

Ministère de l'Enseignement

REPUBLIQUE DU MALI

Supérieur et de la Recherche

Un Peuple

Un But

Une Foi

Scientifique

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

Faculté de Pharmacie (FAPH)

Année universitaire 2012 – 2013

N°/

Thèse

Relation entre l'incidence du paludisme et les titres IgG contre les antigènes du mérozoïte de *Plasmodium falciparum* chez les enfants de Kéniéroba : Impact des hémoglobines S et C

Présentée et soutenue publiquement le.... /...../ 2014 devant la Faculté de Pharmacie du Mali

Par Mlle Nafissatou SISSOKO

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

JURY

Président du jury : Professeur Souleymane DIALLO

Membre : Professeur Amagana Dolo

Co-directeur: Dr Seidina A.S. DIAKITE

Directeur de thèse : Professeur Mahamadou DIAKITE

Remerciements et dédicaces

Remerciements

Je remercie du fond du cœur le Professeur Mahamadou Diakite mon directeur de thèse tout d'abord, pour sa disponibilité, son accessibilité et son amabilité. Je l'admire déjà en tant que mon enseignant et puis en tant que mon directeur de thèse je suis vraiment honorée de travailler avec lui. Que le Tout-puissant le bénisse et l'accorde longue vie.

Je remercie sincèrement Docteur Seidina Diakite, pour ses connaissances, ses conseils, sa bonne humeur, et surtout son amabilité. Seul Dieu peut le récompenser pour sa bonne foi.

Je remercie tous les travailleurs du MRTC, surtout ceux du Laboratoire Immuno-génomique, particulièrement Dr Sory Ibrahim Diawara, Dr Drissa Konate, Dr Karim Traore, Dr Ibrahim Sanogo, Dr Saibou Doumbia, Mr Salam Keita, Dr Ismaïla Coulibaly, Dr Mory Doumbia, Mr Moussa Keita, Cheick, ils n'ont ménagé aucun effort pour m'aider dans ce travail. Je leur remercie pour leur bonne foi, leur disponibilité, leur humanité, seul Dieu peut leur récompenser pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Je remercie Docteur Kanta Sekou Sadibou, pharmacien gérant de l'officine Multi pharma, il m'a accueillie à bras ouvert et m'a traité comme sa fille, je le remercie pour sa confiance et son soutien. Que Dieu le bénisse et l'accorde longue vie et beaucoup de bonheur. Je remercie également tous les employés de l'officine Multi pharma.

Je remercie tous les enseignants de mon ancienne école, « Ecole Faso Kanu » merci pour toutes les connaissances qu'ils m'ont transmises.

Je remercie mes amis et collègues Fanta Koita, Abdrahamane Seye Sidibe, Nana Houmama Kayentao Cisse, Souleymane Mamoudou, Sory Brahim Fomba, Freddy. Je remercie Dieu de leur avoir mis sur ma route que Dieu fasse que nous réussissons tous dans notre vie de famille et professionnelle. Toute la Promotion Professeur Souleymane Diallo et ceux qui nous ont quitté que leur âme repose en paix.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A Allah le Tout-miséricordieux, le très Miséricordieux qui m'a permis de réaliser ce travail et de voir ce jour.

A Ma MERE, Diariatou Cisse

Maman je te remercie pour tout ce que tu as fait et que tu continues de faire pour moi. En plus d'être ma mère, tu es aussi ma meilleure amie. Tu es celle qui m'a appris les bonnes valeurs qu'une personne doit avoir. Je prie DIEU qu'il te donne longue vie, pleine santé et de bonheur, que tu puisses profiter de tout ton effort fourni pour l'éducation de mes frères et moi. Tu es la meilleure mère au monde je t'aime infiniment.

A MON PERE, Maciré Sissoko

Papa je te remercie pour ta compréhension, ta confiance, ton soutien, même si tu n'es pas tout le temps avec nous, nous savons que tu travailles dur pour notre bonheur. Que DIEU te garde longtemps avec nous.

A ma sœur et à mon frère chéris Sirandou dite Assan et Mamoutou Sissoko, je vous remercie pour votre fraternité et votre soutien, que DIEU vous bénisse et vous donne beaucoup de succès et de bonheur dans votre vie future.

A Mes grands-parents, Famankan et Sékou Cisse, pour votre amour et votre confiance, que Dieu vous bénisse.

A tous mes tontons et tanties de la famille Sissoko et Cisse, merci pour vos bénédictions et vos soutiens.

Hommages aux membres du jury

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

Professeur Souleymane Diallo

- **Pharmacien biologiste des services de santé des armées**
- **Maître de conférences en bactériologie et virologie à la Faculté de Pharmacie**
- **Directeur général du Centre d'infectiologie Charles Mérieux**

Cher maître nous sommes très honoré que vous ayez accepté de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Votre sens aigu du devoir d'assurer la formation de vos étudiants, votre simplicité et vos qualités scientifiques font de vous un grand professeur apprécié de vos étudiants. Trouvez-ici, cher maître notre profonde reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET MEMBRE DU JURY

Professeur Amagana Dolo

- **Professeur titulaire de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Pharmacie (FAPH),**
- **Directeur adjoint de l'Institut de Sciences Appliquées (ISA)**

Cher maître, nous avons été marqués par la simplicité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail. Votre correction a beaucoup contribué à l'amélioration de la qualité de ce travail. Soyez assuré de notre reconnaissance et de notre profonde gratitude.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

- **Pr Mahamadou DIAKITE**
- **Docteur en pharmacie et PhD en génomique humaine,**
- **Maitre des Conférences en immunologie**
- **Responsable du laboratoire Immunogénétique et de Parasitologie du MRTC,**
- **Secrétaire Principal de la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie (FMOS)**

Cher maître je vous remercie du fond du cœur tout d'abord, pour votre disponibilité, votre accessibilité, et votre amabilité. Votre amour pour le travail bien fait et votre rigueur scientifique font de vous un exemple à suivre. Travailler à vos côtés était un honneur et une fierté pour nous. Que le tout puissant vous bénisse et vous accorde longue vie.

A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR DE THESE

Docteur Seidina Aboubacar Samba Diakité

- **Docteur en Pharmacie**
- **Assistant en Immunologie à la FAPH**
- **Président du conseil Régional de l'ordre des pharmaciens de Koulikoro**
- **Etudiant PhD à l'Université Pierre et Marie Curie de France**

Cher maître, nous vous remercions sincèrement, pour vos connaissances, vos conseils, vos qualités sociales. Apprendre à vos côtés était un honneur. Seul Dieu peut vous récompenser pour votre bonne foi.

Table des matières

Remerciements et dédicaces	ii
Dédicaces	iii
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des sigles et abréviations	x
1. Introduction	1
2. Objectifs	3
2.1. Objectif General	3
2.2. Objectifs spécifiques	3
3. Généralités sur le paludisme et les hémoglobinopathies	4
3.1. Définition du paludisme.....	4
3.2. Epidémiologie	4
3.2.1. Modalités de transmission du paludisme au Mali.....	4
3.2.2. Agent pathogène	5
3.2.3. Vecteur	6
3.2.4. Le cycle de développement	7
3.3. Physiopathologie.....	8
3.3.1. Signes cliniques.....	9
3.3.2. Formes cliniques du paludisme	10
3.3.4. Caractéristiques de l'immunité antipalustre	12
3.4. Difficultés des stratégies de contrôle du paludisme	15
3.5. Vaccins anti-palustres	17
3.5.1. Différents types de vaccins antipalustres.....	17
3.5.2. Antigènes candidats vaccins antipalustres	18
3.6. Hémoglobinopathies	20
3.6.1. Paludisme et hémoglobine C	21
3.6.2. Paludisme et hémoglobine S	23
4. Méthodologie.....	24
4.1. Cadre de l'étude.....	25
4.1.1. Situation.....	25

4.1.2	Végétation/hydrographie/climat	27
4.1.3.	Infrastructures socio-sanitaires	28
4.1.4.	Activités socio-économiques et culturelles	28
4.2.	Critères d'inclusion et de non inclusion	29
4.2.1.	Critères d'inclusion	29
4.2.2.	Critères de non inclusion	30
□	Absence de consentement,	30
4.3.	Types d'étude et techniques de laboratoire utilisées	30
4.3.1.	Etude de cohorte et prélèvements sanguins	30
4.3.2.	Mesure des titres d'IgG spécifiques d'antigène par ELISA	31
4.3.3.	Mesure de l'activité inhibitrice de la croissance parasitaire des IgG par le test d'inhibition de croissance (GIA)	31
4.4.	Gestion et analyse statistique des données	32
4.5.	Variables mesurées	32
4.6.	Considérations éthique et déontologique	32
5.	Résultats	33
6.	Commentaires et discussion	58
7.	Limites de notre étude	61
8.	Conclusion et recommandations	62
8.1.	Conclusion	62
8.2.	Recommandations	62
9.	Références Bibliographiques	63
10.	Fiche signalétique	74
11.	Annexes	76
11.1.	Détermination du Taux d'hémoglobine.....	76
11.2.	Détermination du groupe sanguin ABO.....	77
11.3.	Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10	79
11.4.	Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alpha-thalassémie par PCR..	80
11.5.	SOP de la technique ELISA utilisée pour le dosage d'anticorps anti-AMA1, anti-MSP1, anti-EBA175 et anti-MSP2	83
	Serment de Galien	89

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de développement du <i>Plasmodium</i> [[21]]	8
Figure 2 : Site d'étude (Source : Unité GIS MRTC/FMPOS (2008))	26
Figure 3 : Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana (Source: Unité GIS MRTC/FMPOS (2008))	26
Figure 4 . L'augmentation de l'âge et le portage de l'HbAS protègent de manière significative les enfants de Kéniéroba contre le paludisme	35
Figure 5. Taux d'IgG spécifiques de l'antigène mérozoïtes augmentent avec l'âge.....	37
Figure 6. Taux d'IgG spécifiques de l'antigène du mérozoïte sont plus faibles chez les enfants HbAS	38
Figure 7. L'augmentation du taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte au cours d'une saison de transmission ne diffère pas selon le type d'hémoglobine	41
Figure 8. Le taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte ne diminue pas au cours de la saison sèche, indépendamment du type d'Hb.....	42
Figure 9. Corrélations significatives entre les taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte à trois mesures différentes dans le temps.....	43
Figure 10. Titre des anticorps dirigés contre les antigènes du mérozoïte en mai 2009 selon le type d'hémoglobine (AA, AS et AC) et les groupes d'âge	44
Figure 11. Titre croisés des anticorps dirigés contre les antigènes du mérozoïte en mai 2009 à la technique ELISA.....	46
Figure 12. Titre des anticorps dirigés contre les antigènes du mérozoïte en mai 2009 selon les génotypes d'alpha-thalassémie et les groupes d'âge	47
Figure 13. Titre des anticorps dirigés contre les antigènes du mérozoïte en mai 2009 selon le phénotype du groupe sanguin ABO et les groupes d'âge	48
Figure 14. Titre des anticorps anti-AMA-1 chez les enfants de Kéniéroba en mai 2009.....	49
Figure 15. Titre des anticorps anti-AMA-1 chez les enfants de Kéniéroba en décembre 2009 ..	50
Figure 16. Titre des anticorps anti-MSP1 chez les enfants de Kéniéroba en mai 2009	51
Figure 17. Titre des anticorps anti-MSP1 chez les enfants de Kéniéroba en décembre 2009....	52
Figure 18. Titre des anticorps anti-EBA175 chez les enfants de Kéniéroba en mai 2009	53
Figure 19. Titre des anticorps anti-EBA175 chez les enfants de Kéniéroba en décembre 2009	54
Figure 20. Titre des anticorps anti-MSP2 chez les enfants de Kéniéroba en mai 2009.....	55
Figure 21. Titre des anticorps anti-MSP2 chez les enfants de Kéniéroba en décembre 2009....	56
Figure 22. Titre des anticorps anti-tétanos chez les enfants de Kéniéroba en mai et décembre 2009.....	57
Figure 23: Analyseur et Microcuvette HemoCue	76
Figure 24: Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+	77

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme selon la classification de Yaoundé	5
Tableau 2 : Position taxonomique des anophèles [19]	7
Tableau 3 : Caractéristiques démographiques et polymorphismes érythrocytaires des enfants inclus dans l'étude, stratifiées par type d'hémoglobine	33
Tableau 4: Résultats de l'analyse de régression multivariée selon l'âge et le type d'Hb ^a	40

Liste des sigles et abréviations

AC: Anticorps

ADCC: *Antibody dependant cellular cytotoxicity* (cytotoxicité dépendante des anticorps)

ADCI: *Antibody dependant cellular inhibition* (Inhibition cellulaire dépendante des anticorps)

Agyp : glycophorine A (Agyp),

AMA1: *Apical Membran Antigen 1* (Antigène membranaire apicale 1)

CD: *Cluster of Differentiation* (Agrégat de différenciation tels que CD35, CD36)

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CR1: *Complement Receptor 1* (Récepteur du composant 1 du Complément, CR1)

CSA : Chondroïtine Sulfate A

CSP : *Circum Sporozoit Protein* (Protéine à la surface du sporozoïte)

CTA : Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine

DBL: *Duffy Binding-Like* (Protéine d'adhésion à Duffy)

EBA175: *Erythrocyte Binding Antigen 175* (Antigène d'adhésion érythrocytaire 175)

EBL: *Erythrocyte Binding-Like* (Protéine d'adhésion à l'érythrocyte)

EDM: *Electron-Dense- Material* (Matériel dense en électrons)

ELISA: *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay* (Test Immunoenzymatique liés absorbant)

FMPOS : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie

G6PD: Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

GIA: *Growth Inhibition Assay* (Test d'inhibition de croissance)

GPI: *Glycosyl phosphatidyl inositol* (*Glycosyle phosphatidyle inositole*)

Hb : Hémoglobine (HbS; HbF)

HE : Alpha-thalassémie hétérozygote

ICAM-1: *Inter Cellular Adhesion Molecule-1* (Molécule d'adhésion intercellulaire 1)

IFN γ : interféron γ

Ig : Immunoglobuline (IgG ; IgA)

IL : Interleukine (IL-1)

KAHRP: *Knob-Associated Histidin-Rich Protein* (Protéine riche en histidine associée aux protubérances)

KDa : Kilo Dalton

MRTC: *Malaria Research and Training Center* (Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme)

MSP : *Merozoit Surface Protein 1* (protéine 1 à la surface du mérozoïte)

NIAID: *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (Institut National d'allergie et de maladies infectieuses)

NIH: *National Institutes of Health* (Instituts Nationaux de Santé des Etats-Unis)

NK: *Natural Killer* (Cellule tueuse naturelle)

NO: Oxyde nitrique

OMS (WHO) : Organisation mondiale de la Santé

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Réactions de polymérisation en chaîne)

PECAM-1: *Platelets Endothelial Cell Adhesing Molecular-1* (Molécule-1 adhérent à l'endothélium cellulaire des plaquettes)

Pf: *Plasmodium falciparum* (Pf)

PfEMP-1: *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membran Protein 1* (Protéine membranaire de *P. falciparum* à la surface de l'érythrocyte)

PfHRP-1: *Plasmodium falciparum Histidin Rich Protein-1* (Protéine 1 riche en histidine de *P. falciparum*)

RESA: *Ring Erythrocyte Surface Antigen* (Antigène de surface érythrocytaire des formes en anneaux)

RTS, S: Candidat vaccin antipaludique *RTS,S* (Le «R» signifie la région répétée centrale de la protéine circumsporozoïtaire de *P. falciparum* (CSP), le «T» pour les épitopes de lymphocytes T de la CSP et le «S» pour l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg) . Ceux-ci sont combinés en une seule protéine de fusion («RTS») et co-exprimés dans des cellules de levure avec l'antigène HBsAg. Le 'RTS' protéine de fusion et de protéine 'S' libre s'assemblent spontanément dans les particules «RTS, S ».)

SP: Sulfadoxine-Pyriméthamine

Th1: T helper-1 (Lymphocyte auxiliaire T-1)

TLR: *Toll Like Receptor* (récepteur semblable au Toll)

TNF: Tumor Necrosis Factor- α (Facteur nécrosant tissulaire, TNF α)

VAR: antigène de variant

VCAM-1: *Vascular Cell Adhesing Molecular-1* (Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire)

WT : *Wild-type* (type sauvage, sujet normal)

1. Introduction

Le paludisme constitue la parasitose la plus importante au monde de part sa prévalence. Malgré les grandes avancées enregistrées dans la lutte contre le paludisme au cours de la décennie écoulée, celui-ci demeure un problème majeur de santé publique dans les pays en voie de développement. En effet, l'impact du paludisme a considérablement diminué ces dernières années dans de nombreux pays [1]. Néanmoins, l'OMS estime que 219 millions de cas de paludisme et 660.000 cas de décès ont été recensés à travers le monde, 90% de ces cas surviennent en Afrique subsaharienne et particulièrement chez les enfants de moins de cinq ans [1]. Au Mali, cette affection représente 34 % de l'ensemble des motifs de consultation dans les centres de santé et hôpitaux. Le paludisme constitue la première cause de morbidité (32,4%) et de mortalité (45,7%) chez les enfants de moins de cinq ans [2].

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* reste l'un des plus grands problèmes mondiaux de santé [1]. La mortalité associée à cette maladie est soupçonné d'avoir sélectionné de façon évolutive l'hémoglobine (Hb)S ($\beta 6$ Glu à Val) en Afrique. Cette hypothèse est étayée par des études épidémiologiques montrant que hétérozygotie pour HbA de l'adulte et la forme « faucille » HbS (HbAS, le trait drépanocytaire) protège les enfants des pays tropicaux contre le paludisme graves qui met la vie en danger [3]. Alors que certaines études [3-5] ont trouvé que HbAS protège également contre le paludisme à *P. falciparum* non compliqué, cela n'a pas été une conclusion consistante [6]. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer comment HbAS confère une protection contre le paludisme, y compris : (i) l'invasion restreinte des parasites et/ou de la croissance dans les érythrocytes HbAS, en particulier dans des conditions de faible pression en oxygène, (ii) la phagocytose accrue des érythrocytes HbAS parasités par les macrophages, et (iii) une mauvaise cytoadhérence de érythrocytes HbAS parasités à l'endothélium microvasculaire et d'a d'autres cellules hôtes [7].

Une étude récente chez la souris a suggéré que la modulation des niveaux du monoxyde de carbone par l'HbS pourrait également exercer des effets de protection antipalustre [8]. En plus de ces facteurs innés, les études actuelles ont démontré que l'immunité acquise peut également contribuer au mécanisme de protection[9, 10]. Les études de transfert passif chez les enfants africains atteints de paludisme à *P. falciparum* ont vérifié l'importance des anticorps IgG immunitaire dans la clairance de la parasitémie au stade sanguin [11]. Cependant, les mécanismes effecteurs de cette protection initiée par les IgG et l'impact des variants d'Hb sur les réponses de protection IgG n'ont pas été complètement élucidés.

Le variant HbC est également produit par la substitution d'un seul acide aminé ($\beta 6$ Glu à Lys). Les effets de HbAC sur l'incidence du paludisme à *P. falciparum* non compliqué et/ou grave sont moins bien établis que ceux de HbAS [3]. Par exemple, des études ont rapporté que HbAC confère une protection contre le paludisme à la fois simple et grave [12], contre le paludisme grave seule [[13]], ou plus précisément contre la forme cérébrale du paludisme grave [14]. D'autre part, certaines études suggèrent que HbAC ne confère aucune protection ni contre le paludisme simple [3][[5]], ni contre le paludisme sévère [[15, 16]]. Collectivement, ces études épidémiologiques suggèrent que HbAS et HbAC peuvent exercer leurs effets de protection contre le paludisme du moins en partie par des mécanismes différents.

Afin de déterminer si les réponses IgG contre les antigènes de mérozoïtes de *P. falciparum* contribuent aux effets protecteurs de l'HbAS et de l'HbAC contre le paludisme, nous avons mené une étude prospective sous-cohorte au Mali. La sous-cohorte comprenait tous les enfants HbAS et HbAC âgés de 3 à 11 ans et qui ont été apparié aussi proche que possible pour l'âge et les polymorphismes érythrocytaires de protection potentielle contre le paludisme (α -thalassémie, déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), groupe sanguin ABO/Rh antigènes). Les échantillons de plasma ont été prélevés au début de la saison de transmission (mai 2009), et à la fin de la saison de transmission (Décembre 2009). Nous avons mesuré les taux d'IgG spécifiques contre quatre antigènes de surface du mérozoïtes (clones 3D7 de *P. falciparum*) et analysé leur relation avec l'incidence du paludisme au cours de la saison de transmission 2009.

2. Objectifs

Pour mener à bien ce travail, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

2.1. Objectif Général

Etudier la relation entre l'incidence du paludisme et les titres IgG contre les antigènes du mérozoïte de *Plasmodium falciparum* chez les enfants de Kéniéroba.

2.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer la proportion des enfants de Kéniéroba porteurs d'hémoglobine S ou C ;
- Mesurer les titres des anticorps IgG spécifiques (anti-AMA1, anti-MSP1, anti-EBA175 et anti-MSP2) des antigènes du mérozoïte chez les enfants de Kéniéroba ;
- Evaluer le niveau de protection conféré par les hémoglobines S et C chez les enfants de Kéniéroba ;
- Déterminer l'effet de la saison de transmission sur le titre des anticorps IgG anti-AMA1, anti-MSP1, anti-EBA175 et anti-MSP2 chez les enfants de Kéniéroba.

3. Généralités sur le paludisme et les hémoglobinopathies

3.1. Définition du paludisme

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante, due à la présence et à la multiplication d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique femelle du genre *Anopheles*.

3.2. Epidémiologie

3.2.1. Modalités de transmission du paludisme au Mali

Le paludisme constitue la première cause de mortalité et de morbidité au Mali [2]. Il est particulièrement endémique dans les régions du centre et du sud et épidémique dans les régions désertiques du nord. Il y a une extrême variabilité de la situation épidémiologique en fonction des faciès géo-climatiques. Au Mali, il existe cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme [[17]] :

- la zone de transmission saisonnière longue de quatre à six mois au Sud correspondant à la région Soudano-guinéenne (régions de Sikasso, sud des régions de Ségou, Koulikoro et Kayes). Le paludisme y est holoendémique avec un indice plasmodique supérieur à 75% de juin à novembre ;
- la zone de transmission saisonnière courte de quatre mois dans les régions de la savane nord soudano-sahélienne (régions de Mopti, nord des régions de Ségou, Koulikoro et Kayes). Le paludisme y est hyper-endémique avec un indice plasmodique variant entre 50 et 75% ;
- la zone subsaharienne au Nord où la transmission est sporadique voire épidémique (régions de Tombouctou, Gao et Kidal). L'indice plasmodique est inférieur à 5% ;
- la zone du delta inférieur du fleuve Niger (Office du Niger) et les zones de retenue d'eau et de riziculture (barrages de Sélingué et Mantali) où la transmission est bimodale voire plurimodale en début de la saison des pluies, au cours de la période de décrue et de mise en eau des casiers rizicoles. Le paludisme est de type mésoendémique avec un indice plasmodique inférieur à 40% ; et
- le milieu urbain, en particulier Bamako et Mopti, qui est impropre à l'impaludation (pollution des gîtes larvaires, automédication élevée, etc.). Le paludisme y est de type hypo-endémique avec un indice plasmodique inférieur à 10%.

Tableau 1: Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme selon la classification de Yaoundé

Niveau d'endémicité	Transmission	Indice plasmodique Chez les enfants de 2-9 ans (%)	Commentaires
Paludisme hypoendémique	Faible: sous-périodique ou sporadique	Généralement ≤ 10	Les moustiques sont instables, généralement difficiles à détecter; des épidémies sérieuses peuvent survenir
Paludisme mésoendémique	Saisonnière, périodique suivant une bonne saison pluvieuse	11-50 en fonction du temps de surveillance	les moustiques fluctuent, détectables en fonction des saisons, une fenêtre saisonnière peut survenir; les habitants acquièrent une certaine immunité
Paludisme hyperendémique	Intense (saisonnière) chaque année	51-75	Fluctuation saisonnière des cas de paludisme; fréquentes séquelles sévères chez les jeunes enfants; une certaine immunité chez les adultes
Paludisme holoendémique	La transmission peut survenir à travers l'année avec des pics de transmission	> 75	On peut détecter les moustiques toute l'année avec des pics; des taux élevés d'anémie chez les très jeunes enfants et la prémunité chez les adultes

3.2.2. Agent pathogène

L'agent pathogène du paludisme est un hématozoaire du genre *Plasmodium*, appartenant à la famille des *Plasmodidae*, à l'embranchement des *Sporozoa* et à l'ordre des *Haemosporidae*, caractérisé par la présence d'un complexe apicale jouant un rôle important dans la sécrétion des organelles et l'orientation du *Plasmodium* lors d'une invasion. Cent soixante douze (172) espèces de *Plasmodium* ont été répertoriées et

possèdent des cycles biologiques similaires, parmi lesquelles quatre sont inféodées à l'homme à savoir :

- *Plasmodium falciparum* : c'est la plus répandue et la plus redoutable surtout en Afrique. Il représente 80 à 95% de la formule parasitaire. Il est transmis pendant toute l'année avec des recrudescences saisonnières dans les régions tropicales. Cette transmission s'interrompt lorsque la température chute en dessous de 18°C. Son incubation est de 7 à 12 jours et il est responsable des formes cliniques graves.
- *Plasmodium vivax* : cette espèce se rencontre surtout en Amérique du Sud et en Asie. Il est rarement observé en Afrique noire où la majorité de la population sont du groupe sanguin érythrocytaire Duffy négatif. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours. Elle est responsable de la fièvre tierce bénigne et des rechutes.
- *Plasmodium malariae*: elle se rencontre en Afrique de façon sporadique et sa période d'incubation est plus longue que les autres, environ 15 à 21 jours. Cette espèce est responsable de la fièvre quarte bénigne. Parfois, elle peut entraîner des complications rénales.
- *Plasmodium ovale* : elle sévit surtout en Afrique intertropicale et dans certaines régions du Pacifique. Son incubation est de 15 jours mais peut être plus longue. Elle provoque la fièvre tierce et son évolution est bénigne mais est responsable des rechutes au même titre que *P. vivax*.

Enfin une cinquième espèce, *Plasmodium knowlesi*, responsable du paludisme chez le singe a été retrouvée infectant l'homme dans les conditions naturelles en Malaisie [18].

3.2.3. Vecteur

Les vecteurs du paludisme des mammifères y compris l'homme, appartiennent tous au genre *Anopheles* qui occupe une position taxonomique bien précise (tableau 2).

Tableau 2 : Position taxonomique des anophèles [19]

Embranchement	Arthropoda (= pattes articulées)
Classe	Insecta (= corps segmenté en trois parties)
Sous-classe	Pterygota (= avec des ailes)
Ordre	Diptera (= avec 2 ailes)
Sous-ordre	Nematocera (= avec des antennes rondes et longues)
Famille	Culicidae (= moustiques)
Sous-famille	Anophelinae (= anophèle)
Genres	Anopheles, Bironella, Chagasia

Il existe environ 484 espèces d'anophèles, mais seulement une soixantaine n'assure que la transmission des plasmodies humaines avec plus ou moins d'efficacité [19].

La répartition des espèces à travers le monde est fonction des conditions favorables à leur implantation et beaucoup de facteurs climatiques et environnementaux peuvent influencer la transmission du paludisme (sécheresse, variations de température, construction des barrages etc. Au Mali, la transmission est assurée par le complexe d'*Anopheles gambiae s.l.* et d'*Anopheles funestus* [20].

3.2.4. Le cycle de développement

Le parasite du paludisme a un cycle hétéroxène à deux hôtes : un hôte intermédiaire (l'homme) chez lequel s'accomplit le cycle asexué et un hôte définitif où a lieu la reproduction sexuée, l'anophèle femelle.

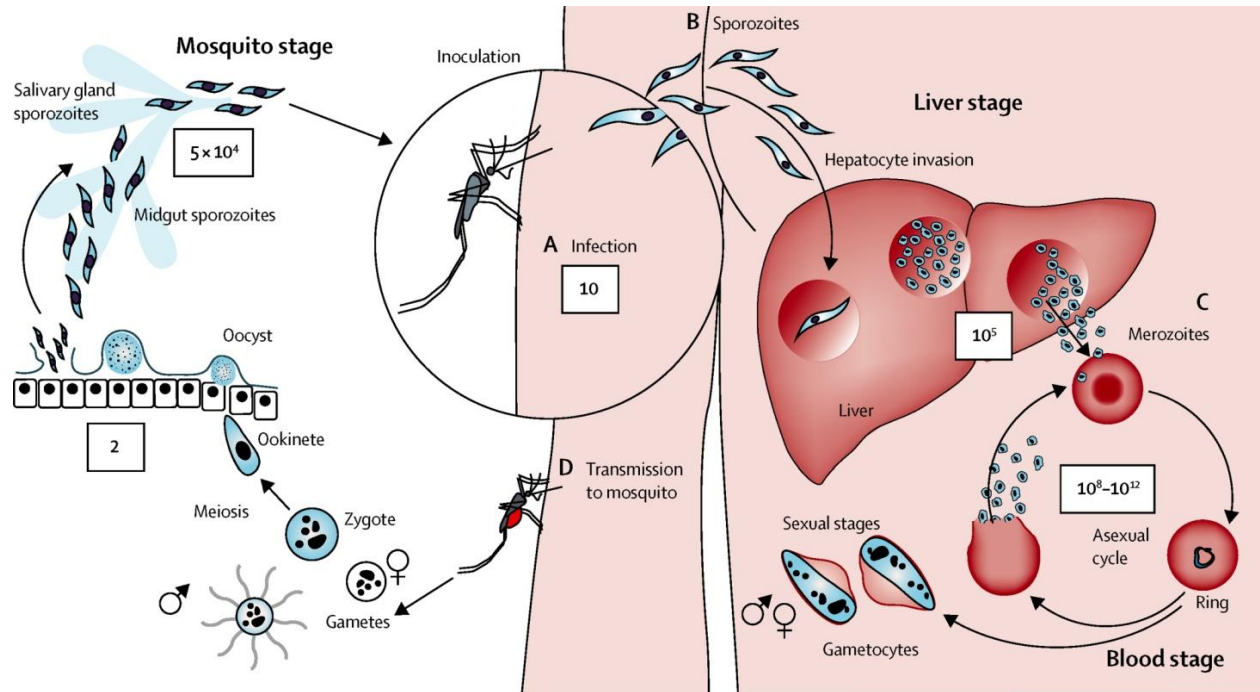


Figure 1 : Cycle de développement du *Plasmodium* [[21]]

Le cycle commence par l'inoculation de sporozoïtes mobiles dans le derme (A), qui voyagent ensuite dans le foie (B). Chaque sporozoïte envahit un hépatocyte, puis se multiplie. Après environ une semaine, les schizontes hépatiques éclatent, libérant dans le sang de milliers de mérozoïtes qui envahissent les globules rouges et commencent le cycle asexué (C). La maladie commence lorsque la parasitémie asexuelle atteint environ 100 millions [[21]]. Certains parasites se développent en formes sexuelles (gamétocytes). Les gamétocytes sont prises par un moustique anophèle lors de son repas sanguin (D) et se reproduisent sexuellement, formant un ookinète (ou œuf mobile) puis un oocyste dans l'intestin du moustique. Les oocystes éclatent et libèrent les sporozoïtes, qui migrent vers les glandes salivaires en attendant l'inoculation lors du prochain repas de sang. Le cycle complet peut prendre plus ou moins 1 mois. L'estimation du nombre de parasites sont présentés dans les différents rectangles - une charge parasitaire totale de 10¹² correspond environ à 2 % de parasitémie chez un adulte.

