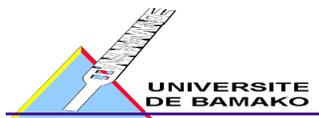


Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la recherche scientifique

République du Mali

Un Peuple – Un But – Une Foi



Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2010 – 2011

N °/

TITRE

Etude des Cellules T Régulatrices dans la protection contre le paludisme dans une Cohorte d'Enfants Vivant en Zone d'Endémie Palustre

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 03/02/2011

devant le jury de la faculté de médecine de pharmacie
et d'Odontostomatologie du Mali.

Par M. BOUBOU SANGARE

Pour obtenir le grade de docteur en médecine

(DIPLÔME D'ETAT)

JURY

Président : Professeur Ogobara K. DOUMBO

Membres : Docteur Mahamadou DIAKITE

Co-directeur : Docteur Bakary MAIGA

Professeur Boubacar TRAORE

Directeur de thèse : Professeur Agrégé Amagana DOLO

**DÉDICACES ET
REMERCIEMENTS**

DÉDICACES

A mon père : MOUSSA SANGARE

Ça été pour moi une bénédiction divine de t'avoir comme père, toi qui as tout accepté pour que je sois ce que je suis aujourd'hui, tu m'as inculqué le savoir vivre, le savoir être et le savoir faire. Tu m'as inscrit à l'école et veillé au jour le jour à ma réussite, cher papa les mots me manquent pour témoigner ma gratitude à ton endroit. Cependant en tant que fils je te demande humblement pardon pour toutes les fois où j'ai pu te blesser. Bahban, que Dieu te garde parmi nous le plus longtemps que possible et te bénisse, Amen !!!

A ma mère : DJENEBA DIALLO

Je ne saurai avoir la manière appropriée de t'exprimer ma reconnaissance en ce jour béni, jour de joie que fait le Seigneur, toi qui me connais plus que tout, toi qui as tout accepté pour moi, maman ce travail est l'œuvre de tes bons conseils et de ton attachement infini à l'éducation de tes enfants. « Angnan », « Na dorgo », « Innan » que Dieu maître de l'univers, t'accorde grâce sur grâce et te garde au près de nous, Amen !!!

A mes frères et sœurs :

Hammidou, Sidy, Ablo, Mamoudou, Gabdo, Oumou, Hammadoun, Kadidia et Malado, vous avez été d'un grand apport pour moi pendant ce long processus, ce travail est aussi le votre.

A mon frère de case défunt Abdrahamane Boiré : Que le temps vécu en ta compagnie fut court pour nous de réaliser ensemble tous nos projet porteurs mais, qu'il a aussi été suffisant pour comprendre que nous ne resterons pas éternellement sur cette terre d'où la culture dans nos cœurs de la foi et la sagesse. Que Dieu le tout Puissance, le Miséricordieux, l'Être de par lequel la providence de ce monde est gouvernée, l'omniscient, l'omnipotent, l'omniprésent te reçoit en son sein

Toutes les réussites de ce travail te reviennent ainsi qu'à toute ta famille.

A ma fille chérie Fatoumata : Toute ma réussite sur cette terre ne pourra que revenir à toi et ta mère Mariam. Que Dieu me donne le temps nécessaire de t'aimer et te voir devenir femmes.

REMERCIEMENTS

A mes pères et mères Hammadoun dit Kaou, Moussa, Ibrahim, Fatouma, Djeneba, Hawa et Djehngui, plus que des parents vous avez été pour moi une bénédiction, un espoir, depuis ma naissance jusqu'aujourd'hui. Vous qui m'avez supporté, soutenu dans les moments de difficultés comme dans les moments de joie, chers parents, que Dieu lui même vous récompense et vous garde auprès de nous pour le reste de vos jours.

A mes frères ainés Adama, Hamidou, Sidy, Abdoulaye, Mammoudou et Barou, et à toutes leurs familles, merci pour tous les sacrifices consentis.

A mes sœurs ainées Aïssata, Hawa, Gabdo, Binta et toutes leurs familles, merci pour le soutien sans faille.

A mes frères et sœurs cadets Gabdo, Oumou, Adama, Kola, Hammadoun, Fanta, Fatoumata, Binta, Aïssata, Tako, Kandidia, Malado, cette œuvre est aussi la votre.

A la famille Diallo, Barry et Sankare à Bamako, Sofara, Sévaré et San merci pour tout le soutien pendant les moments de joies et de peines.

Aux tables de belotte de « Point G » et Faladiè, merci infiniment

A Gourou Sankaré et sa famille à Bamako pour l'hospitalité et la chaleur humaine depuis Sévaré, là où j'ai effectué mon lycée et mes premiers stages de vacances. Merci pour tout et que Dieu lui même vous en récompense au centuple.

A tonton Enconssa Diallo et Famille depuis Sofara merci pour tout le soutien.

A tous mes oncles et tantes, ce travail est aussi le vôtre.

Etude des cellules T regs dans une cohorte d'enfants d'une zone d'endémie palustre du Mali

A tous mes cousins et cousines, ce travail est aussi le fruit de vos efforts.

A tout le personnel de l'hôpital de Mopti : là où j'ai effectué mes débuts de stages de vacances.

Aux familles Sangaré dans diverses localités du Mali et d'ailleurs.

A mes amis et compagnons de la FMPOS: Charles Dara, Modibo Doumbia, Tiémoko Sogodogo, Kalidou Bane, Oumar Cisse, Seydou Sy, Aly Guindo, Salif Koné dit Bina, Mohamed Keita, Zoumana Isaac Traoré, Abderahamane Kane, Diawara dit Yougo, Nouhoum Guindo, Rayso Abdin, Fatoumata Traore, Fatoumata Kone dite la courte, Diouma Kansaye, Nene Konipo, Ibrahim G Diallo, Aïssata Goïta, Amadou Kone, Anou Moïse Somboro, Allaye G Diallo, Moussa Y Sanogo, Raymon Sacko, Yacouba Kassambara, Omar Dolo, Rokia Diarra dite Kia, Aminata Dabo, Karamogo Coulibaly dit Master, merci pour tous vos soutiens.

A mes amis et compagnons: Abdrahamane Cisse, Abdoul Razac, Josephe Doumbia, Nouhoum Guindo, Adama A Togo, Ladji, les Familles Sow à Segou et Sofara, Mariam Sow, Allaye B Diallo, Seydou Bah, Amadou Kontao, Balla Diarra, Les familles Cisse à Bamako, Tonka et Sofara, Mariam Cisse, Dicko Cisse, Aïssata Cisse, Nana S Diallo, Fanta Sall.

A mes collègues internes du DEAP et d'autres services : Hammadoun Diakité, Sidiki Konaté, Ahmadou Dembélé, René Dembélé, Modibo Traoré, Sory Traoré, Hawa Soumaré, Nouhoum Diallo, Yamoussa Keita, M^{me} Dembélé Elizabeth ; Merci pour tout et beaucoup de courage pour la réalisation de vos différentes thèses.

A mes camarades de lutte à la FMPOS : Charles Dara, Nouhoum Guindo, Tiomogo Sogodogo, Josephe Sagara, Mohamed Diakité, Modibo Doumbia, Salif koné, Seydou Sy, Ousmane Diawara, Kalidou Bane, Massedou Traoré, Mamadou D Traoré ; Fousseni Traoré, Youssouf Traoré, Mohamed Keita, Moussa Y Sanogo ; ce travail ne saurai se réalisé sans votre concours, merci pour tout.

A mes frères : Hammadoun Diallo, Oumar Diallo, Zaka Cissé, Sekou Barry, Nouhoum Diallo, Allaye Barry, Bocar Gino, Sekou Diallo, Sekou A Diallo, Mahamoudou Diallo, Kolla Dehmbeli, Kisso Kolla, Seydou Kororie, Bara Kolla, Benbarec, Hamma,

Remerciement

Etude des cellules T regs dans une cohorte d'enfants d'une zone d'endémie palustre du Mali

Bona, Daouda Diallo, Abdourahamane Diallo, Hambagana Diallo, Allaye Diallo, Ibrahim Diallo, Kolla Diallo, Papou Diallo, à tous ceux dont le nom ne me suis pas venu en tête que Dieu lui-même soit votre récompense.

A mes sœurs : Aminata Barry, Mariama Diallo, Dicko Barry, Oumou Barry, Kadidia C Diallo, Aissata M Diallo, Penda Diallo, Anta Diallo, Kadidia Diallo, Oumou Diallo, Ada Diallo, Hawa Diallo, Binta Diallo, Maladoh Anconsa, Gahdo Diallo, Binta Souka, Gahdo Penda, à toutes celles dont les noms ne figurent pas ici ; Merci pour tout.

A mes Chéries : Namoye, Kadia, Diouldé, Safi, Oumou, Pehndou, Diouma, Fatim, Balakissa, Tenin, Kissa, Mariam et toutes celles dont les noms ne sont pas mentionnés par omission d'esprit et non de fait exprès que le seigneur vous dote de gros cœur de pardon et merci infiniment pour le soutien et la souffrance endurée tout au long de ce travail. Quoi de plus merveilleux que de vous avoir comme épouses.

A mes maîtres et aînés du DEAP: Merci infiniment pour tous vos efforts.

Aux Docteurs : Amadou Tapily, Abdoulaye Tapily, Paul Kamaté, Golou Togo, Younouss Koné, Hamidou Niangaly, Moussa Niangaly, Abdramane Traoré, Moussa Djimdé, Mèrèpen dite Agnès Guindo, Amadou Niangaly, Etienne Guirou, Réunion Saye, Youssouf Tolo, Samba Coumare, Jacob Dara, Falaye keïta, Abdrahamane Bathily, Binta Barry, Abdoul K Sangare, Moussa Niangaly, Antoine Dara, Hamidou Niangaly, Amadou Niangaly, Mohamed Keïta. Merci pour la collaboration et le soutien indéfectible.

A tous les professeurs et chargés de cours à la FMPOS, pour les qualités de l'enseignement dont nous avons bénéficié.

Aux membres de l'unité d'immunologie et GLP

Aux autorités de Madougou et notables pour votre soutien.

Aux corps enseignant de Mantéourou et de Madougou, pour tout le soutien.

Etude des cellules T regs dans une cohorte d'enfants d'une zone d'endémie palustre du Mali

M. Mamadou Ba pour la qualité de la formation et votre générosité.

Aux chercheurs et à tout le personnel du MRTC/DEAP

A mes frères et sœurs de l'ASP CVI.

A mes frères et sœurs de l'AERMOS (Association des Étudiants Ressortissants de la région de Mopti et sympathisants) Ce travail est aussi le vôtre.

A nos partenaires français de COMALI.

A tout le personnel du CSCOM de Madougou, du CsRéf de Koro pour tous les efforts consentis.

Aux victimes du paludisme

A tous ceux qui de près ou de loin ont concouru à la réalisation de ce travail, que le seigneur lui même soit votre récompense

Remerciements particuliers

Docteur Bakary MAIGA

Nous avons beaucoup apprécié vos qualités humaines et vos compétences pratiques sur le terrain.

Votre contribution à la réalisation de ce travail est inestimable, au delà des connaissances que nous avons pu acquérir à vos cotés.

Veillez recevoir ici, l'expression de notre profonde gratitude.

Docteur Modibo DAO

Nous avons apprécié votre disponibilité, votre simplicité, votre rigueur et votre souci du travail bien fait. Trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude et nos sincères remerciements.

Docteur Charles ARAMA

C'est l'occasion de vous remercier pour tous les efforts consentis pour que nous soyons là aujourd'hui. Votre générosité et votre disponibilité ne nous ont jamais fait défaut. Recevez ici nos sincères remerciements.

A ma mère chérie défunte Anna Diallo : A travers ta personne j'ai appris que la parenté n'est pas liée à un standing social mais plutôt une prédisposition d'esprit à comprendre le monde et consolider les alliances. Homme avec toutes ses qualités et tous ses défauts, un être humain tout court, tu resteras pour moi une ressource à valeur inestimable. Que la terre te soit légère maman et que le bon Dieu te reçoit en son sein. A travers toi je souhaite un bon séjour à tout ceux qui ont perdu la vie jusqu'à ce jour.

A mes frères et sœurs de case : Addrahamanne Cissé, Tiémoko Sogodogo, Youssouf Doumbia, Charles Dara, Nouhoum Guindo, Allaye B Diallo, Raysso Abdi, Seybou Bah, Modibo Doumbia. A travers vos compassions et appuis, la chaleur humaine a tout ce qui n'a manqué en aucun moment dans ma vie. Qu'Allah le tout Puissant nous donne toujours la joie et surtout la force de toujours se comprendre et se soutenir en vue d'une réalisation de projets sains et bénéfique pour l'humanité tout entière.

Remerciement

Etude des cellules T regs dans une cohorte d'enfants d'une zone d'endémie palustre du Mali

A toute la population de Mantéourou Dogon, Mantéourou Peulh, Naye Peulh, Naye Dogon, Dinsogou, Anakédié, Binédama et aux différents chefs des villages et conseillers qui ont accepté participer aux différentes études malgré leurs différentes occupations.

Aux aides soignants de la case de santé de Mantéourou : Yanogo Doumbo, Amainguère Doumbo et à la matrone Hawa Doumbo sans oublier les guides des différents villages d'études, les manœuvres et cuisinières. Merci pour tous vos efforts dans la réalisation de ce travail ; il est aussi le vôtre.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre maître et Président du jury

Professeur Ogobara K. DOUMBO

- Professeur titulaire de parasitologie-Mycologie à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.
- Médecin chef du Département d'Epidémiologie et des Affections Parasitaires, (DEAP).
- Directeur du Pôle d'Excellence de Recherche sur le paludisme, Malaria Research and Training Center (MRTC).
- Membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine de France.
- Membre honoraire « Alpha Oméga Alpha Honor Medical Society » des États Unis d'Amérique.
- Chevalier des palmes académiques du CAMES ;

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

Vos qualités professionnelles et sociales notamment votre disponibilité et votre amour du travail bien fait font de vous un maître admiré et respecté de tous.

