

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple – Un But – Une Foi

Université des Sciences, des Techniques
et des Technologies de Bamako



Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie

DER de Santé Publique et Spécialités

N° DERSP/FMOS/USTTB

Mémoire

Master en Santé Publique

Option : Epidémiologie

Année Universitaire 2015 - 2016

Association entre les polymorphismes du globule rouge et les
indicateurs palustres chez les enfants de 6 mois à 17 ans dans la
commune rurale de Bancoumana au Mali

Présenté et soutenu le 06/06/2017

Par :

Mr Drissa KONATE

Président : Dr Kassoum KAYENTAO
Membre : Dr Seydou FOMBA
Directeur : Pr Seydou DOUMBIA
Co-directeur : Pr Mahamadou DIAKITE

Sponsor : Université John Hopkins des Etats-Unis

PLAN DE PRESENTATION

1. INTRODUCTION
2. QUESTION DE RECHERCHE
3. HYPOTHESE DE RECHERCHE
4. REVUE DE LA LITTERATURE
5. OBJECTIFS
6. METHODOLOGIE
7. RESULTATS
8. DISCUSSION
9. LIMITES
10. CONCLUSION
11. RECOMMANDATION
12. PERSPECTIVES
13. REFERENCES
14. ANNEXES

Remerciements

A ma Famille : pour le soutien constant tout au long de cette formation.

A mes amis et collègues: pour leur accompagnement indéfectible durant cette formation.

Aux membres de l'unité Immunogénétique de l'ICER-Mali : pour leur encouragement et leur disponibilité constante pendant cette formation.

A mes maitres de stage de l'ICER-Mali : nos reconnaissances sincères au responsable de l'unité d'Immunogénétique et Parasitologie de l'ICER-Mali, Professeur Mahamadou Diakité, pour sa disponibilité et pour toutes les actions entreprises afin de faciliter cette formation. Egalement au Dr Sory I. Diawara pour son encouragement et son soutien tout au long de cette formation.

A la direction du DERSP : pour leur engagement de mettre à disposition les enseignants de qualité, mais aussi leur disponibilité à trouver les solutions aux différents problèmes malgré les difficultés.

A l'encadrement : pour la qualité des enseignements dispensés, leur disponibilité et la volonté de transmettre leur savoir.

Au chef du DER : Nos vifs remerciements pour toutes les actions qu'il entreprend pour améliorer les conditions des apprenants.

A nos Maitres, nos collègues et tout le personnel du l'ICER/FMOS/FAPH : pour les gestes de solidarité exemplaire que nous avons senti au cours de mon stage dans le service.

Au chef du Département d'Entomologie Médicale et des maladies à transmission Vectorielle : pour votre accueil et les démarches entrepris pour faciliter le déroulement de mon stage dans votre département.

A l'université John Hopkins des Etats-Unis: pour avoir financé notre formation à travers leur programme de bourse FOGARTY international.

A nos collègues apprenants de la quatrième promotion du Master1 : pour la bonne collaboration et l'esprit d'équipe.

Au Doyen de la Faculté de Médecine et d'OdontoStomatologie : pour sa confiance mise sur nous en acceptant de nous soutenir pour le financement de notre formation.

A toutes les personnes de près ou de loin qui nous ont aidées au cours de cette formation.

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AUF	Agence Universitaire de la Francophonie
CRF	Formulaire de Report des Cas
CSCoM	Centre de Santé Communautaire
DEAP	Département d'Epidémiologie et des Affections Parasitaires
DEMEVE	Département d'Entomologie Médicale et des maladies à transmission Vectorielle
DERSP	Département d'Enseignement et de Recherche en Santé Publique
EDSM	Enquête Démographique et de Santé du Mali
FAPH	Faculté de Pharmacie
FMOS	Faculté de Médecine et d'OdontoStomatologie
G6PG	Glucose-6-Phosphate déshydrogénase
GE	Goutte Epaisse
GIS	Geographic Information System (Système d'Information Géographique)
Hb	Hémoglobine
HbAC	Hémoglobine AC
HbAS	Hémoglobine AS
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
ICER-Mali	International Center of Excellence in Research of Mali (Centre International d'Excellence en Recherche du Mali)
MRTC	Malaria Research and Training Center (Centre de recherche et de Formation sur le Paludisme)
NIAID	Institut National d'Allergie et des Maladies Infectieuses (National Institute of Allergy and infectious Diseases)
NIH	Instituts Nationaux de Santé des Etats Unis (National Institutes of Health)
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
RN15	Route Nationale 15
RR	Risque Relatif
USTTB	Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako
WHO/OMS	World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)

