

Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique

République du Mali
Un Peuple-Un But-Une Foi

**Université des Sciences, des Techniques et
des Technologie de Bamako**



FACULTÉ DE PHARMACIE



Année universitaire 2018-2019

N.....

Titre :

**PREVALENCE DES POLYMORPHISMES ERYTHROCYTAIRES
CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE PALUDISME DANS DEUX
ZONES D'ENDEMICITE DIFFERENTES AU MALI : DANGASSA ET
NIORO DU SAHEL**

Thèse

présentée et soutenue publiquement le 14/10 /2019 devant la
Faculté de Pharmacie

Par Mr **Sidi Modibo Kane Diallo**

Pour l'obtention du titre de Docteur en Pharmacie (Diplôme
d'Etat)

JURY

Président : Pr Aldiouma GUINDO

Membres: Dr Charles ARAMA

Dr Karim TRAORÉ

Co-directeur: Dr Seidina A.S. DIAKITE

Directeur: Pr Mahamadou DIAKITE

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.

PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
2	Mahamadou	CISSE	Biologie
3	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
4	Souleymane	DIALLO	Bactériologie – Virologie
5	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
6	Ousmane	DOUMBIA	Chimie Thérapeutique
7	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
8	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
9	Alou A.	KEÏTA	Galénique
10	Mamadou	KONE	Physiologie
11	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
12	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
13	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
14	Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER: SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie

3	Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique
6	Amagana	DOLO	Parasitologie - Mycologie
7	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique / Nutrition
8	Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
9	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie - Virologie
2	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
3	Aldiouma	GUINDO	Hématologie
4	Kassoum	KAYENTAO	Santé/Bio-statistique
5	Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER
6	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
7	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
8	Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique
6	Antoine	DARA	Biologie-Moléculaire

7	Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
10	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie clinique
11	Seidina S.A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOÏTA	Biochimie clinique
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé publique
16	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
17	Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
18	Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Oumar	GUINDO	Epidémiologie
6	Falaye	KEÏTA	Santé publique/Santé Environnement
7	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
8	Yacouba	MAÏGA	Bio-statistique
9	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
10	Oumar	SANGHO	Epidémiologie
11	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER: SCIENCES PHARMACEUTIQUES**1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Saïbou	MAÏGA	Législation
3	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
6	Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
7	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
8	Moussa	SANOGO	Gestion
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie
4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie

5	Assitan	KALOGA	Législation
6	Ahmed	MAÏGA	Législation
7	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique
8	Aboubacar	SANGHO	Législation
9	Bourama	TRAORE	Législation
10	Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques
11	Sylvestre	TRAORE	Gestion pharmaceutique
12	Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
13	Mohamed Sarmoye dit	TRAORE	Pharmacie hospitalière

DER: SCIENCES DU MÉDICAMENT

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOUCO	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOUCO	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
8	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
9	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
10	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

DER: SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
2	Sekou F.	TRAORE	Biologie/ Entomologie
3	Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
2	Boureima	KELLY	Physiologie médicale

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
5	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Adourahamane	COULIBALY	Anthropologie médicale
4	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Modibo	DIARRA	Nutrition
7	Moussa I	DIARRA	Biophysique
8	Babacar	DIOP	Chimie
9	Atimé	DJIMDE	Bromatologie
10	Yaya	KANE	Galénique
11	Boubacar	KANTE	Galénique
12	Aboubakary	MAÏGA	Chimie organique
13	Massambou	SACKO	SCMP/SIM
14	Modibo	SANGARE	Anglais
15	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
16	Mme Fatoumata	SOKONA	Hygiène du milieu
17	Fana	TANGARA	Maths
18	Abdel Kader	TRAORE	Pathologies médicales
19	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
20	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

Dédicaces

A Allah

Le Tout Puissant, le Tout-Miséricordieux, et le Très Miséricordieux de m'avoir donné la santé et le courage pour mener à bien ce travail et pour m'avoir fait voir ce jour si important. Qu'Allah guide encore mes pas vers le droit chemin.

A mon père feu Toumani Diallo

Cher père, tu es à l'origine de ce que je deviens aujourd'hui car c'est toi qui m'a inscrit à l'école et tu as suivi mes pas jusqu'à ton dernier jour. Ta rigueur, ta persévérance et ton courage dans le travail ont été pour nous une source d'inspiration inépuisable. J'aimerais bien t'avoir parmi nous aujourd'hui mais Dieu en a décidé autrement. Papa je ne te remercierai jamais assez et je prie que le bon DIEU te pardonne et qu'Il t'accueille dans son paradis. Reposes en paix cher père, Amen !

A ma mère Aichata Hamma Diallo

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

A ma très chère épouse, Mariétou Traoré

Quand je t'ai connu, j'ai trouvé en toi la femme de ma vie, mon âme sœur et la lumière de mon chemin. Ma vie à tes côtés est remplie de belles surprises. Tes sacrifices, ton soutien moral, ta gentillesse sans égale, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Que Dieu réunisse nos chemins pour une longue vie sereine et que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

Remerciements

A mes grands frères Lamine Diallo, Boubacar Diallo et tous les autres

Merci à tous pour vos soutiens, vos bénédictions et vos conseils.

A toutes mes sœurs feu Fatoumata Diallo, Kadiatou Diallo et Binta Diallo, pour vos soutiens et votre affection tout au long de ce travail. De tout cœur je vous souhaite les merveilles du monde.

A tous mes frères Lamine Diallo et Boubacar Diallo, pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi, que Dieu renforce ce lien.

A Dr Bocar Diallo et Idrissa Bouaré, pour avoir été pour moi un confident et un conseiller prodigieux

A tous mes amis Souleymane Maiga, Morifing Doumbia, Amara Coulibaly, Amadou Sacko, Yacouba Coulibaly, Abdramane Bah, Oumar Damango, Assana Yalcouyé, Boubacar Diallo, Fatoumata Kassé, Abdoulaye Keita, Marcel Traoré, vous avez toujours pris mes problèmes comme les vôtres, Ce travail est également le vôtre.

A Dr Seidina Diakité, pour votre sens de travail bien fait, votre apport scientifique et moral ne m'ont jamais manqué, l'amour et l'attention particulière avec lesquels vous m'avez traité depuis mon arrivée resteront gravés dans ma mémoire.

Au Docteur Drissa Konaté, pour votre aide, votre apport scientifique et moral ne m'ont jamais fait défaut durant ce travail. Que DIEU vous accorde une bonne santé le plus longtemps possible.

Au Docteur Bourama keita, grand frère, formateur courageux, rigoureux, engagé, ayant le souci du travail bien fait, merci pour votre soutien.

A toutes l'équipe de l'unité immunogénétique du MRTC : Dr Sory I Diawara, Dr Karim Traoré, Dr Ibrahim Sanogo, Dr Mory Doumbouya, Dr Saibou Doumbia, Dr Bourama Keita, Dr Oumou Coulibaly, Dr Fousseny Doucouré, Feu Dr Amadou Cissé, Dr Fatoumata Kassé, Mr Sidi MK Diallo, Mr Souleymane Maiga, Mr Aboubacar Fomba, Mr Bakaina Diarra, Mr Cheick Traoré, Mlle Larissa Denou, Mlle Kadidia Kone, pour tout le soutien que vous m'avez apporté pendant les moments les plus durs durant mes études, en m'encourageant à ne pas baisser les bras.

A la Gérante et Promotrice de l'officine AYA le Dr Guindo Sali Konaté : En dehors des relations entre Docteur et étudiant, la femme aux qualités énormes que vous êtes a précisément su être pour moi une mère et un soutien. Merci pour tous.

A toute l'équipe de l'officine AYA : Dr Awa Yattara, Dr Bandjougou Berthé, Alfousseyni Guindo, Madame Boité, Madame Maiga Safi, Yacouba coulibaly, Oumar Damago, Assana Yalcouyé et Aliou Keita pour votre soutien et votre bonne compréhension qui m'ont permis d'atteindre ce résultat. Recevez ici toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Hommages aux membres du jury

- PhD, Maitre de conférences agrégé en Hématologie
- Directeur général Adjoint du Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose (CRLD)
- Chef du service de laboratoire du Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose (CRLD)
- Secrétaire général de la société malienne d'hématologie et d'oncologie
- Chevalier du Mérite de la santé
- Lauréat du prix de recherche de l'ordre des pharmaciens du monde

A notre Maître et Président de Jury,

Pr Aldiouma GUINDO

- **PHD, Maitre de conférences agrégé en hématologie**
- **Directeur général adjoint du Centre de Recherche et de Lutte Contre la Drépanocytose (CRLD)**
- **Chef du service de laboratoire du Centre de Recherche et de Lutte Contre la Drépanocytose (CRLD)**
- **Secrétaire général de la société malienne d'hématologie et d'oncologie**
- **Chevalier du mérite de la santé**

Vous nous faites un grand honneur et un réel plaisir en acceptant de présider ce jury. C'est ici l'occasion pour nous de vous rendre hommage, vous dire combien nous avons été séduit par votre engagement sans conditions d'être parmi nous pour juger ce travail. Votre présence dans ce jury apportera une grande amélioration à la qualité de ce travail. Veuillez accepter cher maître, l'expression de notre profond respect.

A notre Maître et Juge, Dr Charles ARAMA

- **Docteur en pharmacie**
- Maître-assistant à la FAPH
- PhD en immunologie

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Votre désir profond de valoriser la profession fait de vous un homme respectable.

Trouver ici, cher maitre, l'expression de notre profonde reconnaissance

A notre Maître et Juge,

Dr Karim TRAORE

Docteur en Pharmacie ;

- **MSc en Neuropharmacologie;**
- **Candidat PhD en Pharmacologie;**
- **Enseignant-Chercheur à la FAPH**

Cher Maître,

Nous sommes très honorés que vous ayez accepté de participer à ce jury malgré vos multiples occupations. Nous avons beaucoup apprécié la spontanéité et la simplicité avec lesquelles vous avez accepté de corriger juger ce travail. Recevez, cher maître, notre sincère reconnaissance.

A notre maître et Co-directeur de thèse

Dr Seidina A S DIAKITE

. Docteur en pharmacie

. PhD en immunologie

- Assistant en Immunologie à la Faculté de Pharmacie / USTTB**

Cher Maître,

Votre simplicité, votre gentillesse et surtout votre esprit de collaboration nous ont beaucoup marqué. Les mots nous manquent pour qualifier tout ce que vous avez fait pour nous. Merci pour l'instruction reçue, merci pour les conseils que vous n'avez cessés de nous prodiguer. Pour nous vous êtes un chercheur de référence. QU'ALLAH le tout puissant vous donne longue vie et pleine de santé.

**A notre Maître et Directeur de Thèse
Professeur Mahamadou DIAKITE**

- **Docteur en Pharmacie**
- **DPhil en immunogénétique**
- **Responsable du laboratoire d'Immunogénétique et d'hémoglobinopathie de Parasitologie (MRTC)**
- **Chef du département des affaires extérieures et de coopération (USTTB)**
- **Directeur scientifique adjoint du centre de recherche clinique de l'USTTB**
- **Secrétaire permanent du comité d'éthique (FMOS /FAPH).**

Cher Maître,

Vous nous avez honorés en acceptant de nous confier ce travail. Votre large ouverture d'esprit, votre gentillesse et votre clairvoyance font de vous un homme et un chercheur exceptionnel. La rigueur scientifique, la perspicacité et le goût de formation que vous avez font de vous un grand scientifique. Nous sommes fiers d'être cités parmi vos élèves. Nous n'oublierons jamais vos conseils et ne cesserons de vous en remercier.

Cher Maître, soyez rassuré de notre profonde reconnaissance.

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ANOFEL	Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie
BCR	B Cell Receptor (Récepteur de la cellule B)
CD	Cluster of Differentiation (aggregate de differentiation, exemple CD36)
CDC	Center for Disease Control and Prevention (Centre de contrôle et de prévention des maladies)
CR1	Complement Receptor 1 (récepteur-1 du complément,)
CRF	Cases Report Form (Formulaire de rapport des cas)
CSA	Chondroïtine Sulfate A
CSCOM	Centre de Santé Communautaire
CSP	Circum Sporozoite Protein (Protéine à la surface du sporozoïte)
EDM	Electron Dense Material (Matériel dense en électron)
FMPOS	Faculté de Médecine, de Pharmacie et d Odontostomatologie
G6PD	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (Facteur de croissance des colonies de macrophage-granulocyte)
GR	Globule Rouge
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
Hb	Hémoglobine
Ht	Hématocrite
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule (molécule d'adhésion intercellulaire)
IFN	Interféron (exemple IFN- α)
Ig	Immunoglobuline (exemple IgE)
IL	Interleukine (exemple IL-1)
IP	Indice plasmodique
IS	Indice splénique
KAHRP	Knob-Associated Histidin Rich protein (protéine riche en histidine associée aux protubérances)
MRTC	Malaria Research and Training Center (Centre de formation et de recherche sur le paludisme)
NADP+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Institut national d'allergie et de maladies infectieuses)
NIH	National Institutes of Health (Instituts nationaux de la santé)
NK Cell	<i>Natural Killer Cell</i> (cellule tueuse naturelle)
NO	Oxide nitrique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PB	Polynucléaire Basophile
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (réaction de polymérisation en chaîne)
PE	Polynucléaire éosinophile

PECAM	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i> (molécule d'adhésion cellulaire endothéliale des plaquettes)
PfEMP	<i>Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane protein</i> (Protéine membranaire érythrocytaire de <i>P. falciparum</i>)
PfHRP	<i>Plasmodium falciparum Histidin Rich protein</i> (protéine riche en histidine de <i>P. falciparum</i>)
PNLP	Programme national de lutte contre le paludisme
PNN	Polynucléaire Neutrophiles
RBC	Red Blood Cells (Globules rouges)
RESA	Ring Erythrocyte Surface Antigen (Antigène à la surface des érythrocytes contenant des formes en anneau)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Facteur nécrosant tissulaire)
USTTB	Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesing Molecule-1</i> (molécule d'adhésion cellulaire vasculaire)
WBC	<i>White Blood Cells</i> (Globules blancs)
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Organisation mondiale de la santé)

Table des matières

Dédicaces	IX
Remerciements	X
Hommages aux membres du jury	XI
Liste des abréviations	XVII
Liste des tableaux	XXI
Liste des figures	XXII
1. Introduction	2
2. Objectifs	4
2.1. Objectif général	4
2.2. Objectifs spécifiques	4
3. Généralités	5
3.1. Généralités sur le paludisme	5
3.1.1. Définition du paludisme	5
3.1.2. Epidémiologie	5
3.1.3. Agents pathogènes	7
3.1.4. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i>	9
3.1.5. Physiopathologie du paludisme	11
3.1.6. Diagnostic et traitement du paludisme	12
3.2. Généralités sur les Variants génétiques et protection contre le paludisme	14
3.2.1. Rappel sur l'hémoglobine normale	14
3.2.2. Hémoglobinopathies	14
4. Méthodologie	19
4.1. Cadre et lieu de l'étude	19
4.2. Sites d'étude	19
4.3. Type et période d'étude	21
4.4. Population d'étude	22
4.5. Echantillonnage	22
4.6. Critères d'inclusion et de non-inclusion	22
4.6.1. Critères d'inclusion	22
4.6.2. Critères de non-inclusion	22

- Refus de participer à l'étude ;	22
4.7. Variables mesurées	22
4.8. Déroulement et procédure d'étude	23
4.9. Collecte gestion et analyse des données	24
5. Résultats	25
5.1. Résultats descriptifs	25
5.2. Résultats analytiques	29
6. Commentaires et discussions	34
7. Conclusion et recommandations	37
7.1. Conclusion	37
7.2. Recommendations	37
8.Limites de l'étude	37
10. Fiche signalétique	41
Abstract	42
11. Annexes	42
11.1. Détermination du taux d'hémoglobine	42
11.2. Détermination du groupe sanguin ABO	44
11.3. Détermination du type d'hémoglobine avec la machine D-10	45
11.4. Procédures standard opératoires (SOP): goutte épaisse	46
11.5. Procédures Standard Opératoires (SOP) : Frottis Mince	50
11.6. Procédures Standard Opératoires (SOP) : Confection du confetti	53
11.6.5. Détection de la mutation 202 A/G responsable du déficit en G6PD par PCR	54
SERMENT DE GALIEN	60

Liste des tableaux

Tableau I. Classification du paludisme en fonction du niveau d'endémicité	6
Tableau II: classification taxonomique du <i>Plasmodium</i> [17]	7
Tableau III. Répartition des sujets en fonction du sexe et du site d'étude	25
Tableau IV. Répartition des sujets en fonction de la Classe d'âge et du site d'étude	25
Tableau V. Répartition des sujets en selon du site d'étude et le groupage sanguin .	25
Tableau VI. Répartition des sujets féminins en fonction du site d'étude et du portage de l'Allèle G6PDA- (mutation <i>G6PG_202A</i>).....	26
Tableau VII. Répartition des sujets masculins en fonction du site d'étude et du portage de l'Allèle G6PDA- (mutation <i>G6PG_202A</i>)	27
Tableau VIII. Répartition des participants en fonction du site d'étude et du type d'hémoglobinique	27
Tableau IX. Répartition des patients selon la gravité du paludisme et le site d'étude	28
Tableau X. Taux moyen d'hémoglobine et la Parasitémie moyenne selon le site d'étude.....	29
Tableau XI. Forme clinique du paludisme selon le site et le groupe sanguin	32
Tableau XII. Forme clinique du paludisme selon le site et le statut en G6PD.....	33
Tableau XIII. Forme clinique du paludisme selon le site et Type d'hémoglobine.....	33

Liste des figures

Figure 1. Cycle de développement de <i>Plasmodium falciparum</i>	10
Figure 4. Illustration des anticorps et antigènes des groupes sanguins érythrocytaires	18
Figure 5. Sites de l'étude	19
Figure 6. Température moyenne et maximale à Nioro du Sahel.....	20
Figure 7. Précipitations moyennes mensuelles en mm de pluies à Nioro du Sahel	21
Figure 8. Critère de gravité du paludisme selon le site d'étude	28
Figure 9. Parasitémie moyenne selon le site et le statut en G6PD.....	29
Figure 10. Technique de la goutte épaisse	48
Figure 11. Technique du frottis mince.....	52

1. Introduction

Considéré comme un problème de santé publique à cause de sa grande mortalité et morbidité infantile dans le monde surtout dans les zones intertropicales, le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. Il constitue un risque majeur pour plus de 3 milliards d'êtres humains et est responsable de nombreux cas de décès dans le monde, notamment en Afrique où il affecte sévèrement les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes [1]. En effet, selon le dernier rapport de l'OMS sur le paludisme dans le monde on assiste à une stagnation, voire une augmentation des chiffres mondiaux [1]. Le nombre de cas de paludisme était d'environ 219 millions en 2017 contre 217 millions en 2016 et le nombre de décès dus à ce problème de santé publique était estimé à 435 000 en 2017 contre 451 000 en 2016 [1].