3.3. Physiopathologie

Les différentes espèces plasmodiales peuvent avoir quelques manifestations cliniques uniques et caractéristiques de chaque espèce. Bien qu'il ne soit pas possible de déterminer chaque espèce lors de l'infection palustre sur la base clinique seule, les différences pathophysiologiques parmi les quatre espèces soulignent leur habilité à causer des manifestations tardives de la maladie. Ces manifestations reposent sur le

potentiel de morbidité et de mortalité attribuables à chacune des espèces plasmodiales. L'importance clinique est la capacité unique de l'infection non-traitée de *P. falciparum* à être fatale. *P. falciparum* peut être associé à la morbidité sévère et les symptômes peuvent progresser au coma et à la mort très rapidement.

3.3.1. Signes cliniques

- **Fièvre**, elle est provoquée par des pyrogènes endogènes (cytokines) des monocytes et macrophages en réponse à des substances non protéiniques lors de la rupture des schizontes. La fièvre est le symptôme majeur du paludisme humain, utilisée habituellement comme marqueur clinique du paludisme maladie [22-24]. Elle constitue le principal critère clinique pris en compte pour apprécier la morbidité palustre chez les enfants et les sujets non-immuns. Elle joue un rôle majeur d'alerte en cas d'infection palustre chez les personnes à haut risque d'infection sévère. Elle est différente selon les espèces d'où les notions de fièvre tierce, quarte et intermittente. Bien que cliniquement bénigne, la fièvre palustre est supposé avoir une pertinence significative en termes de croissance, de survie et de virulence du parasite, qui à son tour, peut modifier l'évolution clinique de la maladie.
- **Anémie**, elle est due à la lyse des globules rouges (GR) parasités. L'anémie est définie comme un bas niveau d'hémoglobine dans le sang, comme attestée par la réduction de la qualité et de la quantité d'hématies associées à une réduction de la capacité de transport d'oxygène. Elle a de sérieuses conséquences négatives, incluant une augmentation de la mortalité chez les femmes et les enfants, une diminution de la capacité d'apprentissage et une diminution de la productivité chez toutes les personnes. Elle dépend de la parasitémie. La perte de protéines de régulation du complément (CR1 et CD55) à la surface des GR a aussi été corrélée avec la sévérité de l'anémie palustre parce que ces protéines protègent la membrane érythrocytaire contre l'opsonisation par le complément [25, 26]. Dans les pays tropicaux, l'infection palustre est une cause majeure d'anémie chez les femmes enceintes et les enfants. L'anémie sévère est une des plus importantes complications du paludisme chez les enfants vivant en zone endémique, spécialement chez ceux infectés par *P. falciparum* [1, 27-29], probablement en raison de fortes parasitémies en relation avec cette espèce. En Afrique, le pic de mortalité par anémie sévère survient à un plus jeune âge que le pic de mortalité par neuropaludisme (entre 6 mois et 2 ans pour l'anémie, 2 à 3 ans pour le neuropaludisme). **Un taux d'hémoglobine inférieur à 5 g /dl (ou un taux d'hématocrite < 15%) associé à une parasitémie ($\geq 10\ 000$ formes asexuées / μ l) est un signe majeur de paludisme grave selon l'OMS [29].** En pratique, l'anémie palustre peut être définie comme une réduction du taux d'hémoglobine ou d'hématocrite en dessous de l'échelle normale pour l'âge, le sexe, et l'état de grossesse dans une région endémique et en présence d'une parasitémie quelle que soit la densité parasitaire. De nombreux enfants

présentant une anémie sévère sans goutte épaisse positive répondent bien au traitement antipalustre [29][[30]].

- **Convulsion**, elle provoquée par la libération des cytokines ainsi que l'obstruction des vaisseaux sanguins par les GR parasités qui conduit à l'hypoxie [29]. Elle est fréquemment rencontrée au cours du neuropaludisme [31].

3.3.2. Formes cliniques du paludisme

3.3.2.1. Accès palustre simple

Les symptômes du paludisme commencent à se prononcer à partir du stade intra-érythrocytaire du cycle de développement du parasite. La fièvre, lors de l'accès simple survient au moment de la lyse des hématies qui libèrent les mérozoïtes, l'hémozoïne (pigment malarique) et d'autres antigènes parasitaires. Pendant longtemps on a cru que le pigment malarique se comportait comme un pyrogène stimulant le centre hypothalamique thermorégulateur. Actuellement, il apparaît que la fièvre n'est pas propre au parasite lui-même, mais est due à des cytokines libérées par les macrophages et les cellules endothéliales de l'hôte [32]. Toute une série de cytokines peuvent avoir un effet pyrogène telles que l'IL-1, l'IL-6 et la lymphotoxine β ; mais c'est le TNF- α dont le lien avec la fièvre a été le mieux établi [33, 34]. Ces cytokines se comportent comme des pyrogènes endogènes en stimulant le centre thermorégulateur hypothalamique.

La fièvre n'apparaît que lorsque la parasitémie atteint un seuil critique, variable d'un sujet à l'autre et d'une souche de parasite à l'autre. Ce seuil est appelé seuil pyrogène. L'allure de la fièvre est variable. Au cours des accès de primo invasion, le cycle érythrocytaire est généralement non synchronisé ; la fièvre prend alors une allure continue ou irrégulière selon la parasitémie. Lorsque les cycles se synchronisent progressivement, la fièvre revêt alors son caractère de type de fièvre intermittente, tierce ou quarte [32]. Au cours de l'infection palustre, le système phagocytaire débarrasse l'organisme non seulement des pigments malariques mais aussi des débris érythrocytaires ce qui aboutit à l'hépto-splénomégalie [35].

3.3.2.1. Accès palustres graves et compliqués

Seule l'espèce *Plasmodium falciparum* et dans certains cas *P. vivax* sont responsables du paludisme grave et compliqué. Ces cas graves s'observent chez les sujets non immuns (jeunes enfants, femmes enceintes, expatriés, sujets vivants en zone hypo-endémique). Les concepts physiopathologiques du paludisme grave font intervenir deux phénomènes interdépendants :

- la séquestration des hématies parasitées,
- le phénomène immunologique.

La séquestration, Elle aboutit à une obstruction du microcapillaire par les globules rouges. Trois mécanismes concourent à ce phénomène : l'auto-agglutination, la formation de rosettes « ou rosetting » et la cytoadhérence.

Le phénomène de l'auto- agglutination, L'auto-agglutination des hématies parasitées a été observée sur de nombreuses souches de *P. falciparum* étudiées en culture au laboratoire. Il s'agit d'un regroupement des érythrocytes infectés entre eux pour former des micros agrégats susceptibles d'obstruer les capillaires profonds. Ce phénomène a été observé chez les patients porteurs de forte parasitémie en dehors de tout phénotype d'adhésion. Les mécanismes moléculaires qui prédisposent à sa survenue sont encore mal connus.

Le phénomène de formation des rosettes « ou rosetting », Les hématies parasitées ont la faculté d'attirer au tour d'elles des hématies saines pour former des rosettes : c'est le phénomène de « rosetting ». La formation des rosettes est la conséquence de la liaison entre les ligands parasitaires (PfEMP1) présents à la surface des hématies infectées et leurs récepteurs sur les globules rouges non infectés. Plusieurs récepteurs pour les ligands parasitaires (PfEMP1) ont été décrits à la surface des globules rouges. On peut citer entre autres, le récepteur-1 du complément (CR1/CD35), les trisaccharides des groupes sanguins A et B, le CD36, le PECAM-1/CD31. Les anticorps (IgM et IgG) et certains composants du complément (C3b et C4b) jouent aussi un rôle dans ce phénomène à travers le CR1. Il aboutit à la formation d'un agrégat qui contribue à l'obstruction des petits vaisseaux sanguins. Ce phénomène a été bien étudié *in-vitro* sur des lignées cellulaires (fibroblastes). Il varie d'une souche plasmodiale à l'autre et est corrélé au degré de sévérité du paludisme [36, 37]. La formation de rosettes constitue un mode de protection pour le parasite contre le système phagocytaire de la rate et exerce un effet délétère pour l'hôte par blocage du flux sanguin.

Le phénomène de cytoadhérence, La cytoadhérence des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire ou aux cellules trophoblastiques placentaires est le mécanisme qui a été le mieux étudié ces dernières années. Ce phénomène permet au *Plasmodium* de se développer plus facilement grâce à un environnement gazeux favorable et d'échapper à la clairance splénique. Les hématies parasitées expriment à leur surface des protubérances (knobs) qui semblent jouer un rôle important dans leur adhésion aux cellules endothéliales. Il s'agit de protubérances protéiniques auxquelles sont incorporés des antigènes plasmodiques. Parmi ces antigènes plasmodiques on peut citer la PfEMP-1 et 2 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 et 2*) ; la PfHRP-1 (*Plasmodium falciparum Histidin Rich Protein*) ou KAHRP (*Knob-Associated Histidin-Rich Protein*), RESA (*Ring Erythrocyte Surface Antigen*) et EDM (*Knob-*

Associated Histidin-Rich Protein), RESA (*Ring Erythrocyte Surface Antigen*) et EDM (*Electron-Dense-Material*).

Parmi les protéines parasitaires associées aux knobs, PfEMP-1 est le ligand parasite le mieux caractérisé. PfEMP-1 interagit avec des récepteurs spécifiques au niveau des cellules endothéliales vasculaires et du syncytiotrophoblaste, comme l'ICAM-1 (*Inter Cellular Adhesion Molecule-1*), le CD36, le VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesing Molecular-1*) le CD31 ou PECAM-1 et le CSA (*Chondroitin Sulfate A*) [38]. L'adhésion des hématies parasitées à ces récepteurs entraîne leur séquestration à l'intérieur de la microcirculation. La séquestration permet aux hématies parasitées d'échapper à la clairance splénique et contribue à la gravité du paludisme. Elle entraîne aussi une obstruction des micro-vaisseaux surtout au niveau cérébral qui semble être la principale cause du neuropaludisme. La séquestration entraînerait aussi une dilatation des micro-vaisseaux par la libération du monoxyde d'azote (NO), responsable de l'œdème cérébral et pulmonaire.

3.3.4. Caractéristiques de l'immunité antipalustre

Le rôle de l'immunité se situerait à cheval entre les manifestations du paludisme et leurs conséquences sur les différentes populations à risque. Dans les régions d'endémie palustre comme le Mali, les défenses immunitaires déterminent l'installation d'une sorte d'équilibre entre les populations humaines et celles du parasite. Une infection simple peut persister pendant des mois avec une parasitémie périphérique qui se caractérise par une alternance de phases avec et sans parasitémie détectable [[39, 40]. On peut alors se demander pourquoi le système immunitaire n'est pas capable d'endiguer plus rapidement l'infection palustre ? L'immunité est l'ensemble des facteurs et processus qui protègent l'organisme contre les micro-organismes et autres substances étrangères ou contre des constituants de l'organisme devenus anormaux.

La réponse immunitaire dirigée contre *P. falciparum* est le résultat de plusieurs milliers d'années de coévolution entre le parasite et son hôte. L'immunité palustre est une résistance contre l'infection palustre par des procédés qui impliquent la destruction du *Plasmodium* et la restriction de sa multiplication [41]. Elle est d'installation d'autant plus rapide que les individus vivent dans les zones endémiques. Dans les régions ayant une transmission annuelle stable, les enfants nés de mères semi-immunes seraient protégés contre la maladie pendant les six mois de leur première année de vie par les anticorps maternels. Cette immunité s'estompe au cours du temps et l'on observe chez l'enfant, après le sixième mois de sa vie, une augmentation de la sensibilité au paludisme [31]. Cette protection semble être associée à la présence des immunoglobulines G (IgG) maternelles. Le taux d'IgG diminue à partir de la naissance et sur la première année de vie. Alternativement, la protection des enfants peut être

associée à des inhibiteurs de la croissance parasitaire tels que la lactoferrine et l'IgA sécrétoire retrouvées dans le lait maternel [42] ou tout simplement par la présence de l'hémoglobine fœtale (HbF) qui persiste jusqu'à 6 mois après la naissance.

Les adultes vivant dans les zones holoendémiques, auront une parasitémie distincte de la maladie, c'est-à-dire le risque d'accès grave diminue alors que le sujet tolère des parasitémies de plus en plus importantes tout en restant cliniquement asymptomatique. La prévention des densités élevées semble être la base de la protection des adultes contre le paludisme. L'immunité antipalustre dépend de plusieurs facteurs tels que le degré de transmission du paludisme, la physiologie de l'hôte, l'âge et l'environnement. Lorsque le risque de l'infection est faible, presque toutes les personnes exposées sont à un risque substantiel de faire le paludisme sévère et compliqué. Mais quand le risque de l'infection est élevé, la susceptibilité du paludisme sévère est limitée aux visiteurs, aux enfants et aux femmes enceintes. En général, plus la transmission est intense, plus la susceptibilité au paludisme est précoce et confinée dans les groupes spécifiques (enfants à bas âge, femmes enceintes et immunodéprimés). L'immunité antipalustre est régulée aussi bien par l'immunité naturelle (ou innée) que par l'immunité acquise.

4.1.5.1. Immunité naturelle ou innée

C'est une immunité qui inhibe ou ralentit le développement du parasite chez un hôte par des défenses naturelles impliquant les cellules de l'immunité naturelle. Elle ne dépend d'aucune infection antérieure. La production rapide d'IFN- γ (interféron- γ) est importante pour le pronostic évolutif de la pathologie. Des études récentes suggèrent que les cellules tueuses naturelles (*Natural killer*, *NK*) pourraient être l'une des sources de cette production précoce d'IFN γ [43, 44]. Plus connues pour leur rôle dans l'immunité anti-tumorale et antivirale, les cellules NK seraient également capables de reconnaître directement des hématies infectées par *P. falciparum* (*Pf*). À la suite de ce contact, leur sécrétion de la chémokine IL-8 (interleukine-8) pourrait permettre le recrutement d'autres cellules sur le site de l'infection. Une collaboration entre les cellules NK et les macrophages serait notamment requise pour une réponse NK optimale. Les fondements moléculaires de l'activation des cellules NK, ainsi que leur rôle dans le contrôle initial du stade sanguin de l'infection font aujourd'hui l'objet d'intenses recherches. Les cellules NK sont capables de reconnaître directement des érythrocytes infectés par *P. falciparum* grâce à un ou plusieurs récepteurs non encore identifiés. Cette interaction directe conduit à l'activation des cellules NK et à leur production d'IL-8. En revanche, leur production d'IFN- γ est dépendante d'une coopération avec des macrophages *via* la production d'IL-18 par ces derniers. L'engagement du récepteur TLR2 par les produits parasitaires est partiellement impliqué dans la production du TNF- α par les macrophages, mais n'est pas nécessaire à la coopération NK/macrophage.

Le complément, les chémokines, les interférons (IFN- α et IFN- β) et l'oxyde nitrique (NO) constituent les principales molécules de l'immunité innée jouant un rôle clé dans l'immunité antipalustre. On estime que le complément activé se fixe à des complexes immuns. Ces derniers se lient à la surface des parasites et entraînent leur lyse par le biais du complexe d'attaque membranaire [26]. La production des cytokines proinflammatoires telles que l'IFN- γ , induit la synthèse du NO. Ce dernier inhibe le développement du parasite à ses différents stades de développement, y compris les stades asexués qui sont responsables des manifestations cliniques de la maladie [45, 46].

4.1.5.2. Immunité acquise

Les études chez l'homme et les souris indiquent que les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ sont importantes pour la protection contre le paludisme [47, 48]

. Les observations cliniques suggèrent que la durée de l'immunité protectrice dépend de la persistance de l'exposition à l'antigène, car la protection diminue quand les personnes immunes du paludisme migrent dans les régions non-endémiques. Le manque d'immunité stérilisante dans le paludisme fait rappeler les infections chroniques virales et beaucoup d'infections parasitaires incluant les leishmanioses.

L'infection palustre induit à la fois une réponse des cellules B T-indépendantes et T-dépendantes. Les études précoces dans les années 1960 démontraient que les anticorps peuvent conférer une protection contre le paludisme : les enfants qui recevaient un transfert passif d'anticorps sériques provenant d'adultes vivant en zone d'endémie palustre étaient capables de contrôler la parasitémie et la fièvre mais étaient incapables d'éliminer l'infection [11, 49, 50]. Les études chez les souris ont aussi démontré que les cellules B et les anticorps sont impliqués dans le contrôle de la parasitémie, bien que les anticorps protecteurs ayant une excellente spécificité protectrice chez l'homme ou la souris ne soient pas bien définis. Heureusement, l'évidence à partir des études longitudinales des infections naturelles au Mali a démontré que l'épuisement des cellules B comprises entre 20 et 60% du pools de cellules B circulantes, même chez les enfants aussi jeunes que ceux de 2 ans, bien qu'il ne compte seulement que pour 1-2% du pool chez les personnes provenant des régions non-endémiques de paludisme [51]. Le phénotype épuisé de cellules B était décrit chez les personnes infectées par le VIH et inclut une grande expression de récepteurs inhibiteurs, une expression altérée des récepteurs intérieurs, une faible prolifération potentielle et une histoire d'une cascade de réplication et de diversité d'immunoglobulines [52, 53]. Bien que les mécanismes exacts ne soient pas encore définis, cette étude du paludisme a fourni la première évidence, à notre connaissance, que l'infection plasmodiale altère la fonction des cellules B chez l'homme [51].

L'immunité antipalustre est extraordinairement complexe [47, 48]. Les personnes non-immunes autochtones vivant dans les régions endémiques palustres, incluant les enfants résidant dans les régions endémiques africaines sont extrêmement susceptibles à un grand risque de mourir de paludisme sévère (par exemple, l'anémie sévère palustre et le paludisme cérébral). Après quelques épisodes palustres, la susceptibilité au paludisme sévère est beaucoup plus faible, bien que les personnes infectées continuent à avoir des cas d'accès palustre simple caractérisés par une parasitémie, une fièvre, des frissons et des rigueurs [54]. Les personnes ont peu de signes cliniques et moins de cas sévères après une exposition répétée. Cependant, la parasitémie persiste, bien qu'elle soit plus faible que celle observée chez les personnes naïves. Les mécanismes immunologiques derrière ces observations sont faiblement élucidés, mais l'histoire naturelle suggère que différents mécanismes confèrent une résistance aux différentes manifestations cliniques du paludisme (comme le cas du paludisme sévère et du décès, le cas du paludisme simple et de la parasitémie). A présent, les mécanismes par lesquels la séquestration parasitaire conduit au paludisme sévère et à la mort sont très peu élucidés. Clairement, la compréhension de ces mécanismes est une importante priorité pour l'immunologie du paludisme. En outre, les personnes qui ont une immunité acquise au paludisme après des expositions répétées dans les régions endémiques deviennent susceptibles au paludisme simple s'ils résident dans les régions non-endémiques pendant une période de plusieurs mois à plusieurs années. Cependant, elles restent apparemment résistantes au paludisme sévère. Ces observations suggèrent que l'immunité naturelle acquise au paludisme simple est de courte durée et pourrait nécessiter une réexposition intermittente aux parasites pour une maintenance optimale.

Il est aussi important de souligner que beaucoup de co-infections qui ont profondément affectés le système immunitaire, incluant l'infection avec le virus de l'immunodéficience acquise, à *Schistosoma spp* et à *Mycobacterium tuberculosis*, sont plus fréquentes chez les personnes qui vivent dans les régions endémiques palustres. Ces pathogènes influencent probablement l'immunité au paludisme et doivent aussi être considérées dans la conception et l'interprétation des études qui impliquent la description des mécanismes immunitaires dans le paludisme.

3.4. Difficultés des stratégies de contrôle du paludisme

La lutte antivectorielle reste le principal moyen de réduire la transmission du paludisme au niveau communautaire. C'est la seule intervention qui peut ramener une forte transmission à des niveaux quasiment nuls [55]. L'OMS préconise deux méthodes : l'imprégnation des moustiquaires d'insecticide à effet durable et la pulvérisation domiciliaire d'insecticide à effet rémanent. . Pour obtenir un résultat optimal, il faut pulvériser au moins 80% des habitations dans les zones ciblées. Cette pulvérisation est

efficace pendant 3 à 6 mois en fonction du type d'insecticide utilisé et du type de surface pulvérisée. Le DDT peut être efficace pendant 9 à 12 mois dans certains cas. Cependant, on observe quelques résistances aux insecticides ces dernières années. Une résistance aux pyréthrinoïdes a fait son apparition dans de nombreux pays [21]. Dans certaines zones, on a détecté une résistance aux quatre classes d'insecticides utilisées en santé publique. Elle est attribuée à une baisse de l'efficacité. Néanmoins la mise au point d'insecticides nouveaux et différents est devenue prioritaire et plusieurs composés prometteurs sont actuellement testés [21].

Les voyageurs non immunisés venant de régions exemptes de paludisme sont très vulnérables à la maladie lorsqu'ils sont infectés. Ils peuvent se protéger au moyen d'une chimioprophylaxie qui doit démarrer avant le départ en voyage dans une zone impaludée. Aucun moyen préventif n'assure à lui seul une protection totale. Il est nécessaire d'associer un traitement chimioprophylactique et une protection contre les piqûres des moustiques. Le traitement préventif ne protège pas contre l'impaludation mais prévient la sévérité. Le parasite développant de plus en plus de résistance aux médicaments antipaludiques, il est donc nécessaire de connaître le niveau de résistance du pays de destination avant de commencer un schéma thérapeutique.

Comme pour la prévention, le traitement aussi se heurte à beaucoup d'obstacle. La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques classiques comme la chloroquine et la sulfadoxine-pyrimétamine (SP) s'est généralisée au cours des années 1970 et 1980. Ces dernières années, une baisse de sensibilité des souches plasmodiales aux dérivés de l'artémisinine a été signalée dans quelques pays de la sous-région du sud-est asiatique [55-57]. L'utilisation prolongée des dérivés de l'artémisinine en monothérapie par voie orale apparaît comme une cause importante. Si la résistance à l'artémisinine progresse et gagne d'autres régions géographiques étendues, les conséquences pour la santé publique pourraient être très graves car aucun autre antipaludique de remplacement n'est actuellement disponible [21]. L'OMS préconise une surveillance systématique de la résistance aux dérivés de l'artémisinine.

Le traitement recommandé par l'OMS est l'utilisation des dérivés d'artémisinine combinée soit à un amino-4-quinoléine (amodiaquine de préférence), à la luméfantrine, à la pipéraquline ou à la sulfadoxine-pyrimétamine ou méfloquine en première intention. Depuis 2004, l'OMS a encouragé tous les pays à passer à ce traitement combiné pour augmenter l'efficacité des antipaludiques d'une part et d'autre part pour raccourcir la durée du traitement (augmenter la compliance du traitement) et ralentir le développement de la résistance. L'association artéméther-luméfantrine (CoArtem[®]) ou artésunate-amodiaquine FDC (*Fixed dose combination*, dose combinée fixe) est recommandée comme médicaments de première intention au Mali par le PNLP pour le

traitement de l'accès palustre simple mais son utilisation semble être limitée par son coût élevé.

Dans le paludisme grave, on privilégie les antipaludiques par voie parentérale ou rectale (de prétraitement ou de transfert). La quinine ne doit plus être le médicament de choix pour le traitement du paludisme grave selon les dernières recommandations de l'OMS [1]. Elles mettent l'accent sur l'utilisation de l'artésunate injectable comme traitement de choix de l'accès palustre grave en fonction de son efficacité et de l'absence de séquelles neurologiques.

3.5. Vaccins anti-palustres

Un vaccin est une préparation à caractère antigénique issu d'un agent pathogène (parasites, bactéries, virus, etc.) qui lorsqu'on l'injecte à une personne réceptive à la maladie, ne contracte pas la maladie ; mais dont l'organisme est capable de le reconnaître et de monter une réponse immunitaire protectrice (humorale et/ou cellulaire), garde en mémoire la structure de l'antigène et s'opposera à toute infection ultérieure même si cet'organisme n'avait pas auparavant rencontré l'agent pathogène en question.

Les tentatives vaccinales, relativement nombreuses, se sont heurtées à la complexité du parasite, de son cycle et de la relation hôte-parasite, aussi bien qu'à la difficulté de son maniement au laboratoire. Aussi, après plus de vingt ans de travaux intensifs, il n'y a pas encore de vaccin commercialisé. Une des difficultés majeures dans la mise au point d'un vaccin contre ce parasite est qu'au cours de sa vie, le *Plasmodium* passe successivement par plusieurs stades avec des phases d'intense multiplication asexuée chez l'homme (dans le foie puis dans le globule rouge) et une phase de reproduction sexuée suivie de multiplication chez l'insecte. Chaque stade se termine par la libération d'un parasite d'une forme différente. Le parasite a développé de multiples stratégies pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. La difficulté majeure est d'identifier les meilleures molécules à utiliser, déterminer leur présentation optimale au système immunitaire de l'homme afin de stimuler préférentiellement des réactions de défense.

3.5.1. Différents types de vaccins antipalustres

Les vaccins antipaludiques à l'étude sont de trois grands types [58, 59]:

- **les vaccins antisporozoïtes** sont conçus pour prévenir l'infection. Ces vaccins sont déterminés pour stopper le cycle de vie du parasite à partir de la progression des sporozoïtes ou des stades hépatiques. Leur objectif principal est de générer une réponse d'anticorps contre les sporozoïtes et ainsi prévenir l'infection des hépatocytes, ou de cellules T dirigées contre les antigènes exprimés par les hépatocytes infectés qui préviennent la libération des mérozoïtes en éliminant ces hépatocytes infectés ou en interférant dans le développement du parasite.

- **les vaccins contre les stades sanguins asexués** visent à atténuer les manifestations cliniques graves et compliquées de la maladie. Ces vaccins ont pour objectif de réduire l'infection plutôt que de l'éliminer, dans le but de protéger contre les symptômes cliniques et la sévérité du paludisme. Ces vaccins pourraient permettre de réduire la morbidité et la mortalité chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique, qui sont le groupe à risque principal et leur mise au point est traitée comme une priorité par l'OMS. Plusieurs vaccins prototypes de ce genre sont en cours d'essai clinique [60].
- **les vaccins qui agissent en bloquant la transmission** sont conçus pour arrêter le développement du parasite chez le moustique et pour réduire ainsi ou arrêter la transmission de la maladie. L'objectif de tels vaccins est d'induire des anticorps dirigés contre les antigènes qui sont exprimés par les stades sexuels du parasite, par exemple les gamétocytes et ainsi stopper leur combinaison subséquente dans l'intestin du moustique et leur développement en sporozoïtes infectants.

3.5.2. Antigènes candidats vaccins antipalustres

Tous les antigènes candidats vaccins contre le paludisme visent à reproduire l'immunité naturelle observée chez les individus vivant en zone d'endémie. Jusque ici, seule la voie de l'immunité humorale a été explorée en utilisant les antigènes exprimés à la surface des érythrocytes ou des mérozoïtes. Nous nous intéresserons aux antigènes ci-dessous qui sont du stade érythrocytaire et sont tous impliqués dans l'invasion de l'érythrocyte :

- ❖ **AMA1** (Antigène-1 de la membrane Apicale du Mérozoïte), il est l'un des principaux candidats vaccins exprimé par les mérozoïtes de *P. falciparum* [61, 62]. AMA1 est une protéine membranaire de 83kDa comprenant une région intracytoplasmique de 55 acides aminés et une région extracellulaire de 550 acides aminés. La protéine AMA1 de *P. falciparum* est très polymorphe [63]. Ce polymorphisme est d'une importance capitale car il conditionne la réponse protectrice [64]. C'est une protéine essentielle dans l'invasion érythrocytaire par les parasites [65] et qui est également impliquée dans l'invasion des hépatocytes [66]. Il a été montré qu'AMA-1 pouvait induire une réponse immune protectrice contre des infections expérimentales chez les animaux (murins et primates ; [67, 68]. Les anticorps anti-AMA1 sont capables de bloquer *in-vitro* l'invasion des érythrocytes par les parasites. Au Mali, une étude a démontré la capacité d'AMA1 à induire une immunité contre le paludisme dans un essai de phase 2b chez les enfants de 1 à 6 ans [69].

- ❖ **MSP1** (Protéine-1 à la surface du mérozoïte), c'est une protéine de surface importante avec une taille moléculaire d'environ 190 kDa qui joue un rôle important dans l'invasion érythrocytaire par le mérozoïte [70]. Il a été démontré *in-vitro* que des anticorps dirigés contre la région carboxy-terminale de MSP-1 [71] et en particulier une portion de 19-kDa, pouvaient empêcher l'invasion des hématies par les mérozoïtes [70]. Un essai clinique d'une portion de 42-kDa de cette région de MSP-1 par infection expérimentale n'a pas démontré d'efficacité vaccinale chez l'homme alors qu'elle a été protectrice dans le modèle primate [72]. Bien que la région de MSP-1 utilisée comme candidat vaccin soit considérée comme conservée, le polymorphisme de MSP-1 pourrait être un obstacle à son utilisation vaccinale.

- ❖ **EBA175** (Antigène d'adhésion érythrocytaire 175), il est localisé dans le micronème à l'extrémité du mérozoïte et est caractérisé comme le ligand qui lie la glycophorine A présent dans la membrane des érythrocytes [73]. Il intervient dans la fixation de l'acide sialique dépendante de la glycophorine A sur les érythrocytes, ce qui joue un rôle cruciale dans l'invasion de la cellule hôte par *P. falciparum*. Le gène d'EBA175 est localisé sur le chromosome 7 et comprend quatre exons et sept régions numérotés de I à VII [74]. Le domaine de liaison des récepteurs d'EBA175 a été localisé à l'extrémité N-terminale (région RII), riche en cystéine [75]. Cette région RII est hautement conservée parmi plus de 30 isolats de laboratoire et de terrain [76] et a été établie comme un candidat vaccin [77, 78].

