

# ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

ANNEE 1992

N°...21.....

\*\*\*\*\*

\*\*\*\*\*

## TITRE

**INTERET CLINIQUE ET EPIDEMIOLOGIQUE,  
DU QBC ET DU DOSAGE DES ANTICORPS  
ANTI-TRAP AU COURS DU PALUDISME A  
*PLASMODIUM FALCIPARUM* (WELCH 1897).**

## THESE

Présentée et soutenue Publiquement le .....1993  
devant l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali.

Par **Guy Albert KODJO**

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

### Jury

Professeur Boubacar CISSE

Président

Professeur Amadou DIALLO

Co-Directeur

Docteur Dapa Aly DIALLO

Examineur

Docteur Amagana DOLO

Examineur

Professeur Agrégé Ogobara DOUMBO

Directeur de Thèse.

LISTE DES PROFESSEURS

Professeur Issa TRAORE	Doyen
Professeur Boubacar S. CISSE	Premier Assesseur
Professeur Amadou DOLO	Deuxième Assesseur
Docteur Bernard CHANFREAU	Conseiller Technique

D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Pr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale Chef de D.E.R.
Pr Mamadou Lamine TRAORE	Chirurgie Générale
Pr Aliou BA	Ophtalmologie
Pr Bocar SALL	Ortho.- Traumatolo.- Secourisme
Pr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Pr Abdou Alassane TOURE	Ortho.-Traumatologie.
Pr Amadou DOLO	Gynéco.-Obstétrique
Pr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Dr Mme SY Aida SOW	Gynéco.-Obstétrique
Dr Kalilou OUATTARA	Urologie
Dr Mamadou L. DIOMBANA	Odonto.-Stomatologie
Dr Salif DIAKITE	Gynéco.-Obstétrique
Dr Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Dr Alhousseïni Ag Mohamed	O.R.L.
Dr Mme DIANE F. S. DIABATE	Gynéco.-Obstétrique
Dr Abdoulaye DIALLO	Anesth.-Réanimation
Dr Sidi Yaya TOURE	Anesth.-Réanimation
Dr Gangaly DIALLO	Chirurgie Générale
Dr Sékou SIDIBE	Ortho.-Traumatologie
Dr Abdel Kader TRAORE dit DIOP	Chirurgie Générale

D.E.R. de SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Pr Bréhima KOUMARE	Microbiologie
Pr Siné BAYO	Anatomie-Pathologie
Pr Gaoussou KANOUTE	Chimie Analytique
Pr Yaya FOFANA	Hématologie
Pr Ogobara DOUMBO	Parasitologie

2. DOCTEURS D'ETAT

Pr Yéya Tiémoko TOURE	Biologie
Pr Amadou DIALLO	Biologie Chef de D.E.R.
Pr Yénimégué A. DEMBELE	Chimie Organique

### 3. DOCTEURS 3<sup>e</sup> CYCLE

Pr Moussa ARAMA	Chimie Organique
Pr Massa SANOGO	Chimie Analytique
Pr Bakary M. CISSE	Biochimie
Pr Mahamadou CISSE	Biologie
Pr Sékou F.M. TRAORE	Entomologie Médicale
Pr Abdoulaye DABO	Malacologie, Biologie Animale
Pr N'yerigie S. KOITA	Chimie Organique

### 4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Dr Abderhamane S. MAIGA	Parasitologie
Dr Anatole TOUNKARA	Immunologie
Dr Amadou TOURE	Histo.-Embryologie

### 5. MAITRES ASSISTANTS

Dr Abdrahamane TOUNKARA	Biochimie
Dr Flabou BOUGOUDOOGO	Bactériologie

### D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

#### 1. PROFESSEURS AGREGES

Pr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne Chef de D.E.R.
Pr Souleymane SANGARE	Pneumo.-Phtisiologie
Pr Aly GUINDO	Gastro-enterologie
Pr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Pr Mahamane MAIGA	Néphrologie
Pr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine Interne
Pr Baba KOUMARE	Psychiatrie
Pr Moussa TRAORE	Neurologie
Pr Issa TRAORE	Radiologie
Pr Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Pr Eric PICHARD	Médecine Interne
Pr Toumani SIDIBE	Pédiatrie

#### 2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Dr Abdel Kader TRAORE	Médecine Interne
Dr Moussa Y. MAIGA	Gastro-enterologie
Dr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Dr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Dr Dapa Ali DIALLO	Hématologie-Méd. Interne
Dr Somita KEITA	Dermatologie-Leprologie
Dr Bah KEITA	Pneumo.-Phtisiologie
Dr Hamar A. TRAORE	Médecine Interne

## D.E.R. DE SCIENCES PHARMACEUTIQUES

### 1. PROFESSEURS AGREGES

Pr Boubacar CISSE	Toxicologie
Pr Arouna KEITA	Matières Médicales

### 2. MAITRES ASSISTANTS

Dr Boukassoum HAIDARA	Législ. Gest. Pharm.
Dr Elimane MARIKO	Pharmacodynamie
Dr Drissa DIALLO	Matière Médicales

## D.E.R. de SANTE PUBLIQUE

### 1. PROFESSEURS AGREGES

Pr Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique Chef de D.E.R.
Pr Moussa A. MAIGA	Santé Publique
Pr Hubert BALIQUE	Santé Publi. Maitre deconf.agrégé

### 2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Dr Bernard CHANFREAU	Santé Publique
Dr Jean Michel MOURILLE	Santé Publique
Dr Bocar G. TOURE	Santé Publique
Dr Sory I. KABA	Santé Publique
Dr Sanoussi KONATE	Santé Publique

### CHARGES DE COURS

Dr Mme CISSE A. GAKOU	Galénique
Pr N'Golo DIARRA	Botanique
Pr Bouba DIARRA	Bactériologie
Pr Salikou SANOGO	Physique
Pr Daouda DIALLO	Chimie Générale et Miner.
Pr Bakary I. SACKO	Biochimie
Pr Yoro DIAKITE	Maths
Pr Sidiki DIABATE	Bibliographie
Dr Aliou KEITA	Galénique
Dr Boubacar KANTE	Galénique
Dr Souleymane GUINDO	Gestion
Dr Mme Sira DIALLO	Maths
M Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu

### ASSISTANTS

Dr Nouhoum ONGOIBA	Chirurgie Générale
Dr Saharé FONGORO	Néphrologie
Dr Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
Dr Benoît KOUMARE	Chimie Analytique
Dr Ababacar I. MAIGA	Toxicologie
Dr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne

Dr Sadio YENA	Chirurgie Generale
Dr Ibrahim ALWATA	Ortho.-Traumatologie
Dr Adama D. KEITA	Radiologie
Dr Tatiana KEITA	Pédiatrie
Dr Massambou SACKO	Santé Publique

C.E.S.

Dr Georges YAYA(RCA)	Ophtalmologie
Dr Abdou ISSA(Niger)	Ophtalmologie
Dr Amadou DIALLO(Sénégal)	Ophtalmologie
Dr Askia MOHAMED(Niger)	Ophtalmologie
Dr Oumar BORE	Ophtalmologie
Dr N'DJIKAM Jonas(Cameroun)	Ophtalmologie
Dr DEZOUNBE Djoro(Tchad)	Ophtalmologie
Dr Aboubacrine A. MAIGA	Santé Publique
Dr Dababou SIMPARA	Chirurgie Générale
Dr Mahamane TRAORE	Chirurgie Générale
Dr Mohamed Ag BENDECH	Santé Publique
Dr Mamadou MAIGA	Dermatologie
Dr Toungo DOUMBIA	Chirurgie Générale
Dr Salimata KONATE	Ophtalmologie
Dr Lamine TRAORE	Ophtalmologie
Dr Ousmane C. FAYE	Dermatologie
Dr Mme N'DIAYE Hawa THIAM	Dermatologie
Dr Idrissa A. CISSE	Dermatologie
Dr Akory Ag IKNANE	Santé Publique
Dr Hamadoun SANGHO	Santé Publique
Dr Mahamadou MAIGA	Santé Publique
Dr Adama DIAWARA	Santé Publique
Dr Mahamadou THERA	Santé Publique
Dr Nkok Luc LOIC (Cameroun)	Ophtalmologie

PROFESSEURS MISSIONNAIRES

Pr P. HAVLCK	Biophysique
Pr F. ROUX	Biophysique
Pr G. FARNARIER	Physiologie
Pr G. GRAS	Hydrologie
Pr E.A. YAPO	Biochimie
Pr Babacar FAYE	Pharmacodynamie
Pr Mamadou BADIANE	Pharmacie Chimique
Pr Issa LOLégislation	

## PERSONNELS RESSOURCES

Dr Madani TOURE	H.G.T.
Dr Tahirou BA	H.G.T.
Dr Amadou MARIKO	H.G.T.
Dr Badi KEITA	H.G.T.
Dr Antoine Niantao	H.G.T.
Dr Kassim SANOGO	H.G.T.
Dr Yéya I. MAIGA	I.N.R.S.P.
Dr Chompere KONE	I.N.R.S.P.
Dr BA Marie P. DIALLO	I.N.R.S.P.
Dr Almahady DICKO	P.M.I.Sogoninko
Dr Mohamed TRAORE	Kati
Dr Arkia DIALLO	P.M.I. Centrale
Dr Reznikoff	I.O.T.A.
Dr TRAORE J. Thomas	I.O.T.A.
Dr P. BOBIN	I. MARCHOUX
Dr A. DELAYE	H.P.G.
Dr N'DIAYE F. N'DIAYE	I.O.T.A.'
Dr Hamidou B. SACKO	H.G.T.

# DEDICACES

Je dédie ce travail :

**- A mon père :**

qui s'est investi sans ménagement à notre éducation et bien-être . Que Dieu te bénisse.

**- A ma mère :**

qui nous a entouré de tendre affection et soutenu moralement durant tout notre cycle. Je prie le seigneur de te garder encore longtemps parmi nous car nous avons besoin de ton amour .

Recevez ici un faible témoignage de ma reconnaissance et de mon amour filial .

**- A mes frères et soeurs :**

tendre affection.

**- A mes nieces et neveux :**

toute ma sympathie.

**- A Rose-Helena :**

que ce travail te serve d' exemple dans l'avenir, réussite et santé.

**- A K.L:**

tous mes remerciements pour ton réconfort et soutien moral . Puisse notre projet se réaliser , affectueusement .

# REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent :

- Au chef de poste médical de Safo et à son aide-soignant .
- A la population de Safo et au personnel médical de l'hôpital Gabriel-Touré .
- A l'équipe parasitologique et entomologique.
- A Mme Assa COULIBALY.
- A Mr. Danzele COULIBALY.
- A mes collègues et amis : Mahamadou DIAKITE , Alassane DICKO , Hawa DEMBELE , Belco POUDJOUYOU courage et succès.
- A Mr. Mouctar DIALLO : mes sincères remerciements pour vos enseignements et votre disponibilité.
- Au Dr Abdoulaye DABO en témoignage des conseils et enseignements reçus.
- Aux chauffeurs DJIGUIBA et Zoumana DIAKITE.
- A mes aînés : Dr Seydou DOUMBIA, Dr Abdoulaye TOURE, Dr Faoussouby CAMARA, Dr Bourèma KOURIBA, Dr Fanta KEITA recevez ici toute ma reconnaissance et ma gratitude pour la contribution à la réalisation de ce travail .
- Au Dr Ousmane KOITA tous mes remerciements pour votre encadrement et dévouement.
- A tous ceux qui m'ont , de loin ou de près, soutenu durant mes études.

Nous remercions très sincèrement toute l'équipe de l'Institut de Parasitologie, en particulier son directeur le Professeur M. Coluzzi pour sa disponibilité , son esprit compréhensif et ses encouragements.

Nos remerciements s'adressent également aux Professeurs Marouf. M. KEITA et Toumani SIDIBE pour leur disponibilité dans la supervision de la partie clinique à l'hôpital Gabriel-Touré et pour nous avoir accordé toutes les facilités au cours de notre étude.

A notre Maître et Président de Jury

**Monsieur le PROFESSEUR BOUBACAR SIDIKI CISSE**

- Premier Assesseur à l'Ecole Nationale de Médecine et Pharmacie
- Chef de la mission universitaire
- Chef de service de la section Toxicologie à l'I.N.R.S.P.
- Professeur chargé des cours de toxicologie à l'Ecole Nationale de Médecine et Pharmacie du Mali.

Votre présence à ce jury nous honore.

Permettez-nous en ce jour de vous exprimer notre gratitude et reconnaissance pour l'enseignement reçu et vos qualités humaines.

A notre Maître et Juge

**DOCTEUR DAPA ALY DIALLO**

- Assistant-chef de clinique d'hématologie
- Professeur d'Hématologie à l'Ecole National de Médecine et de Pharmacie
- Chef de laboratoire de l'E.N.M.P.

Nous sommes très fiers de vous compter parmi les membres du Jury. Vos éminentes qualités professionnelles et humaines sont connus de tous.

Veillez accepter, l'expression de notre profonde gratitude .

A notre Maître et Juge

**DOCTEUR AMAGANA DOLO**

- Pharmacien au D.E.A.P.
- Collaborateur sur la TRAP en Italie

Vous avez su nous faire bénéficier de vos immenses qualités humaines et scientifiques. Vos conseils et enseignements nous ont été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail.

Trouvez ici toute notre reconnaissance.

A notre Maître et Co-Directeur de thèse

**Monsieur le PROFESSEUR AMADOU DIALLO**

-Chef du D.E.R des Sciences Fondamentales

- Professeur de Biologie Animale à l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie

Vous nous avez guidé tout au long de notre travail en nous prodiguant des conseils judicieux. Votre disponibilité et souçis constant pour notre formation forcent notre admiration.

Permettez nous de vous exprimer toute notre gratitude

A notre Maître et Directeur de thèse

**Monsieur le PROFESSEUR OGOBARA DOUMBO**

-Professeur Agrégé de Parasitologie

-Médecin-chef du D.E.A.P.

-Directeur du cours Supérieur d'Epidémiologie de l'OMS

-Professeur de Parasitologie à l'Ecole Nationale de Médecine et Pharmacie

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez faite en nous proposant cette étude. Durant deux ans nous avons pu apprécier vos qualités scientifiques, votre dévouement , votre haute compétence, votre endurance et surtout votre simplicité. Pédagogue et homme de terrain, vous nous avez appris le sens du sacrifice et du travail bien fait .