Table des matières

REMERCIEMENTS	II
LISTE DES ABRÉVIATIONS	III
LISTE DES FIGURES	VI
RÉSUMÉ	VII
SUMMARY	VIII
1. INTRODUCTION	1
2. QUESTION DE RECHERCHE	3
3. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	3
4. REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
5. OBJECTIFS	6
5.1. OBJECTIF GENERAL	6
5.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES.....	6
6. MÉTHODOLOGIE	7
6.1. CADRE D'ETUDE	7
6.2. TYPE D'ETUDE.....	9
6.3. PERIODE D'ETUDE	10
6.4. POPULATION D'ETUDE	10
6.4.1. Critères d'inclusion	10
6.4.2. Critères de non-inclusion	10
6.5. ECHANTILLONNAGE	10
6.6. VARIABLES MESUREES	11
6.7 TESTS DE LABORATOIRE.....	11
6.7.1. Détermination du groupe sanguin ABO	11
6.7.2. Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10	12
6.7.3. Procédures standard opératoires (SOP) de la goutte épaisse	13
6.7.4. Procédures Standard Opératoires (SOP) de Frottis Mince	17
6.7.5. Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alphathalassémie par PCR.....	19
6.7.6. Détection du déficit en G6PD érythrocytaire par la technique de Polymérase Chain Réaction (PCR nichée : Méthode de digestion)	21
6.8. ASPECTS OPERATIONNELS DES VARIABLES DE L'ETUDE	25
6.9. DEFINITIONS OPERATIONNELLES	25
6.10. TECHNIQUES DE COLLECTE DES DONNEES	25
6.11. OUTILS DE COLLECTE DES DONNEES.....	26
6.12. DEROULEMENT D'ETUDE.....	26
6.13. GESTION ET ANALYSE DES DONNEES	27

6.14. CONSIDERATIONS ETHIQUES.....	28
7. RÉSULTATS	30
7.1. RESULTATS DESCRIPTIFS	30
7.2. RESULTATS ANALYTIQUE	31
8. DISCUSSION	35
9. LIMITES.....	40
10. CONCLUSION.....	41
11. RECOMMANDATIONS.....	42
12. PERSPECTIVES.....	43
13. RÉFÉRENCES	44
14. ANNEXES.....	47

Liste des figures

Figure 1 : Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana [23]	9
Figure 2: Technique de la goutte épaisse	15
Figure 3: technique du frottis mince.	18
Figure 4 : Photographie de gel (résultat)	25
Figure 5 : Identification des enfants au début de l'étude	29

Liste des tableaux

Table I : Préparation du volume final de 40.7L.....	22
Table II : Préparation du MIX	23
Table III: Composition du MIX de digestion	24
Tableau IV: Caractéristiques des enfants de l'étude au cours des saisons de transmission de 2008 à 2011	30
Table V: relation entre risque du paludisme, le sexe, les groupes d'âge, l'utilisation de moustiquaire et les polymorphismes du globule rouges chez les enfants au cours des saisons de transmission de 2008 à 2011 dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin après ajustement.....	31
Table VI: Relation entre la parasitémie symptomatique, le sexe, l'âge, l'utilisation de moustiquaire et les polymorphismes du globule rouge chez les enfants au cours des saisons de transmission de 2008 à 2011 dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin après ajustement.....	33

Résumé

Les indicateurs palustres sont souvent influencés par certains facteurs liés à l'hôte tels que les polymorphismes du globule rouge. Le but de cette étude était d'analyser l'influence des polymorphismes du globule rouge sur les indicateurs de morbidité palustre.

Au total, 926 enfants de 6 mois à 17ans résidant dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin ont été suivis aux cours des saisons de transmission de 2008 à 2011 pour comparer l'incidence du paludisme entre ceux ayant les polymorphismes et ceux sans polymorphismes du globule rouge.