Retrouvez ici cher maître l'expression de notre sincère reconnaissance.

A notre maître et juge

Docteur Mahamadou Diakité

PharmD. PhD

- PhD en immunogénétique
- Maître assistant en immunogénétique à la FMPOS
- Responsable de l'unité immunogénétique au MRTC

Cher **maître**, vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Par ce geste, vous témoignez de l'importance que vous accordez à la formation de vos étudiants que nous sommes. Vos critiques et vos suggestions ne feront que parfaire ce modeste travail.

Votre abord facile force notre admiration. Cher maître soyez rassuré de nos sentiments les plus respectueux.

A notre maître et co-directeur

Professeur Boubacar Traoré

- Maître de Conférence de Parasitologie – Mycologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie.
- Responsable de l'unité paludisme et grossesse et immuno-pathologie du MRTC.
- Premier assesseur du décanat de la FMPOS.

Cher maître, permettez nous de vous exprimer notre profonde gratitude et nos remerciements sincères pour les directives et conseils reçus au cours de la réalisation de ce travail.

Puisse le Seigneur vous accordez longue vie pour que les futures générations profitent encore de vos connaissances.

Etude des cellules T regs dans une cohorte d'enfants d'une zone d'endémie palustre du Mali

A notre maître et Co-directeur de thèse

Docteur Bakary MAIGA.

MD.

- Maître assistant d'Immunologie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie.
- Médecin chercheur au MRTC/DEAP.

En nous assistant dans la réalisation de cette thèse, vous nous avez profondément marqués de votre personnalité. Vous avez guidé nos pas tout au long de ce travail en encourageant nos initiatives .Votre disponibilité malgré vos occupations nous ont émerveillé. Soyez assuré de notre profonde reconnaissance et de notre affection indéfectible.

A notre maître et Directeur de thèse

Professeur Agrégé Amagana DOLO

PharmD. PhD

- Maître de conférences Agrégé de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.
- Chercheur au MRTC.
- Chef de DER des sciences fondamentales à la FMPOS

Nous ne saurons trouver les mots justes pour vous exprimer notre sincère reconnaissance pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de diriger ce travail.

Nous admirons l'étendue de vos connaissances, votre esprit scientifique, votre rigueur et votre ardeur au travail.

C'est un grand privilège pour nous d'être compté parmi vos élèves.

Plus qu'un maître, vous êtes pour nous un père.

Veillez trouvez ici, cher maître, l'expression de notre profonde gratitude.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN = Acide Désoxyribonucleïque

CPA= Cellules présentatrices d'antigène.

CD= Cluster of differenciation.

CSCom = Centre de santé communautaire

DEAP= Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires.

°C: degré Celsius

MRTC= Malaria research and Training Center.

Foxp3= Forkhead boxp3.

FMPOS= Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie.

GIS= Geographic Informing System.

GITR= Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor.

G6PD= Glucose-6-phosphate Deshydrogenase.

GPS= Geographic Positioning System.

IP= Indice plasmodique.

IS= Indice splénique.

OMS= Organisation Mondiale de la Santé.

MIM/TDR= Multilateral Initiative for malaria/Tropical Diseases Research.

PBMC= Peripheral-blood mononuclear cells.

PCR= Polymerase-chain reaction.

TCR= T cells receptors.

T regs= Lymphocytes T régulateurs.

Tf/ mm³ = Trophozoïtes par millimètre cube

TNF= Tumor Necrosis Factor

SOMMAIRE

Pages

1. Introduction	1
2. Objectif	4
3. Généralités	5
3.1 Aspects cliniques du paludisme.....	5
3.2 Immunologie du paludisme.....	9
3.3 Cellules T régulatrices.....	11
4. Méthodologie	13
4.1 Site d'étude.....	13
4.2 Population d'étude.....	14
4.3 Période d'étude.....	15
4.4 Type d'étude.....	15
4.5 Critères d'inclusion et de non inclusion.....	15
4.6 Taille de l'échantillon.....	16
4.7 Conception et déroulement pratique de l'étude.....	16
4.8 Variables mesurées.....	17
4.9 Définition opérationnelle.....	18
4.10 Personnel et organisation du travail.....	18
4.11 Techniques de l'étude.....	19
4.12 Considération éthique.....	37
4.13 Saisie et analyse des données.....	37
5. Résultats	38
5.1 Population d'étude.....	38

5.2	Résultats parasito-cliniques.....	39
5.3	Résultats hémato-immunologiques.....	42
6.	Commentaire et Discussion.....	48
7.	Conclusion et Recommandation.....	50
8.	Résumé.....	53
9.	Références.....	55

1. Introduction

Le paludisme est une maladie mortelle due à la présence et la multiplication dans le foie puis dans le sang des parasites du genre *Plasmodium*. Il est transmis par les piqûres de moustiques infectés (Anophèles femelles)¹.

Cinq espèces plasmodiales sont inféodées à l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* et *P. knowlesi*². De ces cinq espèces, *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* sont les plus répandus, les plus dangereux et peuvent être mortels³.

Endémie parasitaire majeure, il touche particulièrement les zones tropicales défavorisées d'Afrique, d'Asie, et d'Amérique latine⁴. Environ 3,3 milliards d'être humains, vivant dans 109 pays et territoires, sont confrontés à ce risque, dont 45 pays sont situés dans la région Africaine selon l'OMS⁵. Avec 247 millions de cas cliniques en 2006, dont 880 000 de cas mortels, le paludisme est l'une des maladies les plus mortelles ; il touche surtout les enfants et les femmes enceintes.

En Afrique, 74% de la population vit en zone stable endémique, 18% en zone à paludisme instable et seulement 7% en zone indemne de paludisme ou avec un très faible risque de paludisme^{6,7}. L'OMS estime que 86 % des cas de paludisme clinique se produisent en Afrique et 91% des cas de décès dont 85% chez les enfants de moins de cinq ans. Erreur : source de la référence non trouvée. Dans ce même continent, le paludisme est responsable de 25 à 40% de l'ensemble des consultations externes et de 20 à 50% de toutes les hospitalisations⁸. Il tue un enfant toutes les 30 secondes⁹.

Au Mali le paludisme représente 30% des décès à l'hôpital, 38% des hospitalisations et 32% des consultations externes¹⁰. Dans ce pays, il est la première cause de morbidité (32,4%) et de mortalité (45,7%) chez les enfants de moins de 5 ans¹⁰. Cette affection occupe la première place dans les étiologies des convulsions fébriles de l'enfant et du nourrisson (49,1%)¹¹ et 16,7% des hospitalisations dans le service de pédiatrie du Centre Hospitalo-universitaire (CHU) « Gabriel Touré »¹².

Il demeure la première cause de morbidité (83,3%) et de mortalité (65,8%) chez les enfants de 0 à 14 ans dans le service de pédiatrie de l'hôpital régional de Sikasso¹³. Chez les populations vivant en zone d'endémie palustre, les individus ne présentent pas le même comportement vis-à-vis de l'infection palustre selon leur background génétique.

La différence de susceptibilité interethnique au paludisme est bien décrite de nos jours, notamment en 1976 au Nigeria par Bryceson et *al* ;¹⁴ en Gambie par Greenwood et *al* en 1987¹⁵; par Modiano et *al* en 1995-1996 au Burkina Faso^{16, 17} et au Mali en 2000, 2004, 2005 et 2006^{18, 19, 20, 21}.

Toutes ces études de susceptibilité au paludisme entre groupes ethniques indiquent que les Peulh étaient moins parasités, moins affectés par la maladie et présentaient de fortes réponses immunitaires anti palustres par rapport à leurs voisins non Peulh¹⁶. L'utilisation des mesures de prophylaxie était comparable entre les deux groupes ethniques, ce qui exclurait l'implication de facteurs socioculturels et environnementaux aux différences observées. Les données disponibles sont en faveur de l'existence d'un éventuel facteur immunogénétique de résistance des Peulh au paludisme.

Les premiers travaux ont mis en évidence le rôle de l'immunité humorale et ont trouvé que le niveau des différents anticorps anti palustres, était significativement plus élevé chez les Peulh par rapport aux Dogon¹⁹.

Des travaux sont en cours au MRTC/DEAP en vue d'investiguer le rôle de l'immunité cellulaire dans la différence interethnique de susceptibilité au paludisme. Les lymphocytes de phénotypes gamma delta et les cellules T régulatrices pourraient être impliqués dans la différence de susceptibilité au paludisme²². La compréhension des mécanismes qui sous-tendent le rôle

potentiel de cette population de cellules T (les T reg) dans la susceptibilité et/ou la résistance au paludisme pourrait aider dans la lutte et le développement des outils de contrôle de cette endémie.

Nous nous proposons dans la présente étude d'analyser l'association entre l'incidence de l'accès palustre simple et la dynamique des cellules T régulatrices dans une cohorte d'enfant vivant en zone d'endémie palustre.

2. Objectifs

2.1 Objectif général:

Etudier le rôle des cellules T régulatrices dans la protection contre le paludisme dans une cohorte d'enfants vivant en zone d'endémie palustre.

2.2 Objectifs spécifiques:

- 1) Déterminer la proportion des cellules T régulatrices dans la cohorte à l'inclusion ;

- 2) Déterminer le risque de l'accès palustre simple en fonction de la proportion des cellules T régulatrices dans la cohorte ;

- 3) Déterminer le nombre de cellules T régulatrices productrices des cytokines (IL-10, TGF β) et le niveau d'expression du marqueur (Foxp3) dans la cohorte.

3. Généralités :

3.1 Aspects cliniques du paludisme

3.1.1 Physiopathologie

La fièvre est provoquée par des endotoxines pyrogènes relâchées par des monocytes et macrophages en réponse à des substances non protéiques libérées lors de la rupture des schizontes²³. Ces pyrogènes endogènes comprennent une famille de cytokines qui agit sur le

centre de thermorégulation de l'hypothalamus, qui induit la synthèse d'une prostaglandine E2. Ainsi, se met en marche la réponse physiologique qui provoque la fièvre, les frissons, une vasoconstriction périphérique et une augmentation du métabolisme.

Cette famille de cytokines est aussi responsable de nombreux autres symptômes qui accompagnent la fièvre, comme les douleurs diffuses, insomnies et une perte de l'appétit.

Différentes observations identiques s'accordent à dire que le TNF- α est un indicateur clé de la fièvre palustre²⁴. D'autres cytokines comme les interleukines (IL-1 α , IL-1 β , INF- γ IL6) ont des propriétés pyrogènes²⁵.

La splénomégalie et l'hépatomégalie témoignent de l'hyperactivité du système phagocytes mononuclés, chargé d'éliminer l'organisme aussi des pigments malariques que des débris érythrocytaires²⁶.

3.1.2 Formes cliniques

❖ Accès palustre simple :

Les accès simples se produisent selon une périodicité de 36 à 48 heures pour *Plasmodium falciparum*. Ils évoluent de façon stéréotypée en trois phases:

-Phase de frisson (1heure): sensation de froid intense, le malade grelotte et accumule des couvertures, la température monte à 39°C, le pouls est rapide et la tension est basse. Il existe parfois une splénomégalie.

-Phase de chaleur (2 à 6heures) : la température atteint 40°C; la peau est brûlante. Le malade rejette les couvertures, la soif, les nausées et les céphalées sont fréquentes, la rate diminue de volume.

-Phase de sueur (1 à 2heures) : abondante, le malade mouille ses draps, la température chute et est suivie de sensation de bien-être.

L'accès palustre est simple car n'est associé à aucun signe de gravité
Erreur : source de la référence non trouvée

❖ **Formes graves et compliquées**

La physiopathologie du paludisme grave et compliqué est déterminée par des processus immunopathologiques complexes²⁷.

Les théories actuelles attribuent un rôle central à la cyto-adhérence des hématies parasitées et leur séquestration dans les micro-capillaires endothéliaux ainsi qu'aux cytokines pro-inflammatoires²⁴,
²⁸.

● **La Cyto-adhérence:**

La cyto-adhérence des hématies parasitées repose sur deux facteurs :

- Le ligand : Au niveau du globule rouge la cyto-adhérence se fait par l'intermédiaire de protubérances membranaires ou « Knobs » au sein desquelles des adhesines plasmodiales spécifiques ont pu être caractérisées. Parmi celles-ci, la PfEMP-1 est la mieux connue. Cette protéine très variable dans sa structure, sa fonction et son expression est composée de la succession de différents domaines de type CIDR (Cysteine Rich Inter Domain Region) ou de type DBL (Duffy Binding-Like)²⁹.
- Les récepteurs : Au niveau endothélial un certain nombre de récepteurs, parmi lesquels CD36, ICAM-1, selectine E, thrombospondine, VCAM, PECAM1, CSA ont été identifiés. Les combinaisons des domaines de PfEMP1 avec les récepteurs endothéliaux peuvent être diverses, chaque domaine se lie avec un récepteur différent mais spécifique du domaine³⁰.

- **La séquestration:**

La séquestration est une conséquence de la cyto-adhérence. Elle est caractéristique de l'infection à *P. falciparum*. Les hématies parasitées par les plasmodies en maturation (trophozoïtes âgés, schizontes, rosaces) sont séquestrées dans les veinules et les capillaires de certains viscères (cerveau, poumons, cœur, placenta).

Le métabolisme intense des plasmodies dans les viscères (siège de la séquestration) se fait aux dépens des cellules parenchymateuses qui sont ainsi privées d'oxygène et de glucose. Les substances produites par le métabolisme parasitaire (lactate, radicaux oxydants) exercent un effet toxique sur les cellules de l'hôte.