Nous vous remercions infiniment

# Sommaire

Matières .....	Pages
Glossaire	
Introduction.....	1
1. Objectifs.....	3
2. Généralités sur la TRAP.....	4
2.1 Mécanismes d'invasion de l'hématie.....	4
2.2 Les récepteurs de l'endothélium vasculaire de l'hôte pour les hématies infectées par <i>P. falciparum</i> .....	6
2.3 Description de la TRAP.....	6
3. Méthodologie.....	8
3.1 Lieux d'étude: le village de Safo et la ville de Bamako.....	8
3.2 Période d'étude.....	13
3.3 Echantillonnage.....	13
3.4 Type d'études.....	14
3.5 Approche des problèmes d'éthiques médicales.....	15
3.6 Variables mesurées.....	16
3.7 Techniques biologiques.....	16
3.8 Analyse des données.....	25
3.9 Laboratoires et services associés.....	25
4. Résultats.....	26
4.1 Safo.....	26
4.2 Hôpital Gabriel -Toure.....	33
5. Discussion.....	41
6. Conclusion et recommandations.....	46
7. Références.....	48
Annexe	

## GLOSSAIRE

- C.D.C : Control disease center
- C.S.P : Circumsporozoite protein
- G.E : Goutte épaisse
- H.G.T : Hôpital Gabriel -Touré
- F.M : Frottis mince
- Q.B.C : Quantitative Buffy Coat
- T.R.A.P : Thrombospondin related anonymous protein
- U.I.E : Unité immuno -enzymatique

## **Introduction.**

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* reste encore à l'aube du 21ème siècle une érythrocytopathie parasitaire mortelle. Les dernières estimations du CDC donnent une mortalité juvénino-infantile spécifique d'environ 1 à 2 millions par an pour le seul continent africain (3,6). Au Mali le taux de mortalité infanto-juvénile lié au paludisme est estimé à 42 pour 1000 (13). Dans le monde, environ un enfant meurt de paludisme chaque minute (Doumbo O., Comm; orale). Cette hémospordiose tue par trois mécanismes: accès palustre grave, complications chroniques et petits poids à la naissance.

De gros progrès scientifiques ont été réalisés dans la compréhension de la biologie du parasite depuis la mise au point de la culture continue par Trager et Jensen en 1976 (45) et dans les relations hôte-parasite, ces dix dernières années. La biologie moléculaire et l'immunologie du paludisme ont connu un bond quantitatif jamais égalé dans le domaine des maladies tropicales, durant cette dernière décennie.

Les firmes pharmaceutiques s'essouffent de plus en plus, quant à la mise au point de nouveaux antipaludéens, peu chers, non toxiques, faciles à administrer en médecine communautaire. La Chloroquinorésistance gagne du terrain dans toutes les zones d'endémie et plus particulièrement en Afrique. Les seules stratégies de lutte actuellement disponibles pour la communauté villageoise restent la réduction de la mortalité et de la morbidité par l'utilisation de rideaux et moustiquaires imprégnés de Pyrethrinoïdes de synthèse, couplée au traitement systématique des accès palustres (4, 14,32)

L'espoir reste tourné vers la mise au point de vaccins antipaludiques permettant de réduire l'incidence du paludisme-maladie, donc la mortalité liée au paludisme. Les résultats récemment obtenus dans ce domaine par différentes équipes sont encourageants (28). Tous les stades parasitaires sont des cibles potentielles de vaccins antipaludiques. Différentes protéines sont en cours d'étude; parmi lesquelles la TRAP ((Thrombospondin Related Anonymous Protein).

La TRAP est une Glycoprotéine située à la surface des stades érythrocytaires de *P. falciparum*, ayant des séquences d'acides aminés communes avec des protéines déjà connues (23, 37, 41). L'homologie la plus marquée porte sur les séquences Trp-Ser-Pro-Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly (WSPCSVTCG) présentes en trois copies dans la Thrombospondine, six copies dans la properdine et une copie dans la protéine Circumsporozoitaire (CSP, de *P. falciparum*) (37).

La TRAP est impliquée dans le processus de reconnaissance et d'invasion de l'hématie par les parasites, en se liant spécifiquement à la Thrombospondine (TSP). Des anticorps anti-TRAP peuvent être dosés au cours du paludisme et leur corrélation avec la gravité de la maladie a été évoquée (33,35).

Dans ce travail, notre but était , d'évaluer l'épidémiologie du paludisme dans une zone rurale du Mali (village de Safo), de mesurer l'incidence du paludisme maladie dans la population des enfants hospitalisés dans les services de pédiatrie de l'Hôpital Gabriel TOURE, et de doser parallèlement le niveau des anticorps anti-TRAP dans ces deux populations impaludées.

## **1. Objectifs de notre étude:**

- Evaluer la dynamique de la transmission saisonnière du paludisme dans le village de Safo, par les techniques parasitologiques de la goutte épaisse, du frottis mince et du QBC (Quantitative Buffy Coat);
  
- Mesurer le taux d'incidence du paludisme maladie dans la population des enfants hospitalisés dans les services de Pédiatrie de l'HGT;
  
- Mesurer le rôle protecteur des anticorps anti-TRAP, vis à vis du portage du parasite en milieu rural et la gravité du paludisme maladie à *P. falciparum* en milieu hospitalier pédiatrique de Bamako;
  
- Doser le taux des anticorps anti-CSP de *P. falciparum* dans la population d'enfants en milieu hospitalier.
  
- Etablir des corrélations entre ces différents indicateurs paludométriques, et dégager le rôle protecteur des anticorps anti-TRAP, sur l'évolution pernicieuse.

## 2. Généralités sur la TRAP.

### 2.1 Mécanismes d'invasion de l'hématie par le Mérozoïte.

Perkins , et coll 1989 (30) montrent que l'invasion du mérozoïte dans l'hématie nécessite deux types de structure fondamentale, Il s'agit de :

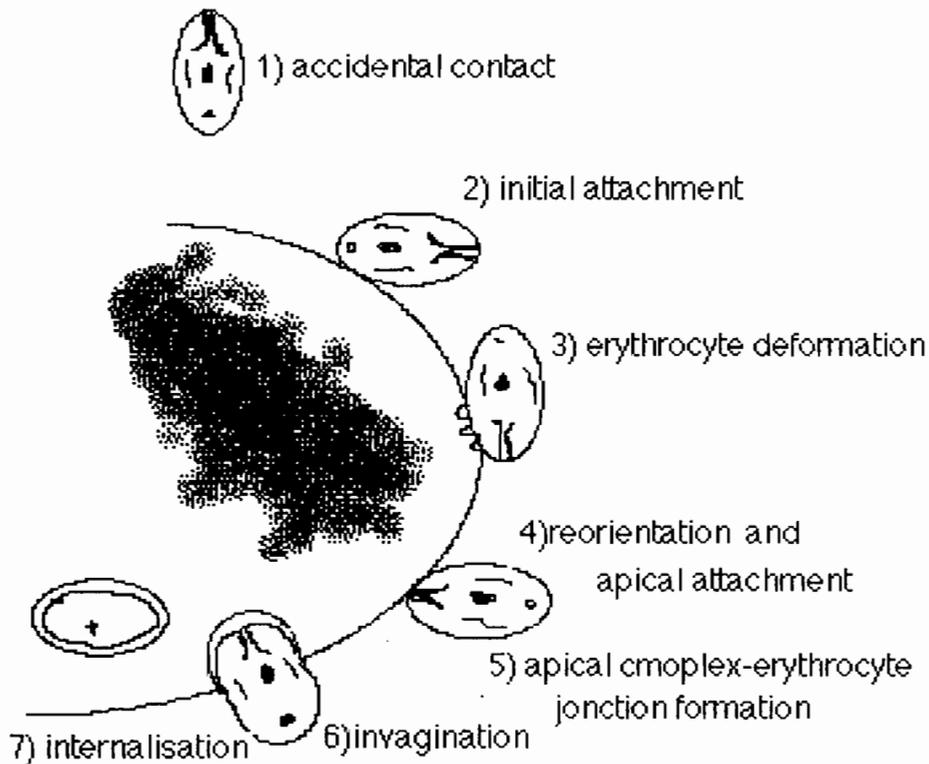
- structures propres à l'hématie , qui sont des récepteurs membranaires spécifiques d'espèces plasmodiales;
- structures propres au mérozoïte , RBP ou protéines spécifiques du mérozoïte qui se lient aux récepteurs membranaires de l'hématie.

Des études réalisées au microscope électronique avec les modèles aviaires (*Plasmodium gallinaceum*) , simiens (*Plasmodium knowlesi*) , et humains , (*Plasmodium vivax* et *Plasmodium falciparum*) révèlent que les plasmodies ne pénètrent pas l'hématie par effraction membranaire.

Le mécanisme de l'invasion est un processus d'invagination membranaire de l'hématie avec formation d'une vacuole parasitophore, appelé **endocytose** (27).

La séquence des évènements est très précise. TOUNKARA (44) résume en sept étapes successives le mécanisme d'invasion de l'hématie par le mérozoïte.

**Figure1:** Processus d'invasion de l'hématie par le mérozoïte de *P. falciparum* (Hermentin et al., 1984).



- 1) Contact accidentel du mérozoïte avec la surface de l'hématie,
- 2 ) Attachement du mérozoïte à la surface de l'hématie; cet attachement peut s'effectuer au niveau de n'importe quelle structure morphologique du mérozoïte.
- 3) Déformation rapide et étendue de l'hématie en un temps très court, 9 à 15 secondes,
- 4) Réorientation du mérozoïte avec attachement de sa zone apicale à la surface de l'hématie,
- 5) Formation d'une jonction mobile à l'interface " mérozoïte - membrane de l'hématie"; celle-ci subit une vague déformation pour engendrer une dépression concave autour de l'apex du mérozoïte.
- 6 ) Invagination de la membrane érythrocytaire en un temps très bref, une minute;

secondaire aux sécrétions libérées par les structures apicales du mérozoïte,  
 -7 ) Internationalisation du mérozoïte avec formation d'une vacuole parasitophore.

## **2.2 Les récepteurs de l'endothélium vasculaire de l'hôte pour les hématies infectées par *P. falciparum***

Les globules rouges adhèrent in vitro à plusieurs lignées cellulaires dont, la C32 qui reste encore actuellement un modèle standard pour la mise en évidence de la cytoadhérence. Ainsi Jeffrey et al., (23) au cours de leurs travaux identifièrent trois récepteurs de l'endothélium vasculaire de l'hôte pour les hématies parasitées:

- la matrice extracellulaire de la protéine thrombospondine
- l'ICAM-1
- la CD36

Les érythrocytes peuvent se lier in vitro à chacune de ces protéines. La Thrombospondine et la CD36 s'attachent l'une à l'autre. Mais chacune indépendamment de l'autre, peut se lier à l'érythrocyte infecté. Il est actuellement admis que la présence de la CD36 à la surface des cellules est due à leur capacité à être des cibles pour la cytoadhérence des globules rouges parasités (6, 23) . La glyco- thrombospondine protéine, synthétisée par plusieurs types de cellules adhérentes dont celle de l'endothélium est suspectée d'être responsable de la cytoadhérence (23) . En effet la thrombospondine représente la première molécule identifiée comme récepteur avec lequel les érythrocytes infectés peuvent se lier et apparaît comme un médiateur entre cellule-cellule et cellule-matrice (6, 23, 41) . L'ICAM-1 vient d'être reconnu comme un récepteur pour une lignée de parasites se liant spécifiquement à l'endothélium vasculaire.

## **2.3 Description de la TRAP**

La TRAP (Thrombospondin Related Anonymous Protein) est une protéine de surface de *Plasmodium falciparum* . Différente de la CSP (Circum Sporozoite Protéine), la TRAP s'exprime à la fois au niveau des sporozoïtes et des stades endoérythrocytaires (37,39). Le gène de la TRAP entière comprend près de 1806 nucléotides soit 602 AA. Celle utilisée pour le dosage des anticorps dans les sérums de Safo ne comporte que 1564 nucléotides soit 521 AA. Des gènes de la TRAP provenant de différents isolats de *Plasmodium falciparum* , ont été étudiés dans quatorze laboratoires distincts.

Tous sont parvenus à la même conclusion (37, 38); c'est à dire l'existence d'une zone conservée et une cinquantaine de substitutions d'acides aminés, au niveau des régions variables.

Aucune substitution n'a été encore observée au niveau de la région WSPCSVTCG (Tryptophane-Sérine-Proline-Cystéine-Sérine-Valine-Thréonine). Cette zone hautement conservée se retrouve dans la région II de la CSP (Dame et al.) (37) également dans une variété d'autres protéines, la Thrombospondine (Lawler et Hynes) (37) et la Properdine (Goundis et Reid) (37).

C'est en 1988, que Robson et al. (37), ont identifié un gène de *Plasmodium falciparum* codant pour une protéine appelée TRAP. Le polymorphisme de la TRAP s'effectue essentiellement par "52 à 53" substitutions, soit par transversion soit par transition (Dolo A., comm. orale). Grâce au progrès de l'immunologie et de la biologie moléculaire, il est possible de produire la protéine TRAP au laboratoire soit par synthèse chimique, soit par génie génétique (40,41). La structure tridimensionnelle de la TRAP n'est pas actuellement connue.

Il existe très peu d'études réalisées sur la TRAP à partir du sérum humain.

Les équipes qui travaillent sur cette protéine sont:

- l'équipe américaine du NIH (Prof. L. MILLER),
- l'unité hématologique et biologie moléculaire de l'université d'Oxford (Dr CK ROBSON),
- l'Institut parasitologique de l'université de Rome (Prof. M. COLUZZI),
- l'équipe allemande de biologie moléculaire de l'université d'Heidelberg (Prof. H. BUJARD),
- l'équipe malienne du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires de l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie (Prof. O. DOUMBO, Dr A. DOLO).

Les travaux déjà réalisés portent essentiellement sur l'aspect de la biologie moléculaire de la TRAP et l'étude de la dynamique des anticorps anti-TRAP dans certaines populations impaludées.

Le *Plasmodium* est une "mosaïque antigénique", à chaque stade correspond une spécificité antigénique. Or la TRAP est la seule protéine qui s'exprime aussi bien au niveau des sporozoïtes qu'au niveau des stades endoérythrocytaires (10, 38, 41). Ce qui montre l'intérêt clinique et épidémiologique de l'étude de la valeur protectrice de la réponse immunitaire induite par la TRAP.

### **3. Méthodologie.**

#### **3.1 Lieux d'Etude: le village de Safo et la ville de Bamako**

##### **3.1.1 Safo**

Notre étude a été effectuée dans une zone rurale malienne , le village de Safo situé à 15 kms au Nord-Est du quartier Bankoni de la capitale Bamako. Il constitue le chef lieu d'un secteur de développement de 18 villages de l' arrondissement de Kalabankoro , cercle de Kati .

Safo serait issu de l'extension du Royaume Bambara de Ségou .

##### ***Biogéographie***

- Le relief

Il est essentiellement constitué par le DIENFA-KOULOU , KOULLOUDJAN et le TORODOKOULOUNI qui sont des prolongements du plateau Manding .

-La végétation

Elle est de type savanne arborée avec un tapis herbacé . Cette végétation subit une certaine désertification liée à l'exploitation abusive du bois , à l'élevage des caprins et au déficit pluviométrique de ces dernières années.

-La faune

Jadis riche, elle se trouve aujourd'hui très appauvrie par la chasse intensive . On y rencontre quelques rares espèces : lièvres , chats sauvages , singes , phacogères , perdrix , pintades sauvages .

-Le climat .

Le climat est de type nord soudanien caractérisé par l'alternance de deux grandes saisons :

\* Une saison pluvieuse qui s'étend de Mai à Octobre avec un maximum en Août-Septembre . C'est la période de transmission intense du paludisme .