- ❖ **MSP2** (Protéine-2 à la surface du mérozoïte), c'est un composant essentiel pour le vaccin contre le paludisme [70, 79]. Cette protéine est riche en Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) qui est un élément essentiel pour le vaccin antipalustre. Elle joue un rôle dans l'invasion de l'érythrocyte [80]. MSP2 est l'une des protéines les plus polymorphes de toutes les protéines de surface du mérozoïte avec une région centrale qui comprend plus de 60% de la chaîne du polypeptide mature de la région N-terminale et de la région C-terminale [81]. Tout comme MSP1, MSP2 est aussi polymorphique. Son polymorphisme est lié à la variabilité de sa région centrale [81, 82]. Les régions de N- et C-terminale de MSP2 sont hautement conservées parmi tous les allèles [80]. MSP2 est une cible essentielle d'anticorps induits par l'infection ou par la vaccination. La majorité des personnes vivant dans les régions d'hyper-endémies palustre développe des titres élevés d'anticorps anti-MSP2 en réponse aux infections [83]. Une grande partie de la réponse en anticorps naturel anti-MSP2 est dirigée contre les épitopes de la région centrale mais aussi contre les régions dimorphes [84]. Les anticorps anti-MSP2 chez les individus immunisés sont principalement de la sous classe IgG3 cytophilique [85, 86]. Les données d'un essai vaccinal réalisé en Papouasie Nouvelle-Guinée ont indiqué que MSP2 est un candidat –vaccin particulièrement prometteur. Ce candidat vaccin contenant une

combinaison de trois antigènes y compris les 73 formes alléliques de MSP2, a réduit significativement les densités parasitaires chez les enfants de 6 à 9 ans vivant dans une zone endémique de paludisme à *P. falciparum* [70].

- ❖ **CSP** (protéine circum-sporozoïte), cette protéine de *P. falciparum* est un antigène candidat vaccin antipalustre très prometteur, connu pour provoquer des réponses d'anticorps protecteur chez l'homme [87]. La CSP est une protéine de surface fortement exprimée lors de la phase pré-érythrocytaire de *P. falciparum* et contient plusieurs épitopes T, un épitope de lymphocytes B et la région répétée PNNA. Cette région répétée PNNA est une cible importante des anticorps isolés de personnes jouissant d'une immunité acquise naturellement contre le paludisme [88]. Elle comporte 412 acides aminés, l'épitope le plus immunogène est un petit peptide de quatre acides aminés: asparagine (N), alanine (A), asparagine (N) et proline (P), soit la séquence NANP. Elle a été testée comme vaccin et utilisée comme antigène pour les tests sérologiques. La CSP ne se retrouve pas dans les autres stades du *Plasmodium*. Elle est aussi présente dans les hépatocytes lors de l'invasion par les sporozoïtes [89].

- ❖ **RST,S** est un candidat vaccin constitué d'un composant de la protéine circum-sporozoïte à *P. falciparum* (CSP) couplé à l'antigène de surface de l'hépatite B [88]. Actuellement, RTS,S est le plus avancé en termes de développement clinique des vaccins antipalustres. Au cours d'essais cliniques, il a été le premier à démontrer qu'il pouvait contribuer à protéger des jeunes enfants et des nourrissons dans les zones d'endémie palustre en Afrique contre l'infection et la maladie provoquée par *P. falciparum*, l'espèce la plus mortelle du parasite du paludisme. RTS,S a pour objectif d'induire une réponse du système immunitaire contre le parasite *P. falciparum* quand il entre dans la circulation sanguine de l'hôte humain pour la première fois ou lorsque le parasite infecte les cellules hépatiques. Il est conçu pour empêcher le parasite d'infecter, de se développer et de se multiplier dans le foie et, ainsi, l'empêcher de revenir dans la circulation sanguine pour infecter les globules rouges et induire les symptômes de la maladie (l'accès palustre ;[90, 91]). C'est de loin le plus avancé des candidats vaccins contre le paludisme. Il est le seul candidat vaccin en phase III [90]. Administré chez des nourrissons de 5 à 17 mois, RTS, S/AS01 réduirait de 46% le risque de développer un accès palustre et de 35,5% celui de contracter une forme sévère du paludisme. Il permettrait aussi de diminuer de 41,5 %, le nombre d'hospitalisations liées au paludisme [92, 93].

3.6. Hémoglobinopathies

Les érythrocytes sont essentiellement remplis d'hémoglobine, et les parasites du paludisme ont développé un style de vie qui est grandement dépendant de son

environnement d'hémoglobine. Les altérations de l'hémoglobine peuvent affecter la biochimie et la machinerie cellulaire du développement du parasite. Elles pourront affecter l'habilité de la rate et d'autres mécanismes immunitaires à reconnaître les hématies parasitées en affectant leur morphologie, leurs propriétés mécaniques ou leurs structures de surface. L'importance biologique de ces dépendances est appuyée par la très grande pression que le paludisme a exercé sur la structure et la régulation de l'alpha globine (encodée par les gènes identiques HBA1 et HBA2) et la bêta globine (encodée par le gène HBB) qui ensemble constituent la protéine tétramérique de l'hémoglobine chez l'adulte. La bêta globine (HBB) a trois SNPs codants qui confèrent la résistance au paludisme, et qui ont atteint des fréquences élevées dans différentes populations vivant dans les régions endémiques de paludisme [94] : (i) l'allèle HbS est une substitution de l'acide glutamique pour la valine à la position 6 de la chaîne bêta globine ; (ii) HbC est une substitution de l'acide glutamique pour la lysine à la position 6 de la chaîne bêta globine ; et (iii) HbE allèle est une substitution de l'acide glutamique pour la lysine à la position 26 de la bêta globine.

Les protéines correspondantes sont connues sous le nom d'hémoglobine (Hb) S, HbC et HbE. On note premièrement, que différents polymorphismes de la bêta-globine sont retrouvés chez différentes populations ; deuxièmement, que différentes populations ont développé indépendamment une réponse évolutive au paludisme, et ceci est constaté à la fois au niveau global et au niveau local. HbS allèle est fréquente en Afrique et rare en Asie du sud-est et l'inverse est aussi vrai pour allèle HbE. Cependant, une image plus complexe émerge au niveau local ; par exemple, les Dogon du Mali qui ont une fréquence faible de HbS allèle que le reste des groupes ethniques en Afrique de l'ouest ont une fréquence élevée d'allèle HbC [95, 96]. La mutation HbS a augmentée indépendamment dans plusieurs régions. Un autre niveau de complexité est que, à l'intérieur de l'Afrique, l'allèle HbS est retrouvé dans quatre différents haplotypes, un phénomène qui a été interprété par le fait que la même mutation est arrivée indépendamment dans quatre différentes populations africaines, bien qu'il ait été signifié que ceci pourrait aussi avoir plusieurs explications.

Ce qui est remarquable c'est la grande variété de variants d'érythrocyte qui fait suite à la force sélective évolutive exercée par le paludisme. Aussi bien que les variations structurales de la bêta globine (HbS, HbC, HbE) ; il y a des défections de régulation de l'alpha globine et de la bêta globine causant respectivement l'alpha- et la bêta-thalassémie [97]. La variation structurale de la protéine SLC4A1 cause l'ovalocytose, la variation du récepteur des chémokines FY est responsable des groupes sanguins Duffy négatifs et les polymorphismes de l'enzyme G6PD des globules rouges causent la déficience en G6PD.

3.6.1. Paludisme et hémoglobine C

L'hémoglobine (Hb) C est retrouvée à travers l'Afrique de l'ouest même si elle est moins répandue que HbS. HbC a moins de conséquences cliniques que l'HbS. Les sujets homozygotes ont relativement une anémie hémolytique mineure, et les hétérozygotes n'ont pas de réduction significative du taux d'hémoglobine [98]. HbC hétéro- et

homozygotes protègent tous contre le paludisme sévère ; mais il semble que cette protection soit élevée pour les homozygotes [12, 13, 96].

Le gène HbC atteint sa fréquence maximale dans le nord du Burkina Faso (autrefois appelé la Haute Volta) et la prévalence diminue du centre aux régions périphériques. Une étude cas-contrôle sur 4 348 Mossi du Burkina Faso suggère une réduction de 29 à 93% de risque de paludisme clinique chez les HbC hétérozygotes et homozygotes, respectivement [12]. L'allèle HbC semble avoir eu des conditions de sélection dans une zone unique centrée sur le plateau Mossi et comprenant presque tout le Burkina-Faso, une partie du Mali et le nord de la Côte-d'Ivoire, du Ghana, du Togo et du Bénin. Or, comme cela a été déjà noté, c'est dans cette zone que s'est vraisemblablement vérifiée l'introgression des arrangements 2La et 2Rb d'*A. arabiensis* et l'occupation de la savane par *A. gambiae* après son origine en forêt. C'est donc là que se vérifie le maximum d'hétérogénéité chromosomique du système vectoriel afrotropical qui comprend trois taxons polymorphiques du complexe « *gambiae* », deux taxons polymorphiques du complexe '*funestus* » et *A. arabiensis*. Leur capacité vectorielle totale exceptionnellement élevée, pourrait rendre compte de la distribution de la mutation HbC à l'état hétérozygote [12]. En accord avec l'hypothèse de Modiano et coll. (2001), le contexte épidémiologique idéal pour la sélection d'un tel facteur génétique de protection serait caractérisé par une transmission très élevée. Une étude faite au Burkina Faso démontre que l'HbC et l'HbS donnent lieu à une multiplication par trois de l'efficacité de la transmission du parasite de l'homme au moustique [99]. Cela signifie que si, d'un côté, la mutation génique représente une sorte de protection pour l'homme qui en est porteur, et qui par conséquent est moins victime du paludisme, elle le rend par ailleurs plus « dangereux » puisqu'en mesure de transmettre plus efficacement le parasite au moustique [100].

Il a été proposé que l'effet protecteur de l'HbC puisse entraîner une augmentation de la clairance des érythrocytes infectés. Ceci est basé sur l'observation de la réduction de la cytoadhérence des parasites, une expression anormale de PfEMP1, un agrégat de la protéine de la bande 3 de l'érythrocyte et une altération de la surface topographique de la membrane de l'érythrocyte en présence de l'HbC [101-103]. Une importante observation qui reste inexplicée est que le trait HbC n'affecte pas la croissance parasitaire aussi bien qu'observée avec les cellules normales. Cette observation est contradictoire avec l'hypothèse selon laquelle la fréquence élevée de HbC chez certaines populations est due à l'effet protecteur de l'état hétérozygote, créant ainsi une pression de sélection positive. Il y a plusieurs explications possibles de ce paradoxe : la culture de parasites du paludisme pourrait ne pas être suffisamment sensible aux avantages de cette anomalie du trait HbC [104]. L'avantage de ces cellules peut dériver d'une portion du cycle de vie non testée lors de la culture, telles que l'adhésion endothéliale, l'interaction avec la rate, ou la phagocytose [102] ; ou la pression de sélection pourrait ne pas être opérationnelle dans le trait HbC mais chez les sujets ayant HbCC et/ou HbSC.

3.6.2. Paludisme et hémoglobine S

Les études pionnières ont établi que la drépanocytose est la conséquence d'une défection dans la molécule de l'hémoglobine [105]. La même année, le mode d'héritage de la maladie a été démontré comme autosomal récessif [106]. Nous fêtons cette année (2010) le centenaire de la première description de la maladie en 1910 [107]. La mutation drépanocytaire a été caractérisée plusieurs années après comme une substitution de la valine par la glutamine à la 6^{ème} position des résidus du polypeptide β -globine [108]. Plusieurs décennies après, les gènes de la β -globine humaine étaient clonés, leurs séquences ADN étaient déterminées, l'organisation du groupe de gènes globines était caractérisée, et un grand aperçu était fait sur les mécanismes de la régulation de leur expression [109]. L'hémoglobine humaine est une molécule tétramérique qui comprend deux paires de sous-unités polypeptides identiques, chacune encodée par une famille de gènes différents. Les gènes humains semblables α -globine (ζ , α_1 et α_2) sont localisés sur le chromosome 16, et les gènes semblables de la β -globine (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ et β) sont localisés sur le chromosome 11. Intéressant, les gènes sont présents sur les deux chromosomes dans le même ordre dans lequel ils sont exprimés pendant le développement. Durant la vie fœtale, le type prédominant d'hémoglobine est l'hémoglobine fœtale (HbF ; $\alpha_2\gamma_2$). Durant la période postnatale, HbF est graduellement remplacée par l'HbA ($\alpha_2\beta_2$). L'HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) est le type mineur d'hémoglobine adulte qui compte pour moins de 2,5% d'hémoglobine circulante chez les personnes normales pendant la vie adulte. Une fois la substitution de l'HbF par HbA complétée, les patients présentant des déficits des gènes β -globines commencent à manifester les caractéristiques cliniques de leurs maladies [110].

L'HbS est retrouvée dans une large partie d'Afrique sub-saharienne aussi bien qu'au Moyen-Orient et en Europe [111]. Elle a la particularité d'être l'une des premières variantes génétiques humaines à être associées à une défection moléculaire spécifique. L'HbS tend à se polymériser sous des concentrations faibles d'oxygène, entraînant l'érythrocyte à se déformer en forme de faucille. Les sujets homozygotes (HbSS) ont la maladie drépanocytaire, une maladie généralement fatale au jeune âge. Les sujets hétérozygotes HbS (HbAS) n'ont généralement pas l'anomalie clinique. Raper a été le premier à suggérer que le trait drépanocytaire pourrait conférer un avantage de survie contre certaines conditions adverses dans les régions tropicales [112], puis Mackey et Vivarelli suggéraient que ce facteur pourrait être le paludisme [113]. La distribution géographique très proche du paludisme et du gène d'HbS supporte ce concept et conduit à une période très excitante dans l'histoire de la recherche sur la maladie drépanocytaire.

Les premières observations entre le trait drépanocytaire et le paludisme provenaient de la Rhodésie du Nord où Beet notait que les parasites du paludisme étaient moins fréquents dans le sang des sujets ayant le trait drépanocytaire [114]. Allison attirait l'attention sur cette association et concluait que les personnes ayant le trait drépanocytaire développaient un paludisme moins fréquent et moins sévère que ceux n'ayant pas ce trait [115]. Allison observa le premier dès 1949 qu'il y'avait une fréquence élevée du trait drépanocytaire HbAS (au moins 20%) dans les populations

vivant près des régions côtières kenyanes et autour du lac Victoria à l'opposé d'une faible fréquence de l'hémoglobine S sur les hautes terres où le paludisme est inexistant. Depuis, il y a eu une forte sélection contre les drépanocytaires homozygotes. Il proposait alors que le trait drépanocytaire conférait à un certain degré une protection contre le paludisme à *P. falciparum*. Afin de tester cette hypothèse, il étudia chez les enfants de 4 mois à 4 ans où la morbidité et la mortalité palustre sont très grandes et trouva que les enfants drépanocytaires ougandais de cette classe d'âge avaient une faible prévalence du paludisme, comparés à ceux ne portant pas ce trait drépanocytaire et avaient une hémoglobine normale A [116]. Cette observation a été confirmée plusieurs fois dans différentes régions africaines, et les manifestations potentiellement létales du paludisme (atteinte cérébrale et anémie sévère) sont rares chez les traits drépanocytaires [14, 117]. Dans la dernière étude, l'état de porteur d'hémoglobine S était associé négativement à toutes les formes létales du paludisme à *P. falciparum*, alors que l'association négative aux porteurs de l'hémoglobine C et l'alpha-thalassémie était limitée au paludisme cérébral et à l'anémie sévère, respectivement [14]. Ces résultats suggéraient que sous les conditions d'intense transmission du paludisme à *P. falciparum*, les jeunes enfants ayant le trait drépanocytaire survivent mieux que ceux ayant l'hémoglobine normale, alors que ceux ayant la forme homozygote HbSS survivent rarement bien que tous les trois autres génotypes.

L'apparition de la mutation du trait drépanocytaire et l'avantage de survie conféré par le paludisme, ensemble, déterminent la distribution de base du gène HbS. L'Afrique équatoriale est hautement paludéenne et la mutation HbS paraît survenir indépendamment au moins dans trois et probablement quatre occasions séparées sur le continent Africain, et les mutations étaient ensuite nommées selon les régions où elles ont été décrites pour la première fois et désignées par les haplotypes de la maladie : Sénégal, Benin, Bantu et Cameroun [118-122]. La maladie observée en Amérique, aux Caraïbes et au Royaume-Uni est prédominante d'origine africaine et en majorité d'haplotype Benin, bien que le Bantu soit proportionnellement plus fréquent au Brésil [123]. Il est donc facile de comprendre le mauvais concept fréquent dans ce domaine qui stipule que la maladie est d'origine africaine. Cependant, le gène HbS est retrouvé fréquemment dans le pourtour méditerranéen, survenant en Sicile, dans le sud italien, au nord de la Grèce et au sud costal de la Turquie, bien que toutes les mutations soient de l'haplotype Benin et ainsi, en fin de compte, d'origine africaine. L'haplotype asiatique de la maladie est généralement associé à une fréquence très élevée de l'alpha-thalassémie et de taux élevés d'hémoglobine fœtale, ces deux facteurs sont supposés améliorer la sévérité de la maladie.

HbAS confère une protection 10 fois supérieure aux formes graves de paludisme, et un léger degré de protection contre les formes modérées de cette maladie [6, 16, 105, 124-128].

Afin de bien conduire notre étude, nous avons suivi la méthodologie suivante.

4. Méthodologie

4.1. Cadre de l'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche sur la résistance innée et acquise à *Plasmodium falciparum* au Mali, menée par le MRTC/FMPOS/USTTB en collaboration avec le LMVR/NIAID/NIH des Etats-Unis d'Amérique.

4.1.1. Situation

Bancoumana est un village situé à 60 km à l'Ouest de Bamako sur la route nationale RN15 dans la zone soudano-guinéenne. La commune comporte 4 centres de santé secondaires et le centre de santé communautaire de Bancoumana qui est en partenariat avec le MRTC/NIH depuis sa création en 1993. La commune est limitée au Nord par celle de Siby, à l'Est par la commune du Mandé, au Sud-ouest par la commune du Minindian et au Sud-est par le fleuve Djoliba qui la sépare des communes de Niagadina et de Kourouba. Cette étude ne concernait que les villages de Kéniéroba et Fourda dans la commune rurale de Bancoumana (figure 2 & 3).

➤ Kéniéroba

Il est situé au Sud-ouest de Bamako, à 60km sur la route RN15 de Kangaba. Le village a été refondé par Maré Famissa KEITA après son déclin pendant le règne de Samory Touré. Il fit réunir ses frères dispersés sur la terre de leur ancêtres d'où le nom Kéniéroba. Il est limité au Sud-est par le hameau de Fourda, au Nord par le village de Nanguilabougou et à l'Ouest par le village de Ticko. Il compte environ 2341 habitants essentiellement constitués de Malinké (85%), de Peulh (10%) et de Bambara (5% ; recensement du MRTC/FMPOS 2012). Le village dispose d'un centre de santé où est basée notre équipe de recherche.

➤ Fourda

C'est un hameau de pêche situé à 3km au Sud-est de Kéniéroba. Il fut fondé par les frères Sogoré (Kalifa, Sinimba, Fodé, Mamady et Drissa) venus de Kangaba dans le but de faire la pêche. Il compte environ 325 habitants qui sont essentiellement composés de Somono (Malinké) mais aussi de Bambara et de Peulh (recensement MRTC/FMPOS 2012). Kéniéroba et Fourda partagent une même école fondamentale et une Médersa.

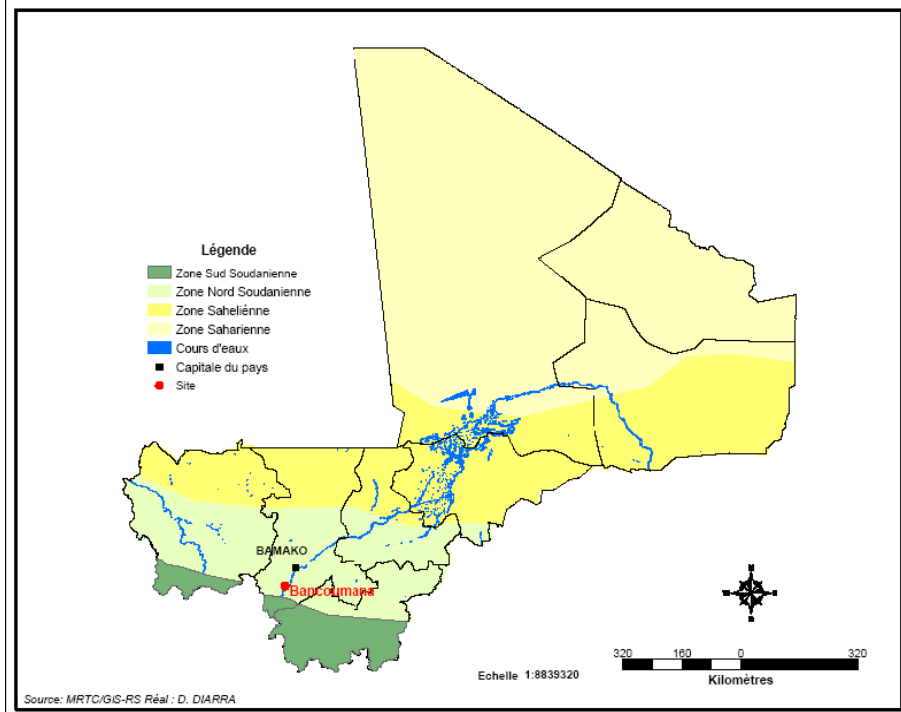


Figure 2 : Site d'étude (Source : Unité GIS MRTG/FMPOS (2008))

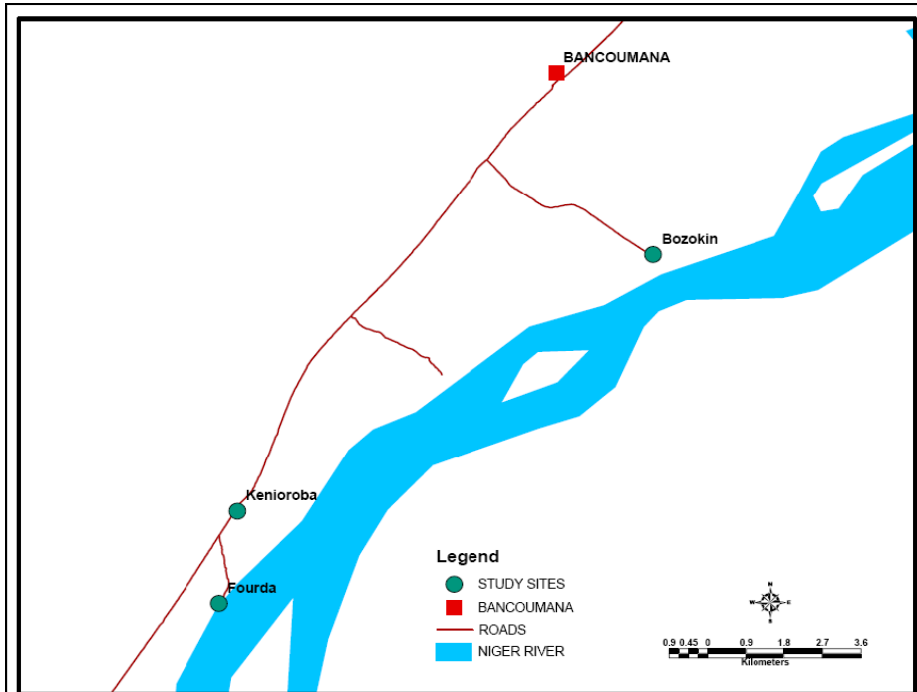


Figure 3 : Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana (Source: Unité GIS MRTG/FMPOS (2008))

4.1.2 Végétation/hydrographie/climat

Les deux villages sont situés le long du fleuve Niger (ou fleuve Djoliba) qui constitue le principal réseau hydrographique. La couverture végétale originale rencontrée sous un climat soudano-guinéen marque la transition entre la savane arborée et la forêt guinéenne. Ce type de végétation existe encore à l'état délictuel au niveau des bois sacrés et le long du fleuve Niger.

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

La savane arborée constitue la principale formation végétale mais aussi quelques galeries forestières sont rencontrées le long du fleuve Niger. On distingue :

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

Deux grandes saisons se succèdent dans cette zone : la saison des pluies de juin à octobre et la saison sèche de novembre à mai. Une courte saison de transition s'étalant de novembre à janvier que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de *fôbònda* se caractérise par un adoucissement voire un rafraîchissement des températures par l'arrivée des côtes atlantiques de l'harmattan.

L'habitat de type traditionnel, est constitué de cases rondes et rectangulaires en terre battue et aux toitures en chaumes coniques, mais quelques maisons ont des revêtements en tôle. Ces différents types de maisons propices au repos des moustiques, favorisent une densité et une agressivité anophélienne élevées. L'environnement physique des villages est propice à la transmission du paludisme avec la présence de nombreux gîtes larvaires et des cultures intradomiciliaires. Les villages sont situés dans une grande plaine qui s'étend jusqu'au fleuve Niger. La plaine présente de nombreuses retenues d'eau pendant la saison des pluies. C'est une plaine de riziculture. Les retenues d'eau avec des crevasses naturelles du sol peuvent être des

gîtes larvaires potentiels. Pendant la saison des pluies, il existe des cultures intra domiciliaires et une prolifération d'herbes sauvages dans le village, contribuant ainsi à augmenter la densité et l'agressivité des moustiques. La température la plus élevée se situe à 40°C au mois de mai et la plus basse est voisine de 18°C aux mois de décembre-janvier. La température moyenne annuelle est autour de 23°C. D'une manière générale, le climat y est assez agréable et la végétation est luxuriante.

La faune entomologique est constituée d'invertébrés et d'arthropodes. *Anopheles gambiae s.l.* et *An. funestus* abondent dans les villages où ils assurent la transmission du paludisme et de la filariose de Bancroft surtout en saison des pluies. Les similis transmettent l'onchocercose durant l'hivernage tandis que les glossines (mouche tsé-tsé) transmettent la maladie du sommeil. *Anopheles gambiae sl* est le vecteur majeur du paludisme rencontré dans la zone d'étude [129].

4.1.3. Infrastructures socio-sanitaires

La commune de Bancoumana dispose :

- Dans le domaine de l'éducation :
 - Dix (10) écoles publiques dont 4 seconds cycles
 - Trois (03) écoles communautaires
 - Sept (07) médersas communautaires
 - Dix Huit (18) centres d'alphabétisation.
 -
- Dans le domaine de la santé :
 - Quatre (04) dispensaires (Kéniéroba, Djiguidala, Ouoronina et Niamé)
 - Cinq (05) maternités
 - Huit (08) dépôts pharmaceutiques
 - Un CSCOM: celui de Bancoumana (base principale de l'équipe de recherche de MRTC dans cette zone)
 - Une pharmacie (officine privée)

4.1.4. Activités socio-économiques et culturelles

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

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

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

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

L'élevage des ovins, des caprins et des bovins y est pratiqué comme une activité économique secondaire. On y retrouve aussi quelques équidés (ânes et chevaux) utilisés comme animaux de trait. La plupart des villageois thésaurisent leurs revenus dans l'élevage et dans les cultures industrielles. La pêche est également pratiquée par les ethnies Bozo et Somono principalement dans les villages de Fourda et de Bozokin. L'artisanat local est peu développé (cordonnerie, forgerie, maçonnerie, poterie). En dehors de la commercialisation des produits agricoles ; le commerce des produits de consommation courante y est pratiqué. Une foire hebdomadaire a lieu à Kéniéroba chaque jeudi favorisant ainsi le phénomène d'automédication par la circulation facile des médicaments.

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

4.2. Critères d'inclusion et de non inclusion

4.2.1. Critères d'inclusion

Les sujets répondant aux critères ci-dessous ont été inclus dans cette étude:

- résider dans les villages de Kéniéroba, Fourda ou Bozokin,
- accepter volontairement de participer à l'étude comme attesté par le consentement libre et éclairé obtenu des parents ou des tuteurs de l'enfant,
- être âgé de 3 à 11 ans,
- avoir un taux d'hémoglobine $\geq 8,5$ g/dl (pour les prélèvements veineux).

4.2.2. Critères de non inclusion

Nous n'avons pas inclus dans notre étude les enfants se trouvant dans les conditions suivantes :

- Absence de consentement,
- Présence de maladies ou de conditions rendant impossible le suivi du protocole.

4.3. Types d'étude et techniques de laboratoire utilisées

4.3.1. Etude de cohorte et prélèvements sanguins

En mai 2008, nous avons lancé une étude de cohorte longitudinale de 4 ans chez des enfants maliens (âgés de 0,5 à 17 ans) dans trois villages (Kéniéroba, Fourda, Bozokin) où la transmission du paludisme est intense et saisonnière (de juin à décembre/janvier). Tous les enfants ont été génotypés pour les polymorphismes érythrocytaires (types d'hémoglobine (Hb), α -thalassémie, déficit en G6PD, antigènes de groupe sanguin ABO/Rh), comme décrit [3, 130]. De cette cohorte, nous avons inclus 73 HbAS et 30 enfants HbAC, âgés de 3 à 11 ans, dans une étude sous-cohorte. Les enfants de Bozokin n'étaient pas inclus pour des raisons logistiques. Pour chaque enfant HbAS ou HbAC, nous avons inclus un enfant HbAA qui a été complètement apparié à l'âge et correspond aussi étroitement que possible au profil de polymorphisme érythrocytaire. La sous-cohorte résultante inclus 70, 80 et 56 enfants âgés de 3-5, 6-8 et 9-11 ans, respectivement.

Au début de l'étude de la sous-cohorte (mai 2009), nous avons obtenu des échantillons de plasma et les avons stockées à -80°C jusqu'au moment d'utilisation. Les parents ou les tuteurs de tous les enfants inclus dans l'étude de cohorte étaient activement encouragés à amener leur enfant à la clinique de l'étude s'il a développé des symptômes de paludisme. Le paludisme simple a été définie comme la température axillaire $> 37,5^{\circ}\text{C}$ (ou antécédents de fièvre dans les dernières 48 heures) avec ou sans autres symptômes du paludisme (par exemple, maux de tête, malaise), une densité de *P. falciparum* de stade asexué à l'examen microscopique d'un goutte épaisse et pas d'autres étiologies de maladies fébriles perceptibles à l'examen clinique. Le paludisme grave a été défini selon les critères de l'OMS [29]. Les échantillons de plasma ont également été prélevés à la fin de la saison de transmission (décembre 2009, $n = 191$) et à la fin de la saison sèche suivante (mai 2010, $n = 180$).

Les études de cohorte et de sous-cohortes ont été approuvées par les comités d'éthique de la Faculté de médecine, de pharmacie et odontostomatologie de l'Université de Bamako et de l'Institut national des maladies allergiques et infectieuses (NIAID). Les parents adultes ou tuteurs des enfants ont donné leur consentement éclairé et écrit s'ils pouvaient lire le français. S'ils ne pouvaient pas lire le français, le consentement oral a été obtenu par le médecin de l'étude et une empreinte digitale obtenue à partir de l'adulte consentant. Un tiers alphabétisé témoin des deux processus

de consentement éclairé a assisté et signé le document de consentement libre et éclairé. L'étude a été enregistrée sur le site des essais Clinique (Clinicaltrials.gov) sous le numéro NCT00669084.