L'analyse par la régression de cox a montré après ajustement sur les autres variables que le sexe ne constituait pas un risque de survenue du paludisme. Ce risque diminuait avec l'âge (6-10ans : RR=0,85 95%IC [0,73 ; 0,99] et 11-17ans : RR=0,59 95%IC [0,49 ; 0,70] et avec l'utilisation de moustiquaire (RR=0,70 95%IC [0,61 ; 0,81]). La forme AS de l'hémoglobine était associée à une réduction de risque du paludisme (RR=0,70 95%IC [0,58 ; 0,85] et non la forme AC (RR=0,95 95%IC [0,72 ; 1,24]). Par contre, ce risque était élevé avec la forme homozygote du déficit en l'alphathalassémie (RR=1,91 95%IC [1,17 ; 3,11]). Les autres formes de polymorphisme tels les déficits en G6PD et le groupe sanguin n'étaient pas associés significativement à une variation de risque du paludisme.

Les résultats suggèrent que l'utilisation de moustiquaire, l'âge et l'hémoglobine AS étaient associés à une réduction de risque du paludisme. Ce risque était élevé avec la forme homozygote du déficit en l'alphathalassémie.

Mots-clés : Indicateurs, Paludisme, Globule rouge, Polymorphismes, Protection

Summary

Malaria indicators are often influenced by red blood cell polymorphisms. The aim of this study was to evaluate the polymorphisms influence on malaria morbidity indicators.

A total, 926 children aged between 0 month and 17 years in Kéniéroba, Fourda and Bozokin villages were monitored during malaria transmission 2008 to 2011 to compare malaria incidence between children with polymorphisms and the children without red cells polymorphisms.

The analysis by cox regression showed, after adjustment on the other variables, that sex did not constitute a risk of malaria. This risk decreased with age (6-10 years: RR=0.85 95% CI [0.73, 0.99]; 11-17 years: RR=0.59 95% CI [0.49; 0.70]) and bed nets use (RR=0.70 95% CI [0.61; 0.81]). Hemoglobin AS was associated with a reduction of malaria risk (RR = 0.70 95% CI [0.58; 0.85] and not AC (RR = 0.95 95% CI [0.72; 1.24] CI 1.17, 3.11]. On the other hand, this risk was high with the homozygous form of the deficiency in alphathalassemia (RR = 1.91 95% CI [1.17, 3.11]). The other polymorphisms forms, such as deficiencies In G6PD and blood group were not significantly associated with a malaria risk variation.

The results suggest that the bed nets use, age and hemoglobin AS were associated with a reduction in the risk of malaria. This risk was high with the homozygous form of alphathalassemia deficiency.

Keywords: Indicators, Malaria, Red blood cell, Polymorphisms, Protection.

1. Introduction

Le paludisme est une parasitose provoquée par la présence et la multiplication des protozoaires du genre *Plasmodium* dans l'organisme. Il est transmis à l'homme par le moustique femelle lors de son repas sanguin. Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2016, le nombre de cas de paludisme est estimé à 212 millions dans le monde dont 88% sont enregistrés dans la région africaine ; le nombre de décès à 429000 dont 92% en Afrique [1]. Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne de par sa morbidité et sa mortalité, mais aussi son impact négatif sur le développement dans ces pays d'où l'aggravation de la pauvreté [2]. Les femmes enceintes et enfants de moins de 5 ans les représentent les couches les plus vulnérables à cette maladie surtout dans les zones endémiques [1, 3].

Au Mali, le paludisme représente 40% des motifs de recours aux soins dans les formations sanitaires, sa prévalence est de 36% chez les enfants de moins de 5 ans selon l'enquête sur les indicateurs du paludisme 2015 [4]. La prévalence du paludisme est extrêmement variable en fonction des faciès épidémiologiques. Cette hétérogénéité de la distribution du paludisme est modulée par certains facteurs, tels que le type de vecteur qui transmet le parasite, l'espèce plasmodiale, le niveau d'immunité de l'hôte et les caractéristiques environnementales qui entretiennent l'interaction entre la triade homme-vecteur-parasite.

