

Ministère de l'Éducation Nationale

République du Mali

Foi

Un Peuple – Un But – Une

UNIVERSITE DE BAMAKO

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET

D'ODONTO-STOMATOLOGIE



Année Universitaire 2008 - 2009

Thèse N° /...../

**Réponse des anticorps anti-AMA1-FVO de
Plasmodium falciparum et l'incidence du paludisme
Kambila**

Présentée et soutenue publiquement le 06 /03/ 2009

Par : **Abdrahamane Traoré**

Pour obtenir le Grade de Docteur en Médecine (DIPLOME D'ETAT)

JURY

PRESIDENT: Pr. Anatole Tounkara

MEMBRES: Pr. Amagana DOLO

: Dr. Kassoum Kayentao

Co-directeur : Dr Boubacar TRAORE

DIRECTEUR DE THESE : Pr. Ogobara K DOUMBO

Ce travail a bénéficié de l'appui financier du NIH

ANNEE UNIVERSITAIRE 2008-2009

ADMINISTRATION

DOYEN: ANATOLE TOUNKARA – PROFESSEUR
1^{er} ASSESSEUR: DRISSA DIALLO – MAÎTRE DE CONFERENCE AGREGÉ
2^{ème} ASSESSEUR: SEKOU SIDIBE – MAÎTRE DE CONFÉRECES
SECRETARE PRINCIPAL: YENIMEGUE ALBERT DEMBELE – PROFESSEUR
AGENT COMPTABLE: MADAME COULIBALY FATOUMATA TALL- CONTROLLEUR DES FINANCES

PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Alou BA	Ophthalmologie
Mr Bocar SALL	Orthopédie Traumatologie – Secourisme
Mr Souleymane SANGARE	Pneumo-physiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou L. TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine interne
Mr Aly GUINDO	Gastro-entérologie
Mr Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Mr Sinè BAYO	Anatomie-Pathologie-Histoembryologie
Mr Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique
Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine interne
Mr Boukassoum HAIDARA	Législation
Mr Boubacar Sidiki CISSE	Toxicologie
Mr Massa SANOGO	Chimie Analytique

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE
D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE	Orthopédie Traumatologie
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco-Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	ORL
Mme SY Assitan SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie-Réanimation
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie viscérale
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale Chef de D.E.R.
Mr Abdoul Kader TRAORE dit DIOP	Chirurgie Générale

2. MAITRES DE CONFÉRENCES AGREGES

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophthalmologie
Mr Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique
Mr Sadio YENA	Chirurgie thoracique
Mr Youssouf COULIBALY	Anesthésie-Réanimation
Mr Zimogo Z. SANOGO	Chirurgie Générale

3. MAITRES DE CONFÉRENCES

Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Mr Sekou SIDIBE	Orthopédie-Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie-Réanimation
Mr Tieman COULIBALY	Orthopédie-Traumatologie
Mme TRAORE J THOMAS	Ophthalmologie
Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie
Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique
Mr Nouhoum ONGOÏBA	Anatomie & Chirurgie Générale

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Issa DIARRA	Gynéco-Obstétrique
Mr Samba Karim TIMBO	ORL
Mme TOGOLA Fanta KONIPO	ORL
Mme Djeneba DOUMBIA	Anesthésie Réanimation
Mr Zanafon OUATTARA	Urologie
Mr Adama SANGARE	Orthopédie- Traumatologie
Mr Sanoussi BAMANI	Ophthalmologie
Mr Doulaye SACKO	Ophthalmologie
Mr Ibrahim ALWATA	Orthopédie - Traumatologie
Mr Lamine TRAORE	Ophthalmologie
Mr Mady MAKALOU	Orthopédie-Traumatologie
Mr Aly TEMBELY	Urologie
Mr Niani MOUNKORO	Gynécologie/ Obstétrique
Mr Tiémoko D. COULIBALY	Odontologie
Mr Souleymane TOGORA	Odontologie
Mr Mohamed KEITA	ORL
Mr Boureima MAIGA	Gynéco-Obstétrique
Mr Youssouf SOW	Chirurgie Générale
Mr Djibo Mahamane DIANGO	Anesthésie-réanimation
Mr Moustapha TOURE	Gynécologie
Mr Mamadou DIARRA	Ophthalmologie
Mr Boubacary GUINDO	ORL
Mr Moussa Abdoulaye OUATTARA	Chirurgie générale
Mr Birama TOGOLA	Chirurgie générale
Mr Brehima COULIBALY	Chirurgie générale
Mr Adama Konoba KEITA	Chirurgie générale
Mr Adégné TOGO	Chirurgie générale
Mr Lassana KANTE	Chirurgie générale
Mr Mamby KEITA	Chirurgie Pédiatrique
Mr Hamady TRAORE	Odonto-Stomatologie
Mme KEITA Fatoumata SYLLA	Ophthalmologie
Mr Drissa KANIKOMO	Neuro-Chirurgie
Mme Kadiatou SINGARE	ORL
Mr Nouhoum DIANI	Anesthésie-Réanimation
Mr Aladji Seydou DEMBELE	Anesthésie-Réanimation
Mr Ibrahima TEGUETE	Gynéco-Obstétrique
Mr Youssouf TRAORE	Gynéco-Obstétrique
Mr Lamine Mamadou DIAKITE	Urologie

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
Mr Amadou DIALLO	Biologie
Mr Moussa HARAMA	Chimie Organique

Mr Ogobara DOUMBO	Parasitologie-Mycologie
Mr Yénimégué Albert DEMBELE	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA	Immunologie
Mr Bakary M. CISSE	Biochimie
Mr Abdourahamane S. MAÏGA	Parasitologie
Mr Adama DIARRA	Physiologie
Mr Mamadou KONE	Physiologie

2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Amadou TOURE	Histoembryologie
Mr Flabou BOUGOUDOGO	Bactériologie – Virologie
Mr Amagana DOLO	Parasitologie – Mycologie Chef de D.E.R.
Mr Mahamadou A THERA	Parasitologie – Mycologie

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Mahamadou CISSE	Biologie
Mr Sékou F. M. TRAORE	Entomologie médicale
Mr Abdoulaye DABO	Malacologie – Biologie Animale
Mr Ibrahim I. MAÏGA	Bactériologie – Virologie

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Lassana DOUMBIA	Chimie Organique
Mr Mounirou BABY	Hématologie
Mr Moussa Issa DIARRA	Biophysique
Mr Kaourou DOUCOURE	Biologie
Mr Bouréma KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane DIALLO	Bactériologie/ Virologie
Mr Cheick Bougadari TRAORE	Anatomie pathologie
Mr Guimogo DOLO	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Mouctar DIALLO	Biologie/ Parasitologie
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Boubacar TRAORE	Parasitologie - Mycologie
Mr Bakary Maïga	Immunologie

5. ASSISTANTS

Mr Mangara M. BAGAYOKO	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Djbril SANGARE	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Bokary Y. SACKO	Biochimie
Mr Mamadou BA	Biologie, Parasitologie Entomologie Médicale
Mr Moussa FANE	Parasitologie /Entomologie

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAÏGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie- Chef de D.E.R.
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Hamar A. TRAORE	Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie

Mr Moussa Y. MAIGA	Gastro-entérologie-Hépatologie
Mr Somita KEITA	Dermato-Léprologie
Mr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie

2. MAÎTRES DE CONFÉRENCES AGREGÉS

Mr Bah KEITA	Pneumo-Phtisiologie
Mr Abdel Kader TRAORE	Médecine Interne
Mr Siaka SIDIBE	Radiologie
Mr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne
Mme SIDIBE Assa TRAORE	Endocrinologie
Mr Daouda K. MINTA	Maladies infectieuses
Mme Mariam SYLLA	Pédiatrie

3. MAÎTRES DE CONFÉRENCES

Mr Mamady KANE	Radiologie
Mr Sahare FONGORO	Néphrologie
Mr Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
Mr Bou DIAKITE	Psychiatrie
Mr Bougouzié SANOGO	Gastro-entérologie
Mr Adama D. KEITA	Radiologie
Mr Soungalo Dao	Maladies infectieuses

4- MAÎTRES ASSISTANTS

Mme Habibatu DIAWARA	Dermatologie
Mr Kassoum SANOGO	Cardiologie
Mr Seydou DIAKITE	Cardiologie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie
Mme DIARRA Assétou SOUCKO	Médecine interne
Mr Boubacar TOGO	Pédiatrie
Mr Mahamadou TOURE	Radiologie
Mr Idrissa A. CISSE	Dermatologie
Mr Mamadou B. DIARRA	Cardiologie
Mr Anselme KONATE	Hépatogastro-entérologie
Mr Moussa T. DIARRA	Hépatogastro-entérologie
Mr Souleymane DIALLO	Pneumologie
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie
Mr Cheick Oumar GUINTO	Neurologie

D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEUR

Mr Gaoussou KANOUTE	Chimie Analytique Chef de D.E.R
Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie

2. MAÎTRES DE CONFÉRENCES AGREGÉS

Mr Drissa DIALLO	Pharmacognosie
Mme Rokia SANOGO	Pharmacognosie

3. MAITRES DE CONFERENCE

Mr Alou KEITA
Mr Benoît Yaranga KOUMARE
Mr Ababacar I. MAÏGA

Galénique
Chimie analytique
Toxicologie

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Yaya KANE
Mr Saïbou MAIGA
Mr Ousmane KOITA
Mr Yaya COULIBALY
Mr Loséni BENGALY
Mr Sékou BAH

Galénique
Législation
Parasitologie Moléculaire
Législation
Pharmacie Hospitalière
Pharmacologie

D.E.R. SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEUR

Mr Sanoussi KONATE Santé Publique

2. MAÎTRE DE CONFERENCES AGREGES

Mr Moussa A. MAÏGA Santé Publique

3. MAITRE DE CONFERENCES

Mr Mamadou Souncalo TRAORE Santé Publique
Mr Massambou SACKO Santé Publique
Mr Samba DIOP Anthropologie Médicale
Mr Seydou DOUMBIA Epidémiologie
Mr Alassane A. DICKO Santé Publique

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Adama DIAWARA Santé Publique
Mr Hamadoun SANGHO Santé Publique
Mr Akory AG IKNANE Santé Publique
Mr Hammadoun Aly SANGO Santé Publique

5. ASSISTANTS

Mr Oumar THIERO Biostatistique
Mr Seydou DIARRA Anthropologie Médicale

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA Botanique
Mr Bouba DIARRA Bactériologie
Mr Salikou SANOGO Physique
Mr Boubacar KANTE Galénique
Mr Souleymane GUINDO Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA Mathématiques
Mr Modibo DIARRA Nutrition
Mme MAÏGA Fatoumata SOKONA Hygiène du Milieu
Mr Mahamadou TRAORE Génétique
Mr Lassine SIDIBE Chimie Organique

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Doudou BA Bromatologie
Pr. Babacar FAYE Pharmacodynamie
Pr. Mounirou CISS Hydrologie
Pr Amadou Papa DIOP Biochimie.
Pr. Lamine GAYE Physiologie

DEDICACES

Je dédie ce travail

A mon père : Feu Ousmane TRAORE

Ton départ prématuré a laissé un grand vide dans mon cœur.

Tes conseils et ton souci permanent du travail bien fait ont forgé cet homme que je suis devenu. Ton affection ne nous a jamais fait défaut .Ce modeste travail est l'occasion pour moi de te signifier ma gratitude.

Nous aurions voulu te voir là assis en ce jour solennel, mais Dieu en a décidé autrement. Dors en paix très cher Papa, et que Dieu t'accorde le repos éternel.

Amen!

Ma mère Molibaly BAMBA

Tu as été un pilier très important dans ma vie car c'est avec toi que j'ai vécu la plupart du temps, même si nous nous sommes quitté juste après mon succès au baccalauréat. Que le bon Dieu te récompense pour tout ce que tu as fait pour moi et qu'Il te garde dans sa miséricorde.

A ma mère : Ramatoulaye OUONOGO

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

Amen!

- Ma fille **Malado TRAORE**

Que le bon Dieu te gratifie des qualités de ton homonyme et qu'Il t'accorde longue vie dans la santé et la prospérité.

- Ma femme bien aimée **Nantenin SANGARE**

Tu as su me supporter pendant cette période si difficile. Tu m'as accepté comme tel et m'as aimé malgré ma situation socio-économique difficile. Saches que je n'oublierai jamais ton aide et je prie le bon Dieu pour qu'Il te donne une longue vie et beaucoup de Sa grâce.

A la mémoire des regrettés de la famille Traore : Assanatou et Nassarata Traoré
Merci pour tout ce que vous avez consenti pour moi. Reposez en paix mes chers et que Dieu vous accorde son paradis éternel. *Amen!*

A mes frères et sœurs : Chaka, Abibata, Boubacar, Brehima, Youssouf, Lamine, Abdoulaye, Moussa, Alassane, Aguibou, Moustapha, Oumar TRAORE
Vous n'aviez pas manqué de m'entourer de la chaleur familiale, je vous en suis reconnaissant. Que **DIEU** vous donne la chance et le courage de faire toujours mieux que moi

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent

A

- **Allah** le Tout Puissant, le Sage, l'Omnipotent, le Miséricordieux de m'avoir donné la vie et guidé sur le droit chemin (islam).

A tous les Professeurs responsables de cours à la FMPOS, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu d'eux.

Aux membres de l'unité Paludisme et grossesse : Dr Boubacar TRAORE, Dr Kassoum KAYENTAO, Dr DOUMBO Safi NIARE, Dr ONGOIBA Aissata ONGOIBA, Dr DOUMTABA Didier, pour votre entière disponibilité, votre soutien, et votre sympathie. Ce travail est le vôtre. Je vous en suis sincèrement reconnaissant.

A mes maîtres et mes aînés: Pr Abdoulaye DABO , Dr Abdoulaye DJIMDE, Dr Mamadou DIAKITE, Dr Mouctar DIALLO, Dr Amed OUATARA, Dr Mahamadou SISSOKO, Dr Aldiouma GUINDO, Dr Issiaka SAGARA, Mr Ousmane TOURE, Dr Mamadou TEKETE, Dr Drissa COULIBALY, Dr Ando GUINDO, Dr Karim TRAORE, Dr Sory DIAWARA, Dr Ousmane GUINDO, Dr Beh KAMATE, Dr Bakary SIDIBE, Dr Bakary FOFANA, Dr Hamma MAIGA, Dr Demba , Dr Cheik SANGARE, Mr Mamadou BA, Mr Seydou DIARRA, merci pour vos enseignements et vos soutiens.

