

R é p u b l i q u e d u M a l i

U n P e u p l e - U n B u t - U n e F o i

M I N I S T È R E D E L ' É D U C A T I O N N A T I O N A L E

U N I V E R S I T É D E B A M A K O

Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie

ANNEE : 2002-2003

Thèse N°.....

Pigment malarique et paludisme grave chez les
sujets de 0 `a 20 ans `a Bandiagara (Mali)

Thèse présentée et soutenue publiquement le

Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie

Par **Mme Koné N'tafé Dembélé**

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

JURY :

Président : Pr Ogobara K Doumbo

Membres : Dr Massambou Sacko

Dr Souleymane Diallo

Coirecteur de thèse : Dr Mounirou Baby

Directeur de thèse : Pr Dapa Diallo

Au bon Dieu le tout puissant

Sans ta permission rien n'est possible, c'est pourquoi je te remercie de m'avoir donné les moyens et surtout le courage pour pouvoir réaliser ce travail. Je te demande de continuer à m'assister.

A mes grands parents paternels et maternels in memoriam

Mais surtout à ma grand-mère et homonyme, Nah, au-delà de la mort tu continues à me guider.

Dormez tous en paix et qu'allah vous accorde son pardon et sa miséricorde!
Amen.

A mon père

Tu as compris très tôt que la seule richesse pérenne que tu peux nous donner est une bonne éducation. Merci de nous avoir appris l'esprit du travail bien fait et surtout de famille. Ce travail est le fruit de tes sacrifices
Puisse le bon Dieu me donner la chance pour combler tes attentes. Amen

A ma mère

Femme courageuse, infatigable et surtout sociable tu demeures pour nous une fierté mais surtout un exemple à suivre. Tu as tout fait pour la réussite de tes enfants. Je suis à ce stade de la vie grâce à tes conseils et tes bénédictions.
Puisse le bon Dieu te donner longue vie et bonne santé afin que tu demeures auprès de tes enfants. Amen

A ma marâtre

Votre soutien ne m'a jamais fait défaut. Je vous serais toujours reconnaissante.

A Mr koné

Ni les mots ni les phrases ne sauraient suffire pour témoigner toute mon affection. Tu t'es dévoué pour ma cause en compagnon exemplaire pour un seul objectif : ma réussite. Puisse ce travail être pour toi un début de consolation. Je souhaite que nous réussissions dans l'union pour le bonheur de notre foyer. Ce travail est aussi le tien ...

A mon oncle ISSAGA et à ma tante Sira Diarra

Je ne pourrais jamais parler d'études sans penser à vous. Chez vous je me sentais comme dans ma propre famille. Permettez-moi de vous remercier pour tout votre soutien durant toute cette période inoubliable de ma vie. Que Dieu vous bénisse !

A mes frères et sœurs

Je vous dis que la fraternité est une chose précieuse, et il est de notre devoir de la consolider et de la garder jalousement. Soyons unis pour porter haut le nom de la famille. Ce travail n'est qu'un exemple pour vous, mais faites tous mieux.

REMERCIEMENTS

A tout le personnel du laboratoire d'hématologie de la Faculté de Médecine de pharmacie et d'Odontostomatologie pour votre encadrement plein de pédagogie et de rigueur. Merci pour toutes les techniques apprises. Trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Au Dr Guindo pour votre apport dans la réalisation de ce travail.

Dr Daniel, Dr Baby pour tous les conseils qui m'ont permis d'aller de l'avant.

Au major et à feu **Mr Sidibé** pour l'estime porter à mon égard.

A tous mes collègues internes : **Gafou, Madjid, Blaise, Alain** pour votre compréhension. Bonne chance à tous dans la vie professionnelle qui commence bientôt.

Au **Docteur Yacouba Cissoko** pour votre aide précieuse pour la finalisation de ce travail.

Au Dr Madani : merci pour tous les conseils que tu m'as prodigués

A mes camarades de la promotion 1996-2002 en souvenirs du temps passé ensemble.

A tout le corps professoral de la FMPOS: ce travail est le fruit de l'enseignement de qualité reçu durant notre cycle.

A tout le personnel du laboratoire de parasitologie de la FMPOS

A tout le personnel de la Pharmacie de Torokorobougou et surtout à vous **Dr Ag FAKIKE** pour votre largesse d'esprit, votre simplicité, et votre humanisme. J'ai beaucoup appris auprès de vous. Soyez rassurer de ma profonde gratitude.

A la famille Tangara

Je ne peux pas parler d'étude sans penser à vous. Vous m'avez ouvert votre porte à un moment où j'avais le plus besoin. Dans la vie il y'a des moments où il faut savoir dire merci. Je pense que cet instant mémorable en est un. Recevez mes sincères remerciements.

A ma tante Fanta Dembélé

Aucune expression ne peut traduire mes sentiments à votre égard. Votre humanisme sans pareil à fait de vous une femme respectée et respectable.

Je n'oublierai jamais votre soutien qui m'a facilité la vie à l'internat. Soyez en remercier.

A ma tante Aminata Dembélé

Ce n'est pas pour rien que je suis contente quand on dit qu'on se ressemble. J'ai beaucoup d'estime pour vous. Je vous suis reconnaissante pour tous vos gestes. C'est grâce à vos conseils que j'ai pu avoir le courage pour mener à bien mes études. Soyez en remercier.

A tous mes Amours : **Sidi, Barou, Bathily** pour votre assistance en l'absence de mon mari.

A tous mes cousins et cousines

Je me réserverais de vous citer mais sachez tous que je vous aime bien.

A toute la famille Kanté à Faladié pour votre amabilité à mon égard.

A la famille Bamba au Quartier Mali pour m'avoir accueilli avec joie dans votre famille

A tout ceux qui de près ou de loin, nous ont aidé dans ce travail de façon désintéressée. Sincère gratitude.

A notre Maître et président de jury

Pr Ogobara K. Doumbo

Pr titulaire de Parasitologie – Mycologie

Directeur du MRTC

Directeur du cour Supérieur d'épidémiologie pour

Chef de D E R de sciences fondamentales à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie

Vous nous faites honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations. Nous avons beaucoup admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques.

Votre simplicité et votre disponibilité font de vous un grand maître.

Soyez rassuré, cher Maître de notre profonde gratitude.

A notre Maître et juge

Dr Massambou Sacko

Chef de clinique Assistant en Santé Publique à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie

Coordinateur du programme national de lutte contre le paludisme à la direction nationale de la Santé

Nous sommes très honorées par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de participer à ce jury de thèse.

Votre simplicité, votre disponibilité pour nous les étudiants font de vous un homme aux qualités humaines exceptionnelles.

Cher Maître, croyez à nos sincères remerciements.

A notre Maître et juge

Dr Souleymane Diallo

Maître assistant en bactériologie, chef du laboratoire d'analyses biomédicales de l'Hôpital Gabriel Touré.

Nous sommes très honorées de vous compter parmi les juges de ce travail.

Votre appréciation et vos remarques amélioreront la qualité de ce travail. Votre réputation de travailleur rigoureux force notre admiration.

Soyez rassuré cher maître de l'expression de notre profond respect.

A notre Maître et co- directeur de thèse

Dr Baby Mounirou

Spécialiste en hématologie et maladies du sang

Assistant en hématologie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'odontostomatologie.

Superviseur du laboratoire des bonnes pratiques en laboratoire au MRTC

Nous avons vite admiré vos qualités humaines scientifiques et pédagogiques.

Votre simplicité, votre disponibilité constante et votre dynamisme font de vous un Maître admiré de tous.

Permettez-nous de vous réitérer, cher Maître nos sentiments de profonde gratitude.

A notre Maître et directeur de thèse

Monsieur le professeur Dapa Aly DIALLO

Pr titulaire d'hématologie

Chef du service d'hématologie-oncologie médicale de l'HNPG

**Médecin chef du laboratoire de recherche en hématologie de la
Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie de
Bamako.**

Nous avons éprouvé une grande joie lorsque vous nous avez acceptée dans votre service. Nous vous en sommes infiniment reconnaissante.

Nous avons admiré votre rigueur scientifique, votre persévérance et votre amour du travail bien fait.

Q'il nous soit permis aujourd'hui de vous dire combien nous sommes heureuse et fière d'être votre élève.

Soyez rassuré, cher Maître de notre profonde considération.