Dans son rapport 2015, L'OMS estime que les enquêtes nationales de plus en plus fréquentes en Afrique subsaharienne sur la prévalence du paludisme permettent de fournir les informations sur les tendances en matière de lutte contre le paludisme. Cependant, il estime aussi que ces données sont insuffisamment cohérentes dans certains pays comme le Mali pour identifier les tendances de diminution du paludisme [2]. Pour faire face à ces situations, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a décidé de renforcer son système de surveillance épidémiologique au niveau de toutes les formations sanitaires dans l'ensemble du pays. En vue de produire des données de qualité sur le paludisme pour prendre des décisions adéquates au moment opportun. Cette surveillance se fait par la mesure des indicateurs de morbidité et de mortalité chez l'hôte, le taux l'inoculation entomologie chez le vecteur. L'appréciation de ces indicateurs permet de fournir des informations sur la situation du paludisme sur le plan national, mais elle permet également d'évaluer les différentes stratégies de lutte contre le paludisme mises en œuvre par le PNLP dans notre pays.

Les données épidémiologiques montrent que les indicateurs de morbidités palustre sont souvent influencés par certains facteurs liés à l'hôte, tels que les polymorphismes du globule rouge dans les zones d'endémie palustre [5]. Le but de cette étude était d'analyser l'influence de ces polymorphismes du globule rouge sur les indicateurs de morbidité palustre chez les enfants au cours de la saison de transmission palustre. Ces données serviront à renforcer celles qui existent déjà dans le cadre de la surveillance épidémiologique du paludisme au Mali, afin que l'OMS puisse avoir des informations suffisantes et cohérentes sur la situation du paludisme dans notre pays. Elles serviront également à renforcer les données sur la relation entre ces polymorphismes et les indicateurs palustres afin d'orienter la communauté scientifique sur les futures questions de recherche.

2. Question de recherche

Quelle est l'influence des polymorphismes du globule rouge sur les indicateurs de morbidité palustre chez les enfants de 6 mois à 17 ans dans la commune rurale de Bancoumana au Mali ?

3. Hypothèse de recherche

Les polymorphismes du globule rouge réduisent significativement le risque du paludisme chez les enfants de 6 mois à 17 ans dans les zones d'endémie palustre au Mali.

4. Revue de la littérature

Les polymorphismes du globule rouge sont responsables de maladies génétiques caractérisées par des anomalies de la partie protéique de l'hémoglobine. Les polymorphismes du globule rouge les plus étudiés sont :

- ✚ Le trait drépanocytaire est une maladie génétique due à une mutation ponctuelle au niveau de la position 6 du gène codant pour la chaîne β de l'hémoglobine (gène porté par le chromosome 11). Cette anomalie se caractérise par une substitution de la glutamine par la valine, entraînant ainsi le remplacement de l'hémoglobine A par l'hémoglobine S. Pour l'hémoglobine C, cette substitution de la glutamine se fait par la lysine à la même position [6].
- ✚ Les thalassémies sont des affections génétiques caractérisées par une réduction de la synthèse des chaînes de globine α (ou β) de l'hémoglobine due à une anomalie au niveau des gènes de régulation. Il existe deux types de thalassémies selon que la chaîne α (α -thalassémie) ou β (β -thalassémie) soit en cause. Les thalassémies sont très courantes dans le bassin méditerranéen, en Afrique et dans le sud-est de l'Asie [6].
- ✚ Le déficit en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD) est une anomalie génétique dont le gène codant pour la G6PD est porté par le bras long du chromosome X, en position q28. L'enzyme de référence est dénommée G6PD (B+) dont l'activité enzymatique est de 100% avec une fréquence de 60-80% dans la population [7]. Le variant (A+) diffère de (B+) par un nucléotide en position 376 de la séquence nucléotidique où l'adénine est remplacée par la guanine. Cette mutation ne confère pas de résistance au paludisme. Le variant (A-) rencontrée dans la population noire notamment en Afrique sub-saharienne, atteint typiquement des fréquences de près de 25% dans les populations vivant en zones d'endémie palustre [7]. Ce variant a une activité enzymatique de 12% et a été décrit comme un facteur de réduction du risque de paludisme grave pour la forme hétérozygote et la forme hémizyote. L'allèle (A-) diffère de (A+) par un nucléotide en position 202 où la guanine est remplacée par l'adénine [8, 9].
- ✚ Le groupe sanguin ABO érythrocytaire est un ensemble d'antigènes glucidiques sur la membrane des globules rouges. Le système ABO est défini selon la présence ou non de l'antigène A et de l'antigène B à la surface des globules rouges. Ainsi, les globules rouges du groupe A possède l'antigène A, ceux du groupe B possède l'antigène B, ceux du groupe AB possèdent l'antigène A et l'antigène B alors que ceux du groupe O ne contiennent ni l'antigène A ni l'antigène B. Le locus du gène ABO se trouve en

