

Université des Sciences, des Techniques  
Et des Technologies de Bamako (USTTB)

Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS)

Année universitaire 2015-2016

N<sup>o</sup> .....

**Titre de la Thèse**

**Etude prospective des indicateurs du paludisme de 2008 à 2011 dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin dans la commune rurale de Bancoumana, Mali: Influence des polymorphismes du globule rouge.**

Présentée et soutenue publiquement le .../.../2016 devant la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie, Bamako, Mali

Par Mr. **Bourama KEITA**

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

**JURY**

**Président du jury** : Professeur Seydou DOUMBIA

**Membre** : Docteur Djénéba K. DABITAO

**Co-directeur**: Docteur Seidina A.S. DIAKITE

**Directeur de thèse** : Professeur Mahamadou DIAKITE

## **DEDICACE**

Je dédie ce travail,

A ALLAH, le tout puissant, le Miséricordieux pour m'avoir donné la santé et la force de réaliser ce travail.

A son prophète Mohamed (paix et salut sur lui)

A mon jeune frère, feu Soumaila Keita, que ce travail soit un grand hommage que je rends à ta mémoire.

A mon père Fousseyni Keita, Papa tu es plein de sagesse et de bonté. Je suis fière d'être ton fils. Sous ton toit je n'ai jamais ressenti ni faim ni soif. QU'ALLAH te protège et te garde très longtemps auprès de nous.

A mes mères Fanta Keita, Binko Keita, Korotoum Keita et Kani Fofana, les mots me manquent pour vous exprimer tout ce que je ressens du fond du cœur. Permettez-moi de vous remercier pour les énormes sacrifices consentis qui m'ont permis d'atteindre ce résultat. Vous avez été toujours attentionné, prévenante et soucieuse de notre avenir. Je vous demande encore en plus de vos bénédictions et vos conseils, de prier pour moi afin que je puisse être un modèle à suivre.

Que ce modeste travail, fruit de votre engagement, me rende digne de vous et que DIEU LE TOUT PUISSANT vous donne joie et encore longue vie.

A mes frères et sœurs, Idaba, Adam, Fanta, Lassyne, Assetou, Mohamed, Kadidiatou, Oumar, Seinabou, Tata, Cheick Oumar, Sadi tous Keita, merci pour votre amour, votre confiance et pour le soutien que vous m'avez apporté tout au long de ma vie. Certes, vivre ensemble n'est pas facile, mais vous avez toujours été patients et respectueux envers moi. Je ne pourrai jamais vous remercier assez. Ce travail est le vôtre.

## **REMERCIEMENTS**

A mon beau-frère Mamadou Algaly Fané, en remerciement à votre inlassable assistance à mon éducation et aux conditions idoines de travail ; votre sens de respect, votre intelligence et votre pacifisme sont là des qualités en vous que j'apprécie à sa juste valeur.

Au Dr Oumar Coulibaly, merci pour l'hospitalité que vous m'aviez réservé lors de mes stages dans votre service à Nioro.

Au Dr Fatoumata Maiga, vous avez toujours accordé un intérêt particulier à ma personne et à tout ce qui me concerne, soit assurée de ma profonde reconnaissance.

A mes amis, Dantouma Traoré, Modibo Diawara, Mamadou Sow, vous n'êtes pas seulement mes amis, vous êtes aussi ma famille. QU'ALLAH renforce davantage nos liens.

A mon ami et frère, Dr Harouna Fomba, le chemin a été difficile, mais grâce à Allah nous avons pu tenir. Plus qu'un ami tu es un frère, merci pour la franche collaboration.

A mes amis de la FMPOS, Zoumana Sangaré, Souleymane Mallé, Youssouf Diawara, Mamadou S Traoré, Mamadou Coulibaly, N'kotié Doumbia merci à vous tous pour la qualité de vos collaborations, vos soutiens moraux. Trouvez ici chers amis l'expression de mes profonds respects et de mes remerciements sincères.

A mes nièces et neveux, Mariam Fané, Aichatou Fané, Sankoung Fané, Djéneba Fané, Sidy Fané, Astan Sall, kounba Fané, Safiatou Fané... Je vous aime tous.

A toutes mes belles sœurs, Mariam Doumbia, Aminata Diarra, Maimouna Traoré, Kadidiatou Traoré, Adiaratou Keita, Je vous aime tous

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

A toute l'équipe de l'unité immunogénétique et Hémoglobinopathie du MRTC : Dr Seidina Diakité, Dr Drissa Konaté, Dr Karim Traoré, Dr Saibou Doumbia, Dr Ibrahim Sanogo, Dr Ismaila Coulibaly, Mr Salam Keita, et Dr Mory Doumbouya merci pour votre entière disponibilité, votre soutien, et votre sympathie. Ce travail est le vôtre. Je vous en suis sincèrement reconnaissant.

Enfin, mes remerciements vont, à tous ceux qui directement ou indirectement ont contribué à ma formation et dont les noms ne sont pas personnellement cités. Ce travail, n'est en somme que la résultante des efforts des uns et des autres.

## **Hommage aux membres de jury**

### **A notre Maître et Président de Jury**

#### **Professeur Seydou DOUMBIA**

- **Professeur titulaire en épidémiologie à la FMOS,**
- **Doyen de la FMOS**

#### **Cher Maître,**

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**

**Docteur Djénéba K DABITAO**

**Docteur en Pharmacie**

**PhD en Biologie Moléculaire et Immunologie**

**Assistant en Biologie Moléculaire à la Faculté de Pharmacie / USTTB**

**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 étrangères et de coopération (USTTB)**
- **Directeur scientifique adjoint du centre de recherche clinique de l'USTTB l'université**
- **Secrétaire permanent du comité d'éthique (FMOS /FAPH).**

**Cher Maître,**

Vous nous avez honorés en acceptant de diriger 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 fières d'être cités parmi vos élèves, 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 pour le contrôle des maladies et de la prévention)
CR	Complement Receptor (récepteur-1 du complément, exemple CR1)
CRF	Cases Report Form (Formulaire de rapport des cas)
CSA	Chondroitin Sulfate A (traduction française ?)
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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
Hb	Hémoglobine
Ht	Hématocrite
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule (molécule d'adhésion intercellulaire)
IFN	Interféron (exemple IFN- $\alpha$ )
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	Natural Killer (cellule tueuse naturelle)
NO	Oxide nitrique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PB	Polynucléaire Basophile
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PE	Polynucléaire éosinophile
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (molécule d'adhésion cellulaire endothéliale des plaquettes)
PfEMP	Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane protein (Protéine membranaire érythrocytaire de P. falciparum)
PfHRP	Plasmodium falciparum Histidin Rich protein (protéine riche en histidine de P. falciparum)
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	Tumor Necrosis Factor (Facteur nécrosant tissulaire)
USTTB	Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako
VCAM-1	Vascular Cell Adhesing Molecular-1 (molécule d'adhésion cellulaire vasculaire)
WBC	White Blood Cells (Globules blancs)
WHO	World Health Organisation (Organisation mondiale de la santé)

# Table des matières

<b>Hommage aux membres de jury</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Objectifs</b> .....	<b>3</b>
2.1. Objectif général .....	3
2.2. Objectifs spécifiques .....	3
<b>3. Généralités sur le paludisme</b> .....	<b>4</b>
3.1. Définition .....	4
3.2. Epidémiologie.....	4
3.2.1. Agents pathogènes .....	4
3.2.2. Vecteur.....	4
3.2.3. Cycle de vie du <i>Plasmodium</i> .....	5
3.2.4. Faciès épidémiologiques du paludisme .....	7
3.2.5. Groupes à risque élevé de paludisme sévère .....	9
3.3. Physiopathologie du paludisme.....	9
3.3.1. Accès palustre simple .....	9
3.4. Hémoglobinopathies.....	12
3.4.1. Rappel sur l'hémoglobine normale.....	12
3.4.2. Drépanocytose .....	13
3.4.3. Thalassémies .....	13
3.4.4. Déficit en G6PD .....	15
3.4.5. Groupes sanguins ABO .....	16
3.5. Immunité antipalustre .....	16
3.5.1. Immunité innée ou naturelle.....	16
3.5.2. Immunité adaptative ou acquise .....	16
<b>4. METHODOLOGIE</b> .....	<b>18</b>
4.1. Cadre d'étude.....	18
4.2. Lieu d'étude.....	18
4.2.1. Situation géographique .....	18
4.2.2. Végétation/hydrographie/climat.....	19

4.2.3. Infrastructures socio-sanitaires .....	21
4.2.4. Activités socio-économiques et culturelles .....	21
4.3. Type et période d'étude.....	22
4.4. Echantillonnage.....	23
4.5. Critères d'inclusion et de non-inclusion .....	23
4.5.1. Critères d'inclusion.....	23
4.5.2. Critères de non-inclusion .....	23
4.6. Variables mesurées.....	23
4.7. Description des techniques de laboratoire réalisés .....	23
4.8. Définitions opérationnelles .....	24
4.9. Déroulement et procédure d'étude .....	25
4.10. Collecte, gestion et analyse des données .....	25
4.11. Considérations éthiques.....	26
<b>5. Résultats .....</b>	<b>27</b>
5.1. Résultats globaux.....	27
5.2. Résultats descriptifs .....	27
5.2.1. Caractéristiques sociodémographiques .....	27
5.2.2. Répartition des polymorphismes érythrocytaires chez les participants .....	28
5.2.3. Proportion des phénotypes cliniques parmi nos participants .....	30
5.3. Résultats analytiques .....	31
<b>6. Commentaires et discussion.....</b>	<b>39</b>
<b>8. Conclusion et recommandations.....</b>	<b>43</b>
8.1. Conclusion .....	43
8.2. Recommandations .....	43
<b>9. Références bibliographiques .....</b>	<b>44</b>
<b>10. Fiche signalétique .....</b>	<b>47</b>
<b>Summary .....</b>	<b>48</b>
<b>11. Annexes.....</b>	<b>49</b>
11.1. Détermination du Taux d'hémoglobine.....	49
11.2. Détermination du groupe sanguin ABO.....	50
11.3. Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10 .....	51
11.4. Procédures standard opératoires (SOP) de la goutte épaisse .....	52

11.5. Procédures Standard Opératoires (SOP) : Frottis Mince .....	56
11.6. Procédures Standard Opératoires (SOP) : Confection duconfetti .....	59

## Liste des figures

Figure 1. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> .....	7
Figure 2. Sites d'étude.....	19
Figure 3. Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana	19
Figure 4. Répartition des sujets en fonction des classes d'âge .....	27
Figure 5. Répartition des participants en fonction de l'ethnie .....	28
Figure 6. Répartition des participants en fonction du groupe sanguin .....	28
Figure 7. Répartition des participants en fonction du type d'hémoglobinique .....	29
Figure 8. Répartition des participants en fonction de leur statut en G6PD .....	29
Figure 9. Répartition des participants en fonction du portage de l'alpha-thalassémie .....	30
Figure 10. Prévalence annuelle du paludisme au cours des quatre années d'étude .....	30
Figure 11. Répartition des participants en fonction des formes cliniques du paludisme .....	31
Figure 12. Distribution temporelle mensuelle des cas du paludisme au cours de la saison de transmission palustre (juin à janvier). .....	31
Figure 13. Répartition des cas du paludisme en fonction de la résidence et de l'année .....	32
Figure 14. Répartition des cas du paludisme en fonction du sexe.....	32
Figure 15. Répartition des cas du paludisme en fonction des classes d'âge.....	33
Figure 16. Proportion des différentes formes clinique du paludisme grave au cours de l'étude .....	33

## Liste des tableaux

Table I : Classification des niveaux d'endémicité de la transmission.....	9
Table II : Symptômes cliniques du paludisme [14].....	11
Table III: Critères de gravité du paludisme [14] .....	12
Table IV : Répartition des participants en fonction du sexe et de la résidence.....	27
Table V : Taux moyen d'hémoglobine chez les patients en fonction des années.....	34
Table VI : Parasitémie moyenne en fonction des années.....	34
Table VII : Taux moyen d'hémoglobine selon l'année et le type d'hémoglobine .....	35
Table VIII : Parasitémie moyenne selon le type d'hémoglobine et l'année .....	35
Table IX : Taux moyen d'hémoglobine selon l'année et le groupe sanguin ABO .....	35
Table X : Parasitémie moyenne selon l'année et le groupe sanguin ABO.....	36
Table XI : Taux moyen d'hémoglobine en fonction de l'alpha-thalassémie et de l'année d'étude .....	36
Table XII : Parasitémie moyenne selon l'alpha-thalassémie et l'année .....	37
Table XIII : Taux moyen d'hémoglobine selon l'année et le déficit en G6PD .....	37
Table XIV : Parasitémie moyenne selon le déficit en G6PD et l'année d'étude.....	38

## 1. Introduction

Le paludisme représente la parasitose la plus importante dans le monde de par sa prévalence et sa distribution géographique. Il concerne particulièrement les zones tropicales et subtropicales où il est potentiellement mortel. C'est un problème majeur de santé publique de par sa morbidité et sa mortalité élevées surtout chez les enfants de moins de cinq ans. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 3,3 milliards de personnes sont à risque de paludisme. En effet 198 millions de cas de paludisme et 584000 décès ont été recensés en 2013 [1]. La région la plus touchée est l'Afrique dont 90% des cas de décès sont enregistrés et parmi lesquels 78% sont les enfants de moins de cinq ans [1]. L'OMS estime que l'évolution de l'incidence et de la mortalité du paludisme ont respectivement diminuées de 30% et de 47% au niveau mondial entre 2000 et 2013 [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 1er rang des affections et représente 44% des motifs de recours aux soins dans les structures sanitaires dans la population générale [3]. Malgré les caractéristiques d'endémicité différentes, toute la population Malienne est à risque de paludisme. Les niveaux de transmission varient considérablement d'une région à une autre et dans une même région, d'une localité à une autre suivant les conditions écologiques et climatiques [4]. La saison des pluies qui dure de 3 à 6 mois est très favorable à la transmission de la maladie.

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% la morbidité et la mortalité imputables au paludisme. Parmi les principales interventions du Plan Stratégique 2013-2017 [4], il y a 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.

Les indicateurs du paludisme permettent de faire un suivi rigoureux de la maladie de sorte à évaluer l'efficacité des différentes mesures de prévention et de traitement. De nombreuses études transversales ont été menées sur les indicateurs palustres au Mali. Cependant, ce type d'étude bien qu'instructive ne renseignent pas sur l'impact des stratégies de lutte antipalustre mises en œuvre dans différentes localités.

Les indicateurs de paludisme les plus fréquemment utilisés sont les taux de mortalité et de morbidité. D'autres indicateurs mineurs sont informatifs concernant les prises de décision comme l'incidence, la distribution géographique des cas de paludisme, la proportion des cas graves de paludisme, la fréquence de différentes manifestations graves du paludisme. Il est important de prendre en compte l'influence ( ?) de facteurs pouvant influencer ces indicateurs. Parmi ces facteurs, les polymorphismes du globule rouge sont les mieux étudiés. En effet, le rôle protecteur contre le paludisme des polymorphismes de GR comme le trait drépanocytaire (l'hémoglobine S à l'état hétérozygote HbAS), l'hémoglobine C ( HbAC et HbCC), l' $\alpha$ -thalassémie, le déficit en Glucose-6-phosphate déshydrogénase, et le groupe sanguin O du système ABO ont été décrits [5-7]. Prendre en compte ces facteurs dans l'étude des indicateurs de paludisme s'avère important pour l'affinement des informations et l'adaptation adéquate des stratégies de lutte contre le paludisme dans une zone donnée.