En Afrique subsaharienne, particulièrement dans les zones rurales pendant la saison de transmission de paludisme (l'hivernage), chaque enfant est susceptible de faire au moins un épisode de paludisme [2].

Au Mali, le paludisme demeure l'endémie majeure et la première cause de morbidité et de mortalité dans les groupes les plus vulnérables, à savoir les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes. Malgré les efforts fournis dans la lutte contre le paludisme, il se situe toujours au 1^{er} rang des affections et représente 44% des motifs de recours aux soins dans les structures de santé au Mali [3]. Malgré les caractéristiques d'endémicité distinctes, toute la population générale est à risque de paludisme. Les niveaux de transmission varient considérablement d'une région à une autre et dans la même région, d'une localité à une autre suivant les conditions écologiques et climatiques [3].

Dans ce contexte, le programme national de lutte contre le paludisme au Mali (PNLP) s'est fixé comme objectif de réduire d'au moins 75% de la morbidité et la mortalité imputables au paludisme. Parmi les principales interventions du plan stratégiques 2013-2014 [3]. On peut citer le renforcement du système de surveillance épidémiologique intégré du paludisme au niveau de tous les districts sanitaires et hôpitaux, et la redynamisation du système de surveillance et de suivi/évaluation des interventions de lutte contre le paludisme.

Cependant, il a été observé que certains sujets font une résistance au paludisme (surtout aux formes graves) allant de la protection contre la mortalité palustre à l'absence d'infection par le *Plasmodium*. Cet état de résistance est essentiellement constitutif donc lié à certains caractères génétiques. L'effet de protection de plusieurs traits génétiques contre diverses manifestations cliniques du paludisme a été rapporté depuis l'hypothèse de Haldane [4]. Le cas du portage du trait drépanocytaire (HbAS) est le plus emblématiques [5]. Plusieurs autres traits génétiques notamment ceux liés au globule rouge ont été associés dans la protection à divers degrés contre le paludisme. C'est le cas de l'hémoglobine C (HbC) [6], le déficit en Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G6PD) [7] [8], le groupe sanguin érythrocytaire O [9], l' α -thalassémie [10]. Si l'effet protecteur de l'HbAS fait

consensus, des résultats contradictoires ont été rapportés pour le cas des autres traits génétiques. Ces contradictions peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs incluant les paramètres environnementaux et épidémiologiques et le design des études.

Ainsi au Mali, des fortes prévalences de l'HbC ont été décrites dans le plateau Dogon où l'HbC est associé à une forte protection contre le paludisme grave [6]. Cependant cet effet protecteur de l'HbC n'a pu être retrouvé dans d'autres zones au Mali où sa prévalence est faible [11]. De même l'HbAS est associée à la protection contre diverses manifestations cliniques du paludisme au Mali dans des zones de forte prévalence de l'HbS [11]. Ces constats suggèrent une composante environnementale dans la protection conférée par ces traits génétiques contre le paludisme. Une meilleure compréhension du rôle de l'environnement dans cette protection faciliterait l'élucidation des mécanismes qui soutiennent ces protections.

Dans ce contexte, il nous est paru judicieux d'étudier la prévalence de ces polymorphismes érythrocytaires chez des patients atteints du paludisme à Dangassa et Nioro du Sahel, deux zones éco-climatiques différentes au Mali présentant de paramètres d'endémicités de paludismes différents.

2. Objectifs

2.1. Objectif général

Etudier la prévalence des polymorphismes érythrocytaires impliqués dans la protection contre le paludisme chez les patients atteints de paludisme vus au CSCom de Dangassa et au CSRéf de Nioro du Sahel pendant les saisons de transmission 2016-2017

2.2. Objectifs spécifiques

- ✓ Estimer la proportion des formes cliniques du paludisme dans les deux sites d'étude ;
- ✓ Déterminer la proportion de l'HbAS, et de l'HbC chez les patients atteints de paludisme vus au CSCom de Dangassa et au CSRéf de Nioro du Sahel pendant la saison de transmission 2016- 2017;
- ✓ Déterminer la proportion de la mutation G6PD (G 202 A) chez les patients atteints de paludisme vus au CSCom de Dangassa et au CSRéf de Nioro du Sahel pendant la saison de transmission 2016- 2017;
- ✓ Déterminer la proportion du groupe sanguin érythrocytaire O chez les patients atteints de paludisme vus au CSCom de Dangassa et au CSRéf de Nioro du Sahel pendant la saison de transmission 2016-2017;

3. Généralités

3.1. Généralités sur le paludisme

3.1.1. Définition du paludisme

Le paludisme est une parasitose due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* et transmis à l'homme par un moustique femelle du genre *Anopheles*. Quatre espèces plasmodiales sont responsables de presque tous les cas humains de paludisme : *P. falciparum* ; *P. vivax* ; *P. ovale* et *P. malariae*. Une cinquième espèce, *P. knowlesi*, a été décrite comme infectant l'homme [12]. La grande mortalité palustre est associée à l'infection par *P. falciparum*.

C'est en 1880 qu'Alphonse Laveran découvre l'hématozoaire du paludisme à partir de l'observation d'une goutte de sang provenant d'un patient infecté par *P. falciparum*, ce qui lui a valu le prix Nobel de médecine ou physiologie en 1907 [13]. De 1895 à 1897, la transmission de cette affection par la piqûre des moustiques du genre *Anopheles* a été soupçonnée par Ross et confirmée par Grassi en 1898 [13].

3.1.2. Epidémiologie

L'épidémiologie du paludisme peut varier considérablement même à l'échelle d'une région géographique relativement petite. Les principaux déterminants de l'épidémiologie du paludisme sont la densité, les habitudes de piqûres et la longévité des moustiques. Plus spécifiquement, la transmission du paludisme est directement proportionnelle à la densité des vecteurs, au carré du nombre de piqûres infestantes par jour et par moustique et à la probabilité qu'un moustique puisse survivre pendant 1 jour à la puissance 10 [14].

Le cycle de transmission fait intervenir trois acteurs : le parasite, le vecteur et l'homme, tous trois en relation dynamique avec les facteurs environnementaux et les conditions socio-économiques. Ces différents facteurs conditionnent l'épidémiologie du paludisme dans une région donnée.

3.1.2.1. Faciès épidémiologique

Les indices qui permettent de classer les zones de transmission du paludisme sont en fonction des facteurs qui conditionnent l'épidémiologie du paludisme. L'indice de stabilité permet de classer le paludisme en deux zones :

- ✓ Les zones de paludisme stable ou endémique : la transmission du paludisme est longue et intense entraînant une prémunition permettant aux individus de limiter les manifestations cliniques graves chez les jeunes enfants.
- ✓ Les zones de paludisme instable ou épidémique : la transmission du paludisme est très courte et il sévit sous forme épidémique. Ce caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition. Tous les individus sont à risque de développer la maladie.

Tableau I. Classification du paludisme en fonction du niveau d'endémicité

Niveau d'endémicité	IP (Yaoundé, 1962)	IS (Kampala, 1950)	Caractéristiques de la transmission
Hypoendémique	<10% chez les enfants de 2-9 ans	<10% chez les enfants de 2-9 ans	Sporadique
Mésoendémique	11-50% chez les enfants de 2-9 ans	11-50% chez les enfants de 2-9 ans	Périodique en fonction de la pluviométrie
Hyperendémique	50-75% chez les enfants de 2-9 ans	50-75% chez les enfants de 2-9 ans	Intense
Holoendémique	>75% chez les enfants de 2-9 ans	>75% chez les enfants de 2-9 ans	Peut survenir toute l'année

IP : *Indice Plasmodique* ; **IS** : *Indice Splénique*.

Au Mali, il y a une extrême variabilité de la situation épidémiologique en fonction des faciès géoclimatiques. Il existe cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme [15].

- Une zone soudano-guinéenne à transmission saisonnière longue ≥ 6 mois. Dans cette zone, l'indice plasmodique (IP) chez les enfants est $\geq 80\%$. L'état de prémunition est acquis vers l'âge de 5-6 ans au prix d'une forte mortalité infantile ;
- Une zone sahélienne à transmission saisonnière courte ≤ 3 mois. Dans cette zone, l'IP se situe entre 50-70%. L'état de prémunition est rarement atteint avant l'âge de 9-10 ans ;
- Une zone de transmission sporadique voire épidémique correspondant aux régions du Nord et à certaines localités des régions de Koulikoro et de Kayes. L'IP est en dessous de 5%. Tous les groupes d'âge sont à risque de paludisme grave ;
- Des zones de transmission bi ou plurimodales comprenant le delta intérieur du fleuve Niger et les zones de barrage et de riziculture (Manatali, Markala, Selingué). L'IP se situe entre 40-50%. L'anémie reste un phénotype clinique important de la maladie ;
- Des zones peu propices à l'impaludation particulièrement dans les milieux urbains comme Bamako et Mopti où le paludisme est hypoendémique. L'IP est $\leq 10\%$ et les adultes peuvent faire des formes graves et compliquées de la maladie.

3.1.2.2. Groupes à risque

Les personnes à risque de paludisme sévère [16] sont :

- Les enfants dans les régions hyper- ou holoendémiques en particulier ceux âgés de six mois à cinq ans ;
- Les sujets de tout âge dans les régions hypo- ou méso-endémiques ;
- Les voyageurs venant de régions où il n'existe pas de transmission de paludisme qui se rendent dans une région impaludée ;
- Les personnes qui retournent dans des régions fortement endémiques après quelques années d'absence ;
- Les femmes enceintes (à risque pour toutes les complications).

3.1.3. Agents pathogènes

a. Taxonomie

Tableau II. Classification taxonomique du *Plasmodium* [17]

Règne :	Protista
Sous-règne :	Protozoa
Phylum :	Apicomplexa
Classe :	Sporozoa
Sous-classe :	Eucoccida
Ordre :	Haemosporidae
Famille :	Plasmodida
Genre :	Plasmodium
Especies :	Falciparum, malariae, ovale, vivax, knowlesi

Il existe d'autres genres que *Plasmodium* qui sont *hepatocystis*, *haemoproteus*, *leucocytozoon*. Ils sont non pathogènes pour l'homme.

Le genre *Plasmodium* compte 172 espèces qui infectent non seulement les mammifères mais aussi les reptiles et les oiseaux. Les parasites qui infectent les humains font partie soit du sous-genre *Plasmodium* (*Plasmodium*) soit du sous-groupe *Plasmodium* (*Laverania*) et les autres parasites infectant les mammifères sont du sous-genre *Plasmodium* (*Vinckeia*). Ces sous-genres se distinguent les uns des autres par des caractères morphologiques et les particularités du cycle biologique qui ont été utilisés comme critères taxonomiques dans la classification classique de Garnham.

b. Espèces

Le paludisme est transmis par un protozoaire du genre *Plasmodium*. Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* touchant diverses espèces animales. Les études ont démontré qu'il existe cinq espèces qui sont pathogènes à l'homme [18].

Plasmodium falciparum

Elle est l'espèce plasmodiale la plus dangereuse de ces cinq parasites causant le paludisme. Il est à l'origine de 99% des cas de paludisme estimés en 2016. Elle représente 85 à 90% de la formule parasitaire au Mali. Il est plus répandu en Afrique subdésertique que dans d'autres régions du monde. L'évolution se fait d'un seul tenant après incubation de 7 à 12 jours. On n'observe pas de rechutes tardives comme avec les autres espèces. *P.falciparum* est responsable des formes cliniques graves, notamment du neuropaludisme. Dans les régions équatoriales, il est transmis toute l'année avec cependant des recrudescences saisonnières.

Plasmodium malariae

Ce parasite se développe sous les tropiques comme en zone tempérée. Sa distribution est aujourd'hui et surtout tropicale. Dans le foie, la schizogonie exo-érythrocytaire de *P. malariae* est capable de former des hypnozoïtes (formes quiescentes du parasites) qui pourront entraîner des reviviscences très tardives [19], jusqu'à 20 ans après l'infection initiale dans une zone endémique. Il se différencie des autres espèces par une incubation plus longue 15 à 21 jours, par une périodicité différente de la fièvre et surtout par sa capacité à entraîner des reviviscences très tardives (jusqu'à 20 ans après le retour de la zone d'endémie) [19]. Dans le sang, le *P. malariae* infecte préférentiellement les érythrocytes âgés [20] et les cycles érythrocytaires provoquent des fièvres quartes bénignes. *P. malariae* peut causer des problèmes rénaux à long terme [21].

Plasmodium vivax

Très largement répandu en Amérique du sud et en Asie, il est beaucoup plus rarement observé en Afrique. Les érythrocytes du groupe sanguin Duffy négatif ne possèdent pas le récepteur membranaire nécessaire à l'infection par *P. vivax*. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours. On observe des rechutes pendant 3 à 4 ans. L'affection par *P. vivax* est classiquement considérée bénigne mais en zone d'endémie il peut avoir des répercussions graves sur l'état de santé des populations, notamment par l'intermédiaire des anémies chez l'enfant.

Plasmodium ovale

Il sévit en Afrique intertropicale du centre et de l'ouest (et dans certaines régions du pacifique) et provoque une fièvre tierce bénigne, comme *P. vivax* dont il est très proche. Son incubation est de 15 jours au minimum mais peut être beaucoup plus longue, jusqu'à 4 ans. Son évolution est bénigne mais on peut observer, comme avec *P. vivax*, des rechutes tardives (5 ans) [19].

Plasmodium knowlesi

Il sévit en Asie du sud-est (particulièrement en Malaisie, à Borbéo), en zone forestière car il touchait initialement le singe. Il est morphologiquement proche de ***P. malariae*** et se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24 heures responsable d'une fièvre quotidienne. Il existe de rares formes graves, voire mortelles, avec de fortes parasitémies.

3.1.4. Cycle biologique du *Plasmodium*

Les plasmodies sont des protozoaires ayant un cycle complexe qui se déroule successivement chez l'homme (phase asexuée chez l'hôte intermédiaire) et chez l'anophèle (phase sexuée chez l'hôte définitif) [22]. La connaissance du cycle du paludisme permet de comprendre les modalités de sa transmission. Le paludisme est transmis par la pique infestant d'un moustique, l'anophèle femelle. La phase sanguine du cycle rend possible d'autres modes de contamination telles que la transmission congénitale, la transmission transfusionnelle, par greffe d'organe. Les facteurs favorisant la transmission sont la température, l'eau et l'humidité, les facteurs anthropiques (barrage, irrigations, déforestation, transports, migration, etc.)

3.1.4.1. Cycle chez le moustique (sporogonie)

Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des formes sexuées du *Plasmodium*, les gamétocytes mâles (microgamétocytes) et femelles (macrogamétocytes). Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'ex flagellation à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés. Il en résulte un zygote appelé ookinète; celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste.

Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique suivie par plusieurs milliers de mitose qui conduit à la production de sporozoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments mobiles et haploïdes dans l'hémolymph. Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infectante. Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule entre 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et l'espèce en cause.

3.1.4.2. Cycle chez l'homme

3.1.4.2.1. Cycle exo érythrocytaire

Au cours de la piqûre, l'anophèle femelle infecté injecte dans un capillaire des sporozoïtes. Les sporozoïtes transitent dans la circulation générale et, en quelques minutes, ils envahissent les hépatocytes grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte (CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte. Le sporozoïte entre alors dans une phase de réplication, au sein de la vacuole parasitophore. S'en suit alors une prolifération intracellulaire du parasite qui repousse en périphérie le noyau de la cellule et finit par constituer une masse multi-nucléée appelée schizonte (schizonte hépatocytaire). Cette schizogonie intra hépatocytaire aboutit à la formation de milliers de mérozoïtes qui seront libérés dans la circulation sanguine après la rupture du schizonte. Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure 8 à 15 jours, selon les espèces (figure 1).

3.1.4.2.2. Cycle intra érythrocytaire

C'est la seule phase symptomatique du cycle, d'intensité variable selon les individus. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte vont débiter le cycle sanguin **asexué** de prolifération de *P. falciparum* en infectant les érythrocytes. Le mérozoïte pénètre grâce à un processus parasitaire actif et se différencie au sein de la vacuole parasitophore en anneau (trophozoïte jeune), puis en trophozoïte mature, stade à partir duquel une intense phase répliquative commence. Il donne alors naissance au schizonte (schizonte érythrocytaire), celui-ci après segmentation montre une forme caractéristique de rosace, puis libère 8 à 32 mérozoïtes qui rapidement réinfectent des érythrocytes sains. L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*.

L'apparition des gamétocytes se déroule en général la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. A la suite d'une nouvelle piqûre par un anophèle (figure 1-8), les gamétocytes mâles et femelles (au dimorphisme sexuel marqué) sont ingérés avec le repas sanguin. Il est à noter que moins de 20% des piqûres de moustiques contenant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires sont responsables d'infections en zone endémique.