position 9q34 sur le bras long du chromosome 9 [10]. Ce gène se compose de 7 exons dont la taille varie de 28 à 688 paires de bases. La majeure partie (77 %) de la protéine est codée par les exons 6 et 7 [11]. Le groupe sanguin O se caractérise par la présence d'une enzyme inactive, due à une délétion en position 261 dans l'exon d'où l'absence d'antigène à la surface des globules rouges des individus ayant le groupe sanguin O [11].

Les études épidémiologiques ont rapporté que la prévalence des polymorphismes du globule rouge est corrélée à celle du paludisme surtout dans les zones d'endémie palustre [12-17]. Il a été rapporté aussi que ces polymorphismes sont associés à une réduction du risque de paludisme dans les zones d'endémie palustre [18, 19], notamment les traits drépanocytaires (AS et AC) [20], l'alphathalassémie [21], le déficit en G6PD [8] et le groupe sanguin O [21]. Les études menées en 2007 et 2012 dans les mêmes zones, ont porté d'une part sur les effets du déficit en G6PD sur le paludisme et d'autre part les effets des traits drépanocytaires sur le paludisme chez les enfants [8, 22]. Il s'agissait d'une étude cas-témoins comparant l'infection palustre et la densité parasitaire entre la forme AS et la forme AA de l'hémoglobine, les formes graves du paludisme en fonction du déficit en G6PD chez les enfants [8, 22]. Ces études ont montré une protection significative du déficit en G6PD contre les formes graves du paludisme et le trait drépanocytaire AS contre l'infection paludisme et la parasitémie moyenne [8, 22]. Nous nous sommes proposés d'initier cette étude pour investiguer d'autres polymorphismes, comme les thalassémies et le groupe sanguin ABO en plus du déficit en G6PD et les traits drépanocytaires. Afin d'étudier l'influence de ces polymorphismes du globule rouge sur les indicateurs de morbidité palustre comme l'incidence du paludisme et la densité parasitaire. Elle permettra de renforcer les résultats obtenus dans les deux études antérieures sur le déficit en G6PD [8] et l'hémoglobine AS [22] dans les mêmes zones afin d'orienter la communauté scientifique sur les futures questions de recherche.

5. Objectifs

5.1. Objectif général

Etudier l'influence des polymorphismes du globule rouge sur les indicateurs palustres chez les enfants de 6 mois à 17ans dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin pendant les saisons de transmission de 2008 à 2011.

5.2. Objectifs spécifiques

- Comparer l'incidence du paludisme entre les enfants ayant les polymorphismes du globule rouge et ceux sans polymorphismes dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin pendant les saisons de transmission de 2008 à 2011 ;
- Comparer la densité parasitaire entre les enfants ayant les polymorphismes du globule rouge et ceux sans polymorphismes dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin pendant les saisons de transmission de 2008 à 2011.

6. Méthodologie

6.1. Cadre d'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un partenariat entre le MRTC (Malaria Research & Training Center) de la FMOS (Faculté de Médecine et d'OdontoStomatologie) de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) et les Instituts Nationaux de santé des Etats-Unis d'Amérique (NIAID/NIH) sur un projet de recherche sur le paludisme. L'étude s'est déroulée dans trois villages dans la commune rurale de Bancoumana. Situé à 55km à l'ouest de Bamako sur la route nationale 15 (RN15), Bancoumana est une zone d'endémie palustre où la transmission saisonnière est intense et longue allant de juin à décembre. L'ICER-Mali entretient des relations étroites avec la commune de Bancoumana depuis 1993 dans le cadre de ces projets de recherche sur les parasitoses, notamment le paludisme.