● **Les Cytokines :**

Les cytokines sont non seulement responsables de la fièvre mais aussi pourraient, lorsqu'elles sont produites en grande quantité, aggraver l'état du malade. Le TNF- α (ou cachectine), secrété par les macrophages, peut provoquer plusieurs signes de complications du paludisme grave. En fait, la sécrétion du TNF- α s'intègre dans une cascade d'autres cytokines qui interviennent dans la pathogénie du paludisme grave: IL1, 2, 3,10; interféron γ , GM-CSF³¹.

❖ **Fièvre bilieuse hémoglobinurique**

Ce phénomène est d'origine immuno-allergique lié à la sensibilisation des globules rouges à la prise des antipaludiques de la classe des amino-alcools. Il en résulte d'abord une destruction des globules rouges, suivie d'une anémie et une hémoglobinurie³².

3.2 Immunologie du paludisme

Au cours d'une infection palustre, l'organisme humain réagit selon deux types de mécanismes:

- ❖ l'immunité non spécifique ou innée.
- ❖ l'immunité spécifique ou acquise qui est une réponse spécifique d'espèces, de souches et de stades de développement du parasite, impliquant la réponse humorale, cellulaire après plusieurs expositions en zone d'endémie.

3.2.1 L'immunité naturelle

La résistance innée au paludisme se traduit chez l'homme par un état réfractaire au parasite dès le premier contact.

Les mécanismes qui déterminent cette résistance innée impliquent essentiellement les facteurs liés au stade érythrocytaire.

La résistance innée peut affecter l'habilité du parasite à envahir les érythrocytes ou à inhiber son développement intraérythrocytaire.

3.2.2 L'immunité acquise

L'acquisition de la réponse immunitaire antipaludique nécessite une longue période d'exposition à des infections répétées. L'installation de l'immunité acquise est d'autant plus précoce que la transmission est intense et stable ; son maintien dépend de la durée d'exposition.

Cette immunité se manifeste par deux types de réponses:

-La réponse humorale (anticorps anti-plasmodiaux).

-La réponse cellulaire qui implique les monocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes T dont les cellules gamma delta T, les cellules T-régulatrices, et les polynucléaires.

A chaque stade du cycle de développement du parasite correspond une réponse immune spécifique de stade.

Les mécanismes de protection contre le paludisme sont complexes et non encore clairement élucidés. Plusieurs études ont été menées afin d'élucider la contribution fonctionnelle des cellules T au cours du paludisme³³.

Dans les zones d'endémie, la particularité de l'acquisition de la réponse immunitaire contre l'infection palustre suggère que des lymphocytes T spécifiques seraient dotés de mécanismes de régulation pour induire une réponse immunitaire efficace³⁴. Les lymphocytes T jouent un important rôle dans la protection immunitaire contre le paludisme notamment les cellules gamma delta T et les cellules T régulatrices.

Les Lymphocytes :

Lymphocytes T :

Plusieurs études ont été menées afin d'élucider la contribution fonctionnelle des cellules T dans la protection contre le paludisme³⁵. Dans les zones d'endémie palustre, la particularité de l'acquisition de la réponse immunitaire contre l'infection palustre suggère que des lymphocytes spécifiques seraient dotés de mécanismes de régulation pour induire une réponse immunitaire efficace. Erreur : source de la référence non trouvée. Au cours de l'infection palustre chez l'homme, une réponse inflammatoire se déclenche parallèlement avec l'élévation de la parasitémie. Ce qui entraîne une réponse régulatrice tendant à maîtriser cette parasitémie.

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans la régulation de l'immunité acquise aussi bien que les cellules T que les cellules B.

3.3 Cellules T régulatrices et susceptibilité au paludisme:

La connaissance des cellules T régulatrices comme entité cellulaire a fait l'objet de controverse en l'absence de marqueurs fiables, l'ambiguïté dans la base moléculaire des phénomènes suppressifs, le manque d'évidence suffisante pour leurs rôles dans les maladies auto-immunes et même la nature évasive de quelques phénomènes suppressifs eux mêmes.

Les lymphocytes T régulatrices sont un sous groupe de lymphocyte TCD4 avec des propriétés immunosuppressives qui servent normalement à empêcher des réactions auto-immunes nocives.

Cependant, les lymphocytes T régulatrices peuvent également interférer avec le déroulement normal de certaines réponses immunitaires telles que l'immunité anti tumorale, antivirale chez l'homme et les rongeurs.

Les T-regs sont identifiées par l'expression à leur surface des marqueurs CD4+ CD25+ avec comme récepteur l'IL2.

Récemment, il a été suggéré que les cellules T régulatrices (T-Reg) joueraient un rôle de médiateur dans le contrôle de l'équilibre immunologique entre l'hôte et le parasite³⁶. Les T-reg qui maintiennent la tolérance immunologique chez l'individu sont caractérisés par l'expression des facteurs intranucléaires de transcription, Foxp3 et GITR et ont un large répertoire antigénique qui identifie divers antigènes du soi et du non soi^{37,38}. Dans une étude longitudinale sur l'infection naturelle à *P. falciparum*, il a été démontré que les cellules T-regs ont un effet immuno-régulateur sur le stade érythrocytaire du parasite *in vivo*³⁹. Il est probable que les cellules gamma/delta T pourraient jouer un rôle essentiel dans l'élimination des parasites et/ou dans la régulation de la réponse immune à l'infection par *P. falciparum* tandis que les cellules T reg pourraient induire une réponse immune délétère. La compréhension des mécanismes par lesquels ces populations de cellules T (gamma delta et les T reg) interviennent dans la susceptibilité et/ou la résistance au paludisme pourrait aider dans la lutte et le développement des outils de contrôle de cette endémie.

4. METHODOLOGIE :

4.1 Le site d'étude:

Nous avons conduit cette étude dans le village de NANGUILABOUGOU, situé à trois kilomètres du village de BANCOUMANA où l'équipe du MRTC dispose d'un centre de recherche depuis 1993. Dans cette zone, la saison des pluies débute en mai/juin et se termine en octobre/novembre. La pluviométrie annuelle moyenne varie de 800 à 1200 mm.

4.1.1 Historique:

La création du village remonterait au 19^{ème} siècle. Les fondateurs vinrent occuper l'actuel site venant de leur village d'origine de Nanguila qui se trouvait sous l'occupation des troupes d'ALMAMY SAMORY TOURE en 1900 (communication orale).

Caractéristiques géographiques : Le village de Nanguilabougou est situé à 63 km au sud-ouest de Bamako sur la rive gauche du fleuve Niger. Il s'étend le long de la route Bamako - Kankan (Guinée). Il est limité au nord-est par le village de Bancoumana, à l'est par le fleuve Niger, à l'ouest par le village de Kouroubougou, au sud-ouest par le village de Nianganabougou. Le village est accessible en toute saison.

4.1.2 Climat: Il est de type soudanien avec des températures très variables au cours de l'année dont les plus basses (18° c) sont observées au mois de janvier et les plus fortes au mois de mai (38° c). La mousson (vent maritime) et l'harmattan (vent continental) définissent les variations climatiques le long de l'année. Une saison pluvieuse de mai à octobre et une saison sèche divisée en sèche froide de novembre à janvier et une saison sèche chaude de février à mai s'alternent durant l'année.

4.1.3 Végétation : Elle est de type savane herbeuse avec quelques galeries forestières le long du fleuve Niger et de son affluent. On y rencontre de grands arbres tels que le karité (*Vittelaria paradoxa*), le Néré (*Parkia biglobosa*), le Tamarinier (*Tamarindus indica*), le Toro (*Ficus gnaphalocarpa*) et des arbustes recouvrant une strate herbacée.

4.1.4 Hydrographie :

Outre le fleuve Niger situé à 5 km du village, un affluent appelé << Koba >> coule de l'est vers le sud du village. Il existe également une grande plaine rizicole qui s'étale entre le village et le fleuve. Ces deux bras constituent alors des facteurs favorisant de l'infection palustre grâce aux gîtes larvaires qu'ils contiennent.

4.2 Population d'étude :

Notre échantillon d'étude était constitué de tous les enfants malinkés répondants aux critères d'inclusion (soit 80 enfants) pour l'évaluation des paramètres paludométriques de base et la surveillance clinique pour évaluer l'incidence des épisodes cliniques du paludisme.

L'islam est la religion la plus pratiquée. Les aliments les plus consommés sont le riz, le tô à base de mil.

Habitat : Les différents types d'habitation rencontrés sont les maisons traditionnelles rectangulaires en banco (qui sont les plus nombreuses), les maisons rectangulaires en banco couvertes de tôles et les cases rondes en banco coiffées d'une toiture en chaume.

Activités économiques : Les principales activités pratiquées sont l'agriculture, l'élevage, la pêche, le commerce et le maraîchage.

Infrastructures socio sanitaires: Le village dispose d'une mosquée, un centre culturel réalisé par la FONDEM (Fondation-Energie-monde), un centre d'alphabétisation réalisé par l'AMAPROS et d'une école fondamentale du premier cycle. Par contre le village ne dispose d'aucune structure sanitaire. Les populations fréquentent le CSCOM de Bancoumana situé à environ 3 kilomètres.

4.3 Période de l'étude :

Nous avons conduit une étude longitudinale de cohorte d'enfants âgés de 3 à 10 ans de septembre 2008 à janvier 2009, période correspondant à la transmission optimale du paludisme. Les enfants ont été observés cliniquement deux fois par semaine durant notre étude. Devant chaque cas de fièvre, une goutte épaisse a été réalisée.

4.4 Types d'études :

Nous avons effectué une étude transversale pour comparer la proportion des cellules T-regs entre les deux groupes 1 (3-5ans) et 2 (6-10ans). Les enfants ont fait l'objet d'un suivi longitudinal deux fois par semaine pendant cinq mois.

4.5 Critères d'inclusion et de non inclusion :

4.5.1 Critères d'inclusion :

- Le consentement libre et éclairé écrit des parents d'enfants est donné avant toute inclusion à l'étude;
- Etre disponible et volontaire à participer à un suivi longitudinal
- Appartenir au groupe ethnique Malinké;
- Etre dans la tranche d'âge de 3 à 10 ans.

4.5.2 Critères de non-inclusion : Nous n'avons pas inclus dans notre étude les enfants porteurs de:

- Toute condition de maladie d'immunodépression confirmée ou suspectée comprenant le VIH (aucun test de dépistage n'a été effectué) par le médecin;

-L'administration chronique (plus de 14 jours) d'immunosuppresseurs ou d'autres médicaments pouvant modifier le statut immunitaire du sujet au début de l'étude. Ceci a concerné les stéroïdes oraux et les stéroïdes inhalés, mais pas les stéroïdes topiques;

-D'autres maladies chroniques (cardio-vasculaires, hépatiques et rénales) suspectées par le médecin pouvant causer un risque supplémentaire à la santé du volontaire;

-Toute autre circonstance et condition suspectée par le médecin pouvant être un risque pour la santé du volontaire.

4.6 Taille de l'échantillon :

L'échantillonnage a été exhaustif et a concerné tous les enfants de 3 à 10 ans répondant aux critères d'inclusion.

4.7 Conception et déroulement pratique de l'étude :

Les enfants de 3 à 10 ans ont été suivis deux fois par semaine pendant 5 mois. A la fin de la saison de transmission, chaque sujet a été rétrospectivement apparié selon le statut clinique à la fin du suivi longitudinal. Ainsi, les sujets qui n'ont pas fait d'épisodes palustres ont été classés comme résistants au paludisme (les cas) et ceux qui ont fait plus d'un épisode palustre ont été classés comme sensibles au paludisme (les témoins).

4.8 Variables Mesurées :

Nous avons mesuré les variables suivantes :

❖ Paramètres sociodémographiques :

.Age,

.sexe.

❖ Paramètres hématologiques :

.Types d'hémoglobine,

.Génotype de G6PD.

❖ Paramètres cliniques :

.La température,

.La rate,

.Le poids.

❖ Paramètres parasitologiques

.L'indice plasmodique,

.Espèce plasmodiale,

.Stade parasitaire.

❖ Paramètres immunologiques

.T-regs : cellules productrice d'IL-10, de TGFβ, Expression de Foxp3.

4.9 Définition opérationnelle :

- Fièvre : est définie comme toute élévation de la température axillaire au delà de 37,5°C sans correction.
- Accès palustre : est définie par la présence de la forme asexuée de P-falciparum avec une parasitémie supérieure à 0 associée à la présence de fièvre mesurée ou déclarée dans les 24heures.

- L'incidence : représente le nombre de nouveaux cas d'une maladie apparue dans une population exposée au risque de la maladie pendant une période donnée.
- L'indice plasmodique (IP): est le pourcentage de sujets dans une population examinée, dont les étalements sanguins relèvent la présence d'hématozoaires quelque soit l'espèce plasmodiale en cause.
- Cas confirmé : présence de fièvre associée à une goutte épaisse positive.
- Cas présumé : cas cliniquement diagnostiqués sans analyse biologique.
- Taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes/jours : c'est le taux d'incidence du paludisme par personnes/temps.

4.10 Personnel et organisation du travail :

Le personnel était constitué de:

- Un parasitologue : pour la lecture des lames de goutte épaisse.
- Un médecin chercheur : pour les investigations cliniques.
- Un pharmacien chercheur : pour les prélèvements sanguins.
- Un interne en médecine : pour les prises de paramètres.
- Un interne en pharmacie : pour les confections de gouttes et confettis.
- Trois guides : pour la mobilisation des sujets de l'étude.
- Un chauffeur : pour le transport des échantillons.
- Une cuisinière : pour la restauration.

Organisation du travail :

Le personnel était reparti en :

- Poste d'identification: tous les sujets ont été identifiés à ce niveau; il était tenu par les guides qui facilitaient la communication entre la population et notre équipe. Ils identifiaient les sujets, établissaient les fiches de liaison sur lesquelles étaient mentionnées le numéro d'étude, nom et prénom du sujet, nom et prénom du chef de famille.