\* Une saison sèche qui est fraîche de Novembre à Janvier et chaude de Février à Mai avec une température maximale observée en Mai.

-L'hydrographie

Le village de Safo est essentiellement arrosé par trois cours d'eau temporaires, grossis pendant la saison pluvieuse par les eaux de ruissellement des collines qui sont le TRONO, le NIAMADOKO et le N'GOLONOGONI

##### ***Données socio-démographiques .***

La population du village de Safo est évaluée à 1500 habitants répartie entre quatre

quartiers : Sidoni , Koko , Bougoudacourani , et Bougoucoro avec un petit secteur libre des enseignants . Elle est principalement composée de Bambara autochtone (90% ) , de Malinké (6%) et d'une minorité de Peulh et de Sarakolé . C'est une population animiste , mais il existe quelques familles chrétiennes et une minorité de musulmans . L'habitat comprend trois types de construction :

- des cases rondes avec un toit de chaume cône ;
- des cases rondes ou rectangulaires avec un toit en terrasse ;
- des maisons rectangulaires avec un toit en tôle (rares) .

Les murs de ces constructions en banco présentent des fentes de retrait qui sont d'excellents lieux de repos pour les moustiques , de même que les toits de chaume et de terrasse.

### ***Activités économiques***

La population de Safo est rurale à 100% . Les principales activités économiques sont l'agriculture et l'élevage .

On rencontre trois groupes de cultures :

- Cultures vivrières : mil , arachide , riz , sorgho , maïs , manioc . Seuls les excédents sont commercialisés .
- Cultures maraichères : Elles constituent une source de revenu très importante car à proximité de Bamako où ces produits sont écoulés . Ils comprennent notamment les aubergines , les tomates , le gombo , les oignons et les épices .
- Cultures fruitières : Il existe quelques vergers de manguiers et de citronniers . On rencontre également dans les jardins des papayers, des bananiers , des goyaviers . A côté de ces cultures les produits de cueillette occupent une place très importante dans les activités économiques à SAFO. L'élevage est une activité pratiquée surtout par la minorité peulhe . On y rencontre surtout des bovins , des caprins, des ovins et des volailles .

### ***Infrastructures***

Le village de Safo est doté d'une école primaire et d'un dispensaire.

L' école fondamentale de Safo a été créée en 1960 . Elle compte 6 classes de 150 élèves . Les activités pédagogiques sont assurées par trois enseignants , avec un système d'enseignement à double vacation.

Le taux de scolarisation est d'environ 20% d'enfants scolarisables . L'école de Safo est la seule pour les 18 villages du secteur de développement .

Le dispensaire rural de safo a été construit en 1967. Il joue le rôle de chef-poste médical des 18 villages du secteur de développement . Ce centre est dirigé par un infirmier du premier cycle assisté d'un aide-soignant . Une maternité tenue par une matrone rurale assure les activités de Santé Maternelle et Infantile (SMI).

### ***Situation sanitaire***

Depuis 1989 notre équipe mène à Safo une surveillance régulière du paludisme aussi bien sur le plan biologique que clinique . Le paludisme reste hyperendémique à Safo avec une transmission saisonnière d'au moins quatre mois. L'indice plasmodique varie de 59% à 55,2% (3). L'onchocercose , les bilharzioses et les helminthiases intestinales, sont aussi prévalentes dans la population de Safo .

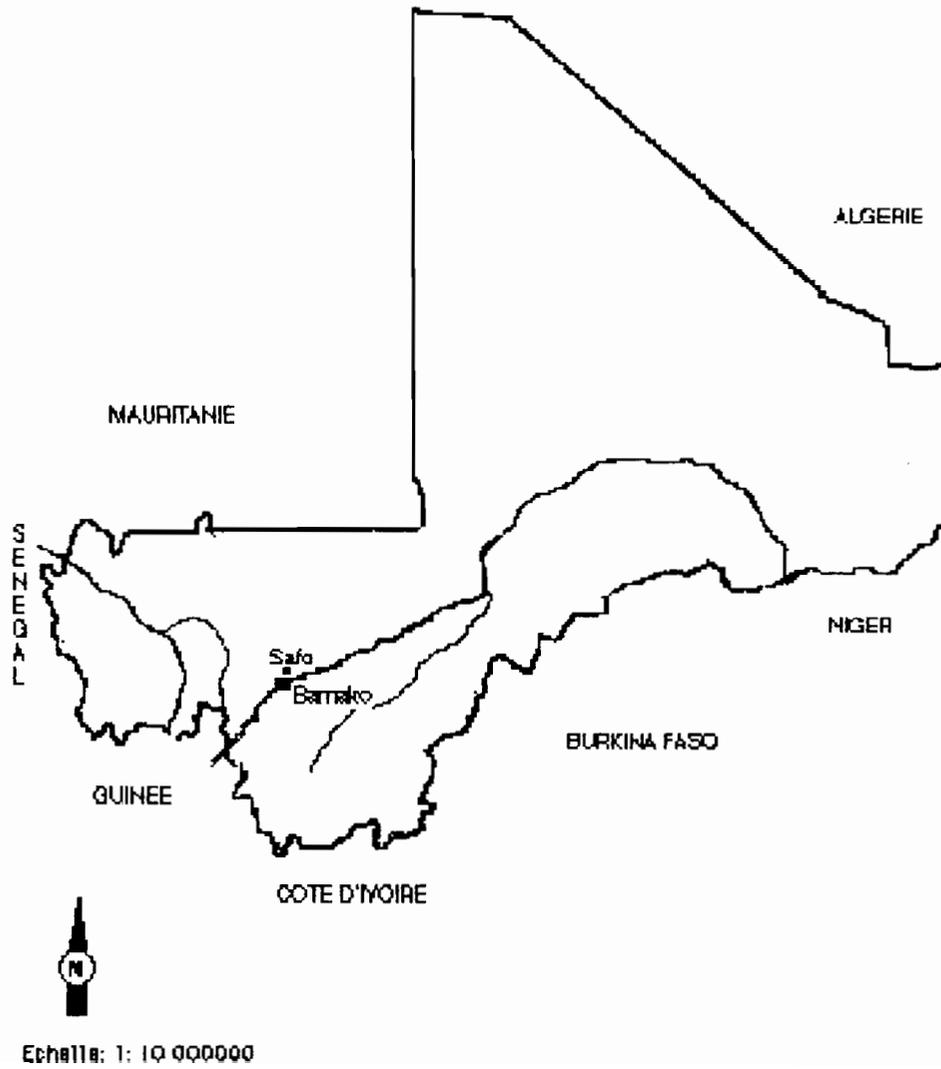
Les gastroentérites constituent une importante cause de mortalité infantile . Les épidémies (rougeole , méningite) surviennent presque tous les deux ans (3).

#### **3.1.2 Hôpital Gabriel Touré,**

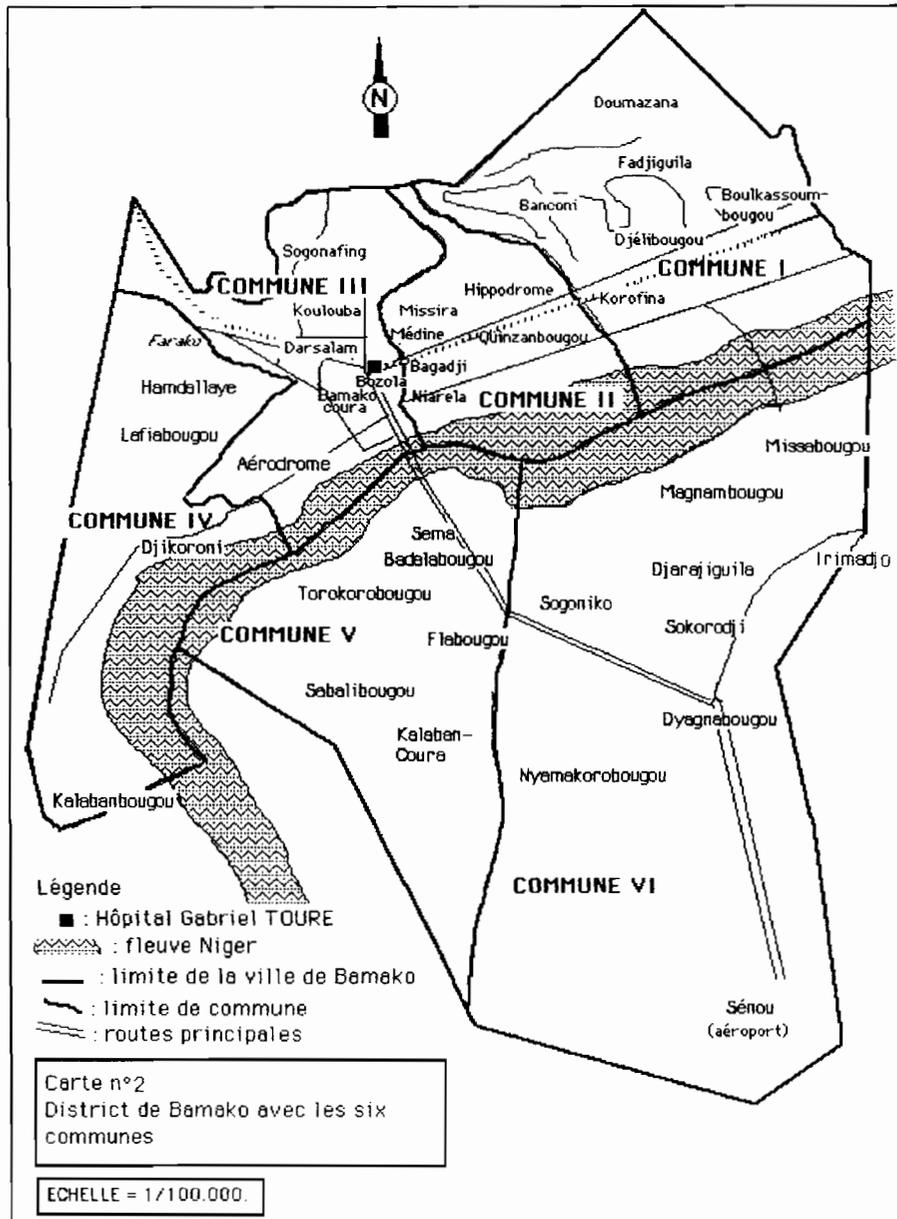
L'hôpital Gabriel -Touré est situé en plein centre de Bamako , au quartier Médine. Il est l'un des trois plus grands hôpitaux de la ville de Bamako et le seul à disposer de services de pédiatrie. Ils sont au nombre de quatre et se partagent les activités de consultation externe et d'hospitalisation. Les services de pédiatrie ont une capacité d'hospitalisation de 80 lits. Le personnel est composé de 10 pédiatres dont deux professeurs agrégés.

En outre, ces services possèdent un laboratoire de biologie médicale qui assure l'essentiel des examens courants (hématologie, biochimie et parasitologie). Cette disponibilité facilitait considérablement le dépistage des cas de paludisme durant notre étude. Ce laboratoire est dirigé par un infirmier d'Etat recyclé en biologie.

**Figure2:** Situation géographique du village de Safo et de la ville de Bamako.



**Figure3:** lieu d'étude clinique, la ville de Bamako.



### **3.2. Période d'étude**

#### **Safo**

C'était un suivi longitudinal d'une cohorte de 200 individus, sur le plan parasitologique. Cette enquête longitudinale a été couplée à deux passages transversaux effectués en Mai et Décembre 1989, pour le dosage des anticorps anti-TRAP. Les sérums ont été congelés à -20°C. Les dosages sérologiques ont été effectués en 1991, suite à la production de la TRAP par génie génétique par l'équipe de biologie moléculaire du Professeur H. BUJARD (Heidelberg, RFA).

Le travail sur le QBC a été effectué au mois de Juin 1992, en début de transmission.

#### **Hôpital Gabriel -Touré**

Nous y avons réalisé une étude cas-témoins durant la saison de transmission 1992.

Le dépistage des cas et la surveillance clinique ont été effectués d'Août à Novembre 1992 (soit 3 mois). Cette période correspondait à la saison de transmission intense du paludisme dans cette partie du Mali, avec une incidence élevée des accès graves dus à *P. falciparum*

### **3.3 Echantillonnage**

#### **A Safo,**

La taille minimum de l'échantillon a été calculée en tenant compte d'un risque Alpha de 5%, d'une prévalence parasitaire de 70% et d'une proportion moyenne de perdus de vue, annuelle de 6%. Notre population cible d'étude, dans ce village était composée d'adultes, d'adolescents et d'enfants. Un total de 200 individus ont été suivis durant notre enquête.

#### **A l'Hôpital Gabriel Touré.**

Nous avons réalisé un recensement systématique de tous les cas de fièvre vus dans les services de pédiatrie durant cette période. La population cible était constituée des enfants de 1 à 12 ans reçus en consultation externe ou hospitalisés dans les services de pédiatrie. Les cas et les témoins ont été définis selon des critères cliniques et biologiques.

La taille minimum de l'échantillon a été calculée en fonction d'un risque Alpha de 5%,  $\beta$  de 20% et d'une différence  $\delta$  de 10% ( que nous comptons observer entre les deux groupes: cas / témoins).

\* Définition des cas graves :

- le coma (stade I, II, III, carus),
- l' hypoglycémie, (glycémie < à 40 mg / dl)
- le choc, tension systolique < à 50mm de Hg (enfants de 1-5 ans) , <70mm deHg (enfants de 6-12 ans)

"Tout malade présentant au moins un de ces signes avec une goutte épaisse ou un frottis positif à *Plasmodium falciparum* et une amélioration de l'état après un traitement antipaludique a été considéré comme cas grave de paludisme à *Plasmodium falciparum* ".

\* Définition des cas témoins:

- la température axillaire supérieure ou égale à 37°5 (sans correction)
- la goutte épaisse positive à *Plasmodium falciparum*,
- Sans signes de malignité ci dessus décrits,

\* Critères d'exclusion

Ont été exclus de notre étude, les enfants qui présentaient , un abcès ou une blessure septique, une angine, des symptômes d'infections respiratoires , des infections ORL, une méningite bactérienne, une rougeole, une fièvre typhoïde.

\* Critères d'inclusion

Tout enfant quelque soit sa provenance (rurale , peri-urbaine , urbaine) de 1à12 ans reçu en consultation externe ou hospitalisé dans l'un des quatre services de pédiatrie de l'HGT durant la période d'étude, et répondant à la définition de cas ou de témoins (ci dessus citée), était inclu dans le protocole. A la fin du protocole chaque cas grave a été apparié à trois cas témoins selon l'âge et l'origine géographique. Ainsi 86 appariements ont été réalisés, soit un total de 340 malades qui ont bénéficié des tests immunologiques.

### **3.4 Type d'Etudes.**

- **A Safo**, nous avons réalisé une enquête prospective longitudinale. Un suivi d'une cohorte de 200 sujets répartis en 27 familles a été réalisé. Nous avons pu ainsi estimer l'incidence de l'infection palustre et des épisodes morbides chez chaque sujet. Les prélèvements pour le dosage des anticorps anti-TRAP et le QBC ont été réalisés à l'occasion des passages transversaux en fonction des saisons (pluvieuse ou sèche).