Le but de la présente étude était d'examiner l'évolution de certains indicateurs palustres entre 2008 et 2011 à Kéniéroba au cours d'une étude de cohorte chez les enfants. Ce travail contribuera ainsi au renforcement et à l'amélioration de la lutte contre le paludisme dans la localité. Et aussi à la formation des jeunes chercheurs.

## **2. Objectifs**

Pour bien mener cette étude, nous nous sommes fixés les objectifs suivants.

### **2.1. Objectif général**

Etudier l'évolution des indicateurs palustres chez les enfants de 0 à 17 ans résidant dans l'aire de santé de Kéniéroba et vus en consultation entre 2008 et 2011 au centre de sante de Kéniéroba.

### **2.2. Objectifs spécifiques**

- Déterminer l'incidence du paludisme chez les enfants de 0 à 17 ans résidents à Kéniéroba au cours des saisons de transmission palustre 2008, 2009, 2010 et 2011 ;
- Déterminer les proportions de paludisme grave recensées chez les enfants de 0 à 17 ans résidents à Kéniéroba entre 2008 et 2011 ;
- Déterminer la fréquence de distribution des différentes formes cliniques chez les enfants de 0 à 17 ans résidents à Kéniéroba au cours de la même période ; et
- Déterminer la prévalence et l'effet des variants du globule rouge (HbAS, HbAC,  $\alpha$ -thalassémie, déficit en G6PD et groupes sanguins ABO) sur les indicateurs ci-dessus cités chez les enfants de 0 à 17 ans résidents à Kéniéroba.

### **3. Généralités sur le paludisme**

#### **3.1. Définition**

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante provoquée par la présence et la multiplication dans l'organisme des protozoaires du genre *Plasmodium*, qui sont transmis à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique du genre *Anopheles* lors de son repas sanguin.

#### **3.2. Epidémiologie**

L'épidémiologie du paludisme est extrêmement variable d'une zone géographique à une autre. Cette hétérogénéité est sous la dépendance de nombreux facteurs tels que la distribution des anophèles et de leur capacité vectorielle, des caractéristiques biologiques des différentes espèces de *Plasmodium* et de l'hôte. La répartition géographique varie d'un continent à l'autre, d'un pays à l'autre, mais aussi d'une région à une autre, d'un village à un autre et même parfois au sein d'un même village.

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.

##### **3.2.1. Agents pathogènes**

Le paludisme est transmis par un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (plus de 140), touchant diverses espèces animales mais seulement cinq de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine. Il s'agit de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. Ce dernier est un parasite habituel des singes d'Asie qui vient de passer récemment chez l'homme [2]. Les cinq espèces diffèrent par des critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques.

*P. falciparum* est l'espèce la plus largement répandue à travers le monde, responsable des formes cliniques potentiellement mortelles et qui développe des résistances aux antipaludiques [2].

##### **3.2.2. Vecteur**

Le paludisme est transmis à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique culicidé du genre *Anopheles* au moment de son repas sanguin. Seule la femelle, hématophage, transmet la maladie.

Les larves d'anophèles se développent dans les collections d'eau. La nature des sols, le régime des pluies, la végétation naturelle ou l'agriculture, rendent les collections d'eau plus ou moins propices au développement des espèces vectrices. Certaines espèces ont ainsi pu s'adapter à des milieux particuliers comme le milieu urbain. Le développement et la longévité des anophèles dépendent de la température avec un optimum entre 20 et 30° pour une durée de vie de l'ordre de 30 jours [2].

### **3.2.3. Cycle de vie du *Plasmodium***

#### **3.2.3.1. Cycle chez le moustique (ou sporogonie)**

Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes à potentiel mâle et femelle. Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'exflagellation à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés. Il en résulte un zygote appelé ookinète (ou œuf mobile) qui va s'implanter sous la paroi stomacale de l'anophèle et former l'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique qui sera suivi de plusieurs milliers de mitoses conduisant au développement de sporozoïtes. Ces derniers vont gagner préférentiellement les glandes salivaires et constituent les formes infectantes prêtes à être inoculées avec la salive lors du repas sanguin sur l'homme ou autre animal. L'ensemble de ce cycle se déroule en 4 à 10 jours, suivant la température extérieure et les espèces en cause [8].

#### **3.2.3.2. Cycle chez l'homme**

##### **✚ Cycle exo-érythrocytaire**

Les sporozoïtes inoculés par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin envahissent les hépatocytes en quelques minutes, grâce à une interaction entre la protéine majeure de la surface du sporozoïte (CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte du côté de l'espace de Disse (espace en contact avec le sang circulant). Le sporozoïte entre alors en phase de réplication au sein de la vacuole parasitophore, et de la prolifération intracellulaire qui repousse en périphérie le noyau de la cellule. Ce dernier finit par constituer une masse multinucléée appelée schizonte (schizonte hépatocytaire). Après quelques jours de maturation, ces schizontes éclatent et libèrent de milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure de 8 à 15 jours selon les espèces.

Dans les infections dues à *P. vivax* et à *P. ovale*, on peut observer les formes dormantes appelées hypnotiques (schizogonie hépatique retardée) entraînant la libération dans le sang de mérozoïtes plusieurs mois après l'infection, expliquant ainsi les rechutes tardives observées avec ces espèces.

### **Cycle intraérythrocytaire**

C'est la phase du cycle qui est responsable des symptômes imputables au paludisme. Ces symptômes sont d'intensités variables en fonction du profil immunitaire de la personne infectée. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture des schizontes hépatocytaires vont débiter le cycle sanguin asexué de prolifération en infectant les érythrocytes. Le mérozoïte pénètre grâce à un processus parasitaire actif et se différencie au sein de la vacuole parasitophore en anneau, puis en trophozoïte, stade à partir duquel une intense phase répliquative commence. Il donne alors naissance au schizonte qui, après une segmentation montre une forme caractéristique de rosace, entraînant la destruction des globules rouges et la libération de 8 à 32 mérozoïtes. Ces mérozoïtes vont rapidement réinfecter d'autres érythrocytes sains et commencer un nouveau cycle de réplication. L'ensemble de ce cycle dure 48 à 72 heures selon l'espèce plasmodiale.

L'apparition des gamétocytes a lieu après un certain nombre de cycles, généralement vers la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. Certains mérozoïtes subissent une maturation accompagnée d'une différenciation sexuée et se transforment en gamétocytes mâle et femelle. A la suite d'une nouvelle piqûre lors de son repas sanguin, les gamétocytes mâles et femelles (au dimorphisme sexuel marqué) sont ingérés par l'anophèle pour un nouveau cycle.

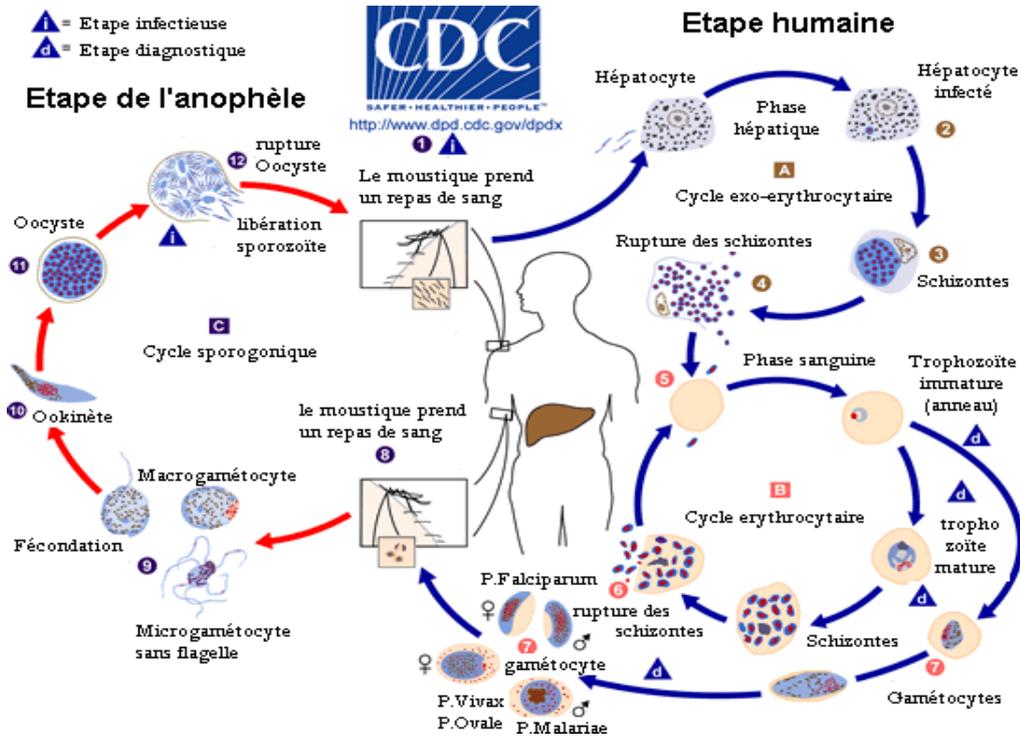


Figure 1 : Cycle biologique du *Plasmodium*

**Source:** National center for infectious diseases (CDC, [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)), Atlanta, Georgia, Division of parasitic diseases (Department of Health and Human Services US).

### 3.2.4. Faciès épidémiologiques du paludisme

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

L'indice de stabilité, déterminé par Macdonald [9], caractérise l'enracinement du paludisme et permet de distinguer :

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

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

Entre ces deux extrêmes existe toute une palette de situations intermédiaires, modulée par différents facteurs comprenant le type de transmission, le type de vecteur, l'espèce plasmodiale en cause et le niveau d'immunité dans la population ainsi que les caractéristiques environnementales.

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 [10].

- Une zone soudano-guinéenne à transmission saisonnière longue  $\geq 6$  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 ;
- Une zone sahélienne à transmission saisonnière courte  $\leq 3$  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. L'IP se situe entre 40-50%. L'anémie reste un phénotype clinique important ;
- 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 paludisme.

La variation de transmission d'une région à l'autre permet de définir des zones épidémiologiques.

**Tableau I : Classification des niveaux d'endémicité de la transmission**

Zone	Transmission	Immunité chez l'adulte	Type de paludisme	IP chez les enfants de 2-5 ans(%)
<b>Holoendémique</b>	Intense toute l'année	Solide	Paludisme stable	>75
<b>Hyperendémique</b>	Intense avec variation saisonnière	Significative	Paludisme stable	51-75
<b>Mésoendémique</b>	Variable	Non significative	Paludisme Instable	11-50
<b>Hypoendémique</b>	Faible	Nulle	Paludisme Instable	≤10

### 3.2.5. Groupes à risque élevé de paludisme sévère

Les personnes à risque de paludisme sévère sont [11] :

- les enfants vivants 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 mésoendémiques ;
- les voyageurs venant des régions où il n'existe pas de transmission de paludisme et qui se rendent dans une région impaludée ;
- les personnes qui retournent dans des régions fortement endemiques après quelques années d'absence ; et
- les femmes enceintes (à risque pour toutes les complications).

### 3.3. 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).

#### 3.3.1. Accès palustre simple

Les symptômes du paludisme commencent à se développer à partir du stade intra érythrocytaire du cycle de développement du parasite. La fièvre est surtout due à une substance pyrogène (l'hémozoïne) déversée lors de l'éclatement des globules rouge parasités. En outre, plusieurs cytokines ont un effet pyrogène comme l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6 et

surtout le TNF- $\alpha$  [12]. La destruction des globules rouges conduit à l'anémie ainsi que d'autres mécanismes auto-immunitaires telles que :

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

Au cours de l'infection, le système monocyte/macrophage débarrasse l'organisme non seulement des pigments malariques mais aussi des débris érythrocytaires, ce qui entraîne l'hépto-splénomégalie [13].

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 pyrogène 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 (6-9 ans) en zone d'endémie restera le plus souvent asymptomatique, même à une parasitémie très élevée [13].

**Table II :** Symptômes cliniques du paludisme [14].

Symptômes	Proportions de malades présentant le symptôme
Fièvre élevée ( $\geq 39^{\circ}$ )	99-100
Céphalées	84
Frissons	81
Splénomégalie	69
Anémie	68
Transpiration	67
Nausées	39
Vomissements	39
Arthralgie	39
Diarrhée	18
Toux	16
Douleurs abdominales	16

### 3.3.2. Accès palustre grave et compliqué

Le neuropaludisme et l'anémie sont les deux formes cliniques majeures fréquemment rencontrées suite à un accès simple mal ou non traité. 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 [13].
- l'adhérence immunologique de globules rouges parasités à l'endothélium vasculaire post-capillaires entraînant des ralentissements importants de la circulation. 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<sup>+</sup>, de certaines interleukines, en particulier le TNF et les récepteurs endothéliaux tels que la molécule d'adhésion intercellulaires de type I (ICAM-1)[13].

L'expression symptomatique est marquée par les convulsions (zone motrice), 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 [13].

**Table III:** Critères de gravité du paludisme [14]

Neuropaludisme (score de Glasgow<9, score de Blantyre <2 chez l'enfant de moins de 5 ans)
Troubles de la conscience (score de Glasgow<15 et >9)
Convulsions répétées (>1/24 heures)
Prostration
Syndrome de détresse respiratoire
Ictère (clinique)
Acidose métabolique (bicarbonates plasmatiques<15 mmol/L)
Anémie grave (Hb<5g/dl ou Ht<15%)
Hyperparasitémie (>4%chez le sujet non immun ou >20%chez le sujet immun)
Hypoglycémie (<2,2mmol/L)
Hémoglobinurie macroscopique
Insuffisance rénale -adulte : diurèse<400ml/24h ou créatininémie>265µmol/L -enfant : diurèse<12ml/kg/24h ou créatininémie élevée pour l'âge
Collapsus circulatoire (TAS* <50mmHg avant 5 ans, TAS<80mmHg après 5 ans)
Hémorragie anormale
Œdème pulmonaire (radiologique)

\*TAS = tension artérielle systolique

### 3.4. Hémoglobinopathies

#### 3.4.1. Rappel sur l'hémoglobine normale

L'hémoglobine (Hb) humaine est une protéine dont la principale fonction est le transport de l'oxygène dans l'organisme. Elle se retrouve essentiellement dans les globules rouges du sang, ce qui leur confère leur couleur rouge. L'Hb est constitué de quatre molécules de

globines (deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$ ) 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, l'acide folique, etc.

En fonction de la nature des deux chaînes  $\beta$  de la globine, on distingue l'HbA ( $\alpha_2, \beta_2$ ), l'HbA2 ( $\alpha_2, \delta_2$ ) et l'HbF ( $\alpha_2, \gamma_2$ ). 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 12 à 17,5g/dl chez l'homme et 11 à 15,5g/dl chez la femme.