Aux : Dr Amadou NIANGALY, M^{lle} Aminatou KONE, Dr Karim TRAORE, Dr Renion SAYE, Dr Seidina DIAKITE, Dr Etienne GUIROU, Dr Souleymane DAMA, Dr Cheik AT DABO, Dr Kourané SISSOKO, Dr Oumar BILA, Dr Boubacar NIARE, Dr Moussa DJIMDE, Dr Nouhoum GUINDO, Mr Zoumana TRAORE, Dr Paul KAMATE, Dr Younous KONE, Dr Hamidou NIANGALY, Dr Hamidou TRAORE.

A mes cadets: Abdrahamane Bathyli, Sory Ibrahima Traore, Abdoul Karim Sangare

A tous les volontaires qui ont bien voulu être les pionniers.

Aux autorités et notables de Kati et à toute la population de Kambila.

A tout le personnel du MRTC/DEAP.

A tous les chauffeurs du MRTC / DEAP

A mes cousins et cousines Assetou KANOUTE, Aida KONE, Kadiatou KONE

A mes amis tous et toutes merci.

A mon cousin **Amar Kone** et sa famille, pour votre sympathie, vos conseils et tout votre soutien. Je vous en suis profondément reconnaissant et soyez rassurés de mon attachement.

Aux familles TRAORE à Sikasso, OUONOGO à Sikasso, SANGARE à Sogoniko, FOFANA au point G, Recevez ici l'expression de toute ma reconnaissance et merci votre soutien indéfectible.

A mon Grand Frère Ami **Medou** : retrouvez ici le fruit de vos conseils et je vous remercie infiniment pour le soutien moral et matériel. Vous avez été pour moi comme un père. Que Dieu vous donne longue vie et guide vos pas.

A toutes et à tous, vous qui de près ou de loin m'avez soutenu, les mots me manquent pour vous exprimer toute ma joie, ma reconnaissance et tout mon respect. Je vous dis UN grand merci

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du jury

Professeur Anatole TOUNKARA :

Professeur Titulaire en immunologie,

Doyen de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie.

Directeur du Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose
(SEREFO)

Responsable de l'enseignement de l'immunologie à la FMPOS,

Ancien Chef de DER des sciences fondamentales à la FMPOS,

Ancien Directeur du Centre National de Transfusion Sanguine(CNTS),

Cher maître, c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger à ce jury malgré vos multiples occupations.

Permettez nous de vous exprimer notre profonde gratitude et notre grand respect.

A notre maître et Directeur de thèse

Professeur Ogobara K Doumbo :

Professeur Titulaire de Parasitologie - Mycologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie.

Directeur du Pôle d'Excellence de Recherche sur le paludisme du Malaria Research and Training Center (MRTC)

Membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine de France,

Membre Honoraire de la « Alpha Omega Alpha Honor Medical Society » des Etats-Unis d'Amérique

Permettez nous de vous remercier cher maître de la confiance que vous nous avez faite en nous acceptant à vos côtés

Votre rigueur scientifique, votre persévérance et votre dévouement constant pour un travail bien fait, font de vous un chercheur émérite.

C'est un honneur pour nous d'être cité parmi vos élèves.

Veillez accepter le témoignage de notre sincère et profonde gratitude.

A notre Maître et co-directeur de thèse

Dr Boubacar Traoré :

Maitre - Assistant de Parasitologie – Mycologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Responsable de l'unité Paludisme et grossesse et du laboratoire Immuno-pathologie parasitaire du MRTC.

Permettez-nous de vous remercier cher maître de la confiance que vous nous avez faite en nous proposant ce travail.

Nous avons beaucoup admiré vos immenses qualités humaines, sociales et scientifiques tout au long de ce travail. Vous avez cultivé en nous, le sens du travail bien fait.

Votre simplicité, votre disponibilité constante, votre rigueur, votre dynamisme font de vous un maître apprécié de tous.

Trouvez ici, cher maître l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible disponibilité.

A notre maître et juge

Professeur Amagana Dolo :

Maître de conférences Agrégé de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Médecine,
de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Chef de DER des Sciences Fondamentales à la FMPOS,

Cher maître, c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger à
ce jury malgré vos multiples occupations.

Permettez nous de vous exprimer notre profonde gratitude et notre grand respect.

A notre maître et juge

Dr Kassoum Kayentao :

Titulaire d'un Doctorat en Médecine, d'un Master en santé Publique, spécialiste en biostatistique.

Responsable adjoint de l'unité paludisme et grossesse du MRTC

Nous avons admiré vos qualités scientifiques et humaines tout au long de cette thèse. Votre assistance dans toutes les étapes de la réalisation de ce travail relève de votre bonté et votre amour pour le travail.

I. INTRODUCTION ET JUSTIFICATION DE L'ETUDE

Dans le monde quelque 3,3 milliards de personnes vivent dans des régions à risque du paludisme avec 347 millions de cas par an et plus de 1 million de décès par an dont la majorité est constituée par des enfants [1]. En fin 2004, 107 pays et territoires comptaient des zones où il y avait un risque de transmission du paludisme [1].

En Afrique, le paludisme est responsable de 25 à 40% de l'ensemble des consultations externes et de 20 à 50% de toutes les hospitalisations [2]. Les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans sont les plus menacés; 15% des anémies maternelles et 35% des naissances prématurées lui sont imputables. Il est à noter qu'environ 1 million d'enfants de moins de 5 ans meurent du paludisme chaque année [3]. Parmi ces enfants, certains d'entre eux qui se rétablissent après un accès de paludisme cérébral présentent des troubles de l'apprentissage et des incapacités consécutives aux lésions cérébrales [4]. L'absentéisme scolaire causé par le paludisme est estimé à 2% [1]. Enfin, cette affection constitue une entrave au développement économique, il lui est attribué une perte de croissance de 1,3% par an soit 12 milliards de dollars en Afrique [5].

Au Mali, le paludisme est la première cause d'absentéisme en milieu scolaire, c'est également la première cause de morbidité (32,4%) et de mortalité (45,7%) chez les enfants de moins de 5 ans [2]. Il est responsable de la moitié des anémies chez la femme enceinte. La résistance aux antipaludiques (chloroquine, sulfadoxine-Pyriméthamine en Afrique de l'Est) constitue un problème inquiétant dans la lutte contre paludisme au Mali.

L'espoir est aujourd'hui tourné vers la recherche vaccinale .Dans ce contexte, il est utile de mener des études sur l'immunité anti- palustre. La notion d'immunité anti-palustre ou << prémunition >> a été décrite pour la première fois par Sergent et al, [6] (1924): C'est un équilibre hôte-parasite après plusieurs années d'exposition si la transmission est constante dans une zone d'endémie élevée [7-8] .Cette prémunition s'acquière progressivement en 5 ans voire plus (au prix d'une mortalité infantile élevée). Elle est labile, et disparaît en 12 à 24 mois chez le sujet semi-immun qui quitte la zone d'endémie. Cette immunité protège d'abord contre la mortalité et les formes graves du paludisme, puis contre les accès palustres simples en diminuant leur incidence plutôt que leur gravité. La prémunition réduit la durée et le niveau des infections par les stades sanguins [9] en laissant persister une infection minimale et continue qui entretient cette « semi-immunité» [9]. On dit que cette immunité n'est pas stérilisante car il n'a jamais été démontré de façon formelle la disparition totale des parasites de *P. falciparum* en l'absence de traitement. Plusieurs études ont montré que le traitement du paludisme a été associé à la diminution rapide du titre des anticorps [10-13].

En Afrique, dans les zones d'endémies stables, les piqûres répétées d'anophèles permettent aux autochtones de développer une prémunition contre l'infection à *P. falciparum*. Les infections plasmodiales chez les autochtones adultes sont habituellement asymptomatiques. Cette immunité, difficile à acquérir, peut être perdue au cours d'un long séjour en dehors des zones à risques. Par ailleurs, l'immunité dirigée contre *P. falciparum* est fortement spécifique de souche. L'acquisition lente et progressive de la prémunition est généralement couplée avec l'acquisition d'IgG spécifiques de la plupart des nombreux antigènes parasitaires, dénommés antigènes variants de surface (AVS).En revanche, la majorité des manifestations graves surviennent chez les enfants de 1 à 4 ans, les femmes enceintes surtout primigestes et les

voyageurs non immuns. Les nouveau-nés sont porteurs d'une protection antipalustre passive à travers les anticorps IgG maternels [14]. Depuis les années 1960 des expériences de transfert passif d'immunoglobuline purifiée d'adultes hyper-immuns à des enfants ont montré que les réponses anticorps participaient à l'immunité acquise naturellement contre les stades sanguins de *P. falciparum* [15-16]. Cette immunité peut être évaluée expérimentalement en mesurant l'inhibition de l'infection d'anophèle d'élevage se gorgeant artificiellement avec du sang contenant des gamétocytes et du sérum d'individus naturellement exposés au paludisme. A quatre –six mois de la vie, cette protection commence à décroître et les enfants exposés aux piqûres des anophèles présentent le paludisme avec ses symptômes habituels : fièvre, frissons, céphalées, diarrhées pouvant occasionnellement conduire au décès. Ceux qui survivent développent lentement et progressivement une prémunition contre le paludisme. En effet les observations sur l'immunité antitoxique et l'influence des infections mixtes sur la physiopathologie du paludisme remettent le concept de prémunition au goût du jour. C'est ainsi, que dans le cadre de ce travail nous proposons de tester l'hypothèse selon laquelle :

La protection contre les infections palustres à *P.falciparum* est elle associée avec le niveau du titre des anticorps anti- AMA1 ?

II OBJECTIFS

1. Objectif Général

Explorer l'effet d'un taux pré- existant d'anticorps anti AMA1-FVO sur la survenue du premier épisode palustre.

2. Objectifs Spécifiques

1°) Déterminer la relation entre les taux d'anticorps anti-AMA1-FVO, la parasitémie initiale, le groupe d'âge, la schistosomose et le type d'hémoglobines.

2°) Déterminer la relation entre le taux d'incidence du paludisme et, le titre d'anticorps anti AMA1-FVO, le groupe d'âge, la parasitémie de base et la schistosomose

3°) Déterminer les facteurs qui pourraient contribuer à l'association entre le taux d'anticorps anti AMA1-FVO et la survenue du paludisme.

III. GENERALITES

1. LE PALUDISME

1.1 Rappel sur le paludisme

Endémie parasitaire majeure, le paludisme (palus = marais) ou malaria (mauvais air) est une érythrocytopathie parasitaire fébrile et hémolytique transmise par la piqûre infectante de l'anophèle femelle. Il existe cinq espèces de plasmodies humains : *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* et *P. falciparum* [17]. Cette dernière espèce est la plus fréquente en Afrique au sud du Sahara et la seule espèce pouvant entraîner des manifestations graves dont le neuropaludisme et représente 85 à 95% de la formule parasitaire.

C'est en 1880 qu'Alphonse Laveran, découvre l'hématozoaire du paludisme à partir de l'observation d'une goutte de sang à l'état frais entre lame et lamelle de *P. vivax* à Constantine, ce qui lui a valu le prix Nobel de médecine en 1907 [18]. Le parasite possède un cycle nécessitant deux hôtes :

1°) Le vecteur, hôte définitif, l'anophèle femelle.

Les femelles du genre Anophèles sont hématophages et sont susceptibles de transporter les parasites alors que les mâles se contentent du nectar des plantes.

2°) L'hôte intermédiaire, l'homme.

Le maintien des populations de plasmodies humaines dans la nature est soumis à deux phases : la sporogonie qui se déroule chez l'insecte vecteur, l'anophèle femelle et deux phases de multiplications asexuées ou schizogonies hépatique et érythrocytaire qui prennent place chez l'hôte intermédiaire, l'homme.

Le Mali est un pays endémique avec 5 faciès épidémiologiques [19] :

1. Zone soudano-guinéenne (Indice Plasmodique, $IP > 85$): De juin en novembre. L'anémie peut atteindre 41,2% chez les femmes enceintes [24]. Le paludisme y est holoendémique.
2. Les régions des savanes soudaniennes Nord et le Sahel hyperendémique : ($50 < IP < 75$) en saison des pluies.
3. Zone subsaharienne à transmission sporadique ($IP < 50\%$).
4. Zone du delta inférieur du fleuve Niger et de riziculture (barrage) méso endémique ($IP < 40$)
5. le milieu urbain hypo endémique avec des formes graves et compliquées.

Au Mali un programme de lutte contre le paludisme a été mis en place en 1993 avec comme stratégie actuelle :

- La prise en charge correcte des cas de paludisme :
 - *Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (CTA) pour les cas simples de paludisme.
 - *Quinine pour les formes graves et compliquées.
- Lutte anti-vectorielle sous toutes ces formes :
 - *Assainissement du milieu.
 - *Utilisation de moustiquaire imprégnée d'insecticides.
- Traitement préventif intermittent (TPI) chez les femmes enceintes : SP le quatrième et le huitième mois de grossesse.

1.2 Cycle de vie de *P. falciparum* (Figure1)

1.2.1 Cycle sexué chez l'anophèle ou sporogonie

Au cours de son repas sanguin, l'anophèle femelle ingère les parasites érythrocytaires dont certains se sont différenciés en gamétocytes mâles et femelles et poursuivent leur développement dans l'intestin moyen du moustique alors que les autres formes dégénèrent. Ces gamètes mâles fertilisent les macros gamètes femelles pour former un œuf diploïde (zygote). En moins de 24 heures, ce zygote se transforme en ookinète mobile. Après avoir, traversé l'épithélium de l'intestin du moustique l'ookinète s'entoure d'une épaisse paroi pour former l'oocyste. Le noyau de l'oocyste subit alors un grand nombre de division mitotique à l'issue desquelles l'oocyste finit par se rompre pour libérer plusieurs milliers de sporozoïtes qui migrent au niveau des glandes salivaires et seront inoculés à l'occasion d'un nouveau repas sanguin[21].