Liste des abréviations

BS	: Bonne santé
CCMH	: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
CRMT	: Centre Régional de Médecine Traditionnelle
DEAP	: Département D'épidémiologie des Affections Parasitaires
EDTA	: Ethylène Diamine Tétracide
GB	: Globule Blanc
GR	: Globule rouge
HB	: Hémoglobine
HT	: Hématocrite
IEC	: International Equipment Company
INRSP	: Institut National de Recherche en Santé Publique
Leu	: leucine
N	: Nombre
Phe	: phénylalanine
PB	: Polynucléaires basophiles
PE	: Polynucléaires éosinophiles
PG	: Paludisme grave
PM	: Poids moléculaire
PN	: Polynucléaire neutrophile
PS	: Paludisme simple
Tr/ min	: tours par minute
VGM	: Volume globulaire moyen
µl	: micro-litre
%	: Pourcentage

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
OBJECTIFS.....	5
1-1 Objectif général.....	5
1-2 Objectif spécifiques.....	5
CHAPITRE I : METHODOLOGIE.....	6
1 Site d'étude.....	6
1-1 Historique de la ville de Bandiagara.....	6
1-2 Relief.....	6
1-3 Hydrographie.....	6
1-4 Climat et végétation.....	6
1-5 Population.....	7
1-6 Activités économiques.....	7
1-7 Infrastructures.....	7
2- Type d'étude.....	8
3- Période d'étude.....	8
4- Population d'étude.....	8
5- Critères d'inclusion et de non inclusion.....	8
5-1 Paludisme grave.....	8
5-2 Paludisme simple.....	8
5-3 Bonne santé.....	9
6-Techniques de laboratoire.....	9
6-1 Goutte épaisse.....	9
6-2 Décompte des leucocytes mélanifères.....	10
6-3 Hématocrite.....	12
6-4 Electrophorèse de l'hémoglobine.....	12
6-5 Dosage du taux d'hémoglobine.....	15
7- Contrôle de qualité.....	15
8-Exploitation des données.....	16
CHAPITRE II : RESULTATS.....	18
1- Résultats globaux.....	18
2- Résultats analytiques.....	24
CHAPITRE III : COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	33
1- Questions méthodologiques.....	33
2- Caractéristiques des sujets étudiés.....	33
3- La distribution des cas de paludisme grave dans la population étudiée.....	34
3- Signification des résultats de la recherche de cellules pigmentées.....	34
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	37
1- Conclusion.....	37
2- Recommandations.....	38
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	39
ANNEXES.....	41
1- Fiche d'enquête.....	41
2- Observation microscopique de leucocytes mélanifères.....	45

INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Il existe quatre espèces plasmodiales qui parasitent l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovalae*. Parmi ces quatre espèces, *Plasmodium falciparum* est la plus répandue et la plus redoutable puisque qu'elle est responsable de l'accès pernicieux potentiellement mortel (1).

Des études ont montré que 300 à 500 millions de personnes souffrent de paludisme symptomatique par an en zone d'endémie (2).

En 1996, l'organisation mondiale de la santé estimait à 2 milliards le nombre de personnes exposées au paludisme. Les $\frac{3}{4}$ des cas de paludisme dans le monde proviennent de l'Afrique. Le paludisme est responsable de plus de 3,5 millions de petits poids à la naissance sur 24 millions de nouveau-nés dans les zones endémiques. Il tue environ 1 à 2 millions de personnes chaque année en Afrique (3). Il s'agit pour la plupart, des enfants de moins de 5 ans et des femmes enceintes.

Au Mali, c'est l'une des principales causes de mortalité (13%) et de morbidité (15%). Il est responsable de 16,45% des hospitalisations pédiatriques (4).

Les plasmodia responsables du paludisme sont transmis à l'homme par la piqure de la femelle d'un moustique : l'anophèle

Le cycle des plasmodia comprend 3 étapes :

- l'étape anophélienne avec son cycle sexué ou sporogonique ;
- l'étape humaine tissulaire, avec son cycle asexué hépatique exo-érythrocytaire (schizogonique) et le stockage éventuel des hypnozoïtes ;
- l'étape humaine vasculaire ou érythrocytaire, avec son cycle asexué (schizogonique) et l'amorce du cycle sexué.

Le cycle chez l'homme commence par l'injection des sporozoïtes lors de la prise du repas sanguin par l'anophèle femelle. Les sporozoïtes gagnent les hépatocytes, se multiplient et donnent un schizonte extra-érythrocytaire ou corps bleu. Celui-ci après

éclatement libère des mérozoïtes qui gagnent le sang périphérique et parasitent les globules rouges en devenant au fur et à mesure de leur croissance trophozoïte, schizonte puis corps de rosace. Les corps de rosace à leur tour éclatent et libèrent des mérozoïtes. L'apparition des éléments à potentiel sexué ou gamétocytes est plus tardive. Ces gamétocytes sont aspirés avec le sang par le moustique lors de son repas sanguin. Ils gagnent l'estomac de l'insecte et se transforment en gamètes (mâles et femelles.)

Après fécondation le gamète femelle devient un ookinète (libre) puis un oocyste (fixe). C'est l'éclatement de l'oocyste qui libère des sporozoïtes qui gagnent les glandes salivaires de l'anophèle (5).

Les manifestations du paludisme sont liées directement ou indirectement à la schizogonie érythrocytaire. C'est à ce stade que chaque mérozoïte qui pénètre par endocytose dans une hématie se transforme en trophozoïte puis en schizonte qui se charge de pigment malarique et devient un corps de rosace. Parallèlement l'hémoglobine se dégrade dans l'hématie parasitée. Durant le cycle intra-érythrocytaire environ 60 à 80% de l'hémoglobine est dégradée selon une protéolyse enzymatique qui libère l'hème et génère des aminoacides. Deux protéases aspartiques, les plasmepsines I et II et une protéase dérivée de la cystéine, la falcipaine ont été purifiées à partir des vacuoles digestives de *P. falciparum*. Ces plasmepsines I et II clivent l'hémoglobine native avec une spécificité entre 33 Phe – 34 Leu. Les molécules d'hèmes libérées au cours de cette protéolyse ne semblent pas être métabolisées ou recyclées mais stockées sous forme de polymères inertes connues sous le nom de pigment malarique ou hemozoïne. Chez *P. falciparum* une partie de la dégradation de l'hémoglobine a lieu aux stades de trophozoïte et de schizonte jeunes mais la majorité survient pendant les 6 à 12 heures du développement du trophozoïte. Ce phénomène est unique au genre *Plasmodium*. Le pigment est visible microscopiquement aux stades où l'hémoglobine est activement dégradée tels que : les trophozoïtes, schizontes, gamétocytes. Pendant le processus de dégradation de l'hémoglobine des micro-molécules d'hèmes libres peuvent endommager le métabolisme cellulaire par inhibition enzymatique, la peroxydation des membranes et la production de radicaux

libres(6). Le pigment malarique libéré se comporte comme une véritable substance pyrogène dont l'effet est comparable à celui d'une endotoxine à dose élevée.

Au niveau de chaque hématie parasitée, la quantité d'hémozoiné libérée est négligeable. Mais lorsque la parasitémie atteint un certain seuil le nombre d'hématies parasitées qui éclatent en libérant du pigment pyrogène est suffisant pour entraîner des crises fébriles.

Cliniquement on distingue 2 types de paludisme : le paludisme simple et le paludisme grave et compliqué.

Les différentes études réalisées jadis corrélaient la sévérité clinique du paludisme essentiellement avec la charge parasitaire périphérique. De nos jours on constate de plus en plus que la charge parasitaire périphérique ne suffit pas à elle seule pour définir un accès grave.

En effet, plusieurs facteurs continuent à faire l'objet d'analyse pour une meilleure compréhension de la physiopathologie du paludisme grave. Parmi les phénomènes étudiés, on peut citer la cyto-adhérence, la formation de rosettes ou rosetting, le rôle des cytokines.

En fait la densité parasitaire obtenue lors du décompte des parasites dans le sang périphérique ne correspond pas à la charge parasitaire réelle du patient parce que certains parasites séquestrés se trouvent dans les tissus et sont responsable de la pathologie.

Le fait qu'une quantité importante de pigment malarique soit déversée dans le sang au moment de la schizogonie, pourrait refléter le pouvoir pathogène des parasites séquestrés et constituer ainsi une possibilité de mesurer la sévérité clinique du paludisme. PHU NH et al., en testant cette hypothèse ont trouvé une corrélation entre le pigment malarique intra leucocytaire et la mortalité par le paludisme grave chez les adultes Thaïlandais. Ce qui constituait pour eux un meilleur outil de pronostic par rapport au calcul de la densité parasitaire périphérique(7). Nous notons que cette étude avait été menée chez les adultes en zone hypoendémique.

Amodu O.K et al., ont testé cette hypothèse sur un recrutement d'enfants âgés de 6 mois à 14 ans et répartis entre quatre catégories (sans paludisme, paludisme asymptomatique, paludisme simple et paludisme grave). Ils ont pu démontrer que la proportion de polynucléaires neutrophiles mélanifères était un meilleur indicateur de la sévérité clinique et de la charge parasitaire totale, tandis que les monocytes mélanifères n'étaient particulièrement corrélés à aucune forme clinique de paludisme (8). Ces auteurs n'ont pas trouvé toutefois un intérêt pronostique du décompte des leucocytes mélanifères peut être à cause de la petite taille de leur échantillon.

Peu d'études ont porté sur les leucocytes mélanifères en Afrique Occidentale et plus particulièrement au Mali.

Nous, nous proposons dans ce travail, d'étudier l'association entre la présence de leucocytes mélanifères circulants et la sévérité du paludisme chez des enfants âgés de 0 à 20 ans dans une localité à transmission saisonnière de paludisme au Mali.

OBJECTIFS

1.1 Objectif général

Etudier l'association entre les formes graves de paludisme et la présence de leucocytes mélanifères dans le sang des sujets semi-immuns de 0 à 20 ans dans le cercle de Bandiagara au Mali.

1.2 Objectifs spécifiques

- 1- Déterminer la prévalence des PN mélanifères circulants chez les sujets semi-immuns de 0 à 20 ans souffrant de paludisme ;
- 2- Déterminer la prévalence de monocytes mélanifères circulants chez les sujets semi-immuns de 0 à 20 ans souffrant de paludisme ;
- 3- Comparer les différentes formes cliniques de paludisme pour la présence ou l'absence de leucocytes mélanifères chez les sujets semi-immuns de 0 à 20 ans.