### **3.4.2. Drépanocytose**

La drépanocytose est une maladie génétique récessive autosomique liée à une anomalie de structure de la chaîne  $\beta$  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). En Afrique, les zones de paludisme sévère coïncident avec celles où la mutation drépanocytaire est endémique [15].

La drépanocytose est le résultat d'une mutation ponctuelle au niveau de la position 6 du gène codant pour la chaîne  $\beta$  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 [16].

Le trait drépanocytaire (HbAS) est généralement asymptomatique. L'hémogramme est normal ainsi que la morphologie des globules rouges. Il conférerait une protection contre certaines formes cliniques du paludisme, ce qui expliquerait la distribution géographique de la drépanocytose dans les zones impaludées [17].

### **3.4.3. Thalassémies**

Les thalassémies sont des affections génétiques caractérisées par une réduction de synthèse des chaînes de globine ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) due à une anomalie au niveau de leurs gènes de régulation. Le déséquilibre de synthèse entre chaînes  $\alpha$  et non- $\alpha$  provoque la précipitation des chaînes non appariées, une érythropoïèse inefficace et une anémie.

### 3.4.3.1. Alpha-thalassémie

Les  $\alpha$ -thalassémies sont le plus souvent la conséquence de la délétion d'un ou de plusieurs gènes  $\alpha$ . L'inactivation d'un ou de plusieurs gènes se traduit par des tableaux cliniques différents.

On distingue ainsi :

- l' $\alpha$ -thalassémie hétérozygote silencieuse : caractérisée par la délétion d'un seul gène  $\alpha$ . L'hémogramme montre une microcytose modérée ou normale ;
- l' $\alpha$ -thalassémie hétérozygote mineure : elle correspond à la délétion de deux gènes  $\alpha$ . Il n'y a pas de conséquence clinique. Chez les nouveaux nés, on observe environ 5 à 10% d'Hb Bart's (g4) ;
- l'inactivation de 3 gènes  $\alpha$  est responsable d'une maladie à HbH. Son expression clinique est variable allant d'une anémie hémolytique chronique modérée (pâleur, ictère, hépato- splénomégalie) à une anémie plus sévère dans la plupart des cas. Cette anémie est microcytaire et hypochrome. L'anémie peut se compliquer à la suite d'épisode infectieux ou de la prise de médicaments antioxydants ;
- la délétion de 4 gènes  $\alpha$  : surtout rencontrée en Asie du sud-est, responsable de la délétion de deux gènes alpha en cis à l'état hétérozygote. Cette anomalie n'a pas été décrite en Afrique.

Les données épidémiologiques montrent que l' $\alpha$ -thalassémie délétionnelle ( $-\alpha$ ), la plus fréquente, est protectrice contre les formes graves de paludisme dans sa forme hétérozygote ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) comme dans sa forme homozygote ( $-\alpha/-\alpha$ ). Elle n'est, en revanche, pas protectrice vis-à-vis des formes plus bénignes, et la densité parasitaire ne semble pas diminuée [18].

### 3.4.3.2. Beta-thalassémie

La diminution de synthèse de la chaîne  $\beta$ -globine dans la  $\beta$ -thalassémie entraîne la diminution de la quantité d'hémoglobine présente dans les hématies. Ceci entraîne une microcytose et une hypochromie. La microcytose est compensée par l'augmentation du nombre des hématies. On observe alors une pseudo-polyglobulie sans anémie.

On distingue trois formes de  $\beta$ -thalassémie :

- **la forme majeure ou forme de Cooley**, caractérisée par l'anémie grave à la fois hémolytique et hypochrome, peu régénérative, qui sans traitement aboutit à la mort avant l'âge de dix ans. Elle devient manifeste lorsque la synthèse des chaînes  $\beta$  remplace celle des chaînes gamma (HbF) dès les premiers mois de vie ;

- **la forme mineure ou hétérozygote**, cliniquement asymptomatique et caractérisée sur le plan hématologique par une pseudo-polyglobulie modérée associée à une hypochromie et une microcytose constante. Le taux d'hémoglobine est normal ou peu diminué ;
- **la forme intermédiaire** présente les signes de la maladie de Cooley mais sous forme atténuée ne nécessitant pas un traitement transfusionnel systématique. Elle est caractérisée par une production résiduelle d'hémoglobine de 60 à 110 g/l, avec une anémie modérée pouvant s'aggraver lors d'une infection, d'une grossesse ou d'une carence en folates.

Les études portant sur l'association entre paludisme et beta-thalassémie ont donné des résultats conflictuels [19, 20].

#### **3.4.4. Déficit en G6PD**

Le déficit en glucose-phosphate-6-déshydrogénase (G6PD) est l'anomalie génétique la plus fréquente dans le monde avec plus de 420 millions de personnes concernées dans le monde [21]. Sur le plan génétique, le gène codant la G6PD est porté par le bras long du chromosome X, en position q28. Le déficit en G6PD est transmis sur le mode récessif. Les garçons hémizygotés et les filles homozygotes expriment totalement la maladie. Cependant, les garçons sont de très loin les plus touchés que les filles qui sont en général porteuses saines.

Sur le plan biochimique, le déficit en G6PD altère le fonctionnement de la voie des pentoses, l'une des 4 voies du métabolisme énergétique. La G6PD est l'enzyme permettant la réduction du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP<sup>+</sup>) en nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) nécessaire à plusieurs réactions biosynthétiques. Le NADPH est nécessaire pour maintenir en équilibre le glutathion réduit qui aide à lutter contre le stress oxydatif.

En Afrique, le déficit en G6PD est essentiellement un polymorphisme tri-allélique. Le G6PD B le variant normal associé à une activité enzymatique normale (100%), est l'allèle le plus rencontré. Le G6PD A qui a 90% de l'activité enzymatique du G6PD B est le second allèle fréquent. Le troisième allèle qui est l'allèle déficient fréquent en Afrique est le G6PD A<sup>-</sup> avec une activité enzymatique de 12% [22]. Cet allèle est unique car il contient deux mutations : la première au niveau du nucléotide 376 (exon 5) qui est une substitution de l'adénine par la guanine, conduisant à la formation de l'aspartate au lieu de l'asparagine et la seconde au niveau du nucléotide 202 (exon 4) aboutissant à la substitution de la guanine par l'adénine [23].

Les données actuelles provenant de plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest et de l'Est n'ont pas confirmé la protection observée chez les femelles hétéro-et homozygotes [24]. Ils ont surtout observé une protection contre le paludisme sévère chez les mâles hémizygotes de l'ordre de 36% [25]. Ces résultats conflictuels semblent être expliqués par l'hétérogénéité allélique du déficit en G6PD [25, 26].

### **3.4.5. Groupes sanguins ABO**

Le groupe sanguin ABO érythrocytaire est un ensemble d'antigènes glucidiques allotypiques sur la membrane des globules rouges. 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 possède l'antigène A, ceux du groupe sanguin B possède l'antigène B, ceux du groupe sanguin AB possèdent les deux antigènes A et B alors que ceux du groupe O ne contiennent pas les deux antigènes A et 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 et la présence de l'anticorps dirige contre l'antigène absent (sous peine de formation d'un complexe antigène-anticorps).

L'effet de protection associé au groupe sanguin O a été décrit en Afrique au sud du Sahara [7, 26]. Il serait à l'origine de la fixation de ce groupe sanguin dans cette zone. Des études expérimentales *in-vitro* ont rapporté une perturbation du phénomène de rosetting, un phénotype associé à la gravité du paludisme *in-vivo* avec des GR de ce groupe sanguin [7].

## **3.5. Immunité antipalustre**

### **3.5.1. Immunité innée ou naturelle**

Cette immunité est imparfaitement connue. Il existe très probablement des facteurs génétiques conférant à certains sujets une immunité naturelle ou moins partielle. On évoque des facteurs érythrocytaire (sujet hétérozygote HbAS), groupe sanguin Duffy négatif et des facteurs génétiques tels que le groupe HLA, le polymorphisme de la réponse immune et les facteurs ethniques [2].

### **3.5.2. Immunité adaptative ou acquise**

Elle joue un rôle essentiel au cours du paludisme. Cette immunité s'acquiert progressivement en situation d'exposition continue. Elle n'est pas stérilisante (elle n'empêche pas d'être de nouveau contaminé) et ne permet pas de se débarrasser totalement des parasites. En revanche, elle empêche progressivement la survenue de formes cliniques graves. Cela

explique qu'en zone de transmission saisonnière intense, les jeunes enfants payent le plus lourd tribut à la maladie à partir de l'âge de 4 à 6 mois lorsque la protection conférée par les anticorps maternels transmis s'amenuise. Il existe une fenêtre de susceptibilité accrue entre 6 mois (absence d'anticorps maternels) et jusqu'à 5 à 6 ans (immaturité du système infantile). Progressivement, le risque d'accès grave diminue alors que le sujet tolère des parasitémies de plus en plus importantes tout en restant cliniquement asymptomatique. Ainsi, les adultes bien que pouvant être infectés ne développent pas les formes sévères de la maladie.

Cette immunité n'est pas totale et définitive, une personne émigrée en zone tempérée pendant 2 ou 3 ans perd progressivement sa protection et devient vulnérable au même titre qu'un sujet «neuf» récemment arrivé en zone d'endémie [2].

## 4. METHODOLOGIE

### 4.1. Cadre d'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche sur le paludisme à *P. falciparum*, menée par le MRTC/FMPOS/USTTB en collaboration avec le NIAID/NIH des Etats-Unis d'Amérique.

### 4.2. Lieu d'étude

Notre étude s'est déroulée dans les villages de Kéniéroba, Bozokin et Fourda dans la commune rurale de Bancoumana.

Bancoumana est un village situé à 55km à l'ouest de Bamako sur la route nationale 15 (RN15) dans la zone soudano-guinéenne. La commune comporte 4 centres de santé et un centre de santé communautaire qui est celui de Bancoumana. Il existe un partenariat entre le centre et le MRTC/NIH dans le cadre de l'exécution de ces activités de recherche. La commune est limitée au nord par celle de Siby, à l'est par la commune rurale du Mandé, au sud-ouest par la commune rurale du Minindian et au sud-est le fleuve Djoliba qui la sépare des communes de Niagadina et de Kourouba.

#### 4.2.1. Situation géographique

**Le village de Kéniéroba** est situé au sud-ouest de Bamako, à 60km sur la route RN15 de Kangaba. Refondé par Maré Famissa KEITA après son déclin pendant le règne de Samory Touré, qui fit réunir ses frères dispersés sur la terre de leur ancêtres d'où le nom Kéniéroba. Il est limité au sud-est par Fourda, au nord par Nanguilabougou et à l'ouest par Ticko. Il compte environ 2341 habitants, qui sont essentiellement des Malinkés, des Peulhs et des Bambaras (recensement MRTC/FMPOS 2012).

**Le village de Fourda** est un hameau de pêche situé à 3km au sud-est de Kéniéroba. Il fut fondé par les frères Sogoré (Kalifa, Sinimba, Fodé, Mamady et Drissa) venus de Kangaba dans le but de faire la pêche. Il compte 325 habitants qui sont essentiellement les Somonos (malinkés) mais aussi les Bambaras et les Peulhs (recensement MRTC/FMPOS 2012).

**Le village de Bozokin** est un hameau de Bancoumana situé à 7km au sud-ouest de Bancoumana. Il fut fondé par Soungalo Traoré il y a plus de 100 ans pour mener ses activités de pêche. Il compte actuellement 341 habitants dont des Bozos qui sont majoritaires (Konta devenu Konaté par le langage mandingue) mais aussi les Peulhs et les Dogons (recensement MRTC/FMPOS 2012).

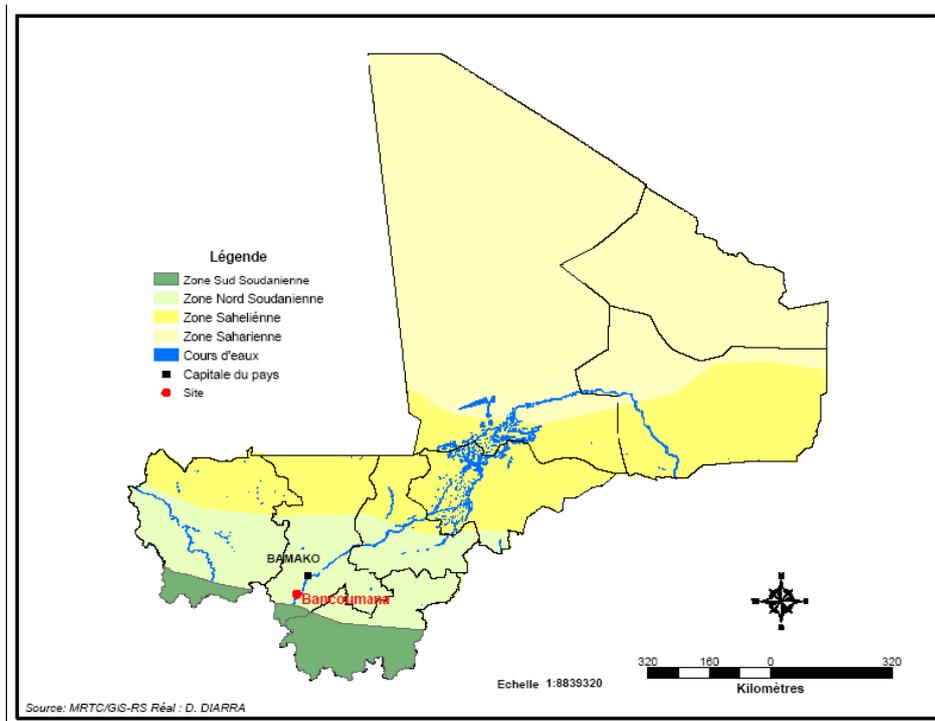


Figure 2 : Sites d'étude

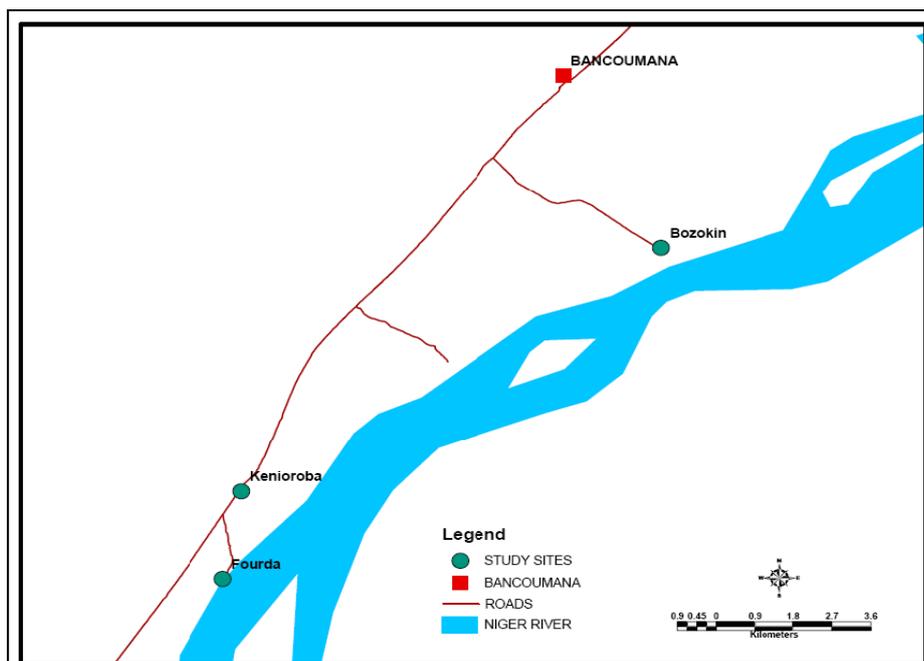


Figure 3 : Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana

Source: Unité GIS MRTC/FMPOS.