1.2.2 Cycle asexué chez l'homme

Ce cycle débute lorsqu'un anophèle injecte à l'occasion du repas sanguin le plus souvent nocturne, plusieurs sporozoïtes fusiformes dans le courant sanguin de l'hôte. Les sporozoïtes gagnent le foie en quelques minutes où ils envahissent les hépatocytes ; c'est le début de la phase hépatique (ou exo-érythrocytaire). Ces sporozoïtes se transforment en trophozoïtes hépatiques ; ceux-ci subissent des divisions pour donner quelques schizontes hépatiques. Les schizontes mûrs éclatent et libèrent dans la circulation des milliers de mérozoïtes par hépatocyte infecté, initiant ainsi le cycle érythrocytaire. Contrairement au *P.vivax* ou au *P. ovale*, *P.falciparum* ne présente pas de stade de persistance hépatique [22]. Après libération dans le courant sanguin, les mérozoïtes pénètrent dans les hématies. La multiplication des noyaux donne un schizonte mûr, qui forme un corps dit en rosace dans l'hématie dont l'éclatement libère 8 à 32 nouveaux mérozoïtes, selon les espèces de plasmodies humaines. Ces mérozoïtes dont la phase libre est très courte envahissent rapidement de nouvelles hématies. La durée du cycle parasitaire intra-

érythrocytaire asexué de *P. falciparum* est d'environ 48 heures ; les formes matures apparaissent au cours des 24 heures et persistent le jour suivant. L'éclatement des schizontes lorsqu'il est synchrone est responsable de la périodicité des fièvres (phase paroxystique) détectables chez l'homme. L'infection à *P. falciparum* se caractérise par la présence des stades anneaux et trophozoïtes dans la circulation sanguine, les stades mûrs, trophozoïtes âgés et schizontes sont retenus le long des capillaires profonds de divers organes.

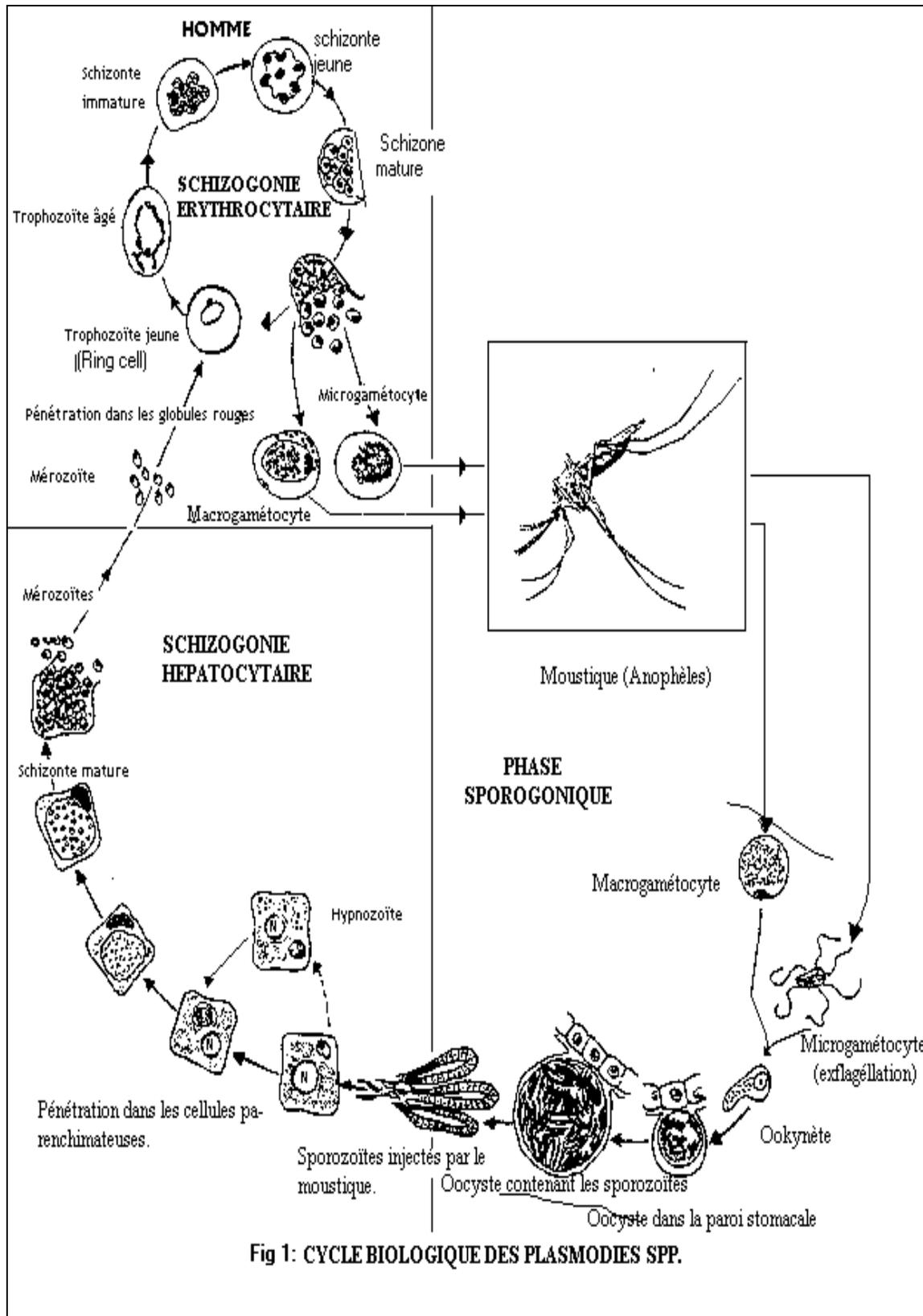


Fig 1: CYCLE BIOLOGIQUE DES PLASMODIES SPP.

Source : FLAMARION

1.3 Physiopathologie

1.3.1 Accès palustre simple :

Lors de l'éclatement des hématies parasitées, les pigments malariques appelés hémzoinés sont libérés, Ils agissent sur le centre bulbaire de la thermorégulation provoquant ainsi la fièvre quand la parasitémie atteint un certain seuil. Lorsque chez le malade les cycles endoérythrocytaires de *plasmodium* se synchronisent progressivement, la libération des pigments malariques est régulièrement répétée, ce phénomène confère ainsi à l'accès palustre sa périodicité. L'hépatomégalie et la splénomégalie surviennent suite à une hyperactivité du système monocyte, macrophage chargé de débarrasser l'organisme aussi bien des pigments malariques que des débris érythrocytaires. L'anémie est causée par l'hémolyse des globules rouges parasités.

1.3.2 Neuropaludisme :

Les stades asexués de *P. falciparum* sont séquestrés dans les microcapillaires des organes nobles (cerveau, poumon, cœur). Cette séquestration se fait après interaction entre une protéine parasitaire : *plasmodium falciparum* érythrocyte membrane Protein 1 (*PfEMP1*) et les différents récepteurs présents à la surface de l'endothélium vasculaire. Ce phénomène est appelé cytoadhérence. Cependant d'autres hypothèses ont été évoquées pour expliquer la physiopathologie du paludisme grave :

- sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : INF- γ et TNF- α .
- une augmentation de la perméabilité de la barrière méningée entraînant une fuite du liquide céphalorachidien et un œdème cérébral.
- la coagulation intra vasculaire disséminée.
- phénomène immuno-pathologique avec dépôt de complexes immuns.

Quelque soit le mécanisme, le ralentissement du flux capillaire intracérébral provoque l'anoxie, voire tardivement une ischémie

responsable d'une hémorragie péri vasculaire et de lésion de la substance blanche.

1.4 Rappel sur l'immunité anti-palustre

1.4.1 Généralités sur l'immunité

Les caractéristiques de l'immunité contre le paludisme sont celles relatives au parasite en général, permettant donc à l'infection d'être contrôlée et tolérée plutôt que d'être éradiquée. La réinfection asymptomatique et la faible parasitémie permettent de diminuer de façon significative la mortalité et la morbidité de la maladie chez certains individus semis immuns. Donc l'immunité se développe graduellement après une longue exposition aux infections à répétition dans les zones où le niveau de la transmission est élevé (zone stable) et où la sévérité et la mortalité de l'infection sont essentiellement le fait des enfants, alors que les adultes en souffrent moins. L'immunité stérilisante (prévention totale de l'établissement de la parasitémie périphérique) semble très rare puisque la prévalence parasitaire chez l'adulte approche 100% dans les zones endémiques [23]. Les mécanismes exacts soutenant l'acquisition de l'immunité au paludisme sont mal compris, mais il est clair que les réponses innées jouent un rôle important [24].

1.4.2 L'immunité innée ou naturelle

La résistance innée au paludisme se traduit chez l'homme par un état réfractaire au parasite dès le premier contact. Cette résistance naturelle résulte soit de la présence chez l'homme d'une substance non propice au développement du parasite (hémoglobine anormale, déficit en G-6-PD) ou de l'absence de récepteur impliqué dans la pénétration du parasite dans les cellules hôtes (antigène Duffy). Les mécanismes qui déterminent cette résistance innée impliquent essentiellement les facteurs liés au stade érythrocytaire. La résistance innée peut affecter l'habilité du parasite à envahir les érythrocytes ou à inhiber son développement intra-érythrocytaire.

1.4.3 Immunité humorale

Le rôle des anticorps (Ac) dans le contrôle de l'infection et de la maladie a été démontré [25]. Les AC peuvent bloquer l'invasion des hépatocytes. Les fragments Fab d'Ac monoclonaux spécifiques des séquences répétées de la CS inhibent l'ineffectivité des sporozoïtes *in vivo* et *in vitro*. Les Ac protecteurs sont principalement de type IgG1 et IgG3. Ils peuvent activer le complément et induire une lyse des sporozoïtes libres dans le sang. Les IgG1 et IgG3 spécifiques peuvent se fixer sur leurs récepteurs présents à la surface des neutrophiles et monocyte-macrophages et entraîner la lyse des sporozoïtes par ADCI [25-26]. Les IgG2 et IgG4 seraient non protecteurs [27]. Les sporozoïtes de *P. falciparum* et de *P. vivax* semblent activer le complément par la voie classique par l'intermédiaire de complexes immuns. Les Ac spécifiques des protéines de surface des gamétocytes de *P. falciparum* ingérés par le moustique peuvent empêcher la fertilisation des gamètes et le développement de l'oocyste [28-29]. Tous les stades érythrocytaires et intra-hépatiques du plasmodium sont immunogènes.

1.4.4 Immunité cellulaire

Elle joue un rôle important dans la défense contre les formes exo-érythrocytaires. L'activation des lymphocytes T conduit à la production de cytokines comme INF- δ qui est capable d'activer les cellules phagocytaires, de stimuler la production des radicaux libres oxygénés et du monoxyde d'azote (NO) toxique pour le parasite [30]. La présence de cellules T cytotoxique spécifiques d'épitopes de la Circum Sporozoïte Protein (CSP) a été associée à la protection contre les réinfections. Certains épitopes reconnus par les Lymphocyte T Cytotoxique (CTL) ont d'ailleurs été identifiés dans la CSP comme candidats vaccinaux [31]. Le rôle de la réponse cellulaire T dans la protection contre l'infection est démontré par la susceptibilité accrue au paludisme des femmes enceintes et des immunodéprimés. Après le

premier trimestre de la grossesse il y a une commutation de la réponse immune de type Th1 vers une réponse de type Th2. Les cytokines de type Th2 comme l'IL4, l'IL10 et certaines hormones comme la progestérone et la prostaglandine placentaire peuvent inhiber la réponse de type Th1 et favoriser le développement de la réponse de type Th2 [32]. L'orientation de l'immunité vers une réponse à prédominance Th2 prédisposerait la femme enceinte et le fœtus au paludisme car le contrôle de l'infection palustre implique une bonne réponse de type Th1 avec prédominance de l'IL2, INF- γ , TNF- α [33].

1.4.5 AMA1

1.4.5.1 historique et structure

Avec l'émergence de résistance du plasmodium aux médicaments antipaludéens, le développement d'un vaccin est devenu prioritaire.

La plupart des recherches vaccinales de stade sanguin est concentrée sur les antigènes qui sont exprimés sur la surface du merozoite. Les antigènes les plus étudiés sont MSP1 (Merozoite surface protein-1) et AMA1 (Apical membrane antigen-1) qui sont les principaux candidats de vaccin de la phase sanguine asexuée du cycle du développement de *P.falciparum*

L'AMA1 est une protéine membranaire de type 1 ; localisée dans le microneme organelle présente dans la région apicale du merozoite qui contient les ligands pour les récepteurs des globules rouges, est produite par les schizontes matures des érythrocytes [34]. La protéine comporte une région ectoplasmique (546 acides aminés), un segment transmembranaire (21 acides aminés) et un domaine cytoplasmique (55 acides aminés) [35]. Lors de l'invasion de l'érythrocytes par le parasite, AMA1 se repartie sur toute la surface externe de l'organisme et subit une série de coupures protéolytiques. AMA1, un polypeptide de 83 kda est transformé par dégradation protéolytique en une molécule de 66 kda qui est exportée à la surface du merozoite lors de la rupture des schizontes ou durant la phase d'invasion du globule rouge [36]. AMA1 a une structure tridimensionnelle.

IV Méthodologie

1. Lieu d'étude

1.1. Situation :

Notre étude s'est déroulée à Kambila, un village rural situé en zone savane soudanienne du Mali dans la commune de Kambila, cercle de Kati en deuxième région du Mali (Koulikoro). Il est situé à 5 Km au nord de la ville Kati, à 26 Km de Bamako (ville capitale du Mali) sur la route Bamako-Kolokani. Le village de Kambila a été fondé, il y'a environ deux siècles et demi par les Soninkés venus de Téninkou dans la région de Mopti.

1.2 Relief :

Le village est situé dans une plaine s'étendant au nord-ouest. Au sud s'élève la montagne de Banambakoulou. Il n'existe pas de points d'eau permanents mais le village est divisé en deux par une sorte de rivière temporaire permettant l'évacuation des eaux de pluie. La végétation est de type savane arborée, dominée par le karité. Les hautes herbes constituent le couvert végétal pendant la saison des pluies.