METHODOLOGIE

1 Site d'étude

Notre étude s'est déroulée dans la ville de Bandiagara au Mali. Elle a concerné des habitants de cette ville et des villages environnant usagers des services de l'équipe de recherche du DEAP basée au centre de santé du cercle de Bandiagara.

1-1 Historique de la ville de Bandiagara

A l'origine, la localité qui a servit de site à la ville de Bandiagara a été découvert par un riche et généreux chasseur. Il offrait son hospitalité aux voyageurs de passage. Ces derniers au cours de leur pérégrination choisissaient le lieu du chasseur comme gîte d'étape pour se reposer, faire des rencontres et échanger. Leurs choix étaient dus au fait qu'ils trouvaient en permanence une grande hospitalité avec une table toujours garnie de mets et nourritures. En milieu traditionnel Dogon, le service de la nourriture se fait dans unealebasse. Chez le chasseur cettealebasse était là en permanence remplie de nourriture pour les voyageurs. C'est le nom vernaculaire de ce récipient rempli de nourriture en langue Dogon « Bandiagara » qui donna naissance au nom de la ville.

1-2 Relief

Située sur le plateau Dogon, la ville de Bandiagara est caractérisée par de nombreuses falaises, prolongements des monts mandingues. Ces falaises sont abrupts et cumulent à peu près à 1000 m.

1-3 Hydrographie

Bandiagara est arrosée par un des principaux affluents du Niger (le Yamé). Mais elle est parsemée de multiples petits marigots.

1-4 Climat et végétation

Situé entre l'isohyète 200 à 700 mm, la pluviométrie moyenne de Bandiagara est de 200 à 500 mm d'eau par an.

La végétation est du type sahélien, constituée essentiellement d'arbustes, d'arbres rabougris et d'épineux.

Le climat est caractérisé par une courte saison de pluie de juin/juillet en Août et une saison sèche occupant le reste de l'année. Pendant la saison sèche le vent dominant est l'harmattan qui souffle du Nord-est au Sud-est. La saison pluvieuse est caractérisée par un vent chargé d'humidité (mousson) dont la remontée est fonction du front inter tropical (FIT).

1-5 Population

D'après le recensement réalisé par l'équipe du DEAP en 1998, la population de Bandiagara a été estimée à environ 12500 habitants. Elle est composée majoritairement de Dogon, on y trouve également des Peuhls, Bambaras, Bozos, sonhraïs, Sénoufos etc....

La culture Dogon est traditionnellement marquée par des pratiques animistes. Mais actuellement, la religion musulmane est de loin la plus pratiquée à côté du christianisme.

Sur le plan culturel, bien que la population soit ouverte au monde extérieur les vestiges de la civilisation Dogon sont très perceptibles çà et là, notamment, en matière vestimentaire, de danses culturelles et masques.

1-6 Activités économiques

Majoritairement rurale, l'économie de la ville repose sur l'agriculture, l'élevage, le commerce, et la cueillette.

1-7 Infrastructures

La ville dispose de deux écoles fondamentales et est le siège de nombreux projets de développement rural.

Comme infrastructures sanitaires la ville dispose :

- d'un centre de santé de cercle dirigé par un médecin chef et son adjoint. Ce centre comprend un dispensaire, une maternité, un dépôt de médicaments et un laboratoire d'analyses médicales ;

- d'un centre régional de médecine traditionnelle (CRMT), fruit de la coopération Italo-malienne sous la responsabilité administrative et scientifique de l' INRSP.

2- Types d'études

Il s'agit d'une étude prospective cas-témoin qui a consisté en la détermination des proportions de polynucléaires neutrophiles mélanifères et des monocytes mélanifères dans les étalements sanguins de trois groupes d'enfants appariés selon l'âge et la résidence :

- le premier groupe était formé d'enfants souffrant de paludisme grave correspondant au cas;
- le second regroupait des enfants souffrant de paludisme simple ;
- le dernier était constituée d'enfants ne souffrant pas de paludisme ;

Ces deux derniers groupent correspondent aux témoins.

3- Période d'étude

L'étude s'est déroulée durant la saison des pluies, période de forte transmission du paludisme. Elle a concerné la période de Juillet à Décembre 2000.

4- Population d'étude

Notre étude a porté sur les sujets de 0 à 20 ans, tout sexe confondu, vus en consultation dans le centre de santé par les équipes de recherche du DEAP, souffrant ou non de paludisme et consentant pour l'étude.

5- Critères d'inclusion et de non-inclusion

5-1 Paludisme grave

Ont été inclus dans notre étude comme cas grave tous les enfants de 0 à 20 ans vus au centre de santé ayant une goutte épaisse positive et présentant un ou des signes de gravité du paludisme suivants: prostration, détresse respiratoire, coma, obnubilation, choc, vomissements répétitifs, anémie sévère (taux d'hématocrite <15%) hypoglycémie (glycémie < 40mg/dl), hyperparasitémie (parasitémie \geq 500000)

5-2 Paludisme simple

Ont été inclus comme cas simple tous les enfants de 0 à 20 ans vus au centre de santé consentant pour l'étude et ayant eu une goutte épaisse positive

(parasitémie < 500000/mm³) accompagnée d'un ou de plusieurs signes suivants : fièvre (température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C), céphalées, courbatures, frissons.

N'ont pas été inclus tous les sujets ne répondant pas aux critères d'inclusion sus cités.

5-3 Bonne santé

Il s'agissait des sujets indemnes de paludisme et ayant les mêmes caractéristiques socio-démographiques que les sujets cas (paludisme grave).

6- Techniques de laboratoire

6-1 Goutte épaisse

6-1-1 Matériels et réactifs

- coton hydrophile ;
- alcool à 70°C ;
- gants en polyvinyle ;
- vaccinostyles stériles à usage unique ;
- lames porte-objets ;
- minuterie ;
- râteliers ;
- boîtes de rangement des lames ;
- papier hygiénique ;
- marqueur indélébile ;
- bacs de coloration ;
- microscope optique ;
- huile à immersion ;

- comprimés tampon ;
- éprouvettes graduées ;
- poubelles
- Giemsa à 3%

6-1-2 Modes opératoires

a) Confection de la goutte épaisse

Pour prendre le sang, l'extrémité du doigt (3ème ou 4ème) choisi, était nettoyée avec un tampon imbibé d'alcool puis séchée avec du coton sec. On piquait le doigt avec un vaccinostyle à usage unique. La première goutte de sang était nettoyée avec un coton sec, la deuxième goutte était recueillie sur une lame préalablement nettoyée avec du papier hygiénique. A l'aide d'un coin d'une autre lame, cette goutte était défibrinée et étalée sur un diamètre d'environ un centimètre. Après séchage à l'air libre on procédait à la coloration.

b) Coloration de la goutte épaisse

Après séchage les gouttes étaient colorées dans une solution de Giemsa à 3% diluée dans de l'eau tamponnée à pH 7,2. Elles étaient ensuite rincées par trempage dans de l'eau puis séchées quelques minutes sur des supports.

c) Lecture des gouttes épaisses

Elle a été faite au microscope optique avec les oculaires ayant un grossissement 10 et un objectif ayant un grossissement 100.

La densité parasitaire a été déterminée par comptage des parasites pour 300 leucocytes et les résultats exprimés en nombre de parasites par millimètre cube de sang sur la base d'une moyenne de 7500 leucocytes par millimètre cube de sang.

Le décompte a été fait à l'aide de deux compteurs manuels, l'un pour les parasites et l'autre pour les leucocytes.

6-2 Décompte des leucocytes mélanifères

6-2-1 Matériel

- Coton ;
- Alcool à 70°C ;
- May GrünWald ;
- Giemsa ;
- Lames porte-objet ;
- Pipettes (20cc, 100 cc, 200 cc) ;
- Fiche des résultats ;
- Solution tampon (pH=7) ;
- Bacs de coloration ;
- Microscope optique ;
- Huile à immersion.

Le prélèvement était fait sur sang veineux ou capillaire.

6-2- 2 Le frottis sanguin

La goutte de sang prélevée était placée à l'extrémité d'une lame porte-objet. Sans attendre, on plaçait le côté d'une autre lame au contact de la goutte de sang. Les deux lames formaient un angle de 45°. On attendait que le sang se répande le long de l'angle dièdre ainsi formé. On tirait ensuite la lame inclinée vers l'autre extrémité de la lame porte-objet. Elle entraînait derrière elle le sang qui s'étalait en couche mince. On attendait que la lame sèche pour procéder à la coloration.

6-2-3 Coloration du frottis

Elle se déroulait en 4 étapes:

- ◆ La fixation par le May GrünWald pendant 3 minutes ;
- ◆ La décoloration avec une solution tampon à pH 7 pendant 3 minutes ;
- ◆ La coloration par le Giemsa à 10% pendant 15 minutes ;

- ◆ Le rinçage avec la solution tampon pendant 3 minutes ;

6-2-4 Lecture

Elle a été faite au microscope optique au grossissement 100 en immersion.

La détermination du pourcentage des polynucléaires neutrophiles mélanifères était effectuée en comptant le nombre de polynucléaires neutrophiles ayant du pigment sur un total de 100 polynucléaires neutrophiles.

La détermination du pourcentage des monocytes mélanifères était effectuée en comptant le nombre de monocytes contenant du pigment sur un total de 30 monocytes.