#### 4.2.2. Végétation/hydrographie/climat

Les trois villages sont situés le long du fleuve Niger (Djoliba) qui constitue le principal réseau hydrographique. La couverture végétale originale rencontrée sous un climat soudano-guinéen

marque la transition entre la savane arborée et la forêt guinéenne. Ce type de végétation existe encore à l'état délictuel au niveau des bois sacrés et le long du fleuve Niger.

Les feux de brousse, l'exploitation du bois de chauffage, les défrichements nécessaires aux cultures ont profondément dégradé cette végétation, devenant propice à l'implantation des moustiques

La savane arborée constitue la principale formation végétale mais aussi quelques galeries forestières. On distingue :

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

Les trois villages se situent dans une zone climatique soudano-guinéenne. Deux grandes saisons se succèdent dans cette zone : la saison des pluies de juin à octobre et la saison sèche de novembre à mai. Une courte saison de transition s'étalant de novembre à janvier que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de fôbônda qui se caractérise par un adoucissement voire un rafraîchissement des températures par l'arrivée des vents des côtes atlantiques de l'harmattan.

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

La température la plus élevée se situe à ~40°C au mois de mai et la plus basse est voisine de 18°C aux mois de décembre-janvier. La température moyenne annuelle est autour de 23°C. D'une manière générale, le climat y est assez agréable et la végétation est luxuriante.

La faune entomologique est constituée d'invertébrés et d'arthropodes. *Anophèles gambiae sl* et *An. funestus* abondent dans les villages où ils assurent la transmission du paludisme et de la filariose de Bancrofti surtout en saison des pluies. Les similis transmettent l'onchocercose durant l'hivernage tandis que les glossines (mouche tsé-tsé) transmettent la maladie du sommeil. *Anophèles gambiae sl* est le vecteur majeur du paludisme rencontré dans la zone d'étude.

#### **4.2.3. Infrastructures socio-sanitaires**

La commune dispose :

- dans le domaine de l'éducation :

Dix (10) écoles publiques dont 4 seconds cycles

Trois (03) écoles communautaires

Sept (07) medersas communautaires

Dix Huit (18) centres d'alphabétisation.

- dans le domaine de la santé :

Quatre (04) dispensaires (Kéniéroba, Djiguidala, Ouoronina et Niamé)

Cinq (05) maternités

Huit (08) dépôts pharmaceutiques

Un CSCOM: celui de Bancoumana

Une pharmacie (officine privée)

#### **4.2.4. Activités socio-économiques et culturelles**

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

L'agriculture constitue la principale activité économique des populations. La plaine de Bancoumana est propice aux cultures vivrières et industrielles. Aux abords du village, dans les retenues d'eau (deux digues), la culture du riz (*Oryza sativa L.*, *O. glaberrima S.*) est très

développée. Celle du sorgho (*Sorghum vulgare* J.), du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf. & Hubb), du maïs (*Zea mays* L.), du haricot (*Vigna unguiculata* L.), du papaye (*Carica papaya* L.), de l'orange (*Citrus sinensis* L.) et du citron (*Citrus limonum* RISSO.) a lieu surtout dans les alentours des concessions ou dans des jardins.

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

L'élevage des ovins, des caprins et des bovins y est pratiqué comme une activité économique secondaire. On y retrouve aussi quelques équidés (ânes et chevaux) utilisés comme animaux de trait. La plupart des villageois thésaurisent leurs revenus dans l'élevage et dans les cultures industrielles.

La pêche est également pratiquée par les ethnies Bozo et Somono principalement dans les villages de Fourda et de Bozokin.

L'artisanat local est peu développé (cordonnerie, forgerie, maçonnerie, poterie).

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

L'islam représente la religion la plus dominante avec 95% de sujets qui s'en déclarent. Cependant, les religions traditionnelles sont assez présentes dans certaines grandes familles et sont visibles dans les pratiques quotidiennes de la vie socio- culturelle.

### **4.3. Type et période d'étude**

Nous avons mené une étude longitudinale sur quatre années de transmission. L'étude s'est déroulée au cours des saisons de transmission du paludisme (mai à décembre) entre 2008 et 2011.

#### 4.4. Echantillonnage

L'échantillonnage était exhaustif. Nous avons inclus tous les enfants qui se sont présentés avec des signes du paludisme et vivants dans l'un de nos trois villages d'étude.

#### 4.5. Critères d'inclusion et de non-inclusion

##### 4.5.1. Critères d'inclusion

Les enfants répondants aux critères ci-dessous ont été inclus dans notre étude.

- ❖ résider dans l'un des trois villages : Kéniéroba, Fourda ou Bozokin ;
- ❖ accepter de participer à l'étude comme attesté par le consentement volontaire, libre et éclairé obtenu des parents ou des tuteurs de l'enfant ;
- ❖ être âgé de 6 mois à 17ans
- ❖ être vu en consultation par notre équipe médicale au centre de santé de Kéniéroba

##### 4.5.2. Critères de non-inclusion

Les enfants ne répondants pas aux critères d'inclusion ci-dessus n'ont pas été inclus dans notre étude. En outre, tout enfant présentant une condition pouvant le rendre incapable de suivre le protocole (par exemple : maladie psychiatrique, hémophilie etc.) n'a pas été inclus dans l'étude.

#### 4.6. Variables mesurées

Pour mieux répondre à nos questions de recherche, nous avons mesuré les variables sociodémographiques et des variables biologiques.

- **Variables sociodémographiques** : âge, sexe, ethnie et résidence.
- **Variables biologiques** : taux d'hémoglobine, type d'hémoglobine, groupe sanguin ABO, génotype de G6PD, alpha-thalassémie et frottis sanguins épais et minces.

#### 4.7. Description des techniques de laboratoire réalisés

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

**Goutte épaisse et frottis mince** : la goutte épaisse et le frottis mince confectionnées sur le terrain ont été colorés au Giemsa et lus sur place.

**Taux d'hémoglobine** : le taux d'hémoglobine a été mesuré en utilisant l'appareil HemoCue® Hb201 et des microcuvettes pour hémoglobine.

**Groupe sanguin ABO** : il a été déterminé par le test d'agglutination en utilisant des kits commerciaux à base d'anticorps monoclonaux (Linear Chemicals) [27].

**Type d'hémoglobine** : la détermination du type d'hémoglobine en utilisant l'appareil D-10 de Bio-Rad dont le principe est basé sur la chromatographie liquide de haute performance (cf. annexe)[28], a été effectuée sur des gouttes de sang recueillies dans les cryotubes ;

**Génotypage du déficit en G6PD** : Il a été identifié en utilisant l'analyse du polymorphisme de restriction basé sur la longueur des fragments sur les produits d'ADN amplifiés par la PCR [6]. Sa détection a été effectuée à partir de sang recueillis sur les confettis ;

**Alpha-Thalassémie** : la détection de la suppression de 3,7kb d'alpha-thalassémie a été faite en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne nichée (*Nested-PCR*) afin d'identifier les enfants alpha+thalassémie hétérozygotes ( $-\alpha/\alpha$ ) et  $\alpha^+$ -thalassémie homozygotes ( $-\alpha/-\alpha$  ; Cf annexe ; [29]). Elle a été effectuée sur les confettis.

#### 4.8. 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 [14].

**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 Newton et Krishna[13].

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

**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.

**Hypoglycémie** est définie comme étant la diminution de la quantité de glucose dans le sang, en dessous de sa valeur normal de 0,80g /L. Cliniquement, l'hypoglycémie se caractérise par la sensation de faim, tremblements, pâleur, sudation profuse, céphalées, diplopie, troubles

psychiques et convulsions, qui peuvent entraîner un coma et la mort si le traitement n'est pas rapide.

**Détresse respiratoire** est définie par l'incapacité des poumons à fonctionner correctement.

#### **4.9. 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 mai 2008, nous avons procédé à l'inclusion des sujets dans l'étude. Chaque année, un recensement générale des enfants des trois villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin était réalisé afin d'inclure dans l'étude les nouveau-nés et d'en exclure les sujets ayant dépassé les 17 ans.

Un consentement individuel éclairé et volontaire était obtenu auprès du parent/tuteur pour chaque participant de l'étude, et une copie du consentement était remise au parent/tuteur. A l'inclusion, un prélèvement de sang périphérique était obtenu de l'enfant par ponction au niveau de la pulpe digitale de l'index ou du majeur. Ce prélèvement de sang nous a permis de dépister les différents polymorphismes de GR comme le groupe sanguin, le type d'hémoglobine, le déficit en G6PD et l' $\alpha$ -thalassémie.

Les parents et tuteurs des enfants étaient activement encouragés à amener tous les enfants présentant des signes de paludisme au centre de santé de Kéniéroba où une équipe médicale assurait la permanence pendant les saisons de transmission du paludisme. Pour chaque enfant reçu en consultation, un interrogatoire suivi d'un examen physique 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 réalisé pour quelques analyses médicales (GE, frottis mince et taux d'Hb).

Pour chaque cas confirmé de paludisme, une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (Artésunate + amodiaquine) était administrée à l'enfant. En cas de complications nécessitant des actions thérapeutiques particulières, les patients étaient référés à Bamako pour une meilleure prise en charge.

#### **4.10. Collecte, gestion et analyse des données**

Les informations ont été collectées sur les formulaires de report de cas (*CRF*). Un contrôle de qualité était effectué chaque jour pour corriger les incohérences avant la validation. Les données ont été saisies sur Microsoft Excel 2007 et analysées avec les logiciels Epi-info7 et SPSS. Les résultats ont été présentés sous forme de tableaux et de figures. Le test de Khi2 de Pearson a été utilisé pour comparer les différents groupes. Le seuil de signification statistique a été fixé à 5%.

#### **4.11. Considérations éthiques**

Le protocole de recherche a été soumis à l'approbation du comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'université de Bamako ainsi qu'aux Instituts Nationaux de Santé des Etats-Unis d'Amérique (cf. annexe). 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).

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

## 5. Résultats

### 5.1. Résultats globaux

Au cours des 4 années d'étude, nous avons recensé 3953 épisodes palustres chez 2010 enfants de sexe masculin et 1943 de sexe féminin. Soixante-trois pourcent (63%) des enfants avaient moins de 5 ans. La majorité des enfants était du groupe sanguin O (37,8%) et la prévalence du trait drépanocytaire et de l'HbAC était de 10% et 7,7%, respectivement.

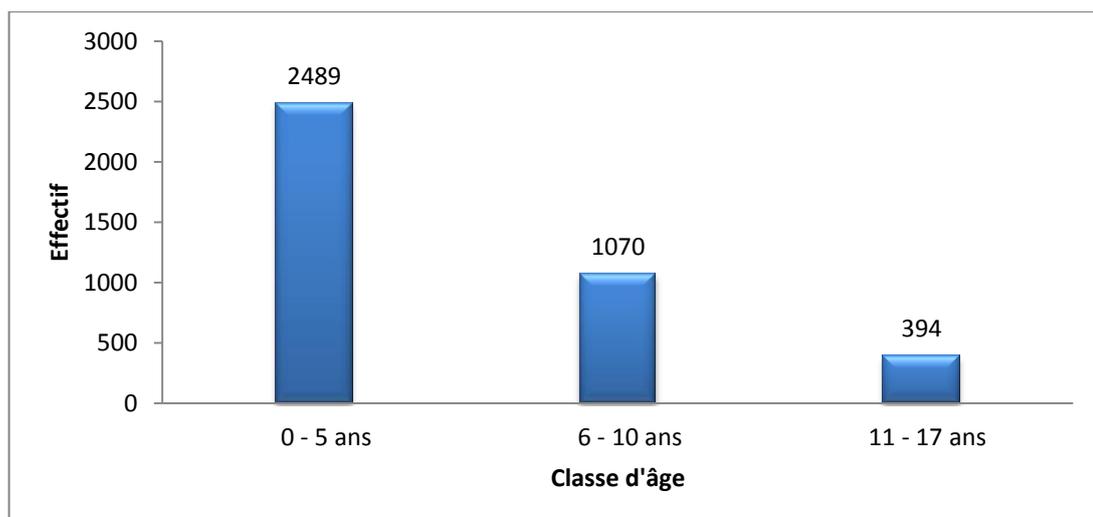
### 5.2. Résultats descriptifs

#### 5.2.1. Caractéristiques sociodémographiques

**Table IV** : Répartition des participants en fonction du sexe et de la résidence

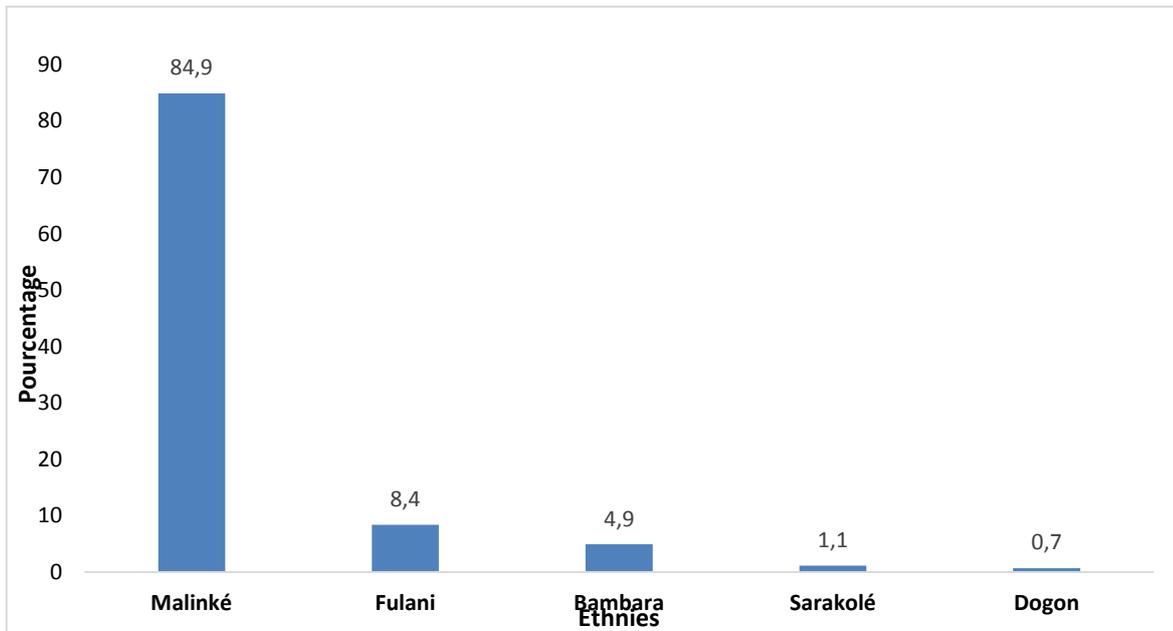
Résidence/Sexe	Féminin (%)	Masculin	Total (%)
Kéniéroba	1519 (49,6)	1541	3060 (77,5)
Bozokin	205 (46,2)	239	444 (11,2)
Fourda	219 (48,8)	230	449 (11,3)
<b>Total</b>	<b>1943 (49,2)</b>	<b>2010</b>	<b>3953 (100)</b>