1.3 Le climat :

Il est de type soudanien caractérisé par deux saisons :

Une saison sèche et une saison des pluies. La saison sèche dure de novembre à mai et se divise en une saison froide de novembre à février et une saison chaude de mars à mai. La saison des pluies dure de juin à octobre, avec le maximum de précipitations en août-septembre. La pluviométrie varie de 700 – 1300 mm d'eau par an.

1.4 Population :

Avec près de 3000 habitants, la population de Kambila est composée de Sarakolés de bambaras de Malinkés et de peuls. La chefferie traditionnelle est détenue par les Sarakolés qui sont les premiers à s'installer. La religion est dominée par l'islam, avec une minorité chrétienne. La population est majoritairement analphabète et la langue la plus parlée est le Bamanan.

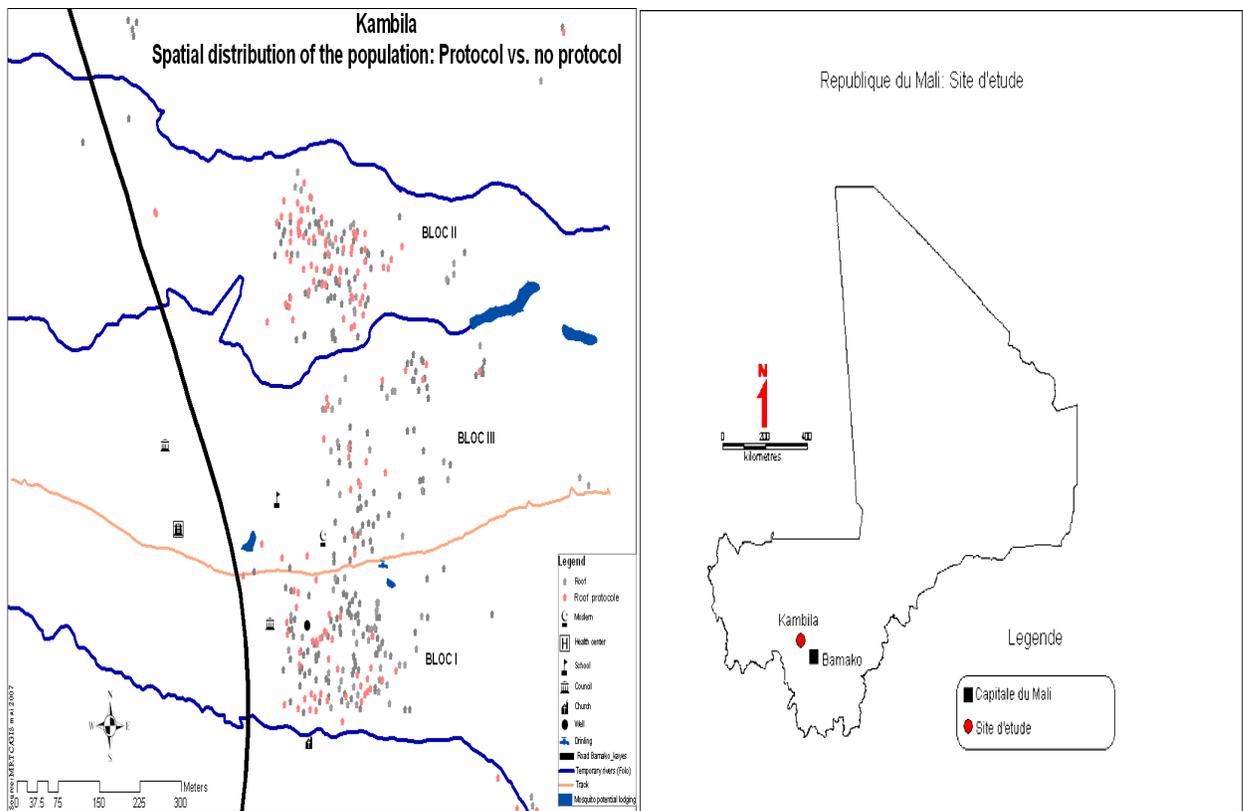


Figure 2 : Plan du village de Kambila

Source : DEAP/MRTC

1.5 Habitat :

L'architecture des habitations est composée de cases rondes, et des maisons en banco couverts de tôle.

1.6 Activités économiques :

L'agriculture constitue l'activité économique principale du village et occupe près de 99% de la population active [37]. Elle est essentiellement agropastorale dominée par les cultures vivrières (le mil, le sorgho, le maïs). Le village est grand producteur de fruits, et de culture maraichère. L'élevage de bovins, d'ovins et de caprins occupe une place de plus en plus importante. L'aviculture y est aussi bien développée.

1.7 Infrastructures :

Le village possède une structure sanitaire ou a lieu notre étude. Il est doté d'une école de 9 classes (de la première année à la neuvième année) fonctionnelle durant toute l'année scolaire ; d'une mosquée et d'une église. La population dispose d'une pompe à eau à motricité humaine. La route bitumée Bamako-Kolokani passe par le village. Kambila abrite le siège de la commune de Kambila construit en 2002.

1.8 Choix de Kambila : Le village a été choisi parce qu'il représente une zone de longue transmission du paludisme (jusqu'à 5 mois). Il est désenclavé par la route Bamako-Kolokani ce qui fait qu'il est accessible à tout moment de la saison. Le paludisme à *P. falciparum* y est hyper endémique. En 1980 Delmont avait trouvé à Kambila un indice plasmodique de 73,6% chez les enfants de moins de 9 ans et *Plasmodium falciparum* est retrouvé dans **95,7%** des cas [38]. En 1989, l'indice plasmodique était 75,1% au mois de novembre [39]. Kambila a été un site pour plusieurs études de notre département y compris les études sur l'efficacité des matériels imprégnés d'insecticides, la participation de la population à ces études a été massive et volontaire.

2. Type d'étude :

Il s'agissait d'une étude longitudinale ayant consisté à un suivi de cohorte d'enfants et d'adultes. Pendant ce suivi, nous avons aussi effectués des passages transversaux réguliers avant, pendant et après la saison de transmission

3. Période d'étude :

Au cours de cette étude, nous avons enrôlé 224 participants pendant le mois de mai 2006 avant la saison de transmission du paludisme et chaque participant était suivi pendant 12 mois. A l'enrôlement et aux 2^e, 4^e, 6^e et 12^e mois, des prélèvements veineux sanguins étaient effectués pour la réalisation des examens immunologiques.

4. La population d'étude :

La population d'étude était basée sur 224 participants sains répartis en 4 groupes selon les classes d'âge : 2-4 ans, 5-7ans ,8-10, ans, et 18-25 ans.

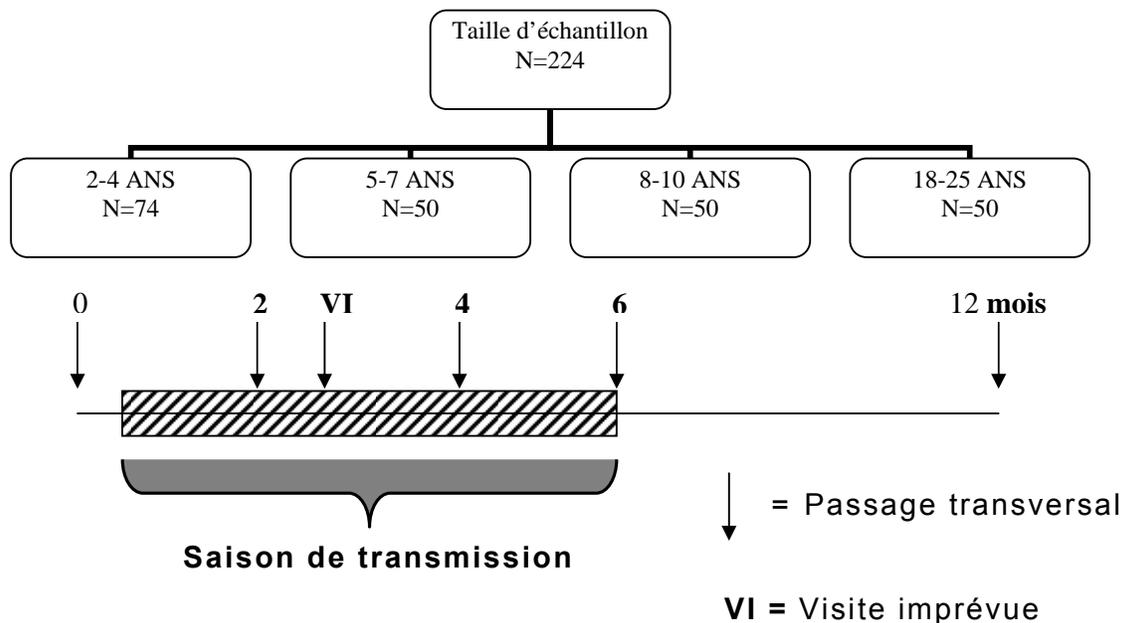


FIGURE 3 Schémas de la cohorte

5. Sélection et recrutement des sujets

❖ Critères d'inclusion

- ✓ Etre masculin ou féminin appartenant à une des classes d'âge suivantes: 2-4 ans ,5-7 ans, 8-10 ans et 18-25 ans
- ✓ Avoir le consentement (adultes) pour la participation à l'étude.
- ✓ Avoir l'assentiment des (parents ou tuteurs) pour la participation de son enfant à l'étude

❖ Critères de non inclusion

- ✓ Saigner activement ou avoir un taux d'hémoglobine ≤ 5 g/dl.
- ✓ Développer un accès fébrile ou une maladie du système à l'enrôlement.
- ✓ Participer à une étude d'essai vaccinale ou d'essai médicamenteux les 30 jours précédant l'étude.
- ✓ Utiliser des corticostéroïdes ou médicaments immunosuppresseurs les 30 jours précédant l'étude.
- ✓ Recevoir un vaccin atténué les quatre semaines passées ou un vaccin inactivé les deux semaines passées avant l'inclusion à l'étude.

6. Déroulement de l'étude :

Le recrutement des individus a commencé après avoir obtenu la permission de la communauté. Les parents intéressés étaient invités à se présenter au centre de santé avec les enfants le jour de l'inclusion. Quand un sujet éligible était identifié, l'étude était brièvement décrite au parent ou tuteur, et quand celui-ci exprime un intérêt pour la participation, des explications complètes lui étaient données. Toutes les explications et procédures de consentement étaient faites dans la langue principale du sujet (c'est à dire en Bamanan). Le consentement éclairé a été documenté sous forme écrite approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université de Bamako, et le comité d'éthique du NIAID /NIH. Après l'obtention du consentement éclairé nous avons procédé à un examen clinique pour les critères d'inclusion et d'exclusion.

7. Organisation du travail

Le travail était organisé au tour de trois postes :

❖ Poste d'identification et de dépistage

Ce poste était composé d'un investigateur et d'un guide. Le travail consistait à attribuer une carte d'étude à chaque volontaire par l'investigateur clinique après avoir vérifié son identité et l'obtention de son consentement éclairé. Cette carte sera gardée soigneusement pendant toute la durée de l'étude. Après ces séries de vérification, le volontaire était dirigé par un guide vers les postes cliniques au cours de l'étude.

❖ Poste clinique

Composé de deux médecins tenant chacun une salle de consultation médicale. Un examen clinique complet a été effectué. Les participants étaient ensuite orientés vers la salle de prélèvement munis de leurs cartes d'étude

❖ **Poste de prélèvement**

Tenu par les biologistes, dont l'un s'occupait de l'étiquetage des tubes CPT™ (Cell-preparator tube) sur lesquels étaient inscrits: la date et l'heure du prélèvement, le numéro d'identification du participant et les initiales du technicien. De même, pour la goutte épaisse, nous inscrivons sur les lames: la date, le numéro d'identification du participant. Le second biologiste était chargé du prélèvement sanguin périphérique réalisé au bout du doigt pour faire la goutte épaisse, le dosage du taux d'hémoglobine ensuite une ponction veineuse (8 ml pour la classe d'âge de 2-4 ans, 5-7 ans, 8-10 ans et 16 ml pour la classe d'âge de 18-25 ans) . Les échantillons étaient chargés sur un portoir approprié ensuite transportés par un véhicule au Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC) à Bamako dans les 2 heures qui suivent le prélèvement (20 minutes de transport en voiture).pour la réalisation des analyses biologiques.

8. Les techniques d'études des variables mesurées :

8.1 Variables démographiques : il s'agissait de l'âge, du sexe, du poids et de la taille. Ces variables sont déterminées à l'inclusion sur la base des données du recensement et confirmées par l'interrogatoire et l'examen physique.

8.2 Variables cliniques :

8.2.1 Matériels : le travail a été effectué au centre de santé de Kambila avec les matériels suivants : bancs, chaises, armoires, registre de consultation, fiches de suivi clinique, liste de recensement de toute la population, fiches d'enquête, bics, thermomètres électroniques, stéthoscope, tensiomètre, pèse-personne, alcool à 90°, coton hydrophile, gants, seringues, et des médicaments (antipaludiques, antibiotiques, antiémétiques, antipyrétiques, anti diarrhéiques, anticonvulsivants)

8.2.2 Variables :

Ces variables sont notées sur les dossiers des patients. L'étude clinique comporte : l'interrogatoire à la recherche des signes ou symptômes du paludisme tels que : la notion de fièvre, les nausées, les céphalées, les vomissements, la diarrhée, les douleurs abdominales, la convulsion et le coma.

8.2.3 Examen physique : Nous réalisons d'abord la prise de la température axillaire à l'aide d'un thermomètre électronique : il y a fièvre quand cette température atteint ou excède 37,5°C. On réalise par la suite l'examen des conjonctives et des paumes des mains à la recherche d'une pâleur ou d'un ictère. Enfin on pratique :

- Un examen pulmonaire complet.
- La prise du poids corporel.
- La palpation de la rate :

Elle est mesurée selon la méthode de Hackett

Stade 0 = rate non palpable même en inspiration profonde.

Stade 1 = rate palpable seulement en inspiration profonde.