6-3 L'hématocrite

6-3-1 Matériel

- Alcool à 70°C ;
- Coton ;
- Vaccinostyle stérile à usage unique ;
- Micro-tube à hématocrite ;
- Gants ;
- Centrifugeuse IEC ;
- Cire ;
- papier hygiénique.

6-3-2 Principe

L'hématocrite a été déterminée selon la micro-méthode.

Le sang capillaire prélevé en micro-tube à hématocrite était centrifugé pendant 5 minutes à 12000 tours par minute.

Le résultat exprimé en pourcentage était lu sur un abaque approprié.

6-4 L'électrophorèse de l'hémoglobine

6-4-1 Réactifs et matériels

- tampon tris EDTA borate (1 sachet dans un litre d'eau distillée) ou tampon Supre-heme ;
- plaque d'acétate de cellulose (Titan R III) ;
- réactif hémolysant ;
- cuves à électrophorèse Helena ;
- générateur de courant ;
- papier pour ponts électriques ;
- papier buvards ;
- applicateur ;
- plaque d'alignement ;
- pipette de 100 μ l ;
- acide acétique dilué à 5 % ;
- rouge ponceau ;
- méthanol ;
- clear aid (réactif clarifiant) ;
- solution saline à 9%
- témoin (hémoglobines A, F, S, C)
- eau distillée ;
- bacs plastiques ;
- râteliers.

6-4-2 Principe

Il consiste à faire migrer un hémolysat de GR sur une plaque d'acétate de cellulose. Les différents types d'hémoglobine migrent suivant leur poids moléculaire (PM) et leur charge électrique.

6-4-3 Mode opératoire

a) Préparation de la plaque d'acétate de cellulose

- Sur la face lisse de la plaque, la date et le numéro étaient marqués avec un marqueur indélébile (Helena) ;
- Le bac de migration était rempli avec le tampon supre-hème (S-H) ;
- On s'assurait que le nombre de plaques était suffisant pour les échantillons à traiter ;
- On déposait les plaques sur le râtelier puis on les plongeait doucement dans le bac afin qu'il n'y ait pas de bulles d'air ;
- On laissait les plaques dans le Supre-hème pendant au moins 30 minutes.

b) Préparation de la chambre de migration

- On mettait 100 ml de tampon Supre-hème dans chacun des deux compartiments de la cuve à migration ;
- On applique le papier buvard sur le bord intérieur des compartiments contenant le tampon pour former un pont sur le bord des compartiments vides.

c) Préparation de l'hémolysat

Lavage du GR

Il consistait à :

- ajouter un volume égal de solution saline à l'échantillon de sang total ;
- mélanger ensuite et procéder à la centrifugation à 3000 tr./mn pendant 15 mn ;
- verser ensuite le surnageant ;

- reprendre la même opération trois fois de suite.

Après la dernière centrifugation on éliminait tout le surnageant et on procédait à une hémolyse en faisant une dilution au 1/4 (un volume de culot de sang pour trois volumes de solution hémolysante).

d) Dépôt de l'hémolysat

On déposait 5 µl d'hémolysat sur une plaque de microtitration comportant un témoin AFSC.

On retirait la plaque d'acétate de cellulose du S-H, puis on absorbe l'excès de solution tampon entre deux papiers buvards.

On déposait la plaque sur le support (Helena) la partie lisse contre celui-ci.

On déposait l'hémolysat sur le côté rugueux de la plaque, à l'aide de l'applicateur.

On mettait la plaque d'acétate dans la cuve de migration la face rugueuse vers le bas.

On fermait la cuve de migration et on appliquait un courant continu de 350 volts pendant 25 minutes à l'aide du générateur (HELENA).

e) Coloration de la plaque

A la fin de la migration, la plaque était retirée de la cuve. Elle était placée sur râtelier et plongée dans la solution de rouge ponceau pendant trois minutes.

La plaque était rincée ensuite par trempages successifs dans trois bains d'acide acétique à 5%.

On procédait à la transparisation de la plaque dans la solution de Clear aid pendant 10 min

Enfin, on sèchait la plaque dans un four pendant 10 min à 50°C.

f) Résultats et interprétation

Les résultats qualitatifs étaient obtenus par lecture visuelle de la plaque dans le transparisant. Il faut noter que :

L'HbS migre à mi-distance entre HbA2 et HbA1 ;

Les HbD, G et P présentent la même migration électrophorétique que l'HbS par cette méthode ;

Les HbC et E migrent comme l'HbA2 ;

L'HbF migre entre HbS et HbA1

Les résultats quantitatifs en % étaient obtenus par densitométrie .

6-5 Dosage du taux d'hémoglobine

Il a été fait par un semi-automate, l'hémocue AB.

6-5-1 Principe

Il est basé sur la transformation de l'Hb en acide méthémoglobine dont l'absorption est mesurée aux longueurs d'ondes de 570 et 880 nm.

Une micro-cuvette sert de tube de prélèvement et contient les réactifs suivants : désoxycholate de sodium, nitrite de sodium, azide de sodium. Ce désoxycholate de sodium hémolyse les érythrocytes et libère l'Hb.

Le nitrite de sodium et l'Hb sont convertis en méthémoglobine, lequel réagit avec l'azide de sodium pour donner l'azide méthémoglobine. Cet équipement et réactif sont fournis par les Laboratoires Hemocue Inc (23263 Madero, Mission Viejo, CA 92691 Phone: 714-859-2630).

6-5-2 Mode opératoire

- L'hémocue était allumée en ramenant l'interrupteur en position «on»
- On tirait le porte cuvette en position d'insertion et attendait le déclic d'arrêt qu'on ne dépassait pas.
- On attendait l'affichage READY dans la fenêtre de lecture.
- L'hémocue était ensuite testé avec une cuvette contrôle.
- On notait le résultat affiché et on vérifiait qu'il ne différait pas significativement du résultat attendu sur la notice d'accompagnement.
- Pour l'analyse des échantillons on procédait de la manière suivante :

- remplissage de la cuvette de mesure en un seul temps ;
- présentation de la cuvette sur le porte cuvette ;
- introduction de la cuvette dans la chambre de lecture ;
- enregistrement des résultats directement sur l'écran de lecture de l'hémocue.

7- Contrôle de qualité :

Il a été effectué sur tous les paramètres mesurés:

la parasitémie a été vérifiée par un parasitologue qualifié qui a relu 10% des GE effectuées chez les sujets étudiés ; les dosages de l'hémoglobine ont été effectués à l'aide d'un semi-automate avec vérification des performances optiques de l'appareil au début des dosages et après tous les dix dosages en série ; la recherche de PN et de monocytes pigmentés a été refaite par un lecteur expérimenté indépendant sur 10% des frottis de sang de chacun des trois groupes d'étude (PG, PS, BS)

8-Exploitation des données

Les données ont été saisies sur Excel puis transférées sur Dbase. L'analyse des données a été faite par nous même avec le logiciel Epi-info (6,0). Les tests utilisés ont été :

- Le test Khi 2 corrigé de Yates pour la comparaison de certains paramètres.
- Le test de Fisher exact
- L'odds ratio

Le degré de signification des tests a été fixé à un seuil de probabilité $p \leq 0,05$

RESULTATS

Durant la période de recrutement 77 cas de PG ont été diagnostiqués. Ces 77 cas ont été appariés à 77 cas de PS et à 77 témoins non impaludés (BS). Mais pour des raisons techniques (frottis pour la recherche des leucocytes mélanifères inexploitable) nous avons retiré 7 cas. Notre étude a finalement portée sur 70 cas de PG appariés à 70 PS et 70 BS.

L'appariement a été fait en fonction de l'âge et de la résidence.

1-Résultats globaux

Tableau I : description des cas de paludisme grave dans notre population d'étude à Bandiagara de Juillet à Décembre 2000

Type de paludisme grave	Isolée		Associée		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Formes neurologiques	13	40,63	19	59,37	32	45,71
Hyper parasitémie	29	90,62	3	9,38	32	45,71
Anémie sévère	0	0	4	100	4	5,71
Autres*	2	100	0	0	2	2,86
TOTAL	44	62,86	26	37,14	70	100

* : la rubrique ' Autre ' regroupe un cas de détresse respiratoire et un cas d'hématurie.

L'observation de ce tableau montre qu'il y avait autant de formes neurologiques que de formes d'hyper parasitémie dans notre échantillon.

Tableau II : distribution de la population étudiée de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara selon le sexe et par groupe

Groupe	MASCULIN		FEMININ		TOTAL
	N	%	N	%	
BS	38	54,26	32	45,71	70
PS	38	54,26	32	45,71	70
PG	38	54,26	32	45,71	70
TOTAL	114	54,26	96	45,71	210

L'analyse de ce tableau montre que les groupes étaient comparables en fonction du sexe.

Tableau III : distribution de la population d'étude de Juillet à Décembre à Bandiagara par tranche d'âge et par groupe.

Groupe	0-5 ans		6-10 ans		TOTAL
	N	%	N	%	
BS	62	88,57	8	11,43	70
PS	62	88,57	8	11,43	70
PG	62	88,57	8	11,43	70
TOTAL	186	88,57	24	11,43	210

La tranche d'âge de 0-5 ans était majoritairement représentée dans les trois groupes d'étude, mais on ne notait pas de différence entre les 3 groupes à l'intérieur des classes d'âge .