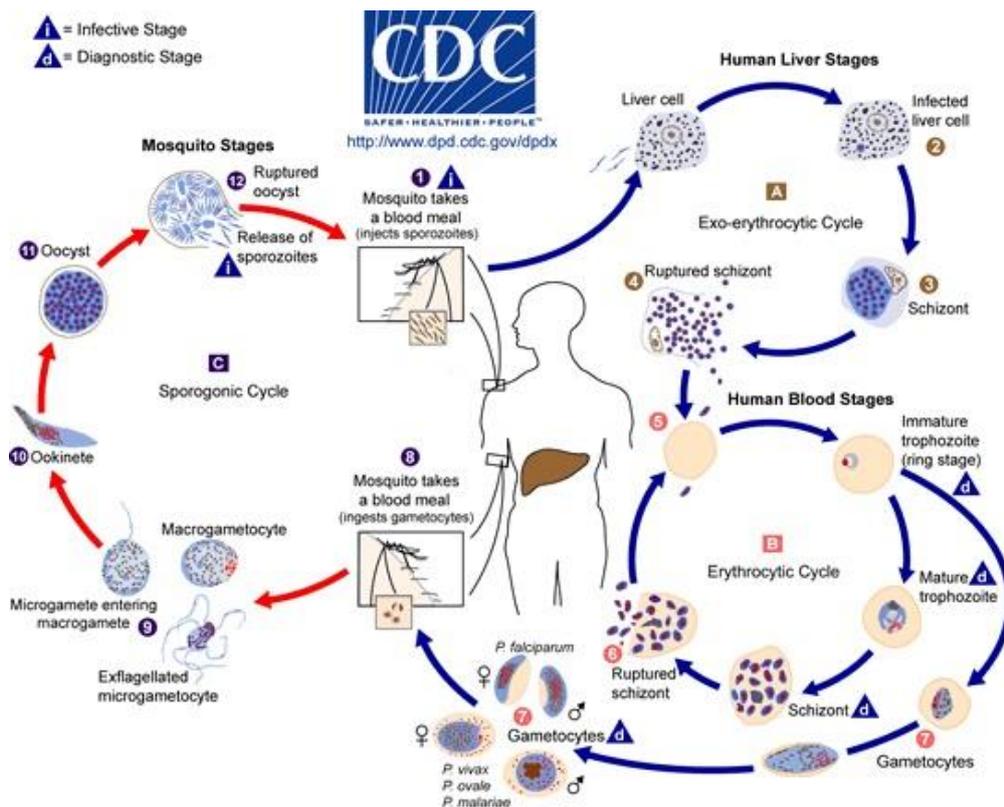


Figure 1. Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*
A. Cycle chez le moustique ; B. cycle chez l'homme

Source : www.dpd.cdc.gov/dpdx, consultée le 16 oct. 18

3.1.5. Physiopathologie du paludisme

Le paludisme et ses complications sont la résultante d'une cascade d'évènements physiopathologiques, influencés à la fois par le parasite et les facteurs liés à l'hôte (y compris l'immunité et les facteurs de susceptibilité génétiques).

3.1.5.1. Accès palustre simple

Les symptômes du paludisme commencent à se développer à partir du stade intra érythrocytaire du cycle de développement du parasite. La fièvre est surtout due à une substance pyrogène (l'hémozoin) déversée lors de l'éclatement des globules rouge parasités. En plus, plusieurs cytokines ont un effet pyrogène comme l'IL-1, l'IL-6 et surtout le TNF- α [23]. La destruction des globules rouges conduit à l'anémie ainsi que d'autres mécanismes auto-immunitaires telles que :

- ✚ La fixation de l'antigène plasmodial soluble sur les membranes érythrocytaires,
- ✚ L'action de facteurs plasmatiques libérés par les parasites et fragilisant les parois érythrocytaires,
- ✚ L'activité opsonisante d'autres produits du métabolisme parasitaire favorisant la phagocytose des hématies par les monocytes. Au cours de l'infection, le système monocyte macrophage débarrasse l'organisme non seulement des pigments malariques mais aussi des débris érythrocytaires, ce qui entraîne l'hépatosplénomégalie.

La parasitémie doit atteindre un seuil critique avant que la rupture des schizontes ne déclenche un accès clinique. Par conséquent, les premiers cycles érythrocytaires restent généralement asymptomatiques. Le seuil de parasitémie est néanmoins variable d'un sujet à l'autre. Un sujet naïf qui n'a jamais fait de paludisme, est susceptible de faire un accès clinique avec une parasitémie à peine détectable (0,001%) alors qu'un enfant d'âge scolaire (6- 9ans) en zone d'endémie restera le plus souvent asymptomatique, même à une parasitémie très élevée[24].

3.1.5.2. Accès palustre grave et compliqué

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

- **les obstacles mécaniques sur la circulation micro-capillaire et veineuse** à cause d'une déformabilité diminuée des érythrocytes parasités et de la formation de "rosettes" constituées d'un globule rouge parasité auquel adhèrent, par un mécanisme non élucidé (les antigènes et les immunoglobulines exposés à sa surface

joueraient un rôle), des érythrocytes normaux. Ces phénomènes entraînent une diminution du débit circulatoire et un coma métabolique réversibles [25].

- **l'adhérence immunologique de globules rouges parasités à l'endothélium vasculaire post-capillaires** entraînant des ralentissements circulatoires importants. Cette adhérence serait sous la dépendance de certaines protéines de surface des globules rouges parasités visibles au microscope électronique (protubérances ou "knobs"), des lymphocytes T CD4+, de certaines interleukines, en particulier le TNF et les récepteurs endothéliaux tels que la molécule d'adhésion intercellulaire de type I (ICAM-1) [25].

L'expression symptomatique consiste en une hémiplégie ou des convulsions (zones motrices), des troubles thermorégulateurs avec hyperpyrexie (hypothalamus), une altération progressive de la conscience si le cerveau entier est atteint. Le neuropaludisme évolue rapidement sans traitement vers le coma puis le décès du malade [25].

3.1.6. Diagnostic et traitement du paludisme

3.1.6.1. Diagnostic biologique

La goutte épaisse, le frottis sanguin et la biologie moléculaire sont les trois examens de référence permettant la mise en évidence du parasite dans le sang au microscope. Ces techniques permettent le repérage du *Plasmodium* dans le sang, la quantification de la charge parasitaire et la détermination de l'espèce plasmodiale.

Tests de diagnostic rapide immunochromatographiques sont utilisés aussi pour le diagnostic sérologique du paludisme. Le principe de ces tests consiste à détecter les protéines spécifiques de *Plasmodium* (antigènes HRP-2 ou enzymes pLDH, aldolase), en chromatographie sur un support solide.

3.1.6.2. Prise en charge du paludisme

Actions préventives

Les mesures préventives visent à protéger soit contre l'infection, soit contre le développement de la maladie chez les individus infectés. Il n'existe actuellement aucun vaccin autorisé sur le marché contre le paludisme, mais un essai vaccinal contre *P. falciparum* est en cours d'évaluation en Afrique sub-saharienne. Ce candidat vaccin, connu sous le nom de RTS, S/AS01, est en bonne voie selon l'OMS. En 2015, l'Agence européenne du médicament a donné un avis favorable pour la poursuite des études sur ce vaccin RTS, S/AS01 (Mosquirix®) en Afrique, qui est un vaccin contre le paludisme et l'hépatite virale B, le « S » situé après la virgule désignant l'antigène HBs. L'OMS a confirmé en 2016 que le vaccin RTS, S/AS01 sera déployé en Afrique subsaharienne, dans le cadre de projets pilotes dès 2018. Toutefois, ce vaccin n'étant que partiellement efficace viendra renforcer les mesures

de prévention, de diagnostic et de traitement recommandées par l'OMS, auxquelles il ne se substituera pas [26].

Les différentes stratégies de prévention mise en œuvre au Mali selon les recommandations de l'OMS sont la lutte anti vectorielle (utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides, l'utilisation de biolarvicides pour la destruction des gîtes larvaires ; la pulvérisation intra domiciliaire), le Traitement Préventif Intermittent (TPI) avec la Sulfadoxine-Pyriméthamine au cours des consultations prénatales ; la Chimio-prévention du paludisme saisonnier chez les enfants de 3 à 59 mois qui consiste à administrer quatre doses de SP et Amodiaquine (AQ) à un mois d'intervalle pendant la période de haute transmission [27].

Actions curatives

Pour le traitement curatif du paludisme simple, l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) est recommandée par l'OMS depuis 2004. En cas de paludisme grave, le traitement se fera par les sels de quinine en perfusion intraveineuse ou par les dérivés de l'Artémisinine injectables. Tous ces moyens nécessitent une politique économique et sociale onéreuse impliquant la participation de chacun pour une meilleure amélioration de la couverture sanitaire de la population.

Les différentes options thérapeutiques recommandées par l'OMS pour le traitement des accès palustres simples sont les suivantes :

- Artéméther-Luméfantrine (Coartem[®], dans tous les pays du monde),
- Artésunate + Amodiaquine (ASAQ[®], dans les zones où le taux de succès thérapeutique de l'Amodiaquine en monothérapie est supérieur à 80%),
- Artésunate + Sulfadoxine Pyriméthamine (Artecon[®], dans les zones où le taux de succès thérapeutique de la SP en monothérapie est supérieur à 80%).

Pour le traitement des accès graves, l'artésunate injectable est le médicament de première intention en raison de 2,4 mg/kg de poids corporel par voie intraveineuse (IV) ou intramusculaire (IM) suivi par la même dose en 12 h et 24 h plus tard et, par la suite, une fois par jour jusqu'à ce que le patient puisse prendre ses médicaments par voie orale. En l'absence d'Artésunate injectable, l'Artéméther (3,2 mg/kg de poids corporel en intramusculaire le J1 puis 1,6 mg/kg par jour) ou la quinine (20 mg de sel de quinine/kg à l'admission, puis 10 mg/kg toutes les 8h en perfusion intraveineuse, diluée dans 10 ml/kg de soluté salin isotonique). D'autres médicaments seront donnés en fonction des manifestations cliniques comme la fièvre, les convulsions et l'hypoglycémie etc.

3.2. Généralités sur les Variants génétiques et protection contre le paludisme

3.2.1. Rappel sur l'hémoglobine normale

L'hémoglobine humaine est une protéine dont la principale fonction est le transport de l'oxygène dans l'organisme humain et chez les invertébrés. Elle se retrouve essentiellement dans les globules rouges du sang, ce qui leur confère leur couleur rouge. L'Hb est constitué de quatre chaînes de globines (deux chaînes α et deux chaînes β) et de quatre molécules d'hème. Sa synthèse se fait dans les érythroblastes médullaires et est stimulée par l'érythropoïétine. Cette synthèse nécessite la présence de certains éléments comme le fer, le cuivre, la vitamine B12, la vitamine B6, la vitamine C et l'acide folique et entre autres [28].

En fonction de la nature des deux chaînes β de la globine, on distingue l'HbA (α_2, β_2), l'HbA2 (α_2, δ_2) et l'HbF (α_2, γ_2). Cette dernière est retrouvée chez le nouveau-né, et son taux commence à s'abaisser dès l'âge de 6 à 8 mois. Chez l'adulte sain, l'hémoglobine A est majoritaire. Les valeurs normales du taux d'hémoglobine se situent entre 13 à 18g/dl chez l'homme et 12 à 16g/dl chez la femme [29].

3.2.2. Hémoglobinopathies

3.2.2.1. Le gène drépanocytaire

La drépanocytose est une maladie génétique récessive autosomique liée à une anomalie de structure de la chaîne β de l'hémoglobine. C'est une maladie héréditaire très répandue dans le monde principalement chez les sujets noirs d'Afrique équatoriale, mais également dans le pourtour méditerranéen, le moyen-orient, le continent indien et les zones de migration de ces populations (noirs américains par exemple). C'est un problème majeur de santé publique en Afrique noire où la prévalence du trait drépanocytaire est très élevée 15 à 25% en Afrique centrale et de l'ouest. Elle est de 10 à 12% dans les DOM(Département français d'œuvre Mer) d'Amérique, de 1 à 15% dans régions méditerranéennes [30].

Le gène drépanocytaire résulte d'une mutation ponctuelle au niveau de la position 6 du gène codant pour la chaîne β de l'hémoglobine, où la séquence GAG est remplacée par GTG. Cette mutation conduit au remplacement de l'acide glutamique par la valine, entraînant la formation de l'HbS [30]. Par conséquent, dans la condition d'hypoxie, l'hémoglobine perd sa forme et sa fonctionnalité pour prendre la forme en faucille incapable de survivre dans cette condition, d'où l'hémolyse aboutissant à une anémie.

Certaines circonstances comme l'hypoxie, la déshydratation, une acidose ou une hyperthermie peuvent entraîner une polymérisation de l'HbS. Cette polymérisation entraîne une altération de la fonction membranaire avec augmentation de la perméabilité aux ions, à la déshydratation, à la cristallisation de l'HbS et à la déformation caractéristique des globules rouges en faucille. Ce type de globules rouges rigides et peu déformables, est responsable de l'hyperviscosité sanguine et

des complications vaso-occlusives rencontrées dans la drépanocytose. Les globules rouges falciformés sont éliminés rapidement à cause de leur durée de vie courte.

Les différentes formes de la drépanocytose rencontrées sont la forme hétérozygote ou porteur du trait drépanocytaire AS, la forme homozygote (SS) et les drépanocytaires composites SC, S/ β^+ thal et S/ β^0 thal [31]. Le trait drépanocytaire est généralement asymptomatique. L'hémogramme est normal ainsi que la morphologie des globules rouges. Il conférerait une protection contre certaines formes de paludisme, ce qui expliquerait la distribution géographique de la drépanocytose dans les zones impaludées.

La maladie drépanocytaire concerne la forme homozygote SS mais également les hétérozygotes composites SC et S β thalassémies. Le tableau clinique de la forme homozygote se caractérise par une anémie hémolytique, des accidents ischémiques vaso-occlusifs secondaires au blocage des petits vaisseaux par les globules rouges peu déformables. Les formes hétérozygotes composites entraînent des manifestations cliniques variables allant des formes quasi asymptomatiques à une drépanocytose très sévère[32].

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

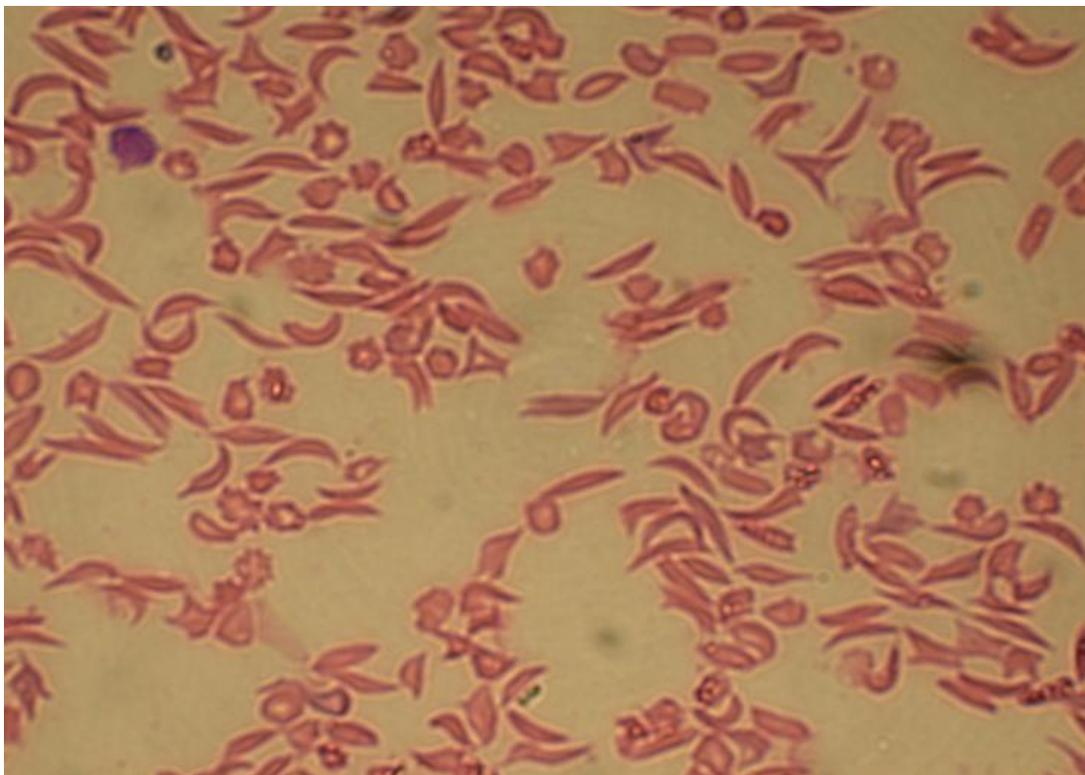


Figure 2. Illustration des globules rouges falciformes sur frottis mince

Source : http://www.lifl.fr/~touzet/M1/Sickle-cell_anemia.jpg

3.2.2.2. Hémoglobine C

L'hémoglobine C est retrouvée à travers l'Afrique de l'ouest surtout sur le plateau Voltaïque. Elle est asymptomatique chez les sujets hétérozygotes et ne comportant qu'une hémolyse extrêmement modérée souvent accompagnée d'une grosse rate chez les sujets homozygotes. C'est une affection génétique à transmission récessive, il s'agit d'une mutation ponctuelle au niveau de la position 6 de la chaîne β globine, c'est-à-dire, la séquence GAG est remplacé par AAG conduisant au remplacement de l'acide Glutamique par la Lysine. Par conséquent, l'HbA est remplacé par l'HbC [33].