Stade 2 = rate palpable en inspiration normale sur la ligne mamelonnaire gauche mais ne dépassant pas la ligne horizontale passant à égale distance entre le rebord costal gauche et l'ombilic.

Stade 3 = rate descendant en dessous de cette ligne, sans dépasser la ligne horizontale passant par l'ombilic.

Stade 4 = rate dépassant cette dernière ligne mais ne franchissant pas la ligne horizontale passant à égale distance entre l'ombilic et la symphyse pubienne.

Stade 5 = rate descendant en dessous de cette ligne.

8.3.4 Les Techniques parasitologiques et immunologiques

Nous avons utilisé les techniques suivantes :

- la technique d'ELISA pour le dosage des anticorps anti-AMA1.
- La filtration des urines pour la recherche des œufs de *schistosoma haematobium*
- La Détermination des différents phénotypes d'Hb par HPLC (Chromatographie liquide de haute performance).
- La réalisation de la goutte épaisse et du frottis sanguins pour le diagnostic de l'infection palustre
- La mesure du taux d'hémoglobine a permis d'estimer le niveau de l'anémie. Les principes et les matériels utilisés pour chacune des techniques sont présentés en « Annexe » pages :(48-59)

❖ Définition des cas de paludisme non compliqués et sévères

Le paludisme non compliqué se définit par la présence d'au moins un stade asexué du parasite dans le sang en présence des signes ou symptômes du paludisme.

Le paludisme sévère sera définit par les critères de l'OMS (OMS 2002) qui sont les suivants:

- Hémoglobine ≤ 5 g/dl
- Parasitémie $\geq 100,000/\mu\text{l}$
- Prostration
- Détresse respiratoire
- Saignement
- Hémoglobinurie massive
- Convulsions récentes
- Coma ou obnubilation
- Incapacité de boire ou de manger
- Vomissement persistant
- Jaunisse

8.3.5 Les Définitions utilisées

Le paludisme infection à l'inclusion (parasitémie de base) a été défini comme la présence d'au moins un parasite asexué lors de la goutte épaisse.

Le paludisme maladie a été défini par la présence d'une parasitémie ≥ 2500 trophozoïtes par mm³ en présence de la fièvre (température axillaire $\geq 37,5$) ou d'autres signes cliniques comme les céphalées, les vomissements, courbatures (adultes).

La schistosomose a été défini par la présence des œufs de *Schistosoma hematobium* dans les urines.

9. Considérations éthiques :

Nous avons obtenu préalablement l'approbation des comités d'éthique de la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie, du NIAID /NIH. Au tout début de l'étude nous avons entrepris des visites de courtoisie aux différentes autorités (sanitaire, municipale, chefs de quartiers, notables). Au cours de ces visites nous avons donné des explications détaillées sur l'étude et nous avons répondu aux questions. Nous avons obtenu la permission communautaire et le consentement éclairé individuel de tous les participants, toutes les dispositions ont été prises pour garantir la confidentialité. Ces mécanismes avaient pour but d'augmenter la protection des participants et de minimiser les risques. Les participants ont bénéficié d'un suivi médical gratuit durant la durée de l'étude. Toute affection diagnostiquée était traitée aux frais de l'étude et conformément aux normes et procédures de prise en charge des maladies en vigueur au Mali. Pour les cas de paludisme, la prise en charge a été assurée conformément aux directives du Programme National de Lutte contre le Paludisme(PNLP). Les participants à l'étude ont reçus une compensation correspondant à :

- 20 kg de riz pour les adultes

-20 kg de riz avec un sachet de lait pour les enfants. Ces aliments sont fournis à chaque passage en guise de compensation pour le temps perdu pour les raisons de l'étude. Les documents sources et les cahiers d'observations étaient gardés dans des armoires fermées à clés.

10. Collecte, saisie, analyse des données:

Les données ont été récoltées sur les cahiers d'observations. Les dossiers et les échantillons de produits biologiques des participants ne portaient pas leurs noms. Un numéro d'étude et un numéro de randomisation avaient été attribués à tous les participants. Une double saisie a été faite pour réduire les erreurs de saisie. Une série de monitoring interne et externe ont été instaurés pour une meilleure qualité des données. Le logiciel Microsoft Access a été utilisé pour la saisie des données, l'analyse a été faite sur les logiciels Stata. Les tests suivants ont été utilisés pour l'analyse des données :

- Le test Cih2 de Pearson pour la comparaison des proportions.
- les moyennes ont été comparées en utilisant le t-test, et l'analyse de variance.
- la régression de POISSON a été faite pour estimer le risque de survenue du paludisme en prenant comme facteur le titre d'anticorps ajusté pour d'autres cofacteurs comme l'âge, la parasitémie de base, la présence de schistosomose.
- Le taux d'incidence du paludisme a été déterminé à partir du nombre de nouveaux cas (numérateur) et temps d'exposition au risque pendant l'étude (dénominateur). Ce taux a été exprimé en 1000 personnes jour (et année).

V.RESULTATS

V.1 Tableau1 Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude

Caractéristiques	Nombre	%
Classes d'âge		
2-4 ans	74	33,1
5-7 ans	51	22,8
8-10 ans	49	21,8
18-25 ans	50	22,3
Total	224	100
Ethnies		
Bamanan	134	59,6
Sarakolé	77	34,2
Peulh	11	4,9
Malinké	3	1,3
Total	224	100
Sexe		
Masculin	109	48,5
Féminin	116	51,5
Total	224	100

Les résultats de ce tableau montrent que les enfants de **2-4 ans** étaient majoritaires avec **33,1 %** de la population globale de l'étude. Les Bamanan représentent l'ethnie majoritaire avec 59,6% de la population d'étude. Le sex-ratio est 1.06 (116/109), en faveur des femmes.

V.2 Tableau 2 Caractéristiques Cliniques et biologiques des participants à l'inclusion

Caractéristiques	Nombre	%
Parasitémie de base		
Positif	16	7,1
Négatif	208	92,9
Total	224	100
Schistosomose		
Positif	12	5,3
Négatif	212	94,7
Total	224	100
Type d'hémoglobine		
AA	160	75,4
AS	22	10,4
AC	29	13,7
CC	1	0,5
Total	212	100
Anticorps anti AMA1-FVO		
AMA1 FVO \geq 500 UI	47	21
AMA1 FVO < 500 UI	177	79
Total	224	100

A l'inclusion, la prevalence du paludisme infection était de 7,1%, et celle de la schistosomose de 5,3% dans notre population d'étude. L'analyse du phénotypage de l'hémoglobine a montré que le phénotype AA était majoritaire avec **75,4%**. Il est à noter que le trait drépanocytaire AS était présent dans 10,4 % de la population et les hémoglobinopathies AC+CC dans 14,2 %. Enfin, 21% de notre population d'étude avaient un titre d'anticorps anti AMA1 FVO \geq 500 UI et 79% avaient un titre d'anticorps anti AMA1 FVO < 500 UI.

V.3 Relation entre le titre d'anticorps anti AMA1-FVO et les facteurs pouvant modifier la survenue du paludisme

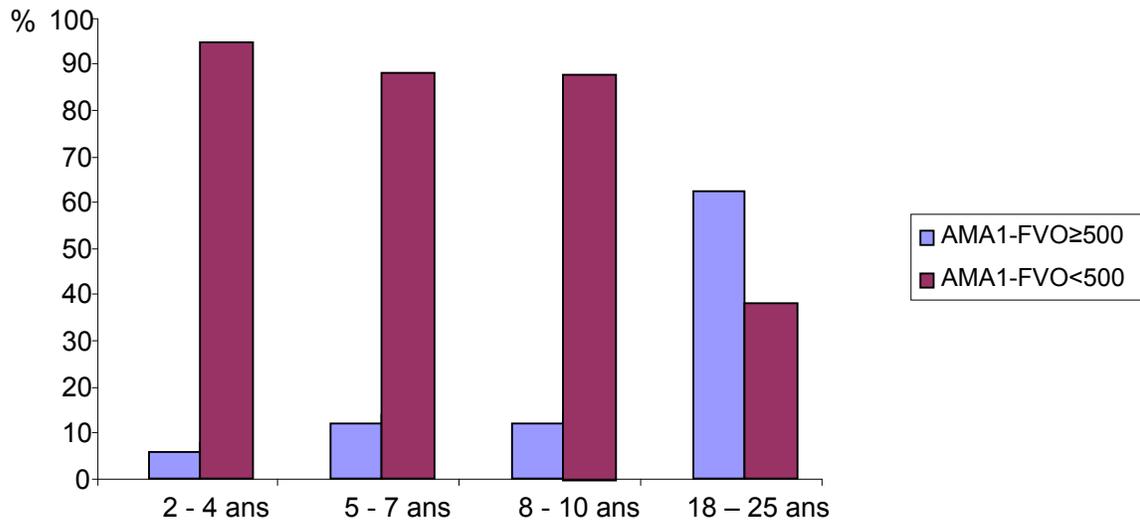


FIGURE 4: Association entre titre d'anticorps anti AMA1-FVO et l'âge

Les résultats de la figure 3 montrent que les titres d'anticorps anti AMA1-FVO ≥ 500 UI augmentent avec l'âge. ($\chi^2 = 66,83$ $p < 0,001$). Cependant, il est à noter qu'il n'y avait pas de différence entre les groupes d'âge 5 - 7 ans et 8 - 10 ans ($\chi^2 = 0,0013$ $p = 0,9$).

Tableau 3 Relation entre titre d'anticorps anti AMA-1FVO et Type d'hémoglobine

Type d'Hb	AMA-1 FVO		Total
	≥ 500 UI	< 500 UI	
AA	36 (22, 5%)	124 (77, 5%)	160 (100%)
AS	5 (22, 8%)	17 (77, 2%)	22 (100 %)
CC + AC	1 (0, 3%)	29 (96, 7%)	30 (100 %)

Nous n'avons pas observé une relation entre les types d'hémoglobine et le niveau du titre d'anticorps antiAMA1-FVO ($X^2 = 2,9$, $p = 0,09$).

Tableau 4 Relation entre le titre d'anticorps antiAMA1-FVO et la parasitémie de base à l'inclusion

Parasitémie de base	AMA-1 FVO		Total
	≥ 500 UI	< 500 UI	
Positive	6 (37, 5%)	10 (62, 5%)	16 (100%)
Négative	41 (19,7%)	167 (80, 3%)	208 (100 %)

A l'inclusion, nous n'avons pas observé une relation entre la parasitémie de base et le niveau du titre d'anticorps antiAMA1-FVO ($X^2 = 2,87$ $p = 0,08$).

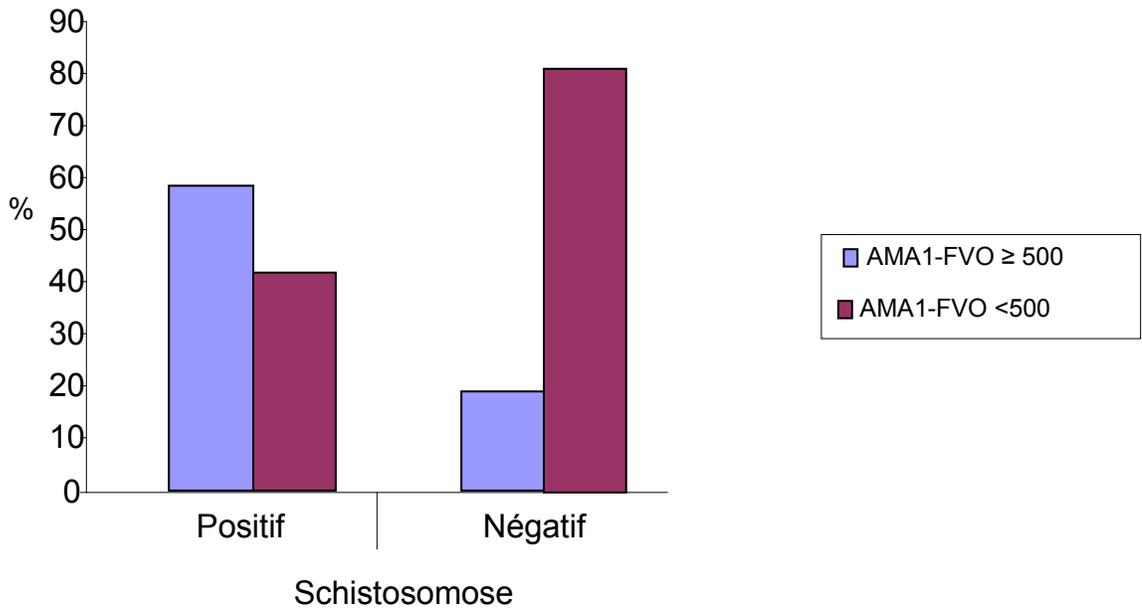


FIGURE 5 : Association entre titre d'anticorps anti AMA1-FVO et la schistosomose à *Schistosoma haematobium*.

L'analyse de la figure 4 nous montre que les patients qui avaient une schistosomose présentaient un taux d'anticorps anti AMA1- FVO \geq 500UI plus élevé ($X^2 = 10,66$ $p < 0,001$).

V.4 Estimation du taux d'incidence du paludisme par personne-temps

Tableau 5 Répartition des épisodes par rapport aux classes d'âge

Episodes	Classes d'âge				Total
	2-4 ans	5-7 ans	8-10 ans	18-25 Ans	
0	2 (2,7%)	2 (3,9%)	9 (18%)	31 (63,2%)	44 (19,4%)
1	13 (17,6%)	6 (11,7%)	10 (20%)	17 (34,6%)	46 (20,53)
2	18 (24,3%)	13 (25,4%)	22 (44,0%)	1 (2,0%)	44 (19,6%)
3	24 (32,4%)	18 (35,2%)	7 (14,0%)	0 (0%)	49 (21,8%)
4	12 (16,2%)	9 (17,5%)	1 (2,00%)	0 (0%)	22 (9,8%)
5	5 (6,7%)	2 (3,9%)	1 (2,00%)	0 (0 %)	8 (3,5%)
6	0 (0%)	1 (1,9%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,4%)
Total	74 (100%)	51 (100%)	50 (100%)	49 (100%)	224 (100%)

Parmi les 224 personnes 19,6 % (44/224) des sujets n'avaient fait aucun épisode palustre. Le nombre d'épisode croit avec l'âge. Il était de 2,7% ; 3,9% ; 18% ; 63,2% respectivement pour les classes d'âge 2-4 ans ; 5-7 ans ;

8-10 ans et 18-25 ans. Au total, les épisodes de paludisme diminuent avec l'âge.