La majorité de nos participants résidait à Kéniéroba (77,5%). Le sexe ratio était de 1,03 (2010/1943) en faveur du sexe masculin. Ce rapport ne variait pas significativement en fonction des villages ( $\text{Chi}^2=1,9$   $p=0,38$ )



**Figure 4.** Répartition des sujets en fonction des classes d'âge

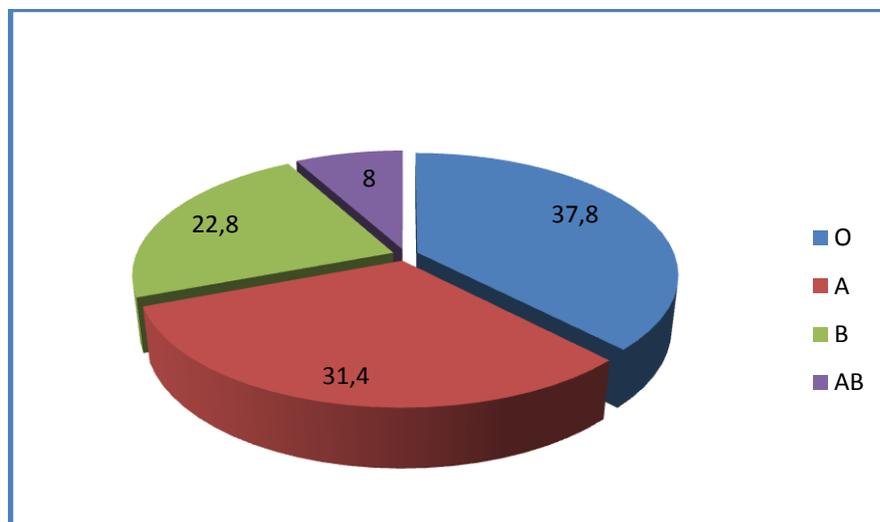
Les enfants de 0 à 5 ans constituaient la majorité des participants à l'étude (63%), suivis respectivement des classes d'âge 6 à 10ans (27%) et les 11 à 17 ans (10%).



**Figure 5.** Répartition des participants en fonction de l'ethnie

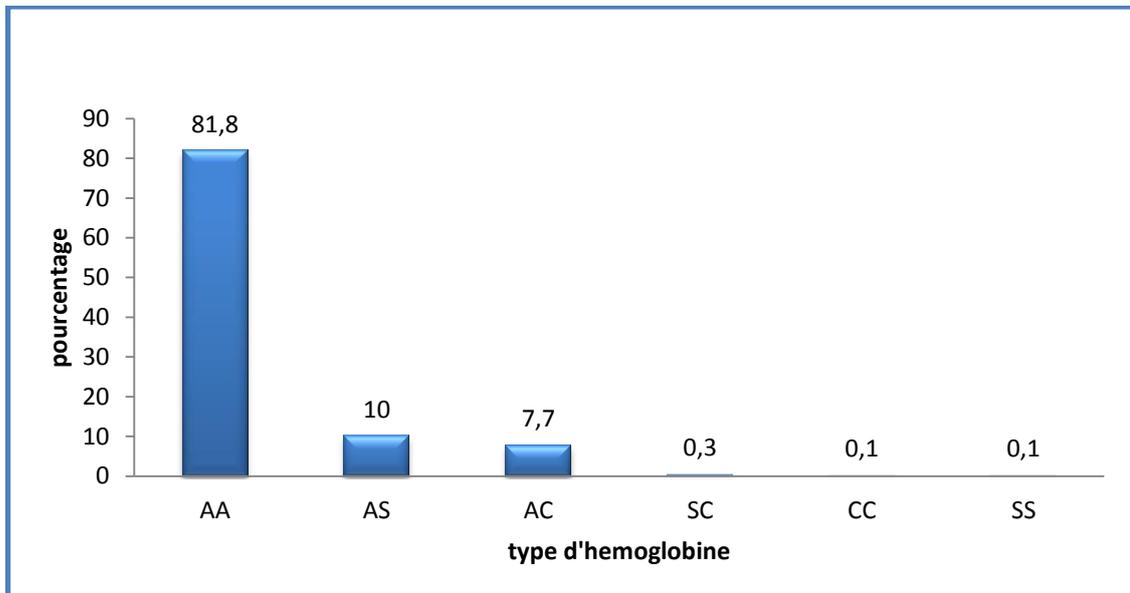
L'ethnie Malinké était majoritaire dans notre étude (84,9%) suivi par les Fulani (8,4).

### 5.2.2. Répartition des polymorphismes érythrocytaires chez les participants



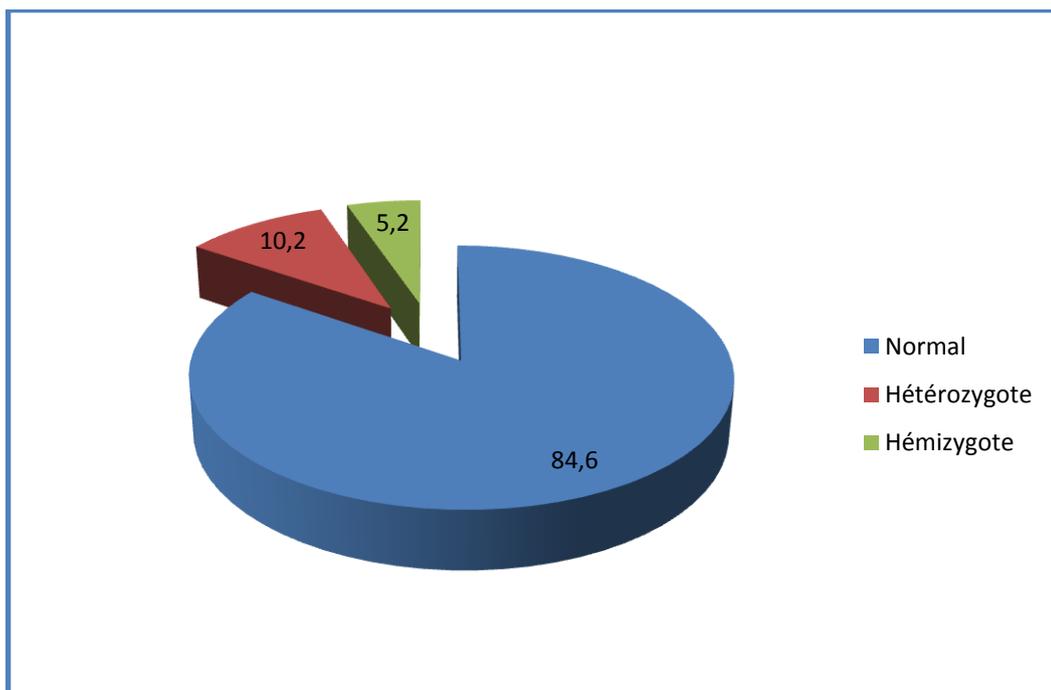
**Figure 6.** Répartition des participants en fonction du groupe sanguin

Le groupe sanguin O était majoritaire parmi nos enfants (37,8%), suivi du groupe A (31,4%), alors que le groupe sanguin AB était moins représenté (8,0%).



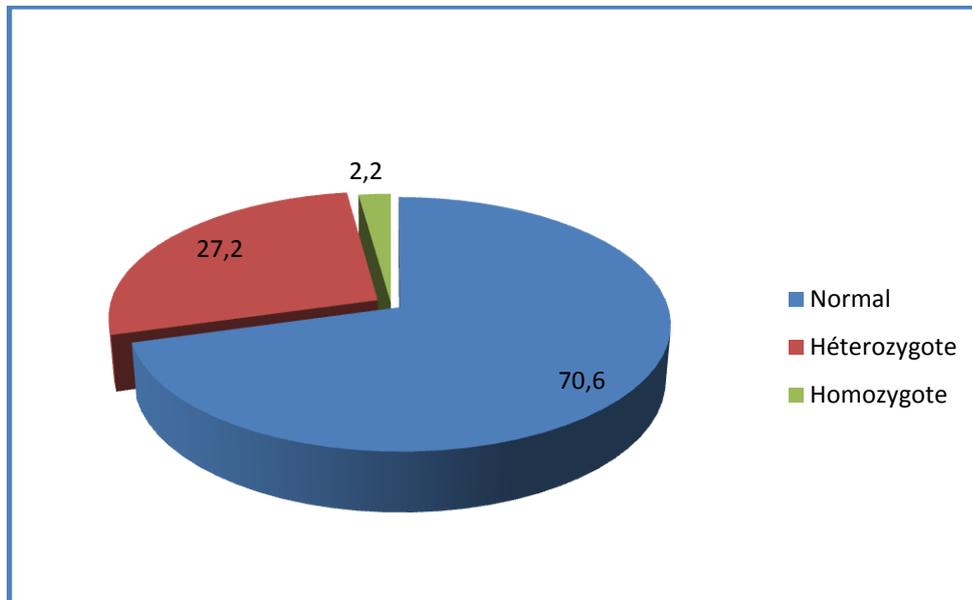
**Figure 7.** Répartition des participants en fonction du type d'hémoglobinique

La prévalence globale des hémoglobines anormales dans notre population d'étude était de 18,2%. Le trait drépanocytaire (HbAS, 10%) et l'HbAC (7,7%) étaient les plus représentés.



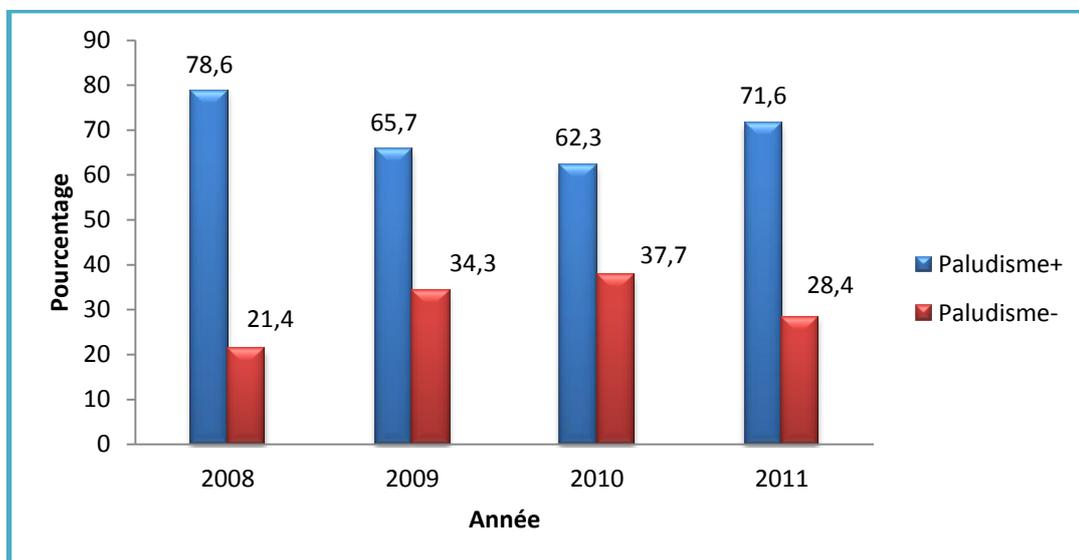
**Figure 8.** Répartition des participants en fonction de leur statut en G6PD

Le déficit en G6PD a été retrouvé chez 15,4% des enfants avec 5,2% chez les garçons hémizygotés et 10,2% chez les filles hétérozygotes.

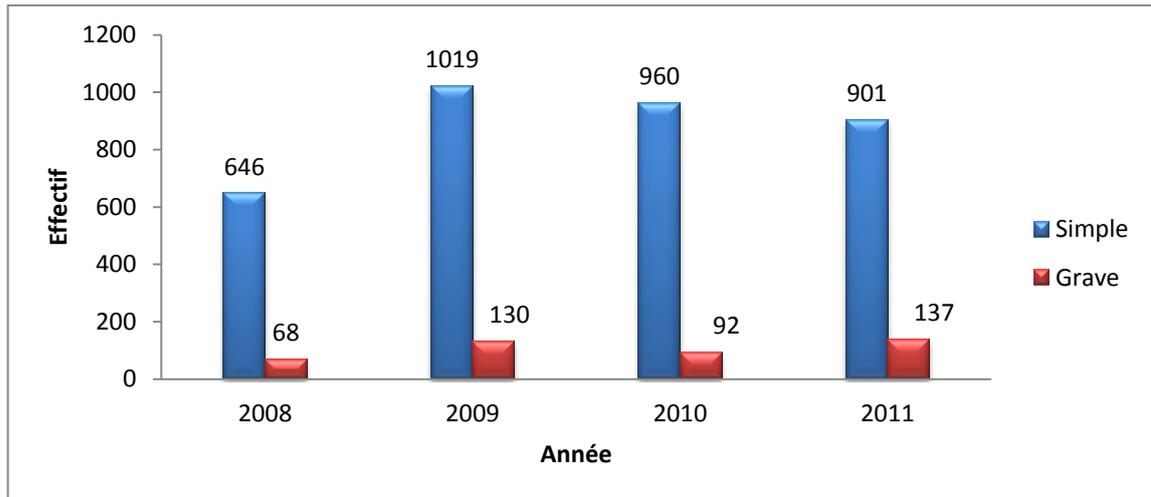


**Figure 9.** Répartition des participants en fonction du portage de l'alpha-thalassémie. L'α-thalassémie (la délétion 3.7) a été détectée chez 29,4% des participants avec 27,2% à l'état hétérozygote et 2,2% à l'état homozygote.