NB: En plus des antiors anti-TRAP et de la parasitémie, d'autres types d'anticorps ont été dosés à Safo (anti-corps anti-M6, M7, M11, F7 etc.. , fragments de la gp190,

antigène majeur de la surveillance du mérozoite de *P. falciparum*), durant ces deux passages transversaux.

- **A l'Hôpital Gabriel Touré**, nous avons effectué une étude Cas-Témoins. 86 cas ont été appariés à 340 témoins. La valeur prédictive de chaque signe et des anticorps anti-TRAP a été estimé en utilisant le ODD RATIO.

### **3.5 Approche des problèmes d'éthiques médicales.**

#### **- A Safo,**

Les cas fébriles ont été systématiquement traités avec du paracétamol avant les résultats du frottis (coloré et lu sur place ). Tout enfant parasité recevait gratuitement une dose curative de chloroquine et ou de sels de quinine, en fonction de la gravité. Les traitements et le suivi clinique étaient assurés par un médecin de notre équipe. Les prélèvements de sang n'étaient effectués qu' avec l'accord éclairé d'au moins un parent de l'enfant (père ou mère). Un contrat social était préalablement signé avec les chefs de famille et le chef de village, après plusieurs réunions de sensibilisation dans le village. L'adhésion des familles au protocole était totalement libre. Une consultation médicale gratuite était systématiquement organisée pour le reste de la population (même pour les familles non incluses dans le protocole de recherche). Le personnel de santé local a été intégré dans notre équipe durant nos activités de recherche. Ce qui a permis leur recyclage. Un équipement médical a été fourni au chef de poste médical de Safo et à la matrone rurale. Un dépôt pharmaceutique a été réalisé dans le village à partir de la liste des médicaments essentiels de l'initiative de Bamako. Le médecin chef de Kati, responsable sanitaire de la zone a été régulièrement informé de toutes nos activités dans le village.

-**A l'Hôpital Gabriel Touré**, nous avons obtenu également le consentement de la famille avant d'entreprendre tout traitement et prélèvement . Durant l'étude, toutes les précautions d'aseptie ont été conformes au recommandations de l'OMS (1992).

Tout le suivi clinique a été réalisé par l'équipe de pédiatres. Le laboratoire de biologie médicale de la pédiatrie a bénéficié d'un approvisionnement en réactifs et d'un microscope. Nous avons entièrement pris en charge tous les traitements des cas et des témoins durant leur hospitalisation.

### **3.6 Variables mesurées**

A Safo nous avons mesuré la parasitémie, l'âge, les anticorps anti-TRAP, anti-P190, et caractériser le type d'hémoglobine pour chaque unité statistique.

A l'Hôpital Gabriel Touré d'autres indicateurs ont été mesurés tels : le coma, la glycémie, l'évolution de la maladie, la tension artérielle, la température rectale, les anticorps anti-TRAP et anti-CSP.

### **3.7 Techniques biologiques**

#### **3.7.1 Goutte Epaisse et frottis mince:**

##### ***Matériel***

- Boîte OMS de conservation de lames,
- coton sec,
- alcool éthylique à 90°,
- eau tamponnée (ph=7,2),
- marqueurs indélébiles de couleur noire,
- feuilles d'identification
- lames porte-objets, dégraissées dans une solution l'alcool-éther.
- vaccinostyles stériles

##### ***Mode opératoire***

Avant la mission nous avons réalisé au laboratoire la récupération des lames et la préparation de l'eau tamponnée .

##### **\* Récupération des lames**

- tremper les lames au moins 48 heures dans une solution de détergeant ( OMO pour la lessive de 50 grs pour 500 lames à diluer dans une quantité 5 litres d'eau ),
- rincer ensuite à l'eau courante (se munir de gants),
- plonger dans un bac contenant une solution de dégraissage (alcool 90° et acide chlorhydrique à 10%) pendant 24 heures,
- rincer à nouveau à l'eau de robinet,
- placer dans une boîte à lame (100 lames par boîte),
- faire sécher durant une heure à l'incubateur à 75°,

- emballer et conserver à l'abri de la poussière et de l'humidité, par paquets de 50 lames.

\*Préparation de l'eau tamponnée

- prendre un litre d'eau distillée ou d'eau désionisée,
- transvaser dans un flacon en verre, à fond plat de 1 litre,
- écraser un comprimé tampon à l'aide d'un pilon dans un mortier, bien triturée de façon à obtenir une fine poudre,
- ajouter cette poudre dans le flacon contenant l'eau distillée,
- mettre une baguette magnétique et centrifuger durant quinze minutes à 750 tr/mn.

### ***Prélèvement de sang.***

Le premier jour est consacré à l'installation, la prise de contact et la sensibilisation de la population.

Le travail débute le lendemain dès 7h30. Il consiste à prélever le tout venant sans critère d'exclusion. La seule condition est d'être un résidant de SAFO. Nous mettons trois postes en place. Le premier s'occupe de l'enregistrement et de l'identification, le second se charge de la réalisation des trois examens c'est à dire, la goutte épaisse, le frottis mince et le QBC. Enfin le troisième concerne uniquement la clinique.

La goutte épaisse, le prélèvement s'effectue sur des lames préalablement dégraissées ou neuves. Pour réaliser la goutte épaisse, il faut se munir d'un coton imbibé d'alcool (pas en excès pour éviter de fixer le sang).

- aseptiser le pulpe du majeur (gauche pour un droitier et inversement),
- enlever le vaccinostyle stérile et piquer franchement sans hésitation, d'un coup sec et rapide,
- jeter le vaccinostyle dans le haricot (à l'abri des enfants),
- essuyer la première goutte de sang avec du coton sec,
- puis sur une lame qui repose sur une surface plane, déposer en son centre la deuxième goutte de sang de telle sorte que le volume fasse 20 microlitres,
- saisir une seconde lame par les bords entre le pouce et l'index afin que l'un de ces coins puisse servir à imprimer dans la goutte des mouvements circulaires croissants du centre vers la périphérie.
- exercer une pression suffisante pour qu'elle soit rayée quelque peu,

La préparation se trouve ainsi sur un support moins lisse et de cette façon mieux amarrée sans tendance au décollement au cours de la coloration. *Cette opération*

*s'appelle une défibrination mécanique.* Poursuivre le mouvement 15 à 30 secondes pour étaler la goutte à un diamètre de 1,5 centimètres .

- numéroté la lame.

Le frottis mince, s'effectue simultanément avec la goutte épaisse . Si le sang ne coule plus , exercer une pression à proximité de la piqûre;

- mettre une lame dégraissée et numérotée au crayon au contact de la goutte de sang ( sans que le doigt la touche),

- recueillir une goutte (10-15  $\mu$ l) à un centimètre de l' extrêmité portant le numéro d'identification,

- à l'aide d' une seconde lame , faire un angle de 45° devant l'étalement,

- grâce au majeur ou l'index de la main gauche soutenir la première lame au niveau du coin gauche en dessous de la goutte de sang,

- prendre la seconde lame, reculer en gardant toujours le même angle,

- dès le contact la goutte de sang, avec le bord de la lame, il s'étale par capillarité dans le dièdre formé,

- pousser régulièrement , et rapidement la seconde lame vers l'avant qui toujours par capillarité entraine le sang à sa suite,

- il s'étale avec continuité en s'épuisant vers l'extrêmité de la lame support,

- ainsi on obtient une queue de frottis arrondie, en formant une couche monocellulaire de globules rouges. cette zone est privilégiée pour l' observation microscopique de la morphologie et de la couleur des hématies parasitées et des stades parasitaires .

### La coloration

#### \* Goutte épaisse

Les gouttes épaisses sont colorées au laboratoire de préférence 24 heures après le prélèvement . Les lames sont acheminées chaque soir par notre véhicule qui assure la liaison entre le terrain et le laboratoire.

#### Matériels :

-flacon commercial de solution mère du colorant Giemsa à 3%

- éprouvette graduée (10 ou 20 ml)

-grande éprouvette graduée en plastique .

- bécher de 1 litre

- minuterie

- papier indicateur

- eau tamponnée (pH=7,2)

- ratelier
- bac de coloration (100 lames)

Mode opératoire:

La coloration est faite, soit par groupe de lames de 100 ou par lame isolée. Pour la coloration d'une lame la dilution est de: 2 ml d'eau distillée + 3 gouttes de Giemsa . pour colorer 100 lames, il faudrait remplir la boîte de rangement d'eau courante pour évaluer son volume (750 ml) :

- prendre 22,5 ml de Giemsa pour 727, 5 ml d'eau tamponnée,
- ranger les lames dans la boîte ventre contre dos,
- mesurer 727, 5 ml d'eau tamponnée,
- verser dans le broc et y ajouter 22,5 ml de Giemsa ( solution de Giemsa à3%)

A l'aide d'une éprouvette en verre ou en plastique mélanger pendant quelques secondes . Puis repartir uniformément le colorant le long de l'allée centrale qui sépare les deux rangées . Lorsque la boîte est remplie , recouvrir avec une plaque de plastique perforée . Laisser ainsi pendant 45 minutes à la température ambiante . A la fin du temps imparti , ajouter au niveau des trous l'eau distillée jusqu'à l' apparition de l'écume fluorescente à la surface des perforations . Agiter légèrement et incliner la boîte pour permettre l'écoulement du colorant .

- Rincer une seule fois à l'eau distillée .
- Retirer les lames et les disposer sur un ratelier .

La lecture s'effectue à l'objectif 100 à immersion.

\* Le frottis mince

Sur le terrain nous utilisons" l'hémacolor" qui est une technique rapide de la coloration du frottis . A la différence de la goutte épaisse , le frottis doit être toujours fixé au méthanol avant toute coloration . L'hémacolor est constitué de trois kits . Dans le premier on trouve le méthanol , de l'éosine pour le second et dans le troisième du bleu de méthylène . Le principe consiste à ouvrir le couvercle du méthanol et à y tremper trois fois la lame (quelques secondes ) . Laisser sécher trente secondes puis plonger dans l'éosine aqueuse deux à trois fois .

Laver dans le bac contenant l'eau tamponnée et passer six à huit fois dans le bleu de méthylène . Laver à nouveau dans l'eau tamponnée . La lecture peut être réalisée cinq minutes après .

Nous avons développé dans notre équipe une technique plus rapide, qui utilise le vert de malachite (14). En effet cette coloration ne nécessite que trente secondes, ce qui diminue considérablement l'attente des patients .

Le frottis et le QBC ont été utilisés pour le" screening" lors de notre enquête . Toute

personne déclarée positive est aussitôt traitée et prélevée pour le test in vivo de chimiosensibilité si la parasitémie périphérique excède 1000 trophozoïtes par mm<sup>3</sup> de sang .

**\* QBC (Quantitativite, Buffy , Coat)**

**Matériel**

- tubes capillaires contenant de l'acridine orange et un anticoagulant .
- portoir
- crayon à papier
- centrifugeuse
- parafuge
- paralens
- microscope à fluorescence
- étiquette
- paraviewer

**Mode opératoire:**

Une fois que les prélèvements du frottis et de la goutte épaisse sont réalisés ,

- presser le doigt pour recueillir le sang dans le tube capillaire,
- tenir le tube horizontalement , le rouler entre les doigts à plusieurs reprises afin que le sang puisse se mélanger avec la couche d'anticoagulant ,
- tourner le tube dans l'autre sens et l'incliner de sorte que le sang s'écoule vers l'extrémité revêtue du colorant orangé,
- rouler cinq fois le tube pour que le sang s'imprègne du colorant ,
- incliner légèrement le tube afin que le sang parcourt une distance d'au moins six mm dans le sens opposé du revêtement orangé pour permettre le bouchage du tube,
- boucher avec une fermeture en plastique , tourner en enfonçant le bouchon à la main , pour l'étanchéité .
- à l'aide d'une pince propre saisir un flotteur et l'insérer par l'extrémité libre,
- identifier l'échantillon sur une étiquette autocollante qui sera placée entre les deux traits blancs du tube,
- poser les tubes dans les rainures du rotor du centrifugeur en tenant compte de l'équilibre ; mettre le couvercle du rotor , fermer puis verrouiller .
- après cinq minutes arrêter la centrifugeuse , sortir les tubes et les ranger verticalement sur le portoir avec leur extrémité bouchée dirigée vers le bas .

### La lecture

- adapter le tube QBC centrifugé dans la rainure du “paraviewer” de sorte que l'extrémité bouchée dépasse la zone abaissée du porte-tube,
- poser le “paraviewer” sur la platine du microscope à fluorescence, porter l'objectif au x 50 ,
- ajouter deux à trois gouttes d' huile d'immersion d'optique à fluorescence,
- effectuer la mise au point sur la région du tube occupée par la couche leucocytaire,
- déplacer la platine de sorte que la partie supérieure de la couche érythrocytaire expansée se trouve dans le champ visuel.

### **\* ELISA pour le dosage des anticorps anti-TRAP**

#### Matériel

- coating Buffer
- blocking Buffer
- phosphate Buffer saline
- substrat : diéthanolamine
- spray pour le washing Buffer
- embouts jaunes et bleus
- micropipettes
- micropipettes d'éppendorf 20, 100 , 250 , 1000
- plaques flexibles à fond rond
- bécher en plastique
- pipette Pasteur
- agitateur
- chronomètre
- lecteur de plaque Titertek Multiskan plus
- boîtes rectangulaires pour incubation
- tubes Falcon de 50 ml et de 10 ml
- Titertek microplate Washer

#### Mode opératoire

\* Obtention de l'antigène.

Nous avons bénéficié pour l'obtention des antigènes TRAP de la collaboration de l'Institut parasitologique de ROME qui a réalisé la Polymérase Chain Reaction et le clonage .

Le génome de l'ADN de *P. falciparum* est extrait des cultures in vitro des isolats ITO4/Brasil. 0,1 microlitre de cet ADN sert de matrice pour l'amplification du codage

de la séquence de TRAP par la Polymerase Chain Reaction utilisant des conditions standards de réaction .

L'amplification a lieu dans un ordinateur programmé pour 30 cycles . Le fragment d'ADN résultant est purifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide , coupé avec le BamHI et HindIII et cloné dans le vecteur .

\*La technique ELISA .

- diluer l'antigène TRAP à la concentration de 5 ug / ml dans du tampon carbonate pour la "sensibilisation" (Coating) des plaques flexibles à fond rond,

- répartir 50  $\mu$ l par puits des antigènes dilués pour le "Coating Buffer" et incuber toute la nuit à + 4° ,

- laver 10 fois avec le tampon de lavage le "Washing Buffer",

- répartir du "Blocking Buffer" à raison de 200  $\mu$ l par puits et laisser agir 30 mn à 1 heure à la température du laboratoire,

- laver 10 fois au "washing Buffer",

- déposer 50  $\mu$ l du premier anticorps (sérum à tester) dans chaque puits dilué au 1/200 avec le 2 x PBS,

NB: Pour le contrôle positif on utilise l'anticorps anti-TRAP polyclonal de souris et le 2 x PBS pour le contrôle négatif .