Tableau 6 Répartition de la moyenne des épisodes du paludisme par classes d'âge

Classes d'âge	Moyenne	Ecart type	P
2-4 ans	2,62	1,2	<0,001
5-7 ans	2,70	1,2	<0,001
8-10 ans	1,68	1,1	<0,001
18-25 ans	0,11	0,5	
Moyenne globale = 1,94 ± 1,41			

Nous avons trouvé une différence statistiquement significative entre les classes d'âge par rapport à la moyenne des épisodes (test.F $p < 0,001$). La comparaison des classes d'âge chez les enfants par rapport aux adultes donnait une différence statistiquement significative.

(2-4 ans *versus* 18-25 ans $p < 0,001$)

(5-7 ans *versus* 18-25 ans, $p < 0,001$)

(8-10 ans *versus* 18-25 ans, $p < 0,001$).

Tableau 7 Taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jour (année) par classes d'âge

Classe âge	Incidence du paludisme	Temps de suivi personne/jours	Taux d'Incidence du paludisme par 1000 prses/jours (Année)
2-4 ans (n = 74)	72	11485,31	6,26 (2,28)
5-7 ans (n = 51)	49	8919,32	5,49 (2)
8-10 ans (n = 49)	41	10557,98	3,88 (1,41)
18-25 ans (n = 50)	18	12157,06	1,43 (0,54)
Total	180	43119,71	4,17 (1,52)

Le taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jours (année) était inversement proportionnel à l'âge ($p < 0,001$). Le taux d'incidence globale est de 4,17 /1000 personne /jour).

Il est significativement plus élevé chez les jeunes comparées aux adultes.

(2-4 ans *versus* 18-25 ans $X^2 = 22,5$ $p < 0,001$)

(5-7 ans *versus* 18-25 ans $X^2 = 18,9$ $p < 0,001$)

(8-10 ans *versus* 18-25 ans $X^2 = 6,17$ $p < 0,001$)

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre 2-4 ans *versus* 5-7 ans $X^2 = 1,95$ ($p = 0,16$).

Tableau 8 Taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jour (année) et titre d'anticorps anti AMA1-FVO

Titre d'anticorps AMA1-FVO	Incidence du paludisme	Temps de suivi Personne/jours	Taux d'Incidence du paludisme par 1000 prses/jours (Année)	
< 500 UI (n=178)	155	32302,74	4,79	(1,74)
≥ 500 UI (n=47)	25	10816,96	2,31	(0,84)

Le taux d'incidence du paludisme était significativement plus élevé chez les participants ayant un titre d'anticorps anti AMA1-FVO < 500 UI par rapport à ceux ayant un titre d'anticorps anti AMA 1-FVO ≥ 500 UI ($p < 0,001$).

Tableau 9 Taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jour (année) et type d'hémoglobine

Type d'hémoglobine	Incidence du paludisme	Temps de suivi personne/ jours	Taux d'Incidence du paludisme par 1000 prses/jours (Année)	
AA (n = 160)	127	31884,31	5,01	(1,45)
AS (n = 22)	18	3967,16	5,54	(1,65)
AC+CC (n = 30)	26	5090,13	5,89	(1,86)

L'analyse de ce tableau montre qu'il n'y avait pas de relation entre le taux d'incidence du paludisme et les types d'hémoglobine ($p = 0,09$).

Tableau 10 Taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jour (année) et parasitemie de base

GE à l'inclusion	Incidence du paludisme	Temps de suivi personne/ jours	Taux d'Incidence du paludisme par 1000 prses/jours (Année)	
Négatif (n = 208)	171	39160,46	4,36	(1,59)
Positif (n = 16)	9	3959,24	2,27	(0,82)

A l'inclusion, les participants qui étaient négatifs à *P. falciparum* avaient un taux d'incidence palustre plus élevé que ceux qui étaient positifs ($p < 0,001$).

Tableau 11 Taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jour (année) et schistosomose à *Schistosoma haematobium*

Schistosomose	Incidence du paludisme	Temps de suivi personne/Jours	Taux d'Incidence du paludisme par 1000 prses/jours (Année)	
Positif (n = 12)	3	3612,06	0,83	(0,30)
Négatif (n = 212)	177	39348,18	4,49	(1,63)

Les résultats du tableau 11 montrent qu'à l'inclusion les participants qui n'avaient pas de schistosomose à *S. haematobium* avaient un taux d'incidence palustre plus élevé par rapport à ceux présentant une schistosomose à *S. haematobium* ($p < 0,001$).

V.5 Analyse des facteurs influençant la survenue des accès palustres

Tableau 12 Relation entre le titre d'anticorps anti-AMA1-FVO et le nombre d'épisode du paludisme, en présence d'autres co-facteurs, selon la régression de poisson

	IRR	IC (95%)		P
		Inferieure	Supérieure	
AMA1-FVO ≥ 500UI	0,834	0,598	1,161	0,283
Classe d'âge	0,612	0,551	0,679	0,0001
Schistosomose	0,263	0,096	0,721	0,009
Parasitemie de base	0,600	0,393	0,917	0,018

L'analyse de ce tableau nous montre que les participants possédant un titre d'anticorps anti AMA1-FVO ≥ 500 UI avaient tendance à faire moins d'épisode palustre (sans différence statistique) comparés à ceux ayant un titre d'anticorps AMA1-FVO < 500 UI, après avoir ajusté pour l'âge, la schistosomose à *S. haematobium* et la parasitémie de base, nous observons que l'augmentation de l'âge, la présence de schistosomose à *S. haematobium* et de la parasitémie de base contribuent de façon significative à la diminution du nombre d'épisodes.

VI. Commentaires et Discussion :

VI-1 Méthodologie

Notre étude a été menée dans la localité de Kambila, un village rural situé au Nord Ouest et à 15 km de Bamako. Le choix de ce site se justifie par sa proximité avec le laboratoire du DEAP/MRTC, et par l'adhésion de sa population aux études antérieures qui y ont été effectuées par notre département.

Pour pouvoir mesurer l'effet d'un taux pré existant d'anticorps anti AMA-1 sur la survenue du paludisme, il était plus pertinent de faire une étude de cohorte. De plus, dans le cadre d'une étude, il nous est possible de mesurer l'impact du taux d'anticorps anti AMA-1 sur l'incidence du paludisme.

VI- 2- Caractéristiques cliniques et biologiques

A l'inclusion, nous avons observé une fréquence globale du paludisme infection de 7,1 %. Cette fréquence observée reste très en deçà de celle observé par Dolo et al (2003), (78,5%) dans une étude menée à Bancoumana chez les enfants de 1 à 4 ans [40]. Nos résultats s'expliquent sans doute par le fait que nos inclusions ce sont déroulées en saison sèche. En effet, c'est au début du mois de mai que nos volontaires ont été inclus.

La fréquence des schistosomoses à *S. haematobium* est de 5,3%. Cette faible prévalence peut s'expliquer par l'absence de gîte larvaire permanent et par la campagne de traitement de masse à base d'albendazole qui a précédé notre étude.

La fréquence du trait drépanocytaire était de 10,4 % dans notre population d'étude. Cette fréquence était comparable à celles observées par Batilly (9,56 %) et Koné (10 %) chez les enfants malinkés à Kangaba et à Kela respectivement en 2004 et

2005 [41-42]. Au cours de notre étude nous avons observé 1 seul cas d'homozygotie CC.

VI- 3- Relation entre le titre d'anticorps et les facteurs pouvant influencer la survenue des accès palustres

Au cours de notre étude, nous avons dosé le titre d'anticorps anti AMA1-FVO par la technique d'ELISA. En nous référant aux travaux de Dicko et al (2007) [43] qui avaient observé un taux médian d'anticorps anti AMA-1 égale à environ 500 UI chez les sujets semi immuns à Donéguebougou, nous avons jugé utile de diviser notre population d'étude en "bons" répondeurs (taux d'anticorps AMA-1 \geq 500 UI) et en "mauvais" répondeurs (taux d'anticorps AMA-1 $<$ 500 UI). Nous avons observé une augmentation progressive du titre d'AC AMA1-FVO avec l'âge. Les titres d'anticorps les plus faibles ($<$ 500 UI) ont été observés chez les enfants de 2 à 10 ans. C'est dans cette tranche d'âge que nous avons enregistré l'incidence la plus élevée. Chez les adultes (titres d'anticorps très élevés \geq 500 UI), nous avons observé très peu d'épisodes palustres.

Nous n'avons pas trouvé de lien entre le titre d'anticorps anti AMA1-FVO, la parasitémie de base et le type d'hémoglobine. En revanche, nos résultats montrent une association entre le titre d'anticorps anti AMA1-FVO et la schistosomose. Ces résultats sont comparables aux données de plusieurs auteurs sur le rôle protecteur des helminthiases dans la survenue des accès palustres. [Doumbia (2007), Diabaté (2002)]. [44] [45]. En Thaïlande des études ont montré que l'infection par les helminthes protège contre les formes cérébrales du paludisme chez les enfants [46].

VI- 4- Estimation du taux d'incidence par personne-temps

Au cours de notre suivi, nous avons enregistré une incidence globale de 4,17 épisodes par 1000 personnes jours soit 1,52 épisode par an. Notre taux d'incidence est comparable à celui de Sagara I et al (2002) qui avaient trouvé une moyenne d'accès palustre de 1,44 épisodes par enfant par an à Sotuba, chez les enfants de 6 mois à 7ans [47]. Par contre, Kamaté B (1999) avait trouvé une incidence 1,5 épisodes par enfant pendant 24 semaines de suivi à Doneguebougou chez les enfants de 3 mois à 20 ans [48]. C'est dans les tranches d'âge de 2 à 4 ans et 5-7 ans que l'incidence était très élevée soit respectivement 2,28 ; 2 épisodes par enfant

par an. Ces valeurs étaient comparables à celle trouvées par Dolo *et al* (2003). En effet, ils avaient observé à Donéguebougou une incidence cumulée variant entre 2 à 4 épisodes par enfant /an [37]. Enfin, nos résultats étaient inférieurs à ceux trouvés par Lemming *et al* (1995) en Tanzanie, où ils avaient observé 3 à 3,5 épisodes par enfant par an [49].

En ce qui concerne la relation entre le titre d'anticorps anti AMA1-FVO et l'incidence du paludisme, nous avons observé une incidence de 0,84 épisode par an, chez les participants ayant un titre d'anticorps anti AMA1-FVO ≥ 500 UI et 1,74 épisodes par an chez ceux ayant un titre d'anticorps anti AMA1-FVO < 500 UI. Ces résultats montrent clairement une association entre le titre d'anticorps anti AMA1-FVO et l'incidence du paludisme. Ceci permet de mettre en évidence le concept de prémunition des sujets vivants en zone d'endémie palustre [9].

VI- 5- Facteurs influençant la survenue des accès palustres

En prenant en compte l'effet de certains facteurs susceptibles de modifier la survenue des accès palustre, nous avons observé que les participants ayant un titre d'anticorps anti AMA1-FVO ≥ 500 UI avaient tendance à faire moins d'épisode palustre comparés à ceux ayant un titre d'anticorps anti AMA1-FVO < 500 UI [Tableau 12]. La présence d'un titre d'anticorps anti AMA1-FVO n'est pas suffisante pour assurer la prémunition. En effet, on a constaté une diminution significative du taux d'incidence du paludisme avec une augmentation de l'âge, la présence de schistosomose et d'une parasitémie de base. Cette diminution du taux d'incidence du paludisme pourrait, d'une part s'expliquer par l'entretien de l'immunité antipalustre chez les porteurs asymptomatiques de *P. falciparum* [9], et d'autre part par une réaction croisée chez les sujets coinfectés (*P. falciparum* plus *Schistosoma ssp*) dans les zones d'endémie.

VII. Conclusion :

Au terme de notre étude, il ressort que les participants qui ont un titre d'anticorps anti AMA1-FVO ≥ 500 UI avaient tendance à faire moins d'épisode palustre comparés à ceux ayant un titre d'anticorps AMA1-FVO < 500 UI. L'effet du titre d'anticorps anti AMA1-FVO disparaît, après avoir ajusté pour l'âge, la schistosomose et la parasitémie de base qui avaient tous un effet significatif protecteur.

VIII. Recommandations

Aux chercheurs :

- ❖ De continuer cette étude :
 - En mesurant le titre des anticorps au cours des différents passages transversaux.
 - Analyser l'effet de ces différents titres d'anticorps sur l'incidence du paludisme
De prendre en compte la fréquence de la parasitémie de base et des co-infections paludisme et schistosomoses à *Schistosoma haematobium* dans l'évaluation de l'efficacité des essais cliniques médicamenteux et vaccinaux dans les populations des zones d'endémie palustre

Aux autorités sanitaires et Programme Nationale de Lute contre le Paludisme.

- ❖ D'accélérer la prévention par l'usage de moustiquaires imprégnés d'insecticide et la prise en charge des cas cliniques en vue d'une réduction de la morbidité liée au paludisme chez les enfants.

REFERENCES

1. **Paludisme OMS 2008.** <http://www.patho.org/French/DPC/CD-world-rpt-2008.htm>
19 janvier 2009
2. **PNLP. 2004.** Deuxième révision juin2003-juillet: 12-14.
3. **OMS**, série de rapport technique 892, 20^{ème} rapport, Genève 2002.
4. **MURPHY S C, BREMAN JG. (2001)** Gaps in the childhood malaria burden in Africa: Cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med and Hyg* **64**: 57-67.
5. WWW.impact-malaria.com/index_prehome.asp. 27 Mai 2008
6. **SERGEANT E, PAROT, LAND DONATIEN A. (1924)** une question de terminologie: immuniser et prémunir. *Bull SocPath Exot* **17**: 37 -38.
7. **I.A. McGregor, (1974)** Mechanisms of acquired immunity and epidemiological patterns of antibody responses in malaria in man, *Bull. World Health Organ* **50**: 259–266.
8. **C. Rogier, A.B. Ly, A. Tall, B. Cisse and J.F. (1999)** Trape, *Plasmodium falciparum* clinical malaria in Dielmo, a holoendemic area in Senegal: no influence of acquired immunity on initial symptomatology and severity of malaria attacks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60** (3): 410–420.
9. **C. Rogier, (2003)** Paludisme de l'enfant en zone d'endémie : épidémiologie, acquisition d'une immunité et stratégies de lutte. *Med. Trop.* **63** (4-5): 449–464.