- Poste de clinique: le médecin chercheur et l'interne en médecine ont effectué l'examen clinique complet des patients (l'accueil, l'interrogatoire, prise de température, de poids). Ils ont effectué la palpation de la rate, cherché les autres pathologies couramment rencontrées dans la localité. Tous les sujets ont été traités à ce niveau par ces cliniciens.

- Poste de biologie: les examens biologiques (la goutte épaisse, les confettis) ont été effectués à ce niveau.

4.11 Technique d'étude

4.11.1 Evaluation Clinique et traitement

➤ Matériel clinique :

-Balance

-Tensiomètre

-Thermomètre électronique

-Un stock de médicaments essentiels

-Fiches cliniques

-Un registre de recensement de la population

-Un registre de consultation.

➤ **Prise de la température** : la température était mesurée à l'aide d'un thermomètre électronique en le plaçant sous l'aisselle. Elle a été exprimée en degré Celsius. Toute température supérieure ou égale à 37,5°C (sans correction) a été considérée comme cas de fièvre.

- **Prise de poids** : elle a été faite par une balance pèse-personne. Le poids était exprimé en kilogramme.
- **Palpation de la rate** : elle a été faite chez un sujet debout et a permis de classer les splénomégalies selon la classification de HACKETT (1944) en 5 stades :
 - **Rate 0** : rate normale non palpable même en inspiration profonde.
 - **Rate I** : rate palpable sur la ligne mammelonnaire gauche, en inspiration profonde.
 - **Rate II** : rate palpable sur la ligne mammelonnaire gauche, mais ne dépassant pas une horizontale passant à égale distance entre le rebord costal et l'ombilic.
 - **Rate III** : rate dépassant cette ligne sans dépasser l'ombilic.
 - **Rate IV** : rate dépassant l'ombilic sans franchir l'horizontale passant à égale distance entre l'ombilic et la symphyse pubienne.
 - **Rate V** : la rate dépassant cette ligne.

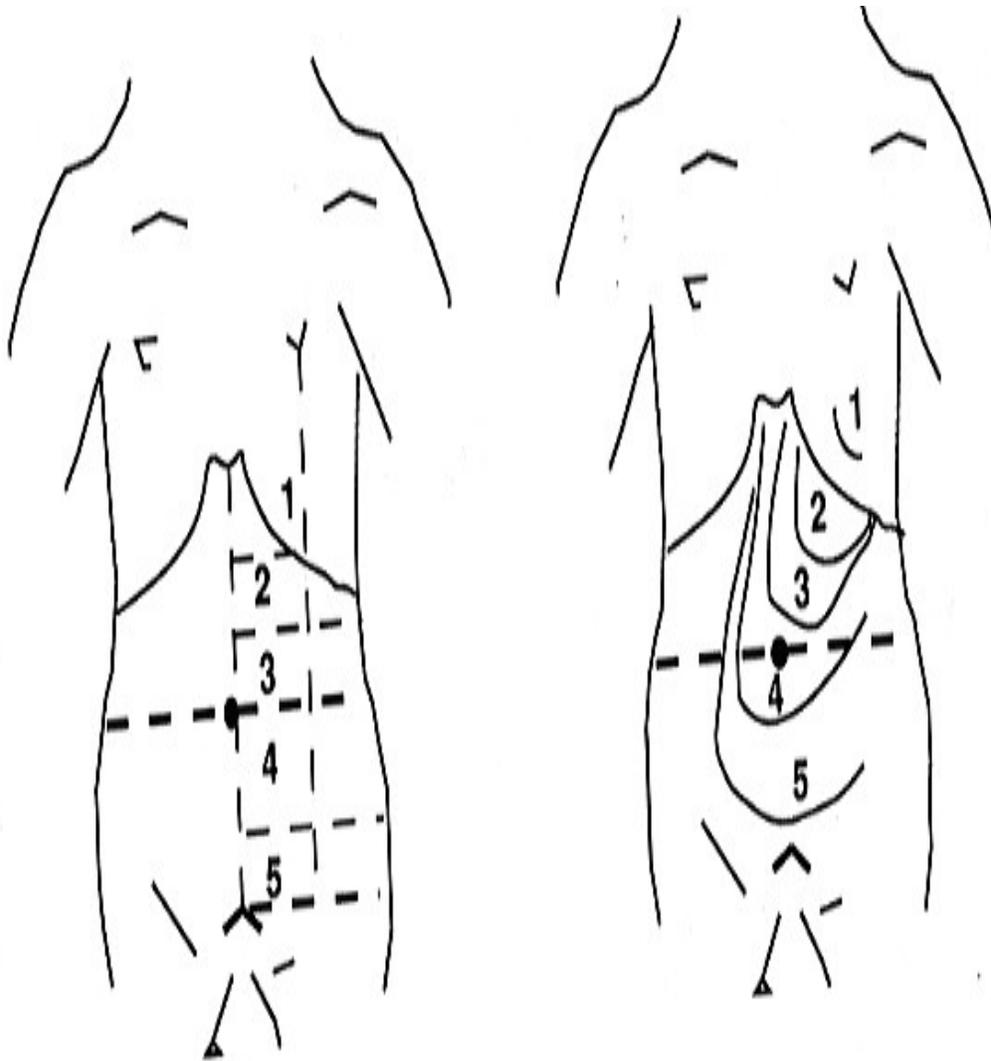


Figure 1 : Classification de la splénomégalie selon Hackett (1944).

4.11.2 Technique parasitologique :

1) Le Matériel

Blouses et gants

Coton hydrophile

Alcool 70°

Pissette

Vaccinostyles

Lames

Boites OMS

Marqueur indélébile

Solution de Giemsa

Eprouvette

Comprimé tampon (Buffer, PH=7,2)

Eau distillée

Bac de coloration

Pot de rinçage des lames

Chronomètre

Râtelier

Microscope optique binoculaire

Housse de protection de microscope

Huile d'immersion

Papier hygiénique

Groupe électronique

Poubelle

Crayon

Stylos

Cahier de parasitologie

Savon

Compteur manuel, table, tabouret

2). Technique de la goutte épaisse

▪ Principe :

Consiste à un étalement épais de sang circonscrit dans un cercle d'environ un centimètre de diamètre sur une lame porte objet. Elle permet la quantification des parasites aux différents stades de développement dans le sang périphérique et de déterminer l'espèce plasmodiale. Cette procédure décrit la technique de confection, de coloration et de lecture de la goutte épaisse.

▪ Confection :

Le doigt d'une main (de préférence troisième ou quatrième doigt de la main gauche) est désinfecté avec un tampon d'alcool. Avant de piquer le doigt ainsi choisi, se rassurer qu'il n'existe aucune trace d'alcool. Le doigt choisi ne doit pas être infecté, ni œdémateux, ni cyanosé. A l'aide d'un vaccinostyle stérile, piquer d'un seul coup à l'extrémité latérale du doigt.

La première goutte ainsi obtenue est essuyée par un tampon de coton sec, la deuxième déposée au centre d'une lame porte objet propre et portant le numéro d'étude du sujet. A l'aide de l'angle d'une autre lame, procéder à une défibrination mécanique par un mouvement circulaire de façon à étaler le sang sur un cercle d'environ un centimètre de diamètre. Après ce geste, les lames ont été gardées dans les boîtes de collection de type OMS pour séchage. Ainsi elles ont été mises à l'abri de la poussière et des mouches. Après le séchage nous avons procédé à la coloration.

▪ **Coloration des lames :**

La technique de coloration au Giemsa à 3 % a été choisie. La durée de coloration des lames a été de 45 minutes par coloration. Au bout desquelles les lames étaient rincées à l'eau propre afin de chasser les écumes sur la lame. Ensuite nous avons procédé au séchage sur un râtelier à l'abri de la poussière. Après la coloration, les lames du passage étaient classées dans les boîtes et celles du suivi longitudinal étaient lues au MRTC/DEAP. Les résultats ont été portés sur les fiches de suivi.

NB:

- Ne jamais fixer une goutte épaisse.

3). Lecture de la goutte épaisse

Elle consiste à identifier et quantifier par champ microscopique les différents stades parasitaires sur 300 leucocytes.

La lecture de la goutte a été faite à l'aide d'un microscope optique binoculaire à immersion à l'objectif 100, la parasitémie était quantifiée suivant la méthode quantitative leucocytaire. Les

parasites étaient comptés en même temps que les leucocytes sur la lame. Lorsque le nombre de 300 leucocytes était atteint, le comptage était arrêté.

La parasitémie est obtenue par la formule suivante :

$$P = N \times 7.500 / 300 \text{ soit } P = 25 \times N \text{ parasites}$$

P = la parasitémie, N est le nombre de parasites comptés au microscope, 300 est le nombre de leucocytes comptés et 7.500 est la moyenne leucocytaire par mm³ de sang chez l'adulte au Mali.

NB : Une lame est négative si aucun parasite n'a été identifié à la lecture de toute la goutte épaisse (100 champs microscopiques environ).

4.11.3 Etude immunologique

Nous avons réalisé la lympho-séparation au laboratoire sous une hotte lumineuse stérile selon la procédure décrite ci-dessous.

➤ Séparation des lymphocytes à partir du sang total (voir Annexe 1)

Réactifs et matériels :

-Ficol,

- RPMI,
- FCS,
- Gentamicine,
- Glutamine,
- Hepes 10nm,
- DMSO,
- Tube Falcon de 15 ou 50 ml,
- Centrifugeuse,
- Hotte stérile,
- Pipette de 10 ou 5 ml,
- Embout de 10, 100 ou 1000.

Mode opératoire

- Mettre du sang dans le tube de 15 ou 50ml.
- Diluer avec du RPMI.
- Transférer le sang dilué dans un autre tube contenant du ficol
- Mettre en centrifugation le sang sur du ficol à 1700g pendant 30mm.
- Récupérer la couche lymphocytaire dans un autre tube de 15 ou 50 ml.

- Laver 2 fois les cellules avec du RPMI à 1500g.
- Verser le surnageant et suspendre de nouveau le culot dans du milieu complet (RPMI, 50% FCS, Gentamicine, Hepes, Glutamine).
- Compter les cellules et congeler les avec 10% de DMSO dans un Revco de -70 degré.

➤ **Technique de marquage phénotypique des cellules (voir Annexe 2)**

➤ **Réactifs et matériel**

- Anti CD3
- Anti-CD4, CD25,
- Anti TGF β , Foxp3
- Anti IL10
- Buffer frais (PBS, 2% FCS, 0,2% NaN₃),
- Facs tubes
- Centrifugeuse,
- Aspirateur.

Mode opératoire

- Transférer la solution contenant les cellules dans les tubes Facs, puis centrifuger à 800g pendant 7 mn.
- Aspirer le surnageant délicatement.
- Suspendre de nouveau le culot dans 50 ul de solution PBS avec 1%FCS et de l'Anti-CD4CD25 dilué au 1/50 et incuber au frais pendant 20 mn.
- Mettre en incubation et au frais dans l'obscurité pendant 20 mn.

-Ajouter 1 ml de la solution fraîche (PBS avec 2% FCS, 0,2% NaN₃) et centrifuger à 800 g pendant 5 mn.

-Aspirer le surnageat délicatement.

-Ajouter 1 ml de la solution fraîche (PBS avec 2% FCS, 0,2% NaN₃) et centrifuger à 800 g pendant 5 mn.

-Verser le surnageant.

-Suspendre de nouveau les cellules dans 250 µl de PBS.

-Ajouter 250 µl du formaldéhyde à 2% et faire la lecture au FACS.

4.11.4 Technique hématologique

4.11.4.1 Extraction de l'ADN humain par le Kit QIAamp® (QIAGEN)

○ Principe

Le principe de l'extraction de l'ADN par le Kit QIAGEN est basé sur la libération, la cristallisation, le lavage et enfin la récupération de l'ADN.

○ Matériel et composition du Kit QIAamp® (QIAGEN)

✓ Ciseaux

- ✓ Gants stériles
- ✓ Pipettes de 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- ✓ Embouts de 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- ✓ Agitateur
- ✓ Chronomètre
- ✓ Congélateur
- ✓ Box de conservation
- ✓ Marqueur indélébile
- ✓ Plaque chauffante
- ✓ Racks pour les tubes
- ✓ Centrifugeuse
- ✓ Mouchoir
- ✓ Thermomètre
- ✓ Tube Eppendorf de 1,5ml
- ✓ Tube de 2ml
- ✓ Colonne Qiagen munie de filtre
- ✓ Ethanol absolu (96-100%)
- ✓ Le Kit QIAGEN composé de :
- ✓ Buffer ATL
- ✓ Buffer AL

- ✓ Buffer AW1
- ✓ Buffer AW2
- ✓ Buffer AE
- ✓ Protéinase K

○ **Procédure**

- Découper les spots de confettis imbibés de sang à l'aide de ciseaux et les introduire dans les tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Ajouter 180 µl de Buffer ATL, incuber à 85°C pendant 10 minutes,
- Centrifuger et ajouter 20 µl de protéinase K, mélangé à l'aide d'un Vortex
- Incuber les tubes et leur contenu à 56°C pendant une heure
- Centrifuger brièvement les tubes pour faire descendre le liquide suspendu à leur paroi.
- Ajouter 200 µl de Buffer AL dans chaque tube, et les agiter à l'aide d'un vortex
- Incuber les tubes à 70°C pendant 10 minutes,
- Centrifuger les tubes, et ajouter 200 µl d'éthanol absolu (96-100%) dans chaque tube,
- Agiter les tubes à l'aide d'un vortex puis centrifuger brièvement les tubes
- Transférer doucement tout le contenu des tubes dans des colonnes Qiagen munie de filtre,
- Fermer la colonne et la centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute.
- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un autre tube de 2 ml
- Mettre 500 µl de Buffer AW1 dilué avec de l'éthanol (19 ml de Buffer AW1 plus 25 ml de l'éthanol) dans la colonne,
- Centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute,

- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un autre tube de 2 ml
- Mettre 500 µl de Buffer AW2 dilué avec de l'éthanol (13 ml de Buffer AW2 plus 30 ml de l'éthanol) dans la colonne,
- Centrifuger à 14000 tours par minute pendant 3 minutes.
- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un tube eppendorf 1,5 ml.
- Mettre 150 µl de Buffer AE dans la colonne et incubé à la température ambiante de la salle pendant une minute,
- Centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute,
- Jeter la colonne et garder le filtrat contenu dans le tube eppendorf 1.5 ml à + 4°C (Ce filtrat contient l'ADN extrait et purifié)

4.11.4.2 Génotypage de la G6PD par la technique de polymérase Chain Réaction-Restriction enzyme Analysis (PCR-REA)

❖ PRINCIPE

Le principe consiste à faire le diagnostic de la mutation ponctuelle au niveau du gène de la G6PD par une PCR nichée. Au cours de cette technique, le produit issu d'une première PCR est de nouveau amplifié à l'aide d'un second couple d'amorce, qui s'hybride à une partie interne (nichée) de la séquence amplifiée

En mélangeant le couple d'amorce avec l'ADN de l'homme dans des conditions d'hybridation, ils se positionnent en face de leurs séquences complémentaires respectives. Puis en faisant agir une ADN polymérase (Taq polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'=>3' d'une séquence exactement complémentaire du brin copié.