- incuber pendant trente minutes à la température ambiante (chambre humide)

- laver 10 fois au "Washing Buffer",

- mettre dans chaque puits 50 $\mu$ l du deuxième anticorps marqué à la phosphatase alcaline dilué au 1/5000 : avec 2 x PBS

. antiglobuline anti-mouse-PA pour le contrôle

. antiglobuline anti-humain-PA pour les sérums testés.

-incuber trente minutes à la température ambiante (chambre humide).

- Laver 10 fois au "Washing Buffer",

Pour la révélation de la réaction Ac-Ag:

- répartir 50  $\mu$ l par puits de la solution du substrat; ajouter le 4 nitrophényl phosphate (poudre) au tampon diéthanolamine juste avant la réaction. Contrôler la réaction après quinze minutes.

-ajouter 50 $\mu$ l par puits de la solution d'arrêt de la réaction chromogène (Stop solution = EDTA 500 mM) juste après les quinze minutes.

La lecture se fait au spectrophotomètre (lecture horizontale), à la longueur d'onde de 405nm, et les résultats sont exprimés en densité optique (DO).

NB : Chaque sérum est répété 3 fois (3 puits par sérum pour les différents antigènes).

### **\* ELISA pour le dosage des anticorps anti-CSP**

#### Principe :

Le sérum dilué est placé dans les puits. La microplaque est ensuite mise à incuber. Si des anticorps spécifiques sont présents, pendant la phase d'incubation ils se combinent avec l'antigène fixé à la phase solide. Après élimination par lavage des substances non fixées, un anticorps anti-IgG humaine (provenant de la chèvre) conjugué à une enzyme-phosphatase alcaline (ALP) est ajouté.

Après lavage du conjugué non lié, la microplaque est mise à incuber avec une solution de substrat p-nitrophényl-phosphate (pNPP), lequel va réagir avec l'ALP pour former du P-nitrophénol

#### Matériel

- (NANP) 40 Microplate
- Sporozoïte Ig Negative Control Serum
- Sporozoïte Ig Medium Positive Control Serum
- Ig conjugate
- Washing Buffer
- Substrat
- Stop solution
- Fermeoir
- Couvercles pour plaques
- Pincettes
- Papier Log-Log
- Diluent concentré

#### Mode Opérateur

- préparer les dilutions des sérums des patients au 1: 201,
- laisser incuber 60 minutes à la température ambiante,
- distribuer en double 0,1 ml de chacun des sérums de contrôle négatif (puits B1-B12, moyen positif (C1-C2) et les échantillons dilués de patients,
  - placer les échantillons dans les puits adjacents. Les puits réservés au Blanc et à la courbe d'étalonnage (puits A1, A2, D1-H1 et D2-H2) doivent être remplis avec la solution de dilution (0,1ml / puits),
- couvrir la plaque avec le couvercle adhésif et l'agiter doucement une quinzaine de secondes à la main,
- laisser incuber 60 minutes à la température ambiante, puis laver les puits,
- distribuer les réactifs de la manière suivante :

- 0,1ml de solution de dilution prête à l'emploi dans les puits A1-A2; 0,1ml de la première dilution ALP-mAb ( au1/120) dans les puits D1-D2 puis les dilutions suivantes dans les puits E1 ,E2 -H1, H2,

-ajouter 0,1 mlde conjugué Ig dilué dans chaque puits réservé aux contrôles (B1-B2; C1-C2) et aux sérums des patients (A3-A4; H3-H4),

- couvrir la plaque avec le couvercle adhésif,

- laisser incuber 60 minutes à la température ambiante,

- faire de nouveau le même lavage.

#### Revélation de la réaction de coloration et lecture

- ajouter 0,1ml de solution de substrat, prête à l'emploi dans tous les 96 puits,

- recouvrir la plaque avec le couvercle adhésif (parafilm),

- laisser incuber 60 minutes à la température ambiante,

- retirer le couvercle adhésif,

- ajouter 25ul de solution d'arrêt dans chaque puits,

- utiliser un lecteur de plaques de microdosage,

- effectuer la lecture à une longueur d'onde de 405nm.

#### Schéma A

	1	2	3	4
a	D	D	S1	S1
b	N	N	S2	S2
c	P	P	S3	S3
d	D	D	S4	S4
e	D	D	S5	S5
f	D	D	S6	S6
g	D	D	S7	S7
h	D	D	S8	S8

D= Diluant ; P= Sérum ; N= Sérum de contrôle négatif.

### **3.8 Analyse des données**

La saisie et l'analyse de nos données ont été réalisées sur Epi info 5,1 et SAS 5-18

Nous avons utilisé les tests statistiques suivants :

- \* le Kappa statistique,
- \* le test de rang de Wilcoxon, et le test de Mantel-Hanzel,
- \* le test de Kruskal-Wallis, pour les variables quantitatives (taux d'anticorps),
- \* le test de Chi carré de Pearson pour la comparaison de fréquences,
- \* le ODD Ration pour la recherche de prédiction de protection,
- \* le Risque Alpha de première espèce a été fixé à 0,05 pour tous nos tests.
- \* la regression linéaire a aussi été utilisée.

### **3.9 Laboratoires et services associés**

- \* Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires, Prof. A. DIALLO,  
Prof. O. DOUMBO
- \* Services de pédiatrie de l'Hôpital Gabriel Touré, Prof. MM KEITA, Prof. T.  
SIDIBE
- \* Laboratoire de Biologie Moléculaire, Heidelberg (RFA), Prof. Doc. H.  
BUJARD.
- \* Laboratoire de Parasitologie, Rome (ITALIE), Prof. M. COLUZZI.

## **4. Résultats.**

### **4.1 Safo.**

#### **4.1.1 Résultats parasitologiques.**

Nous avons travaillé sur un échantillon de 161 personnes.

Les trois examens parasitologiques (frottis, QBC, goutte épaisse), ont été effectués simultanément sur 103 individus.

L'indice plasmodique était de 33,54% (54 / 161) dans notre échantillon à la goutte épaisse, au mois de juin 1992 .

La formule parasitaire était composée essentiellement de *P. falciparum* (90%) et de *P. malariae* (10%). Aucun cas de *P. ovale* n'a été détecté durant notre enquête de juin.

L'indice gamétoctaire était de 0,62% (1 / 161).

Sur les 103 personnes qui ont subi les trois épreuves parasitologiques, nous avons dénombré 14 porteurs de *Plasmodium* au frottis mince, 33 à la goutte épaisse et 41 au QBC.

Tableau I : Prévalence du portage du *Plasmodium* au frottis mince

FROTTIS	EFFECTIF	%
POSITIF	14	13,6
NEGATIF	89	86,4
TOTAL	103	100

Ce tableau nous montre sur un effectif de 103 personnes , 14 positifs au frottis , soit un taux de prévalence parasitaire au frottis mince de 13% .

Tableau II : Prévalence du portage de *Plasmodium* à la goutte épaisse

GE	EFFECTIF	%
POSITIFS	33	32,1
NEGATIFS	70	67,9
TOTAL	103	100

Dans ce tableau le taux de portage de plasmodies à la goutte épaisse était de 32% (33 / 103).

Tableau III : Prévalence du portage de *Plasmodium* au QBC.

QBC	EFFECTIF	%
POSITIFS	41	39,8
NEGATIFS	62	60,2
TOTAL	103	100

Le taux de prévalence parasitaire à la technique du QBC était dans notre échantillon de 39,8% (41 / 103).

Tableau IV : Comparaison de l'indice plasmodique entre les techniques de la GE et du QBC.

GE/ QBC	POSITIFS	NEGATIFS	TOTAL
POSITIFS	28	13	41
NEGATIFS	5	57	62
TOTAL	33	70	103

Pour les autres résultats analytiques, nous avons calculé la spécificité, la sensibilité et les valeurs prédictives, du QBC par rapport à la GE .

Se = 0, 84

Sp = 0,81

Vpp = 0, 68

Vpn = 0, 91

Nous avons par ailleurs évalué la concordance entre les deux techniques parasitologiques, en utilisant le test statistique KAPPA . Nous obtenons une statistique KAPPA de 0,62; ce qui représente une bonne concordance .

Tableau V : Comparaison entre les résultats du frottis mince et du QBC.

Frottis/ QBC	POSITIFS	NEGATIFS	TOTAL
POSITIFS	14	27	41
NEGATIFS	0	62	62
TOTAL	14	89	103

Se = 1

Sp = 0,69

Vpp = 0,34

Vpn = 1

Les mêmes analyses sont effectuées pour le QBC / FROTTIS . Pour leur degré de concordance, la statistique KAPPA est de 0,38.

La concordance entre les deux méthodes est très faible statistiquement pour les résultats positifs.

#### 4.1.2 Résultats immunologiques.

Les sérums ont été répartis en trois classes d'âge, les enfants de 2 à 5 ans , les adolescents de 6 à 14 ans et au dessus de 15 ans, les adultes avec des effectifs respectifs de 88, 66 et 39 .

Tableau VI : Comparaison des titres des anticorps anti-TRAP en fonction des groupes d'âge et des saisons à Safo.

GROUPE D'AGE		MAI			DECEMBRE			p <sup>b</sup>
		Q <sub>L</sub>	M	Q <sub>U</sub>	Q <sub>L</sub>	M	Q <sub>U</sub>	
Adultes	(n=88)	0,38	0,53	0,75	0,39	0,55	0,77	0,07
Adolescents	(n=66)	0,18	0,29	0,48	0,26	0,39	0,63	0,004
Enfants	(n=39)	0,15	0,20	0,37	0,23	0,36	0,56	0,001
				P <0,0001			P=0.001	

QL =lower quartile (Q1); Qu =upper quartile (Q3).

M =Medium (Médiane).

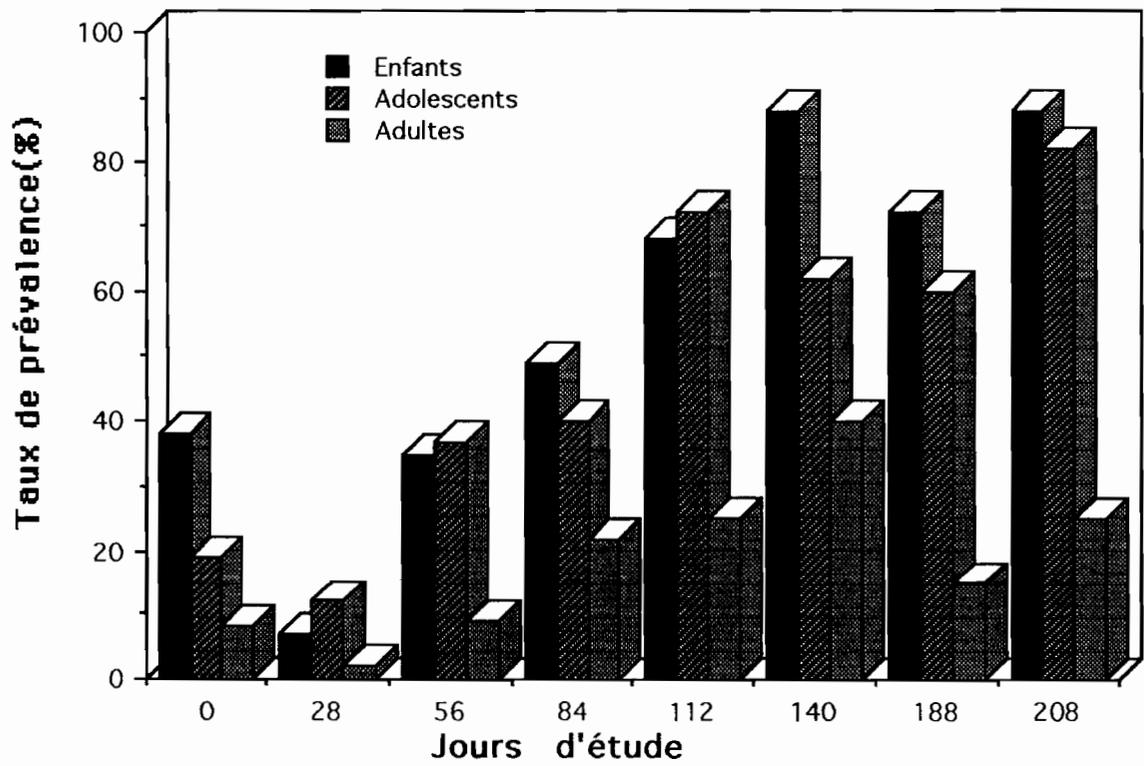
Ce tableau montre un taux élevé d'anticorps anti-TRAP chez les adultes au mois de Mai avant le début de la transmission . Ce pourcentage évolue légèrement entre Mai et Décembre (p=0,07).

Par contre dans le groupe des enfants et des adolescents le nombre des séropositifs pour les anticorps anti-TRAP augmente significativement durant cet intervalle (p<0,004; p<0,001).

La différence du taux d 'anticorps anti-TRAP entre les adultes et chacun des jeunes groupes d'âge est fortement significative (p<0001) .

Cependant la différence des taux de portage d' anticorps anti-TRAP entre les enfants et les adolescents est significative avant la période de transmission (p<0,03, au test bilatéral pour une distribution asymptotiquement gaussienne). Cette différence n'est pas significative au mois de Décembre (p>0,05).

**Figure4:** Taux de prévalence du paludisme dans les différents groupes d'âge en fonction de la saison.



**Tableau VII :** Comparaison des titres d'anticorps anti-TRAP au mois de Mai entre les individus parasités et non parasités

Age groupe	Parasités			Non-parasités			pb	
	QL	M	Qua	QL	M	Qua		
Adolescents (n=11)	0.21	0.38	0.57	(n=52)	0.17	0.29	0.44	0.2
Enfants (n=14)	0.22	0.33	0.55	(n=21)	0.14	0.18	0.22	0.005
	p =0.1			p = 0.002				

**NB:** Seuls 6 adultes étaient porteurs de plasmodies au mois de Mai, raison pour laquelle les adultes n'ont pas été inclus dans l'analyse de ce tableau.

Dans le groupe des adolescents, il n'existe pas de différence statistique significative entre les sujets porteurs de parasites et ceux à goutte épaisse négative, quant à leur taux d'anticorps anti-TRAP ( $p=0,2$ ). Par contre cette différence est très significative dans le groupe des enfants ( $p<0,005$ ).

La comparaison des taux de portage des anticorps anti-TRAP entre enfants et adolescents montre une différence statistique:

- non significative, en cas de portage de *Plasmodium* ( $p=0,1$ ),
- très significative, en cas d'absence de parasites dans le sang ( $p=0,002$ ).

Nous avons par ailleurs testé au vu de nos résultats, l'hypothèse selon laquelle "la présence des anticorps anti-TRAP dans le sérum avant la saison de transmission aurait un impact sur l'infestation palustre durant la saison de transmission".