- 10. Ferreira MU, Kimura EA, De Souza JM, Katzin AM. (1996)** The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. *Am J Trop Med Hyg* **55**(3): 315-23.
- 11. Giha HA. (1999)** Nine-year longitudinal study of antibodies to variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infect Immun* **67**: 4092-4098
- 12. Ramasamy R, Nagendran K, Ramasamy MS. (1994)** Antibodies to epitopes on merozoite and sporozoite surface antigens as serologic markers of malaria transmission: studies at a site in the dry zone of Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg* **50**: 537-547.
- 13. Kinyanjui SM, Bull P, Newbold CI, Marsh K. (2003)** Kinetics of antibody responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte variant surface antigens. *J Infect Dis* **187**: 667-674.
- 14. J.C. Edozien, H.M. Gilles and I.O.K. Udeozo, (1962),** Adult and cord-blood gamma globulin and immunity to malaria in Nigerians. *Lancet* ii: 951–955.
- 15.S. Cohen, I.A. McGregor and S. Carrington, (1961)** Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* **192**:733–737.
- 16 A. Sabchareon, T. Burnouf, D. Ouattara, P. Attanath, H. Bouharoun-Tayoun and P. (1991)** Chantavanich Parasitological and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45 (3)**: 297–308.
- 17.Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman. (2004)** A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet.* **363(9414)**:1017-24.

18 LAVERAN, A. (2004) Note sur un nouveau parasite dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. **(1880)** Bulletin de l'Académie de Médecine, séance du 28 décembre **(9)** :1346-1347.

19. Doumbo O. (1992) Epidémiologie du paludisme au Mali, étude de la chloroquino-résistance, essai de stratégie de contrôle basé sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associée au traitement systématique des accès fébriles. Thèse de Doctorat des sciences biologiques (Parasitologie, pathologie, Ecologie) Montpellier

20. Dembélé H. (1992) Paludisme et grossesse, saisonnalité et relation avec anémie et petits poids de naissance à Bougoula (hameau de culture) dans la région de Sikasso. **(1995)** Thèse Med Bamako, N°20.

21. SHAHABUDDIN, M. AND KASLOW, D. C. (1994) Biology of the development of *Plasmodium* in the mosquito midgut: a molecular and cellular view. Bull de l'Institut Pasteur **92**: 119-132

22. GARNHAM, P. C. C. (1977) The continuing mystery of relapses in malaria. Protozoological. Abstracts **1**: 1-12.

23. McGregor IA, Barr M. (1962) Antibody response to tetanus toxoid inoculation in malarious and non-malarious *Plasmodium* Gambian children. Trans R Soc Me. Hyg **56**: 364-7.

24. Struik SS, Riley EM. Does malaria suffer from lack of memory? **(2004)**. Immunol Rev **201**: 268-90.

25. Perlmann. P; and Troye-Blomberg. M. (2000) Malaria blood stage infection and its control by the immune system. Folia Biol (Krakow), **46(6)**: 210-218.

26. **Bouharoun. TH; and P Druihle. (1992)** *falciparum* malaria: evidence for an isotype, imbalance, which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immun*, **60**: 1473-1481.

27. **Christophe. A; Yves. T; Franc. OT. (2000)** High immunoglobulin g2 (igg2) and low igg4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect and Immunity* **689(3)**: 31252-31258.

28. **Mendis. KN; Targett. Ga. (1981)**, Immunization to produce a transmission blocking immunity in *Plasmodium yoelii* malaria infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **75(1)**: 158-159.

29. **Gwadz. RW; Carter. R; and Green. I. (1979)** Gamete vaccines and transmission blocking immunity in malaria. *Bull World Health Org* **57 Suppl 1**: 175-180.

30. **Clark. IA; Rockett. Ka; and Cowden Wb. (1991)**, Proposed link between cytokines nitric acid and human cerebral malaria. *Parasitol Today* **7**: 205-207.

31. **Weetman AP. (1999)** The immunology of pregnancy. *Thyroid* **9**: 643-646.

32. **Kwiatkowski. D. (1992)** Malaria: becoming more specific about no specific immunity. *Curr Opin Immunol*, **4**: 425-431.

33. **Cruz Cubas. AB; Gentilini. M; and Monjour L. (1994)** Cytokines and T-cell response in malaria. *Biomed. Pharmacother*, **48**: 27-33.

34. **CREWETHER P. E., CULVENOR J. G., SILVA A., COOPER J. A. and ANDERS, R. F (1990)**. *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp. Parasitologia*; **70** p:193-206.

35. **PETERSON M. G. , COPPEL R. L., MOLONEY M. B., KEMP D. J. (1988)** Third form of the precursor to the major merozoite surface antigen of *P. falciparum*. *Mol. Cel. Biol.* p: 2662-2667.

- 36. MENDIS K. N., PETER H. DAVID P. H., CARTER R. (1991)** Antigenic polymorphism in malaria: is it an important mechanism for immune evasion? Immunol Today. Mar.; **12** (3) p: 34-37.
- 37. Dembélé M. (1989)** Evaluation entomologique parasitologique et clinique de l'efficacité des rideaux et couvertures imprégnés à la perméthrine dans la stratégie de contrôle du paludisme. Thèse de médecine ; Bamako ; n° 39.
- 38. Delmont J, Ranque P, Ballique H. et coll. (1981)** Influence d'une chimioprophylaxie antipaludique sur l'état de santé d'une communauté rurale en Afrique de l'ouest. Résultats préliminaires. Bull. Soc. Path. Exot **74** : 600-610.
- 39. Doumbo O., Traore S. F., Sow Y. et coll. (1991)** Impact des rideaux et couvertures imprégnés de perméthrine sur les indices paludométriques et le nombre d'accès palustres par enfant dans un village d'hyper endémie palustre de savane malienne (résultats préliminaires de la première année d'étude). Bull. Soc. Path Exot. ; **84**: 761-774.
- 40. Dolo A, Camara F, Poudiougou B, Toure A, Kouriba B, Bagayoko M, Sangaré D, Diallo M, Bosman A, Modiano D, Toure YT&, Doumbo O.(2003)** Epidémiologie du paludisme dans un village de savane soudanienne du Mali (Bacoumana).Bull soc pathol Exot.Nov (**4**): 308-12.
- 41. Bathily T. (2006)** Hémoglobine S et paludisme grave dans une population âgée de 3 mois à 5 ans dans les villages de Kagaba et Kela (mali) de juin 2001 à janvier 2005. Thèse de Med ; FMPOS N° 138
- 42. Koné S.M. (2008)** Association trait drépanocytaire et déficit en G6PDA : Impact sur la protection contre le paludisme grave Kagaba et Kela (mali) de juin 2001 à janvier 2005. Thèse de Med ; FMPOS N° 94

- 43. Dicko A, Diemert DJ, Sagara I, Sogoba M, Niambele MB, Assadou MH, Guindo O, Kamate B, Baby M, Sissoko M, Malkin EM, Fay MP, Thera MA, Miura K, Dolo A, Diallo DA, Mullen GE, Long CA, Saul A, Doumbo O, Miller LH. (2007)** Impact of a *Plasmodium falciparum* AMA1 vaccine on antibody responses in adult Malians. PLoS ONE **2(10)**: e1045.
- 44. Doumbia S. (2007)** Evolution des paramètres paludométriques au cours de la coïnfection *Schistosoma Haematobium* et *plasmodium falciparum* dans un village au Mali. Thèse de Med ; FMPOS N° 187
- 45. Diabaté D. (2006)** Impact du portage chronique de *Schistosoma Haematobium* sur l'infection palustre à Bandiagara. Mali. Thèse de Med ; FMPOS N° 62
- 46. Nacher M, Gay F, Singhasivanon P, Treeprasertsuk S, Mazier D, Vouldoukis I, Looareesuwan S. (2000)** *Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria. Parasite Immunol; 22:107-114.
- 47. Sagara I, Dicko A, Thera M A, Klion A, Diemert D, Diallo D A, Sogoba M, Niambele M B, Yalcouye D, Miller L, Doumbo O K.** No increase in the incidence of *plasmodium falciparum* malaria after stopping malaria chemoprophylaxis in children living under different entomologic inoculation rates (EIRs) in Mali.
- 48. Kamate B. (2002)** Effet du niveau de transmission et de l'âge sur l'incidence du paludisme simple à Sotuba et Donéguebougou Mali en 1999 et 2000. Thèse de Med ; FMPOS N° 143
- 49. Lemnge M M. (1995)** malaria and filariasis at Magoda village in northeastern Tanzania: epidemiology, maloprim malaria prophylaxis and estimation of blood maloprim levels. PhD. Thesis, Zoological Institute, Copenhagen University.

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom: TRAORE

Prénom: Abdrahamane

Nationalité : Malienne

Année de soutenance: 2008 - 2009

Ville de soutenance: Bamako

Titre: Réponse des anticorps anti AMA1-FVO et l'incidence du paludisme à Kambila.

Lieu de dépôt: Bibliothèque de la faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie, Bamako, Mali.

Secteur d'intérêt: Santé publique - Parasitologie - Epidémiologie - Immunologie.

Résumé

Ce travail avait pour but d'explorer l'effet d'un taux pré-existant d'anticorps anti AMA1-FVO sur la survenue du premier épisode palustre.

Pour pouvoir mesurer l'effet d'un taux pré existant d'anticorps anti AMA-1 sur la survenue du paludisme, nous avons réalisé une étude de cohorte sur 224 participants sains répartis en 4 groupes selon les classes d'âge : 2-4 ans, 5-7ans ,8-10, ans, et 18-25 ans.

L'analyse des données a montré que : le titre d'anticorps anti AMA1-FVO ≥ 500 UI et le taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jours (année) était inversement proportionnel à l'âge. titre d'anticorps anti AMA 1-FVO croit avec l'âge. Le taux d'incidence du paludisme était significativement plus élevé chez les participants ayant un titre d'anticorps anti AMA1-FVO < 500 UI par rapport à ceux ayant un titre d'anticorps anti AMA 1-FVO ≥ 500 UI. Les participants qui étaient négatifs à *P. falciparum* avaient un taux d'incidence palustre plus élevé que ceux qui étaient positifs Les participants qui n'avaient pas de schistosomose avaient un taux d'incidence palustre plus élevé par rapport à ceux présentant une schistosome.

Au terme de ce travail, il ressort que les participants qui ont un titre d'anticorps anti AMA1-FVO ≥ 500 UI avaient tendance à faire moins d'épisode palustre comparés à ceux ayant un titre d'anticorps AMA1-FVO < 500 UI. Après avoir pris en compte la contribution âge, la schistosomose et la parasitémie de base, nous observons que l'augmentation de l'âge, la présence de schistosomose et de la parasitémie de base contribuent de façon significative à la diminution du nombre d'épisodes.

Mots clés : paludisme, Anticorps anti AMA1-FVO, Incidence, Kambila, prémunition.

ANNEXES

Etude parasitologique du Paludisme

ANNEXE 1 :

Gouttes épaisses

Matériels utilisés:

Au cours de notre étude nous avons utilisé les matériels suivants pour la confection de la goutte épaisse : Lames porte-objet, vaccinostyles stériles, alcool à 90°, coton hydrophile, marqueur indélébile, boîtes de collection type OMS, bacs de coloration, éprouvettes graduées de 100 ml et 500 ml, râtelier, chronomètre, huile d'immersion, solution de Giemsa, eau distillée tamponnée (pH=7,2), comprimés tampons (1 comprimé pour un litre d'eau distillée), minuterie, microscope optique binoculaire, crayon de papier, papiers filtres wattman.

Mode opératoire :

La goutte épaisse a permis de déterminer l'espèce, le stade de développement du parasite et la charge parasitaire.

Il consistait à désinfecter le bout du troisième ou du quatrième doigt avec l'alcool, et de piquer un vaccinostyle stérile. La première goutte était enlevée avec une compresse stérile. La deuxième goutte était déposée au milieu de la lame dégraissée. La goutte était ensuite étalée avec le bord d'une seconde lame. Les gouttes épaisses réalisées étaient ensuite conservées dans les boîtes de collection à l'abri de la poussière et des mouches.

Coloration :

La coloration s'effectue en un seul temps. On utilise le giemsa à 10% pendant 30 minutes.

Lecture :

Elle était faite au microscope optique binoculaire à immersion (objectif x100). La densité a été établie par comptage des parasites sur 300 leucocytes et les résultats exprimés en nombre de parasites par mm^3 de sang sur la base de 7500 leucocytes comme moyenne du nombre leucocytaire par μl de sang.

Dosage du taux d'hémoglobine :

Matériels utilisés :

Alcool à 90°, vaccinostyles stériles, coton hydrophile, micro cuvette, hémoglobino-pathie (Hemocue®), piles.

Mode opératoire :

La détermination du taux d'hémoglobine est obtenue en utilisant un hémoglobinomètre (Hemocue®). Il consistait à désinfecter le bout du troisième ou du quatrième doigt avec l'alcool, et de piquer avec un vaccinostyle stérile. La première goutte était enlevée avec une compresse sèche. Après une goutte de sang est mise dans une micro cuvette placée dans l'hémoglobinomètre. Celui-ci affichait automatiquement le taux d'hémoglobine sur l'écran.

ANNEXE 2 : Schistosomoses

-Examen des urines :

.Matériels :

- . Papier Whatman n°3
- .Seringue de10 ou 20cc
- . Chambre de filtration
- .Ninhydrine solution 5%
- . Pipette
- .Bocaux
- . Microscope.