4.3.2. Mesure des titres d'IgG spécifiques d'antigène par ELISA

La méthode normalisée utilisée pour effectuer le test ELISA a été décrit précédemment [131]. En bref, les plaques à 96 puits ELISA à fond plat ont été revêtues avec 100 ng de protéine d'essai par puits et les échantillons de plasma ont été testés en triple exemplaire à des dilutions de 1:500-1:50,000 (cf. annexe). L'absorbance à 405 nm a été lue en utilisant un lecteur de microplaques et l'absorbance de chaque échantillon d'essai a été convertie en unités ELISA en utilisant une courbe standard générée par dilution en série de la norme dans la même plaque. La valeur unitaire d'un ELISA standard a été assignée comme l'inverse de la dilution donnant une densité optique (DO) 405 = 1 dans un test standardisé. L'antigène membranaire apical-1 (AMA1)-3D7 [132] et la protéine-1 à la surface du mérozoïte (MSP1, 42kDa)-3D7 [133] ont été aimablement fournies par le Dr David Narum (NIAID/NIH). La protéine antigénique érythrocytaire de liaison de 175kDa-3D7 (région II EBA175-3D7) II [134] a été fournie par les Drs Annie Mo et Lee Hall (NIAID/NIH) tandis que la protéine-2 à la surface du mérozoïte (MSP2)-3D7 [79] a été fournie par le Dr Robin Anders (Université La Trobe, Melbourne, Australie). Le niveau de détection minimale d'IgG dans cette étude était de 44 unités ELISA. Toutes les réponses en dessous de ce niveau ont été affectées d'une valeur de 22 unités ELISA.

Pour mesurer les titres d'IgG antitétanique et déterminer les sous-classes d'IgG, nous avons choisi au hasard des échantillons de plasma provenant de huit paires enfants appariés HbAA et HbAS dans chaque groupe d'âge (3-5, 6-8 et 9-11 ans) et nous les avons testés à une dilution de 1:500 (n = 48). L'anatoxine tétanique a été achetée chez la « *List Biological Laboratories* », Inc. (Campbell, CA).

4.3.3. Mesure de l'activité inhibitrice de la croissance parasitaire des IgG par le test d'inhibition de croissance (GIA)

Le test d'inhibition de croissance (GIA) a été effectué avec la protéine G purifiée des IgG totales et la méthode normalisée a été décrite précédemment [135]. En bref, les IgG de test (à une concentration finale de 10 mg/ml par puits), les parasites synchronisés de *P. falciparum* (3D7 clones) et le milieu de culture ont été ajoutés à des plaques de culture de 96 puits en triple exemplaire et cultivées pendant ~40h. La parasitémie relative a été quantifiée par la détermination biochimique de la lactate déshydrogénase du parasite. Le pourcentage d'inhibition des IgG du test a été calculé comme $100 - ((A_{650} \text{ de l'IgG test} - A_{650} \text{ des globules rouges normaux}) / (A_{650} \text{ des globules rouges infectés sans aucune IgG} - A_{650} \text{ des globules rouges normaux}) \times 100)$ (cf. annexe).

4.4. Gestion et analyse statistique des données

Les variables catégorielles ont été comparées en utilisant le test du chi-carré. Les temps du premier épisode palustre ont été comparés par un test du log-Rank. Les variables continues entre les deux groupes ont été comparées en utilisant le test de Mann-Whitney et celles qui existent entre les trois groupes ont été comparées par le test de Kruskal-Wallis (s'il est significatif, le test de comparaison multiple de Dunn a ensuite été utilisé). Pour la comparaison par paires, le test de Wilcoxon a été utilisé. Le test de corrélation de Spearman a été utilisé pour évaluer la corrélation entre les deux ensembles de données. Nous avons utilisé un ajustement logistique nominal de données pour des cas de paludisme (à savoir si oui ou non l'enfant a fait un épisode palustre). La régression de Cox a été utilisée pour le temps de premier épisode de paludisme et une analyse longitudinale pour le nombre d'épisodes de paludisme. Pour ces analyses de régression multivariée, l'âge (comme une variable continue), le type d'hémoglobine (HbAS ou non-HbAS) et le log10-transformées des unités d'ELISA ont été utilisés comme variables. Pour déterminer s'il y avait une interaction significative entre l'âge et le type d'hémoglobine sur le temps du premier épisode de paludisme, une analyse de régression de Cox a été réalisée avec l'âge, le type d'hémoglobine et le produit de ces deux variables. Les données ont été analysées à l'aide de Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) ou JMP8 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Les valeurs du $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

4.5. Variables mesurées

Nous avons mesuré les variables suivantes :

- ❖ **variables sociodémographiques** : âge, sexe et résidence ;
- ❖ **variables biologiques** : taux d'hémoglobine, type d'hémoglobine, groupe sanguin ABO/Rh, génotypes de l'alpha-thalassémie et taux d'anticorps IgG anti-AMA1, anti-MSP1, anti-EBA175 et anti-MSP2.

4.6. Considérations éthique et déontologique

Le protocole de recherche a été soumis à l'approbation des comités d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université des Sciences, des Techniques et Technologies de Bamako et des Instituts Nationaux de Santé des Etats-Unis d'Amérique. Nous avons également travaillé selon les bonnes pratiques de recherche clinique sur l'homme et selon les bonnes pratiques de laboratoire telles qu'énoncées dans les conventions internationales (déclaration d'Helsinki, Conférence internationale d'harmonisation des bonnes pratiques de recherche biomédicale).

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

Cette méthodologie nous a permis d'aboutir aux résultats suivants.

5. Résultats

Au total, nous avons inclus 206 enfants dans cette étude avec un sex ratio de 1,02 en faveur des filles. Le taux de portage du trait drépanocytose était de 35,4 % (73/206), de l'HbAC 14,6 % (30/206) et de % d'HbAA 50% % (103/206 ; tableau 3). Il n'existait pas assez d'enfants porteurs du déficit en G6PD pour les inclure dans l'analyser. Donc, nous n'avons pas inclus ces enfants dans notre étude.

Tableau 3 : Caractéristiques démographiques et polymorphismes érythrocytaires des enfants inclus dans l'étude, stratifiées par type d'hémoglobine

	HbAA (n = 103)	HbAS (n = 73)	HbAC (n = 30)	Valeur p
Age				0,996
3-5 ans	35	25	10	
6-8 ans	40	29	11	
9-11 ans	28	19	9	
Sex ratio (M/F)	51/52	40/33	14/16	0,692
Village				0,451
Kéniéroba	93	66	29	
Fourda	10	7	1	
Phénotype ABO				0,415
A	36	24	11	
AB	7	6	0	
B	20	16	4	
O	40	27	15	
Phénotype rhésus				0,563
Positive	93	69	28	
Négative	10	4	2	
Génotype G6PD-				0,556
Sauvage	92	64	23	
Hétérozygote	8	6	5	
Hémizygote	3	3	2	
Génotype α-3,7kb				0,335
Sauvage	77	53	22	
Hétérozygote	25	18	7	
Homozygote	1	0	1	
Nombre d'épisodes palustres	1,4 (1,2-1,7)	0,8 (0,6-1,0)	-	0,002

Les valeurs p ont été calculées en utilisant le test du chi carré. Les génotypes d'alpha-thalassémie pour deux enfants HbAS n'ont pas été déterminés.

HbAS est associée à un risque réduit de paludisme chez les enfants maliens

En mai 2009, nous avons identifié tous les enfants avec HbAS (n = 73) et avec HbAC (n = 30) d'une cohorte d'enfants vivant dans les deux villages de l'étude. Pour chaque enfant HbAS ou HbAC, nous avons inclus un enfant HbAA qui a été complètement apparié à l'âge. Le profil de polymorphisme des érythrocytes (c'est-à-dire phénotypes de l'antigène de groupe sanguin ABO/Rh, génotypes G6PD*A⁻ et α -globine 3,7kb) a été apparié aussi près que possible (tableau 3). Il n'y avait pas de différences significatives dans les caractéristiques démographiques et les polymorphismes érythrocytaires entre les groupes des enfants HbAA, HbAS et les enfants HbAC (tableau 3). Seuls quatre enfants (2 HbAA, 1 HbAS, 1 HbAC) avaient une parasitémie à *P. falciparum* asymptomatique (50-200/ μ l de sang total) lors de leur inscription. Un total de 206 enfants ont été suivis passivement pour déterminer le nombre d'épisodes de paludisme tout au long de la saison de transmission 2009 (1 juin 2009 au 31 janvier 2010). L'augmentation de l'âge et le portage de l'HbAS étaient significativement associés à un risque réduit de paludisme tel que mesuré par : (i) si oui ou non le paludisme a été retrouvé (figure 4A, p < 0,0001, figure 4B, p = 0,0203 en utilisant le test chi - carré), et (ii) le temps du premier épisode de paludisme (figure 4C, p = 0,0002 ; figure 4D, p = 0,0013 en utilisant le test du log-Rank). Les enfants HbAA et HbAC ne différaient pas de façon significative dans ces mesures du risque de paludisme.

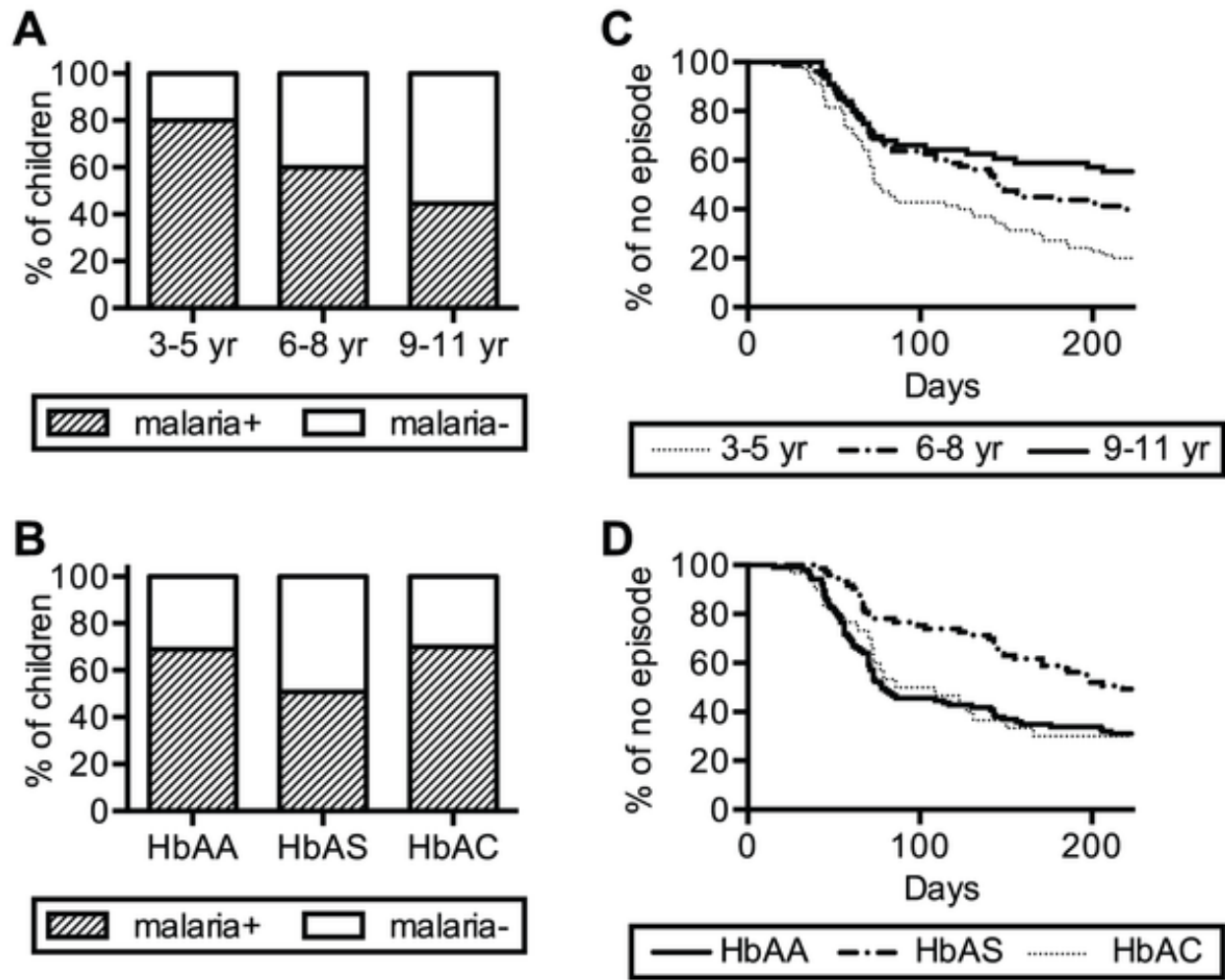


Figure 4 . L'augmentation de l'âge et le portage de l'HbAS protègent de manière significative les enfants de Kéniéroba contre le paludisme

Les figures (A & B) La proportion d'enfants qui ont vécu au moins un épisode de paludisme (malaria+) au cours de la saison de transmission 2009. Les enfants sont classés par âge (A) ou selon le type d'Hb (B). Les figures (C & D) sont l'analyse de survie du temps au premier épisode de paludisme. Les Courbes de Kaplan-Meier sont indiqués pour les enfants regroupés par âge (C) ou de selon le type d'Hb (D). L'augmentation de l'âge et le portage de l'HbAS étaient significativement associés à un risque réduit de paludisme tel que mesuré par si ou non le paludisme a été vécu (figure 4A, $p < 0,0001$, figure 4B, $p = 0,0203$; en utilisant le test chi-carré), ou du temps pour le premier épisode de paludisme (figure 4C, $p = 0,0002$; figure 4D, $p = 0,0013$; en utilisant le test du log-Rank).

L'HbAS est associé à des titres d'IgG spécifiques de l'antigène du mérozoïte au début de la saison de transmission

Pour déterminer si une meilleure immunité humorale a contribué à l'effet protecteur du trait drépanocytaire contre le paludisme, nous avons quantifié les titres d'IgG plasmatiques dirigées contre quatre antigènes du mérozoïte chez les enfants porteurs d'HbAA, d'HbAS et d'HbAC juste avant la saison de transmission (mai 2009). Dans toute la sous-cohorte d'enfants, nous avons trouvé de fortes corrélations ($r_s = 0,49$ à $0,67$, $p < 0,0001$) entre toutes les combinaisons de taux d'IgG spécifiques de l'antigène (figure 9). Les deux groupes plus âgés ont démontré des taux d'IgG spécifiques de l'antigène significativement plus élevés que dans le groupe d'âge le plus jeune, alors qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes plus âgés (figure 5). Comparés aux enfants HbAA, les enfants HbAS avaient des niveaux significativement plus faibles d'IgG spécifiques d'EBA175-MSP2 et avaient tendance à avoir des taux IgG - spécifiques inférieurs d'AMA1-MSP1 (figure 6). En revanche, aucun de ces taux d'IgG et ne différait entre les enfants HbAC et HbAA (Figure 6). Après ajustement pour l'âge et le type d'hémoglobine, d'autres polymorphismes érythrocytaires (c'est-à-dire, phénotypes ABO et Rh, G6PD*A⁻ et génotypes α -thalassémie-3,7 kb) n'étaient pas associés à des taux d'IgG spécifiques de l'antigène (données non présentées).

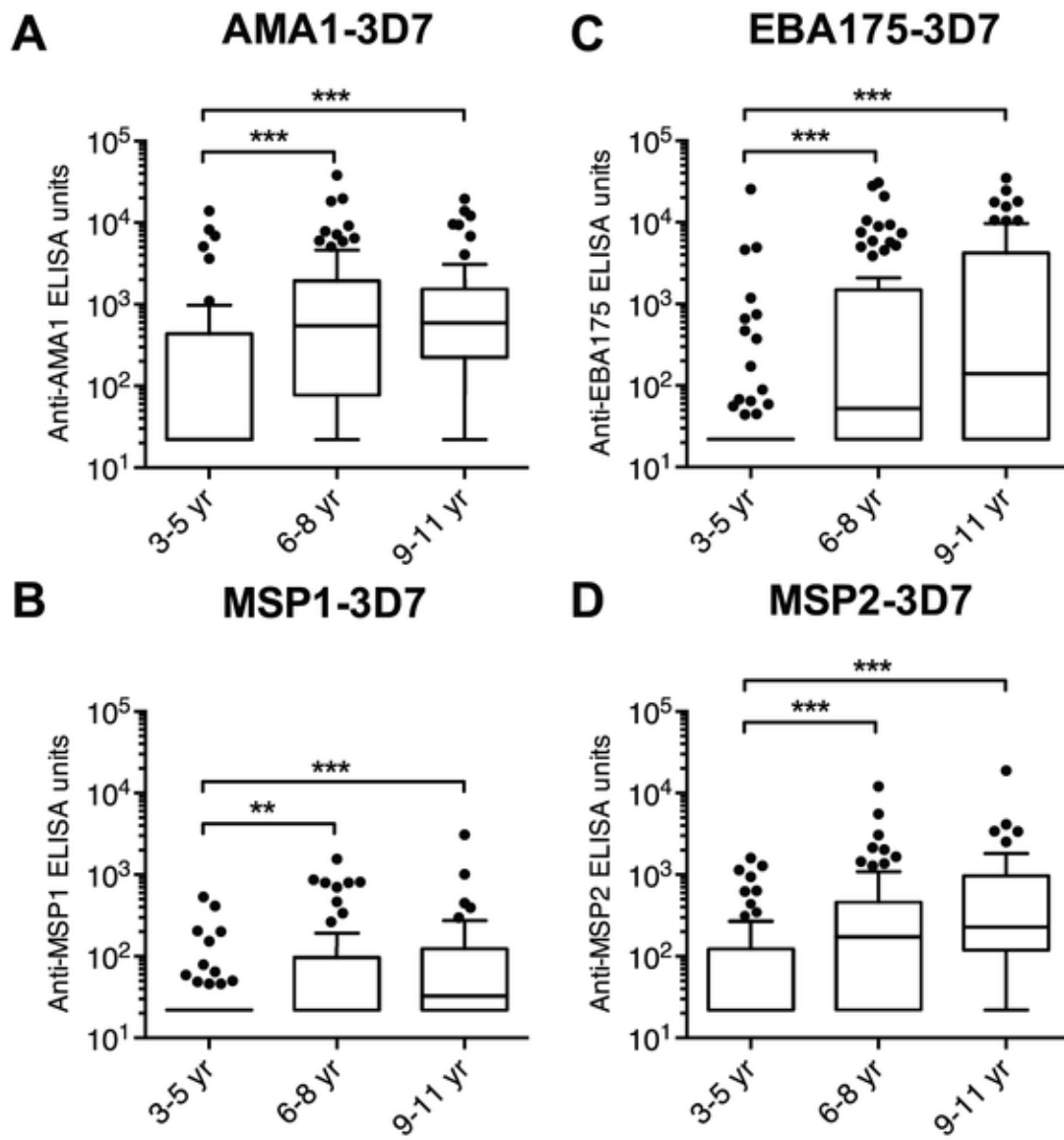


Figure 5. Taux d'IgG spécifiques de l'antigène mérozoïtes augmentent avec l'âge. Les points et les carres de taux d'IgG dans chaque groupe d'âge sont représentés. Les taux d'IgG contre AMA1-3D7 (A), MSP1-3D7 (B), EBA175-3D7 (C) et MSP2-3D7 (D) ont été quantifiés. Toutes les réponses en dessous de la limite de détection (44 unités ELISA) ont été affectées d'une valeur de 22 unités ELISA. Les taux d'IgG entre les trois groupes d'âge ont été comparés en utilisant un test de Kruskal-Wallis suivi par un test de comparaison multiple de Dunn lorsque statistiquement significatifs (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

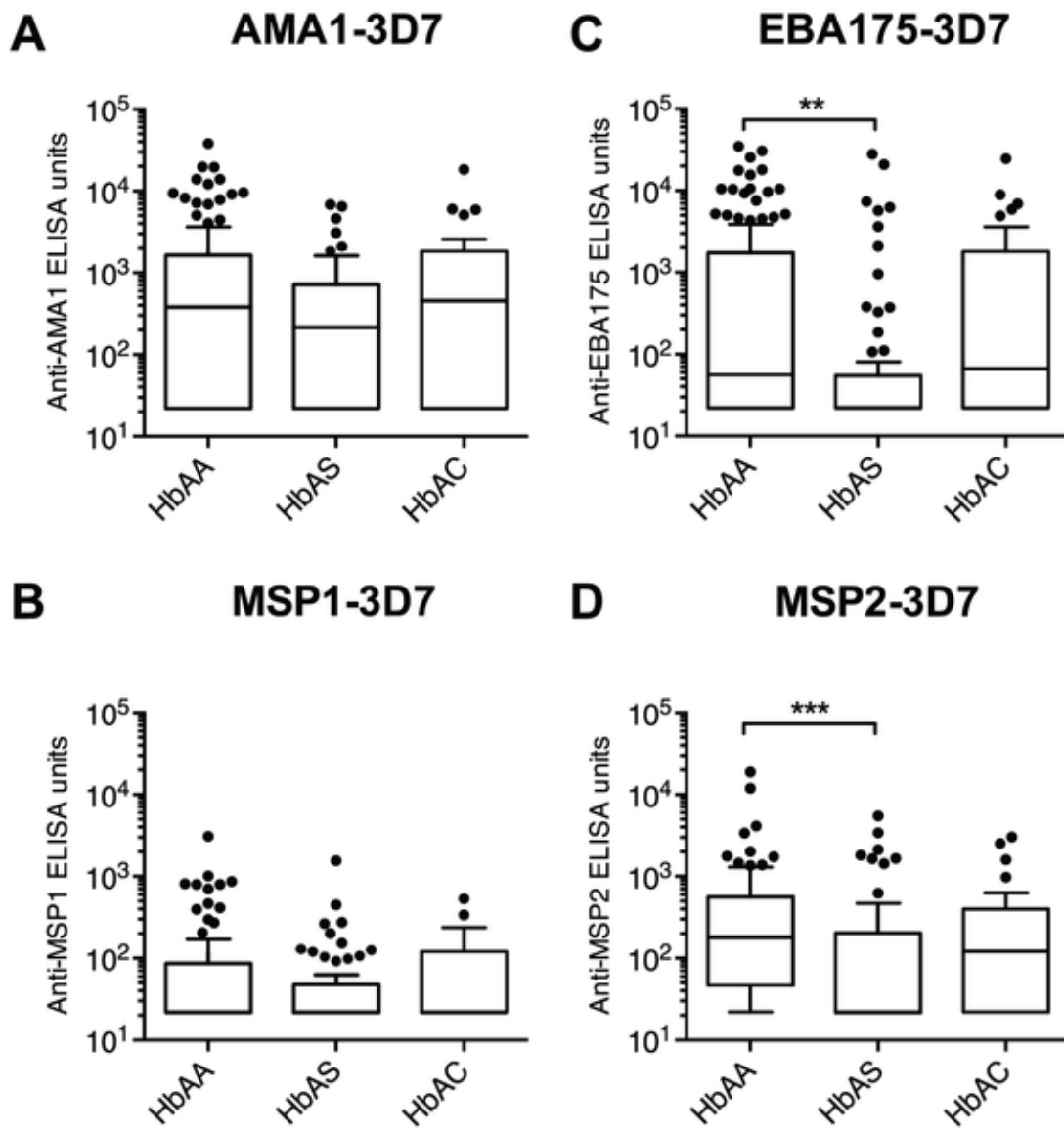


Figure 6. Taux d'IgG spécifiques de l'antigène du mérozoïte sont plus faibles chez les enfants HbAS

Les points et les carrés de taux d'IgG dans chaque groupe d'âge sont représentés. Les taux d'IgG contre AMA1-3D7 (A), MSP1-3D7 (B), EBA175-3D7 (C) et MSP2-3D7 (D) ont été quantifiés. Toutes les réponses en dessous de la limite de détection (44 unités ELISA) ont été affectées d'une valeur de 22 unités ELISA. Les taux d'IgG entre les trois groupes d'âge ont été comparés en utilisant un test de Kruskal-Wallis suivi par un test de comparaison multiple de Dunn lorsque statistiquement significatifs (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Pour déterminer si les enfants HbAS avaient de faibles taux d'IgG spécifiquement dirigés contre les antigènes du mérozoïte, nous avons quantifié les titres d'IgG spécifiques à l'anatoxine tétanique chez huit paires des enfants HbAA et HbAS choisis

au hasard et appariés dans chaque groupe d'âge (3-5, 6-8 et 9-11 ans). Nous n'avons pas trouvé de différences dans ces taux d'IgG entre les enfants HbAA et HbAS (données non présentées). Dans ces échantillons pairs de plasma HbAA et HbAS appariés, nous n'avons également constaté aucune différence dans la distribution de sous-classes d'IgG. Indépendamment du type Hb, l'IgG₁ était dominante pour AMA1, MSP1 et EBA175 ; l'IgG₃ était dominante pour MSP2 (figures 14 & 15). Les sous-classes d'anticorps IgG₂ et l'IgG₄ ont été détectés à des niveaux proches de fond pour les quatre antigènes du mérozoïte.

La fonctionnalité de l'anticorps a été évaluée par un test d'inhibition de croissance (GIA) en utilisant des IgG de la protéine G purifiée. Nous avons trouvé des corrélations significatives entre les niveaux d'IgG spécifiques de l'antigène et l'activité inhibitrice de croissance ($r_s = 0,27$ à $0,49$, $p < 0,0001$ pour AMA1, EBA175 et MSP2; $p = 0,0002$ pour MSP1). La médiane de l'activité inhibitrice de croissance des IgG purifiées a été de 23,0% (Inter percentile, IQR, 9,0 à 50,0) chez les enfants HbAS, 23,0% (IQR, 16,0 à 38,8) chez les enfants HbAC, et 36,0% (IQR, de 16,0 à 54,0) chez les enfants HbAA. La différence entre les trois types d'hémoglobine n'était pas significative ($p = 0,054$ par test de Kruskal-Wallis).

Le taux des IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte était inversement corrélé avec le risque de paludisme

Pour déterminer si les réponses IgG contre les antigènes du mérozoïte a contribué à la protection contre le paludisme dans notre sous-cohorte d'enfants, nous avons évalué les corrélations a la fois entre les données ELISA et GIA et le risque de paludisme. Dans l'analyse de régression multivariée, les enfants ont été classés soit comme HbAS ou non-HbAS (c'est-à-dire HbAA ou HbAC) car le risque de paludisme ne diffère pas entre les enfants HbAC et HbAA (Figure 4). Après ajustement pour l'âge et le type d'hémoglobine, seuls les taux d'IgG spécifiques à MSP2 et à MSP1 étaient inversement corrélés avec le risque de paludisme (à savoir si un épisode de paludisme a été observé, le temps de premier épisode de paludisme, ou le nombre d'épisodes de paludisme) lorsque tous les quatre taux d'IgG ont été analysés en même temps (tableau 4). L'activité d'IgG inhibitrice de croissance n'était pas corrélée avec la mesure du risque de paludisme après ajustement pour l'âge et le type Hb (données non présentées).

Tableau 4: Résultats de l'analyse de régression multivariée selon l'âge et le type d'Hb^a

Antigènes	Paludisme observé			Temps du premier épisode palustre			Nombre d'épisodes palustres		
	OR ^b	[95% IC]	P	HR ^c	[95% IC]	P	IRR _d	[95% IC]	P
AMA1-3D7	1,11	(0,66–1,92)	0,70	1,10	(0,82-1,47)	0,53	1,07	(0,87-1,33)	0,51
MSP1-3D7	0,41	(0,17-0,94)	0,03	0,45	(0,23-0,83)	0,01	0,59	(3,70-0,89)	0,01
EBA175-3D7	0,85	(0,53-1,37)	0,51	1,02	(0,76-1,37)	0,87	1,05	(0,85-1,30)	0,65
MSP2-3D7	0,49	(0,24-0,97)	0,04	0,59	(0,38-0,90)	0,01	0,63	(0,46-0,85)	0,002

Changements du taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte d'une saison de transmission à l'autre

Au début de la saison de transmission 2009, les enfants HbAS avaient des taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte inférieurs à ceux des enfants HbAA. Pour expliquer ce constat, nous avons émis l'hypothèse que ces taux d'IgG augmentent moins chez les enfants HbAS que chez les enfants HbAA au cours d'une saison de transmission. Pour tester cette hypothèse, nous avons recueilli des échantillons appariés de plasma des enfants HbAA (n = 97, 94,2% de ceux recueillis au mois mai 2009), des enfants HbAS (n = 68 ; 93,2%) et des enfants HbAC (n = 26 ; 86,7%) en décembre 2009. A cette époque, 18 enfants HbAA (18,6%), 12 enfants HbAS (17,6%) et 5 enfants HbAC (19,2%) avaient une parasitémie asymptomatique à *P. falciparum* (25 à 1875 parasites/ μ l de sang total). Les taux d'IgG à tous les quatre antigènes du mérozoïte ont été plus élevés en décembre 2009 par rapport à mai 2009 (p <0,001, tests de rang signé Wilcoxon-paires). L'augmentation de ces taux d'IgG ne diffère pas significativement selon le type d'Hb (Figure 7) et n'est corrélée avec le nombre d'épisodes de paludisme au cours de la saison de transmission 2009 (données non présentées).