### 5.2.3. Proportion des phénotypes cliniques parmi nos participants



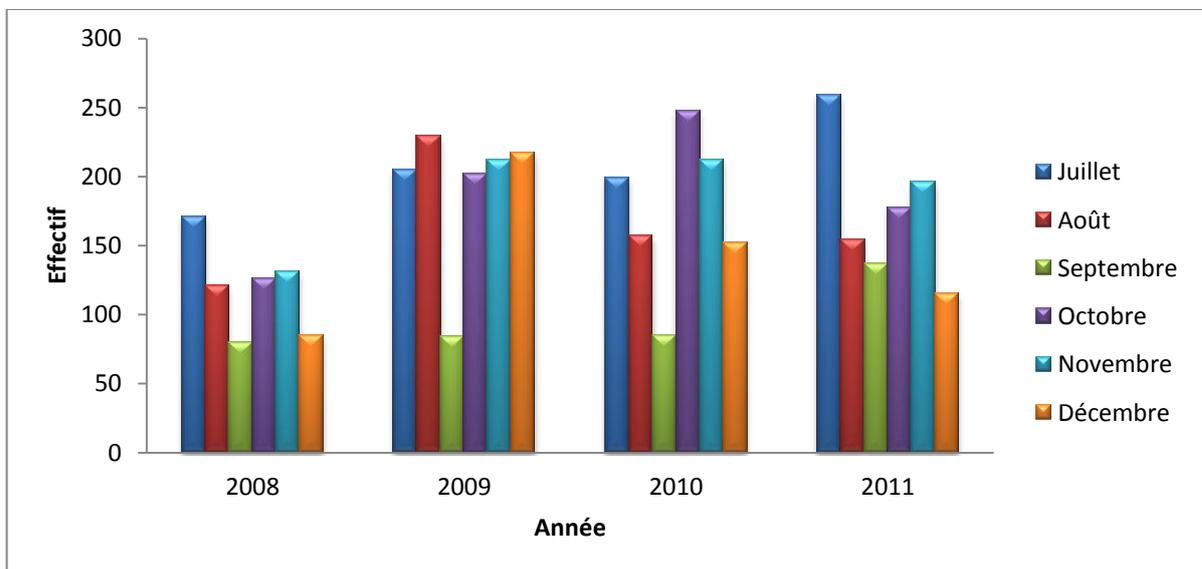
**Figure 10.** Prévalence annuelle du paludisme au cours des quatre années d'étude. La prévalence globale du paludisme a diminué entre 2008 (78,6%) et 2011 (71,6%) dans l'étude ( $p = 0,0007$ ). Les fortes diminutions ont été observées en 2009 (65,7%) et en 2010 (62,3 ;  $p=0,003$ ).



**Figure 11.** Répartition des participants en fonction des formes cliniques du paludisme

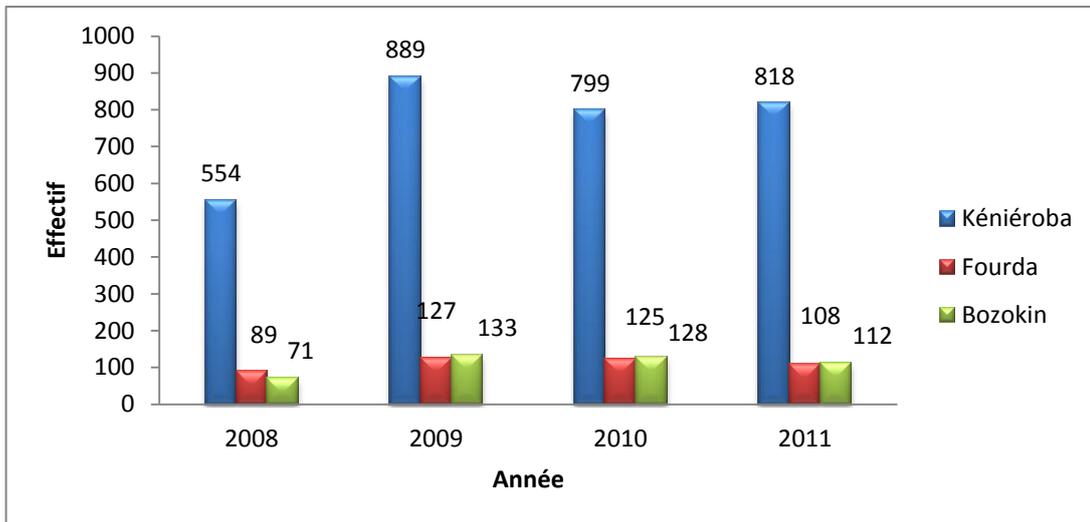
Dans l'ensemble nous avons observé peu de cas de paludisme grave au cours des quatre années d'étude. Cependant ce nombre était proportionnel au nombre total de cas de paludisme recensé au cours de la saison de transmission.

### 5.3. Résultats analytiques

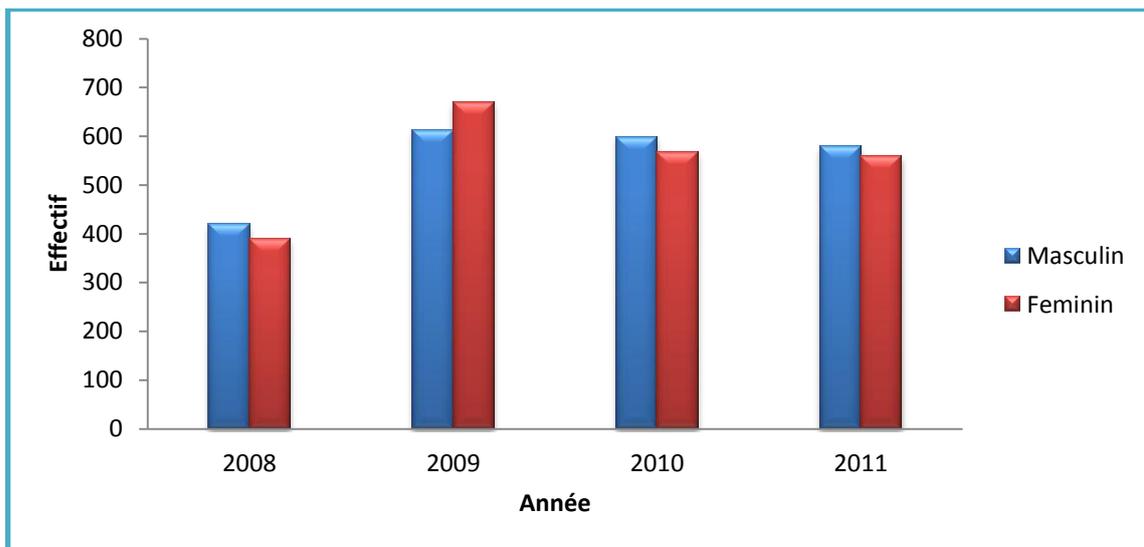


**Figure 12.** Distribution temporelle mensuelle des cas du paludisme au cours de la saison de transmission palustre (juin à janvier).

Nous avons constaté que la distribution des cas de paludisme au cours des saisons de transmission était bipolaire avec un premier pic en juillet –août et un second pic en octobre – novembre.

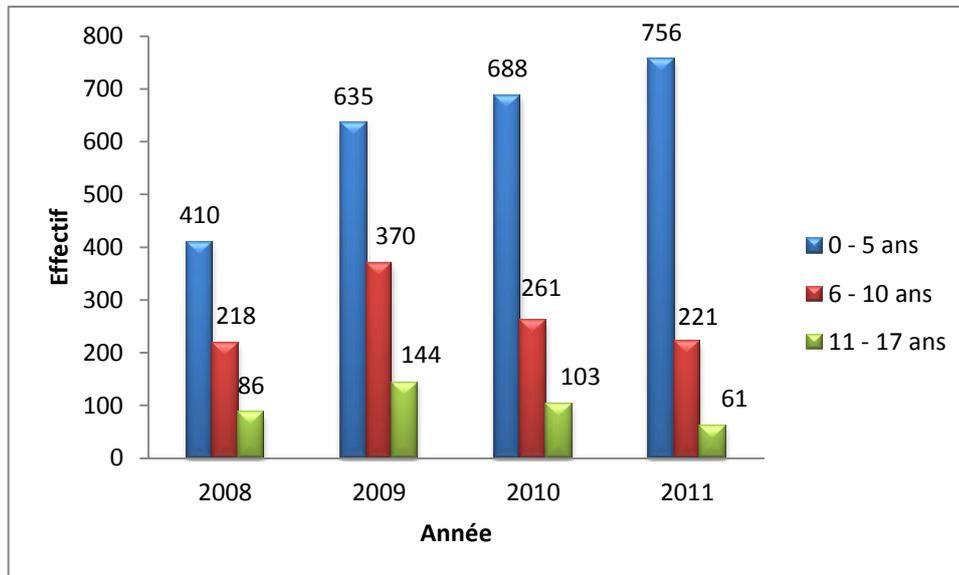


**Figure 13.** Répartition des cas de paludisme en fonction de la résidence et de l'année  
 La majorité des cas de paludisme a été observé à Kéniéroba (~77%) alors que les deux hameaux de culture avaient des proportions similaires (~10%).



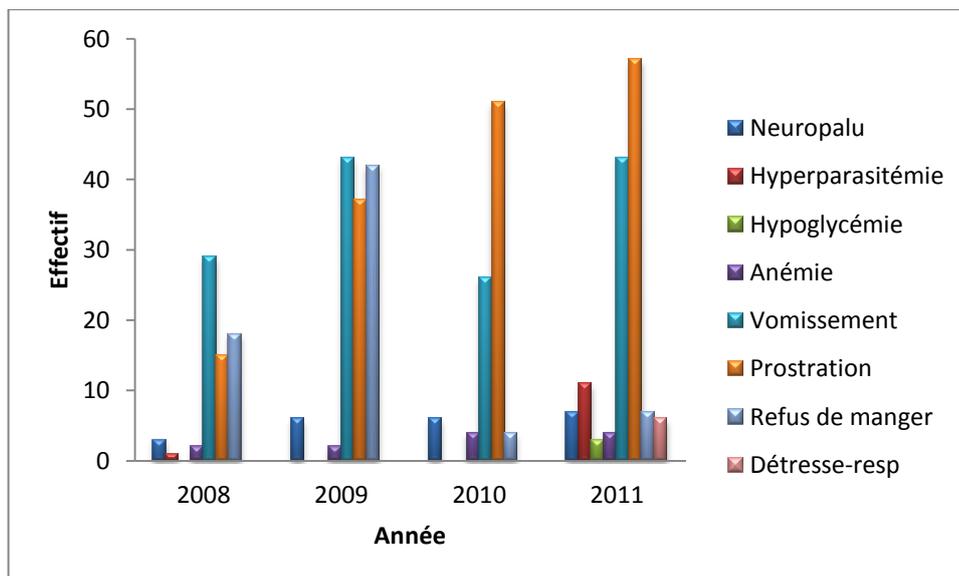
**Figure 14.** Répartition des cas du paludisme en fonction du sexe.

Il n'y avait pas de différence significative de nombre de cas entre le sexe quel que soit l'année (Chi<sup>2</sup>=4,75 p=0,19)



**Figure 15.** Répartition des cas de paludisme en fonction des classes d'âge

Au cours des 4 années d'étude, nous avons observé d'une part que plus de la moitié des cas de paludisme était observée chez les enfants de moins 5 ans; et d'autre part, cette prévalence diminuait selon l'âge ( $p < 10^{-6}$ ). Par contre, la prévalence restait stable dans les différents groupes d'âge entre 2008 et 2011 ( $p = 0,8$ ).



**Figure 16.** Proportion des différentes formes clinique du paludisme grave au cours de l'étude

Au cours des deux premières années de l'étude, les vomissements répétés (42,3% en 2008 et 33,3% en 2009) suivi du refus de manger (25,9% en 2008 et 32,1% en 2009) étaient les formes cliniques graves les plus couramment rencontrées. Par contre, au cours des deux dernières années de l'étude, la prostration prédominait avec 55,2% (2010) et 41,6% (2011). Les autres formes du paludisme grave ont été rarement observées pendant l'étude.

**Table V** : Taux moyen d'hémoglobine chez les patients en fonction des années

Année	Taux moyen d'hémoglobine
2008	10,42±1,71
2009	10,57±2,31
2010*	10,65±1,79
33332011	10,65±2,03
* année de comparaison	$p=0,08$

Nous n'avons pas observé de variation significative du taux moyen d'hémoglobine en fonction d'une année à l'autre ( $p=0,08$ ).

**Table VI** : Parasitémie moyenne en fonction des années

Année	Parasitémie moyen
2008	24504,3±37510,4
2009	26692,5±33447,6
2010*	19104,8±20658,4
2011	24046,6±28524,1
*Année de comparaison	$p < 10^{-5}$

Une réduction statistiquement significative de la parasitémie moyenne a été observée en 2011 comparativement aux autres années ( $p = 0,002$ ).

**Table VII : Taux moyen d'hémoglobine selon l'année et le type d'hémoglobine**

Type d'hémoglobine	2008	2009	2010	2011	Valeur du p
Normale*	10,43±1,73	10,58±2,03	10,64±1,81	10,74±2,00	<b>0,15</b>
AS	10,40±1,64	10,69±2,15	10,82±1,51	10,74±2,05	<b>0,75</b>
AC	10,38±1,64	10,34±2,47	10,52±2,07	10,29±2,16	<b>0,46</b>
<i>p</i>	0,99	0,58	0,45	0,16	

Nous n'avons pas aussi observé de variation statistiquement significative du taux moyen d'hémoglobine selon l'année ou le type d'hémoglobine au cours de notre étude.

**Table VIII : Parasitémie moyenne selon le type d'hémoglobine et l'année**

Type d'Hb	2008	2009	2010*	2011	<i>p</i>
AA*	26097,5±39374,8	27004,9±33488,4	19504,0±20699,1	25181,3±29210,0	$10^{-5}$
AS	17977,7±27351,6	25219,8±36168,7	15618,2±18719,3	18531,9±21745,9	0,04
AC	18374,3±27970,2	25891,7±30207,8	21018,1±23213,2	19713,5±19034,5	0,23
<i>p</i>	0,05	0,03	0,003	0,006	

La parasitémie moyenne était toujours élevée chez les porteurs d'hémoglobine normale (HbAA) comparés aux porteurs d'hémoglobine anormale (HbAS ou HbAC) au cours de l'étude. Comparés aux porteurs d'HbAC, les porteurs du trait drépanocytaire (HbAS) avaient une parasitémie moyenne faible au cours de notre étude ( $p < 0,05$ ).

**Table IX : Taux moyen d'hémoglobine selon l'année et le groupe sanguin ABO**

Groupe sanguin	2008	2009	2010*	2011	<i>p</i>
A*	10,23±1,75	10,37±2,46	10,78±1,75	10,64±2,03	0,02
AB	10,73±1,68	10,76±1,91	10,96±2,01	10,92±2,14	0,8
B	10,66±1,67	10,81±2,04	10,65±1,82	10,67±2,07	0,7
O	10,38±1,69	10,56±2,39	10,48±1,77	10,56±1,98	0,6
<i>P</i>	0,038	0,08	0,03	0,4	

Il n'existait aucune différence statistiquement significative du taux moyen d'hémoglobine entre les années ou le groupe sanguin ABO ( $p > 0,05$ )

**Table X** : Parasitémie moyenne selon l'année et le groupe sanguin ABO

Groupe sanguin	2008*	2009	2010*	2011	<i>p</i>
<b>A*</b>	24221,8±36507,5	24910,9±30169,9	17985,1±19920,8	23027,2±26951,3	<b>0,004</b>
<b>AB</b>	25577,5±32291,5	26098,7±32160,6	20334,3±21186,3	27819,8±30308,8	<b>0,3</b>
<b>B</b>	27272,7±44483,0	29351,1±41942,6	222,7±23097,4	25590,0±30461,8	<b>0,031</b>
<b>O</b>	22833,8±34332,9	26614,4±30130,4	165,5±69,5	22931,7±28077,8	<b>0,001</b>
<b><i>p</i></b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	

Les parasitémies moyennes sont restées globalement similaires chez les enfants des différents groupes sanguins sur la période d'étude ( $p > 0,05$ ), cependant une variation significative a été observée au sein des différents groupes sanguins sauf le groupe AB.