La coïncidence de la distribution géographique de cette affection génétique érythrocytaire avec celle de l'endémie palustre passée ou présente suggère qu'elle est impliquée dans la protection contre le paludisme. En effet, l'HbC hétéro- et homozygote protègent tous contre le paludisme sévère ; mais il semble que cette protection soit élevée pour les sujets homozygotes [34]. Une étude menée sur 4348 sujets au Burkina Faso suggère une réduction de 29 à 93% de risque de paludisme clinique chez les sujets de type d'HbC hétérozygotes et homozygotes, respectivement [35].

Certaines études récentes ont démontré l'effet protecteur de cette hémoglobinopathie contre le paludisme grave, comme celle conduite au Mali chez les Dogons, qui a démontré que l'HbAC était associée approximativement à 80% de réduction du risque de paludisme grave [36]. Aucun cas de paludisme grave n'a été observé chez les 7 sujets homozygotes HbCC inclus dans cette étude. Ce résultat suggère que les sujets homozygotes sont plus protégés que les sujets hétérozygotes.

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

- **la diminution de la séquestration des globules rouges parasités** dans la micro circulation sanguine reconnue comme facteur déterminant la survenue des formes graves de paludisme ;
- **une augmentation de la clairance splénique des globules rouges parasités.** Le premier mécanisme semble être le mécanisme prépondérant. On expliquerait ainsi la protection conférée par l'HbC contre la plupart des formes graves du paludisme même chez les enfants de moins de cinq ans qui manquent encore d'immunité spécifique acquise antipaludique suffisante [37].

3.2.2.3. Déficit en G6PD

Le déficit en G6PD, encore appelé favisme, est le plus fréquent des déficits héréditaires enzymatiques du globule rouge. Il touche environ 420 millions de personnes dans le monde, avec une fréquence plus élevée dans les pays du pourtour méditerranéen, d'Afrique tropicale, du moyen orient et d'Asie tropicale et sud-tropicale. Les populations d'origine africaine et hispanique de l'Amérique du nord et du sud et des Antilles sont également touchées [32].

Le glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est une enzyme présente dans le cytoplasme de toutes les cellules de l'organisme. Il est impliqué dans la première étape de la voie métabolique des pentoses phosphates, produisant ainsi le NADPH (coenzyme nécessaire à la réduction du glutathion oxydé). Pour le globule rouge qui manque de noyau, de mitochondrie et d'autres organites, l'enzyme G6PD est particulièrement importante. La protéine G6PD a un poids moléculaire de 59 kDa et chaque unité est composée de 515 acides aminés. Le gène de la G6PD chez l'homme est situé dans la région télomérique du bras long du chromosome X sur la partie q28 [38].

Ce gène se compose de 13 exons et atteint approximativement 18 kb. L'enzyme de référence est dénommée G6PD (B+) dont l'activité enzymatique est de 100% avec une fréquence de 60-80% dans la population. Le variant (A+) a une fréquence de 15-40% avec une activité enzymatique de 80%. Elle diffère de la forme B+ par un nucléotide en position 376 de la séquence nucléotidique (l'adénine est remplacée par la guanine). Cette mutation n'a pas de conséquence clinique et ne confère pas de résistance au paludisme [39]. Le variant (A-) rencontré dans la population noire notamment en Afrique sub-saharienne, atteint typiquement des fréquences de près de 25% dans les populations vivant en zones d'endémie palustre. Ce variant a une activité enzymatique de 12% [39] et a été décrit comme un facteur de réduction du risque de paludisme grave pour les femmes G6PD hétérozygotes et les hommes G6PD Hémizygotés [40].

3.2.2.4. Groupe sanguin ABO

L'expression des antigènes glucidiques du système du groupe sanguin ABO à la surface des globules rouges a été décrite pour la première fois par Karl Landsteiner en 1900 [41] et représentait une étape importante pour le développement d'une transfusion sanguine sans risque. Plus tard, en 1941, Hartmann démontrait que l'expression des antigènes ABO n'était pas confinée aux hématies, lesquelles conduisaient au nom plus précis d'antigènes du groupe histo-sanguin [42]. La base moléculaire du système de groupe sanguin ABO a été élucidée en 1990 [43]. Le système a été décrit pour la première fois avec trois antigènes, six génotypes et quatre phénotypes, mais est démontré maintenant comme étant hautement polymorphique [41]. Le système ABO est défini selon :

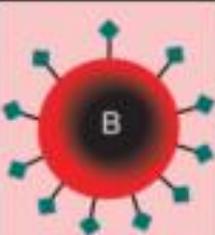
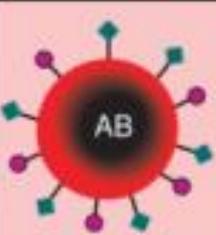
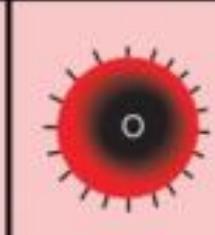
- **la présence ou non d'antigènes A ou B à la surface des globules rouges.** Ainsi, les globules rouges du groupe sanguin A possèdent l'antigène A, ceux du groupe B l'antigène B, ceux du groupe AB les antigènes A et B alors que ceux du groupe O ne contiennent ni l'antigène A ni l'antigène B.

- **La présence ou non d'anticorps anti-A ou anti-B dans le sérum.** La présence d'un antigène dans un organisme implique l'absence de son anticorps spécifique dans cet organisme (sous peine de formation d'un complexe anticorps-antigène). La recherche des antigènes définit l'épreuve de **Beth-Vincent** alors que celle des anticorps définit l'épreuve de **Simonin-Michon** et sont obligatoires et doivent être

concordantes pour établir un groupe sanguin ABO. Une exception, toutefois, chez le nouveau-né de moins de six mois dont les anticorps ne sont pas bien développés, et chez lequel ne sont donnés que des résultats non définitifs.

Le mécanisme par lequel **le groupe O** a un avantage sur **le groupe A** par rapport au paludisme met en avant l'hypothèse de cytoadhérence et le phénomène de rosetting [44].

Figure 2. Illustration des anticorps et antigènes des groupes sanguins érythrocytaires

	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	 Antigène A	 Antigène B	 Antigène A et B	Pas d'antigène

Source : Ifmsciences.skyrock.com consulte le 28/02/19

<http://www.hema-quebec.qc.ca/sang/savoir-plus/groupes-sanguins.fr.html>

4. Méthodologie

4.1. Cadre et lieu de l'étude

Cette étude s'est déroulée dans le cadre d'un projet de recherche sur la diversité génomique des populations de parasite en vue du développement d'un vaccin contre la phase sanguine de *P. falciparum* au Mali financé par le DELTAS Africa une initiative de l'Académie Africaine des Sciences à travers le Centre Ouest Africain de Biologie Cellulaire des Pathogènes Infectieux (WACCBIP) basé à l'Université de Ghana (Grant DEL-15-007: Awandare). L'étude s'est déroulée dans deux faciès épidémiologiques différents : Nioro du Sahel et le village de Dangassa.

4.2. Sites d'étude

L'étude s'est déroulée dans deux localités du Mali : Nioro du Sahel et Dangassa choisis pour leur grande différence sur le plan épidémiologique palustre.

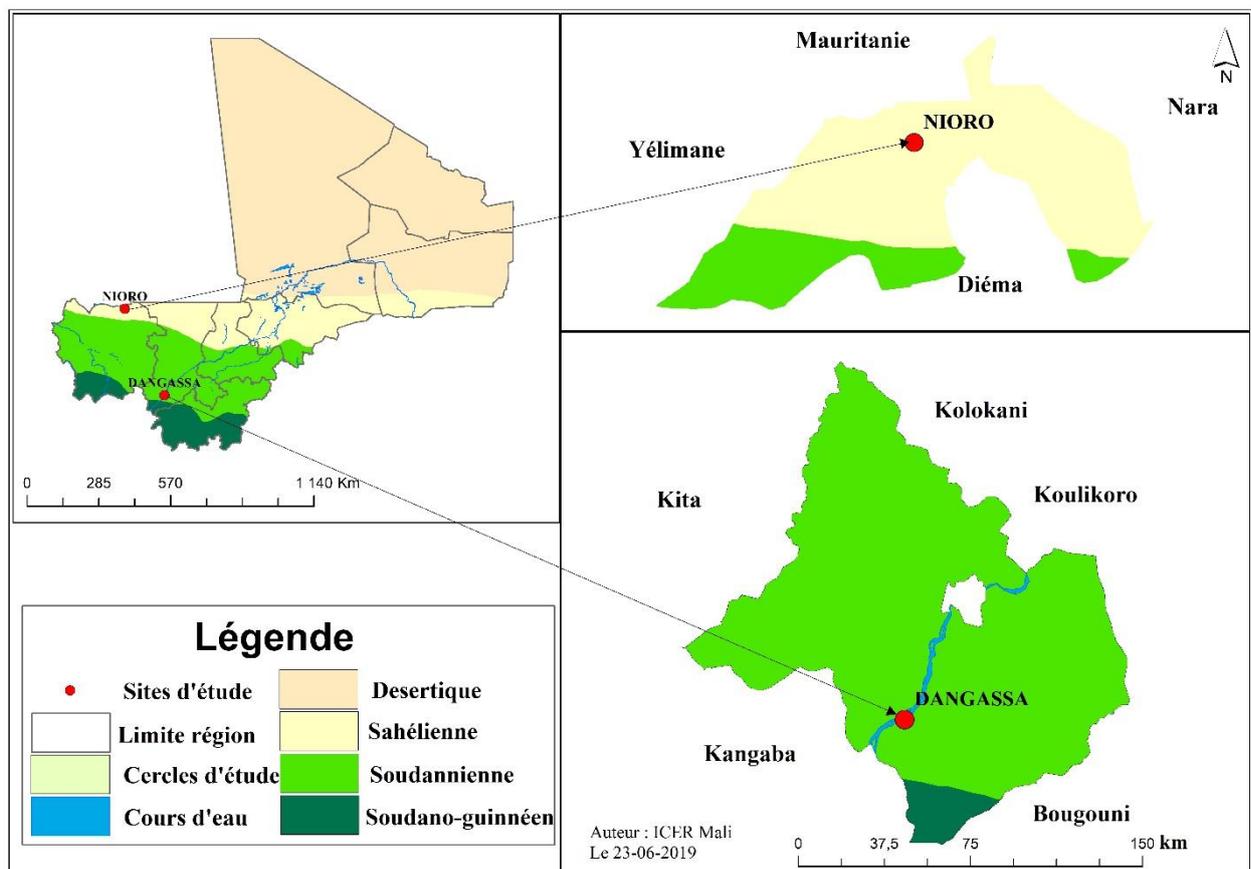


Figure 3. Sites de l'étude

Source : ICER MALI le 23/06/2019

➤ Nioro du Sahel

Nioro du Sahel est situé à 241 km au nord-est de Kayes (chef-lieu de la première région administrative du Mali) et à 447 km de Bamako. Il est situé entre la latitude 14°30 et 16°30 nord et les longitudes 11°00 et 9°00 ouest. Nioro du Sahel est le chef-lieu de la commune et du Cercle du même nom. Il compte 16 communes et couvre une superficie de 11 060 km².

Le climat est nord sahélien avec deux saisons bien marquées : l'hivernage va de juillet à septembre. En année moyenne, on enregistre en moyenne 300 mm de pluies (figure 2). Il fait très chaud en avril, mai et juin (45°C, figure 2). Ce qui caractérise surtout Nioro du Sahel est le fort taux d'évaporation des eaux de surface avec 80%. Ceci explique en grande partie le tarissement précoce des points d'eaux naturels. Les mares de Korkodio et de Gakou constituent des réservoirs d'eaux importants.

La végétation est essentiellement composée d'arbustes épineux avec une domination d'Acacia (peuplement d'*Acacia Sénégalensis* au nord du cercle).

La population du cercle est cosmopolite, composée de Soninké, Peuls, Maures, Kagoro et Bambara y vivent en paix. Cette population est estimée à environ 253 000 habitants (sources DNCT).

L'agriculture et l'élevage restent les deux occupations majeures de la population. Le commerce et l'artisanat sont assez bien développés dans la ville de Nioro du Sahel. La commune urbaine de Troungoumbé abrite le plus grand marché à bétail de la région. La population du cercle est confrontée à d'énormes problèmes de santé, d'éducation, de communication. Le manque d'infrastructure et d'équipements est senti à tous les niveaux. La couverture sanitaire en termes d'infrastructures construites est passée du simple au triple (07 CSCOM en 2001 contre 14 en 2005 et 21 en 2015). Par rapport à l'accessibilité géographique de la population aux services socio- sanitaires, le taux est passé à 42% pour les populations situées à moins de 5 km et à 62% pour celles résidentes à moins de 15 km. Le taux de consultation prénatale est passé de 37% en 2001 à 65% en 2005. Le taux d'accouchement assisté demeure constant à 31%. Les maladies courantes sont le paludisme et les infections respiratoires chez les enfants. On note une recrudescence de la tuberculose liée à la pandémie du SIDA.



Figure 4. Température moyenne et maximale à Nioro du Sahel

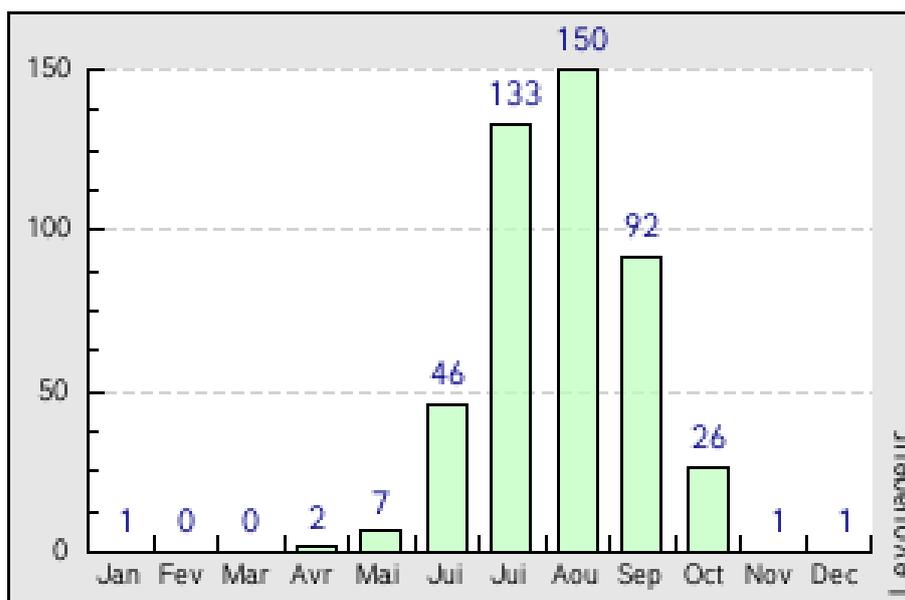


Figure 5. Précipitations moyennes mensuelles en mm de pluies à Nioro du Sahel

Village de Dangassa

Dangassa est situé dans le district sanitaire d'Ouélessébougou, cercle de Kati, région de Koulikoro. Autre fois, le village s'appelait Tintinbilé (plateau rouge), et aurait été fondé vers le 13ème siècle par Manssa Dan camara venu de Kong. Il s'installa sur un plateau où poussait une herbe appelée en malinké Ngasan. Quand son frère Kamadjan lui rendit visite et dit « nous viendrons nous installer à Dan ka Ngasanfièra » ce qui signifie en malinké (le plateau où pousse l'herbe Ngasan) que le village prend le nom de Dangassa. Ce village compte environ onze milles(11000) habitants composés essentiellement de malinké, mais aussi les bambaras, peuhls, les somono, les dogons et les mossis.

Situation géographique

Le village de Dangassa est situé à 82km au Sud-ouest de Bamako sur la route nationale 7, dans la commune rurale de Niagadina, sous-préfecture de Kourouba, préfecture de Kati, région de Koulikoro.

Il est limité à l'Est par le village de Ballala, au Nord-Est part le village de Makono à l'Ouest par le village de Niagadina, au Nord par le fleuve Niger, et au Sud par le village de Faraba de Bamako.

4.3. Type et période d'étude

Nous avons mené une étude transversale prospective qui consistait à collecter des données chez les patients reçus en consultation pour paludisme aux centres de santé de Nioro et Dangassa au cours de la saison de transmission palustre de septembre à décembre 2016 et d'août à décembre 2017. Une équipe médicale assurait la permanence dans le centre de santé des deux localités pendant toute la

période de l'étude. Et les populations étaient encouragées à fréquenter les centres en cas de maladie.

4.4. Population d'étude

La population d'étude était constituée de toutes les personnes âgées de 6 mois et plus se présentant aux centres de santé de Niro et Dangassa pour paludisme.

4.5. Echantillonnage

L'échantillonnage était exhaustif nous avons inclus tous les patients qui se sont présentés aux centres avec des signes de paludisme et accepté de participer à l'étude chez qui un test rapide de diagnostic du paludisme (TDR) a été réalisé.

4.6. Critères d'inclusion et de non-inclusion

4.6.1. Critères d'inclusion

Les personnes répondant aux critères suivants ont été inclus dans cette étude :

- accepter de participer à l'étude
- Etre âgé de 6 mois et plus
- Avoir donné son consentement libre et éclairé ;
- Avoir un taux d'Hb $\geq 8,5$ g/dl ;
- Avoir un TDR positif.
- Avoir une goutte épaisse (GE) positif

4.6.2. Critères de non-inclusion

- Refus de participer à l'étude ;
- Toute condition qui selon l'opinion de l'investigateur pourrait rendre le patient incapable de suivre le protocole (par exemple, maladie psychiatrique).
- Toute condition qui, selon l'opinion de l'investigateur, pourrait être un facteur confondant dans l'analyse des données ou poser un risque d'exposition inutile au personnel de l'étude (par exemple, sujets reconnus infectés par le virus du SIDA ou ayant le SIDA).