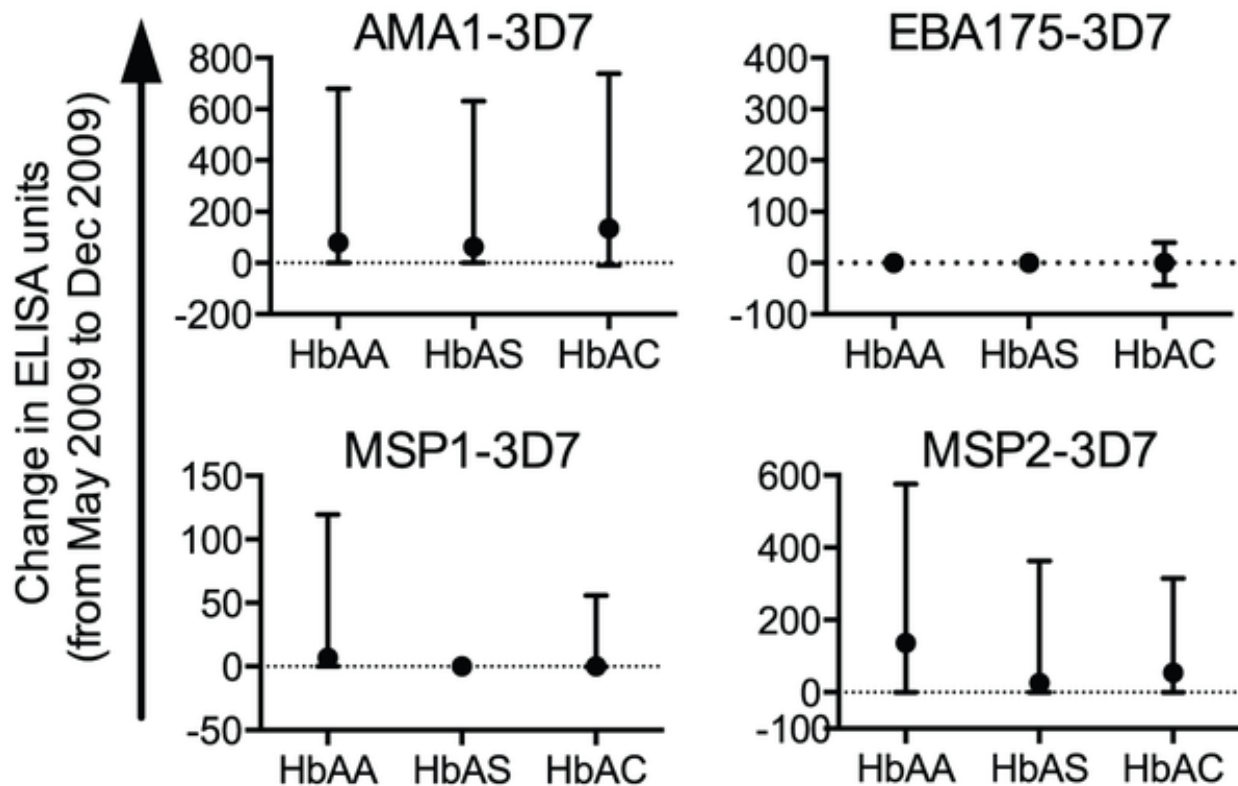


Figure 7. L'augmentation du taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte au cours d'une saison de transmission ne diffère pas selon le type d'hémoglobine

Pour chaque enfant, le changement du taux d'IgG de mai à décembre 2009 a été calculé pour chaque antigène (A, AMA1-3D7, B, MSP1-3D7, C, EBA175-3D7; D, MSP2-3D7). Toutes les valeurs en dessous de la limite de détection (44 unités ELISA) ont été affectées d'une valeur de 22 unités ELISA. La médiane et l'interquartile sont présentés. Les valeurs positives représentent l'augmentation du taux d'IgG à la fin de la saison de transmission. Le changement des taux d'IgG n'était pas significativement différent entre les trois types d'hémoglobine quelque soit l'antigène ($p > 0,05$ par le test de Kruskal-Wallis).

Pour approfondir la base du taux faible des IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte chez les enfants HbAS en mai 2009, nous avons émis l'hypothèse que ces taux d'IgG diminuent plus rapidement chez les enfants HbAS que chez les enfants HbAA au cours de la saison sèche. Pour tester cette possibilité, nous avons recueilli des échantillons paires de plasma des enfants HbAA ($n = 89$; 91,7% de ceux recueillis en mai 2009), HbAS ($n = 64$, 94,1%) et HbAC ($n = 27$, 86,7%) en mai 2010. A cette époque, aucun de ces enfants n'avait une parasitémie à *P. falciparum* détectable au microscope. Le taux des IgG contre les quatre antigènes du mérozoïte n'étaient pas significativement différents entre décembre 2009 et mai 2010 ($p > 0,05$). Ces changements dans les taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte ne diffèrent pas significativement selon le

type d'Hb (Figure 8). Pris ensemble, les données indiquent que les enfants de Kéniéroba augmentaient chaque année leurs taux d'IgG anti-mézoïtes pendant la saison de transmission et maintenaient ces taux d'anticorps tout au long des 5 mois de la saison sèche.

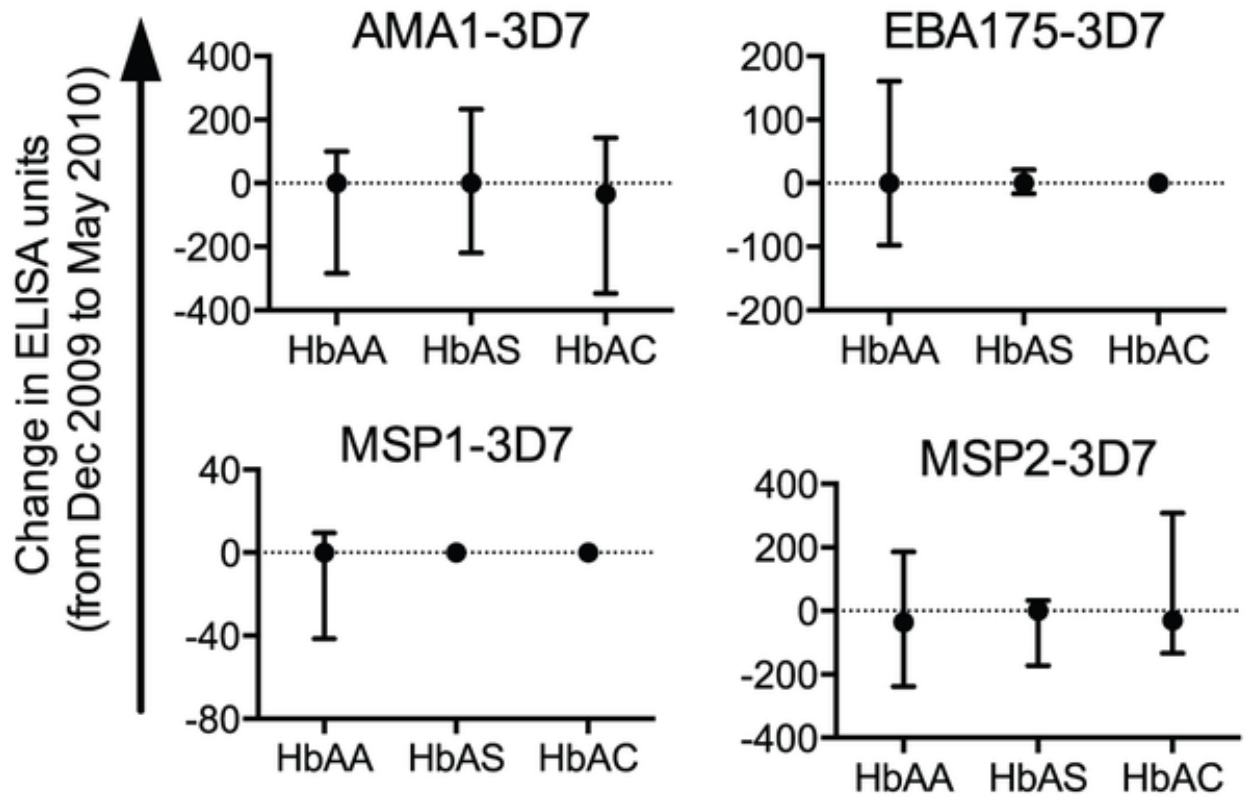


Figure 8. Le taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte ne diminue pas au cours de la saison sèche, indépendamment du type d'Hb

Pour chaque enfant, le changement du taux d'IgG de mai à décembre 2009 a été calculée pour chaque antigène (A, AMA1-3D7, B, MSP1-3D7, C, EBA175-3D7; D, MSP2-3D7). Toutes les valeurs en dessous de la limite de détection (44 unités ELISA) ont été affectées d'une valeur de 22 unités ELISA. La médiane et l'interquartile sont présentés. Les valeurs positives représentent l'augmentation du taux d'IgG à la fin de la saison de transmission. Le changement des taux d'IgG n'était pas significativement différent entre les trois types d'hémoglobine quelque soit l'antigène ($p > 0,05$ par le test de Kruskal-Wallis).

Dans la sous-cohorte entière, nous avons également comparé les taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte à trois périodes différentes. Il y avait de fortes corrélations positives ($r_s = 0,59-0,89$, $p < 0,0001$) entre ces taux d'IgG en mai et en décembre 2009 (figures 9A-D) et en mai 2009 et mai 2010 (figures 9E-H). Ces données suggèrent que les enfants ayant des taux relativement faibles des IgG anti-mézoïtes dans la population de l'étude au mois de mai 2009 sont resté faibles (et les enfants

ayant des taux élevés sont resté élevés) tout au long de l'année de la période de l'étude, alors qu'il y avait une augmentation significative au cours de la saison de transmission.

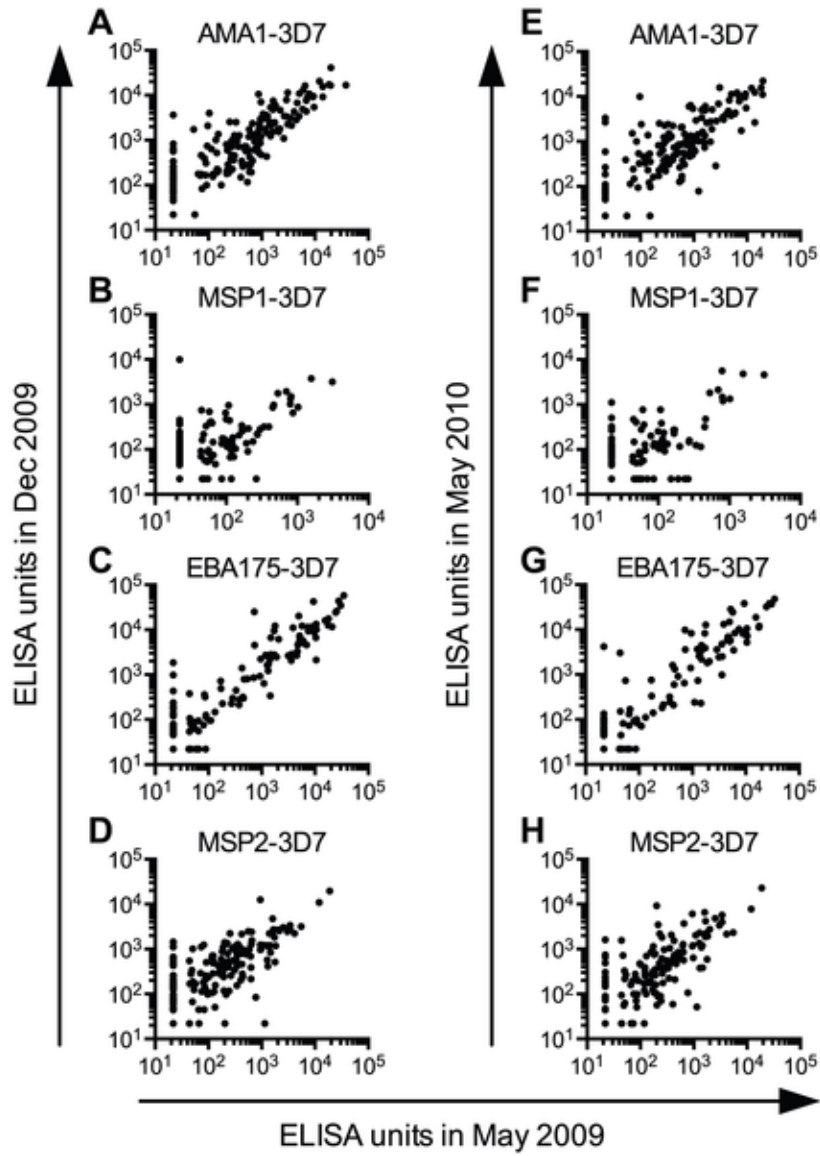


Figure 9. Corrélations significatives entre les taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte à trois mesures différentes dans le temps

Le taux des IgG en mai 2009 sont tracés contre le taux des IgG en décembre 2009 (A-D) et en mai 2010 (E-H). Chaque point représente les données d'un seul enfant. Le taux des IgG plasmatiques aux quatre antigènes du mérozoïte (A et E, AMA1-3D7 ; B et F,

MSP1-3D7 ; C et G, EBA175-3D7 ; D et H, MSP2-3D7) sont corrélées. Toutes les valeurs en dessous de la limite de détection (44 unités ELISA) ont été affectées d'une valeur de 22 unités ELISA. Toutes les corrélations indiquées sont significatives ($p < 0,001$ selon le test de rang de Spearman).

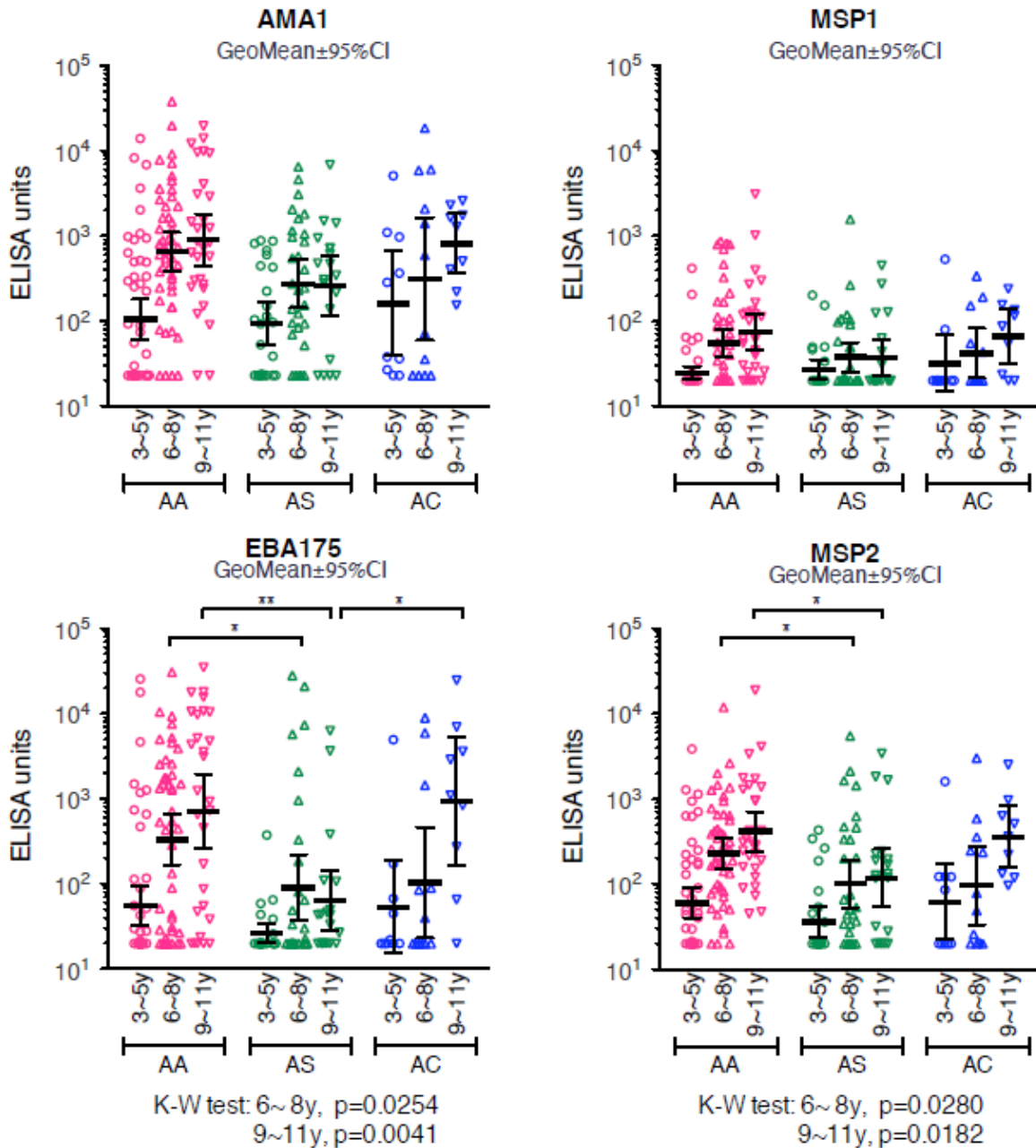


Figure 10. Titre des anticorps dirigés contre les antigènes du mérozoïte en mai 2009 selon le type d'hémoglobine (AA, AS et AC) et les groupes d'âge

Le taux des IgG en mai 2009 sont présentés selon les groupes d'âges et les types d'hémoglobine (AA, AS et AC). Chaque point représente les données d'un seul enfant. Il existe une différence statistiquement significative entre du titres des anticorps IgG plasmatiques parmi les trois types d'hémoglobine pour EBA175 et MSP2 mais pas pour AMA1 et MSP1. De même, aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans le groupe d'âge de 3-5 ans. Dans la catégorie des enfants de 6 à 8 ans, le titre des anticorps anti-EBA175 et anti-MSP2 des enfants ayant HbAA sont supérieurs à ceux des enfants ayant HbAS qui ont des titres similaires aux enfants HbAC. Cependant, chez les 9-11 ans, le titre des anticorps anti-EBA175 et anti-MSP2 sont identiques entre les enfants HbAA et HbAC qui sont supérieurs à ceux des enfants HbAS. Les barres horizontales représentent la moyenne géométrique avec son intervalle de confiance à 95%. Toutes les valeurs en dessous de la limite de détection (44 unités ELISA) ont été affectées d'une valeur de 22 unités ELISA.

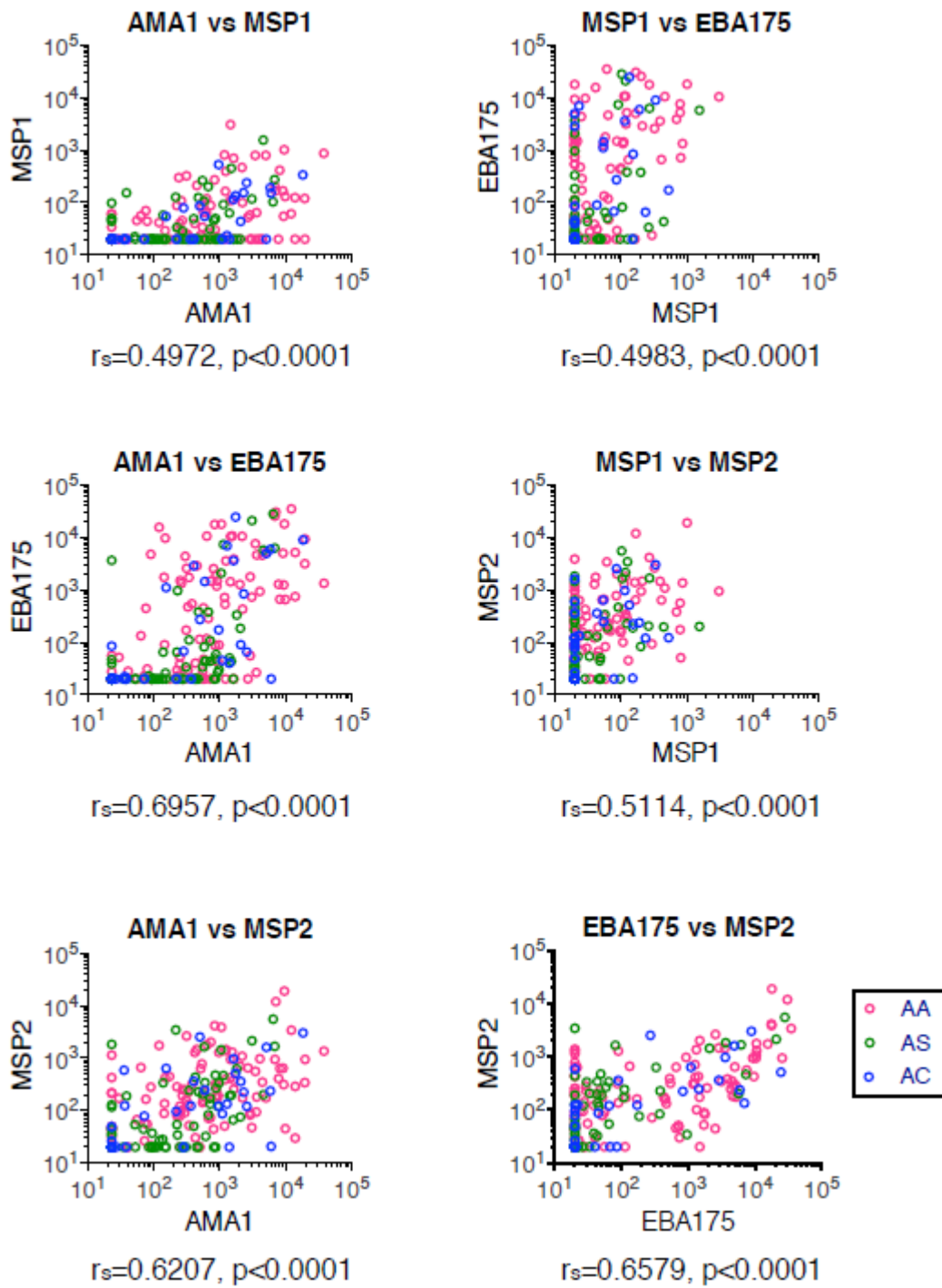


Figure 11. Titre croisés des anticorps dirigés contre les antigènes du mérozoïte en mai 2009 à la technique ELISA

Les taux croisés des IgG contre les quatre antigènes du mérozoïtes sont présentés. Chaque point représente les données d'un seul enfant. Les taux des IgG plasmatiques aux quatre antigènes du mérozoïte sont corrélés. Un enfant qui a des titres IgG élevés contre un antigène a tendance à avoir des titres élevés aux trois autres antigènes. Toutes les valeurs en dessous de la limite de détection (44 unités ELISA) ont été affectées d'une valeur de 22 unités ELISA. Toutes les corrélations indiquées sont significatives ($p < 0,0001$ selon le test de rang de Spearman).

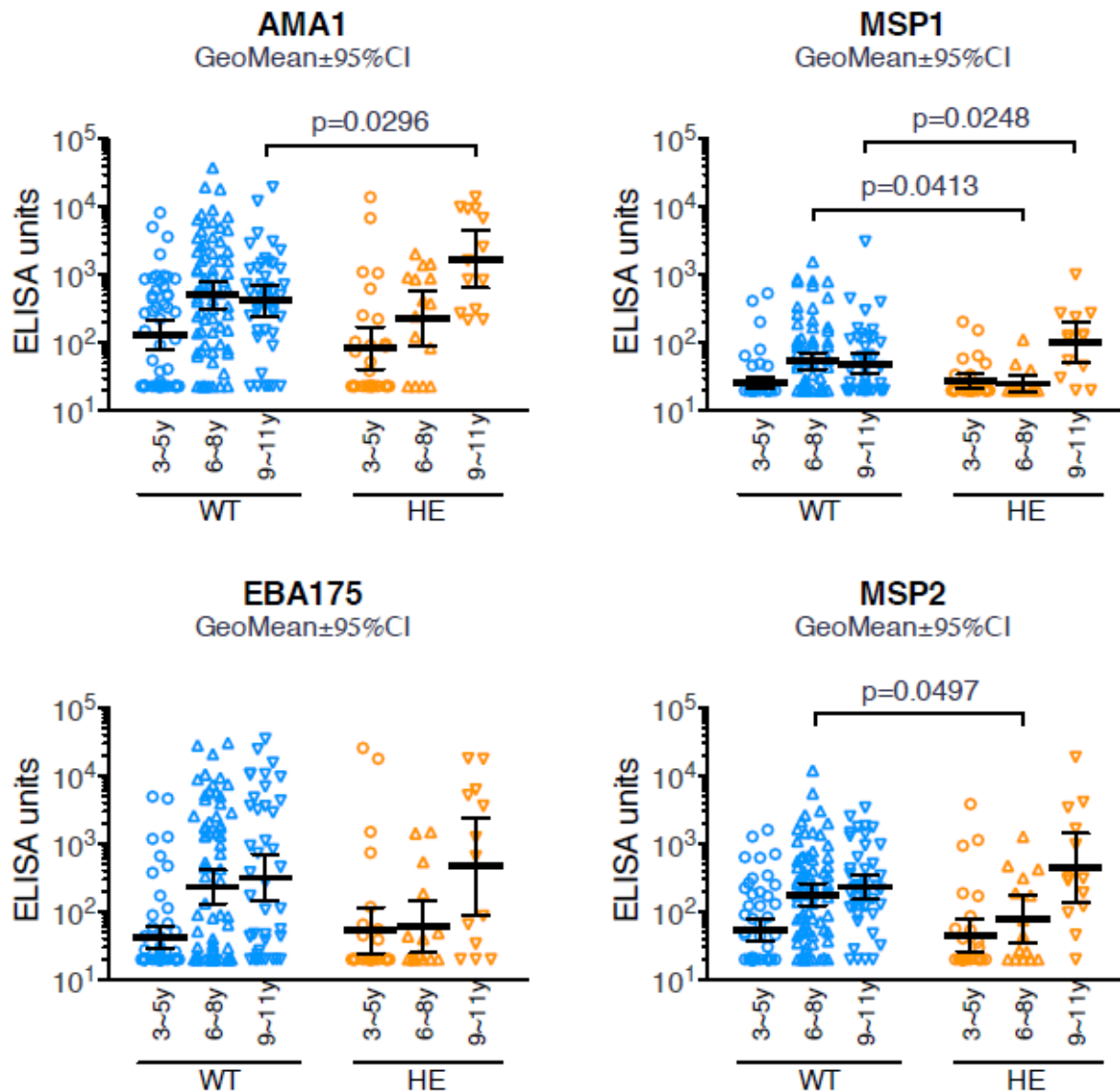


Figure 12. Titre des anticorps dirigés contre les antigènes du mérozoïte en mai 2009 selon les génotypes d'alpha-thalassémie et les groupes d'âge

Il existe une différence statistiquement significative des titres des anticorps IgG au mois de mai 2009 entre les génotypes d'alpha thalassémie sauvage et hétérozygote pour les antigènes AMA1, MSP1, MSP2 mais pas pour EBA175.

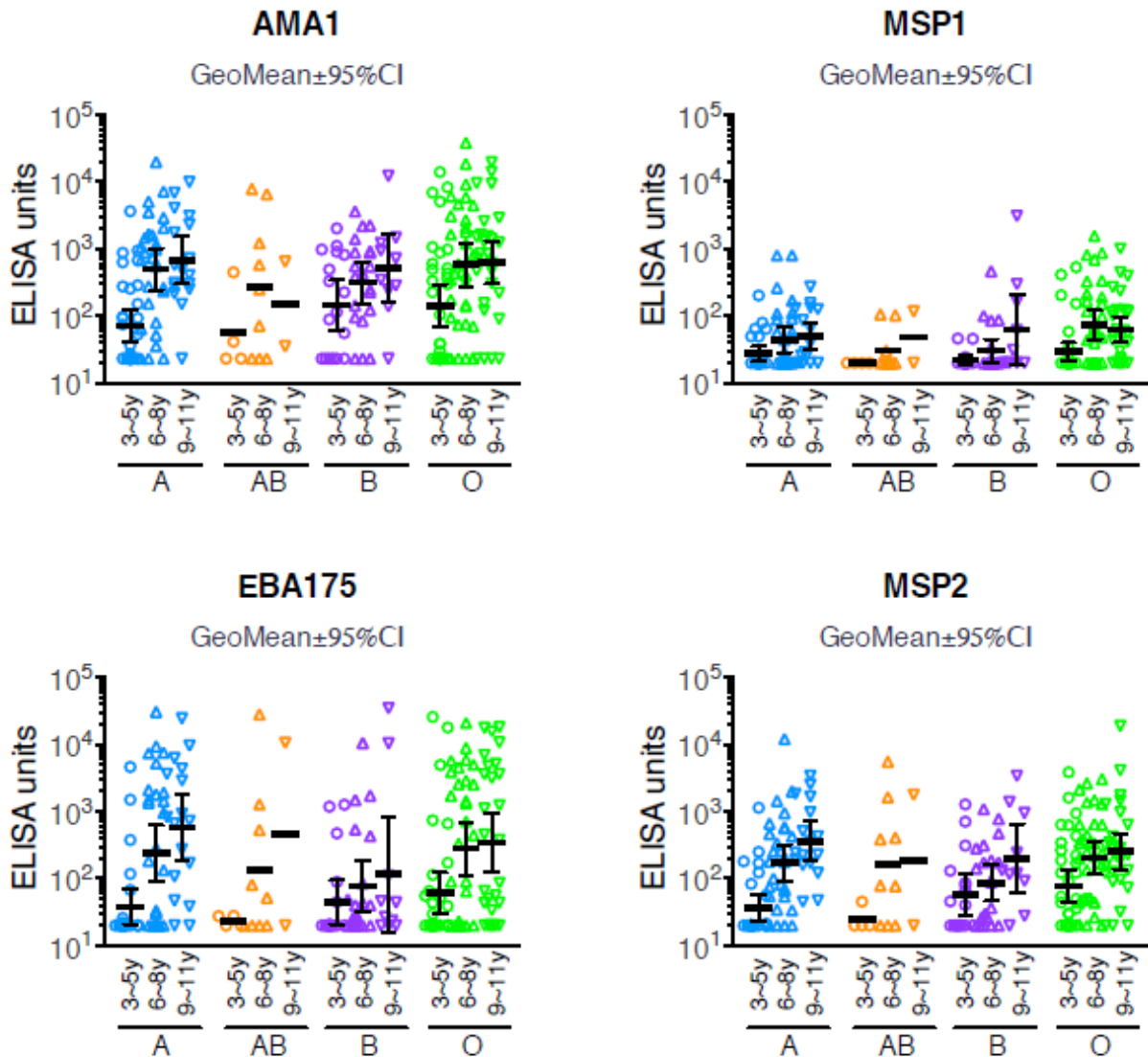


Figure 13. Titre des anticorps dirigés contre les antigènes du mérozoïte en mai 2009 selon le phénotype du groupe sanguin ABO et les groupes d'âge

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les titres des anticorps IgG parmi les phénotypes du groupe sanguin ABO en fonction des différentes catégories d'âge.