❖ Matériel

- ✓ Gants stériles
- ✓ Tubes de 0.2ml, 1.5ml,
- ✓ Pipettes de 2µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- ✓ Embouts de 2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- ✓ Marqueur indélébile
- ✓ Chambre à PCR
- ✓ Racks pour les tubes
- ✓ Thermocycler
- ✓ Réfrigérateur
- ✓ Bain marie
- ✓ Balance
- ✓ Erlenmeyer
- ✓ Moule
- ✓ Micro onde
- ✓ Eprouvette graduée 100ml
- ✓ Peignes pour gel
- ✓ Bac de migration
- ✓ Appareil photo UV
- ✓ Film polaroid
- ✓ Parafilm

- ✓ Générateur
- ✓ Source de lumière UV

❖ **Réactifs :**

- ✓ Les Amorces : Deux paires d'amorces sont utilisées :

A2 : GTCTTCTGGGTCAGGGAT et B2 : GGAGAAAGCTCTCTCTCC pour la première amplification, NA4 : CCTGTTCCCTCTGCCACA et NB4: GGGGGTCTCAAGAAGTAC pour la deuxième amplification

- ✓ Platinum supermix
- ✓ Eau pour biologie moléculaire
- ✓ Solution de buffer K 10X
- ✓ Solution de BSA 10X
- ✓ Enzyme Hsp92II
- ✓ Agarose ultra pure GIBCO BRL
- ✓ Solution de Bromure d'Ethidium (Sodium)
- ✓ TBE 0.5X
- ✓ Dye (buffer de chargement)
- ✓ Marqueur de poids moléculaire

❖ **Procédure de la PCR**

- Déterminer le nombre N d'échantillon à traiter
- Prendre un tube eppendorf 1.5 ml
- Mettre (N+1) x 22.5 µl de platinum supermix,

- Ajouter (N+1) x 0.1 µl de chacun des amorces A2 et B2 pour la première amplification ou NA4 et NB4 pour la deuxième amplification
- Bien mélanger,
- Distribuer ce mélange dans les tubes PCR 0.2 ml déjà identifiés en raison de 22.7 µl de mélange par tube PCR
- Mettre dans chacun des tubes PCR 2.5 µl d'ADN de l'échantillon correspondant pour la première amplification (1 µl du produit de la première amplification de l'échantillon pour la deuxième amplification)
- Placer les tubes PCR dans la machine de PCR et mettre en marche le programme A pour la première amplification (le programme B pour la deuxième amplification.)

Programme de la première amplification :

- Dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes

Puis 45 cycles de :

- Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
- Hybridation à 60°C pendant 45 secondes
- Extension à 72°C pendant 1 minute
- Extension finale à 74°C pendant 5 minutes
- Conservation à + 4°C pendant un temps indéterminé
- Sortir les tubes et les garder au réfrigérateur à 4°C.

Programme de la deuxième amplification :

- Dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes

Puis 35 cycles de :

- Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
- Hybridation à 60°C pendant 1 minute
- Extension à 72°C pendant 45 secondes
- Extension finale à 74°C pendant 5 minutes
- Conservation à 4°C pendant une durée illimitée

Digestion enzymatique :

- Déterminer le nombre N d'échantillon à traiter,
- Prendre un tube eppendorf 1.5 ml,
- Mettre Nx13 µl d'eau pour Biologie moléculaire
- Ajouter Nx3 µl de la solution buffer K 10X
- Ajouter Nx3 µl de la solution de BSA 10X
- Ajouter Nx1 µl de l'enzyme Hsp92II
- Bien mélanger
- Ajouter 20 µl de ce mélange sur chacun des produits de la deuxième amplification dans les tubes PCR.

- Incuber l'ensemble à 37°C pendant au moins 2 heures.

Préparation du gel de migration : Gel à 1.5% d'Agarose

- Peser 1.5 g de poudre d'agarose et le mettre dans une fiole (erlenmeyer)
- Ajouter 100 ml de solution de TBE 0.5X
- Bouillir dans le micro onde pendant 3 minutes
- Laisser refroidir un peu, puis ajouter 3 µl de bromure d'Ethidium
- Couler le gel dans une moule mise en place à cet effet.
- Laisser le gel se refroidir et prendre en masse.

La migration :

- Placer le gel préparé dans le bac à migration contenant la solution de TBE 0.5X (la solution de TBE doit submerger le gel)
- Mélanger 10 µl du produit de la digestion avec 3 µl du buffer de chargement (dye)
- Mettre ces mélanges dans les puits du gel
- Faire la migration pendant 25 minutes à 500 mA sous un voltage constant de 200 V
- Voir les bandes d'ADN à la lumière UV
- Faire la photo du gel à l'aide d'une camera polaroid.
- Numérotter les bandes.

Interprétation de la photographie

Après digestion et la migration, les allèles mutés sont coupés en deux bandes de petite taille (environ 100 à 200 bp), alors que les allèles normaux ont une taille plus grande d'environ 300 bp.

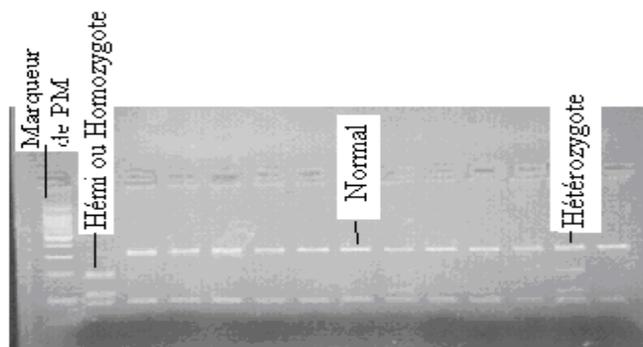


FIGURE 2: Photographie d'une bande d'ADN de la G6PD après digestion

4.12 Considération éthique

L'étude a été conduite conformément aux bonnes pratiques cliniques. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS) de l'Université de Bamako.

Chaque parent/tuteur des enfants de l'étude a été informé individuellement des procédures de l'étude. Le consentement libre et éclairé ainsi que le formulaire de consentement leur ont été soumis.

Tous les cas d'affections aiguës (paludisme et autres) étaient systématiquement pris en charge gratuitement par l'équipe du MRTC/DEAP.

Les cas chirurgicaux étaient référés sur le centre de santé communautaire de Bancoumana

4.13 Gestion et analyse des données :

Les données ont été enregistrées sur un cahier ou des fiches individuelles avant d'être saisies. A la fin de chaque journée, un contrôle de qualité était effectué pour déceler d'éventuelles erreurs. Nous avons procédé à une double saisie avec réconciliation des fichiers par le Dr. MAIGA B.

Les lames de goutte épaisse ont été relues au laboratoire du MRTC/DEAP pour un contrôle de qualité par le Prof DOLO A.

La saisie a été faite au logiciel MS-ACCES et l'analyse a été faite en utilisant le logiciel SPSS (version 12) et Epi-info pour le calcul de Khi 2. La valeur

$P \leq 0,05$ a été considérée comme statistiquement significatif.

L'évaluation du rôle protecteur des différents paramètres immunologiques (CD4/CD25, IL10, TGF β , Foxp3) a été faite selon deux approches :

Le niveau de ces paramètres à l'inclusion et la présence ou l'absence d'épisodes palustres au cours du suivi.

Le niveau de ces paramètres à l'inclusion et la durée d'apparition du premier épisode palustre au cours des cinq mois de suivi selon la courbe de survie de Kaplan-Meier.

En l'absence de données sur les mesures de référence de ces paramètres immunologiques dans la littérature, nous avons pris comme seuil de référence la valeur médiane des proportions des différentes cellules étudiées: 0,97 pour les cellules CD4+CD25+; 6,78 pour les cellules productrices de l'IL10; 7,83 pour les lymphocytes productrices du TGFβ et 3,64 pour le marqueur Foxp3.

5. RESULTATS

Les résultats ont concerné 80 enfants chez lesquels l'indice splénique, l'indice plasmodique, le dosage du déficit en G6PD ainsi que l'étude des cellules régulatrices ont été réalisés.

5.1 Caractéristiques sociodémographiques, cliniques et biologiques de la population d'étude à l'inclusion.

Tableau I: Répartition des sujets en fonction du sexe

Sexe	Effectif	Fréquence
Masculin	42	52,5
Féminin	38	47,5
Total	80	100

Le sex ratio était de 1.10 en faveur du masculin.

Tableau II: Répartition des sujets en fonction de l'âge

Age	Effectif	Fréquence
3 – 5 ans	34	42,5
6 – 10 ans	46	57,5
Total	80	100

La tranche d'âge 6 – 10 ans a été la plus fréquente avec 57,5%.

Tableau III: Proportion de l'automédication anti palustre dans l'échantillon.

ANTI PALUSTRE	FREQUENCE	POUCENTAGE
Non	72	90
Oui	8	10

Total	80	100
-------	----	-----

La proportion de sujets ayant fait de l'automédication anti palustre a été de 10% durant notre étude.

Tableau IV: L'indice splénique dans l'échantillon d'étude.

Splénomégalie	Effectif	Fréquence
Présence	19	23,75
Absence	61	76.25
Total	80	100

L'indice splénique était 23,75%.

Tableau V: L'indice plasmodique dans l'échantillon d'étude

Goutte Epaisse	Effectif	IP(%)
Négatif	43	53.8
Positif	37	46.2
Total	80	100

L'indice plasmodique a été de 46,2% durant notre étude.

Tableau VI: L'indice gaméocytaire dans la population d'étude

Goutte Epaisse	Effectif	IG(%)
Positive	10	12,5
Négative	70	87,5
Total	80	100

L'indice gaméocytaire a été de 12,5%.

Tableau VII: Fréquence du déficit en G6PD selon le sexe

G6PD	Fréquence	Pourcentage
Normal	65	86,7
Hémi zygote	3	4,0
Hétérozygote	7	9,3

Homozygote	0	00
------------	---	----

Total	75	100
-------	----	-----

La fréquence d'hétérozygote a été de 9,3% dans la population féminine et celle d'hémi zygote a été de 4,0% dans la population masculine.

Tableau VIII: Parasitémie moyenne par classe d'âge dans l'échantillon.

Classe d'âge	Effectif	Moyenne (parasites/mm ³)	Ecart-type
3-5ans	14	667,19	1997,10
6-10ans	23	243,12	1066,49
Total	37	356,21	1526,00

Nous avons trouvé une différence statistiquement significative entre les classes d'âge par rapport à la moyenne parasitaire ($p = 0.01$).

5.2 Résultats de la surveillance longitudinale

Tableau IX: Répartition de la cohorte selon le nombre d'épisodes palustres au cours du suivi

EPISODES	FREQUENCE	POURCENTAGE
Aucun	35	43,75
1 épisode	38	47,5
2 épisodes	7	8.75
Total	80	100

Dans la population d'étude 47,5% des sujets avaient fait un épisode palustre, 8.75% ont fait 2 épisodes palustres et 43,75% n'avaient fait aucun épisode palustre.

Tableau X: Répartition des sujets selon la survenue du paludisme par classe d'âge au cours du suivi

Epi palustre Age	Oui	Non	Total
3-5 ans	25	12	35
6-10 ans	22	23	45
Total	45	35	80

Ce tableau ne montre aucune différence entre les classes d'âges par rapport à la survenue du paludisme (Ch2=2,26 ; P=0,13 ; Odds Ratio=2,18).