4.7. Variables mesurées

Nous avons mesuré les variables suivantes :

- sociodémographiques : l'âge, le sexe, la résidence, ethnie.
- clinique : température, le poids
- biologiques : Goutte épaisse/frottis mince, le taux d'hémoglobine (Hb), le Statut en G6PD, le statut hémoglobinique le groupage sanguin érythrocytaire.

Définitions opérationnelles

- **Accès palustre** : il a été défini par la présence d'au moins un signe du paludisme et la présence de *P. falciparum* dans le sang.
- **Accès palustre grave** : présence de l'un des signes du paludisme grave et la présence du *P. falciparum* dans le sang selon l'OMS
- **La prostration** désigne spécifiquement un état de faiblesse et de fatigue extrêmes qui se manifeste par l'effondrement des fonctions musculaires du patient et par son immobilité.
- **Hyperparasitémie** a été définie par la présence de plus de 100000 trophozoïtes sur une goutte épaisse.
- **Anémie** a été définie comme un bas niveau d'hémoglobine dans le sang, comme attestée par la réduction de la qualité et de la quantité d'hématies associés à une réduction de la capacité de transport d'oxygène. Nous avons utilisé la définition des différents degrés d'anémies en Afrique selon l'OMS.
 - **absence d'anémie** : un taux d'hémoglobine ≥ 10 g/dl,
 - **anémie modérée** : un taux d'hémoglobine compris entre 7 et 9,9g/dl,
 - **anémie sévère** : un taux d'hémoglobine < 7 g/dl.

4.8. Déroulement et procédure d'étude

Avant le démarrage de l'étude, une autorisation communautaire a été obtenue auprès du chef du village, des chefs de familles et des autorités communautaires et administratives.

En Juillet 2016 nous avons installé une équipe médicale au centre de santé de Dangassa et une autre équipe médicale a été installée au centre de santé de référence de Nioro du sahel à partir de Septembre 2016. Les populations des deux localités étaient encouragées à fréquenter les centres de santé en cas de signes clinique. Pour chaque patient accueilli par les équipes médicales, un interrogatoire suivi d'un examen clinique était réalisé. Cela nous a permis de recueillir les données cliniques sur un formulaire de report de cas. Un prélèvement sanguin était par la suite effectué au niveau du doigt pour réaliser le TDR, le taux d'Hb, la GE/FM et déterminer le groupe sanguin érythrocytaire.

Un prélèvement veineux était ensuite fait dans les tubes EDTA pour d'autres analyses. Les prélèvements veineux étaient centrifugés pour séparer le plasma du culot. Le plasma était utilisé pour rechercher des facteurs pouvant influencer les manifestations cliniques du paludisme. Et le culot de globules rouges (environ 10 μ l) était utilisé pour le typage de l'hémoglobine et le reste du culot (environ 200 μ l) était utilisé pour extraire l'ADN total contenant l'ADN humain contenu dans les leucocytes et l'ADN parasite contenu dans les hématies infectées. Cet ADN extrait nous a permis de faire les génotypages du gène de la G6PD. Pour chaque cas confirmé de paludisme, une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (CTA) était administrée pour le paludisme simple, et Quinine en perfusion ou artéméter injectable pour le paludisme grave. En cas de complications nécessitant des actions thérapeutiques particulières, les patients étaient orientés ou référés vers des services spécialisés.

4.9. Collecte gestion et analyse des données

Les informations ont été collectées sur les formulaires de report de cas (*CRF*). Les données ont été saisies sur Microsoft Excel 2007 et analysées avec le logiciel SPSS. Les résultats ont été présentés sous forme de tableaux et de figures. Le test de Khi2 a été utilisé pour comparer les prévalences des différents polymorphismes entre les deux sites d'étude. Le seuil de signification statistique a été fixé à 5%.

4.10. Considération éthique

Le protocole de recherche a été soumis à l'approbation du comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie. Nous avons également travaillé selon les bonnes pratiques de recherche clinique sur l'homme et selon les bonnes pratiques de laboratoire telles qu'énoncées dans les conventions internationales (déclaration d'Helsinki, Conférence internationale d'harmonisation des bonnes pratiques de recherche biomédicale). Un consentement écrit lu, expliqué et signé a été obtenu de chaque patient avant son enrôlement dans l'étude. Il a été obtenu après la permission communautaire et l'autorisation administrative. Nous avons utilisé des numéros d'anonymat pour chaque participant pour empêcher leur identification par de tierces personnes. Le matériel courant était un matériel stérile à usage unique tels que les lancettes et les lames.

5. Résultats

Dans nos deux sites d'étude, nous avons recensé 457 patients dont 328 à Dangassa et 129 à Niore du sahel. Les enfants étaient les plus représentés dans les deux sites d'étude avec respectivement 67,4% et 58,9% des participants à Dangassa et à Niore du sahel. La majorité de nos patients était du groupe sanguin O sur les deux sites avec respectivement 44,8% à Dangassa et 43,4% à Niore. La prévalence du trait drépanocytaire (HbAS) et l'HbAC étaient retrouvés respectivement à des proportions de 11,9% et 6,8% à Dangassa et 10,1% et 4,7% à Niore du Sahel. L'HbCC et l'HbSS n'ont pas été retrouvés dans cette étude.

5.1. Résultats descriptifs

Tableau III. Répartition des sujets en fonction du sexe et du site d'étude

Sexe	Dangassa		Niore		Total	
	N	%	N	%	N	%
Masculin	139	42,4	71	55	210	46
Féminin	189	57,6	58	45	247	54
Total	328	71,77	129	28,22	457	100

Globalement, les femmes étaient plus représentées 54,04% des participants à l'étude soit un sexe ratio de 1,17 en faveur du sexe féminin. Ce sexe ratio était de 1,35 et 0,85 respectivement à Dangassa et Niore du sahel.

Tableau IV. Répartition des sujets en fonction de la Classe d'âge et du site d'étude

Classe d'âge	Dangassa		Niore	
	N	%	N	%
Enfant (1-17 ans)	221	67,4	76	58,9
Adulte (18-70 ans)	107	32,6	53	41,1
Total	328	100	129	100

Les enfants étaient les plus représentés dans les deux sites d'étude avec respectivement 67,4% et 58,9% des participants à Dangassa et à Niore du sahel.

Tableau V. Répartition des sujets en fonction du site d'étude et le groupage sanguin

Groupage sanguin	Dangassa		Nioro	
	N	%	N	%
A	70	21,5	28	21,7
B	88	27	35	27,1
AB	22	6,7	10	7,8
O	146	44,8	56	43,4
Total	326	100	129	100

Il a été observé une dominance des groupes sanguins O sur les deux sites avec respectivement 44,8% à Dangassa et 43,4% à Nioro. De façon générale les prévalences des différents groupes sanguins érythrocytaires étaient similaires dans les deux sites d'étude.

Tableau VI. Répartition du sexe féminin en fonction du site d'étude et du portage de l'Allèle G6PDA- (mutation G6PG_202A)

G6PD	Dangassa		Nioro	
	N	%	N	%
Normal	69	80,2	13	92,8
Hétérozygote	16	18,6	1	7,2
Homozygote	1	0,2	0	0
Total	86	100	14	100

La mutation *G6PG_202A* a été recherchée chez 100 participants féminins dont 86 à Dangassa et 14 à Nioro. Elle était deux fois plus représentée à Dangassa comparé à Nioro avec des prévalences respectives de 18,6% et 7,2%. Un seul cas homozygotie a été retrouvé à Dangassa.

Tableau VII. Répartition du sexe masculin en fonction du site d'étude et du portage de l'Allèle G6PDA- (mutation *G6PG_202A*)

G6PD	Dangassa		Nioro	
	N	%	N	%
Normal	60	91	36	92,3
Hémizygote	6	9	3	7,7
Total	66	100	39	100

La mutation *G6PG_202A* a été recherchée chez 105 participants masculins dont 66 à Dangassa et 39 à Nioro. Les prévalences de l'allèle G6PD (A-) étaient similaires à Dangassa et à Nioro avec respectivement 9% et 7,7% des participants.

Tableau VIII. Répartition des participants en fonction du site d'étude et du type d'hémoglobinique

Trait drépanocytaire	Dangassa		Nioro	
	N	%	N	%
AA	252	81,3	110	85,3
AC	21	6,8	6	4,7
AS	37	11,9	13	10,1
Total	310	100	129	100

Le trait drépanocytaire (HbAS) et le type hémoglobinique HbAC étaient retrouvés respectivement à des proportions de 11,9% et 6,8% à Dangassa et 10,1% et 4,7% à Nioro du Sahel. L'HbCC et l'HbSS n'ont pas été retrouvés dans cette étude.

Tableau IX. Répartition des patients selon la gravité du paludisme et le site d'étude

Sexe	Dangassa		Nioro	
	N	%	N	%
Paludisme simple	201	61,2	80	62
Paludisme grave	127	38,8	49	38
Total	328	100	129	100

La prévalence du paludisme grave était similaire dans les deux sites. Elle a été de 38,8% et 38% respectivement à Dangassa et Nioro du sahel.

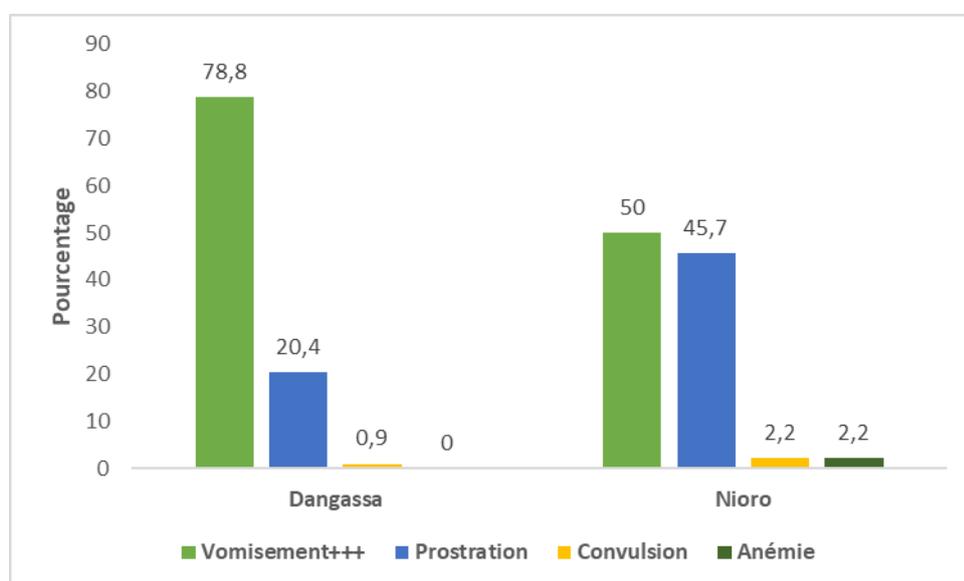


Figure 6. Critère de gravité du paludisme selon le site d'étude

Les vomissements étaient le symptôme le plus fréquemment retrouvé chez les cas grave (78,8% à Dangassa et 50% à Nioro) suivi de la prostration qui a été de 45,7% à Nioro du sahel et 20% à Dangassa. Alors que l'anémie sévère a été observée seulement à Nioro du sahel avec 2,2%.

Tableau X. Taux moyen d'hémoglobine et la Parasitémie moyenne selon le site d'étude

Site d'étude	Taux moyen d'hémoglobine	Parasitémie moyenne
Dangassa	11,585 ± 1,7563	20104,20 ± 28626,987
Nioro	11,976 ± 21687	24226,29±23262,475
P	0,08	0,15

Dans nos deux sites d'études nous n'avons pas remarqué une différence significative entre les taux moyens d'hémoglobine ($p= 0,08$) et les parasitémies moyennes ($p=0,15$).

5.2. Résultats analytiques

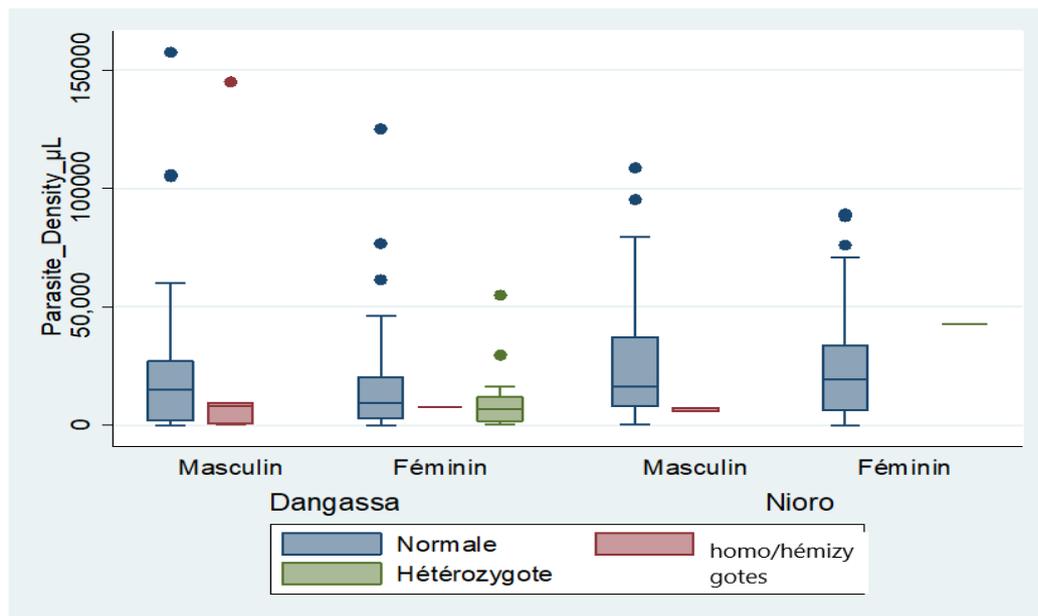


Figure 7. Parasitémie moyenne selon le site et le statut en G6PD

A Dangassa, les hémizygotes avaient une faible parasitémie moyenne alors que la parasitémie moyenne était plus élevée chez les sujets hommes normaux. A Nioro, La parasitémie moyenne chez les sujets hémizygotes était inférieure à celle des sujets normaux elle-même inférieure à celles des femmes hétérozygotes. Ces différences n'étaient pas significatives

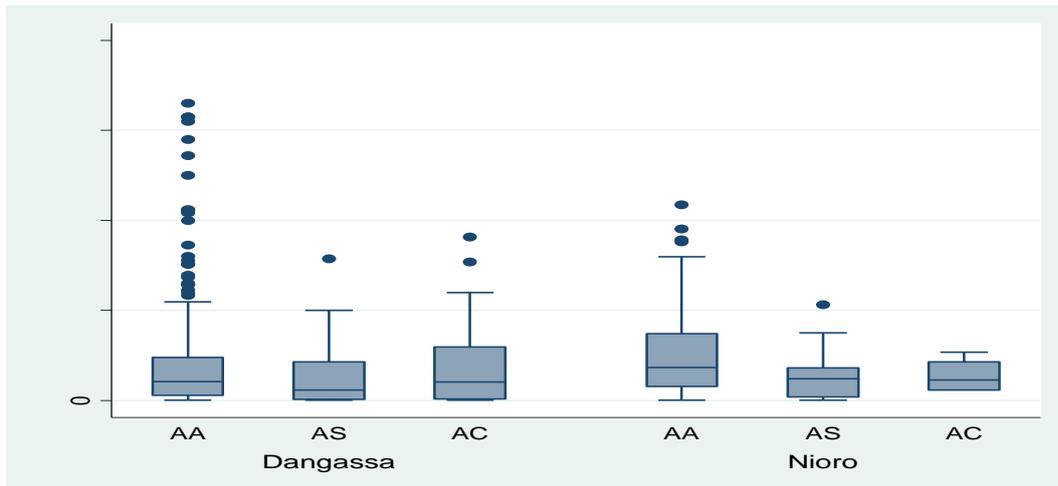


Figure 10. Parasitémie moyenne selon le site et le trait drépanocytaire

Comparées à la parasitémie moyenne des sujets HbAA, les parasitémies moyennes chez les sujets HbAS étaient diminuées de près de la moitié aussi bien à Dangassa qu'à Nioro. La parasitémie moyenne des sujets HbAC était comparable à celle des sujets HbAA à Dangassa mais diminuée de près de moitié à Nioro. Les différences n'étaient pas significatives.

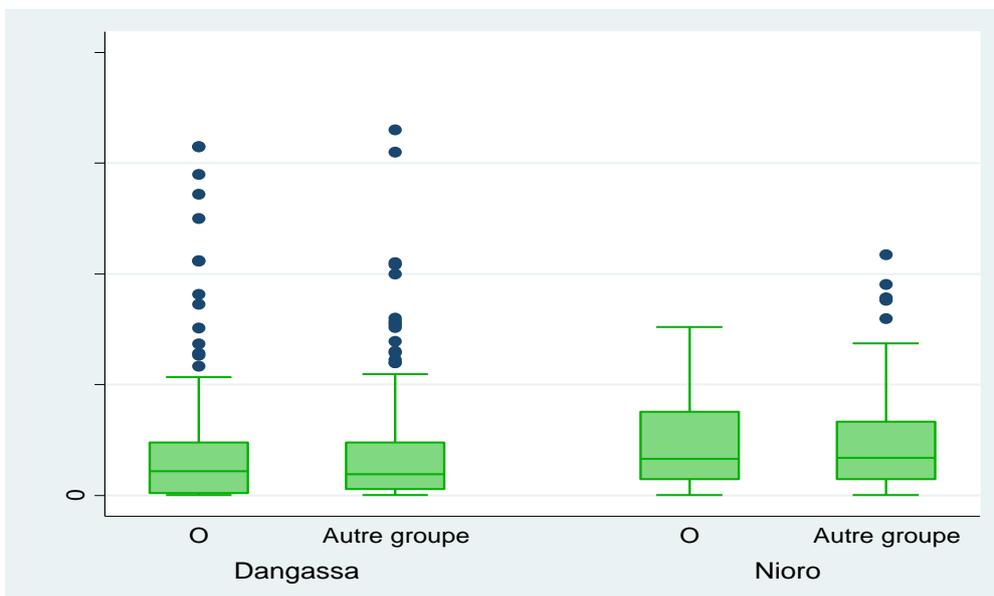


Figure 11. Parasitémie moyenne selon le site d'étude et le groupage sanguin

Nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre la parasitémie moyenne chez les sujets de groupe O et celle retrouvée chez les sujets des autres groupes sanguins ($p=0,7$).