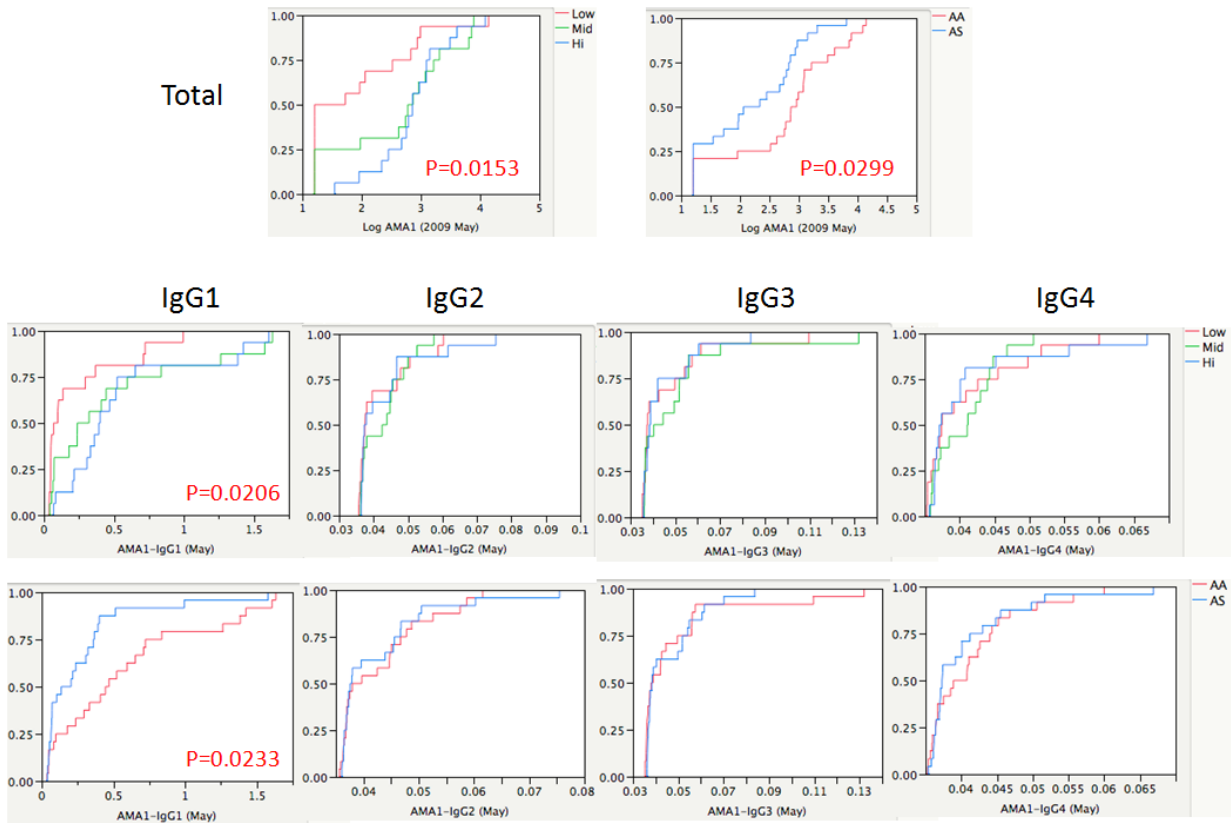


Figure 14. Titre des anticorps anti-AMA-1 chez les enfants de Kénieroba en mai 2009

Le titre global des anticorps IgG anti-AMA1 est inférieur chez les enfants HbAS comparés aux enfants HbAA. Cette différence est statistiquement significative pour le sous-groupe IgG1 ($p < 0,05$).

Relation entre le trait drépanocytaire et l'immunité humorale antipalustre chez les enfants Maliens

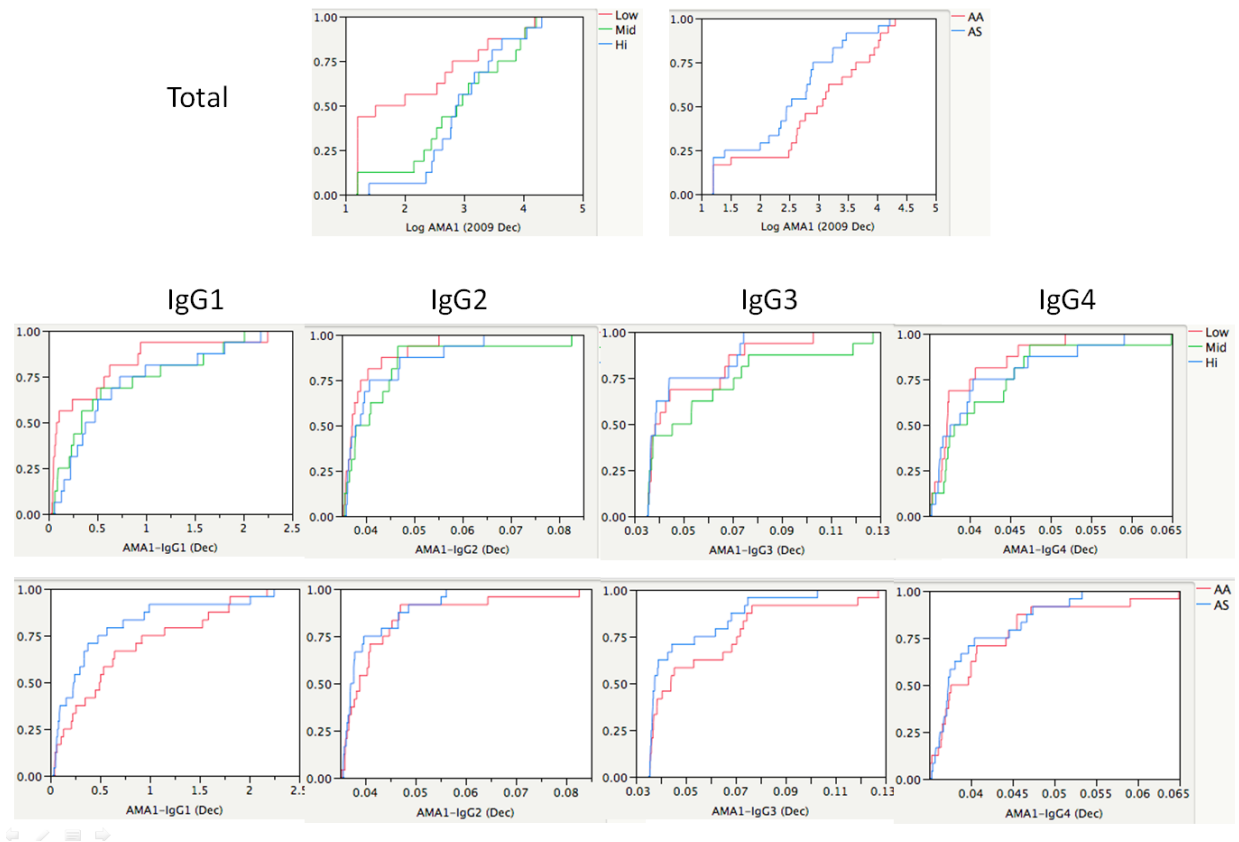


Figure 15. Titre des anticorps anti-AMA-1 chez les enfants de Kéniéroba en décembre 2009

Le titre global des anticorps IgG anti-AMA1 est inférieur chez les enfants HbAA comparés aux enfants HbAA. Il n'existait aucune différence statistiquement significative selon les sous-groupes IgG (IgG1 à IgG4).

Relation entre le trait drépanocytaire et l'immunité humorale antipalustre chez les enfants Maliens

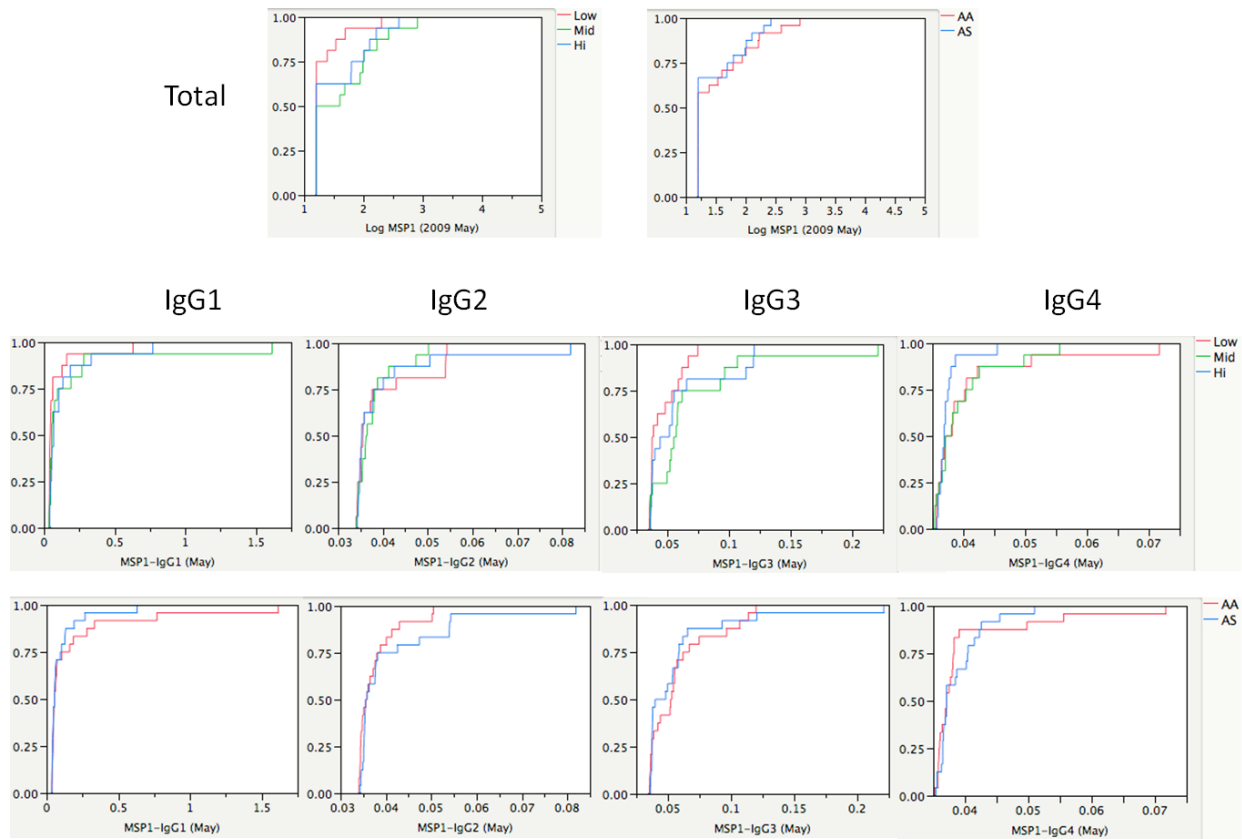


Figure 16. Titre des anticorps anti-MSP1 chez les enfants de Kénieroba en mai 2009

Il n'existe aucune différence entre les enfants HbAA et HbAS dans le titre global des anticorps IgG anti-MSP1 et cela quelque soit le sous-groupe d'IgG.

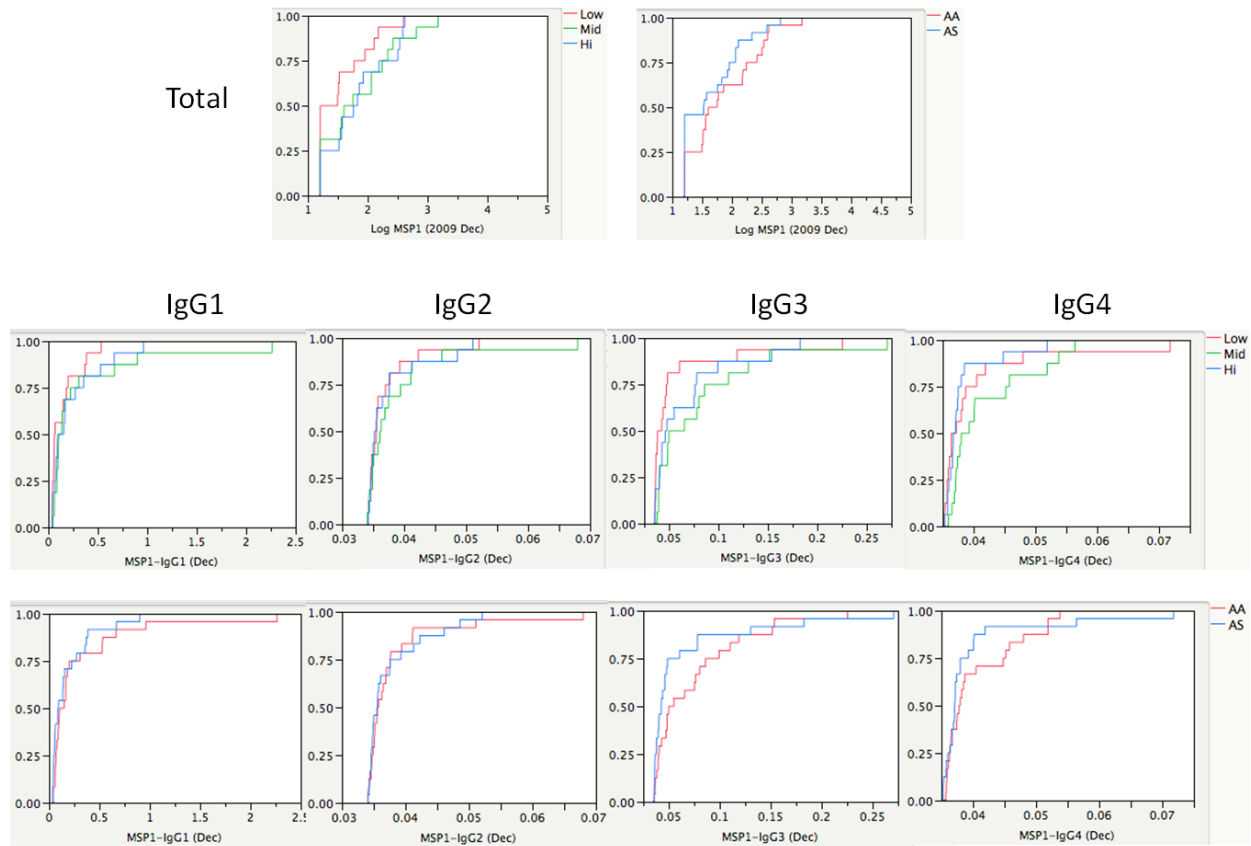


Figure 17. Titre des anticorps anti-MSP1 chez les enfants de Kéniéroba en décembre 2009

Il n'existe aucune différence entre les enfants HbAA et HbAS dans le titre global des anticorps IgG anti-MSP1 et cela quelque soit le sous-groupe d'IgG.

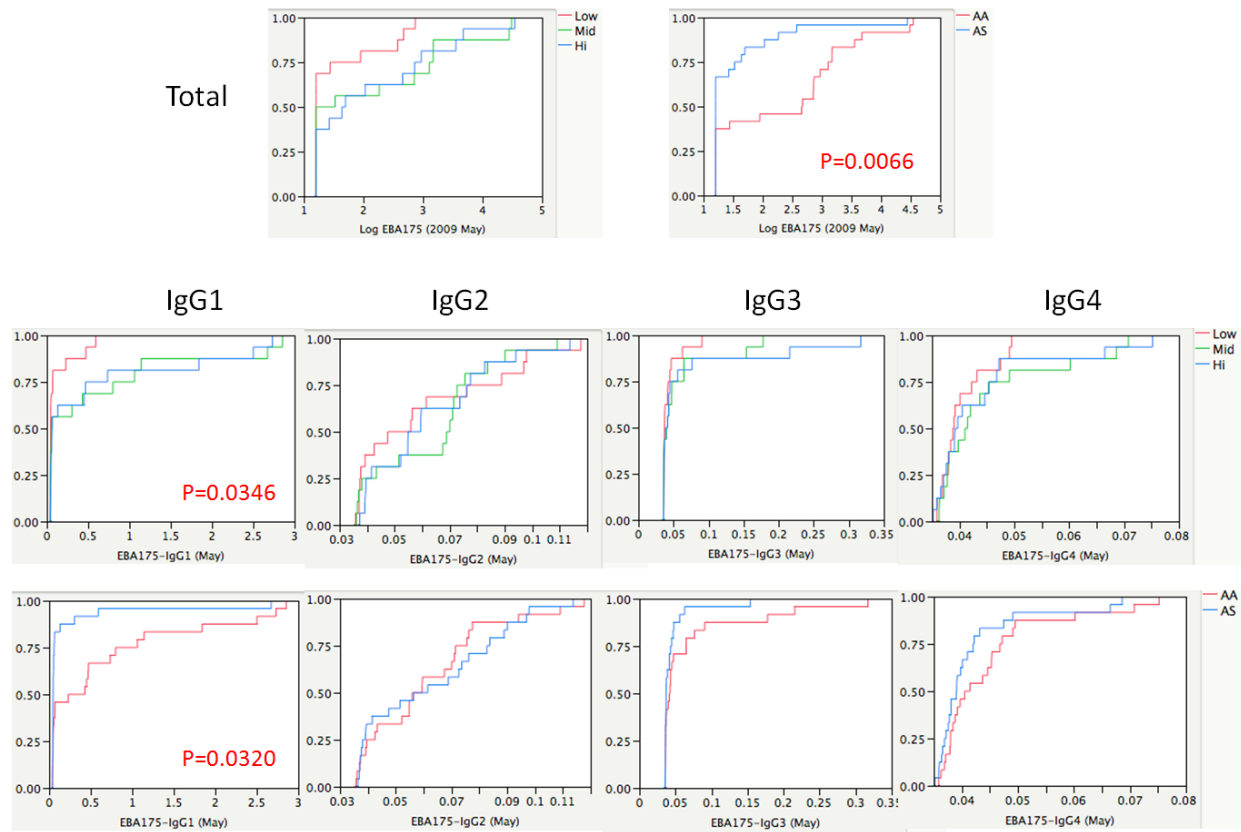


Figure 18. Titre des anticorps anti-EBA175 chez les enfants de Kénieroba en mai 2009

Le titre global des anticorps IgG anti-EBA175 est inférieur chez les enfants HbAS comparés aux enfants HbAA. Cette différence est statistiquement significative pour le sous-groupe IgG1 ($p < 0,05$).

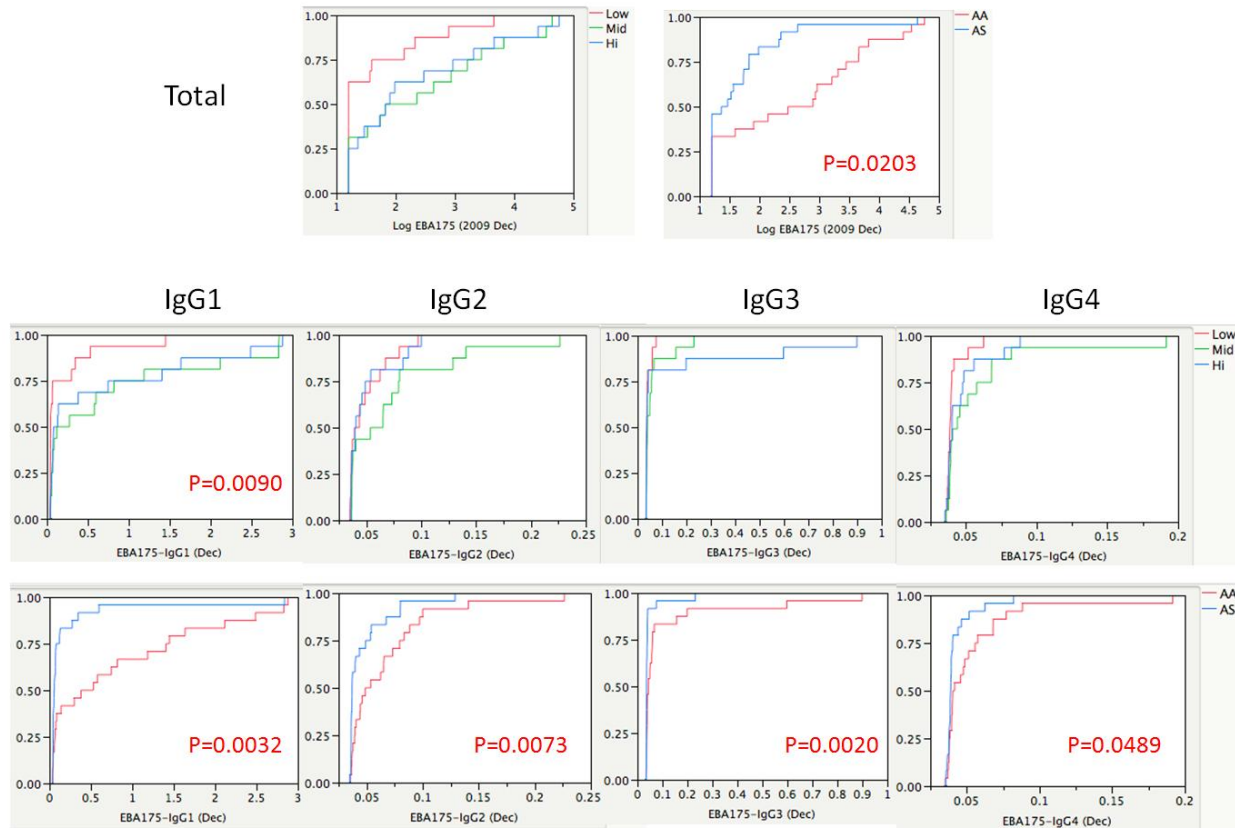


Figure 19. Titre des anticorps anti-EBA175 chez les enfants de Kénieroba en décembre 2009

Le titre global des anticorps IgG anti-EBA175 est inférieur chez les enfants HbAS comparés aux enfants HbAA. Cette différence est statistiquement significative pour les 4 sous-groupes d'IgG (IgG1 à IgG4 ; $p < 0,05$).

Relation entre le trait drépanocytaire et l'immunité humorale antipalustre chez les enfants Maliens

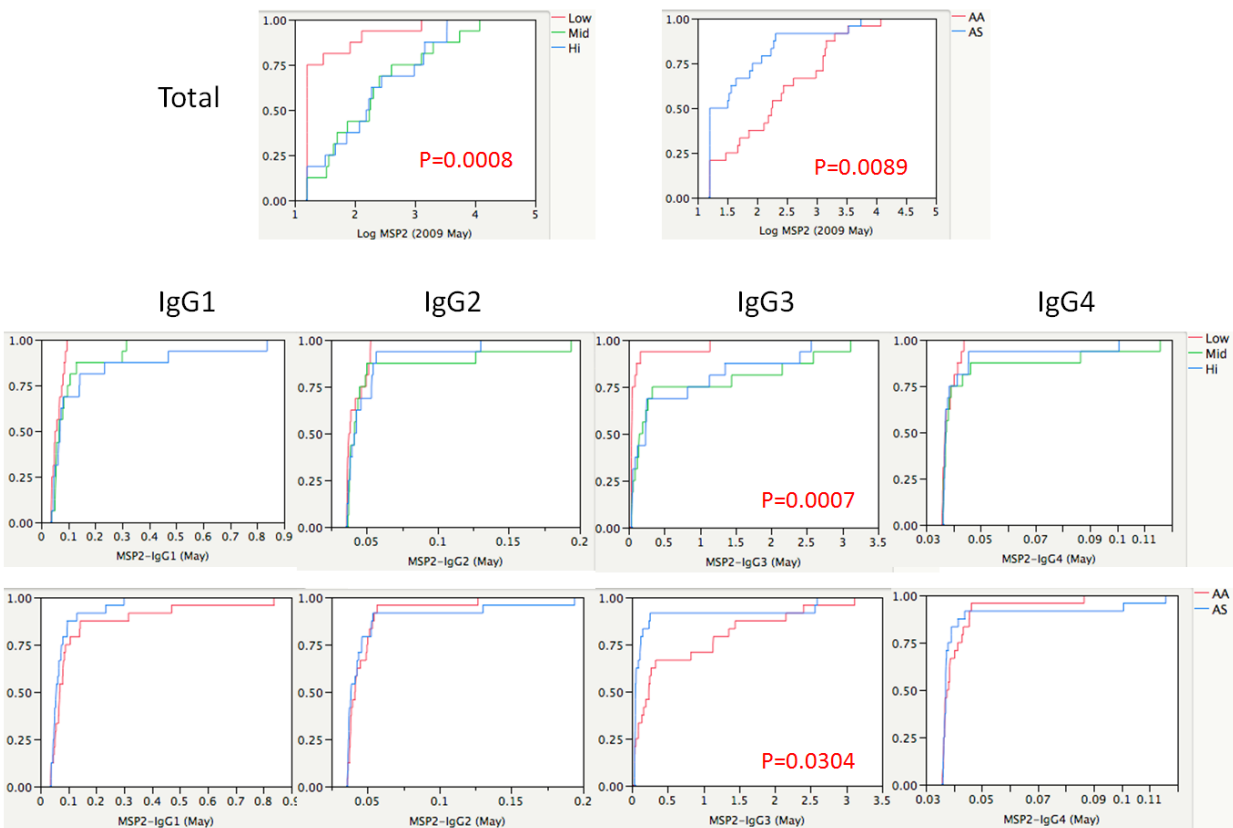


Figure 20. Titre des anticorps anti-MSP2 chez les enfants de Kénieroba en mai 2009

Le titre global des anticorps IgG anti-EBA175 est hautement inférieur chez les enfants HbAS comparés aux enfants HbAA. Cette différence est statistiquement significative pour le sous-groupe IgG3 ($p < 0,05$).

Relation entre le trait drépanocytaire et l'immunité humorale antipalustre chez les enfants Maliens

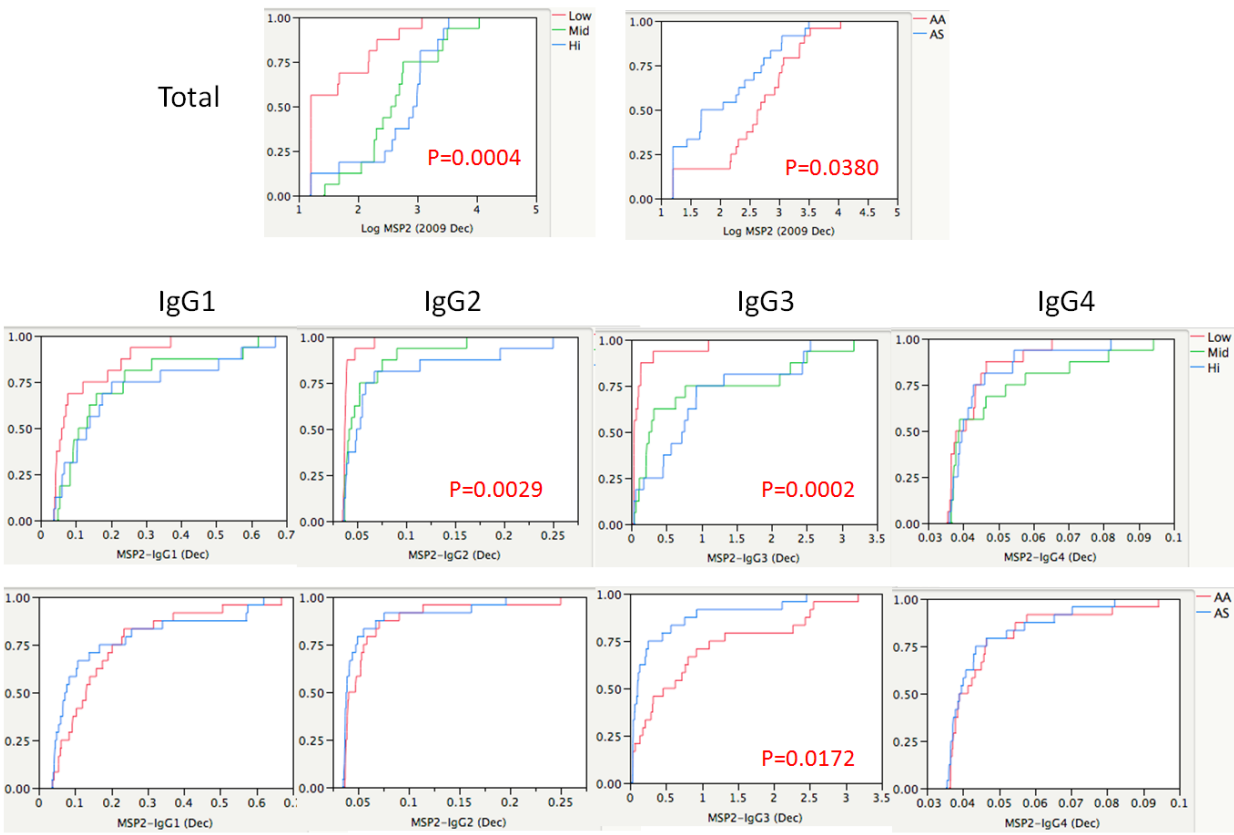


Figure 21. Titre des anticorps anti-MSP2 chez les enfants de Kénieroba en décembre 2009

Le titre global des anticorps IgG anti-EBA175 est hautement inférieur chez les enfants HbAS comparés aux enfants HbAA. Cette différence est statistiquement significative pour le sous-groupe IgG3 ($p < 0,05$).

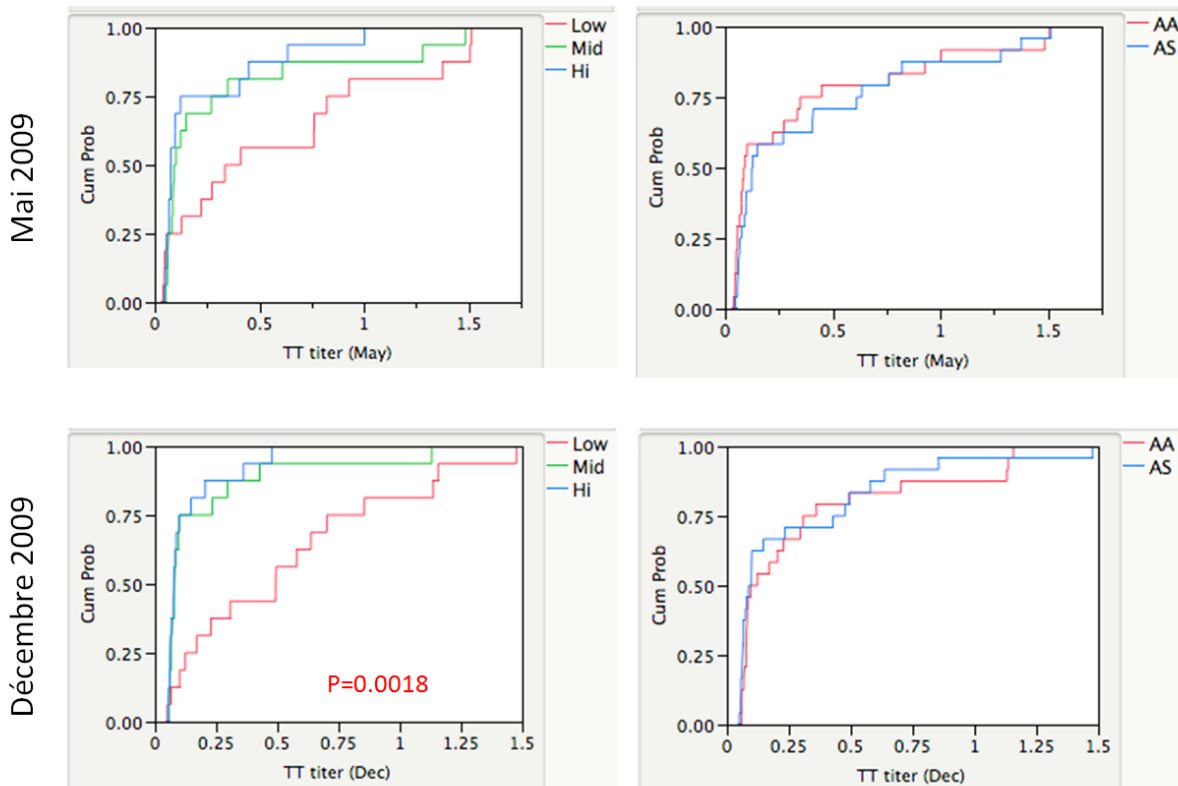


Figure 22. Titre des anticorps anti-tétanos chez les enfants de Kénieroba en mai et décembre 2009

Il n'existe aucune différence entre les enfants HbAA et HbAS dans le titre des anticorps IgG anti-tétanos chez les enfants de Kénieroba.