Tableau XI: Répartition des sujets selon la survenue du paludisme par rapport à la splénomégalie au cours du suivi

Epi palustre Rate	Non	Oui	Total
Présente	24	11	35
Absente	37	8	45
Total	61	19	80

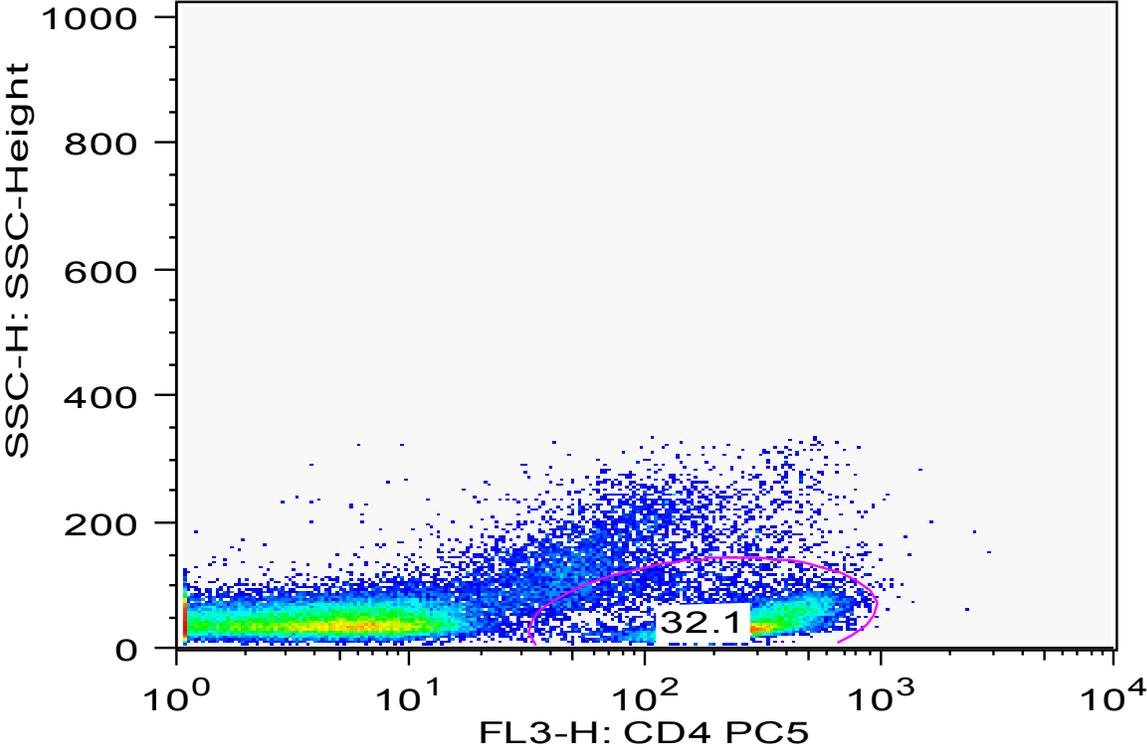
Ce tableau ne montre aucune différence statistiquement significative entre les personnes qui avaient une splénomégalie et celles qui n'en avaient pas par rapport à la survenue du paludisme (Ch2=2,03 ; P=0,16 ; Odds Ratio=2,12).

5.3 Résultats immunologiques

Tableau XII: Proportions des différentes cellules étudiées à l'inclusion

Cellules	Effectif	Moyenne	Ecart-type
CD4+CD25+	76	1,65	1,80
Foxp3+	76	5,23	4,32
IL-10	76	7,39	4,87
TGF-β	76	10,19	11,24

La moyenne des différentes cellules étudiées à l'inclusion a été de 1.65 pour les cellules TCD4+CD25+, 7,39 pour l'IL-10, 10,19 pour le TGF-β et 5,23 pour le Foxp3+.



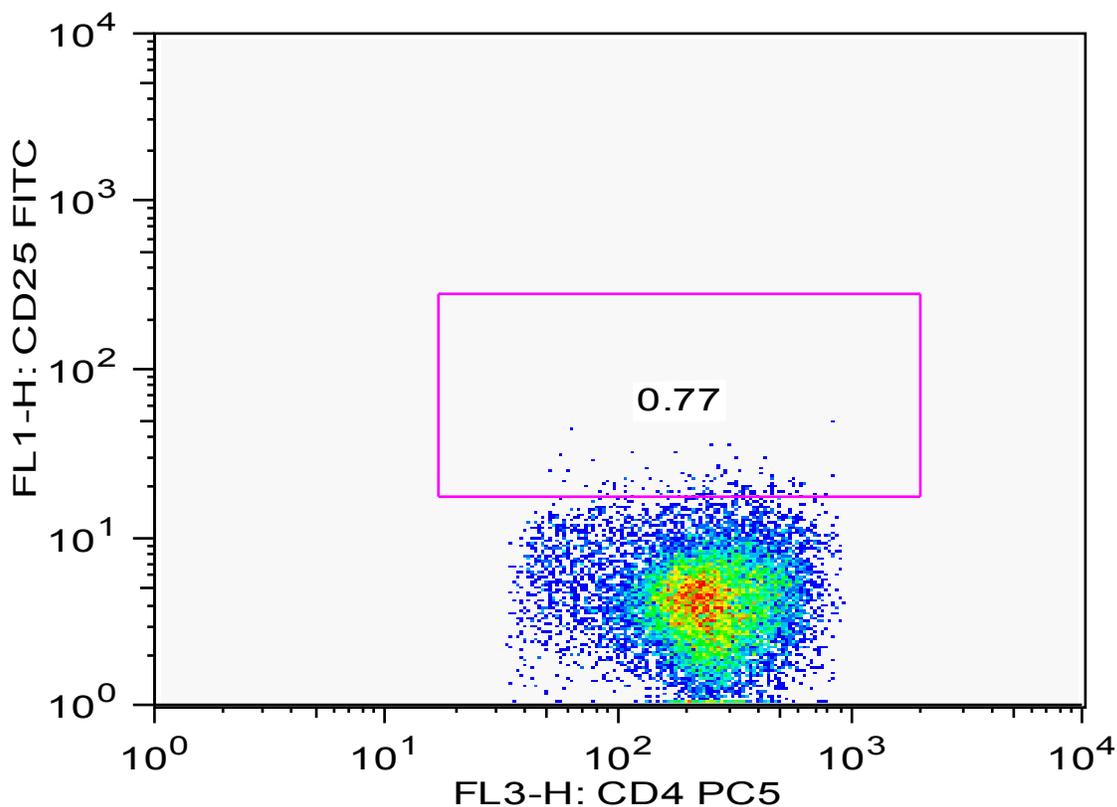


Tableau XIII: Proportions des cellules étudiées selon les classes d'âge à l'inclusion

Cellules	Classe d'âge	Effectif	Moyenne	Ecart-type	p. value
CD4+CD25+	3-5ans	30	1,68	1,73	0.14
	6-10ans	46	1,62	1,87	
Foxp3+	3-5ans	30	6,43	5,04	0.07
	6-10ans	46	4,45	3,63	
IL-10	3-5ans	30	6,68	4,65	0.08
	6-10ans	46	7,86	5,00	
TGF-β	3-5ans	30	8,50	9,92	0.05
	6-10ans	46	11,30	11,99	

Nous avons trouvé une différence statistiquement significative entre les classes d'âges par rapport à la proportion des cellules TGFβ étudiées (p=0,05).

Tableau XIV: Proportions des cellules étudiées selon la survenue du paludisme au cours du suivi

Cellules	Episode	Effectif	Moyenne	Ecart-type	P value
CD4CD25	négatif	33	1,41	1,49	0,20
	Positif	33	2,07	2,22	
FOXP3	négatif	33	5,14	4,07	0,81
	positif	33	5,77	4,83	
TGFβ	négatif	33	10,04	11,98	0,59
	positif	33	11,58	11,32	
IL10	négatif	33	5,90	3,72	0,01
	positif	33	9,15	5,41	

Nous avons trouvé une différence statistiquement significative par rapport à la moyenne des cellules productrices de l'IL10 étudiées selon le paludisme au cours du suivi (p=0,01).

Tableau XV: Association entre les cellules CD4+CD25+ et le portage du Plasmodium à l'inclusion

<i>Plasmodium falciparum</i>	CD4CD25		Total
	>0,97	≤0,97	
Négatif	19	17	36
Positif	15	16	31

Nous n'avons pas trouvé de relation entre les cellules CD4CD25 et le portage du *Plasmodium* à l'inclusion (Ch2=0,13 ; p=0,72).

Tableau XVI : Association entre les cellules productrices de l'IL10 et le portage du *Plasmodium* à l'inclusion

<i>Plasmodium falciparum</i>	IL10		Total
	>6,78	≤6,78	
Négatif	21	15	36

Positif	13	18	31
----------------	----	----	----

Nous avons trouvé une relation entre les cellules productrices de l'IL10 et le portage du *Plasmodium* à l'inclusion (Ch2=1,79 ; p=0,01).

Tableau XVII: Association entre les cellules productrices de TGFβ et le portage du *Plasmodium* à l'inclusion

<i>Plasmodium falciparum</i>	TGFβ		Total
	>7,83	≤7,83	
Absence	22	14	36
Présence	11	20	31

Nous n'avons pas trouvé une association statistique significative entre les cellules productrices de TGFβ et le portage du *Plasmodium* à l'inclusion (Ch2=4,38 ; p=0,59).

Tableau XVIII : Association entre le niveau d'expression du marqueur FOXP3 et le portage du *Plasmodium* à l'inclusion

<i>Plasmodium falciparum</i>	FOXP3		Total
	>3,64	≤3,64	
Absence	20	16	36
Présence	14	17	31

Nous n'avons pas trouvé de relation entre le niveau du marqueur FOXP3 et le portage du *Plasmodium* à l'inclusion ($\chi^2=0,72$; $p=0,40$).

Tableau XIX: Taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jours et les classes d'âge

Classe d'âge	Incidence du paludisme	Temps de suivi par 1000perso/jours	Taux d'incidence du paludisme/1000per/jours
3-5ans	35	2926	11,96 (4,36)
6-10ans	45	4416	10,19 (3,72)
Total	80	7342	10,90 (3,98)

Le taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jour était inversement proportionnel à l'âge. Le taux d'incidence globale est de 10,90/1000 personnes/jour. Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les taux d'incidences palustres par 1000 personnes jours et l'âge ($\chi^2=1,91$; $p=0,16$).

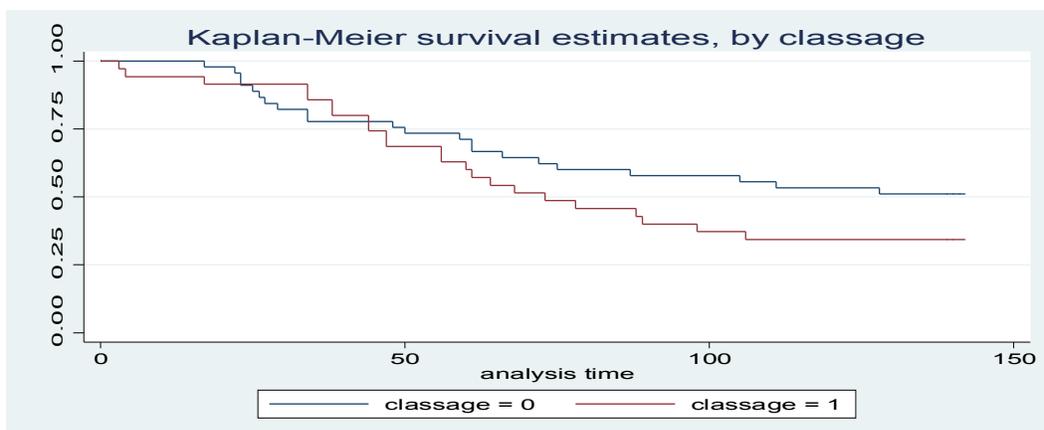


Figure3: Courbe de survie des classes d'âge par rapport au paludisme.

50% des participants de 6-10 ans ont développé leur premier épisode palustre avant le 140^{ème} jour tandis que 50% des participants de 3-5 ans ont développé leur premier épisode palustre avant le 74^{ème} jour.

Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les classes d'âges par rapport à la courbe de survie au paludisme au cours du suivi (Ch2=1,91 ; p=0,16).

Tableau XX: Taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jours et la splénomégalie

Splénomégalie	Incidence du paludisme	Temps de suivi par 1000perso/jours	Taux d'incidence du paludisme/1000per/jours
Présence	19	1931	9,84
Absence	61	5411	11,27

. Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les taux d'incidences palustres par 1000 personnes jours et la splénomégalie (Ch2=1,54 ; p=0,21).

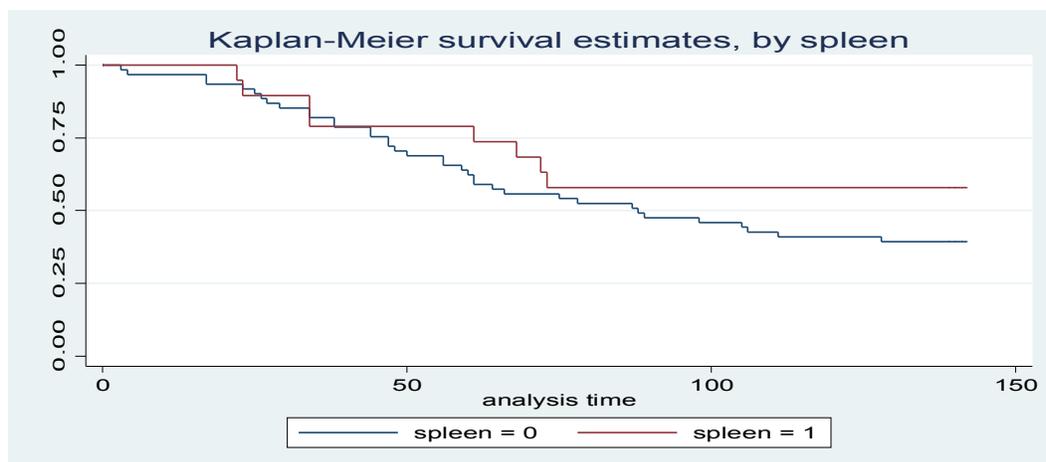


Figure4: Courbe de survie de la splénomégalie par rapport au paludisme.

50% des participants ayant une splénomégalie ont développé leur premier épisode palustre avant le 88^{ème} jour tandis que 50% des participants n'ayant de splénomégalie ont développé leur premier épisode palustre avant le 140^{ème} jour.

Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre la splénomégalie et la courbe de survie du paludisme au cours du suivi (Ch2=1,54 ; p=0,21).