Le centre de Bancoumana dispose actuellement des infrastructures adéquates et suffisantes pour la conduite des activités de recherche. En plus, les habitants de la commune sont disponibles pour participer et soutenir les différentes activités de recherche menées par l'ICER-Mali. Toutes choses qui font de Bancoumana un site potentiel de recherche pour l'ICER Mali. Donc, le choix de la commune de Bancoumana se justifie facilement pour toutes ces raisons. Les trois villages dans lequel l'étude s'est déroulée sont :

- le village de Kéniéroba est situé au sud-ouest de Bancoumana, à 13km sur la route RN15 de Kangaba. 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 2593 habitants, qui sont essentiellement les malinkés, les peulhs et les bambaras (recensement MRTC/FMPOS 2014). C'est le village où l'équipe était basée pour mener les activités de recherche.
- le village de Fourda est un hameau de pêche situé à 3km au sud-est de Kéniéroba. Il compte 325 habitants, composés de somonos (malinkés), les bambaras et les peulhs (recensement MRTC/FMPOS 2012).
- le village de Bozokin est un hameau de Bancoumana situé à 7km au sud-est. Il compte 341 habitants en majorité bozos (Konta devenu Konaté par le langage mandingue) mais aussi les peulhs et les dogons (recensement MRTC/FMPOS 2012).

Les trois villages sont situés le long du fleuve Niger (Djoliba) qui constitue le principal réseau hydrologique du Mali. Le climat est de type soudano-guinéen. Deux grandes saisons se

succèdent dans cette zone : une saison des pluies allant de juin à octobre et une saison sèche de février à mai. Une saison de transition s'étale entre les deux, allant de novembre à janvier que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de fôbônda qui se caractérise par un rafraîchissement des vents. L'habitat est de type traditionnel avec des cases rondes et rectangulaires en terre battue et aux toitures en chaumes coniques, mais la majorité sont en tôles. Les villages sont situés dans une grande plaine de riziculture qui s'étend jusqu'au fleuve Niger avec de nombreuses retenues d'eau pendant la saison des pluies. Tous ces facteurs créent un environnement physique favorable à la prolifération des moustiques, propices à la transmission du paludisme.

Les pratiques traditionnelles sont assez répandues dans la zone. Elles retardent parfois une meilleure prise en charge des cas pouvant avoir un impact négatif sur les indicateurs du paludisme.

La commune de Bancoumana dispose de cinq centres de santé dont un Centre de Santé Communautaire (CSCoM), huit dépôts de produits pharmaceutiques et une pharmacie (officine privée). Les principales activités socio-économiques sont l'agriculture, la pêche, le commerce et l'élevage.