Après ces résultats obtenus, nous pouvons maintenant les commenter et les discuter en fonction d'autres travaux portant sur le même thème.

6. Commentaires et discussion

Les études antérieures portant sur l'effet des hémoglobines HbAS et HbAC sur le développement des réponses IgG spécifiques de *P. falciparum* ont produit des résultats contradictoires. Certaines études ont démontré que les enfants HbAS ont des titres IgG supérieurs [136, 137], similaires [138-140], ou inférieurs [141, 142] contre les antigènes de *P. falciparum* que les enfants HbAA. Des données contradictoires ont également été signalées chez les enfants HbAS à l'intérieur des études individuelles, dépendant des antigènes utilisés [6], des sous-classes d'IgG mesurées [143, 144] et des situations épidémiologiques étudiées [145]. D'autres études ont démontré que les enfants HbAC ont des réponses IgG similaires [140] ou augmentées [145] contre les antigènes de *P. falciparum* par rapport aux enfants HbAA. Celles-ci suggèrent que l'effet des mutations de la β -globine sur la réponse humorale aux antigènes du mérozoïte peut être modifié par d'autres facteurs de l'hôte (par exemple, enfants ou adultes, etc.), par les facteurs environnementaux (par exemple, l'endémicité du paludisme, etc.) et/ou les antigènes utilisés dans le dosage. En utilisant des tests ELISA et de GIA hautement standardisés, nous avons démontré que les enfants HbAS avaient des taux d'IgG inférieurs aux antigènes EBA175 et MSP2 et un risque réduit de paludisme à *P. falciparum*, par rapport aux enfants HbAA. Les enfants HbAS avaient également des taux d'IgG plus faibles aux antigènes AMA1 et MSP1, mais ceux-ci ne diffèrent pas significativement de ceux des enfants HbAA. Ces données suggèrent que l'HbAS ne confère pas de protection contre le paludisme dans la population étudiée en améliorant les réponses IgG contre les antigènes du mérozoïte.

Alors que nous avons mesuré les taux d'IgG seulement contre quatre antigènes du mérozoïte, les fortes corrélations entre ces taux d'IgG chez les enfants donnent à penser que les enfants HbAA et HbAS diffèrent dans leur exposition aux antigènes de *P. falciparum* en général. Choléra et al. ont rapporté que le taux de la protéine membranaire érythrocytaire 1 de *P. falciparum* (PfEMP1) est plus bas à la surface des érythrocytes HbAS comparativement aux érythrocytes HbAA [146]. En tenant compte des études sur l'affichage anormal de PfEMP1/*knob* à la surface des érythrocytes HbAS et HbAC parasités [102, 146, 147], nous sommes entrain d'évaluer également les réponses d'anticorps contre les protéines à la surface des hématies parasitées dans une étude distincte [148]. Si l'HbAS provoque des changements quantitatifs ou qualitatifs des antigènes du mérozoïte exposés au système immunitaire lors de l'invasion des érythrocytes, ces changements peuvent expliquer les faibles taux d'IgG contre les antigènes du mérozoïte chez les enfants HbAS. Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'a encore comparé les taux des antigènes à la surface du mérozoïte libérés des érythrocytes HbAS, HbAC et HbAA parasités. Tour à tour, certaines études ont indiqué que la densité parasitaire chez les enfants HbAS était inférieure à celle chez les enfants HbAA [5, 9, 144]. La charge parasitaire faible chez les enfants HbAS peut réduire la quantité d'antigènes présentés au système immunitaire, entraînant une baisse des titres d'IgG. Cependant, une étude a démontré aucune différence de la densité parasitaire entre les enfants HbAS et HbAA [149] et dans une autre étude, une différence de la densité parasitaire n'a été observée que chez les enfants d'un certain âge [141]. Une enquête plus approfondie est nécessaire

pour expliquer les faibles taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte chez les enfants HbAS dans notre population d'étude

Les observations que les titres d'IgG à un seul antigène peuvent corrélérer de façon significative avec la protection clinique dans une étude, mais pas dans une autre [150], suggèrent que l'effet antipaludique des réponses IgG est modifié par des facteurs de l'hôte et du parasite. Pour mieux évaluer les relations entre les taux d'IgG et le risque du paludisme, il est important de tenir compte de l'effet protecteur des variants d'Hb du paludisme simultanément dans la même population de l'étude. Cependant, peu d'études longitudinales ont recueilli des données immunologiques et cliniques à la fois chez les enfants HbAS et HbAA dans la même situation épidémiologique [141, 149]. Étant donné que ces études n'ont pas rapporté des corrélations entre les réponses immunologiques et les résultats cliniques, la contribution des réponses immunitaires spécifiques sur l'immunité antipaludique mesurées lors de ces études dans les populations spécifiques est difficile à évaluer. Par exemple, le titre anti-MSP1 mesuré dans une étude pourrait ne pas contribuer à l'immunité clinique dans la population particulière d'étude. Dans cette étude, nous avons mesuré les données immunologiques et cliniques, puis démontré que les enfants HbAS avaient significativement des titres plus faibles MSP2 que les enfants HbAA, tandis que le niveau élevé d'anticorps anti-MSP2 réduit significativement le risque de paludisme après ajustement pour l'âge et le type d'hémoglobine dans la même population de l'étude.

Les études antérieures ont suggéré une contribution de l'immunité acquise à la protection chez les enfants HbAS, mise en évidence par l'observation que le niveau de protection contre le paludisme augmente avec l'âge à une plus grande cadence chez les enfants HbAS que chez les enfants HbAA [4, 9]. Dans la présente étude, nous avons examiné si l'âge réduit le risque de paludisme au même titre que les hémoglobines HbAS et HbAA (données non présentées). Lorsque nous avons effectué une analyse de régression de Cox (avec le temps de premier épisode de paludisme) en utilisant l'âge, le type d'hémoglobine et le produit croisé de ces deux variables, le produit croisé n'a eu aucune incidence significative ($p = 0,345$). Aucune des études précédentes, qui impliquaient un très grand nombre (1054 [4] ou 601 [9]) d'enfants et des périodes plus longues (~ 2 années [4] ou 18 mois [9]) d'observation ont démontré des interactions statistiquement significatives entre l'âge et le type d'Hb. Identifier les composants putatifs de l'immunité acquise qui contribuent à la protection contre le paludisme par l'HbAS peut ainsi exiger même des données plus grandes. D'autres études sont nécessaires pour savoir si les réponses IgG contre les antigènes supplémentaires et d'autres composants de l'immunité acquise expliquent en partie la protection contre le paludisme conférée par l'HbAS.

Dans cette étude, les enfants HbAC et HbAA ne diffèrent pas dans le risque de paludisme ou du taux d'IgG contre les quatre antigènes du mérozoïte. Il y avait relativement peu d'enfants HbAC ($n = 30$) que d'enfants HbAS ($n = 73$) dans notre d'étude, ce qui pourrait réduire la puissance de détecter les différences entre les enfants HbAC et HbAA. Cependant, nous n'avons pas vu de tendance (par exemple,

moins d'épisodes palustres, faible taux d'IgG) chez les enfants HbAC. En outre, puisque les effets de l'HbAC sur le risque de paludisme [3, 5, 12-16] et sur les titres d'anticorps [140, 145] varient considérablement entre les études, nos résultats ne sont pas surprenants. Alors que certaines études ont trouvé des corrélations significatives entre les données du test d'inhibition de croissance (GIA) et le risque de paludisme [151, 152], notre étude n'a pas trouvé de telles corrélations. Cette contradiction apparente peut être expliquée en partie par la variation de l'incidence du paludisme, de la prévalence de variants d'hémoglobine et les niveaux d'immunité antipaludique dans les différentes populations étudiées. Ces écarts entre les différentes études soulignent l'importance d'évaluer les mesures immunologiques et cliniques en même temps dans la même population d'étude.

Nous n'avons trouvé aucune preuve que les titres d'IgG spécifiques contre les antigènes du mérozoïte sont plus faibles chez les enfants HbAS car ils augmentent moins au cours de la saison de transmission ou diminuent plus rapidement au cours de la saison sèche que chez les enfants HbAA et HbAC. Ces titres d'IgG augmentaient chez tous les enfants au cours de la saison de transmission 2009, mais le niveau d'augmentation des taux d'IgG ne sont pas corrélés avec le nombre d'épisodes de paludisme chez les enfants. Ce résultat suggère que l'augmentation des taux d'IgG spécifiques contre les antigènes du mérozoïte au cours d'une saison de transmission ne découle pas nécessairement d'un épisode de paludisme. Au lieu de cela, les infections asymptomatiques peuvent jouer un rôle important dans le développement de réponses IgG spécifiques de *P. falciparum*.

Une fois qu'ils ont augmenté, les taux d'IgG spécifiques de l'antigène du mérozoïte ne se diminuent pas au cours des 5 mois de la saison sèche. Cette découverte est surprenante étant donné que d'autres ont rapporté que des anticorps spécifiques de *P. falciparum* sont de courte durée (par exemple, la demi-vie de quelques semaines) [153-155] par rapport à des anticorps antiviraux avec des demi-vies de 10 à > 200 années [156]. Cependant, il faut être prudent dans cette comparaison puisque les deux phases de la cinétique des anticorps (de la phase d'élimination aiguë dans l'intervalle d'environ 1 mois après l'exposition à l'antigène et la phase de stabilité [157]) peuvent avoir complètement des demi-vies différentes pour le même immunogène. D'autres études ont trouvé les demi-vies d'anticorps spécifique de *P. falciparum* d'être relativement plus longues, surtout chez les adultes [158, 159] : une étude n'a montré aucune réduction significative des titres IgG contre les antigènes de MSP1 au cours des 6 mois de la saison sèche [158] et l'autre étude a estimé que la demi-vie des anticorps anti-AMA1/MSP1 était de 5-10 ans [159]. Les fortes corrélations entre les taux d'IgG mesurés à deux différents temps (figure 9) suggèrent que nous avons mesuré la plupart des taux d'IgG dans leur phase stable.

Les mécanismes de l'entretien des anticorps à long terme par les cellules B mémoires et les plasmocytes de longue vie sont mal connus, en particulier chez l'homme. En partie, ceci est parce que le site prédominant de la production d'anticorps est la moelle osseuse où jusqu'à 90 % des plasmocytes de longue vie résident [157]. En effet, le nombre (ou présence) de cellules mémoire B spécifiques de l'antigène, qui ont été

différenciées à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique ex-vivo, ne correspond pas toujours avec le titre (ou la présence) d'anticorps spécifiques de l'antigène [156, 159, 160]. Il est difficile de savoir si la parasitémie asymptomatique au cours de la saison sèche en permanence a stimulé le système immunitaire à maintenir les taux d'IgG que nous avons mesuré. Nos deux mesures de la parasitémie asymptomatique (2% en mai 2009, 0% en mai 2010) suggèrent que l'infection à *P. falciparum* détectée au microscope était très rare dans notre population d'étude au cours de la saison sèche. Cependant, la prévalence de la parasitémie résiduelle aurait pu être sensiblement plus élevée si on a utilisé un procédé de détection plus sensible, comme les réactions de polymérisation en chaîne (PCR). Une étude plus approfondie est nécessaire pour comprendre le mécanisme des taux soutenus d'IgG spécifiques de l'antigène au cours de la saison sèche.

7. Limites de notre étude

Notre étude s'est limitée à déterminer l'impact du trait drépanocytaire sur l'acquisition de la réponse humorale anti-AMA1, anti-MSP1, anti-EBA175 et anti-MSP2 et les classes d'âge, sur le paludisme. Par conséquent, nous n'avons pas testé d'autres antigènes candidats vaccins afin d'avoir un aperçu général sur les nombreux antigènes candidats vaccins actuellement en phase d'essais cliniques. Il serait également utile de tester ces antigènes dans les mêmes conditions chez les adultes. Une recherche plus approfondie est nécessaire pour expliquer le taux inférieur d'IgG spécifiques des antigènes chez les enfants HbAS dans notre population d'étude. Un accroissement de la taille de l'échantillon pourrait également détecter des différences significatives dans les différents titres des anticorps dirigés contre les quatre antigènes étudiés ici.

8. Conclusion et recommandations

8.1. Conclusion

Au terme de notre étude, nous pouvons conclure que l'HbAS et l'HbAC sont associée différemment au risque de paludisme et aux taux d'IgG spécifiques des antigènes du mérozoïte chez les enfants de Kéniéroba. Les enfants HbAS avaient des taux d'IgG inférieurs contre les quatre antigènes du mérozoïte comparés aux enfants HbAA et ils avaient peu d'épisodes palustres. Ce qui suggère que ces réponses IgG - dont deux corrélaient avec l'incidence réduite du paludisme – n'initient pas les effets protecteurs antipalustres chez les enfants HbAS de 3 à 11 ans. Quelque soit le type d'hémoglobine, il y'avait une augmentation du titre des anticorps au cours de la saison de transmission 2009 (de mai à décembre 2009). Cependant, l'augmentation ne corrélait pas avec le nombre d'épisodes palustres chez les enfants. Il n'avait aucune réduction significative des titres d'anticorps au cours des 5 mois de saison sèche (de décembre à mai 2009).

Le développement et la diminution des taux d'IgG au cours de la saison de transmission et au cours de la saison sèche ne différaient pas entre les enfants HbAS et HbAA, ce qui suggère que les différences dans les titres d'IgG peuvent avoir été établies avant l'âge de 3 ans. Nos résultats suggèrent que le taux de base des anticorps anti-mérozoïtes peuvent être déterminés principalement par les facteurs de l'hôte et/ou environnementaux qui ne changent pas relativement au cours d'une période courte.

8.2. Recommandations

A la fin de notre étude et vu nos résultats, nous pouvons formuler les recommandations suivantes aux chercheurs et la population :

- poursuivre la recherche sur les mécanismes de protection des hémoglobinopathies (HbAS et HbAC) contre le paludisme ;
- d'étudier d'autres antigènes du mérozoïtes dans les mêmes conditions chez les enfants vivant en zone d'endémie palustre en Afrique.
- d'amener leurs enfants en consultation dès les premiers symptômes évocateurs du paludisme et d'être disponible lors des études de recherche clinique sur cette maladie.

9. Références Bibliographiques

1. OMS, *World Malaria Report 2013*, Geneva, Switzerland
2. PNL, *PLAN STRATEGIQUE DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME 2007-2011 AU MALI*. 2006: p. 47 PAGES.
3. Crompton, P.D., et al., *Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria*. J Infect Dis, 2008. **198**(9): p. 1265-75.
4. Williams, T.N., et al., *An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait*. PLoS Med, 2005. **2**(5): p. e128.
5. Kreuels, B., et al., *Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth*. Blood, 2010. **115**(22): p. 4551-8.
6. Allen, S.J., et al., *Morbidity from malaria and immune responses to defined Plasmodium falciparum antigens in children with sickle cell trait in The Gambia*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1992. **86**(5): p. 494-8.
7. Lopez, C., et al., *Mechanisms of genetically-based resistance to malaria*. Gene, 2010. **467**(1-2): p. 1-12.
8. Ferreira, A., et al., *Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection*. Cell, 2011. **145**(3): p. 398-409.
9. Gong, L., et al., *Evidence for both innate and acquired mechanisms of protection from Plasmodium falciparum in children with sickle cell trait*. Blood, 2012. **119**(16): p. 3808-14.
10. Williams, T.N., et al., *An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait*. PLoS medicine, 2005. **2**(5): p. e128.
11. Cohen, S., G.I. Mc, and S. Carrington, *Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria*. Nature, 1961. **192**: p. 733-7.
12. Modiano, D., et al., *Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2001. **414**(6861): p. 305-8.
13. Mockenhaupt, F.P., et al., *Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children*. The Journal of infectious diseases, 2004. **190**(5): p. 1006-9.
14. May, J., et al., *Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria*. JAMA, 2007. **297**(20): p. 2220-6.
15. Guinet, F., et al., *A comparison of the incidence of severe malaria in Malian children with normal and C-trait hemoglobin profiles*. Acta Trop, 1997. **68**(2): p. 175-82.
16. Gilles, H.M., et al., *Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria*. Lancet, 1967. **1**(7482): p. 138-40.

17. Doumbo, O., *Epidémiologie du paludisme au Mali, étude de la chimiorésistance, essai de stratégie de contrôle basé sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associé au traitement systématique des accès fébriles.*, Parasitologie, Pathologie, Ecologie, France., 1992, Montpellier II: Montpellier.
18. Singh, B., et al., *A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings.* Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1017-24.
19. Harbach, R.E., *The classification of genus Anopheles (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships.* Bull Entomol Res, 2004. **94**(6): p. 537-53.
20. Toure, Y.T., et al., *The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the Anopheles gambiae complex in Mali, West Africa.* Parassitologia, 1998. **40**(4): p. 477-511.
21. White, N.J., et al., *Malaria.* Lancet, 2014. **383**(9918): p. 723-35.
22. Smith, T., et al., *Is fever a good sign for clinical malaria in surveys of endemic communities?* The American journal of tropical medicine and hygiene, 1995. **52**(4): p. 306-10.
23. Rao, V.B., D. Schellenberg, and A.C. Ghani, *The potential impact of improving appropriate treatment for fever on malaria and non-malarial febrile illness management in under-5s: a decision-tree modelling approach.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69654.
24. Smith, L.A., et al., *From fever to anti-malarial: the treatment-seeking process in rural Senegal.* Malaria journal, 2010. **9**: p. 333.
25. Waitumbi, J.N., et al., *Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe plasmodium falciparum anemia.* Blood, 2000. **95**(4): p. 1481-6.
26. Stoute, J.A., et al., *Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia.* J Infect Dis, 2003. **187**(3): p. 522-5.
27. WHO, *Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. **94 Suppl 1**: p. S1-90.
28. WHO, *Africa malaria report 2003.* 2003.
29. OMS, *Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. **94 Suppl 1**: p. S1-90.
30. Menendez, C., et al., *Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants.* Lancet, 1997. **350**(9081): p. 844-50.
31. Marsh, K., *Malaria--a neglected disease?* Parasitology, 1992. **104 Suppl**: p. S53-69.
32. Angulo, I. and M. Fresno, *Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria.* Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(6): p. 1145-52.

33. Kwiatkowski, D., *Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria*. Immunol Lett, 1990. **25**(1-3): p. 213-6.
34. McGuire, W., et al., *Levels of tumour necrosis factor and soluble TNF receptors during malaria fever episodes in the community*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1998. **92**(1): p. 50-3.
35. Newton, C.R. and S. Krishna, *Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment*. Pharmacol Ther, 1998. **79**(1): p. 1-53.
36. Rowe, A., et al., *Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya*. Infect Immun, 1995. **63**(6): p. 2323-6.
37. Rowe, J.A., et al., *P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 292-5.
38. Bull, P.C., et al., *Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria*. Nat Med, 1998. **4**(3): p. 358-60.
39. Bruce-Chwatt, L.J., *Malaria and its control: present situation and future prospects*. Annual review of public health, 1987. **8**: p. 75-110.
40. Bruce-Chwatt, L.J., *[Immune relations between mother and child in African endemic malaria]*. Archives francaises de pediatrie, 1985. **42 Suppl 2**: p. 911-6.
41. Bruce-Chwatt, L.J. and J.H. Pull, *[Malaria. 40 fundamental truths, or so it seems]*. La Nouvelle presse medicale, 1980. **9**(22): p. 1577-80.
42. Kassim, O.O., et al., *Inhibitory factors in breastmilk, maternal and infant sera against in vitro growth of Plasmodium falciparum malaria parasite*. J Trop Pediatr, 2000. **46**(2): p. 92-6.
43. Chen, Q., et al., *Human natural killer cells control Plasmodium falciparum infection by eliminating infected red blood cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**(4): p. 1479-84.
44. Filtjens, J., et al., *Contribution of the Ly49E natural killer receptor in the immune response to Plasmodium berghei infection and control of hepatic parasite development*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87463.
45. Burgner, D. and K. Rockett, *Nitric oxide and severe sepsis*. Arch Dis Child, 1997. **77**(5): p. 463.
46. Burgner, D., K. Rockett, and D. Kwiatkowski, *Nitric oxide and infectious diseases*. Arch Dis Child, 1999. **81**(2): p. 185-8.
47. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers*. Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 725-32.
48. Struik, S.S. and E.M. Riley, *Does malaria suffer from lack of memory?* Immunological reviews, 2004. **201**: p. 268-90.

49. McGregor, I.A., *Studies in the Acquisition of Immunity of Plasmodium Falciparum Infections in Africa*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1964. **58**: p. 80-92.
50. McGregor, I.A., *The Passive Transfer of Human Malarial Immunity*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 1964. **13**: p. SUPPL 237-9.
51. Pierce, S.K. and L.H. Miller, *World Malaria Day 2009: what malaria knows about the immune system that immunologists still do not*. Journal of immunology, 2009. **182**(9): p. 5171-7.
52. Weiss, G.E., et al., *Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area*. Journal of immunology, 2009. **183**(3): p. 2176-82.
53. Moir, S. and A.S. Fauci, *Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2008. **122**(1): p. 12-9; quiz 20-1.
54. Augustine, A.D., et al., *NIAID workshop on immunity to malaria: addressing immunological challenges*. Nature immunology, 2009. **10**(7): p. 673-8.
55. Kolaczinski, J., M. Macdonald, and S. Meek, *Vector control to eliminate artemisinin resistant malaria in the Greater Mekong subregion*. The Lancet infectious diseases, 2014. **14**(1): p. 9-11.
56. Phompradit, P., et al., *Four years' monitoring of in vitro sensitivity and candidate molecular markers of resistance of Plasmodium falciparum to artesunate-mefloquine combination in the Thai-Myanmar border*. Malaria journal, 2014. **13**: p. 23.
57. Vreden, S.G., et al., *Evidence of an increased incidence of day 3 parasitaemia in Suriname: an indicator of the emerging resistance of Plasmodium falciparum to artemether*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 2013. **108**(8): p. 968-73.
58. Miller, L.H. and S.L. Hoffman, *Research toward vaccines against malaria*. Nat Med, 1998. **4**(5 Suppl): p. 520-4.
59. Vekemans, J. and W.R. Ballou, *Plasmodium falciparum malaria vaccines in development*. Expert Rev Vaccines, 2008. **7**(2): p. 223-40.
60. Richards, J.S. and J.G. Beeson, *The future for blood-stage vaccines against malaria*. Immunol Cell Biol, 2009. **87**(5): p. 377-90.
61. Remarque, E.J., et al., *Humoral immune responses to a single allele PfAMA1 vaccine in healthy malaria-naive adults*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38898.
62. Remarque, E.J., et al., *Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review*. Trends Parasitol, 2008. **24**(2): p. 74-84.
63. Escalante, A.A., et al., *Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of Plasmodium falciparum. X. Asembo Bay Cohort Project*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **113**(2): p. 279-87.

64. Garg, S., et al., *Sequence diversity and natural selection at domain I of the apical membrane antigen 1 among Indian Plasmodium falciparum populations*. Malar J, 2007. **6**: p. 154.
65. Mitchell, G.H., et al., *Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 154-8.
66. Silvie, O., et al., *A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by Plasmodium falciparum sporozoites*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 9490-6.
67. Stowers, A.W., et al., *Vaccination of monkeys with recombinant Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6961-7.
68. Anders, R.F., et al., *Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with Plasmodium chabaudi*. Vaccine, 1998. **16**(2-3): p. 240-7.
69. Laurens, M.B., et al., *Extended safety, immunogenicity and efficacy of a blood-stage malaria vaccine in malian children: 24-month follow-up of a randomized, double-blinded phase 2 trial*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79323.
70. Genton, B., et al., *A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces Plasmodium falciparum density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea*. J Infect Dis, 2002. **185**(6): p. 820-7.
71. Holder, A.A., et al., *Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria*. Parasitologia, 1999. **41**(1-3): p. 409-14.
72. Chang, S.P., et al., *A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria*. Infect Immun, 1996. **64**(1): p. 253-61.
73. Soulama, I., et al., *Low-high season variation in Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen 175 (eba-175) allelic forms in malaria endemic area of Burkina Faso*. Trop Med Int Health, 2009. **15**(1): p. 51-9.
74. Perce-da-Silva, D.S., et al., *Evaluation of allelic forms of the erythrocyte binding antigen 175 (EBA-175) in Plasmodium falciparum field isolates from Brazilian endemic area*. Malar J, 2011. **10**: p. 146.
75. Mamillapalli, A., et al., *Sequence polymorphisms in the receptor-binding domain of Plasmodium falciparum EBA-175: implications for malaria vaccine development*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **146**(1): p. 120-3.
76. Liang, H. and B.K. Sim, *Conservation of structure and function of the erythrocyte-binding domain of Plasmodium falciparum EBA-175*. Mol Biochem Parasitol, 1997. **84**(2): p. 241-5.
77. Jones, T.R., et al., *Protection of Aotus monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA prime-protein boost immunization regimen*. J Infect Dis, 2001. **183**(2): p. 303-312.

78. Sim, B.K., et al., *Induction of biologically active antibodies in mice, rabbits, and monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA vaccine*. Mol Med, 2001. **7**(4): p. 247-54.
79. McCarthy, J.S., et al., *A phase 1 trial of MSP2-C1, a blood-stage malaria vaccine containing 2 isoforms of MSP2 formulated with Montanide(R) ISA 720*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24413.
80. Yang, X., et al., *Identification of key residues involved in fibril formation by the conserved N-terminal region of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 (MSP2)*. Biochimie, 2010. **92**(10): p. 1287-95.
81. Fenton, B., et al., *Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(2): p. 963-71.
82. Smythe, J.A., et al., *Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol, 1990. **39**(2): p. 227-34.
83. al-Yaman, F., et al., *Assessment of the role of the humoral response to Plasmodium falciparum MSP2 compared to RESA and SPf66 in protecting Papua New Guinean children from clinical malaria*. Parasite Immunol, 1995. **17**(9): p. 493-501.
84. Taylor, R.R., et al., *Human antibody response to Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 is serogroup specific and predominantly of the immunoglobulin G3 subclass*. Infect Immun, 1995. **63**(11): p. 4382-8.
85. Metzger, W.G., et al., *Serum IgG3 to the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria*. Parasite Immunol, 2003. **25**(6): p. 307-12.
86. Tongren, J.E., et al., *Epitope-specific regulation of immunoglobulin class switching in mice immunized with malarial merozoite surface proteins*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8119-29.
87. Sedegah, M., et al., *Identification and localization of minimal MHC-restricted CD8+ T cell epitopes within the Plasmodium falciparum AMA1 protein*. Malar J, 2010. **9**: p. 241.
88. Calvo-Calle, J.M., et al., *Immunogenicity of multiple antigen peptides containing B and non-repeat T cell epitopes of the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum*. J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1403-12.
89. Coppi, A., et al., *The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host*. J Exp Med, 2011. **208**(2): p. 341-56.
90. Agnandji, S.T., et al., *A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants*. The New England journal of medicine, 2012. **367**(24): p. 2284-95.
91. Richie, T.L. and R.L. Haberberger, *RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children*. The New England journal of medicine, 2012. **366**(8): p. 765.

92. Abdulla, S., et al., *Randomized, controlled trial of the long term safety, immunogenicity and efficacy of RTS,S/AS02(D) malaria vaccine in infants living in a malaria-endemic region.* Malaria journal, 2013. **12**: p. 11.
93. Moorthy, V.S., et al., *Assessment of the RTS,S/AS01 malaria vaccine.* The Lancet infectious diseases, 2013. **13**(4): p. 280-2.
94. Williams, T.N., *Human red blood cell polymorphisms and malaria.* Current opinion in microbiology, 2006. **9**(4): p. 388-94.
95. Dufrenot, M. and J.P. Legait, *[Distribution of hemoglobin S and C genes in Upper Volta, Mali and Niger].* Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales, 1970. **63**(5): p. 606-14.
96. Agarwal, A., et al., *Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S.* Blood, 2000. **96**(7): p. 2358-63.
97. Williams, T.N. and D.J. Weatherall, *World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies.* Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2012. **2**(9): p. a011692.
98. Diallo, D.A., et al., *A comparison of anemia in hemoglobin C and normal hemoglobin A children with Plasmodium falciparum malaria.* Acta Trop, 2004. **90**(3): p. 295-9.
99. Gouagna, L.C., et al., *Genetic variation in human HBB is associated with Plasmodium falciparum transmission.* Nature genetics, 2010. **42**(4): p. 328-31.
100. Pasvol, G., *Protective hemoglobinopathies and Plasmodium falciparum transmission.* Nat Genet, 2010. **42**(4): p. 284-5.
101. Arie, T., et al., *Hemoglobin C modulates the surface topography of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.* J Struct Biol, 2005. **150**(2): p. 163-9.
102. Fairhurst, R.M., et al., *Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria.* Nature, 2005. **435**(7045): p. 1117-21.
103. Tokumasu, F., et al., *Band 3 modifications in Plasmodium falciparum-infected AA and CC erythrocytes assayed by autocorrelation analysis using quantum dots.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 1091-8.
104. Fairhurst, R.M., et al., *Aberrant development of Plasmodium falciparum in hemoglobin CC red cells: implications for the malaria protective effect of the homozygous state.* Blood, 2003. **101**(8): p. 3309-15.
105. Pauling, L., H.A. Itano, and et al., *Sickle cell anemia a molecular disease.* Science, 1949. **110**(2865): p. 543-8.
106. Neel, J.V., *The inheritance of the sickling phenomenon, with particular reference to sickle cell disease.* Blood, 1951. **6**(5): p. 389-412.

107. Orkin, S.H. and D.R. Higgs, *Sickle cell disease at 100 years*. Science, 2010. **329**(5989): p. 291-2.
108. Ingram, V.M., *Abnormal human haemoglobins. III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins*. Biochim Biophys Acta, 1959. **36**: p. 402-11.
109. Stamatoyannopoulos, G., *Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation*. Exp Hematol, 2005. **33**(3): p. 259-71.
110. Frenette, P.S. and G.F. Atweh, *Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 850-8.
111. Taylor, S.M., C.M. Parobek, and R.M. Fairhurst, *Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis*. The Lancet infectious diseases, 2012.
112. Raper, A.B., *Malaria and the sickling trait*. British medical journal, 1955. **1**(4923): p. 1186-9.
113. Mackey, J.P. and F. Vivarelli, *Sickle-cell Anaemia*. Br Med J 1954. **1**: p. 276.
114. Beet, E.A., *Sickle cell disease in Northern Rhodesia*. East Afr Med J, 1947. **24**(6): p. 212-22.
115. Allison, A.C., *The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1954. **48**(4): p. 312-8.
116. Allison, A.C., *Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection*. Br Med J, 1954. **1**(4857): p. 290-4.
117. Allison, A., *Aspects of polymorphism in man*. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 1965. **20**: p. 239-251.
118. Kulozik, A.E., et al., *Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation*. Am J Hum Genet, 1986. **39**(2): p. 239-44.
119. Chebloune, Y., et al., *Structural analysis of the 5' flanking region of the beta-globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(12): p. 4431-5.
120. Lapoumeroulie, C., et al., *A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type*. Hum Genet, 1992. **89**(3): p. 333-7.
121. Allison, A.C., *Genetic control of resistance to human malaria*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(5): p. 499-505.
122. Ghansah, A., et al., *Haplotype analyses of haemoglobin C and haemoglobin S and the dynamics of the evolutionary response to malaria in kassena-nankana district of Ghana*. PLoS one, 2012. **7**(4): p. e34565.