Tableau XXI: Taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jours et les cellules CD4+CD25+

Cellules CD4+CD25+	Incidence du paludisme	Temps de suivi par 1000perso/jours	Taux d'incidence du paludisme/1000per/jours
>0,97	33	2760	11,95 (4,36)
≤0,97	33	3496	9,43 (3,44)

Le taux d'incidence du paludisme tendait à être plus élevé chez les participants ayant une médiane de cellules CD4+CD25+>0,97 par rapport à ceux ayant une médiane de cellules CD4+CD25+≤0,97 (Ch2=3,08 ; p=0,07)

Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les médianes des cellules CD4+CD25+ par rapport à la courbe de survie au paludisme des cellules CD4+CD25+ au cours du suivi (Ch2=3,08 ; p=0,07).

Tableau XXII: taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jours et la production d'IL10

IL10	Incidence du paludisme	Temps de suivi par 1000perso/jours	Taux d'incidence du paludisme/1000per/jours
>6,78	33	2706	12,19 (4,49)
≤6,78	33	3550	9,29 (3,39)

Le taux d'incidence du paludisme tendait à être plus élevé chez les participants ayant une médiane de cellules productrices d'IL10>6,78 par rapport à ceux ayant une médiane de cellules productrices d'IL10≤6,78 (Ch2=5,19 ; p=0,02).

Nous avons trouvé une différence statistiquement significative entre les médianes des cellules productrices de l'IL10 par rapport à la courbe de survie des cellules productrices de l'IL10 au paludisme au cours du suivi (Ch2=5,19 ; p=0,02).

Tableau XXIII: Taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jours et la production du TGFβ

TGFβ	Incidence du	Temps de suivi par	Taux d'incidence du
------	--------------	--------------------	---------------------

	paludisme	1000perso/jours	paludisme/1000per/jours
>7,83	32	2831	11,30 (4,12)
≤7,83	34	3421	9,92 (3,62)

Le taux d'incidence du paludisme tendait à être plus élevé chez les participants ayant une médiane de cellules productrices du TGFβ>7,83 par rapport à ceux ayant une médiane de cellules productrices du TGFβ≤7,83 (Ch2=1,20 ; p=0,27).

Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les médianes des cellules productrices de TGFβ par rapport à la courbe de survie au paludisme des cellules productrices de TGFβ au cours du suivi (Ch2=1,20 ; p=0,27)

Tableau XXIV: Taux d'incidence du paludisme par 1000 personnes jours et Le niveau du marqueur FOXP3

FOXP3	Incidence du paludisme	Temps de suivi par 1000perso/jours	Taux d'incidence du paludisme/1000per/jours
>3,64	33	3160	10,44 (3,81)
≤3,64	33	3096	10,65 (3,89)

Le taux d'incidence du paludisme tendait à être plus élevé chez les participants ayant une médiane du marqueur Foxp3>3,64 par rapport à ceux ayant une médiane du marqueur Foxp3≤3,64 (Ch2=0,01 ; p=0,92).

Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les médianes du niveau du marqueur Foxp3 par rapport à la courbe de survie au paludisme du niveau du marqueur Foxp3 au cours du suivi (Ch2=0,01 ; p=0,92).

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Le but de ce travail était d'étudier la susceptibilité au paludisme dans une cohorte d'enfants vivant en zone d'endémie palustre du Mali et de déterminer les éventuels facteurs immunologiques impliqués dans la résistance ou la susceptibilité au paludisme.

❖ Aspects méthodologiques

Nous avons choisi la localité de Nanguilabougou dans le cercle de Kati, région de Koulikoro qui réunissait les conditions. En effet, l'étude a porté sur des enfants de 3 à 10 ans. Les enfants ont été repartis en classe d'âge de 3 à 5 ans et de 6 à 10 ans.

Un passage, transversal en septembre 2008 qui a duré une semaine et un autre d'investigation immunologique d'octobre à novembre 2009 ont été effectués. Au cours de ces passages, le dépistage moléculaire du déficit en G6PD érythrocytaire a été effectué grâce aux techniques de biologie moléculaire (PCR) déterminant ainsi le polymorphisme génétique de la G6PD. Les échantillons ont été recueillis à partir des confettis réalisés sur le site. La PCR a été effectuée dans le laboratoire d'hématologie moléculaire de la FMPOS.

Nous avons aussi mesuré les paramètres immunologiques et paludométriques.

L'examen clinique complet a été réalisé et la combinaison Sulfadoxine-pyriméthamine plus l'amodiaquine a été utilisée pour le traitement de l'accès palustre simple. Les sels de quinine étaient réservés aux cas graves de paludisme. Nous avons réalisé des gouttes épaisses pour le diagnostic biologique du paludisme.

Le taux de participation est assez bon dans l'ensemble. Cependant les enfants de 6-10 ans étaient majoritaires avec 57,5% contre 42,5% des 3-5 ans avec un ratio de 1,10 en faveur du sexe masculin. Ce résultat est différent de celui obtenu chez les Dogon et les Peulh par Tapily.⁴⁰ où le sexe ratio était de 1,06 en faveur du sexe féminin.

Les quelques difficultés rencontrées sont inhérentes à toutes études populationnelles et n'ont pas eu d'impact significatif sur les résultats.

Dans la population, 10% pratiquaient de l'automédication. Cela pourrait s'expliquer par la faible couverture sanitaire de la localité.

❖ Résultats cliniques et parasitologiques

L'indice splénique était de 23,75%, l'indice plasmodique 46,2% à l'inclusion. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Tapily. Erreur : source de la référence non trouvée qui a trouvé respectivement 4% et 7,6% en 2007 à Mantéourou.

Ces différences pourraient s'expliquer non seulement par le fait que nos sujets d'études étaient différents (adultes à Mantéourou et enfants à Nanguilabougou) mais aussi que Nanguilabougou

est situé dans une zone hyper-endémique alors que Mantéourou est situé dans une zone méso-endémique.

Nous avons trouvé que les charges parasitaires dans l'infection à *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium malariae* étaient significativement plus élevée chez les enfants de 3-5 ans que les enfants de 6-10 ans ($p=0.01$).

Le G6PD normal dans notre étude a prédominé avec 86,7%. Ce résultat est comparable à celui obtenu par Traore⁴¹ à Bandiagara qui a trouvé 83,6 en 2004. Le déficit en G6PD a été observé dans une proportion de 13,3% dans notre étude. Il a été observé chez 9,3% des sujets de sexe féminin contre 4,0% des sujets de sexe masculin. Traoré.⁴², en 2003, avait trouvé une prédominance du sexe masculin avec 15.7% dans les zones malinkés, Duflo et al (12), en 1975, dans une étude hospitalière menée à l'HGT de Bamako, a rapporté une prédominance du sexe masculin avec 7,4%.

Cette proportion élevée du déficit chez les sujets féminins dans notre étude pourrait s'expliquer par le fait que nous avons utilisé la technique du PCR qui détermine le trait déficitaire porté par le gène qui code pour le G6PD. Ce gène est porté par le chromosome x ; la femme ayant deux chromosomes x, est plus exposée au gène déficient mais la manifestation clinique de l'affection est beaucoup plus fréquente chez l'homme qui a un seul chromosome x. Pour la femme qui a deux chromosomes x, il faudrait que le gène déficient soit porté par les deux chromosomes x pour que l'activité enzymatique soit fortement réduite.

Les auteurs précédents (Traoré, Traoré et Duflo et al) avaient tous utilisé la méthode biochimique qui mesure l'activité enzymatique dans le globule rouge.

❖ **Relation entre les cellules T régulatrices et la survenue des accès palustres**

Nous avons pris les médianes des cellules pour évaluer les liens et impacts par rapport à la survenue des accès palustres. Nous n'avons pas trouvé d'association entre la survenue des accès palustres et les différents paramètres évalués (CD4+CD25+, TGF β et Foxp3). En revanche, nos résultats montrent une association entre la parasitémie de base et la production de l'IL10. De nos jours, la littérature est pauvre en données de référence qui caractérisent les cellules T régulatrices.

❖ **Estimation du taux d'incidence par personne-temps**

Au cours de notre étude, nous avons enregistré une incidence globale de 10,90 épisodes par 1000 personnes jours soit 3,97 épisodes par enfant par an. Notre taux d'incidence est différent de celui de Sagara et al (2002) qui avait trouvé une moyenne d'accès palustre de 1,44 épisode par enfant par an à Sotuba, chez les enfants de 6 mois à 7 ans⁴³. Kamaté (1999) avait trouvé une incidence de 1,5 épisode par enfant pendant 24 semaines de suivi à Doneguebougou chez les enfants de 3 mois à 20 ans⁴⁴. C'est dans la tranche d'âge de 3-5 ans que l'incidence était très élevée soit 4,36 ; 4 épisodes par enfant par an. Ces valeurs sont comparables à celles trouvées par Dolo et al (2003) à Bancoumana. En effet, ils avaient observé à Bancoumana une incidence cumulée variant entre 2 à 4 épisodes par enfant/an⁴⁵.

En ce qui concerne la relation entre les éléments caractéristiques (marqueurs et cytokines) des cellules T régulatrices et l'incidence du paludisme, nous avons observé une incidence de 4,36 épisodes par an, chez les enfants ayant une médiane de cellules CD4CD25 > 0,97 et 3,44 épisodes par an chez ceux ayant une médiane de cellules CD4CD25 ≤ 0,97. Une incidence de 4,49 épisodes par an, chez les participants ayant une médiane de cellules productrices d'IL10 > 6,78 et 3,39 épisodes par an chez ceux ayant une médiane de cellules productrices d'IL10 ≤ 6,78. Une incidence de 4,12 épisodes par an, chez les participants ayant une médiane de cellules productrice de TGFβ > 7,83 et 3,62 épisodes par an chez ceux ayant une médiane de cellules productrices de TGFβ ≤ 7,83. Une incidence de 3,81 épisodes par an, chez les participants ayant une médiane du niveau du marqueur Foxp3 > 3,64 et 3,89 épisodes par an chez ceux ayant une médiane du niveau du marqueur Foxp3 ≤ 3,64. Ces résultats indiquent clairement une association entre les cellules T régulatrices et l'incidence du paludisme⁴⁶.

❖ Facteurs influençant la survenue des accès palustre

Dans une étude longitudinale de l'infection naturelle par *P. falciparum*, il a été démontré que les cellules T-regs ont un effet immuno-régulateur sur le stade érythrocytaire du parasite *in vivo*³⁸. Il semblerait que les cellules T-regs pourraient induire une réponse immune délétère dans l'élimination des parasites et/ou dans la régulation de la réponse immune à l'infection par *P.falciparum*.

Nous avons trouvé dans notre étude que la moyenne des cellules T-regs était comparable entre les deux classes d'âge étudiées. Nous avons observé également que les participants ayant une

médiane de cellules CD4+CD25+ > 0,97, une médiane de cellules productrices de l'IL10 > 6,78, une médiane de cellules productrices de TGFβ > 7,83 et une médiane du niveau du marqueur Foxp3 ≤ 3,64 avaient tendance à faire plus d'épisode palustre comparés à ceux ayant une médiane de cellules CD4+CD25+ ≤ 0,97, une médiane de cellules productrices de l'IL10 ≤ 6,78, une médiane de cellules productrices de TGFβ ≤ 7,83 et une médiane du niveau du marqueur Foxp3 > 3,64 (Tableau 20, 21, 22, 23). L'augmentation d'expression du gène Foxp3 associée à une tendance faible de participants n'est pas suffisante pour confirmer le rôle protecteur des cellules T régulatrices. Cependant, une étude menée au Burkina Faso a montré une faible expression des gènes des cellules T-regs (CTA4 et Foxp3) chez les Peulh vivant en sympathie avec les Mossi⁴⁷.

La compréhension des mécanismes de protection des cellules T (T-regs) dans la susceptibilité et/ou la résistance au paludisme pourrait aider dans la lutte et le développement des outils de contrôle de cette endémie.

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1 CONCLUSION

A la fin de cette étude, nous pouvons conclure que :

- Les charges parasitaires de *P. falciparum* et de *P. malariae* ont été significativement plus élevées chez les enfants de 3-5 ans que chez les enfants de 6-10 ans.
- Le déficit en G6PD a été plus fréquent chez les sujets de sexe féminin.
- les participants ayant une médiane de cellules CD4CD25 > 0,97, une médiane de cellules productrices de l'IL10 > 6,78, une médiane de cellules productrices de TGFβ > 7,83 et une médiane du niveau du marqueur Foxp3 ≤ 3,64 avaient tendance à faire plus d'épisode palustre comparés à ceux ayant une médiane de cellules CD4CD25 ≤ 0,97, une médiane de cellules productrices de l'IL10 ≤ 6,78, une médiane de cellules productrices de TGFβ ≤ 7,83 et une médiane du niveau du marqueur Foxp3 > 3,64 (Tableau 20, 21, 22, 23).
- La moyenne des cellules T-régulatrices a été comparable entre les deux classes d'âges. Nous n'avons pas pu mettre clairement en évidence le rôle des cellules T régulatrices dans la protection contre le paludisme.

7.2 Recommandations

A la fin de cette étude, nous recommandons de :

1. Effectuer le même protocole sur un échantillon significatif avec une longue durée de suivi ;
2. Effectuer une étude intra-ethnique (chez les Peuhls) pour mieux appréhender le rôle des cellules T-regs dans le paludisme ;
3. Etudier le rôle des cellules T-regs dans une cohorte d'adultes.
4. Réaliser des études multicentriques dans les d'endémicité différentes pour cerner le rôle des cellules T Régulatrices dans la susceptibilité au paludisme.

8. Fiche signalétique

Nom: SANGARE

Prénom: Boubou

Nationalité: Malienne

Date de soutenance: 03/03/2011

Ville de soutenance: Bamako

Titre: Etude des cellules T régulatrices dans la protection contre le paludisme dans une cohorte d'enfants vivant en zone d'endémie palustre.

Lieu de dépôt: Bibliothèque de la faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie (F.M.P.O.S), université de Bamako (UB), Mali.

Secteurs d'intérêt: Parasitologie, Immunologie, Santé publique.