Les urines étaient recueillies dans les bocaux portant le numéro d'identification de l'enfant. Les échantillons d'urines étaient ensuite regroupés dans une bassine en plastique placée dans un coin de la cour des locaux de travail. Les urines étaient filtrées immédiatement après la collecte sur un papier Whatman. Les filtres étaient colorés à la ninhydrine à 5% et séchées puis conservés pour être lus.

. Mode opératoire :

- Inscrire le numéro de l'enfant sur le disque du papier Whatman n°3.
- Placer le disque du papier Whatman dans l'un des compartiments d'un port- filtre, adapter le second compartiment puis viser de manière à éviter que l'urine ne s'écoule au moment de la filtration.
 - Prélever 10ml d'urine à l'aide d'une seringue, puis adapter la seringue au port-filtre. -Pousser le piston pour chasser l'urine à travers le filtre tout en maintenant la seringue verticalement.
 - Enlever la seringue du porte-filtre, tirer une nouvelle fois le piston, puis chasser le reste des urines restes sur le filtre.
 - Dévisser le port-filtre et déposer à l'aide d'une pince le filtre sur une plaque d'étalement.
 - Déposer une goutte de Ninhydrine à 5% sur le filtre.
 - Laisser sécher le filtre pendant quelques heures.
 - Lire ensuite le filtre (déposé sur une lame) au microscope (objectif x4) en humectant auparavant celui-ci en y déposant quelques gouttes d'eau.

Le volume d'urine que nous avons filtré était de 10ml.

La charge ovulaire de *S. haematobium* fut évaluée en nombre d'œufs par 10ml d'urine. L'intensité de l'infection a été définie selon la classification de l'OMS(1985).Trois classes d'intensités ont été définies :

0 œufs----- non infecté
1-49 œufs/10ml d'urine-----moyennement infecté
≥50 œufs/10ml d'urine -----fortement infecté

ANNEXE 3 : Phénotypage de l'hémoglobine

Détermination des différents types d'Hb : HPLC

a- Principe: D-10 est un automate dont le principe repose sur l'HPLC permettant de faire la quantification et la détermination des différentes fractions de l'hémoglobine (AA, F, S, C, glyquée).

b-Matériels et réactifs:

-Matériels:

-pipette de 1000 μ l

-Embouts de 1000 μ l

-Pipette de 10 μ l

-Embouts de 10 μ l

-Portoir d'échantillons (rack d'échantillons au maximum 10 position pour micro tubes)

-Microtubes de 2ml

-Tubes à EDTA

-Réservoir à déchets externes

-réactifs :

-buffer (wash/diluent)

-Solutions contrôles de qualité (<<A2/F >>control réf 553)

-Eau distillée

c-Modes opératoires :

-Préparations des contrôles de qualité :

Ajouter 1000 μ l d'eau distillée à chacun des niveaux de contrôles de qualité <<A2/F control>> lyophilisée (réf. 553) pour les reconstituer. Laisser reposer 10 mn, agiter pour dissoudre.

Ecrire la date de reconstitution sur l'étiquette. Le contrôle de qualité<<A2/F control>> reconstitué est stable pendant 21 jours conservé entre 2°C et 8°C. Les contrôles de qualité doivent être dilués au 1 :300 avant l'analyse. Avant la préparation de l'hémolysât, veiller a

retourné plusieurs fois le flacon de contrôles de qualité pour assurer son homogénéité.

-Préparation des échantillons de patients :

Pipeter 1.5ml de wash/ Diluent dans un microtube de 2ml et ajouter 5µl de l'échantillon de sang total. Fermer le microtube et mélanger complètement Positionner le microtube sur un adaptateur à barrés appropriés.

-Exécution d'une série

Pour pouvoir exécuter une série, le D-10 doit être mode veille (STANDBY)

-charger les microtubes et les tubes sur le rack échantillons, aligner les codes à barres des adaptateurs de microtubes et les tubes de façon à ce qu'ils puissent être lus par le lecteur (orientation des codes à barres vers la face arrière du rack). Charger le rack dans le D-10. Dans le menu MENU RUN, cliquer sur START. Le D-10 se met en route et affiche l'état RUNNING dans la barre d'état situé au bas de l'écran.

-Une fois que tous les échantillons du rack ont été analysés, le D-10 retourne automatiquement en mode STANDBY, le portoir d'échantillons peut alors être éjecté pour un nouveau chargement d'échantillons et une nouvelle série d'analyses.

Une fois la série terminée, le D-10 peut rester en veille jusqu'à 90 minutes (durée paramétrable de 30 à 90min). A l'issue, le D-10 se met automatiquement en position de repos (SLEEP). Un cycle de préchauffage (START UP) devra alors être exécuté avant toute nouvelle série.

b-Résultats

Lorsque l'analyse d'un échantillon est réalisée, le résultat est imprimé automatiquement et s'exprime en pourcentage en fonction des différentes fractions de l'hémoglobine.

ANNEXE 4 : Dosage de l'anticorps

Technique d'ELISA

La technique ELISA a été utilisée pour le dosage des anticorps.

Principe

La technique ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

Matériel

Incubateurs ;

Réfrigérateurs ;

Plaque de microtitration (*Immulon® 2HB et 4 HBX*);

Pipettes multicanaux (*University Pipette Service*), 5-50µl et 50-300µl ;
(*ISB integra biosciences*)

Pipettes pasteur (*Gilson*) ;

Embouts pour pipette ;

Tubes ependorf ;

Tube falcon de 15 et 50 ml

Papier hygiénique ;

Gants ;

Un laveur de microplaques (*ULTRAWASH PLUS*) ;

Lecteur de microplaques (*VERSAmax microplate reader.*).

Le logiciel Softmaxpro programme.

Poubelles.

Réactifs

Carbonate de Sodium-Mallinckrodt AR Cat. No.7521;

Bicarbonate de Sodium-Mallinckrodt AR Cat. No.7412;
Eau désionisée fabriquée au laboratoire du DEAP ;
Eau distillée: Ultra pure Water-Advanced Biotechnologies, Inc.; Cat# 01-515-001;
Le lait: Bacto Skim Milk, DIFCO Laboratireis, reorder # 0032-17-3 ;
TRIS Buffered saline (TBS) 10X, Biofluids, Cat# 616NS-000
Comprimés de Phosphatase : Sigma 104 Phosphatases substrate tablets. Cat# 104-105 ;
Hydroxyde de sodium 10N solution, J.T.Baker, Cat# 5674-02 ;
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate), Sigma, Cat# P-1379
Sodium azide 2% ;
Antigènes de sensibilisation : (Coating Antigens.) :
AMA1-FVO: Lot: 0932 WRAIR
AMA1-3D7: Lot: 0942 WRAIR
Anticorps standard pour les deux clones d'AMA-1
Anticorps de chèvre anti-IgG humaine couplé à une phosphatase alcaline ; Kirkegaard & Perry Labs, Inc. 1.0mg Cat# : 075-1006.

7-1-4 Préparation des solutions tampons

Tampon carbonate (coating buffer 10X)

(Na)₂CO₃..... 15,74 g

NaHCO₃29,4 g

Q.S.P -----1000 ml

NB : Pour préparer une solution de 1X à partir de la solution de 10X, mélanger 100 ml de la solution 10x avec 900 ml d'eau distillée.

Solution de lavage (Wash Buffer.): 0.1% Tween-TBS.

TBS, 10X -----100 ml

Tween-20 -----1 ml

QSP -----1000 ml

L'ensemble est soumis à une agitation magnétique au moins 20 minutes à la température du laboratoire avant utilisation.

Solution de blockage (Blocking Buffer: 5% Milk in TBS.)

Skim Milk Powder -----25g

TBS, 1X----- 500 ml

QSP-----500 ml

L'ensemble est soumis à une agitation magnétique au moins 20 minutes à la température du laboratoire et gardé à 4 degré avant utilisation. Cette solution peut être utilisé jusqu'à deux semaines.

NB : pour la solution de dilution, ajouter du sodium azide à 0'1%

Substrat (Révélateur.)

Pour préparer une solution de 10 ml de substrat :

Dissoudre 2 comprimés de Phosphatase alcaline 5mg dans 10 ml de tampon carbonate (Coating buffer) et garder à l'obscurité.

Solution stop. NaOH 5N

Pour préparer 50 ml de solution stop

NaOH 10N-----25 ml

Eau distillée-----25 ml

Dilution du Standard :

La solution stock a une concentration de 100 UI. La concentration de travaille de la première dilution est de 20 UI. Donc on réalise une dilution de 1/5. Après on effectue une dilution en série à 10 gammes dans les puits d'une microplaque.

Mode opératoire

I. Sensibiliser (Coating) les plaques avec l'antigène.

1) Etiqueter (Labeler) le nombre de plaque dont vous avez besoin : Mettre le nom du type d'antigène et la date sur chaque plaque.

2) Chaque plaque requiert 10ml de solution coating ; Déterminer le volume total de la solution de coating dont on a besoin pour pouvoir sensibiliser le nombre de plaques utilisées.

3) Diluer l'antigène à une concentration de 1µg/ml dans la solution 1X coating buffer.

Mélanger cette solution.

4) À partir de la pipette multichannel mettre 100µl dans chaque puits de chaque plaque.

Couvrir les plaques avec une plaque vide et d'une fine membrane plastique (ClingWrap) et du papier aluminium.

5) Incuber les plaques à 4 degrés pendant au moins une nuit.

NB: Ces plaques peuvent être conservées pendant un maximum de 7 jours.

II. Blocage des plaques

Laver les plaques à la machine ULTRAWASHER PLUS et tapoter sur un chiffon propre.

Avec une pipette multichannel répartir dans chaque puits de chaque plaque 200 µl de la solution de blocage pour bloquer les espaces vides et placer les plaques à l'incubation à la température ambiante dans une chambre humide pendant 2 heures.

NB: on peut utiliser du lait avec sodium azide ou du lait sans sodium azide.

III. Premier anticorps (sérum)

1) Diluer le sérum à la concentration désirée dans la solution de blocage ainsi que le standard

2) Laver les plaques à la machine ULTRAWASHER PLUS et tapoter sur un chiffon propre.

3) Répartir 100µl par puits du premier anticorps (sérum dilué à tester) en « triplicate » à l'aide d'une pipette multichannel. Dans les deux dernières rangées H et G, mettre la solution du standard, incuber les plaques pendant 2 heures dans une chambre humide.

IV. Second anticorps

- 1) Laver les plaques à la machine avec du 0.1% Tween -TBS pour enlever les anticorps non liés.
- 2) Mettre dans chaque puits 100 μ l du second anticorps (anticorps conjugué) dilué à 1 μ g/ml dans la solution de blocage sans azide. Incuber pendant 2 heures dans la chambre humide à la température ambiante.

V. Substrat

- 1) Laver les plaques à la machine (programmée à 4 lavages) pour éliminer les excès.
Vérifier que la plaque est propre (surface de la plaque en bas et en haut)
- 2) À partir d'une pipette multichannel, mettre 100 μ l de substrat dans chaque puits de chaque plaque.

VI. Solution stop

Arrêter la réaction en ajoutant 25 μ l de la solution stop dans chaque puits.

VII. Lecture

Faire la lecture immédiatement après le stoppage à l'aide d'un spectrophotomètre (VERSAMAX) relié à un ordinateur à la longueur d'onde $\lambda_1 = 405$ et $\lambda_2 = 490$, et utiliser le programme SOFTmaxPRO 4.0

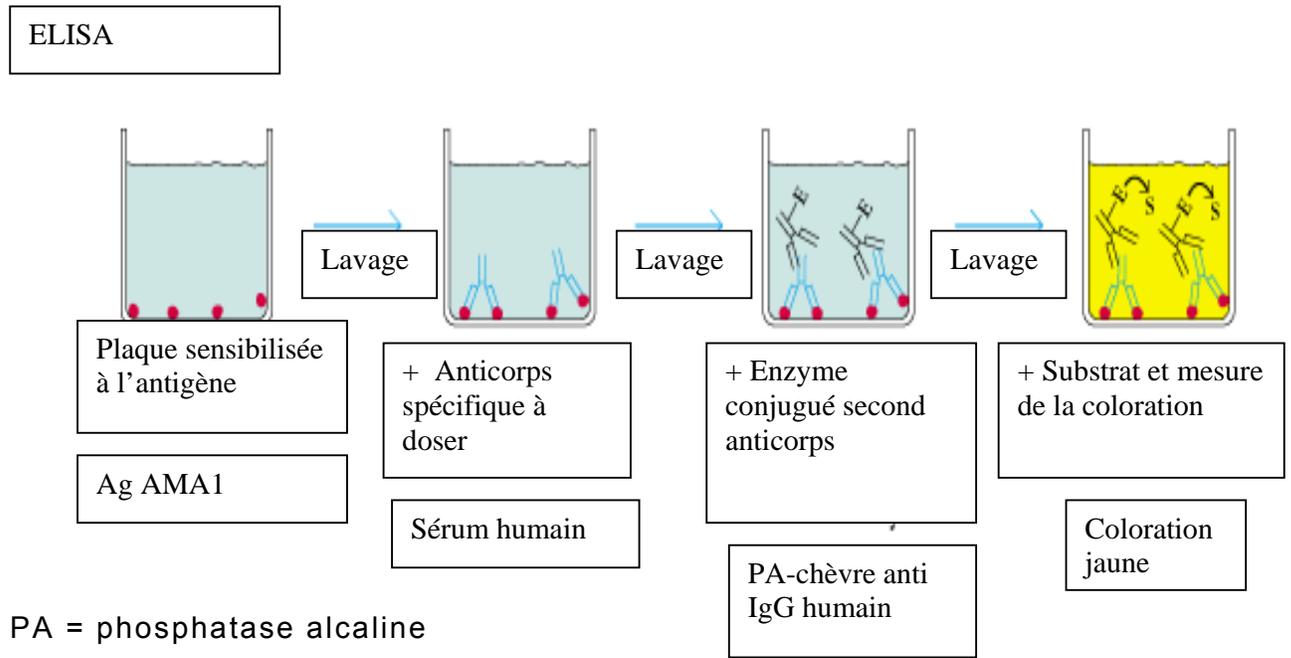


Figure 6 : Différentes étapes de l'ELISA

SERMENT D'HIPPOCRATE

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

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

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

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.
Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

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

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

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

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

Je le jure.