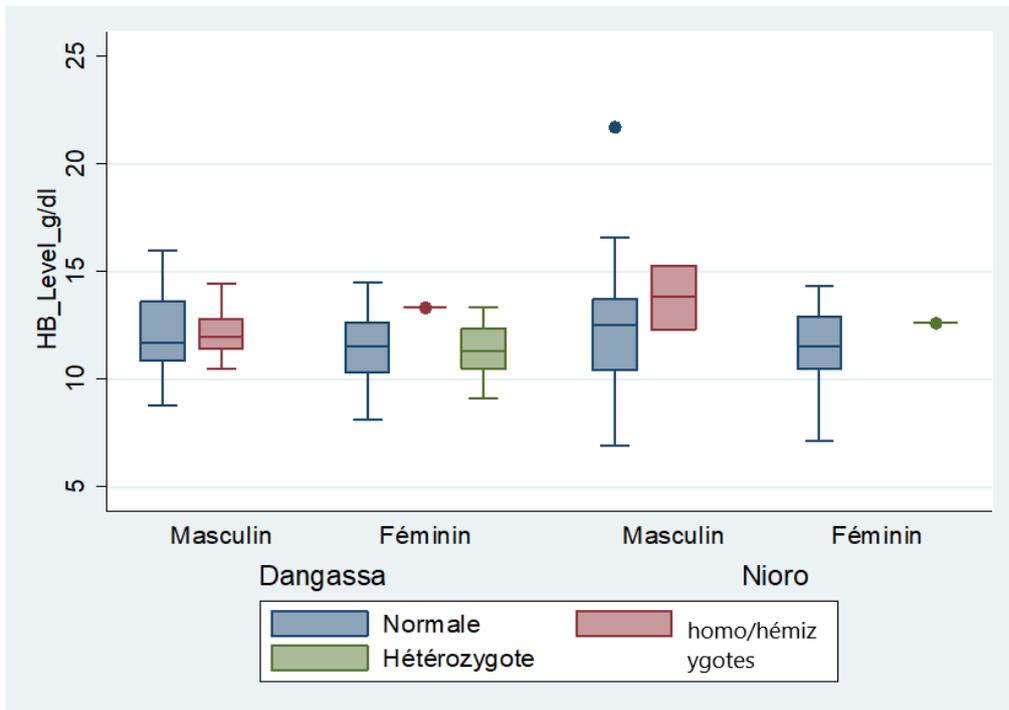


Figure 12. Taux moyen d'hémoglobine selon le site et le déficit en G6PD

Le taux d'hémoglobine ne variait pas de façon significative entre les sujets en fonction de leur statut en G6PD ni à Dangassa ni à Nioro du sahel.

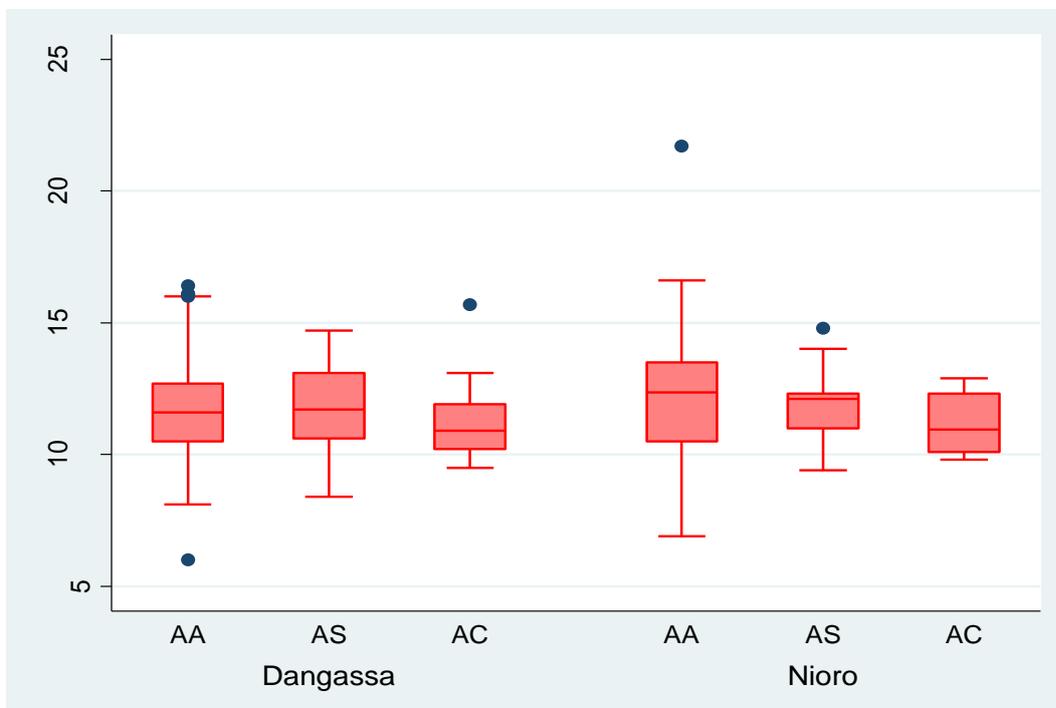


Figure 13. Taux moyen d'hémoglobine selon le site et le type d'hémoglobine

Le taux d'Hemoglobine moyen était similaire dans les trois groupes des sujets et sur les deux sites d'étude.

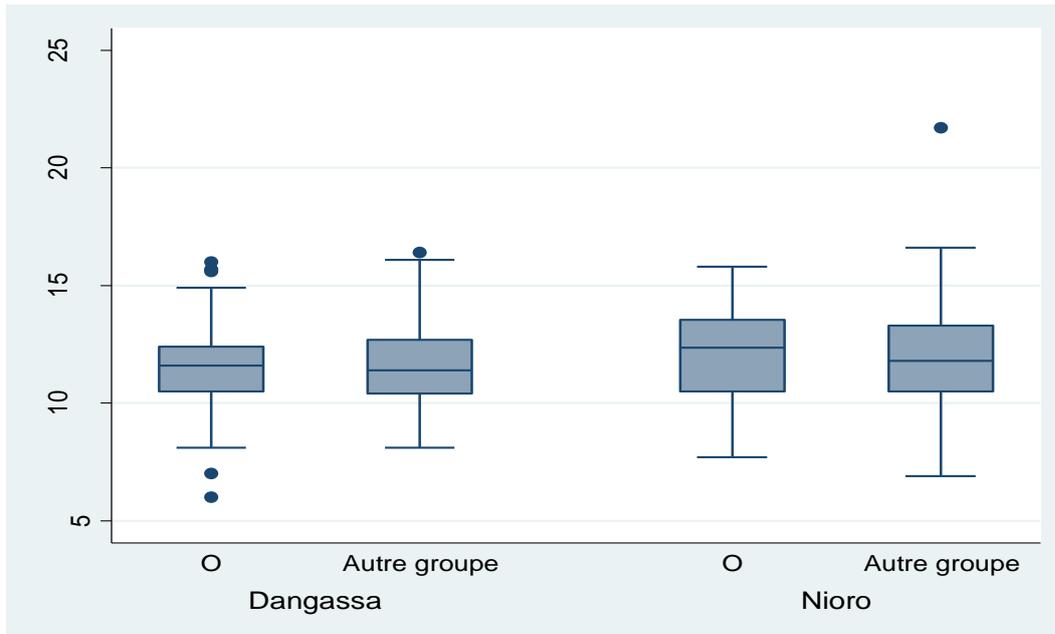


Figure 14. Taux moyen d'hémoglobine selon le site et le groupe sanguin

Nous n'avons observé aucun impact du groupe sanguin érythrocytaire sur le taux moyen d'hémoglobine à Nioro et Dangassa.

Tableau XI. Forme clinique du paludisme selon le site et le groupe sanguin

Groupage	Dangassa			Nioro		
	Palu simple	Palu grave	P	Palu simple	Palu grave	P
O*	89	57		36	20	
Autres groupes	110	70	0,9	44	29	0,6

Dans l'ensemble de nos deux études, la différence n'était pas significative mais les deux formes du paludisme étaient plus fréquentes chez les autres groupes que les groupes Dangassa (p=0,9), Nioro (p=0,6).

Tableau XII. Forme clinique du paludisme selon le site et le statut en G6PD

G6PD	Dangassa			Nioro		
	Palu simple	Palu grave	P	Palu simple	Palu grave	P
Normal*	69	60		32	18	
Hétérozygote	10	6	0,5	1	0	0,6
Hémi/Homozygote	5	2	0,9	2	1	0.008

Les sujets normaux étaient plus affectés par les deux formes de paludisme à Dangassa ($p=0,5$) ainsi qu'à Nioro ($p=0,7$) aussi.

Tableau XIII. Forme clinique du paludisme selon le site et Type d'hémoglobine

Trait drépanocytaire	Dangassa			Nioro		
	Palu simple	Palu grave	P	Palu simple	Palu grave	P
AA	149	103		68	42	
AS	25	12	0,3	8	5	0,9
AC	12	9	0,9	4	2	0,8

On avait observé qu'après les porteurs de l'hbAA, les AS étaient plus touchés que les AC dans les deux sites d'étude.

6. Commentaires et discussions

Notre étude avait pour but d'évaluer la prévalence de certains polymorphismes du globule rouge chez les patients atteints du paludisme dans deux localités d'endémicité palustre différente au Mali. Les localités de Dangassa et de Nioro du Sahel ont été choisies pour leur grande différence en termes d'endémicité palustre. Dangassa est située dans la zone forestière soudano-guinéenne au bord du fleuve Niger. La transmission du paludisme y est saisonnière et stable. Elle est intense entre le mois de Mai et Décembre. Cependant des cas de paludisme y sont observés toute l'année. Quant à la ville Nioro du Sahel, elle est située dans la zone sahélienne aride à la frontière du Mali avec la Mauritanie. La transmission du paludisme y est instable et fortement liée à la saison pluvieuse. Elle est courte et s'étend de Septembre à Novembre.

Nous avons considéré les polymorphismes érythrocytaires les plus couramment cités dans la protection contre le paludisme notamment les formes grave. Il s'agit de : Le trait drépanocytaire (HbAS), HbAC, le déficit en G6PD (l'allèle A⁻) et groupe sanguin érythrocytaires O. Les patients ont été enrôlés à Dangassa au centre de santé du village et à Nioro dans le centre de santé de référence de la ville ainsi qu'au niveau des deux CSCOM de la ville. La population a été fortement encouragée à fréquenter ces centres de santé en cas de signe de paludisme et tous les cas de paludisme confirmés sans distinction de l'âge et du sexe ont été inclus dans l'étude. Cette stratégie nous a garanti une inclusion exhaustive des cas de paludisme.

Au total, nous avons enrôlé 457 patients dans l'étude Dont 328 à Dangassa et 129 à Nioro du sahel. Une très grande proportion des sujets enrôlés à Nioro du sahel était des adultes soit 41,1%. Cette observation nous rappelle que l'âge bien qu'étant un surrogatoire de l'immunité antipalustre dans les zones d'endémie ne protège pas complètement contre l'infection palustre. Elle confère plutôt une prémunition contre les formes grave de la maladie. En effet dans les zones d'endémie palustre, la prémunition contre les formes grave du paludisme est acquise vers l'âge de 5 ans mais les sujets même adultes restent susceptibles à l'infection palustre. Le délai d'acquisition de la prémunition reste largement tributaire de l'endémicité de la maladie et dans les zones à transmission faible, les adultes restent susceptibles même aux formes graves du paludisme.

Les cas graves représentaient une forte proportion des cas de paludisme recensés soit 38,7% à Dangassa et 38% à Nioro. La grande majorité de ces cas graves était due aux vomissements répétés (78,8% des cas à Dangassa et 50% des cas à Nioro). La prostration était présente chez 45,7% des cas graves de Nioro contre seulement 20,4% à Dangassa. L'absence d'anémie palustre sévère dans cette étude est due au fait que les patients présentant un taux d'hémoglobine inférieur à 8,5g/dl n'étaient pas inclus. La forte proportion des cas graves est due aux faits que la définition des cas graves de paludisme est très souvent subjective et dépend largement de l'appréciation du médecin traitant notamment concernant le cas du vomissement.

En dehors de la définition de l'anémie sévère qui est assez objective car basé sur la mesure du taux d'hémoglobine mais qui reste multifactorielle, et dans une moindre mesure la prostration, les autres critères de gravité du paludisme rencontrés dans cette étude sont largement subjectifs. Nous n'avons pas observé une variation du taux moyen d'hémoglobine ainsi que la densité parasitaire moyenne entre les sites (Dangassa et Nioro) (tableau IX). Plusieurs auteurs ont exploré les effets des polymorphismes du globule rouge sur le risque de paludisme et du paludisme grave.

Nous avons recherché la mutation *G6PG_202A* principale mutation responsable du déficit en G6PD en Afrique subsaharienne chez 206 patients dont 152 à Dangassa et 54 à Nioro. Cette mutation était présente à l'état hémizygote *G6PG_202A* chez 9% des sujets masculins à Dangassa contre 7,7% à Nioro. Chez les sujets féminins, l'état hétérozygote *G6PG_202A/G* a été retrouvé chez 18,6% et 7,2% respectivement à Dangassa et Nioro. L'état homozygote n'a été retrouvé que chez une patiente de Dangassa.

Notre étude s'est intéressé particulièrement à étudier la prévalence ainsi certains auteurs ont trouvé une protection associée à l'état hémizygote du déficit chez les hommes [45], alors que d'autres ont rapportés une protection associée à l'état hétérozygote chez les femmes [46]. Des études épidémiologiques bien structurées, couplées aux études d'exploration du mécanisme sont nécessaire pour élucider le rôle du déficit en G6PD dans la protection innée contre le paludisme.

La majorité de nos patients étaient du groupe sanguin O en général et particulièrement dans nos deux sites (44,39%) suivi du groupe B (27,03%), groupe A (21,53%) et groupe AB (7,03%) (Tableau V). Ce résultat des patients du groupe O est légèrement en relation avec ceux obtenu chez les donneurs de sang à Bamako en 2004 sur 136 donneurs [46] et dans d'autres régions d'Afrique de l'ouest [47, 48]. La forte proportion du groupe sanguin O dans ces populations d'Afrique subsahariennes s'expliquerait par la sélection positive de ce groupe sanguin en raison de la résistance qu'elle procurait contre le paludisme grave [49]. Cependant, au cours de notre étude, nous n'avons pas observé de réduction significative du risque de paludisme grave associé au groupe sanguin O.

La prévalence cumulée du trait drépanocytaires (HbAS) et de l'hémoglobine C (HbAC) dans notre étude était de 17,53% dont 11,38% d'HbAS et 6,15% d'HbAC (Tableau VII). Ces deux types d'anomalies hémoglobiniques ont été associés à une réduction significative du risque de développement de certaines manifestations graves du paludisme dans diverses zones géographiques. Les prévalences de ces deux types Hb varient énormément en fonction des zones géographiques et des groupes ethniques. En 1992, Baby avait trouvé 14,75% d'HbAC et 3,05% d'HbAS dans la population des dogons à Bandiagara qui sont supposés être originaires du Mandé [50]. Diallo et col. (1994) avaient trouvé chez les dogons au Mali 15,8% d'HbAC et une faible fréquence de 3,05% d'HbAS [51]. Ces différences de proportions avec notre étude s'expliquent par le fait que notre population d'étude était essentiellement constituée de Malinké. On pense que l'HbC semble remplacée

l'HbS chez les Dogons à cause de sa faible conséquence clinique comparée à la population originelle Malinké [52, 53]. Le même constat a été fait au Burkina Faso [35] et au Ghana [34].

Nous n'avons pas observé de lien entre le portage des polymorphismes du globule rouge et la réduction du risque de paludisme grave (Tableaux X, XI, XII). Cela s'explique par les critères de gravités que nous avons considérées dans cette étude. En effet, était considéré comme cas grave tout patient présentant des vomissements nécessitant un traitement parentéral. Ce qui a contribué à augmenter considérablement le nombre de cas grave dans cette étude.

7. Conclusion et recommandations

7.1. Conclusion

Les polymorphismes de globule rouge étudiés sont assez fréquents chez les patients impaludés de Dangassa et de Nioro. Au moins cependant nous n'avons pas observé d'association entre les polymorphismes étudiés et la réduction du risque de paludisme grave.

7.2. Recommendations

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

Mener une étude conçue spécialement pour évaluer l'impact de l'endémicité du paludisme sur le phénomène de protection des sujets porteurs de ces polymorphismes contre le paludisme,

8.Limites de l'étude

Nous avons rapporté seulement les prévalences des différents polymorphismes du globule rouge chez des patients impaludés vus en consultation à Dangassa et à Nioro. L'étude n'avait pas été conçu initialement pour rechercher l'effet de ces polymorphismes sur le risque de paludisme (non compliqué et sévère). Aussi nos effectifs semblent faibles pour conclure par rapport à cette hypothèse. Nous n'avons pas aussi étudié d'autres facteurs génétiques non érythrocytaires potentiellement impliqués dans la protection contre l'accès palustre.