Tableau IV : distribution de la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara selon l'ethnie et par groupe

ETHNIE	GROUPE			TOTAL
	BS	PS	PG	
Dogon	54	56	57	167
Bambara	2	3	3	8
Peulh	0	8	2	10
soninké	6	1	1	8
Sonhrai	1	0	5	6
Malinké	1	0	0	1
Mossi	0	0	1	1
Minyanka	2	0	1	3
Toucouleur	1	1	0	2
Samogo	0	1	0	1
indéterminée	3	0	0	3
Total	70	70	70	210

L'ethnie Dogon était majoritaire dans les trois groupes d'étude. Mais les trois groupes étaient aussi comparables quand à la distribution ethnique.

Tableau V: distribution de la population d'étude selon le type d'hémoglobine dans les trois groupes de Juillet à Décembre.

Groupe	AA		AC		AF		AS		TOTAL
	N	%	N	%	N	%	N	%	
BS	55	83,33	4	6,06	1	1,16	6	9,09	66
PS	57	82,60	9	13,04	0	0	3	4,35	69
PG	63	91,30	3	4,35	1	1,45	2	2,90	69
TOTAL	175	85,79	16	7,84	2	0,98	11	5,39	204

PG/PS OR= 0,45 (IC 95% 0,14 -1,41)

PG/BS OR= 0,48 (IC 95% 0,15 -1,51)

Ce tableau nous renseigne sur les fréquences des différents phénotypes hémoglobiniques rencontrés ; ainsi nous trouvons 85,79% de sujets AA, 7,84% de sujets AC et 5,39% de sujets AS. On ne retrouvait pas plus d'hémoglobines anormales chez les sujets souffrant de paludisme grave.

L'hémoglobine n'avait pas été typée chez 6 de nos sujets d'études (4 dans le groupe BS, 1 dans le groupe PS et 1 dans le groupe PG).

Tableau VI: Prévalence de l'anémie dans les groupes d'études à l'inclusion de Juillet à Décembre

Groupe	Anémie (+)		Anémie (-)		TOTAL
	N	%	N	%	
BS	61	87,12	9	12,58	70
PS	62	88,57	8	11,43	70
PG	66	94,29	4	5,71	70
Total	189	90	21	10	210

PG/PS OR= 2,13 [IC 95% (0,67 - 7,13); p=0,36]

PG/BS OR= 2,34 [(IC 95%(0,71 - 8,31) ; p= 0,24]

Ce tableau montre que l'anémie définie par un taux d'hémoglobine <12 g/dl était beaucoup plus fréquemment observée dans le groupe des sujets avec paludisme grave que dans les autres groupes. Mais cette différence n'était pas significative

Tableau VII : prévalence de la fièvre dans les groupes à l'inclusion de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Groupe	Fièvre (+)		Fièvre (-)		TOTAL
	N	%	N	%	
<i>BS</i>	0	0	70	100	70
<i>PS</i>	69	98,57	1	1,43	70
<i>PG</i>	69	98,57	1	1,43	70
Total	138	65,71	72	34,29	210

Il ressort de ce tableau que dans le groupe des sujets en bonne santé, aucun cas de fièvre n'a été observé. Mais la fièvre était aussi prévalente en cas de paludisme simple qu'en cas de paludisme grave ($\chi^2=195,89$ et $p=10^{-7}$).

Tableau VIII : prévalence du pigment dans les polynucléaires neutrophiles dans les trois groupes d'étude de Juillet à Décembre

Groupe	Pigment (+)		Pigment (-)		TOTAL
	N	%	N	%	
<i>BS</i>	1	1,43	69	98,57	70
<i>PS</i>	19	27,14	51	72,86	70
<i>PG</i>	56	80	14	20	70
Total	134	36,19	134	63,81	210

PG/PS OR= 10,74 [IC 95%(4,88- 23,60) ; $p=10^{-7}$]

PG/BS OR= 276 [IC 95% 35,21 -2163,73); $p=10^{-7}$]

L'analyse de ce tableau permet de conclure que la présence de polynucléaires neutrophiles était fonction de la gravité du paludisme . Plus le paludisme était grave plus le taux de positivité de la recherche de PN pigmenté était élevé

Tableau IX: prévalence du pigment dans les monocytes dans les trois groupes de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Groupe	Pigment (+)		Pigment (-)		TOTAL
	N	%	N	%	
BS	3	4,28	67	95,71	70
PS	39	55,71	31	44,29	70
PG	57	81,21	13	18,57	70
TOTAL	99	47,14	111	52,86	210

PG/PS OR= 3,49 [IC 95%(1,62- 7,49); p= 0,002]

PG/BS OR= 97,92 [IC 95% (26,58 - 360,80); p=10⁻⁷]

L'observation de ce tableau permet de constater que la présence du pigment malarique dans les monocytes était fonction de la gravité du paludisme. Plus le paludisme était grave plus on avait la chance de trouver du pigment malarique dans les monocytes des sujets étudiés.

2- Résultats analytiques

Tableau X : association entre la présence de PN pigmentés dans le sang et l'anémie dans notre échantillon de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Anémie	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
Anémie +	73	96,05	116	86,57	189
Anémie -	3	3,95	18	13,43	21
Total	76	36,19	134	63,81	210

A la lecture de ce tableau, nous pouvons conclure qu'il existait une association de cause à effet entre la présence du pigment malarique dans les polynucléaires neutrophiles et la survenue de l'anémie. Ainsi 96,05% des sujets ayant le pigment dans les polynucléaires neutrophiles étaient anémiés contre 86,57% des sujets qui n'en avaient pas. La différence était statistiquement significative ($Khi^2=3,85$ et $p=0,049$).

Tableau XI: association entre la présence de PN pigmenté dans le sang et la fièvre dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Fièvre	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	70	97,37	2	2,63	72
NON	64	47,76	74	52,24	138
Total	134	63,81	76	36,19	210

Ce tableau permet de faire le commentaire suivant :

La présence de pigment malarique dans les polynucléaires neutrophiles semble être un facteur important dans la survenue de la fièvre ; cette association est statistiquement significative. ($Khi^2=50,79$ et $p=10^{-7}$).

Tableau XII : association entre pigment dans le PN et les formes neurologiques isolées dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

neuropaludisme isolée	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	9	62,23	4	30,77	13
NON	47	82,47	10	17,54	57
Total	56	8	14	20	70

Environ soixante pour cent de nos sujets ayant le pigment dans le PN avaient fait un paludisme neurologique simple contre quatre vingt deux pour cent n'ayant pas le pigment dans le PN (*p unilatéral de Fisher =0,24*).

Tableau XIII : association entre pigment dans le PN et les formes neurologiques associées dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000

Neuropaludisme Associée	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	18	94,74	1	5,26	19
NON	38	74,51	13	25,49	51
Total	56	80	14	20	70

Le pigment malarique était présent dans le PN chez 94,74% de nos sujets faisant le neuropaludisme associé à d'autres signes de gravité du paludisme (*p unilatéral de Fisher =0,05*).

Tableau XIV: association entre pigment dans le PN et hyper parasitémie isolée dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000

Hyper parasitémie isolée	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	20	68,97	9	31,03	29
NON	36	87,80	5	12,19	41
Total	56	80	14	20	70

Ce tableau ne montre pas d'association statistique significative quand à la présence du pigment malarique et la charge parasitaire . ($p=0,10$).

Tableau XV : association entre pigment dans le PN et hyper parasitémie associée dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Hyper parasitémie Associée	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	3	100	0	0	3
NON	53	79,10	14	20,90	67
Total	56	80	14	20	70

Tous nos sujets faisant une hyper parasitémie associée à un autre signe de gravité du paludisme autre que les formes neurologiques ou hématologiques avaient le pigment dans le PN (p unilatéral de Fisher= 0,50) .

Tableau XVI: association entre pigment malarique dans le PN et anémie grave dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Anémie grave	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	13	100	0	0	13
NON	43	75,44	14	24,56	57
Total	56	80	14	20	70

Lorsqu'on s'intéresse à la distribution des cas d'anémie grave selon la présence ou pas de pigment malarique dans le PN, on constate que tous les sujets ayant une anémie grave présentaient du pigment malarique dans le PN (*p unilatéral de Fisher=0,039*).

Tableau XVII : association entre la présence de pigment dans les monocytes et anémie dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Anémie	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
Anémie +	96	96,97	93	83,78	189
Anémie -	3	3,03	18	16,22	21
Total	99	47,14	111	52,86	210

Il apparaît sur ce tableau que 96,97 % des sujets ayant le pigment dans les monocytes étaient anémiés contre 83,78% des sujets n'ayant pas de monocytes pigmentés circulants (*Khi 2 =8,70 et p= 0,003*).

Tableau XVIII: association entre la présence du pigment dans les monocytes et la fièvre dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Fièvre	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	95	95,96	43	38,74	138
NON	4	4,04	68	61,26	72
Total	99	47,14	111	52,86	210

Ce tableau laisse apparaître que la quasi-totalité des sujets ayant le pigment dans les monocytes avaient de la fièvre. Parmi les sujets chez qui on n'avait pas trouvé de monocytes pigmentés circulants seulement 38,74% avaient de la fièvre. Cette différence était statistiquement significative ($\chi^2 = 73,53$ et $p = 10^{-7}$).