**Table XI** : Taux moyen d'hémoglobine en fonction de l'alpha-thalassémie et de l'année d'étude

Statut $\alpha$ -thalassémie	2008*	2009	2010*	2011	<i>p</i>
<b>Normal*</b>	10,47±1,71	10,63±2,39	10,74±1,84	10,73±2,11	<b>0,09</b>
<b>Hétérozygote</b>	10,34±1,76	10,40±2,17	10,51±1,71	10,54±1,81	<b>0,6</b>
<b>Homozygote</b>	10,24±1,49	10,58±1,65	9,86±1,42	10,03±1,68	<b>0,39</b>
<b><i>p</i></b>	<b>0,44</b>	<b>0,17</b>	<b>0,007</b>	<b>0,32</b>	

Une diminution significative a été seulement observée en 2010 chez les sujets  $\alpha$ -thalassémiques comparés aux sujets normaux seulement au cours de cette étude ( $p=0,007$ ).

**Table XII** : Parasitémie moyenne selon l'alpha-thalassémie et l'année

Statut $\alpha$ -thal	2008	2009	2010*	2011	p
<b>Normal*</b>	4301,9 $\pm$ 38494,5	26607,5 $\pm$ 33602,6	18345,0 $\pm$ 20257,2	23721,3 $\pm$ 27587,3	10 <sup>-5</sup>
<b>Hétérozygote</b>	25148,0 $\pm$ 36271,8	27286,7 $\pm$ 33605,4	20769,8 $\pm$ 21280,7	3337,4 $\pm$ 26000,1	0,040
<b>Homozygote</b>	18644,2 $\pm$ 31215,6	27408,0 $\pm$ 33824,2	17968,5 $\pm$ 21733,0	36850,0 $\pm$ 58152,2	0,28
<b>p</b>	0,76	0,94	0,2	0,12	

Nous n'avons pas observé de variations statistiquement significatives en fonction du statut thalassémique au de l'étude. Cependant, une variation significative a été observée au sein des différents types en selon les années sauf en le type homozygote.

**Table XIII** : Taux moyen d'hémoglobine selon l'année et le déficit en G6PD

Type G6PD	2008	2009	2010*	2011	p
<b>Normal*</b>	10,47 $\pm$ 1,68	10,61 $\pm$ 2,34	10,67 $\pm$ 1,84	10,64 $\pm$ 2,10	0,19
<b>Hétérozygote</b>	10,19 $\pm$ 1,91	10,12 $\pm$ 1,93	10,64 $\pm$ 1,40	10,41 $\pm$ 2,02	0,2
<b>Hémizygote</b>	10,21 $\pm$ 1,72	10,55 $\pm$ 2,20	10,43 $\pm$ 1,80	10,67 $\pm$ 2,05	0,7
<b>p</b>	0,23	0,2	0,6	0,5	

Nous n'avons pas observé de différence significative du taux moyen d'hémoglobine en fonction du statut en G6PD et en fonction des années d'étude aussi (p>0,05).

**Table XIV** : Parasitémie moyenne selon le déficit en G6PD et l'année d'étude

Statut G6PD	2008	2009	2010*	2011	p
<b>Normal*</b>	24107,3±3754,8	26415,4±33484,3	19291,1±21376,8	24061,3±28036,6	10 <sup>-5</sup>
<b>Hétérozygote</b>	26480,9±40146,9	28333,6±35509,6	17708,9±16382,67	25053,3±28025,2	0,043
<b>Hémizygote</b>	27602,3±33588,9	27603,5±29539,2	19244,3±17348,2	19221,1±25785,8	0,1
<b>p</b>	0,7	0,8	0,7	0,3	

Nous n'avons pas observé une variation statistique significative de la parasitémie moyenne selon le déficit en G6PD mais une variation significative a été observée chez les types normal et hétérozygote ( $p > 0,05$ ).

## 6. Commentaires et discussion

Le paludisme constitue une des priorités de la politique nationale de santé du Mali avec une prévalence nationale du paludisme qui est de 52% [30]. Il est la première cause de morbidité et de mortalité chez les enfants de 0-5 ans et constitue la première cause de consultation dans les centres de santé (44%). C'est la première cause d'absentéisme à l'école et au travail d'où l'importance de ses répercussions socio-économiques. Bien que toute la population malienne soit exposée au paludisme, la maladie est particulièrement endémique dans les régions du centre et du sud, et épidémique dans les régions du nord. Notre étude avait pour but d'étudier l'évolution et l'effet des variants génétiques du globule rouge (HbAS, HAC,  $\alpha$ -thalassémie, déficit en G6PD et le groupe sanguin ABO) sur les indicateurs palustres chez les enfants de Kéniéroba, Bozokin et Fourda au cours des saisons de transmission palustre des années 2008, 2009, 2010 et 2011.

L'étude s'est déroulée au centre de santé de Kéniéroba situé à seulement 20km de Bancoumana où le MRTC a une grande expérience de recherche clinique et vaccinale. Le paludisme se caractérise par une intense transmission saisonnière de juin à décembre. La population est relativement homogène avec plus de 80% de Malinké. Ceci fait de la zone de Kéniéroba un site idéal pour mener une étude immunogénétique sur le paludisme car les effets confondant liés à l'ethnicité sont limités. Au total, 3953 cas de paludisme ont été enregistrés chez les enfants de 6 mois à 17 ans. Ce groupe d'âge permet une meilleure compréhension des patterns du paludisme. L'âge est un marqueur surrogatoire de l'immunité antipalustre. Les enfants de moins de 6 mois ont été exclus de l'étude pour deux raisons principales :

- notre étude visait à évaluer l'effet de certains polymorphismes génétiques de l'hôte notamment ceux liés au globule rouge sur les indicateurs palustres et de suivre leur évolution au cours de quatre années successives de transmission palustre. Ces enfants de moins de 6 mois bénéficient d'une protection antipalustre conférée par la présence des anticorps maternels de type IgG et de l'hémoglobine fœtale (HbF) [31, 32] ;
- La technique de dépistage des types d'hémoglobine que nous avons utilisé n'est pas fiable chez les enfants de moins de 6 mois chez qui le profile réel d'hémoglobine peut-être masqué par la présence d'HbF.

La majorité de nos enfants étaient âgés de moins de 5 ans (63% ; figure 4) et vivaient dans le village de Kéniéroba (77,5% ; tableau IV). Cela s'explique par le fait que les enfants de moins

de 5 ans en zone d'endémie palustre constituent un groupe cible de la maladie. La distribution temporelle des cas de paludisme au cours de la saison de transmission a montré deux pics vers la fin de la saison de transmission. C'est deux pics était maintenus au cours de chacune des quatre saisons de transmission qu'à durée l'étude (figure 12). Cependant, nous avons enregistré le plus grand nombre de cas de paludisme en 2009. La seule explication semble être la très bonne pluviométrie enregistrée dans la localité en 2009 par rapport aux autres années. Au total, parmi seuls 468 cas de paludisme grave ont été recensés au cours de cette étude, et les critères de gravité les plus fréquemment observés étaient la prostration (55,2%), les vomissements répétés (42,3%), et le refus de manger (25,9% ; figure 16), l'anémie grave et les neuropaludisme étant très peu observé. Ce constat pourrait s'expliquer par le fait que nous avons travaillé dans une zone hyper-endémique où l'immunité anti palustre s'installe très tôt chez les enfants mais un coût de mortalité élevé. Cette immunité incomplète ou prémunition protège contre les formes sévères létales du paludisme. En dehors de l'anémie qui est multifactorielle, les autres formes cliniques du paludisme grave (neuropaludisme et détresse respiratoire) sont généralement observées en milieu hospitalier [33-35].

Nous n'avons pas observé une variation du taux moyen d'hémoglobine (tableaux VI et VIII). Par contre, il existait une variation statistiquement significative de la densité parasitaire moyenne entre les années (tableau VII). De tous les polymorphismes érythrocytaires mesurés, seul l'HbAS et le déficit en G6PD hétérozygote réduisaient significativement le risque de paludisme. Le rôle de protection du trait drépanocytaire (HbAS) contre le paludisme a été décrit depuis longtemps chez diverses populations et dans diverses régions géographiques [18]. De nombreuses études réalisées sur le paludisme recherchent systématiquement cette association qui est en phase d'être considérée comme un élément de contrôle de qualité dans les études génomique sur le paludisme. Quant au déficit en G6PD, les données reportées par divers auteurs restent conflictuelles. Certains auteurs ont trouvé une protection associée à l'état hémizygotique du déficit chez les mâles [6], alors que d'autres ont rapporté une protection associée à l'état hétérozygote chez les femmes [36]. Des études épidémiologiques bien structurées, couplées aux études d'exploration du mécanisme sont nécessaires pour élucider le rôle du déficit en G6PD dans la protection innée contre le paludisme.

Alors que l' $\alpha$ -thalassémie a été associée à une réduction du risque de paludisme grave notamment celui de l'anémie palustre sévère [37], nous n'avons pas retrouvé cette association au cours de notre étude. Cependant, l'état homozygote de l' $\alpha$ -thalassémie était associé à une

réduction significative du taux d'hémoglobine au cours des épisodes de paludisme (tableau XII).

La majorité des participants était du groupe sanguin O (37,8%) des suivis du groupe A (31,4%), B (22,8%), et AB (8,0% ; figure 6). Cette proportion de sujet de groupe sanguin O est légèrement inférieure à celle obtenue chez les donneurs de sang à Bamako en 2004 sur 136 donneurs [38] et dans d'autres régions d'Afrique de l'ouest [38, 39]. La forte proportion du groupe sanguin O dans ces populations d'Afrique sub-sahariennes s'expliquerait par la sélection positive de ce groupe sanguin en raison de la résistance qu'elle procurerait contre le paludisme grave [7, 27]. Cependant, au cours de notre étude, nous n'avons pas observé de réduction de risque de paludisme grave associé au groupe sanguin O (tableau X).

La prévalence cumulée des hémoglobines anormales (HbAS et HbC) dans notre étude était de 18,2% avec 10,02% d'HbAS et 7,69% d'HbC. Ces prévalences sont similaires à celles rapportées par Doumbia en 2010 dans la même localité [40]. Ces deux types d'anomalie hémoglobinique ont été associés à une réduction significative du risque de développement de certaines manifestations graves du paludisme dans diverses zones géographiques [40]. Cependant, cette protection semble influencée par des cofacteurs génétiques et géographiques. Les prévalences de ces deux types Hb varient énormément en fonction des zones géographiques et des groupes ethniques. Une fréquence élevée d'HbC a été décrite chez les Dogon de Bandiagara (15,8%) alors que la fréquence de l' HbAS était de 3,05% [41]. Dans cette population, l'HbC est associé à une réduction significative du risque de neuropaludisme [41]. Le même constat a été fait au Burkina Faso [42] et au Ghana [43] .

Nous avons aussi dépisté la mutation 202 G→A au niveau du gène de la G6PD chez tous nos participants. Cette mutation est la principale anomalie moléculaire responsable du déficit en G6PD en Afrique subsaharienne. Le gène de la G6PD étant situé sur le chromosome X, nous avons donc identifié quatre groupes de sujets en fonction de l'état de présence de la mutation. Les sujets « normaux », (homozygote normaux A<sup>+</sup>), les sujet déficitaires hétérozygotes féminins (A<sup>+/-</sup>), les sujets déficitaires hémizygotés mâles (A<sup>-</sup>) et les sujets déficitaires homozygotes féminins (A<sup>-</sup>). Les sujet déficitaires mâles hémizygotés et les sujets féminins déficitaires homozygotes ayant des phénotypes similaires d'expression du déficit en G6PD ont été regroupés dans le même groupe (A<sup>-</sup>). La fréquence du déficit en G6PD était de 15,4%, avec respectivement 10,2% d'hétérozygotes et 5,2% d'homo-/hémizygotés (figure 8). Nos résultats sont similaires à ceux de Souleymane dans la même zone en 2012 avec 9,2% pour les hétérozygotes et 4% pour les homo/hémizygotés [44].

Il ressort de notre étude que la fréquence globale d'alpha-thalassémie était de 29,4% dont 27,2% d'hétérozygotes et 2,2% d'homozygotes (figure 9). Nos résultats sont similaires à ceux de Souleymane en 2012 [33] dans la même zone mais supérieures à ceux de Labie en 2006 chez les immigrants West-Africains en France [45] et de Tenia en 2006 en Guinée Bissau [46].

## **7. Limites de notre étude**

Notre étude s'est intéressée particulièrement à suivre l'évolution de certains indicateurs palustres et à l'impact de certains polymorphismes érythrocytaire sur ces indicateurs chez les enfants de 0 à 17 ans. Nous n'avons pas étudié les mécanismes pouvant expliquer la protection conférées par ces polymorphismes érythrocytaires contre l'accès palustre. Nous n'avons pas aussi étudié d'autres facteurs génétiques potentiellement impliqués dans la protection contre l'accès palustre en dehors des gènes classiques de résistance connus.

## **8. Conclusion et recommandations**

### **8.1. Conclusion**

Au terme de ce travail, les indicateurs de paludisme n'ont démontrés de changements significatifs au cours de nos quatre années d'étude. Seules les prévalences du paludisme et la densité parasitaire moyenne étaient significativement plus élevées en 2009 comparées aux autres années. La prévalence du paludisme dans la population d'étude était significativement réduite dans les groupes des patients HbAS et des patients déficitaires hétérozygotes en G6PD. Seul l'HbAS était associée à une réduction de la densité parasitaire moyenne. Les autres polymorphismes du GR étudiés n'ont pas influencé les indicateurs palustres.

### **8.2. Recommandations**

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

- la poursuite de l'étude sur les indicateurs du paludisme dans diverses faciès épidémiologiques afin de mieux déterminer l'impact des stratégies de lutte contre le paludisme en tenant compte des covariates étudiés ici ;
- la poursuite des études sur les indicateurs palustres dans diverses zones éco-climatiques pour mieux évaluer l'impact des stratégies de lutte contre le paludisme.