Résumé

Au cours de ce travail, nous avons étudié le rôle des cellules T régulatrices dans la protection contre le paludisme dans une cohorte d'enfants vivant en zone d'endémie palustre. Nous avons mené un passage transversal, parasito-clinique en septembre 2008 pour dépister les sujets à inclure. Le dépistage a concerné 80 enfants pour la détermination moléculaire du déficit en G6PD érythrocytaire. La lymphoséparation et l'étude des cellules T régulatrices ont concerné tous les 80 enfants. Les enfants ont fait l'objet de suivi rigoureux durant 5 mois. A l'issue de ce travail nous retenons que :

- Les moyennes des densités parasitaires de *Plasmodium-falciparum* et de *P. malariae* ont été significativement plus élevées chez les enfants de 3-5 ans que chez les enfants de 6-10ans ($P \leq 0,05$).
- Au cours de la période de surveillance longitudinale, 56,25% des sujets avaient fait au moins un épisode palustre, contre 43,75% n'ayant fait aucun épisode.
- Le déficit en G6PD a été observé dans une proportion de 13,3% dont 9,3% des sujets de sexe féminin contre 4% des sujets de sexe masculin.

- Nous avons trouvé une relation statistique entre les cellules productrices de l'IL10 et le portage du *Plasmodium* à l'inclusion (Ch2=1,79 ; p=0,01).

- La moyenne des proportions des cellules T régulatrices était comparable entre les deux groupes d'enfants : ceux ayant fait un épisode et ceux n'ayant fait aucun épisode (CD4CD25, IL10, TGFβ et Foxp3).

Une étude ultérieure intra-ethnique chez les adultes s'avère nécessaire pour d'éventuelle implication des cellules T régulatrices dans la protection contre le paludisme.

Mots clés : paludisme, cellules T régulatrices, déficit en G6PD (Glucose-6-phosphate Deshydrogenase), Mali.

9. REFERENCES

¹ **OMS**

Aide mémoire N° 94.

Révisé en janvier 2009.

²**SINGH, B., KIM SUNG, L., MATUSOP, A., RADHAKRISHNAN, A., SHAMSUL, S. S., COX-SINGH, J., THOMAS, A. & CONWAY, D. J. (2004)** A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet*, 363, 1017-24.

³ **PALU TROP**

Prise en charge du paludisme en Afrique, Manuel du prescripteur, Impact Malaria, Septembre 2005.

⁴ **OMS**

Aide Mémoire : Paludisme, 1998, N° 94.

⁵ **OMS**

World Malaria Report 2008.

⁶ **OMS**

Grandes lignes du plan d'action de l'OMS pour la lutte contre le Paludisme 1993-2000.
Conférence ministérielle sur le paludisme, Amsterdam, 27 octobre 1992.

⁷ **MEDECINE TROPICALE**

Marc Gentilini.

Flammarion Médecine - Sciences 3ème édition 1982, 4ème tirage, juillet 1985.

⁸ **OMS/UNICEF 2003**

Le rapport sur le paludisme en Afrique 2003.

⁹ **OMS**

Rapport sur la santé dans le monde: la vie au 21^{ème} siècle : une perspective pour tous. 1997.

¹⁰ **PNLP Mali.**

Rapport Annuel de Programme National de lutte contre le Paludisme au Mali

2004. Bamako, Mali.

¹¹ **Dembélé G.**

Place du paludisme dans les hospitalisations pédiatrique à L'HGT.

Thèse de médecine, Bamako 1991 N°31.

¹² **DIAWARA F**

Contribution a l'étude des convulsions fébriles de l'enfant et du nourrisson a L'Hôpital Gabriel Toure.

Thèse de médecine, 121_91m07

¹³ **GUINDO O.**

Epidémiologie du paludisme dans la région de Sikasso : formes graves et compliquées a l'Hôpital Régional de Sikasso, étude CAP et saisonnalité dans un village rural.

Thèse Médecine. Bamako, 2002, FMPOS. N: 02-M-104.

14

BRYCESON ADM, FLEMING AF, EDINGTON GM.

Splenomegaly in Northern Nigeria. *Acta Trop.* 1976; 33:424-426.

¹⁵ **GREENWOOD BM, GROENENDAAL F, BRADLEY AK, GREENWOOD AM, SHENTON F, TULLOCH S, HAYES R.**

Ethnic differences in the prevalence of splenomegaly and malaria in the

Gambia. *Ann Parasitol.* 1987; 81: 345-354.

¹⁶ **MODIANO D, PETRARCA V, SIRIMA BS, NEBIE I, DIALLO D, LAMIZANA L, ESPOSITO F, COLUZZI M.**

Plasmodium falciparum malaria in sympatric ethnic groups of Burkina Faso, West Africa. *Parasitologia* 1995, 37: 255-259.

¹⁷ **MODIANO D, PETRARCA V, SIRIMA BS, NEBIE I, DIALLO D, ESPOSITO F and COLUZZI M.**

Different response to *Plasmodium falciparum* malaria in West Africa sympatric ethnic groups.

Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 13206-11.

¹⁸ **DOLO A, MODIANO D, GUINDO H, DOLO G, MAIGA B, COULIBALY D, TOURE Y, COLUZZI M, DOUMO OK.**

Interethnic comparison of malaria susceptibility in Mali *Parassitologia* 42 (Suppl.1), 2000; 131.

¹⁹ **DOLO A, MODIANO D, MAIGA B, DAOU M, DOLO G, GUINDO H, BA M, MAIGA H, COULIBALY D, PERLMANN H, BLOMBERG MT, TOURE YT, COLUZZI M, DOUMBO O.**

Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *Am J Trop. Med Hyg*; 2005 mar, 72(3): 243-248.

20

FAROUK S.E, SALAH E, DOLO A, SANDOR B, KOURIBA B, MAIGA B, FARNERT A, PERLMANN H, MONTGOMERY S, HATANO M, DOUMBO OK, TROYE-BLOMBERG M.

Different antibody and cytokine-mediated responses to *Plasmodium falciparum* parasite in two Sympatric Ethnic Tribes living in Mali. *Microbes infect.* 2005 .7(1): 110-117.

²¹ **SANDOR B, DOLO A, MAIGA B, HAYANO M, GRANATH F, MONTGOMERY SM, DAOU M, ARAMA C, TROYE-BLOMBERG M, DOUMBO OK, FARNERT A.**

Spleen enlargement and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infection in two ethnic groups with different malaria susceptibility in Mali, West Africa.

Transactions of the Royal society of Tropical Medicine and Hygiene. 2006 mar; 100(3): 248-257.

²² **GREENWOOD BM, GROENENDAAL F, BRADLEY AK, GREENWOOD AM, SHENTON F, TULLOCH S, HAYES R.**

Ethnic differences in the prevalency of splenomegaly and malaria in the

Gambia. *Ann Tromped Parasitol.* 1987; 81: 345-354.

²³ **SMITH T**

Attributable Fraction estimate and Case Definitions for malaria in Endemic Areas : Statics in Medicine, vol 13, 2345-2358 (1994).

²⁴ **ANGULO I and FRESNO M.**

Cytokines in the pathogenesis and protection against malaria

Clin Diag Lab Immunol; 2002; **9(6)**: 1145-52.

²⁵ **GUINDO O.**

Epidémiologie du paludisme dans la région de Sikasso : Forme grave et compliquées à l'hôpital régional de Sikasso ; étude CAP et saisonnalité dans le village rural. Thèse : médecine, Bamako, 2002. N°104.

26

MAIGA B.

Susceptibilité au paludisme et groupes ethniques sympatriques dans le cercle de Koro (Mopti). Thèse Médecine FMPOS 2000 N° 105.

²⁷ **Miller L. H., Baruch D. I., Marsh K., Doumbo O. K.**

The Pathogenic basis of Malaria Nature 2002; (42): 251-6.

²⁸ **CLARK IA, ALLEWA LM, MILLS AC and COWDEN WB.**

Pathogenesis of Malaria and clinically similar conditions *Clin. Microbiol. Rev*; 2004; **17**: (3) 509-39.

²⁹ **BARUCH DI, GORMELY JA, MA C, HOWARD RJ and PASLOSKE BL.**

Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 as a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1996; PP. 3497-3502.

³⁰ **SU XZ, HEATWOLE VM, WERTHEIMER SP, GUINET F, HERRFELDT JA and PETERSON DS et al.,**

The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes, *cell* **82**: 1995; pp. 89-100.

³¹ **OMS**

UNICEF, World Malaria Report 2005 (Roll Back Malaria). **24**.

³² **ANN O'FEL (1996-1997).**

Association Française des Enseignants de parasitologie.

Parasitologie Mycologie. Ed. Collections Références.

³³ **TROYE-BLOMBERG M, WORKU S, TANGTEERAWATA P, JAMSHAIID R, SODERSTON K, ELGHAZALI G, MORETTA L, HAMMARSTOM M, MINCHEVA-NILSON L.**

Human gamma delta T cells that inhibit the in vitro growth of the a sexual blood stages of the *Plasmodium falciparum* parasite express cytolytic and proinflammatory molecules. *Scand. J. Immunol.* 1999;50(6):642-50.

³⁴ **STRUİK, RILEY EM.**

Does malaria suffer from lack of memory?
Immunol Rev. 2004 oct;201:268-90.

³⁵ **PERLMANN P and TROYE-BLOMBERG M.**

Malaria and the immune system in humans, (eds. Perlmann, P, Troye-Blomberg, M) in Malaria Immunology. Chem. Immunol, Basel, Karger, 2002, 80: 229.

³⁶ **MATSUYAMA J, KAGA S, KANO S, MINOTA S.**

A novel costimulation pathway via the 4C8 antigen for the induction of CD4+ regulatory T cells
The Journal of Immunology, 2002, 169: 3710-3716.

³⁷ **SAKAGUCHI S, SAKAGUCHI N, SHIMIZU J, YAMAZAKI S, SAKIHAMA T, ITOH M, KUNIIYASU Y, NOMURA T, TODA M, TAKAHASHI T.**

Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. Immunol Rev, 2001; 182: 18-32.

³⁸ **SHEVACH E M.**

CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers.
Nature Reviews, 2002, Vol 2: 389-400.

³⁹ **WALTHER M, TONGREN JE, ANDREWS L, KORBEL D, KING E, FLETCHER H, ANDERSEN RF, BEJON P et al.**

Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. Immunity. 2005, 23 : 287-296.

⁴⁰ **TAPILY AS.**

Rôle potential des cellules gamma/delta et Tréglultrices dans la protection contre le paludisme dans deux groupes ethniques (peulh et Dogon) vivant en sympathie au Mali.
Thèse Pharmacie, Bamako, 2009.-36P, 64.

⁴¹ **TRAORE K.**

Déficit en G6PD érythrocytaire et paludisme dans une population âgée de 3 mois à 20 ans de la ville de Bandiagara(Mali). Thèse Med, Bamako, 2005.-54P, 66.

⁴² **TRAORE A.**

Déficit en G6PD érythrocytaire : fréquence, relation avec le paludisme dans une population âgée de 3 mois à 20 ans des villes de Kangaba et Kela, region de Koulikoro (Mali).
Thèse Pharmacie, Bamako, 2003.-34P.

⁴³ **SAGARA I, DIKO A, THERA M A, KLION A, DIEMERT D, DIALLO D A, SOGOBA M, NIAMBELE M B, YALCOUYE D, MILLER L, DOUMBO O K.**

No increase in the incidence of Plasmodium falciparum malaria after stopping malaria chemoprophylaxis in children living under different entomologic inoculation rates (EIRs) in Mali.

⁴⁴ **KAMATE B (2002).**

Effet du niveau de transmission et de l'âge sur l'incidence du paludisme simple à Sotuba et Doneguebougou Mali en 1999 et 2000. Thèse de Med ; FMPOS N° 143.

⁴⁵ **DOLO A, CAMARA F, POUADIOUGOU B, TOURE A, KOURIBA B, BAGAYOK M, SANGARE D, DIALLO M, BOUSMAN A, MODIANO D, TOURE YT ET DOUMBO O (2003).**

Epidémiologie du paludisme dans un village de savane soudanienne du Mali (Bancoumana). Bull soc pathol Exot. Nov (4): 308-12.

⁴⁶ **ROGIER C, (2003).**

Paludisme de l'enfant en zone d'endémie : épidémiologie, acquisition d'une immunité et stratégies de lutte. Med. Trop. 63 (4-5) : 449 – 464.

⁴⁷ **TORCIA MG, SANTARLASCI V, KONATE A, CLEMENTE A, MAGGI L, MANGANO VD, VERRA F, LIOTTA F, FROSALI F, ANGELI R, GARACI E, COLUZZI M, ANNUUZIATO F, ROMAGNANIE S, SEVERINI C, LUCIBELLO M, BANCONE G, NEBBIE I, CUZZOLINO F, VERONICA S, ANMARIA C, BIENVENU S, SIRIMA BS, MARIO C and DAVID M.**

Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria.

646-651/PNAS/January15, 2008/vol105/N°2.

Annexe 1: Marquages des Lymphocytes pour l'étude des cellules Gamma-Delta et des T reg.

	FL1 (FITC)	FL2 (PE)	FL3 (PC5)
<u>1-GammaDelta T cells :</u>			
Unstained	-	-	-
Isotype control	IgG2	IgG1	IgG1
Control PE (FL2)	-	CD3-PE	-
Control (FL3)	-	-	CD4-PC5
Control FL1	TCR V γ 2	-	-
Sample (Volunteer)	anti-TCR V γ 2	anti CD3-PE	TCR-Pan $\gamma\delta$ -PC5
<u>2-Gamma Interferon staining</u>			
Control PE (FL2)	-	AntiH-INF- γ	-
<u>3-T reg :</u>			
Control PE (FL2)	-	Anti-H-Foxp3	-
Sample (Volunteer)	Anti-CD25-FITC	anti-CD3-PE	CD4-PC5