Tableau XIX: association entre la présence de pigment dans le monocyte et les formes neurologiques isolées dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Neuropaludisme	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	10	79,92	3	23,08	13
NON	47	82,46	10	17,54	57
Total	57	81,43	13	18,57	70

Soixante dix neuf pour cent de nos sujets ayant le pigment dans les monocytes avaient fait un neuropaludisme isolé contre quatre vingt deux pour cent des sujets n'ayant pas le pigment dans les monocytes (p unilatéral de Fisher = 0,45).

TableauXX : association entre la présence de pigment dans le monocyte et les formes neurologiques associées dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Neuropaludisme Associée	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	18	94,74	1	5,26	19
NON	39	76,47	12	23,53	51
Total	57	81,43	13	18,57	70

Environ 95% de nos sujets faisant le neuropaludisme associé à d'autres formes compliquées avaient le pigment dans les monocytes (*p unilatéral de Fisher= 0,07*) .

Tableau XXI: association entre la présence de pigment malarique dans les monocytes et l'hyper parasitémie isolée dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Hyper parasitémie Isolée	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	21	72,41	8	27,59	29
NON	36	87,80	5	12,20	41
Total	56	81,43	14	18,57	70

Ce tableau ne montre pas d'association statistiquement significative entre la présence du pigment malarique et l'hyper parasitémie (*p =0,19*).

Tableau XXII : association entre la présence de pigment malarique dans les monocytes et l'hyper parasitémie associée dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Hyper parasitémie Associée	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	2	66,67	1	33,33	29
NON	55	82,09	12	17,91	41
Total	57	81,43	13	18,57	70

Ce tableau ne montre pas d'association statistiquement significative entre la présence du pigment malarique et l'hyper parasitémie associée à autres formes compliquées ($p = 0,46$).

Tableau XXIII: association entre pigment malarique dans les monocytes et anémie grave dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000

Anémie grave	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
OUI	12	92,31	1	7,69	13
NON	45	95,74	12	4,26	47
Total	57	81,43	13	18,57	70

Lorsqu'on s'intéresse à la présence du pigment dans le monocyte chez les cas d'anémie grave, on constate que 92,31% de nos sujets présentant une anémie grave avaient du pigment malarique dans les monocytes (p unilatéral de Fisher = 0,21).

Tableau XXIV : les types de cellules mélanifères retrouvés selon les groupes d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Type de cellules	PS		BS		PG	
	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Non
PN pigmenté	19	51	1	69	56	14
Monocyte pigmenté	39	31	3	67	57	13
Signification Statistique	Chi2=11,77 p=0,0006		p Fisher=0,31		Chi2=0,05 p=0,83	

Le pigment malarique était plus fréquemment rencontré dans le monocyte que dans le PN lors du paludisme simple et cette différence était statistiquement significative.

Tableau XXV : étude des associations entre PN et Monocytes pigmentés dans les différentes formes cliniques de paludisme dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Cellule pigmentée	Paludisme grave	Paludisme simple	Bonne santé
PN+Mo+	49	14	1
PN+Mo-	7	5	0
PN-MO+	8	25	2
PN-Mo-	6	26	67

Il ressort de ce tableau les observations suivantes :

- PN+Mo+ vs. PN- Mo- on a : χ^2 corrigé de Yates =2,96 et $p=10^{-6}$
- PN+Mo- vs. PN-Mo- on a un p unilatéral=0,015
- PN-Mo+ vs. PN-Mo- on a χ^2 corrigé de Yates =0,06 $p= 0,81$

Cela signifierait que la présence de pigment dans les PN est bien plus souvent associée aux formes graves de paludisme que celle des monocytes pigmentés.

Tableau XXVI : relation entre l'évolution du malade et la présence du pigment dans le PN dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000 à Bandiagara

Issu	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
Décès	4	80	1	20	5
Guérison	52	80	13	20	65
Total	56	81,43	14	18,57	70

Nous remarquons dans ce tableau que 80 % de nos sujets décédés avaient du pigment dans le PN. Cette différence n'était pas statistiquement significative ($p= 0,74$).

Tableau XXVII : relation entre l'évolution du malade et la présence du pigment dans le monocyte dans la population d'étude de Juillet à Décembre 2000

Issu	Pigments				Total
	OUI		NON		
	N	%	N	%	
Décès	5	100	0	0	5
Guérison	52	80	13	20	65
Total	57	81,43	14	18,57	70

Nous remarquons dans ce tableau que 80 % de nos sujets décédés avaient du pigment dans le monocyte. Mais cette différence n'était pas statistiquement significative ($p= 0,34$).

1-Questions méthodologiques

Cette étude s'intègre dans le cadre des travaux conduits dans la ville de Bandiagara depuis 1997 par le Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie visant à mieux comprendre la physiopathologie du paludisme grave.

Nous avons espéré répondre à la question scientifique posée par une étude cas-témoins qui a l'avantage de minimiser le poids des facteurs confondants non pris en compte par les paramètres d'exploration prévus. Toutefois, les effectifs étudiés au cours de cette étude sont encore faibles pour porter un jugement formel sur certains résultats des études d'association. C'est pourquoi nous voudrions considérer les résultats présentés ici comme des résultats préliminaires.

Nonobstant les limites liées à la faible taille de l'échantillon étudié, cette étude a le mérite d'avoir intégré une procédure de contrôle de qualité qui a concerné tous les paramètres mesurés : la parasitémie a été vérifiée par un parasitologue qualifié qui a relu 10% des GE effectuées chez les sujets étudiés ; les dosages de l'hémoglobine ont été effectués à l'aide d'un semi-automate avec vérification des performances optiques de l'appareil au début des dosages et après tous les dix dosages en série ; la recherche de PN et de monocytes pigmentées a été refaite par un lecteur expérimenté indépendant sur 10% des frottis de sang de chacun des trois groupes d'étude (PG, PS, BS). Le recours au frottis mince pour la recherche de cellules chargées en pigment malarique minimise les erreurs d'appréciation liées au recours à la goutte épaisse.

2- Caractéristiques des sujets étudiés

La distribution de la population étudiée selon l'âge, le sexe ou l'ethnie confirme les résultats des travaux antérieurs effectués dans le même site : l'ethnie qui prédomine est l'ethnie Dogon, la tranche d'âge la plus concernée par les formes graves de paludisme est celle de 0 à 5 ans (9). Cette plus grande fréquence du paludisme grave dans cette

tranche d'âge est souvent rattachée à une insuffisance de prémunition contre le paludisme (10,11).

3-La distribution des cas de paludisme grave dans la population étudiée

L'étude de la distribution des cas de paludisme grave permet de constater une prédominance des formes neurologiques et hyperparasitémiqes qui représentent 45,71%. Elles sont suivies par les formes anémiques (5,71%). Ce profil de distribution des cas de paludisme grave dans ce site d'étude est celle qui a été rapportée classiquement dans les zones d'endémie palustre (12).

4- Signification des résultats de recherche de cellules pigmentées

Notre étude permet de constater que la présence de PN et/ou de monocytes chargés de pigment malarique dans le sang périphérique est très fréquente au cours du paludisme puisque ces cellules sont retrouvées chez au moins 80% des sujets souffrant de paludisme grave et chez au moins 25% des malades souffrant de paludisme simple.

La présence de PN pigmentés dans le sang est d'autant plus fréquente que le paludisme est grave. L'étude des associations avec les différentes formes de paludisme grave montre que la présence des PN pigmentés dans le sang est significativement associée aux formes neurologiques, à la présence de fièvre ou d'une anémie grave. Mais on ne note pas d'association significative avec les hyperparasitémies chez le malade impaludé. Certains auteurs ont trouvé une association significative entre l'observation de PN pigmentés circulants et les formes neurologiques de paludisme en général (13). L'absence d'association significative entre la présence de PN pigmentés dans le sang périphérique et les formes neurologiques isolées dans notre étude pourrait s'expliquer par le faible effectif des cas dans notre échantillon de malades. La présence de PN pigmentés dans le sang périphérique apparaît donc comme un facteur prédictif de gravité de la maladie (8,13). L'observation du pigment malarique dans les PN des sujets en bonne santé, pose le problème de la sensibilité de la goutte épaisse dans la détection des parasitémies faibles sans expression clinique et permet de discuter l'intérêt de la recherche du pigment malarique comme marqueur permettant de dater l'histoire d'une infection palustre. Lorsqu'on tient compte en effet de la courte durée

de vie du PN dans la circulation sanguine, la découverte de PN mélanifères circulants chez un sujet sans symptomatologie fait discuter à priori, deux hypothèses explicatives : soit qu'il existe une parasitémie faible mais insuffisante pour déclencher une symptomatologie clinique ; soit que le sujet est guéri d'un paludisme très récent. Ces deux situations sont des situations au cours desquelles, la parasitémie peut paraître négative par la technique de la goutte épaisse. L'absence d'association significative entre l'existence de PN pigmentés circulants et la parasitémie chez nos malades s'expliquerait alors par une moins bonne sensibilité de la goutte épaisse et autoriserait à penser que le taux de PN mélanifères permet de mieux évaluer la biomasse parasitaire que la parasitémie appréciée par la technique de la goutte épaisse classique. L'absence d'association significative avec l'hyperparasitémie pourrait s'expliquer aussi par le faible effectif de l'échantillon analysé dans le cadre de cette étude.