## 9. Références bibliographiques

1. OMS, world malaria report 2014 : points essentiels. 2014.
2. Mycologie.(ANOFEL), A.f.d.e.d.p.e., Paludisme. 2014.
3. V, E.-. Plan strategique de lutte contre le paludisme 2013-2017. 2012 2013.
4. PNLP, Rapport sur le paludisme au Mali. 2013.
5. Fairhurst, R.M., et al., Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria.Nature, 2005. 435(7045): p. 1117-21.
6. Guindo, A., et al., X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. PLoS Med, 2007. 4(3): p. e66.
7. Rowe, J.A., et al., Blood group O protects against severe Plasmodium falciparum malaria through the mechanism of reduced rosetting. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(44): p. 17471-6.
8. Bannister LH and s. IW., plasmodium. encyclopedia of life sciences. 2009.
9. Macdonald, G., Epidemiological basis of malaria control. Bull World Health Organ, 1956. 15(3-5): p. 613-26.
10. Doumbo, O., Epidémiologie sur paludisme au Mali,étude de la chimiorésistance,essai de stratégie de controle basé sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine.1992.
11. OMS, Rapport sur le paludisme. 2014.
12. Kwiatkowski, D., Cytokines and anti-disease immunity to malaria. Res Immunol, 1991. 142(8): p. 707-12.
13. 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.
14. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. 94 Suppl 1: p. S1-90.
15. Lehmann, H., Man's Haemoglobins. 1974: p. 319-20.
16. Williams, A.W. and J.P. Mackey, Rapid Determination of the Sickle Cell Trait by the Use of a Reducing Agent. J Clin Pathol, 1949. 2(2): p. 141-2.
17. Lehmann, H. and A.B. Raper, Distribution of the sickle-cell trait in Uganda, and its ethnological significance. Nature, 1949. 164(4168): p. 494.
18. Wellems, T.E. and R.M. Fairhurst, Malaria-protective traits at odds in Africa? Nat Genet, 2005. 37(11): p. 1160-2.
19. Hockham, C., et al., Understanding the contrasting spatial haplotype patterns of malaria-protective beta-globin polymorphisms. Infect Genet Evol. 36: p. 174-83.
20. Ghartey-Kwansah, G., et al., The Prevalence of alpha-Thalassemia and Its Relation to Plasmodium falciparum Infection in Patients Presenting to Clinics in Two Distinct Ecological Zones in Ghana.Hemoglobin. 40(1): p. 32-7.

21. J. Bancarel , P. Causse-Le-Dorze , and C. Traccard., Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase: intérêt du dépistage systématique dans les forces armées. *médecine et armées*, 2010. vol 38: p. 125-130.
22. Luzzatto, L.M., Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Scriver CR, Baudet AL, Sly WS, Valle D (eds) ed. *The metabolic basis of inherited disease*. 1989, New York: 6th edition.
23. Hirano, A. and E. Beutler, Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(11): p. 3951-4.
24. Ruwende, C., et al., Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature*, 1995. 376(6537): p. 246-9.
25. Clark, T.G., et al., Allelic heterogeneity of G6PD deficiency in West Africa and severe malaria susceptibility. *Eur J Hum Genet*, 2009. 17(8): p. 1080-5.
26. Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study. *Nat Genet*. 46(11): p. 1197-204.
27. Fry, A.E., et al., Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum Mol Genet*, 2008. 17(4): p. 567-76.
28. Higgins, T., G.A. Naughton, and D. Burgess, Effects of wearing compression garments on physiological and performance measures in a simulated game-specific circuit for netball. *J Sci Med Sport*, 2009. 12(1): p. 223-6.
29. Williams, T.N., et al., Both heterozygous and homozygous alpha+ thalassemias protect against severe and fatal *Plasmodium falciparum* malaria on the coast of Kenya. *Blood*, 2005. 106(1): p. 368-71.
30. Cellule de Planification et de Statistique (CPS/SSDSPF), Institut National de la Statistique (INSTAT/MPATP), and INFO-STAT et ICF International, Enquête Démographique et de Santé au Mali 2012-2013. 2014, Maryland, USA : CPS, INSTAT, INFO-STAT et ICF International: Rockville,.
31. Amaratunga, C., et al., A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One*. 6(4): p. e14798.
32. Riley, E.M., et al., Lack of association between maternal antibody and protection of African infants from malaria infection. *Infect Immun*, 2000. 68(10): p. 5856-63.
33. Griffin, J.T. and al., The interaction between seasonality and pulsed interventions against malaria in their effects on the reproduction number. *PLoS Comput Biol*, 2015. 11(1).
34. Kyu, H.H., et al., Global and National Burden of Diseases and Injuries Among Children and Adolescents Between 1990 and 2013: Findings From the Global Burden of Disease 2013 Study. *JAMA Pediatr*. 170(3): p. 267-87.
35. Mackinnon, M.J., et al., Environmental Correlation Analysis for Genes Associated with Protection against Malaria. *Mol Biol Evol.*, 2016. 33(5): p. 1188-204.
36. Luzzatto, L., G6PD deficiency: a polymorphism balanced by heterozygote advantage against malaria. *Lancet Haematol*. 2(10): p. e400-1.

37. Opi, D.H., et al., Red blood cell complement receptor one level varies with Knops blood group, alphas-thalassaemia and age among Kenyan children. *Genes Immun.*
38. Loua, A., et al., [Frequency of blood groups ABO and rhesus D in the Guinean population]. *Transfus Clin Biol*, 2007. 14(5): p. 435-9.
39. Folquet Amorissani, M., et al., [Anemia in the premature newborn]. *Mali Med*, 2007. 22(2): p. 1-5.
40. Doumbouya, M., Prévalence des polymorphismes de l'hémoglobine (HbS, HbC,  $\alpha$ -thalassemie) et du globule rouge (déficit en G6PD, groupe sanguin ABO) connus comme protecteurs contre les formes graves du paludisme dans la commune rurale de Bancoumana, Kati. 2010.
41. Agarwal, A., et al., Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood*, 2000. 96(7): p. 2358-63.
42. Modiano, D., et al., Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 2001. 414(6861): p. 305-8.
43. Mockenhaupt, F.P., et al., Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children. *J Infect Dis*, 2004. 190(5): p. 1006-9.
44. Souleymane, M.I., Effet de la saison de transmission du paludisme sur les PARAMETRES hématologiques chez les enfants en bonne santé DE KENIEROBA, Commune rurale de BANCOUMANA, MALI. 2014.
45. Labie, D., et al., [Hemoglobinopathies in West-African immigrant workers in France (author's transl)]. *Sem Hop*, 1978. 54(43-44): p. 1343-6.
46. Masmias, T.N., et al., Inherited hemoglobin disorders in Guinea-Bissau, West Africa: a population study. *Hemoglobin*, 2006. 30(3): p. 355-64.

## 10. Fiche signalétique

**Nom et Prénom:** Mr. Bourama KEITA

**Nationalité:** Malienne

**Année et ville de soutenance:** 2016, Bamako

**Titre:** Etude prospective des indicateurs du paludisme de 2008 à 2011 dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin dans la commune rurale de Bancoumana, Mali: Influence des polymorphismes du globule rouge

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

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

### Résumé

L'épidémiologie du paludisme varie non seulement d'un facies épidémiologique à un autre mais aussi d'une année à une autre. Au cours de cette étude, notre objectif était d'évaluer les indicateurs palustres au cours de quatre années de transmission palustre tout en prenant en compte des variants du globule rouge (HbAS, HbAC, groupe sanguin ABO, déficit en G6PD et alpha-thalassémie) comme covariates.

Au cours des saisons de transmission 2008, 2009, 2010 et 2011, nous avons entrepris une étude prospective de cohorte dans les villages de Bozokin, de Fourda et de Kéniéroba situés tous dans la commune rurale de Bancoumana, district sanitaire de Kati.

Au total, 3953 enfants âgés de 6 mois à 17 ans ont été inclus dans l'étude. Nous n'avons pas observé de variation significative concernant les indicateurs palustres étudiés d'une année à l'autre sauf en 2009 où nous avons noté une augmentation des accès palustres de la densité parasitaire moyenne. Nous avons observé une prévalence élevée des polymorphismes du globule rouge dans notre population d'étude. Ainsi, la prévalence du trait drépanocytaire 10,02% d'HbAS alors que celle de l'HAC était de 7,69%. La fréquence du déficit en G6PD était de 15,4%, avec respectivement 10,2% d'hétérozygotes et 5,2% d'homo-/hémizygotte. De tous ces polymorphismes étudiés, seuls l' HbAS et le déficit en G6PD dans sa forme hétérozygote étaient associés à une réduction du risque de paludisme et à une densité parasitaire réduite.

**Mots clés:** Indicateurs de paludisme, Polymorphismes de globule rouge, Accès palustres

## **Summary**

Malaria epidemiology varies not only from an area to another but also from years to year. This study aimed to describe malaria disease indicators over four transmission seasons taking in account red blood cell polymorphisms that have been reported to be protected against malaria such as sickle cell trait, Hemoglobin C and S, ABO blood groups, G6PD deficiency, alpha-thalassemia.

To achieve this goal, we carried out a cohort prospective study in the villages of Bozokin, Fourda and Kenioroba both located in the Bancoumana rural commune.

In total, 3953 children aged from six months to seventeen years old were enrolled in this study. No significant changes were observed in the indicators from year to year, except in 2009 where we noticed an increase in the number of malaria cases and the mean parasitemia. High prevalence of red blood cell polymorphisms was observed. The prevalence of HbAS, HbC, G6PD deficiency hemizygous, G6PD deficiency heterozygous were respectively 10.02%, 7.69%, 5.2% and 10.2%. From all the RBC polymorphisms, only HbAS and G6PD deficiency (mainly heterozygous carriage) were associated with reduction of malaria risk and parasite density.

**Key words:** Malaria indicators, Red Blood cell Polymorphisms, Malaria disease

## 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 25: Analyseur et Microcuvette HemoCue

**Source** : Photo prise à Kéniéroba

#### 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 (ref).

#### 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 26: 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](http://www.hemocue.com)

## 11.2. Détermination du groupe sanguin ABO

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

### 11.2.1. Principe

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

### 11.2.2. 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)

### 11.2.3. 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 ;

-turturer 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 le 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 (ref).

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) de la goutte épaisse**

**11.4.1. 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<sup>e</sup> doigt après le pouce), sur la face latérale du doigt sain.

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

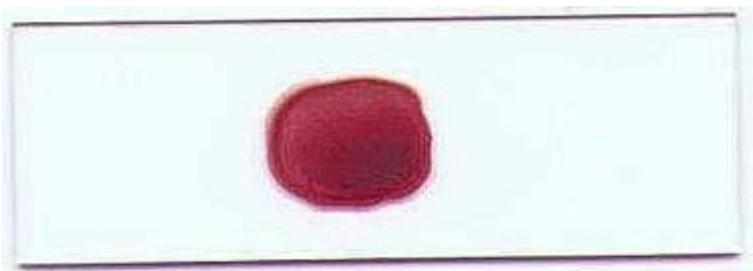
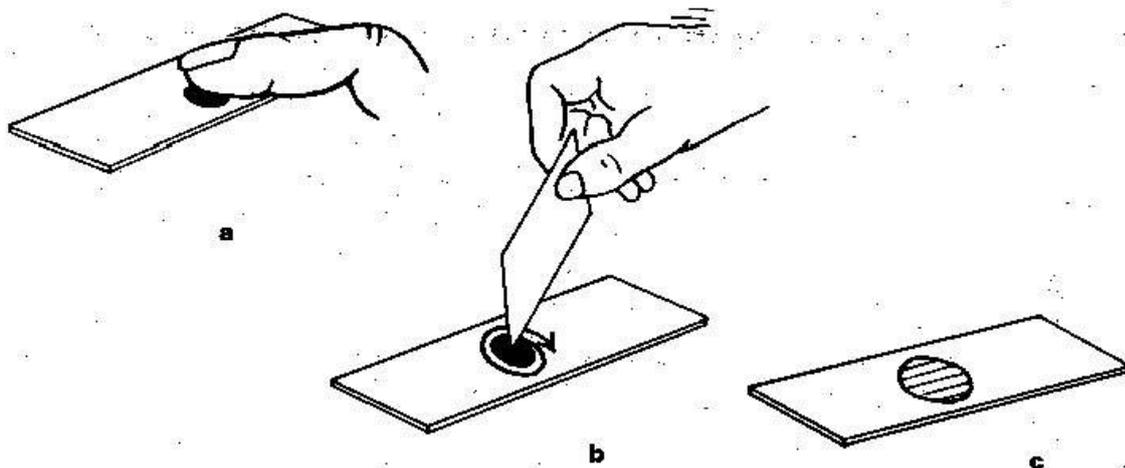
Au talon ou gros orteil chez le nourrisson, après l'avoir réchauffé.

#### **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. Étendre 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 27: 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.

#### **11.4.6. Aspects**

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 d'un bleu pale. 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 $\mu\text{l}$ (= $\text{mm}^3$ )**

On trouvera ci-dessous une méthode pratique de précision suffisante. Elle consiste à dénombrer les parasites par  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$ . 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 $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  par la simple formule mathématique suivante :

Nombre de parasites X 7 500

----- = parasites par  $\mu\text{l}$

Nombre de leucocytes

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

### **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 graisseuses. 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

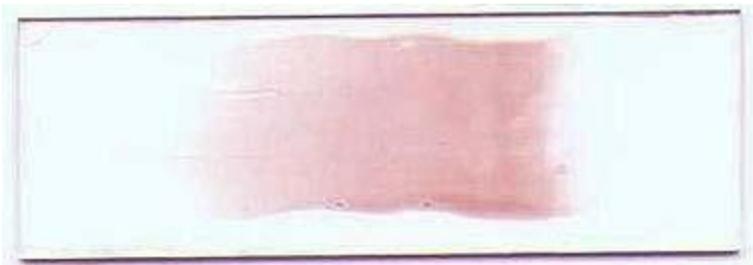
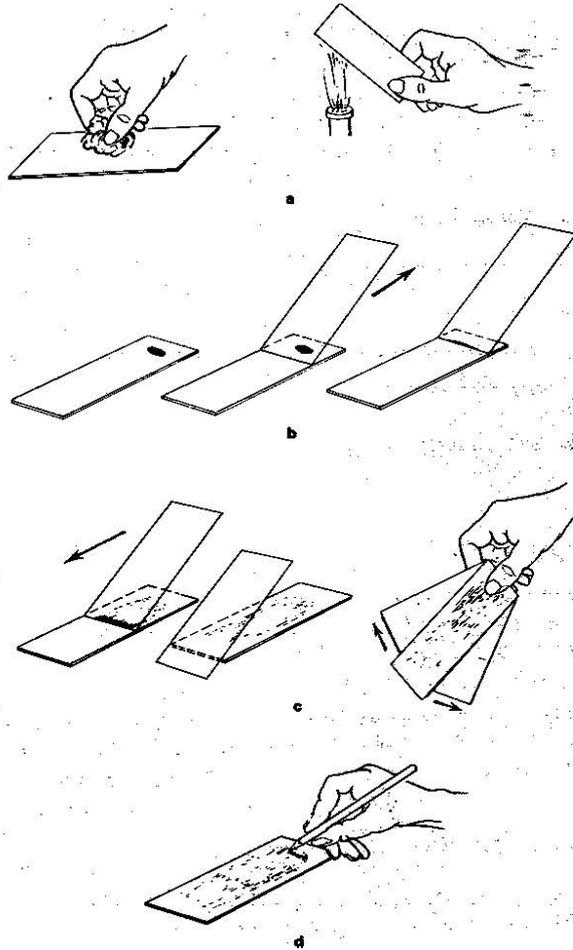
#### **11.5.2. Lieu du prélèvement**

- a. A l'extrémité d'un doigt gauche (ni index, ni pouce), sur la face latérale du doigt qui ne doit être ni oedémateux, 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 la colorant de May-Grunwald-Giemsa, ou l'Hémacolor ou colorer avec le Giemsa 3% dans de l'eau tamponnée.



**Figure 28: technique du frottis mince.**

#### **11.5.4. 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  $\mu\text{l}$  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.

## SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

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 !**