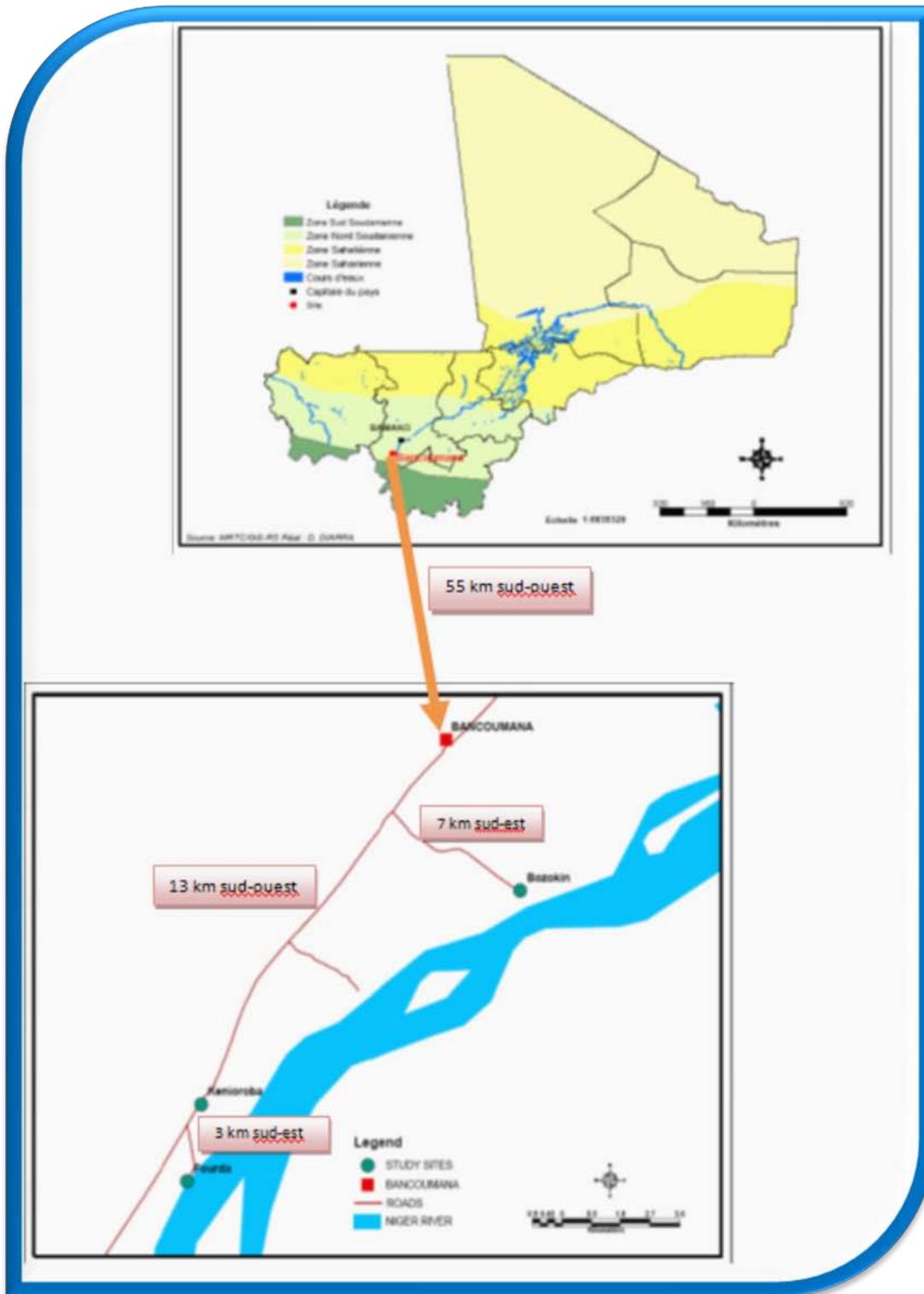


Figure 1 : Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana [23]

6.2. Type d'étude

Il s'agissait d'une étude de cohorte qui consistait à suivre pendant la saison de transmission deux groupes d'enfants, l'un composé des enfants sans polymorphisme du globule rouge (facteur non à risque) et l'autre composé des enfants ayant au moins un polymorphisme du

globule rouge (facteur de risque). Afin de comparer le risque de survenue du premier épisode palustre entre les deux groupes sélectionnés au début de l'étude en mai 2008.

6.3. Période d'étude

L'étude s'est déroulée au cours des saisons de transmission de juin à décembre de 2008 à 2011.

6.4. Population d'étude

La population d'étude était constituée des enfants de 6 mois à 17 ans résidant dans l'un des trois villages d'étude et qui s'étaient présentés au centre de santé de Kéniéroba pour consultation.

6.4.1. Critères d'inclusion

- ❖ résider dans l'un des trois villages d'étude : Kéniéroba, Fourda ou Bozokin ;
- ❖ accepter de participer à l'étude comme attesté par le consentement/assentiment volontaire, libre et éclairé obtenu des parents ou des tuteurs de l'enfant (cf. annexe) ;
- ❖ avoir un âge compris entre 6 mois et 17 ans ;
- ❖ être vu en consultation par l'équipe de recherche pour un symptôme du paludisme.

6.4.2. Critères de non-inclusion

- ❖ tout enfant présentant une condition pouvant le rendre incapable de suivre le protocole (maladie psychiatrique, hémophilie etc...) ;
- ❖ refuser de participer à l'étude.

6.5. Echantillonnage

L'échantillonnage était exhaustif. L'échantillon était constitué progressivement des enfants qui reçus en consultation au centre de santé de Kéniéroba avec un signe du paludisme chez qui une goutte épaisse était réalisée.

La taille minimale a été calculée avec le logiciel Epi Tools epidemiological calculateurs. Les éléments nécessaires pour ce calcul étaient :

- l'incidence prévue chez les enfants n'ayant pas le facteur (20%) ;
- le risque relatif supposé (RR=2) ;
- le niveau de confiance (95%) ;
- la puissance souhaitée pour la détection d'une différence significative entre les deux cohortes (80%).