9. Références bibliographiques

1. OMS, *Rapport sur le paludisme*. 2018.
2. Greenwood, B., *Progress in malaria control in endemic areas*. Travel Med Infect Dis, 2008. **6**(4): p. 173-6.
3. PNLP, *Plan stratégique de lutte contre le paludisme 2013-2017*. 2013. 115.
4. Lederberg, J., *J. B. S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution*. Genetics, 1999. **153**(1): p. 1-3.
5. Devoucoux, R.Hurpin, C.Baudon, D.Molez, J. F.Roux, J. F.Guilloud-Bataille, M.Carnevale, P.Feingold, J. *Population genetics of abnormal haemoglobins in Burkina Faso, west Africa*. Ann Hum Biol, 1991. **18**(4): p. 295-302.
6. Agarwal, A.Guindo, A.Cissoko, Y.Taylor, J. G.Coulibaly, D.Kone, A.Kayentao, K.Djimde, A.Plowe, C. V.Doumbo, O.Wellems, T. E.Diallo, D. *Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S*. Blood, 2000. **96**(7): p. 2358-63.
7. Baird, J.K., K.E. Battle, and R.E. Howes, *Primaquine ineligibility in anti-relapse therapy of Plasmodium vivax malaria: the problem of G6PD deficiency and cytochrome P-450 2D6 polymorphisms*. Malar J, 2018. **17**(1): p. 42.
8. Mockenhaupt, F. P.Ehrhardt, S.Cramer, J. P.Otchwemah, R. N.Anemana, S. D.Goltz, K.Mylius, F.Dietz, E. Eggelte, T. A.Bienzle, U. *Reduced prevalence of Plasmodium falciparum infection and of concomitant anaemia in pregnant women with heterozygous G6PD deficiency*. Trop Med Int Health, 2003. **8**(2): p. 118-24.
9. Lell, B.May, J.Schmidt-Ott, R. J.Lehman, L. G.Luckner, D.Greve, B.Matousek, P.Schmid, D.Herbich, K.Mockenhaupt, F. P.Meyer, C. G.Bienzle, U.Kremsner, P. G. *The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria*. Clin Infect Dis, 1999. **28**(4): p. 794-9.
10. Allen, S. J.O'Donnell, A.Alexander, N. D.Alpers, M. P.Peto, T. E.Clegg, J. B.Weatherall, D. J. *alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14736-41.
11. Lopera-Mesa, T.M., *Effect of red blood cell variants on childhood malaria in Mali: a prospective cohort study*. Lancet Haematol, 2015. **2**(4): p. e140-9.
12. Singh, B.Kim Sung, L.Matusop, A.Radhakrishnan, A.Shamsul, S. S.Cox-Singh, J.Thomas, A.Conway, D. J. *A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings*. Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1017-24.
13. Diakite, M.Miura, K.Diouf, A.Konate, D.Keita, A. S.Doumbia, S.Diakite, S.Traore, K.Doumbouya, M. Anderson, J. M.Fairhurst, R. M.Long, C. A. *Hematological Indices in Malian Children Change Significantly During a Malaria Season and with Increasing Age: Implications for Malaria Epidemiological Studies*. Am J Trop Med Hyg, 2016. **95**(2): p. 368-72.

14. Mayor, S., *WHO report shows progress in efforts to reduce malaria incidence*. BMJ, 2008. **337**: p. a1678.
15. Doumbo, O., *Epidemiologie sur le paludisme au Mali, etude de la chimioresistance , essai de strategie de controle basé sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine*. 1992.
16. WHO, *La prise en charge du paludisme grave*. 2017. 15.
17. Imam, T., S, *THE COMPLEXITIES IN THE CLASSIFICATION OF PROTOZOA: A CHALLENGE TO PARASITOLOGISTS*
2009.
18. Aubry, P., *Paludisme*. 2018.
19. ANOFEL, U.M.V.F.U.A.F.d.E.d.P.e.M., *paludisme*. 2014.
20. Barnadas, C., *Epidemiologie moléculaire et résistance de Plasmodium vivax aux antipaludiques à Madagascar*. 2008. 180.
21. SONDOSS, G.M., *Paludisme*. 2012.
22. AVIQ, *Paludisme*. 2016.
23. Kwiatkowski, D., *Cytokines and anti-disease immunity to malaria*. Res Immunol, 1991. **142**(8): p. 707-12.
24. Newton, C.R. and S. Krishna, *Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment*. Pharmacol Ther, 1998. **79**(1): p. 1-53.
25. Laurent, V., *la physiopathologie du paludisme grave a plasmodium falciparum*. 2012.
26. Vandoolaeghe, P. and L. Schuerman, *[The RTS,S/AS01 malaria vaccine in children aged 5-17 months at first vaccination]*. Pan Afr Med J. **30**: p. 142.
27. OMS. *Rapport sur le paludisme dans le monde 2018*. 2018; Available from: <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/fr/> (consulté 11/02/2019).
28. Bardakdjian-Michau, J., *Hémoglobine normale*. 2012.
29. UMVF, *Hématologie*. 2011.
30. COUPRIE, N., *Hémoglopathies*. 2000.
31. Bernaudin, F., *Drepanosite*. 2006.
32. Aubry, P., *Hémoglobinoses*. 2018.
33. Kwiatkowski, D.P., *How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(2): p. 171-92.
34. Mockenhaupt, F.P., et al., *Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children*. J Infect Dis, 2004. **190**(5): p. 1006-9.
35. Modiano, D., et al., *Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2001. **414**(6861): p. 305-8.
36. Friedman, M.J., *Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(4): p. 1994-7.
37. Diakite, S.A.S., *Les mecanismes de protection de l'hémoglobine C contre les formes graves du paludisme a P. falciparum: resultat d'etudes preliminaires in-vitro*. These de Pharmacie, Universite de Bamako, Mali 2005.
38. Pai, G. S.Sprenkle, J. A.Do, T. T.Mareni, C. E.Migeon, B. R. *Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom X chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(5): p. 2810-3.

39. Ruwende, C.Hill, A. *Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria*. Nature, 1995. **376**(6537): p. 246-9.
40. Ruwende, C. and A. Hill, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(8): p. 581-8.
41. Aymard, J.P., [*Karl Landsteiner, the man of blood groups*]. Rev Prat, 2012. **62**(10): p. 1474-7.
42. Hartmann, O., [*Compatibility tests in blood transfusion*]. Nord Med, 1956. **55**(19): p. 662-3.
43. Yamamoto, F.Maruiwa, M.Kanetani, K.Matsuo, H.Shigemori, M.Kuramoto, S. [*Coexistence of multiple metastatic brain tumors from thyroid carcinoma and cerebral aneurysms*]. No Shinkei Geka, 1990. **18**(4): p. 361-5.
44. Fernandez, V.Treutiger, C. J.Nash, G. B.Wahlgren, M. *Multiple adhesive phenotypes linked to rosetting binding of erythrocytes in Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 1998. **66**(6): p. 2969-75.
45. Guindo, A.Fairhurst, R. M.Doumbo, O. K.Wellems, T. E.Diallo, D. A. *X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria*. PLoS Med, 2007. **4**(3): p. e66.
46. Luzzatto, L., *G6PD deficiency: a polymorphism balanced by heterozygote advantage against malaria*. Lancet Haematol, 2015. **2**(10): p. e400-1.
47. Loua, A.Lamah, M. R.Haba, N. Y.Camara, M. [*Frequency of blood groups ABO and rhesus D in the Guinean population*]. Transfus Clin Biol, 2007. **14**(5): p. 435-9.
48. Folquet Amorissani, M.Sylla, M.Dainguy, M. E.Kouakou, C.Seuchi, P.Houenou-Agbo, Y.Kouame Konan, J. [*Anemia in the premature newborn*]. Mali Med, 2007. **22**(2): p. 1-5.
49. Fry, A. E.Griffiths, M. J. Auburn, S.Diakite, M.Forton, J. T.Green, A.Richardson, A.Wilson, J.Jallow, M.Sisay-Joof, F.Pinder, M.Peshu, N. Williams, T. N.Marsh, K.Molyneux, M. E.Taylor, T. E.Rockett, K. A.Kwiatkowski, D. P. *Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe Plasmodium falciparum malaria*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(4): p. 567-76.
50. Baby, M., *Approche pluridisciplinaire des hémoglobinopathies chez les dogons de l'arrondissement de Sangha (MALI), These de Pharmacie, Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie, Bamako, Mali*. 1992.
51. Diallo, D.Traore, A. K.Baby, M.Rhaly, A. A.Bellis, G.Chaventre, A. *Haemoglobinopathies C and S in the Dogons*. Nouv Rev Fr Hematol, 1994. **35**(6): p. 551-4.
52. Verra, F.Simpore, J.Warimwe, G. M.Tetteh, K. K.Howard, T.Osier, F. H.Banccone, G.Avellino, P.Blot, I.Fegan, G.Bull, P. C.Williams, T. N.Conway, D. J.Marsh, K.Modiano, D. *Haemoglobin C and S role in acquired immunity against Plasmodium falciparum malaria*. PLoS One, 2007. **2**(10): p. e978.
53. Gouagna, L. C.Banccone, G.Yao, F.Yameogo, B.Dabire, K. R.Costantini, C.Simpore, J.Ouedraogo, J. B. Modiano, D. *Genetic variation in human HBB is associated with Plasmodium falciparum transmission*. Nat Genet, 2010. **42**(4): p. 328-31.

10. Fiche signalétique

Nom et Prénom : Mr. Sidi Modibo Kane Diallo

Nationalité : Malienne

Année et ville de soutenance : 2019, Bamako

Titre: Prévalence des polymorphismes érythrocytaires chez les patients atteints de paludisme dans deux zones d'endémicité différentes au Mali : Dangassa et Nioro du sahel

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

Secteur d'intérêt : Parasitologie, Santé publique, Hématologie

Résumé

Nous avons évalué les proportions de l'HbAS, de l'HbAC, du groupe sanguin érythrocytaire ABO, de l'allèle G6PDA⁻ chez les patients atteints de paludisme dans deux localités d'endémicité palustre différentes au Mali, Nioro du Sahel (zone de faible endémicité palustre) et Dangassa (zone de forte endémicité palustre). Les groupes sanguins érythrocytaires ont été déterminés par la technique de Beth Vincent, le typage de l'hémoglobine a été réalisé par la méthode de chromatographie en phase liquide (Machine D-10 de Bio-Rad) et l'allèle G6PDA⁻ a été déterminé en utilisant la technique de PCR couplée à l'enzyme de restriction pour détecter la mutation G6PD G202A.

Au total, nous avons inclus 457 patients atteints de paludisme dont 129 à Nioro et 328 à Dangassa. Les proportions des différents traits génétiques étaient similaires dans les deux localités. Le groupe sanguin O a été retrouvé chez 44,8% des participants à Nioro du Sahel contre 43,4% à Dangassa. L'HbAC et l'HbAS ont été retrouvés chez 4,7% et 10,1%, respectivement, chez les participants de Nioro du Sahel contre 6,8% et 11,9%, respectivement à Dangassa. La proportion du déficit en G6PD hétérozygote était de 18,6% et 7,2% les participants respectivement à Dangassa et à Nioro du Sahel. Chez les participants du sexe masculin, la proportion du déficit en G6PD à l'état hémizygotique était de 9,0% et 7,7% des participants respectivement à Dangassa et à Nioro du Sahel. Notre étude révèle que plus de 60% de nos participants portaient au moins un trait génétique classique de résistance au paludisme à Nioro du Sahel aussi bien qu'à Dangassa.

Nous n'avons pas observé d'association positive entre les traits génétiques étudiés et les phénotypes cliniques du paludisme au cours de notre étude.

Mots Clés : HbC, HbS, déficit en G6PD, Paludisme, groupe sanguin ABO Mali

Abstract

Since the sedentarisation of man following the development of agriculture more than 10,000 years ago, malaria has become one of the main forces of modification of the human genome. The almost perfect overlapping of the geographical distribution of the high prevalence of certain polymorphisms of the red blood cell and of those of malaria made suggest the hypothesis that these genetic polymorphisms would provide a resistance to malaria. However, the results of field epidemiological studies remained discordant with many of them suggesting an environmental component of the phenomenon.

We assessed the prevalence of HbAS, HbAC, erythrocyte blood groups, G6PDA-allele in patients with malaria in two localities of different malaria endemicity in Mali: Nioro (low endemic area) and Dangassa (area of low endemicity). Erythrocyte blood groups were determined by the technique of Beth Vincent, the typing of hemoglobin was carried out by the method of liquid chromatography (D-10) and the G6PDA allele was sought by the reaction technique polymerase chain followed by restriction enzyme analysis to detect the G6PD G202A mutation.

In total, we included 457 patients with malaria, including 129 in Nioro and 328 in Dangassa. The prevalence of different genetic traits was similar in both localities. Blood group O was found in 44.8% of participants in Nioro and 43.4% in Dangassa. The HbAC and HbAS hemoglobin phenotypes were found in respectively 4.7% and 10.1% of participants in Nioro against 6.8% and 11.9% in Dangassa. Only one HbSC phenotype and two HbCC were observed in Dangassa. The G6PDA- allele was present in the heterozygous state in 18.6% and 7.2% of female subjects respectively in Dangassa and Nioro. Only one female subject presented the homozygous G6PDA-allele in Dangassa. In the male subject, the G6PDA- allele was found in the hemizygous state in 9% and 7.7% of the participants in Dangassa and Nioro, respectively. Our study reveals that more than 60% of our participants carried at least one of the genetic traits implicated in the protection against malaria in Nioro as well as in Dangassa. However, we found no significant association between the genetic traits studied and a particular clinical form of malaria in this study.

Keywords: HbC, HbS, G6PD deficiency, Paludisme, Blood Group ABO Mali

11. Annexes

Description des techniques de laboratoire

11.1. Détermination du taux d'hémoglobine

Le taux d'hémoglobine a été mesuré par l'appareil HemoCue Hb201+ microcuvette



Figure : Analyseur et Microcuvette HemoCue

Source : Photo prise à Dangassa

11.1.1. Principe de la méthode

La réaction dans la microcuvette repose sur une réaction modifiée de formation d'azoture de méthémoglobine. Les érythrocytes sont hémolysés pour libérer l'hémoglobine. L'hémoglobine est convertie en méthémoglobine, laquelle réagit avec de l'azoture pour donner de l'azoture de méthémoglobine dont l'absorbance est mesurée dans l'analyseur. Cette absorbance est directement proportionnelle à la concentration de l'Hb (réf).

11.1.2. Matériel et réactifs

- Appareil analyseur
- Microcuvette HemoCue
- Lancette
- Alcool 70°
- Coton

11.1.3. Technique

- cibler un doigt, bien désinfecté avec le tampon d'alcool à 70°;
- piquer en un coup sec avec une lancette ; nettoyer la première goutte de sang, presser le bout du doigt pour avoir une deuxième goutte ;
- Appliquer la microcuvette sur la goutte de sang. La quantité nécessaire est aspirée automatiquement dans la microcuvette par capillarité.

-Après avoir enlevé minutieusement toute trace de sang présente à la surface de la microcuvette, la mettre sur son support et l'insérer ensuite dans le photomètre



Figure : Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+

Le résultat est exprimé en gramme d'hémoglobine par décilitre de sang (g/dl)

Source : www.hemocue.com

11.2. Détermination du groupe sanguin ABO

Nous avons déterminé le groupe sanguin par l'épreuve de Beth VINCEN

11.2.1. Principe

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

7.1.1. Matériel et réactifs

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

10.2.3. Mode opératoire

-marquer à l'aide de crayon de papier le numéro d'identification du sujet sur trois lames porte objet en les marquant A, B et D

-cibler un doigt

-nettoyer le doigt avec un tampon d'alcool à 70°

-piquer en un coup sec le bout du doigt par une lancette et nettoyer la première goutte de sang avec le coton sec;

- presser le bout du doigt pour avoir d'autres gouttes et déposer une goutte (de 10µl) de sang sur chacune des trois lames porte objets.

-ajouter :- une goutte (10µl) du sérum anti-A sur la goutte de la lame A

-une goutte (10µl) du sérum anti-B sur la goutte de la lame B

-une goutte (10µl) du sérum anti-D sur la goutte de la lame D ;

-triturer les trois gouttes avec trois cure-dents différents.

11.2.4. Résultat

Observer l'agglutination avec les sérums tests :

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

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

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

11.3. Détermination du type d'hémoglobine avec la machine D-10

11.3.1. 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 matériau contenu dans la cartouche. Les molécules d'hémoglobine séparées traversent ensuite la cellule à circulation du photomètre filtre où sont mesurés les changements d'absorbance à 415 nm (réf.).

Le logiciel D-10 intègre les données brutes recueillies lors de chaque analyse. Un étalonnage à deux niveaux est employé pour déterminer les concentrations des différents types d'Hb recherchés. Un compte-rendu d'analyse et un chromatogramme sont générés pour chaque échantillon. La surface de l'A1c est calculée à l'aide d'un algorithme gaussien

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

11.3.2. Prélèvement et manipulation des échantillons

11.3.3. Type d'échantillon

On utilise le sang total.

11.3.4. 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.

11.3.5. 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.

11.3.6 Préparation des échantillons

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

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

11.4. Procédures standard opératoires (SOP): goutte épaisse

10.4.1. Principe : c'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang et l'identification des différentes espèces (frottis sanguin).