Deux modèles d'analyse des données ont été utilisés:

- le premier modèle teste le fait que les anticorps anti-TRAP jouent un rôle essentiel dans la maintenance de l'immunité stérilisante; donc la première date d'apparition d'une parasitémie détectable par la microscopie est considérée comme le jour critique;
- le second modèle teste le contrôle possible des fortes parasitémies par les anticorps anti-TRAP; donc le jour critique est défini à partir de la date d'apparition d'une charge parasitaire supérieure ou égale à 5000 trophozoïtes de *P. falciparum* par mm<sup>3</sup>

L'analyse a été faite séparément pour les trois groupes de sujets. Le modèle de régression linéaire a été utilisé, en comparaison avec les données sur les anticorps anti-fragment F7 de la gp190 de la surface du mérozoïte (chez les mêmes individus).

Les variables confondantes telles que; les résultats de l'ELISA (anticorps contre les autres fragments de gp190 , M6, M7, M11 etc....), l'âge, l'Hb S, la parasitémie à J0 ; ont fait l'objet d'ajustement (standardisation), par groupe de sujets enquêtés.

La réponse immunitaire humorale contre laTRAP est une variable qui a un impact peu significatif dans le premier modèle, sur l'apparition de la parasitémie périphérique. Par contre dans le second modèle, deux paramètres immunologiques avaient un impact significatif sur la charge parasitaire périphérique , dans le groupe des adolescents.

Tableau VIII: Analyse de la valeur prédictive des anticorps anti-TRAP et anti-F7, pour le contrôle de la parasitémie<sub>a</sub> dans la population des adolescents dans le modèle II.

Facteur <sub>b</sub>	Risque-Relatif	95% de confiance	P
	Estimé <sub>c</sub>	Interv. de confiance	
TRAP	0,15	0,04 - 0,55	0,005
F7	8,98	2,23 - 36,2	0,002

- a.) Date à laquelle la parasitémie périphérique est  $\geq 5000$  TF / mm<sup>3</sup> pour la première fois;
- b.) Résultats dichotomiques du test ELISA à partir de la valeur seuil (sérums de contrôle),
- c.) Risque Relatif estimé  $< 1$  = indication d'une protection,  
Risque Relatif estimé  $> 1$  = indication d'une grande susceptibilité.

NB: Les résultats ainsi obtenus sur les sérums de Safo, nous ont reconforté dans l'hypothèse de valeur protectrice des anticorps anti-TRAP sur les formes graves de paludisme. Donc l'étude cas-témoins effectuée dans les services de pédiatrie de l'HGT venait à point nommé.

## **4.2 Résultats de l'Hôpital Gabriel Touré.**

### **4.2.1 Résultats Globaux.**

Nos patients étaient issus essentiellement des zones urbaines (237 enfants) et périurbaines (185 enfants) de Bamako. Les autres malades provenaient du milieu rural (52 enfants). Parmi les 1877 cas recensés au cours de notre étude dans les services de pédiatrie de l'HGT, nous avons inclus 479 enfants dans notre protocole, soit un taux d'incidence du paludisme maladie en milieu pédiatrique de 25,52% (479 / 1877).

Cent (100) cas fébriles à GE positive ont été exclus du protocole à cause des critères d'exclusion.

Cent vingt sept (127) cas graves présentaient un coma isolé dans notre série. Nous avons identifié un cas de coma avec des signes de choc, un cas de coma avec hypoglycémie et , deux cas de choc isolé.

Au total 86 cas graves ont été appariés à 340 témoins, en tenant compte de l'âge, du sexe et de l'origine géographique des enfants malades.

L'étude du degré d'homogénéité entre les deux groupes après appariement montrait:

- une moyenne des âges comparable dans les deux groupes; 5,5 ans chez les cas contre 5,7 ans dans le sous groupe des témoins (la différence des moyennes au test *t* de student n'était pas statistiquement significative,  $p > 0,05$ );
- une distribution des cas et des témoins comparable, quant à leur provenance géographique en fonction des mois de transmission ( $p > 0,05$ );
- une densité parasitaire à J0 statistiquement plus élevée dans le groupe des cas graves que celui des témoins ( $p = 0,033$ ).

#### **4.2.2 Résultats Cliniques.**

Tableau IX : Evolution de la température des 132 cas, en fonction des jours

	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
<b>MATIN</b>	38,9	37,7	37,2	36,8	36,9	37,2	37,1	36,8
	ET=1	ET=1,1	ET=1	ET=0,7	ET=0,6	ET=1	ET=1	ET=0,5
<b>SOIR</b>	38,4	37,8	37,1	37,1	37	37,1	37,2	37
	ET=1	ET=1	ET=1	ET=0,7	ET=0,6	ET=1	ET=0,6	ET=0,6

Ce tableau montre qu'à partir de J1, c'est à dire dès le deuxième jour de traitement , la température moyenne se normalisait , dans la population des enfants souffrant de paludisme grave. Ce temps de clairance thermique est celui habituellement obtenu durant le traitement aux sels de quinine.

Tableau X : Evolution clinique de la maladie dans les deux groupes.

Evolution	Cas	Témoins	Total
guérison	102	150	252
amélioration	0	94	94
aggravation	2	0	2
décès	22	0	22
inconnu	6	103	109
total	132	347	479

Le tableau montre qu'il existait plus de 75% de guérison chez les cas graves et 43,1 % dans le groupe des témoins ( $p < 0,01$ ). Nous avons enregistré 22 cas de décès durant les trois mois de suivi chez les cas, soit un taux de létalité hospitalière de 16,7% (22 / 132). Tous les décès sont survenus pour la plupart lors des deux premiers jours d'hospitalisation.

#### **Analyse des niveaux de coma.**

Cette analyse montre que la majorité des malades comateux sortaient de leur coma à partir de J4 au soir. Nous avons observé quelques particularités :

- un cas de coma score 1, qui réapparaissait à J5 au soir ;
- un cas de coma score 3 qui a persisté jusqu'à J6 au matin ;
- deux cas de coma score 4 qui ont persisté jusqu'à J7 au soir.

En outre nous avons observé lors de notre étude d'autres signes cliniques chez nos malades :

- 68 cas d'hépatomégalie, 22 cas et 46 témoins, soit respectivement 16,17% et 13,25% ( $X^2 = 0,65$ , ddl=1,  $p = 0,41$ ) ; il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes, quant à la présence de l'hépatomégalie.

- 50 cas de splénomégalie, 13 cas et 37 témoins, soit respectivement 9,84% et 10,7% ( $X^2 = 0,086$ ,  $p > 0,05$ ) ; la différence statistique n'est pas significative entre les deux groupes.

- 50 cas de pâleur conjonctivale, 13 cas et 37 témoins, soit respectivement 9,84% et 10,7% ( $\chi^2 = 0,08$ ,  $p > 0,05$ ). En outre 18 de ces malades ont été systématiquement transfusés (à cause de leur bas taux d'hémoglobine), soit 3,75% du total de nos malades.

- 3 cas d'ictère conjonctival, 2 cas et 1 témoin, soit respectivement 1,5% et 0,2%.

#### **4.2.3 Résultats Parasitologiques**

Tableau XI : Evolution de la charge parasitaire chez les malades de l'Hôpital Gabriel-Touré en fonction des Cas et des Témoins.

Jours	Cas		Témoins	
	effectif	M	effectif	M
J0	130	107018 ET=119874	344	72265 ET=91601
J3	88	0	239	330 ET=3404
J7	67	0	153	19 ET=158

L'analyse de ce tableau montre une négativation de la parasitémie à partir de J3 pour les cas et une réduction significative chez les témoins.

La comparaison des moyennes de la parasitémie entre les deux groupes montre qu'à J0 il existait une différence hautement significative ( $t = 1071,07$ ,  $p < 0,001$ ). Les enfants gravement malades de paludisme avaient en moyenne une parasitémie plus élevée.

La négativation de la parasitémie est nette dès le troisième jour de traitement chez tous les cas graves (sels de Quinine). Cette clairance parasitaire se poursuit jusqu'à J7, tandis que les témoins (Chloroquine orale) avaient une parasitémie décelable encore à J7.

Tableau XII : Répartition des classes de densité parasitaire à J0 dans les deux groupes (cas / témoins)

Classe de densité parasitaire	Cas	Témoins	Total
	Effectif	Effectif	
<500	1	5	6
500-5000	16	27	43
5000-50000	22	106	128
>50000	44	112	156
Total	83	250	333

Le tableau XII montre que la densité parasitaire à J0 est significativement plus élevée dans le groupe des cas graves que dans celui des témoins ( $\chi^2 = 8,68$ ; ddl = 3;  $p = 0,033$ ).

#### **4.2.4 Résultats immunologiques.**

##### **\* Anticorps anti-TRAP.**

Les deux groupes étaient comparables, quant aux variables, âge, provenance géographique et la période de transmission ( $p > 0,05$ ). Nous pouvons donc comparer leur réponse immunitaire contre la TRAP.

Tableau XIII : Comparaison de la réponse immunitaire humorale contre la TRAP entre les cas et les témoins.

	Cas	Témoins	
Séroconversion	Effectif	Effectif	Total
positifs	30	124	154
négatifs	56	131	187
Total	86	255	341

Ce tableau montre que les témoins ont un taux de portage des anticorps anti-TRAP, 48,62% (124/255) significativement plus élevé que les cas graves 34,88% (30/86); ( $\chi^2 = 4.91$ , ddl = 1,  $p = 0.036$ ).

Le ODD RATIO est de 1,766 (IC = 1,035 - 3,013). Le risque de portage des anticorps anti-TRAP est 1,76 fois plus élevé chez les témoins que chez les cas.

Tableau XIV : Comparaison de la réponse immunitaire humorale contre la TRAP en fonction des mois .

Mois	Séropositifs	Séronégatifs	Total
août	21	19	40
septembre	45	71	116
octobre	76	89	165
novembre	12	7	19
Total	154	186	340

Il n'existe pas de liaisons statistiques significatives entre la fréquence de portage des anticorps anti-TRAP en fonction des mois de la saison des pluies 1992, ( $\chi^2 = 5,30$ ; ddl=3,  $p = 0,15$ ).

*Notons cependant que le plus grands nombre de cas de paludisme maladie dans notre échantillon a été observé au mois d'octobre, c'est à dire en fin de saison des pluies (soit 165 cas sur 340) .*

Tableau XV : Comparaison de l'évolution clinique en présence ou en absence d'anticorps anti-TRAP.

évolution	Séropositifs	Séronégatifs	Total
	Effectif	Effectif	
guérison	70	102	172
amélioration	38	31	69
décès	2	12	14
Total	110	145	255

L'analyse de ce tableau montre que la présence d'anticorps anti-TRAP a une valeur prédictive sur l'évolution clinique de la maladie ( $X^2= 9.17$ , ddl = 2 , p = 0,0102). *En effet le nombre de décès est statistiquement plus élevé chez les enfants souffrant de paludisme grave avec un taux bas d'anticorps anti-TRAP.*

Tableau XVI: Classe de densité parasitaire à J0 en fonction de la présence ou non d'anticorps anti-TRAP.

Densité Parasitaire	Séropositifs Effectif	Séronégatifs Effectif	Total
<500	2	3	5
500-5000	21	20	41
5000-50000	59	71	130
> 50000	71	87	158
Total	153	181	334

*Ce tableau montre que la présence d'anticorps anti-TRAP n' influe pas significativement sur la charge parasitaire ( $X^2= 0,69$ , ddl= 3, p= 0,89 ), en milieu hospitalier dans la population de malades paludéens.*

**\* Anticorps anti-CSP.**

Tableau XVII : Comparaison de la réponse immunitaire humorale contre la CSP selon la période de transmission

Mois	Séropositifs		Séronégatifs
	Effectif	Effectif	Total
août	15	25	40
septembre	45	71	116
octobre	39	121	160
novembre	4	15	19
Total	103	232	335

L'analyse de ce tableau montre que la fréquence des séropositifs à la CSP , varie significativement en fonction de la période de transmission ( $X = 8.27$   $p = 0,04$  ). La prévalence de portage des anticorps anti-CSP est plus élevée aux mois de Septembre et d'Octobre.

**\* Corrélation anticorps anti-TRAP versus anti-CSP,**

Tableau XVIII: Comparaison du taux des anticorps anti-TRAP et anti-CSP.

		TRAP		
		Négatifs	Positifs	Total
C S P	Négatifs	132	100	232
	Positifs	52	51	103
	Total	184	151	335

Il n'existe pas de liaison statistiquement significative entre les taux des anticorps anti- TRAP et anti- CSP ( $X^2 = 0,94$ ,  $ddl=1$ ,  $p=0,33$  ).

## **5. Discussion.**

### ***AU niveau méthodologique,***

Nous avons commencé notre étude par celle de Safo afin de tester nos hypothèses d'abord sur des sujets infestés par *P. falciparum*, non malades. Le temps qui s'est écoulé entre les prélèvements des sérums et le dosage des anticorps anti-TRAP s'explique par le fait que la protéine n'avait pas été encore caractérisée, sur le plan de sa composition en acides aminés.

Ce sont les résultats de cette étude d'observation à Safo, qui nous ont permis de générer les hypothèses que nous avons testées dans les services de pédiatrie de l'HGT. Le couplage avec l'étude sur la technique du QBC est dû essentiellement à l'efficacité d'une telle enquête. En effet, vu notre degré d'intégration dans le village de Safo, la population acceptait sans difficulté de subir en même temps les trois prélèvements (GE, FM et QBC).

Nous avons choisi l'Hôpital Gabriel-Touré du fait que tous les services de pédiatrie s'y trouvent. La population de 1 à 12 ans représente la tranche d'âge la plus exposée au paludisme grave dans les régions sub-sahariennes (13, 14, 21). Par ailleurs en 1989, HAÏDARA A.Y. et coll. (21), avaient montré que le paludisme était responsable de 49,07% des convulsions fébriles chez les enfants de 1 à 14 ans.

Le travail a été conduit par l'unité parasitologique et l'équipe de pédiatres pour dépister les cas, assurer leurs traitements et le suivi clinique. Nous avons intégré cette équipe pour la récolte de données, en tant que pharmacien thésard.

L'hétérogénéité de notre échantillon (urbain, péri-urbain et rural) à l'HGT, s'explique par le fait que tous les cas graves d'enfants malades sont référés à cet hôpital. L'infestation des enfants urbains se fait probablement par un séjour en campagne (vacances), puisque la ville de Bamako est impropre à l'impaludation (14).

Par contre à Safo, l'étude a concerné une cohorte de 200 individus répartis dans 27 familles consentantes. Ce "pacte social" avec les villageois de Safo a été un des facteurs déterminants de la réussite du suivi de la cohorte (4, 26).

Le fait de mesurer les anticorps anti-TRAP à Safo parallèlement avec ceux de la P190, s'explique par le fait que ces deux protéines sont toutes deux impliquées dans la protection contre les formes graves du paludisme à *P. falciparum* (15,26,28).

La présence d'homologie avec la CSP, explique la recherche de corrélation entre les anticorps anti-TRAP et anti-CSP, dans la population de malades en pédiatrie (5,10, 12,16,17).