Comme les PN mélanifères, les monocytes chargés de pigment malarique sont d'autant plus fréquemment retrouvés dans le sang périphérique que la forme de paludisme est grave. On ne note pas de différence de prévalence en cas de paludisme grave ou pour les témoins en bonne santé, mais on constate des proportions de monocytes chargés de pigment malarique significativement plus élevées par comparaison avec les proportions de PN pigmentés en cas de paludisme simple. Cette observation qui mérite d'être confirmée, autorise à penser que, plus que le monocyte mélanifère, le PN mélanifère est un marqueur plus fidèle pour apprécier la gravité du paludisme (8). Cette conclusion est confortée dans cette étude, par les résultats des études d'association entre PN et monocytes pigmentés selon les formes cliniques du paludisme (tableau XXV). On peut penser en outre que la recherche de PN pigmentés permettrait un diagnostic plus précoce de l'infection palustre. L'explication du phénomène n'est pas simple. Il semble que la seule différence de durée de vie entre le PN et le monocyte ou le fait que le monocyte intervient en première ligne dans le processus de phagocytose des agents étrangers à l'organisme n'est pas suffisante pour le comprendre (14-16). Des cytokines particulières à activité ciblée sur le monocyte pourraient intervenir au cours du paludisme simple chez le sujet semi-immun.

Contrairement à certains auteurs, nous n'avons pas trouvé d'association positive significative entre la présence de pigment dans les PN ou les monocytes et l'évolution fatale de la maladie palustre (7). Notre résultat pourrait s'expliquer par la faible taille de notre échantillon de malades. Mais, Lyke et al., travaillant sur un échantillon de 77 cas dans la même population ont trouvé une association positive entre l'évolution fatale des cas graves et le taux moyen des PN pigmentés (17). On peut donc penser que plus que la présence des PN pigmentés dans le sang, leur quantité qui reflète mieux la masse de polynucléaires neutrophiles et donc, de pigment malarique de l'organisme est le meilleur paramètre qui corrélait avec le pronostic des formes graves de paludisme. D'où l'intérêt de préférer la détermination de la valeur absolue des PN à la seule détermination de leur pourcentage chez l'individu impaludé.

1 Conclusion

Cette étude qui s'est intéressée à l'association entre la présence de leucocytes mélanifères circulants et le paludisme grave chez des enfants et des adultes jeunes d'une zone d'endémie palustre malienne nous a permis de faire les observations suivantes :

- la recherche de pigment malarique est fréquemment positive chez ces sujets ;
- la présence de leucocytes mélanifères est significativement associée à la gravité du paludisme ;
- si la présence de leucocytes mélanifères est significativement associée à l'existence d'un neuropaludisme, d'une fièvre ou d'une anémie grave, elle ne semble pas l'être avec l'existence d'une hyperparasitémie ;
- alors qu'on a les mêmes chances d'observer des monocytes pigmentés que des PN pigmentés circulants chez le sujet apparemment indemne de paludisme ou souffrant d'un paludisme grave, les monocytes pigmentés circulants sont significativement plus fréquemment observés que les PN pigmentés en cas de paludisme simple.

L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que la recherche de pigment malarique dans les PN et les monocytes dans le sang périphérique est un outil à la fois de diagnostic et d'appréciation du pronostic du paludisme maladie et que la découverte de PN mélanifères circulants peut être un marqueur biologique d'infection palustre plus sensible que la parasitémie appréciée par la technique de la goutte épaisse.

2- Recommandations

Notre travail est une étude réalisée à Bandiagara. Elle a été conduite durant une saison de forte transmission palustre. Elle a consisté à un décompte des leucocytes mélanifères dans des étalements sanguins de trois groupes d'enfants et d'adultes jeunes. Le premier groupe formé par 70 enfants souffrant d'un paludisme grave a été comparé à un groupe de 70 enfants souffrant de paludisme simple et à un autre de 70 enfants en bonne santé apparente sans parasitémie à *Plasmodium falciparum*.

A la lumière de ce travail nous formulons les recommandations:

1) Aux responsables du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) au Mali

- Former les techniciens de laboratoire à la recherche des leucocytes mélanifères ;
- Prendre en compte la recherche du pigment malarique dans les leucocytes dans l'élaboration des modules de formation pour la prise en charge des cas de paludisme.

2) Aux chercheurs du domaine de la paludologie au Mali

- Mesurer les valeurs seuils des PN mélanifères régulièrement corrélées à l'existence d'une infection palustre et à l'issue fatale du malade impaludé ;
- Décrire par d'autres études, les valeurs pronostiques du taux des PN mélanifères exprimé en pourcentage et en valeur absolue dans le sang;

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Jacquemin P, Jacquemin J L. Abrégé de parasitologie clinique. 3^{ème} éd. Masson; 1987:273.
- 2- O.M.S. Pratique de la chimiothérapie du paludisme. Rapport d'un groupe scientifique. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1994;88:475-83.
- 3- Haïdara M. Paludisme et grossesse dans le service de Gynéco-obstétrique de l'hôpital Gabriel Touré. Thèse de doctorat en Médecine, Bamako, 2000 N°15.
- 4- Dembélé G. " Place du paludisme dans les hospitalisations pédiatriques de Hôpital Gabriel Touré de Bamako Durant 12 mois. Thèse de doctorat en médecine, Bamako, 1991 N°25.
- 5- Gentillini M. Le paludisme. In Médecine tropicale. 5^{ème} éd. Paris: Flammarion; 1993:928.
- 6- Susan E F, David J S, Jr., and Daniel E G. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium Falciparum*. *Annu Rev Microbiology* 1997 ; 51 :97-123
- 7- PHu NH, Day N, Diep TT, Ferguson DJP, White NJ. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 200-4.
- 8- Amodu OK, Adeyemo AA, Olumese PE, Gbadegesinr A. Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria children. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1998;92(1): 54-6.
- 9- Coulibaly Seydou M. Relations entre l'anémie et le paludisme dans une zone d'endémie palustre (Bandiagara). Thèse de Pharmacie Bamako 2001 N°11.
- 10- Bloland Peter B, Eve Lackritz, Peter N Kazembe, Joad B O, Were Richard Steketee and Carlos C Cambell. Beyond chloroquine: Impactious of drug resistance for evaluating malaria therapy efficacy and treatment policy in Africa. *The journal of infectious diseases* 1993; 3167:923-7.

- 11-Dicko Alassane. Epidémiologie du paludisme dans la région de Mopti en vue de l'élaboration d'un programme régional de lutte. Thèse de Médecine Bamako 1992 N° 12.
- 12-Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002;415:673-9.
- 13-Metzger WG, Mordmuller BG, Kremsner PG. Malaria pigment in leucocytes. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1995; 89 (6): 637-638
- 14-Zittoum R, Bernandou A, Samama M. Généralité sur les éléments figurés du sang. In Manuel d'hématologie 1^{ère} éd. Paris: Doin; 1992:1-21.
- 15-Zittoum R, Samama M, Marie JP. Les éléments cellulaires du sang. In Manuel d'hématologie. 1^{ère} éd. Paris : Doin; 1992:1-21.
- 16-Germain D, Gentilhomme O, Bryon PA. Monocytes et macrophages. Physiologie humaine: cellules sanguines et organes hématopoïétiques. 1^{ère} éd. Bruxelles: Simep s.a.; 1981 :171-175.
- 17- Lyke KE, Coulibaly S, Diallo DA, Koné A, Coulibaly D, Guindo A, Cissoko Y, Sangaré L, Dicko A, Sehdev PS, Thera MA, Taylor TE, Doumbo OK, Plowe CV. Association of intraleukocytic *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity and prognosis in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg (suppl.)*, 2001; 65 (3): 402

FICHE D'ENQUETE : PIGMENT MALARIQUE INTRALEUCOCYTAIRE ET SEVERITE CLINIQUE DU PALUDISME

Paramètres Socio-Démographiques

Q3 : Nom =

Q4 : Prénom =

Q5 : Sexe = /__/

1- Homme

2- Femme

Q6 : Age = /__/_/

Q7 : Ethnie = /__/_/

1= Bambara 2= Malinké 3= Sarakolé 4=Peuhl 5=Sonrhaï

6=Bobo 7=Dogon 8=Sénoufo 9=Minyanka 10=Autres

Q8 : Niveau d'instruction = /__/_/

1= illettré 2= 1^{er} cycle 3= 2^{ème} cycle 4 =Autres

Q9 : Lieu d'instruction = /__/_/

1= école coranique 2= école moderne 3= medersa 4= alphabétisation fonctionnelle

5=Autres

Q10 : Profession =

1= élève ou étudiant 2= ménagère 3= Ouvriers (à préciser)

4= cultivateur 5= éleveur 6= commerçant 7-Autres

Q11 : Statut matrimonial = /__/_/

1= marié(e) 2= célibataire 3= veuf (e) 4= divorcée

Q12-Formes de paludisme /---/

1 paludisme grave

2-Paludisme simple

3-Bonne santé

Mesures techniques de prévention (individuelle ou collective)

Q13 : Utilisation de moustiquaire = /___/

1= Oui 2=Non

Q14 :Prise d'antipaludique pour la prévention = /___/

1= Oui 2= Non(aller à Q16)

Si oui

Q15 :

Lequel =.....
.....
.....

Q16 :a quel dose =.....