11.4.2. Matériel

Deux (2) lames porte-objet propres et bien dégraissées

Vaccinostyle stérile

Alcool 70°

Colorant de Giemsa pur

Coton hydrophile sec

Eau tamponnée, PH=7,2

Boîte à lames ou couvercle pour protéger les frottis pendant le séchage

Chiffon de coton propre et ne peluchant pas

Crayon noir à mine grasse ou marqueur indélébile

Stylo à bille

Bacs de coloration

Eprouvette graduées

Râtelier, chronomètre

Huile d'immersion

Registre ou formulaire de notification

Un compteur manuel

Gant

11.4.3. Lieu du prélèvement

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

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

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

11.4.4. Technique de la goutte épaisse

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

1. En tenant la main gauche du malade la paume tournée vers le haut, choisir le troisième doigt après le pouce (le gros orteil peut être utilisé chez les nourrissons. Le pouce ne doit jamais être utilisé chez les adultes ou les enfants).
2. Avec un tampon de coton légèrement imbibé d'alcool, nettoyer le doigt en appuyant fermement pour enlever la saleté et la graisse du bout du doigt.
3. Avec le chiffon de coton propre, essuyer le doigt en appuyant fermement pour stimuler la circulation du sang.
4. Avec un vaccinostyle stérile, piquer le bout du doigt d'un seul geste.
5. Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec. S'assurer qu'il ne reste pas de fibres de coton sur le doigt, qui pourraient se mélanger au sang.

6. En procédant rapidement et en tenant les lames propres uniquement par les bords, recueillir le sang comme suit :
7. Appuyer doucement sur le doigt et recueillir une petite goutte de sang au milieu de la lame (cf. figure).
8. Essuyer le sang restant sur le bout du doigt avec un tampon de coton.
9. Tenir la lame supérieure par les bords.
10. Placer le coin de l'autre lame au centre de la goutte de sang
11. Etendre légèrement la surface de la goutte par des mouvements spiralés appuyés de la lame (cf. figure).
12. Assurer cette défibrination mécanique pendant quelques secondes et étendre la goutte sur environ 1 cm de diamètre.
13. Laisser la préparation à plat, à l'abri de la poussière, de la chaleur et des mouches pendant deux heures en zone sahélienne. Respecter ce long temps de séchage sinon il y a risque de décollement de la préparation lors de la coloration (cf.

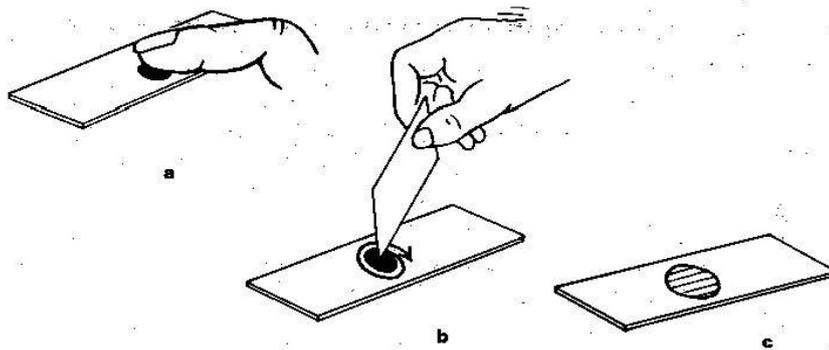


figure).

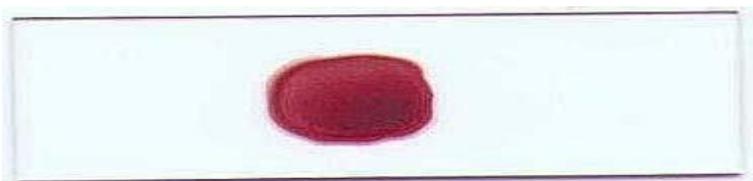


Figure 8. Technique de la goutte épaisse
11.4.5. Technique de coloration de Giemsa

C'est une méthode de coloration classique employée en routine pour la coloration des étalements sanguins et pour le diagnostic du paludisme.

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

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

Préparer la solution de Giemsa à 3 ou 5 dans l'eau tamponnée (PH 7,2) et bien mélanger le colorant.

Verser doucement le colorant dans la bague jusqu'à ce que la lame soit entièrement recouverte.

Laisser colorer pendant 30 à 45 mn pour 30 (15mn pour 10), à l'abri de la lumière solaire et de la poussière.

Les lames sont ensuite rincées et séchées sur un râtelier.

NB : La lecture se fait au microscope à l'objectif 100 à l'huile d'immersion

Le fond doit être propre, exempt de débris, coloré en bleu

Les noyaux des leucocytes sont en violet foncé.

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

11.4.7. Méthodes de numération des parasites du paludisme dans les gouttes épaisses

Parasites par μl (= mm^3)

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

1. Un compteur manuel à 4 chiffres nécessaire pour dénombrer séparément les parasites et les leucocytes.
2. a) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié 10 parasites ou plus, noter les résultats sur le formulaire de notification, en indiquant le nombre de parasites par 300 leucocytes.

b) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié neuf parasites ou moins, continuer de compter jusqu'à 500 leucocytes et noter le nombre de parasites par 500 leucocytes.

3. Dans chaque cas, le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes peut être converti en nombre de parasites par μl par la simple formule mathématique suivante :

Nombre de parasites X 7 500

----- = parasites par μl

Nombre de leucocytes

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

11.5. Procédures Standard Opératoires (SOP) : Frottis Mince

Le frottis sanguin consiste en la réalisation d'un étalement monocellulaire des éléments sanguins. Lames à tenir par les bords pour éviter les empreintes digitales grasses. Plus la lamelle utilisée pour faire le frottis est mince, plus fin le frottis sera.

11.5.1. Matériel

- 2 lames porte-objet dégraissées
- Vaccinostyle stérile
- Alcool 70°
- Colorant de Giemsa pur
- Coton hydrophile sec
- Eau tamponnée, pH= 7,2
- Méthanol absolu

11.5.2. Lieu du prélèvement

a. A l'extrémité d'un doigt gauche (ni index, ni pouce), sur la face latérale du doigt qui ne doit être ni œdémateux, ni cyanosé, ni traumatisé, ni infecté.

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

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

11.5.3. Technique

1. Dégraisser la lame à l'alcool (ou au toluène); faire sécher à l'air ou près d'une flamme ou avec un appareil-sèche cheveu (fig. 11a).

2. Désinfecter le bout du 3eme ou 4eme doigt avec de l'alcool 70°.
3. Piquer le doigt avec un vaccinostyle stérile, d'un seul geste.
4. Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec.
5. Déposer une goutte de sang capillaire ou veineux à l'une des extrémités de la lame.
6. Poser le bord de la deuxième lame en avant de la goutte de sang, le faire glisser en arrière jusqu'au contact de la goutte de sang qui va se répandre sur toute la largeur du bord de la lame supérieure dans l'angle formé par les 2 lames (fig. 11b).
7. Incliner la lame supérieure de 45°.
8. Pousser fermement la deuxième lame le long de la lame de sang, en la tenant inclinée à 45°, d'un geste rapide et régulier, en avant, vers l'extrémité libre de la lame porte-objet. S'assurer que la deuxième lame reste bien en contact avec la surface de la lame de sang pendant qu'on procède à l'étalement.
9. Faire sécher le film mince de sang obtenu en agitant la lame à l'air. Le frottis doit présenter deux bords et une queue, zones électives de lecture (fig.11c).
10. Porter le nom du patient ou le numéro de l'examen sur la marge de la lame ou sur la partie large du frottis sanguin au crayon de papier (fig. 11d, 11e).
11. Placer la lame dans la boîte horizontale (type OMS), à l'abri des mouches, de la poussière et d'une trop forte chaleur si on ne peut la colorer immédiatement.
12. Fixer le frottis sanguin avec le méthanol
13. Appliquer le colorant de May-Grunwald-Giemsa, ou l'Hémacolor ou colorer avec le Giemsa 3% dans de l'eau tamponnée.

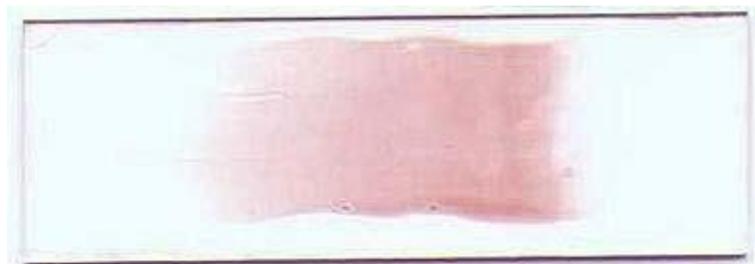
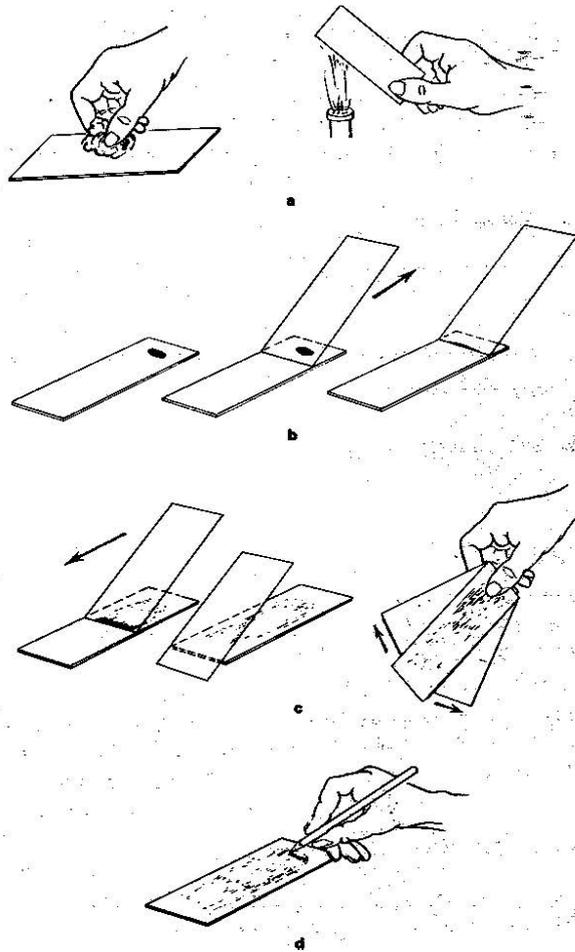


Figure 9. Technique du frottis mince.

10.5.4. Coloration avec l'Hemacolor®

- Fixer le frottis avec le méthanol en plongeant deux fois 3 secondes
- Laisser sécher la lame à l'air libre ou faire sécher avec une machine sèche-cheveux.
- Plonger la lame 3 à 5 fois une seconde dans la solution d'éosine, qui colore le noyau du parasite en rouge.

- Rincer à l'eau propre.
- Plonger la lame 3 à 5 fois une seconde dans la solution de bleu de Méthylène qui colore le cytoplasme du parasite en bleu.
- Rincer à l'eau propre.
- Laisser sécher.
- Lire la lame au microscope optique binoculaire avec l'objectif 100 en immersion

11.5.5. Méthodes de numération des parasites du paludisme dans les frottis minces

Une méthode simple pour dénombrer les parasites dans le frottis mince consiste à compter 1000 hématies sur la queue, zone élective de lecture du frottis mince. On dénombre les hématies parasitées sur 1000 hématies dans un frottis mince. Le résultat est exprimé en pourcentage d'hématies parasitées.

Cette méthode est surtout utilisée dans les essais cliniques de nouveaux médicaments antipaludiques. Elle semble être plus précise que le nombre de parasites par μl de sang. L'inconvénient majeur est qu'elle consomme suffisamment de temps.

11.6. Procédures Standard Opératoires (SOP) : Confection du confetti

11.6.1. Matériel

- Papier buvard
- Gants stériles
- Vaccinostyle stérile
- Coton hydrophile
- Alcool 70%
- Ciseaux
- Poubelle pour vaccinostyles
- Registre
- Crayons
- Enveloppes
- Agrafeuse
- Agrafe
- Scotch type OMS
- Insecticides (Timor)

- Cantine + cadenas

11.6.2. Lieu de prélèvement

Face latérale de l'annulaire gauche indemne de toute pathologie

11.6.3. Technique

- Découper du papier buvard à l'aide d'une paire de ciseaux environ 4 cm de long sur 2 cm.
- Diviser un des bouts du confetti en quatre dents (1/2 cm de largeur sur 1 cm de hauteur).
- Mettre en confiance le patient
- Inscrire le numéro d'identification du patient sur le buvard à l'aide du crayon
- Désinfecter la face latérale de l'annulaire gauche à l'aide d'un coton hydrophile imbibé d'alcool à 70%.
- Prendre ledit doigt du patient entre le pouce, l'index et le majeur et le piquer à l'aide d'un vaccinostyle stérile.
- ensuite, imbiber les 4 dents du papier buvard de sang en massant doucement toujours le doigt piqué de bas en haut.
- Après le prélèvement, appliquer du coton sec sur la partie piquée du doigt pour faire hémostase.
- Laisser sécher le confetti en l'accrochant sur un scotch adhésif suspendu à l'intérieur d'un carton qui se ferme bien. Laisser sécher complètement le confetti à l'abri de la poussière et des mouches.

11.6.4. Gestion du confetti

Après séchage, mettre chaque confetti dans une enveloppe portant le numéro d'identification du patient, la date du prélèvement et les garder soigneusement dans une cantine à l'abri des insectes et rongeurs.

Consigner chaque jour dans un registre, le numéro des confettis confectionnés.

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

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

Principe

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

Matériel et composition du Kit QIAamp® (QIAGEN)

Matériel :

- Ciseaux

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

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

Réactifs :

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

Composition du Kit QIAamp® (QIAGEN)

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

Prélèvement

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

Procédure

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

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

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

Principe

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

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

Matériel et réactifs :

Matériel :

- Gants stériles
- Tubes de 0,2ml, 1,5ml,
- Pipettes de 2µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Embouts de 2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Marqueur indélébile
- Chambre à PCR
- Racks pour les tubes
- Thermocycler
- Réfrigérateur

Réactifs :

Les amorces de la première amplification

-A2 : GTCTTCTGGGTCAGGGAT

-B2 : GGAGAAAGCTCTCTCTCC

Les amorces de la deuxième amplification

-NA4: CCTGTTCCCTCTGCCACA

-NB4: GGGGGTCTCAAGAAGTAC

-Platinum super Mix

Procédure de la PCR :

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

Déterminer le nombre N d'échantillon à traiter.

Prendre un tube Eppendorf 1,5 ml.

Mettre (N+1) x 22,5 µl de Platinum supermix.

Ajouter (N+1) x 0,1 µl de chacun des amorces **A2** et **B2** pour la première amplification ou **NA4** et **NB4** pour la deuxième amplification.

Bien mélanger.

Distribuer ce mélange dans les tubes PCR 0,2 ml déjà identifié en raison de 22,7 µl de mélange par tube PCR.

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

Placer les tubes PCR dans la machine de PCR et mettre en marche le programme A (Dénaturation initial 95°C pendant 3 min, 45 cycles de : 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 45 seconde, 72°C pendant 1 min. Extension final 72 °c pendant 5 min) pour la première amplification et le programme B Dénaturation initial 95°C pendant 3 min, 35 cycles de : 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 45 seconde, 72°C pendant 1 min. Extension final

72 °c pendant 5 min) pour la deuxième amplification.

Programme de la première amplification :

- Dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes

Puis 45 cycles de :

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

Programme de la deuxième amplification :

- Dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes

Puis 45 cycles de :

- Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
- Hybridation à 60°C pendant 1 minute
- Extension à 72°C pendant 45 secondes
- Extension finale à 74°C pendant 5 minutes

- Conservation à + 4°C pendant un temps indéterminé

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

Matériel et Réactifs :

Matériel :

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

Réactifs :

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

Procédure de la digestion enzymatique

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

Révélation et interprétation

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

Préparation du gel

Matériel

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

Réactifs :

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

Procédure :

- Peser 1,5 g de poudre d'agarose et le mettre dans une fiole,
- Ajouter 100 ml de solution de TBE 0,5X,
- Bouillir dans le micro-onde pendant 3 minutes,

- Laisser le refroidir un peu puis ajouter 3 μ l de bromure d'Ethidium,
- Couler le gel dans une moule mise en place à cet effet,
- Laisser le gel se refroidir et prendre en masse.

La migration :

Matériel :

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

Réactifs :

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

Procédure :

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

Interprétation de la photographie

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

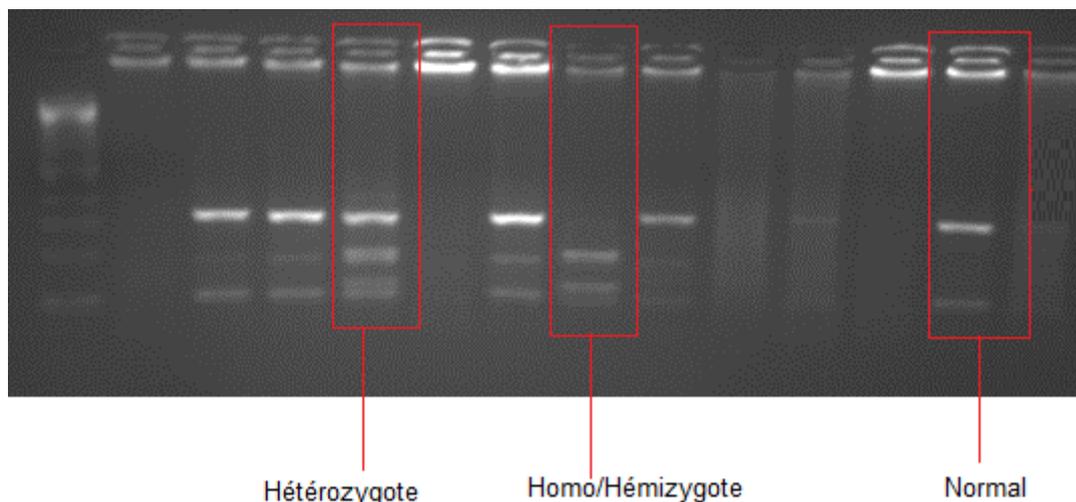


Photo de gel de migration du produit de la digestion

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 !