A l'HGT, certains parents ont refusé que leurs enfants intègrent le protocole de notre recherche et cette volonté a été respectée à cause des closes prévues lors de l'identification des problèmes d'éthiques médicales.

### ***Au niveau des résultats,***

\* Au plan parasitologique, le village de Safo, avec un indice plasmodique de 32%, à la GE était à un niveau mésoendémique (Tableau II) en 1992. L'indice plasmodique était autour de 72% en 1989 (27) et 50% en 1990 (3, 4, 14). Il y a une nette diminution de l'Indice Plasmodique à Safo au fil des années. Cette réduction de l'IP à Safo, pourrait s'expliquer par un effet de cohorte et d'une pression médicamenteuse, induite par notre équipe.

Dans notre étude, nous avons trouvé qu'il existe une assez bonne concordance entre les résultats parasitologiques obtenus par la GE et le QBC, sur le terrain ( $\kappa = 0,62$ ). Par contre, cette concordance est médiocre entre le QBC et le frottis mince ( $\kappa = 0,38$ ).

Certains auteurs ((24,25,29,42) ont trouvé que le QBC était plus sensible et plus spécifique que la goutte épaisse. Un fait troublant pourtant est que, dans la majeure partie des travaux et publications portant sur la comparaison des deux techniques, nous avons souvent des résultats de QBC positifs qui sont négatifs à la goutte épaisse (1, 9, 29, 42). Ce qui confirme peut être la plus grande sensibilité du QBC, trouvée par certains auteurs (1,42). Pour notre part, ces discordances sont peut être à mettre au compte des erreurs d'identification des plasmodies au QBC (faux positifs ?). Mais l'existence de résultats négatifs au QBC et positifs à la goutte épaisse est aussi signalée dans de nombreuses études(1, 9, 29,42). Ce qui remet en cause l'affirmation de la plus grande sensibilité de la technique du QBC par rapport à la GE. Ainsi en Iran Jaya, BAIRD et al., (1) trouvaient sur 65 gouttes épaisses à Plasmodium, que seulement 49 confirmées par le QBC. Ils avaient 16 faux négatifs au QBC. Le même phénomène est observé en milieu hospitalier à Bujumbura (9). A Safo, lors de notre étude nous sommes arrivés au même constat: sur 13 résultats positifs au QBC, tous étaient négatifs à la goutte épaisse. De même 5 personnes positives à la goutte épaisse sont négatives au QBC.

Pour expliquer cette dualité, COOSMAN (9.) l'attribue aux corps de JOLLY, c'est à dire les débris de leucocytes qui par leur fluorescence peuvent donner de faux positifs.

Nous constatons que sur les cinq positifs à la goutte épaisse et trouvés négatifs au QBC, la parasitémie n'excédait guère 75 trophozoïtes par microlitre. A partir de 100 trophozoïtes par microlitre le QBC est toujours positif. Le seuil déterminé à Safo correspond à celui trouvé aux Philippines par RICKMAN et al. (36).

D'autres études réalisées dans différents pays proposent comme seuil :

- de 60 parasites /mm<sup>3</sup> en Iran Jaya, Wongsrichanalai et al. 1991 (46)

- de 30 parasites /mm<sup>3</sup> en Thaïlande (46).

D'autre part, la technique de la goutte épaisse permet une quantification parasitaire; ce qui est difficilement réalisable par le QBC. Un technicien expérimenté peut faire un diagnostic d'espèces plasmodiales à la goutte épaisse (entre *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale* et ou *P. vivax*). Ceci est quasi-impossible au QBC (34).

Le QBC ne présente donc pas d'intérêt majeur par rapport aux techniques parasitologiques classiques. En plus, il nécessite plus de matériel sur le terrain et demande un technicien très expérimenté, sinon les facteurs de confusion sont très nombreux (9, 1,36).

Dans notre étude de Safo, nous avons mis en évidence l'intérêt des anticorps anti-TRAP sur les fortes parasitémies dans le modèle II (Tableau XVII). Qu'il existe une évolution significative des niveaux d'anticorps dans les trois groupes en fonction des saisons ( $p < 0,001$ ). Cette différence de taux est statistiquement significative entre adultes et les deux autres groupes (enfants et adolescents, Tableau XVI).

A l'HGT, les cas graves de paludisme ont en moyenne une fréquence de séropositivité en anticorps anti-TRAP, plus basse que ceux des témoins ( $p = 0,036$ ). De même la présence ou l'absence de l'anticorps anti-TRAP corréle significativement avec l'évolution clinique de la maladie. De plus, la majorité des décès se rencontre chez les cas qui ont une faible séropositivité à la TRAP. Tous ces éléments nous suggèrent un rôle protecteur de la TRAP comme COWAN l'indique si bien (10).

La fréquence de la séropositivité de la CSP varie, dans notre échantillon, significativement en fonction des mois de la transmission. FRÜH (16) parle de "short lived" en dehors de toute infestation. HOFFMAN et coll la définissent comme induisant une protection incomplète des anticorps anti-CSP (27).

En calculant les moyennes des UIE des séropositifs à la CSP dans les deux groupes suivants :

- groupe à évolution favorable (guérison+amélioration) UIE=9179
- groupe des cas de décès UIE=3407

Nous obtenons une différence significative entre ces deux moyennes ( $t=42,22$   $p=0,039$ ). Ce qui nous permet de suggérer que le titre élevé des anticorps anti-CSP peut être considéré comme un indicateur d'une évolution clinique favorable. A Safo nous avons également obtenu une variation significative des titres d'anticorps anti-TRAP en relation avec la recrudescence saisonnière de l'infestation chez les adolescents et les enfants. Par contre cette augmentation de la séropositivité à la TRAP en fonction de la saison n'est pas significative.

A la différence de la CSP et de la GP 190 les adultes possèdent un taux élevé d'anticorps anti-TRAP dès le mois de Mai qu'ils conservent durant la transmission avec une légère augmentation en fin d'infestation. La GP190 a une vie brève (8, 12,16, 27). Sous l'induction d'un stimulus antigénique en période de transmission maximum nous obtenons un pic de la réponse immunitaire. La GP190 ne procure pas un bénéfice protecteur saisonnier malgré un taux élevé des anticorps des enfants avoisinant celui des adultes, ils présentent une charge parasitaire élevée (16, 27 ,3). Comme la TRAP, les anticorps anti- GP190 n'influent pas significativement sur la parasitémie, dans la population des enfants. La réponse immunitaire de la GP190 est quantitative et non protectrice (16, 27) .

D'autre part signalons que dans toutes ces études, seule l'immunité humorale a été explorée. Ceci ne traduit toujours pas la réalité biologique. La détermination de la réponse cellulaire, donc de l'épitope des lymphocytes T sur la TRAP est une étape indispensable.

Il ressort de notre étude deux points saillants qui suscitent un intérêt scientifique fondamental et pratique:

- le rôle protecteur contre les formes graves de *P.falciparum* du portage des anticorps anti-TRAP,
- les anticorps anti-TRAP pourraient constituer un bon indicateur biologique de la prédiction clinique, lors du paludisme,

Nous n'avons pas mis en évidence dans notre étude une corrélation significative entre le niveau des anticorps anti-TRAP et celui de la CSP (Tableau XV). La CSP est la protéine majeur de la surface du sporozoïte , elle porte un épitope immunodominant retrouvé chez tous les types de sporozoïtes isolés et examinés (11, 16) .

De même , la TRAP initialement décrite comme une protéine des formes sanguines , vient d'être mise en évidence chez les sporozoïtes . Au point de vue génétique , la CSP et la TRAP possèdent en commun la séquence W S P C S V T C G (37, 38, 41), laquelle correspond à la région hautement conservée qui est caractéristique des propriétés adhésives des cellules (38, 41). En outre le RGD , motif qui est spécifique de plusieurs glycoprotéines adhésives comprises dans les cellules de reconnaissance , se retrouve au niveau de la TRAP (38, 41)

Elle est la première protéine plasmodique avec cette séquence (37) . DAME et al 1984 , décrit ce motif également dans la région II de la CSP (11). Au niveau du mode d'action , selon ROBSON la CSP détermine la spécificité des interactions entre le parasite et les cellules hépatiques (38) .Un possible rôle de laCSP est la reconnaissance et l'entrée dans les cellules hépatocytaires (22) . Les peptides synthétiques de la région I du CSP se lient spécifiquement in vitro aux hépatocytes (22, 39) . Cependant des anticorps anti-TRAP inhibent l'invasion des sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* dans les hépatocytes (41) . Sur le plan immunitaire au niveau de la TRAP , des volontaires humains ont été immunisés avec des sporozoïtes entraînant la production d'anticorps qui reconnaissent la protéine TRAP et induisent une prolifération de leucocytes sanguins à la périphérie en réponse à la TRAP (10) . La même expérience avec la CSP montre le pouvoir immunogène de cette protéine dont les anticorps produits selon WEBSTER H.K et coll 1987 (27) ont une brève durée de vie . On note une faible réponse des lymphocytes T cytotoxiques à la CSP (27) . Par contre COWAN G. et al., suggèrent que l'antigèneTRAP existant à la fois au niveau du foie et des formes sanguines devraient entraîner une réponse des lymphocytes T cytotoxiques plus fortes et plus protectrices (10) .

Toutes ces analogies permettent d'entrevoir une possibilité d'action synergique en associant les deux protéines afin de potentialiser la réponse immunitaire et assurer ainsi une protection complète . Mais cette hypothèse théorique n'a pas été confirmée par nos résultats d'observation.

De nos résultats cliniques obtenus à Gabriel-Touré, il ressort une évolution clinique satisfaisante avec une normalisation de la température à J1. Le traitement a été essentiellement à base de chloroquine pour les témoins à la dose de 25 mg / kg répartie sur 3 jours et de sels de quinine pour les cas principalement à la dose de 25mg / kg répartie sur trois jours ou pour certains substitué par la chloroquine après le premier jour.

Notre étude dénote le bien-fondé de cette thérapeutique et montre par ailleurs que les sels de quinine sont actifs sur les souches maliennes de *Plasmodium falciparum*. Chez les témoins 4 malades portaient encore des trophozoïtes à J7. Il serait prudent de ne pas se lancer sur la voie d'une quelconque résistance le traitement ayant lieu à domicile. Un fait important est la présence de schizontes de *Plasmodium malariae* sur six lames.

Au cours de l'étude nous avons enregistré sur trois mois 22 décès parmi les cas et aucun chez les témoins. DEMBELE (13) dans une étude similaire en milieu pédiatrique réalisée dans le même hôpital sur toute l'année 1990 a déterminé une létalité de 25,04%. Sur le plan parasitologique, la densité parasitaire à J0 est significativement plus élevée chez les cas.

Ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle une parasitémie très élevée est corrélée avec un plus grand risque de paludisme grave (41).

## **6 . CONCLUSION et RECOMMANDATIONS**

Il ressort de notre étude :

### ***Sur le plan parasitologique,***

- que le QBC semble plus sensible et plus spécifique que le frottis mince,
- que la goutte épaisse est plus sensible et plus spécifique que le QBC,
- qu'il existe de faux positifs au QBC,
- qu'il existe un seuil de parasitémie périphérique en dessous duquel le QBC manque de sensibilité ( 75 trophozoïtes / mm<sup>3</sup> de sang).

### ***Sur le plan immunologique ,***

#### **A Safo**

- Les adultes possèdent un taux élevé d'anticorps anti-TRAP au mois de Mai qui augmente significativement au cours de la transmission. Ils présentent la plus faible prévalence parasitémique.
  - On assiste à une élévation considérable de ce taux pendant la transmission dans les deux jeunes groupes d'âge sans toute fois atteindre celui des adultes.
- Les enfants présentent la plus grande prévalence parasitaire durant toute l'année.
  - L'influence de la saison , de l'âge sur la réponse immunitaire de laTRAP est manifeste. De même nous notons la liaison entre le taux d'anticorps anti - TRAP et la prévalence du paludisme.

### **A l'hôpital Gabriel-Touré**

- les moyennes d'âge entre les cas et les témoins sont comparables,
- la période de transmission n'a pas d'effet sur la séropositivité,
- la présence d'anticorps anti-TRAP corrèle significativement avec l'évolution clinique de la maladie, les séropositifs ont une évolution clinique plus favorable,
- la fréquence des séropositifs à la CSP varie significativement en fonction de la période de transmission,
- il n'existe pas de liaison statistique entre la séropositivité à la TRAP et celle de la CSP,
- aucun cas de décès n'a été enregistré chez les témoins,
- au cours des trois mois d'enquête 22 décès sont survenus chez les cas ce qui représente 16,6% des cas et 4,59% de l'échantillon,
- les sels de quinine sont actifs sur les souches plasmodiales maliennes.

Ces résultats préliminaires encourageants nous incitent à faire quelques recommandations.

- Poursuivre cette étude sur toute l'année pour mieux apprécier les variations saisonnières du taux des anticorps anti-TRAP et anti-CSP,
- Développer les techniques simples de dosage des anticorps anti-TRAP et anti-CSP au Mali,
- Associer systématiquement l'immunologie spécifique des ces anticorps à la parasitologie lors des enquêtes épidémiologiques palustres,
- Tester le QBC en milieu hospitalier sur un très grand échantillon (envion 500),
- Continuer à participer à la recherche de protéines candidates aux vaccins anti-paludiques.

## **7. Références**

- 1- BAIRD J. K., PARNOMO and TREVOR R. J.  
Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy of QBC capillary tubes.  
*Am. j. trop. med. hyg.*, 1992, 86 : 3-5
  
- 2- BERENDT A. R., SIMMONS D., NEWBOLD C.I., TANXY J. and MARSH K.  
Intercellular adhesion molecule (ICAM-1) is an endothelial cytoadherence receptor for *Plasmodium*.  
*Nature, lond.* , 1988 , 335 : 82-85
  
- 3- CAMARA F.  
Evolution de la chimiosensibilité des souches maliennes de *Plasmodium falciparum* aux amino-4-quinoléïnes de 1985 à 1991.  
*Thèse de doctorat en médecine*, Bamako , 1991.
  
- 4- CARNEVALE P., ROBERT V., BOUDIN C., HALNA J.M., PAZART L., GAZIN P., RICHARD A. et MOUCHET J.  
La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides au Burkina Faso.  
*Bull. soc. path. ex.*, 1988, 81 : 832-846
  
- 5- CERAMI, FEVERIC C.U., SINNIS P., TAKACS B., CLAVIJO P., SANTOS M.J. and WUSSENZWEIG V.  
The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptor for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoite.  
*Cell.*, 1992, 70: 1021-1033
  
- 6- CHARMOT G.  
Physiopathologie du paludisme à *Plasmodium falciparum*.  
*Cahiers de santé*, 1991, 1 : 117-123
  
- 7- CHEVALIER B., CAVALLO J.D., BAUDET J.M., SAMSON T., GROS P., CREEN Y. and MEYRAN M.  
Rapid diagnosis of malaria. The microwave furnace.  
*Bull. soc. path. ex.*, 1992, 85(3) : 223-225

8- CLYDE D.F., MC CARTHY V.C., MILLER R.M. and WOODWARD W.E.  
Immunization of man against *P. falciparum* and *vivax* malaria by use of  
attenuated sporozoite.