Q17-Issue /----/

1-Guéri

2-Décédé

3-Séquelles

Paramètres Biologiques

Hémogramme

Q18: Hb (g/dl) = /_/_/_/

Q19 : Ht (%) =/_/_/_/

Electrophorèse de l'hémoglobine :

Q20 : Type d 'Hb = /_/_/

1= AA 2=AF 3 =AS 4 =AC 5 =SS 6=SC

7=CC 8 =Autres

Dosages des fractions :

Q21:A=/---/---/---/-%

Q22 : C=/---/---/---/-%

Q23 :F=/---/---/---/-%

Q24:S=/---/---/---/-%

Q25 :Goutte épaisse = /_/_/

1= positive 2 =négative

Q 26 : Densité parasitaire /mm³ :

Q27a : J0=/_/_/_/_/_/_/_/_/_/

Q28b : J3= /_/_/_/_/_/_/_/_/_/

Q29c : J7= /_/_/_/_/_/_/_/_/_/

Q30d : J14= /_/_/_/_/_/_/_/_/_/

Q31 :Espèce plasmodiale = /___/

1=*Plasmodium falciparum*

2=*Plasmodium ovalae*

3=*Plasmodium malariae*

4=*Plasmodium vivax*

Q32 :Parasitémie : nombre de trophozoïtes par mm³ = /___/___/___/___/___/___/___/

Q33 : Présence de pigments mélanifères = /___/

1= Oui

2= Non

Q34 :Polynucléaires neutrophiles mélanifères sur 100 PN= /___/___/___/

Q35: Monocytes mélanifères sur 30 monocytes= /___/___/

Paramètres cliniques :

Signes cliniques observés :

1=Oui

2=Non

Q36 :fièvre : /---/

Q39 : vomissements= /-----/

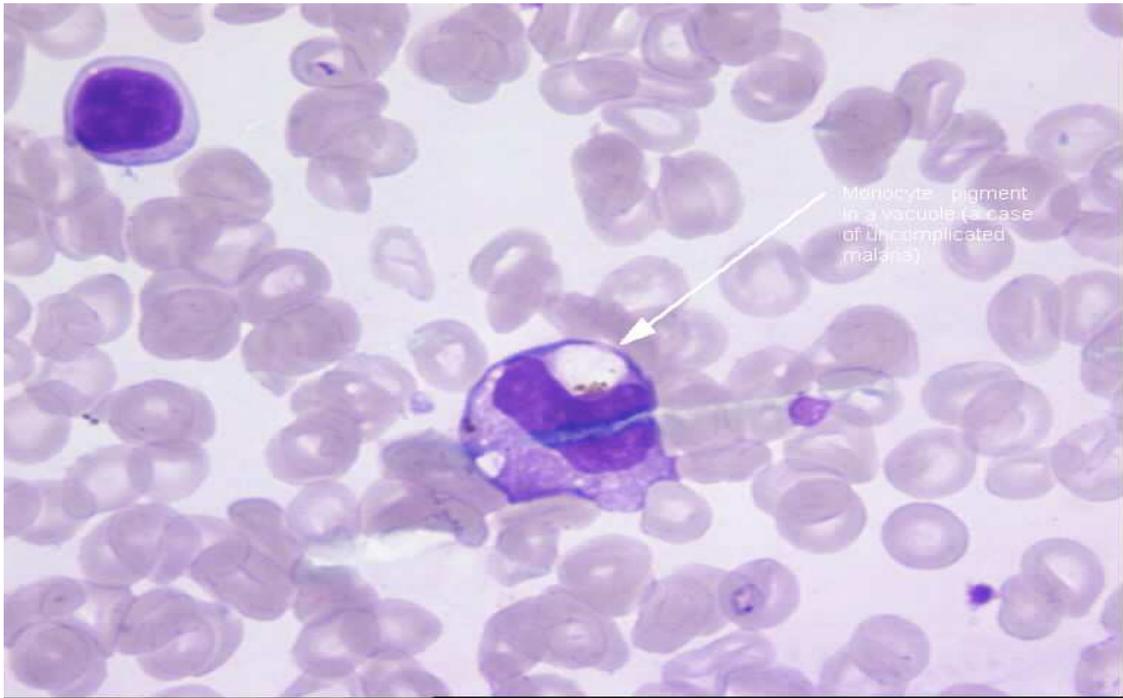
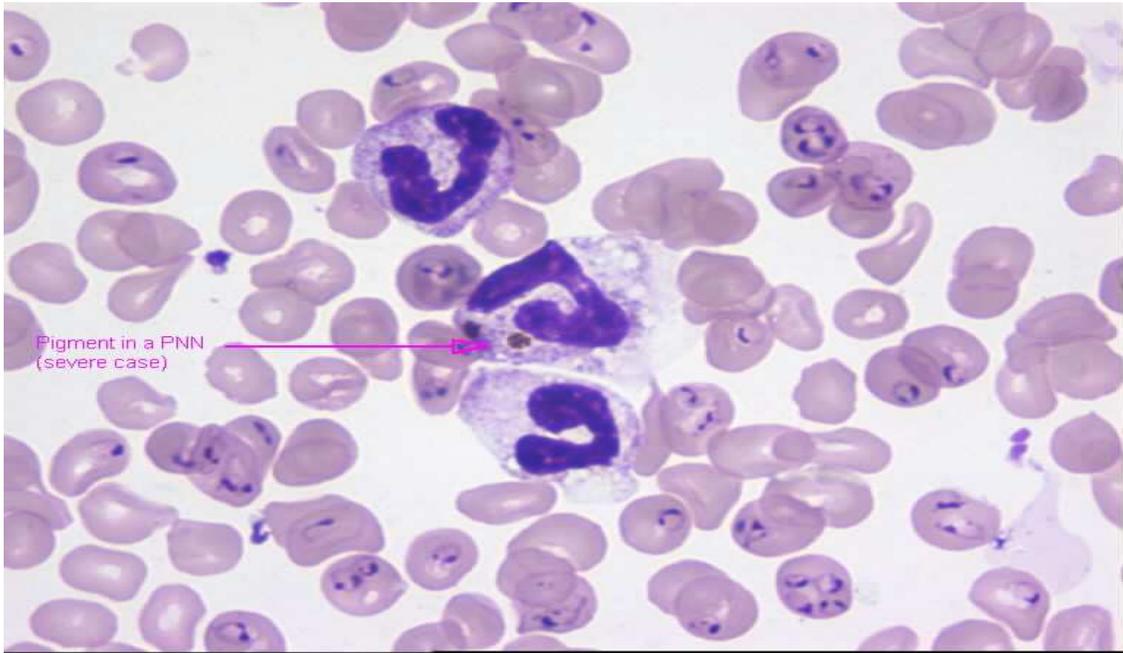
Q37 :céphalées = /----/

Q40 : Convulsion= /-----/

Q38 :vertiges= /-----/

Q41 : asthénie = /-----/

OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES DE LEUCOCYTES
MELANIFERES



FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : DEMBELE

Prénom : MOKO N'TAFE

Titre : Paludisme grave et pigment malarique chez des sujets de 0 à 20 ans à Bandiagara, Mali

Année de soutenance : 2002

Ville de soutenance : Bamako

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

Secteur d'intérêt : Hématologie, Parasitologie, Epidémiologie

RESUME

Notre étude avait pour objectif d'étudier l'association entre les formes graves de paludisme et la présence de leucocytes mélanifères circulants chez des sujets semi-immuns.

Cette étude conduite dans la ville de Bandiagara où la transmission du paludisme est saisonnière, a concerné des sujets volontaires âgés de 0 à 20 ans durant la période de forte transmission du paludisme de l'an 2000.

Il s'est agi d'une étude cas-témoins appariés (1 : 2) selon l'âge et le lieu de résidence. Les cas étaient les formes de paludisme grave, les témoins étaient des sujets apparemment indemnes de paludisme ou souffrant d'un paludisme simple. Le diagnostic de l'infection palustre procédait de la lecture de la goutte épaisse, la recherche du pigment malarique a été faite dans les PN et les monocytes sur des frottis minces de sang capillaire colorés par la technique de May-Grünwald-Giemsa.

Soixante-dix cas de paludisme grave parmi lesquels prédominent les formes neurologiques et hyperparasitémiqes ont été étudiés. Au moins 80% de ces cas étaient associés à la présence de leucocytes mélanifères dans le sang périphérique. Par comparaison avec les témoins, nous avons pu observer que la recherche de leucocytes mélanifères circulants était d'autant plus fréquemment positive que le paludisme était grave.

La présence de leucocytes mélanifères dans le sang était significativement associée aux formes neurologiques, à la présence d'une fièvre ou d'une anémie grave chez le malade. Mais elle n'était pas associée à l'existence d'une hyperparasitémie.

La comparaison des prévalences du pigment malarique dans les PN et les monocytes selon les formes cliniques de paludisme permettait d'observer que les monocytes pigmentés étaient significativement plus prévalent en cas de paludisme simple.

Nous concluons que la découverte de pigment malarique dans les PN et les monocytes circulants chez un sujet impaludé pourrait être prédictive de la gravité de la maladie et que le taux des PN mélanifères dans le sang est un bien meilleur marqueur biologique d'infection palustre chez le sujet semi-immun. D'autres études devraient préciser les seuils des PN mélanifères circulants régulièrement corrélés à un paludisme grave ou à une infection palustre au cours de laquelle la goutte épaisse est en défaut.

Mots clés : Paludisme, *Plasmodium falciparum*, enfant, adulte jeune, semi-immunité.

SERMENT DE GALIEN

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

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

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

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

Je le jure