123. Zago, M.A., M.S. Figueiredo, and S.H. Ogo, *Bantu beta s cluster haplotype predominates among Brazilian blacks*. Am J Phys Anthropol, 1992. **88**(3): p. 295-8.
124. Allison, A.C., *Notes on sickle-cell polymorphism*. Ann Hum Genet, 1954. **19**(1): p. 39-51.
125. Brittenham, G.M., A.N. Schechter, and C.T. Noguchi, *Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes*. Blood, 1985. **65**(1): p. 183-9.
126. Hill, A.V., et al., *Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria*. Nature, 1991. **352**(6336): p. 595-600.
127. Stirnadel, H.A., et al., *Malaria infection and morbidity in infants in relation to genetic polymorphisms in Tanzania*. Trop Med Int Health, 1999. **4**(3): p. 187-93.
128. Sokhna, C.S., et al., *Host factors affecting the delay of reappearance of Plasmodium falciparum after radical treatment among a semi-immune population exposed to intense perennial transmission*. Am J Trop Med Hyg, 2000. **62**(2): p. 266-70.
129. Sogoba, N., et al., *Monitoring of larval habitats and mosquito densities in the Sudan savanna of Mali: implications for malaria vector control*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(1): p. 82-8.
130. Guindo, A., et al., *X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria*. PLoS medicine, 2007. **4**(3): p. e66.
131. Miura, K., et al., *Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines*. Vaccine, 2008. **26**(2): p. 193-200.
132. Kennedy, M.C., et al., *In vitro studies with recombinant Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6948-60.
133. Malkin, E., et al., *Phase 1 study of two merozoite surface protein 1 (MSP1(42)) vaccines for Plasmodium falciparum malaria*. PLoS Clin Trials, 2007. **2**(4): p. e12.
134. El Sahly, H.M., et al., *Safety and immunogenicity of a recombinant nonglycosylated erythrocyte binding antigen 175 Region II malaria vaccine in healthy adults living in an area where malaria is not endemic*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(10): p. 1552-9.
135. Malkin, E.M., et al., *Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 2005. **73**(6): p. 3677-85.
136. Diatta, A.M., et al., *Relationship of binding of immunoglobulin G to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes with parasite endemicity and antibody responses to conserved antigen in immune individuals*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(1): p. 6-11.
137. Cabrera, G., et al., *The sickle cell trait is associated with enhanced immunoglobulin G antibody responses to Plasmodium falciparum variant surface antigens*. J Infect Dis, 2005. **191**(10): p. 1631-8.

138. Bayoumi, R.A., et al., *Cell-mediated immune responses to Plasmodium falciparum purified soluble antigens in sickle-cell trait subjects*. Immunol Lett, 1990. **25**(1-3): p. 243-9.
139. Courtin, D., et al., *G6PD A-variant influences the antibody responses to Plasmodium falciparum MSP2*. Infect Genet Evol, 2011. **11**(6): p. 1287-92.
140. Tan, X., et al., *Hemoglobin S and C heterozygosity enhances neither the magnitude nor breadth of antibody responses to a diverse array of Plasmodium falciparum antigens*. J Infect Dis, 2011. **204**(11): p. 1750-61.
141. Le Hesran, J.Y., et al., *Longitudinal study of Plasmodium falciparum infection and immune responses in infants with or without the sickle cell trait*. Int J Epidemiol, 1999. **28**(4): p. 793-8.
142. Sarr, J.B., et al., *Impact of red blood cell polymorphisms on the antibody response to Plasmodium falciparum in Senegal*. Microbes Infect, 2006. **8**(5): p. 1260-8.
143. Ntoumi, F., et al., *Sickle cell trait carriage: imbalanced distribution of IgG subclass antibodies reactive to Plasmodium falciparum family-specific MSP2 peptides in serum samples from Gabonese children*. Immunol Lett, 2002. **84**(1): p. 9-16.
144. Matondo Maya, D.W., et al., *Distribution of IgG subclass antibodies specific for Plasmodium falciparum glutamate-rich-protein molecule in sickle cell trait children with asymptomatic infections*. Exp Parasitol, 2006. **112**(2): p. 92-8.
145. Verra, F., et al., *Haemoglobin C and S role in acquired immunity against Plasmodium falciparum malaria*. PLoS One, 2007. **2**(10): p. e978.
146. Cholera, R., et al., *Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(3): p. 991-6.
147. Taylor, S.M., C.M. Parobek, and R.M. Fairhurst, *Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(6): p. 457-68.
148. Zeituni, A.E., et al., *Effects of age, hemoglobin type and parasite strain on IgG recognition of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in Malian children*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76734.
149. Allen, S.J., et al., *Aflatoxin exposure, malaria and hepatitis B infection in rural Gambian children*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1992. **86**(4): p. 426-30.
150. Fowkes, F.J., et al., *The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of Plasmodium falciparum malaria: A systematic review and meta-analysis*. PLoS Med, 2010. **7**(1): p. e1000218.
151. Crompton, P.D., et al., *In vitro growth-inhibitory activity and malaria risk in a cohort study in mali*. Infection and immunity, 2010. **78**(2): p. 737-45.

152. Perraut, R., et al., *Antibodies to the conserved C-terminal domain of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with in vitro inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village.* J Infect Dis, 2005. **191**(2): p. 264-71.
153. Boutlis, C.S., et al., *Immunoglobulin G (IgG) responses to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositols are short-lived and predominantly of the IgG3 subclass.* J Infect Dis, 2003. **187**(5): p. 862-5.
154. Kinyanjui, S.M., et al., *IgG antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life.* Malar J, 2007. **6**: p. 82.
155. Akpogheneta, O.J., et al., *Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage Plasmodium falciparum is age dependent and antigen specific.* Infect Immun, 2008. **76**(4): p. 1748-55.
156. Amanna, I.J., N.E. Carlson, and M.K. Slifka, *Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens.* N Engl J Med, 2007. **357**(19): p. 1903-15.
157. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
158. Riley, E.M., et al., *A longitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surface protein (MSP1) of Plasmodium falciparum in an area of seasonal malaria transmission.* Parasite Immunol, 1993. **15**(9): p. 513-24.
159. Wipasa, J., et al., *Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax.* PLoS Pathog, 2010. **6**(2): p. e1000770.
160. Dorfman, J.R., et al., *B cell memory to 3 Plasmodium falciparum blood-stage antigens in a malaria-endemic area.* J Infect Dis, 2005. **191**(10): p. 1623-30.

10. Fiche signalétique

Nom et Prénom : Sissoko Nafissatou

Bamako (Mali) Magnambougou, Rue : 370, Porte : 355

Email : paradisminette@yahoo.fr ; Tel : 66 99 77 99

Résumé

Le trait drépanocytaire (HbAS) et l'HbAC sont supposés protéger contre le paludisme à *P. falciparum* en partie en améliorant l'immunité acquise naturellement à cette maladie. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons comparé les taux d'anticorps à quatre antigènes du mérozoïtes du clone 3D7 de *P. falciparum* (antigène-1 de la membrane apicale « AMA1-3D7 »; les protéines 1 et 2 de surface du mérozoïte « MSP1-3D7 et MSP2-3D7 » et l'antigène érythrocytaire de 175 kDa « EBA175-3D7 » dans une cohorte de 103 enfants HbAA, 73 enfants HbAS et 30 enfants HbAC âgés de 3 à 11 ans dans les villages de Kéniéroba et Fourda, dans la commune rurale endémique de Bancoumana au Mali.

Au cours de la saison de transmission 2009, nous avons constaté que l'HbAS, mais pas l'HbAC, réduisait significativement le risque de paludisme par rapport à l'HbAA. Les taux d'IgG contre les antigènes MSP1 et MSP2 au début de cette saison de transmission corrélaient inversement avec l'incidence du paludisme après ajustement pour l'âge et le type Hb. Cependant, les enfants HbAS avaient significativement des taux d'IgG plus faibles à EBA175 et à MSP2 par rapport aux enfants HbAA. D'autre part, les enfants HbAC présentaient des taux d'IgG semblables à tous les quatre antigènes. L'activité inhibitrice de la croissance parasitaire des IgG purifiées ne différait pas significativement selon le type Hb. Les changements des taux d'IgG spécifiques aux antigènes au cours de la transmission 2009 ne différaient pas selon le type d'hémoglobine et aucun de ces taux d'IgG n'avait considérablement diminué au cours de la saison sèche. Les enfants HbAS ont présenté significativement moins d'épisodes de paludisme que les enfants HbAA au cours de la saison de transmission 2009, malgré des titres nettement inférieurs à ceux des enfants HbAA en mai 2009. Ces titres ont augmenté dans les deux groupes d'enfants au cours de la saison de transmission 2009 et des différences similaires dans des titres ont été retrouvées en décembre 2009. Il n'y avait pas de différence dans l'augmentation des titres entre les enfants HbAS et HbAA et le nombre d'épisodes palustres au cours de la saison de transmission n'était pas corrélé avec l'augmentation. Ces données suggèrent que le trait drépanocytaire ne réduit pas le risque de paludisme en améliorant l'acquisition des réponses IgG aux antigènes du mérozoïte.

Mots clés : HbS, HbC, réponse humorale, paludisme, enfants, Mali.

Summary

Heterozygous hemoglobin (Hb) AS (sickle-cell trait) and HbAC are hypothesized to protect against *Plasmodium falciparum* malaria in part by enhancing naturally-acquired immunity to this disease. To investigate this hypothesis, we compared antibody levels to four merozoite antigens from the *P. falciparum* 3D7 clone (apical membrane antigen 1, AMA1-3D7; merozoite surface protein 1, MSP1-3D7; 175 kDa erythrocyte-binding antigen, EBA175-3D7; and merozoite surface protein 2, MSP2-3D7) in a cohort of 103 HbAA, 73 HbAS and 30 HbAC children aged 3 to 11 years in a malaria-endemic area of Mali.

In the 2009 transmission season we found that HbAS, but not HbAC, significantly reduced the risk of malaria compared to HbAA. IgG levels to MSP1 and MSP2 at the start of this transmission season inversely correlated with malaria incidence after adjusting for age and Hb type. However, HbAS children had significantly lower IgG levels to EBA175 and MSP2 compared to HbAA children. On the other hand, HbAC children had similar IgG levels to all four antigens. The parasite growth-inhibitory activity of purified IgG samples did not differ significantly by Hb type. Changes in antigen-specific IgG levels during the 2009 transmission and 2010 dry seasons also did not differ by Hb type, and none of these IgG levels dropped significantly during the dry season. HbAS children experienced significantly fewer malaria episodes than HbAA children during the 2009 transmission season, despite having significantly lower titers than HbAA children in May 2009. These titers increased in both groups of children during the 2009 transmission season and similar differences in titers were found in December 2009. There were no differences in the increase in titers between HbAS and HbAA children and the number of episodes during the transmission season did not correlate with the increase. These data suggest that sickle-cell trait does not reduce the risk of malaria by enhancing the acquisition of IgG responses to merozoite antigens.

Keys words: HbS, HbC, humoral response, malaria, children, Mali

11. Annexes

Description des techniques de laboratoire

11.1. Détermination du Taux d'hémoglobine

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



Figure 23: Analyseur et Microcuvette HemoCue

Source : Photo prise à Kéniéroba

11.1.1. Principe de la méthode

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

11.1.2. Matériel et réactifs

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

-Coton

11.1.3. Technique

-cibler un doigt, bien désinfecté avec le tampon d'alcool à 70°;

-piquer en un coup sec avec une lancette ; nettoyer la première goutte de sang, presser le bout du doigt pour avoir une deuxième goutte ;

- Appliquer la microcuvette sur la goutte de sang. La quantité nécessaire est aspirée automatiquement dans la microcuvette par capillarité.

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



Figure 24: Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+
Le résultat est exprimé en gramme d'hémoglobine par décilitre de sang (g/dl)

Source : www.hemocue.com

11.2. Détermination du groupe sanguin ABO

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

11.2.1. Principe

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

11.2.2. Matériel et réactifs

- lame porte objet
- cure-dent
- coton
- alcool 70°
- lancette

- crayon de papier
- Sérums tests, (anticorps) : anti-A (couleur bleu), anti-B (couleur jaune), anti-D (incolore)

11.2.3. Mode opératoire

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

-cibler un doigt

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

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

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

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

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

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

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

11.2.4. Résultat

Observer l'agglutination avec les sérums tests :

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

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

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

11.3. Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10

11.3.1. Principe de la procédure du D-10

Le D-10 Dual Program repose sur le principe de la séparation des analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par échange d'ions. Les échantillons sont automatiquement dilués dans le système D-10 puis injectés dans la cartouche analytique. Le système D-10 envoie un gradient programmé de tampon de force ionique croissante (il existe 2 solutions de réactif de force ionique différentes, l'une hyper concentrée en ion et l'autre peu concentrée en ion. La machine mélange de façon automatique au fil du temps ces solutions pour obtenir une solution finale de concentration croissante) dans la cartouche ; les molécules d'hémoglobine sont alors séparées en fonction de leur interaction ionique avec le matériau contenu dans la cartouche. Les molécules d'hémoglobine séparées traversent ensuite la cellule à circulation du photomètre filtre où sont mesurés les changements d'absorbance à 415 nm.

Le logiciel D-10 intègre les données brutes recueillies lors de chaque analyse. Un étalonnage à deux niveaux est employé pour déterminer les concentrations des différents types d'Hb recherchés. Un compte-rendu d'analyse et un chromatogramme sont générés pour chaque échantillon. La surface de l'A1c est calculée à l'aide d'un algorithme gaussien exponentiellement modifié (EMG) qui permet d'exclure la surface des pics dus à l'A1c labile et à l'hémoglobine carbamylée de la surface du pic A1c.

11.3.2. Prélèvement et manipulation des échantillons

11.3.3. Type d'échantillon

On utilise le Sang total.

11.3.4. Précautions relatives au prélèvement des échantillons

Comme toute substance d'origine humaine les échantillons de sang doivent être manipulés en appliquant les procédures de biosécurité d'usage.

Les échantillons de sang total doivent être recueillis dans un tube sous vide contenant de l'EDTA.

11.3.5. Conservation des échantillons

Les échantillons de sang total peuvent être conservés jusqu'à 4 jours entre 2 et 8 °C, et à -4°C si l'échantillon ne peut être traité avant une semaine.

11.3.6. Préparation des échantillons

Porter les tubes d'échantillons à température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant l'essai. Les échantillons sont stables à température ambiante pendant 1 jour. Aucune préparation particulière des échantillons n'est nécessaire. Il n'est pas nécessaire d'agiter les tubes avant le chargement. Les tubes d'échantillons sont placés dans le portoir à échantillons du D-10 puis mis dans le système D-12.

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

11.4. Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alpha-thalassémie par PCR

Il s'agit d'une PCR nichée (nested PCR) où le produit de la première PCR est amplifié de nouveau dans une deuxième PCR.

11.4.1. Matériel et réactifs

- Matériel

- Termocycler
- Micropipette (1000µl, 200µl et 10µl)
- Embout pour micropipette (1000µl, 200µl et 10µl)
- Tube PCR 0.2ml

- Réactifs

- Le Tris-HCl, pH 8.5
- KCl
- Betaine (Sigma)
- dNTP (ATP, GTP, TTP, CTP)

- Taq polymerase
- Les Amorces:
 - $\alpha 2/3.7F = 5'-CCCCTCGCCA AGTCCACC C-3'$
 - $\alpha 2R = 5'-AGACCAGGAAGGGCCGGTG-3'$
 - $3.7/20.5R = 5'-AAAGCACTCTAGGGTCCAG CG-3'$
 - $A3.7F = 5'-CTTTCCTACCCAGAGCCAGGTT -3'$
 - $3.7R1 = 5'-CCACTTTCCTCCTCCATCCC-3'$
 - $\alpha 2R1 = 5'-AGGAG GGCCCGTTGGGAGGC-3'$

11.4.2. Procédure

11.4.2.1. Première amplification

Il s'agit d'une PCR multiplex visant à amplifier en même temps dans la même réaction, le fragment d'ADN portant la délétion 3.7 et le fragment d'ADN normal sans délétion. Ces deux fragments ont en commun une amorce ($\alpha 2/3.7F$) la seconde amorce étant spécifique pour chaque fragment ($\alpha 2R$ pour le fragment normal et $3.7/20.5R$ pour le fragment délétère). Il consiste à amplifier approximativement 5ng d'ADN (2.5 μ l d'ADN extrait avec le Qiagen) dans un volume réactionnel de 25 μ l dont la composition est la suivante:

- 20 mmol/L de Tris-HCl pH 8.5
- 50 mmol/L KCl
- 1.5 mmol/L $MgCl_2$
- 1 mol/L de Betaine
- 0.3 μ mol/l de chaque amorce ($\alpha 2/3.7F$, $\alpha 2R$ et $3.7/20.5R$)
- 0.2mmol/L de chaque dNTP
- 1.25 unité de platinum Taq polymerase (Invitrogen)

11.4.2.2. Deuxième amplification

Chaque produit de première amplification est amplifié deux fois dans deux tubes de PCR différents.

Dans le tube de PCR N°1, les amorces spécifique pour le fragment normal (A3.7F et α 2R1) sont utilisé alors que dans le tube de PCR N°2 sont introduites les amorces spécifiques pour les gènes délétères (A3.7F et 3.7R1).

Dans chaque tube de PCR 1 μ l d'une dilution au 1 /20 est utilisé dans un volume réactionnel de 25 μ l de même composition que dans la première amplification.

Le programme utilisé pour l'amplification est le suivant :

Il est le même pour la première et la deuxième amplification.

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 5 minutes

Suivit de 35 cycle de :

- Dénaturation : 97°C pendant 45 secondes

- Renaturation : 60°C pendant 1 minute et 15 secondes

- Extension : 72°C pendant 2 minutes et 30 secondes

Une extension Final à 72°C pendant 5 minutes

11.4.3. Migration du produit de PCR

On utilise un gel d'agarose à 2% auquel est incorporé du bromure d'éthidium (~ 3 μ g/100ml) dans TBE 0.5X. La migration se fait à 200 volts pendant 30 minutes et la révélation est faite à la lumière UV.

11.4.4. Interprétation

Présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 signifie que le sujet possède le gène Normal.

Présence d'une bande de 1.8 kb dans le tube N° 2 signifie que le sujet possède le gène délétère. Trois scenarios sont possibles :

1- Le sujet est Normal : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et l'absence de bande dans le tube N° 2

2- Le sujet est α -thalassémique hétérozygote : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et aussi la présence d'une bande de 1.8kb dans le tube N° 2

3- Le sujet est α -thalassémique homozygote : On observe la présence d'une bande de 1.8 kb dans le tube N° 2 et l'absence de bande dans le tube N° 1

11.5. SOP de la technique ELISA utilisée pour le dosage d'anticorps anti-AMA1, anti-MSP1, anti-EBA175 et anti-MSP2

Matériel et réactifs

Matériel

- Machine de lavage des plaques d'ELISA (ELISA Ultrawash ELISA Plus, Dynex Technologies)
- Lecteur de microplaques, (Spectramax 340PC Molecular Devices)
- Agitateur (Daigger Vortex Genie 2, A Daigger & Co., Inc, Cat # 22220A ou équivalent)
- Pipetboy, Integra Biosciences, ou l'équivalent
- Agitateur Magnétique muni de système de chauffage (modèle PC-420 ou l'équivalent)
- Micropipette multicanal 50-300 μ ,
- Micropipette multicanal 5-50 μ ,
- Micropipette 2 μ l,
- Micropipette 20 μ l,
- Micropipette 200 μ l,
- Micropipette 1000 μ l,
- Microplaque à fond plat
- Plaques de dilution ELISA 2ml,
- bassin de solution pour les micropipettes multicanaux,
- Embout de micropipette jetables de 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l et 2 μ l
- Flacon Erlenmeyer stérile jetable 250 ml,
- Tubes coniques jetables avec bouchon à vis stérile 50 ml et 15 ml
- Tubes coniques jetables avec bouchon à vis stérile 15 ml, Stardsted # 62.554.00
- filtre de stérilisation à usage unique 0,2 μ m, 150ml, la société Nalgen[®] 155-0020, ou équivalent,
- Tube Eppendorf 1,5 ml,
- Barreaux magnétiques,
- Feuille d'aluminium,

- Mouchoir de nettoyage jetable,
- Eprouvettes graduées, 100ml, 500ml, 1000ml,
- gants stériles
- Chronomètre approprié pour mesurer 20 min à 2 heures d'intervalle

Réactifs

- Antigène de revêtement,
- Sérum (E.1: 1000),
- Carbonate de Sodium,
- Bicarbonate de sodium,
- Trinitride de sodium (N_3Na),
- eau déminéralisée purifiée, des fournitures de laboratoire,
- Eau distillée,
- Lait,
- Solution tampon Tris (TBS) 10X,
- Comprimé de substrat pour la Phosphatase alcaline,
- Tween-20,
- glycérol ultra pur,
- Anticorps de chèvre anti-IgG humain marqué avec la Phosphatase alcaline,

Préparation des solutions:

- Tampon de revêtement (10X): (Carbonate de Sodium 0.15M + Bicarbonate de sodium 0.35M), pH = 9,6,

Pour préparer 1000 ml de Tampon de revêtement (10X), dissoudre 15.74g du carbonate de sodium (Na_2CO_3) et 29.4g de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) dans 1000 ml d'eau distillée.

* Note: Pour préparer une solution 1X à partir d'une solution 10X mélangée à 100ml solution 10X et 900 ml d'eau distillée.

- Tampon de lavage: 0,1% de Tween-TBS.

Pour 1000 ml de tampon de lavage, mélanger 100 ml TBS (10x), 900 ml eau distillée et 1ml de Tween-20. Mélanger avec un agitateur magnétique pendant au moins 20 min à température ambiante avant utilisation.

- Tampon de Dilution / Blocage: 5% de lait dans du TBS (1X).

Pour préparer 300 ml de Tampon de dilution/blocage, mélanger 15g lait écrémé en poudre et 300 ml de TBS (1x) dans un Erlenmeyer sur l'agitateur magnétique pendant 20 minutes ou jusqu'à dissolution complète. Conserver à 4 ° C pour un maximum de cinq jours. Facultatif:

1) faire des aliquotes de 50 ml pour préparer du blocage / tampon dilution et conserver à -20°C

2) Ajouter le trinitride de Sodium (0,01% final) au tampon de Dilution/ de la manière suivante et le lait peut être stocké pendant 2-3 semaines.

Pour obtenir le tampon de dilution/ blocage (1x) au trinitride de Sodium (0,01%): Mélanger 500 ml de tampon Dilution/ blocage (1x) et 2,5 ml de Trinitride de Sodium à 2%. Le tampon de dilution/ blocage (1x) au trinitride de Sodium doit être gardé dans l'obscurité.

- glycérol (50%) pour la dilution secondaire des anticorps: mélanger 5 ml glycérol (100%) et 5 ml d'eau distillée. Stériliser par filtration et le garder en aliquotes de 1.5 ml à -20°C.

- solution d'anticorps secondaire:

Note: * Les lyophilisés des anticorps secondaires sont reconstitués à 1 mg/ml avec 50% dans du glycérol (50%) et stockés à -20°C. Mélanger 10 µl de la solution d'anticorps secondaires marqués avec de la phosphatase alcaline (1mg/ml) avec 10 ml de du Tampon de dilution/ blocage (1x). Cette solution peut être préparée pendant que les plaques sont en incubation avec les anticorps primaires.

- Solution de substrat.

Pour 10 ml de solution de substrat, dissoudre 2 comprimés de substrat Phosphatase dans du tampon de revêtement (1x). Utiliser 10 ml de solution de substrat par plaque. Cette solution doit être Préparée juste avant la fin de l'incubation avec les anticorps secondaires.

Procédures

Revêtement des plaques avec l'antigène

* Note: Les plaques revêtu avec l'antigène doivent être conservées à 4°C et doivent être utilisées dans un délai d'une semaine.

- Identifier chaque plaque avec le nom de l'antigène et la date de revêtement avec marqueur indélébile sur le côté de la plaque.
- Le revêtement de chaque plaque nécessite 10 ml de solution de revêtement. Déterminer le volume total de solution de revêtement nécessaire pour revêtir le nombre de plaques Utilisées.
- Diluer l'antigène de revêtement dans le tampon de revêtement (1x) à une concentration de 1µg/ml dans un tube de 50 ml ou un Erlenmeyer de 250 ml. La dilution souhaitée de l'antigène est déterminée par la concentration de la solution mère d'antigène.
- Mélanger la solution en retournant le tube ou le flacon, puis versez la solution dans le bassin de solution pour micropipette multicanal.
- En utilisant une micropipette multicanal, mettre chaque puits 100 µl de la solution de revêtement.
- empilez soigneusement les plaques en utilisant une plaque vide comme fermeture de l'autre, et les envelopper dans une pellicule en plastique ou en aluminium. Laissez les plaques pendant au moins une nuit au réfrigérateur à 4 ° C.

Plaques de blocage

- Prendre un nombre désiré de plaques du réfrigérateur. Marquer chaque plaque avec un marqueur indélébile.
- Laver les plaques à l'aide de la machine de lavage des plaque ELISA ((ELISA Ultrawash ELISA Plus, Dynex Technologies). Prendre soin de s'assurer que les plaques ne sont pas complètement séchées avant d'ajouter le tampon de blocage.
- A l'aide d'une pipette multicanal, mettre dans chaque puits 200 µl de tampon de blocage et de placer les plaques dans la chambre humidifiée (Square BioAssay-vaisselle) ou les couvrir d'une pellicule en plastique et laisser pendant 2 heures ± 15min à température ambiante.
- Laver les plaques. Remplir les plaques avec le tampon de lavage si les anticorps primaires ne sont pas prêts à être appliquées immédiatement.

- Mettre les plaques dans une chambre humidifiée jusqu'à ce que les anticorps primaires soient prêts à être appliqués.

Préparation des sérums à tester et préparation des plaques

* NOTE: 24 sérums en triple exemplaire, à une seule dilution peuvent être testés sur une plaque.

Sérum standard de dilution. Une série de dilution en double exemplaire, des sérums de référence sont inclus dans chaque plaque d'ELISA.

Application des anticorps primaire (sérums)

- Veiller à ce que toutes les plaques revêtues, les plaques de dilution des sérums test et les plaques de sérums standard soient disponibles et à la température ambiante. Régler le volume de deux pipettes (STANDARD et TEST) multicanaux 50-300 μl à 100 μl

- Régler le chronomètre à 2 heures. Utiliser autant de chronomètre que de plaques ELISA utilisées pour le dosage.

- A l'aide de la pipette multicanal TEST, mélanger le contenu des puits de la ligne A de la plaque de dilution et ensuite transférer 100 μl dans les puits de la ligne A de la plaque ELISA correspondante. Ne pas changer d'embout, utiliser le même embout pour l'ensemble des trois rangées A, B et C. Mélanger le contenu des puits de la ligne B de la plaque de dilution et transférer 100 μl dans les puits de la ligne B de la plaque ELISA correspondante. Mélanger le contenu des puits de la ligne C de la plaque de dilution et transférer 100 μl dans les puits de la ligne C de la plaque ELISA correspondante.

- Changer les embouts. A l'aide de la pipette multicanal "TEST", mélanger le contenu des puits de la ligne D de la plaque de dilution et ensuite transférer 100 μl dans les puits de la ligne D de la plaque ELISA correspondante. Ne changer pas l'embout, utiliser le même embout pour l'ensemble des trois rangées D, E et F. Changer les embouts, mélanger le contenu de la ligne G de la plaque de dilution et ensuite transférer 100 μl de la ligne E de la plaque ELISA correspondante. Mélanger le contenu de la ligne H de la plaque de dilution et ensuite transférer de 100 μl dans les puits de la ligne F de la plaque ELISA correspondante.

- Lorsque 6 lignes de la première plaque ELISA ont été pourvus, en utilisant la micropipette "STANDARD", et en prenant soin que la pipette est toujours utilisée dans la même orientation, transférer 100 μl d'une rangée de la plaque de dilution standard à

la ligne G de la plaque ELISA. Sans changer d'embout, transférer 100µl des puits de la ligne suivante de la plaque de dilution standard aux puits de la ligne H de la plaque ELISA.

- Premier démarrer le chronomètre et mettre la plaque ELISA dans une chambre humide.
- Le temps d'incubation des sérums (anticorps primaires) est de 2 heures à la température ambiante.

Lavage et application des anticorps secondaires

- Pendant l'incubation avec les anticorps primaires, réorganiser les plaques dans la chambre humide de sorte que la première plaque soit plus accessible, seconde suivante, etc. Préparer anticorps secondaires. Veiller à ce que la machine de lavage des plaques soit allumée et qu'un volume suffisant de tampon de lavage soit préparé.
- A 2 heures commencer à laver la plaque. Dès que la plaque est lavée, régler le chronomètre à 2 heures et ajouter 100µl de dilution des anticorps secondaires dans chaque puits, en utilisant les micropipettes multicanal de 50-300µl. Démarrer le chronomètre
- Le temps d'incubation des anticorps secondaires est de 2 heures à la température ambiante.

Lavage et l'addition du substrat

- Pendant l'incubation avec un anticorps secondaire, au moins 30 minutes avant la fin de l'incubation, allumer le lecteur de la plaque ELISA (SpectaMAX ELISA Reader).à 10 minutes avant la fin de l'incubation préparer la solution de substrat. A la fin de l'incubation (2 heures) commencer à laver la plaque,
- Régler le chronomètre à 20 minutes. Dès que la plaque est lavée, s'assurer que le fond de la plaque est propre (essuyer soigneusement avec un tissu si nécessaire). En utilisant une micropipette multicanal, ajouter 100 µl de substrat par puits. Démarrer le Chronomètre. Recouvrir la plaque avec du papier aluminium.

Lecture des plaques ELISA

- A la fin des 20 minutes, lire la plaque à 405 nm sur SpectraMAX ELISA Reader. Le lecteur doit être programmé pour agiter la plaque pendant 5 secondes avant de lire.
- Enregistrer les données sous forme de fichier pdf.

Serment de Galien

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

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;

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

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

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

Je le jure !