*Am.j.trop.med.hyg.*, 1975, 24 : 397-401

9 -COOSEMANS M., MANGELSHOTS E. and WENG M.

Valeur du test "quantitative buffy coat" comme méthode de diagnostic microscopique  
du paludisme.

*Ann.soc.belge.med.trop.*, 1991, 71 :325-328

10- COWAN G., KRISHNA S., CRISANTI A. and ROBSON K.

Expression of thrombospondin-related anonymous protein in  
*Plasmodium falciparum* sporozoite.

*Lancet*, 1992, 339 : 1412

11- DAME J.B, WILLIAMS J.L., CUTCHAN M.C., WEBER T.F., WIRTZ

R.A., HOCKMEYER W., MALOY W.L., HAYNES J.D., SCHENEI-

-DER I., ROBERTS D., SANDER G.S., REDDY E.P., DIGGS C.L. and MILLER L.H.

Structure of the gene incoding the immunodominant surface antigen  
on the merozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.

*Science*, 1984, 225 : 593-599

12- DEANS A.J. and COHEN S.

Immunology of malaria.

*Ann.rev.microbio.*, 1983, 37: 25-29

13- DEMBELE G.

Place du paludisme dans les hospitalisations pédiatriques de l'hôpital  
Gabriel Touré de Bamako durant 12 mois (janvier-décembre 1990)

*Thèse de doctorat en medecine*, Bamako 1991.

14-DOUMBO O.

Epidémiologie du paludisme au Mali , Etude de la  
chloroquinorésistance, Essai de stratégie de contrôle basée sur  
l'utilisaton de rideaux imprégnés de perméthrine associée au  
traitement systématique des accès febriles.

*Thèse de Doctorat Sciences Biologiques*, Montpellier II, 1992.

## 15- DRUILHE

Intérêt des nouveaux tests immunologiques appliqués à l'étude de l'épidémiologie du paludisme humain.

*Ann.soc.belg.med.trop.*, 1985, 65 (2) :223-233

## 16- FRÜH K., DOUMBO O., MÜLLER H.M., KOITA O., MC BRIDE J., CRISANTI A., TOURE Y., and BUJARD H.

Human Antibody Response to the Major Surface Antigen of *Plasmodium falciparum* is strain Specific and Short-lived.

*Am.microb.*, 1991, 59(4) :1319-1324

## 17 -GOUNDIS D. and REID K.B.M.

Properdin, the terminal complement components, thrombospondin and the circumsporozoite protein of malaria parasite contain similar sequence motif.

*Nature, lond.*, 1988, 335; 82-85

## 18- MC GREGOR I.A.

Mechanisms of acquired immunity and epidemiological patterns of antibody response in malaria immun

*Bull.who* , 1974,50:259-266

## 19- MC GREGOR I.A.

The development and maintenance of immunity to malaria in highly endemic areas.

*Ann.trop.med.hyg*, 1986 (1) :29-53

## 20- HADLEY T.J. and MILLER L.J.

Invasion of Erythrocytes by malaria parasites . Erythrocyte ligand and Parasite receptor .

*Prog.allergy*, 1988,41 : 49-71

## 21- HAÏDARA S.A., DOUMBO O., TRAORE A.H.? KOITA O., DEMBELE M., DOLO A., PICHARD E. et DIALLO A.N.

Place du paludisme dans les syndromes fébriles en médecine interne à l'hôpital du point G.

*Med.d'afrique noire*, 1991, 38(2):

22- HOLLINGDALE M.R.

Biology and immunology of sporozoite invasion of liver cells and exoerythrocytic development of malaria parasites

*Prog.allergy*, 1988, 41 : 15-48

23 -JEFFREY D.C. and OCKENHOUSE C.F.

Host receptors for Malaria-infected Erythrocytes

*Am.j.trop.med.hygiene*, 1990,43(2) :6-14

24- KAWAMOTO F.

Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter.

*Lancet*, 1991, 337(8735) : 200-202

25- LONG G.W., JONES T.R., RICKMAN L.S., TRIMMER R. and HOFFMAN S.L.

Acridine orange detection of *Plasmodium falciparum* malaria : relationship between sensitivity and optical configuration.

*Am.j.trop.med.hygiene*, 1991, 44(4) :402-405

26- MÜLLER H.M.,FRÜH K., DOUMBO O. LYON J.A. and BUJARD H.

The human Antibody Response Against the Major Merozoite Surface Antigen of *P. falciparum* Mainly Directed Against non conserved sequences.

*Behring inst.mitt*, 1991,58: 157- 160

27 -N'DIAYE M.

Contribution à l'étude des anticorps naturels anti-P190 antigène majeur de la surface du mérozoïte de *Plasmodium falciparum* (Welch 1897)

*Thèse de doctorat en pharmacie*, Bamako 1989.

28- PATARROYO E.M., AMDOR R., CLOWIYO P., MORENO, GURMAN.F.

ROMEO P.,TASCAN R., FRANCO A., MURILLA L.A., PONTON G.,and TRUZILLO.G.

A synthetic vaccine protects humans against challenge with Asexual blood stage of *Plasmodium falciparum* malaria.

*Nature*, 332 : 156-161

29- PARZY D., RAPHENON G., MARTET G., NICOLAS P., TOUZE J.E.,  
BAUDON D. and LECAMUS J.L.

The quantitative Buffy Coat test (QBC). Monofluo Kit falciparum.  
Comparative value in the rapid diagnosis of malaria.

*Med.trop*, 1990, 50(1) :97-102

30 - PERKINS M.E. and ROCCO L.J.

Sialic acid dependent binding of Plasmodium falciparum merozoite  
surface antigen *P. falciparum* to human erythrocytes

*The journal of immunology*, 1988, 141: 3190-3196

31 - PIERSCHBACHER M.D. and ROUSLAHTI E.

The cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small  
synthetic fragments of the molecule

*Nature london*, 1984(309) : 30-33.

32 - PIETRAY., PROCACCI P.G.

Impact de l'utilisation des rideaux imprégnés de perméthrine sur le  
paludisme dans une zone rurale de haute transmission au BurkinaFaso.

*Bull.soc.path.ex*, 1991, 84 :375-385

33- POGGENSEE V. and SCHÜLER D.

Rapid diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy, of  
QBC capillary tubes

*Am.j.med.hyg* , 1992, 86:3-5

34- RAPHENON G. et OUEDRAOGO J.B.

Application aux enquêtes paludométriques d'un nouveau test  
diagnostique rapide du paludisme à l'Acridine Orange. Le QBC  
test(quantitative Buffy Coat) de Becton-Dickinson.

*Pharm. afr*, 57 : 35-38

35- RICH A.K., GEORGE IV F.V., LAW J.L. and MARTIN W.J

Cell adhesive motif in region II of malaria circumsporozoite  
protein.

*Science*, 1990, 249 : 1574-1577

- 36- RICKMAN L.S., OBERST R., SANGALANG R., CHULAY J.D., LONG G.W., CABANBAN A., SMITH J.I. and HOFFMAN S.  
Rapid diagnosis of malaria by Acridine Orange staining of centrifuged parasites  
*the lancet*, 1989, 14 :68-71
- 37-ROBSON K. J.H., HALL J.R.S., DAVIES L.C., CRISANTI A. , HILL A. V.S. and WELLEMS T.E.  
Polymorphism of the TRAP gene of *Plasmodium falciparum*  
*Proc.r.soc.lond.B*,1990, 242:205-216
- 38- ROBSON K.J.H., HALL J.R.S., JENNINGS M.W., HARRIS T.J.R. MARSH K., NEWBOLD C.I., TATE V.E.and WEATHERALL D.J.  
A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin, and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite.  
*Nature*, 1988, 335 : 79-82
- 39- ROGERS W.O., MALIK A., MELLOUK S., NAHAMURA K., ROGERS M.D. , SZARFMAN A., GORDON D.M., NUSSLER A.K. AIKAWA M. and HOFFMAN S.L.  
Characterization of *Pasmodium falciparum* sporozoite surface protein2.  
*Proc.natl.acad.sci.usa* , 1992, 89 : 9176-9180
- 40 - SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J, HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. and ERLICH H.A.  
Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymérase.  
*Science*, 1988, 239: 487-491
- 41-SCARCELLI E., PROSPRO E. and BUJARD H.  
Unpublished observation,1990.
- 42- SPIELMAN A., PERRONE J.B., TEKLEHUIMANOT A.W., BALCHA F., WURDLAW S.C. and LEVINE R.A.  
Malaria diagnosis by direct observation of centrifuged samples of blood.  
*Am.j.trop.med.hygiene* , 1988, 39(4) : 337-342

- 43 - STUBER D., MUTILE H. and GAROTTA G.  
System for high level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant protein : Application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure-function analysis.  
*Immunological methods, Academic Press Inc, Orlando, Fla, 1990, 4* : 121-152
- 44- TOUNKARA A.  
Contribution à l'étude de récepteur erythrocytaire du *Plasmodium falciparum*.  
*Thèse de doctorat 3<sup>ème</sup> cycle, université Paris VII, 1987.*
- 45 - TRAGER W. and JENSEN J.B.  
Human malaria parasite in continuous culture.  
*Science, 1975, 193* :673-675
- 46 - ZAVALA F., TAM J.P. and MASUDA A.  
Synthetic peptides as antigens for the detection of humoral immunity to *Plasmodium falciparum* sporozoites.  
*Journal of immunological methods* , 1986, 93 : 55-61
- 47 - WONGSRICHANALAI C., PORNILAPUATIP J., NAMSIRIPONGPUN V., WEBSTER H.K., LUCCINI A., PUNSAMDANG P., WILDE H. and PRASSITTISUK M.  
Acridine orange fluorescent Microscopy and the detection of malaria in populations with low-density parasitaemia.  
*Am.j.trop.med.hyg, 1991, 44* : 17-20

Nom : KODJO

Prénom : Guy-Albert

Titre de la thèse : INTERET CLINIQUE ET EPIDEMIOLOGIQUE , DU QBC ET DU DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-TRAP AU COURS DU PALUDISME A PLASMODIUM FALCIPARUM (WELCH 1897).

Année :1992-1993

Ville de soutenance : Bamako

Pays d'origine : Côte-d'Ivoire

Lieu de dépôt : Bibliothèque, Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali

Secteur d'intérêt : Parasitologie (Paludisme)

## **Résumé:**

Nous avons mené une étude cas-témoins dans les services de pédiatrie de l'hôpital Gabriel-Touré, et une enquête longitudinale en deux passages transversaux à Safo, pour évaluer le rôle protecteur de l'anticorps anti-TRAP . En milieu hospitalier l'échantillonnage a concerné la population de 1 à 12 ans sur la période d'Août à Novembre. Nous avons travaillé sur des sérums prélevés à Safo en Mai et Décembre 1989. Parallèlement en Juin 1992 , nous avons utilisé les techniques de la goutte épaisse, du frottis mince et le QBC pour le diagnostic du paludisme.

Les principaux objectifs étaient de :

- tester les valeurs diagnostiques du QBC sur le terrain,
- évaluer la dynamique des anticorps anti-TRAP en milieu hospitalier et rural , et leur valeur protectrice.

Nous avons bénéficié de la collaboration de l'institut parasitologique de ROME et de biologie moléculaire de Heidelberg, pour l'obtention de l'antigèneTRAP et laCSP.

Les résultats obtenus montrent que les anticorps anti-TRAP semblent conférer une protection contre les fortes charges parasitaires et les formes graves de paludisme. Il n'existe pas de lien entre la séropositivité de la TRAP et celle de la CSP. A Safo, nous avons constaté une influence de l'âge , de la variation saisonnière sur la réponse immunitaire à la TRAP, en fonction des groupes d'âge. De même nous avons noté une liaison statistique entre la prévalence du paludisme et le taux de portage d'anticorps anti-TRAP. Le taux d'anticorps anti-TRAP chez les adultes est fortement élevé quelque soit les saisons.

Le QBC semble plus sensible que le frottis. Mais son seuil de détection est de l'ordre de 75 trophozites / mm<sup>3</sup> de sang.

La goutte épaisse reste l'examen parasitologique de référence en matière d'enquête épidémiologique palustre.

La TRAP pourrait être une candidate aux vaccins plasmodiaux anti-maladie.

La poursuite des études tant au niveau hospitalier que rural est plus que nécessaire.

## **ANNEXES**

Fiche d'enquête : Palu TRAP

I - Renseignements généraux :

numéro d'identification : \_\_\_\_\_  
nom et prénom : \_\_\_\_\_  
adresse : \_\_\_\_\_  
zone (urbaine, peri-urbaine, rurale) : \_\_\_\_\_  
date de naissance : \_\_/\_\_/\_\_ âge : \_\_\_\_\_ sexe: \_\_\_\_\_  
lieu de recrutement : \_\_\_\_\_ date : \_\_/\_\_/\_\_  
début de la maladie(date) : \_\_/\_\_/\_\_  
Premiers signes de symptômes de la maladie : \_\_\_\_\_

noté par qui : \_\_\_\_\_  
quand (date) : \_\_/\_\_/\_\_  
antécédent de consultation(oui, non) : \_\_\_\_\_  
si oui, préciser lieu : \_\_\_\_\_ date : \_\_/\_\_/\_\_  
antécédent de traitement (oui, non): \_\_\_\_\_  
si oui préciser médicaments: \_\_\_\_\_  
posologie: \_\_\_\_\_  
moyen de transport utilisé: \_\_\_\_\_  
temps mis pour le transport : \_\_\_\_\_  
dépenses pour les médicaments : \_\_\_\_\_  
dépenses pour le transport : \_\_\_\_\_  
utilisation des moustiquaires (oui, non) : \_\_\_\_\_  
utilisation d'une chimioprophylaxie (oui,non): \_\_\_\_\_

II - Observations initiales

asthénie marquée (oui, non) : \_\_\_\_\_  
coma (oui, non) : \_\_\_\_\_  
si oui, préciser le niveau de coma : \_\_\_\_\_  
TA (mmhg) : \_\_/\_\_\_\_  
température (°c) : \_\_\_\_\_  
glycémie (mg/dl) : \_\_\_\_\_  
parasitémie(/mm<sup>3</sup>): \_\_\_\_\_  
LCR : \_\_\_\_\_  
autres observations : \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

III - Traitement et suivi clinique (pendant la durée de l'hospitalisation)

poinds du malade: \_\_\_\_\_

Observations	J0		J1		J2		J3		J4		J5		J6		J7		
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	
Coma (niveau)																	
T.A.																	
Temperature																	
Glycémie																	
Traitement reçu																	

IV - Evolution de la maladie

parasitémie (J3): \_\_\_\_\_  
 parasitémie (J7): \_\_\_\_\_ (si le malade est toujours hospitalisé)

Evolution : (1=guérison, 2=amélioration, 3=aggravation, 4=décès) \_\_\_\_\_

Observations \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

## **SERMENT DE GALIEN**

\*\*\*\*\*

***Je jure en présence des Maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et des 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 mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.***

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

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

\*\*\*\*\*