La taille minimale retenue était 197 enfants par groupe soit 394 enfants au total.

6.6. Variables mesurées

- ❖ les variables sociodémographiques mesurées étaient l'âge, le sexe et la résidence. Ces données ont été recueillies à partir de la carte établie pour chaque enfant au début de l'étude ;
- ❖ la variable de parasitologie était la parasitémie, mesurée avec la technique de la goutte épaisse ;
- ❖ variables hématologiques : groupe sanguin, type d'hémoglobine, alpha-thalassémie et le G6PD ;
- ❖ utilisation des moustiquaires : lors de l'interrogatoire.

6.7 Tests de laboratoire

6.7.1. Détermination du groupe sanguin ABO

le groupe sanguin ABO a été déterminé par la méthode de Beth-Vincent avec le test d'agglutination en utilisant des kits commerciaux à base d'anticorps monoclonaux [24, 25]

Principe

Cette méthode consiste à rechercher 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.

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).

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 et nettoyer avec un tampon d'alcool à 70° ;
- piquer en un coup sec le bout du doigt avec 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.

Résultats

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. Cette technique permet de déterminer les phénotypes : A+, B+, AB+ , O+, A-, B -, AB- et O-.

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

La détermination du type d'hémoglobine a été faite avec l'appareil D-10 de Bio-Rad dont le principe est basé sur la chromatographie liquide de haute performance. Cette technique a permis d'identifier les enfants qui portaient l'hémoglobine AA, les formes hétérozygotes AC et AS [26].

Principe de la procédure du D-10

La technique de 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'hémoglobine 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.

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 ou un cryotube.

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.

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-10.

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 2,0mL d'échantillon, une prédilution est nécessaire. Pour prédiluer, pipeter 1,5mL de solution de lavage/dilution dans un microtube de 1,5mL étiqueté puis ajouter μ de échantillon de sang total. Fermer le tube et bien mélanger. Utiliser un adaptateur pour les microtubes de 1,5 mL.

6.7.3. Procédures standard opératoires (SOP) de la goutte épaisse

 Principe : c'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang et l'identification des différentes espèces (frottis sanguin).

Matériels

- Deux (2) lames porte-objet propres et bien dégraissées ;
- Vaccinostyle stérile, alcool 70°, colorant de giemsa pur, coton hydrophile sec, eau tamponnée (PH=7,2), boîte à lames, chiffon de coton propre, crayon noir à mine grasse ou marqueur indélébile, stylo à bille, bacs de coloration, éprouvette graduées, râtelier, chronomètre, huile d'immersion, registre ou formulaire de notification, un compteur manuel et gant.

 Lieu du prélèvement

Face latérale à l'extrémité d'un doigt (en général gauche, 3^e doigt après le pouce), sur le lobe de l'oreille après avoir réchauffé avec les doigts, au niveau du talon ou gros orteil chez le nourrisson.

Technique de la goutte épaisse

Après avoir noté les renseignements relatifs sur le formulaire ou le registre approprié, ainsi que l'identité du patient sur la lame, réaliser la goutte comme suite :

- En tenant la main gauche du malade la paume tournée vers le haut, choisir le troisième doigt après le pouce (le gros orteil peut être utilisé chez les nourrissons. Le pouce ne doit jamais être utilisé chez les adultes ou les enfants) ;
- Avec un tampon de coton légèrement imbibé d'alcool, nettoyer le doigt en appuyant fermement pour enlever la saleté et la graisse du bout du doigt ;
- Avec le chiffon de coton propre, essuyer le doigt en appuyant fermement pour stimuler la circulation du sang ;
- Avec un vaccinostyle stérile, piquer le bout du doigt d'un seul geste ;
- Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec. S'assurer qu'il ne reste pas de fibres de coton sur le doigt, qui pourraient se mélanger au sang ;
- Appuyer doucement sur le doigt et recueillir une petite goutte de sang au milieu de la lame (cf. figure) ;
- Essuyer le sang restant sur le bout du doigt avec un tampon de coton ;
- Tenir la lame supérieure par les bords ;
- Placer le coin de l'autre lame au centre de la goutte de sang ;
- Étendre légèrement la surface de la goutte par des mouvements spiralés appuyés de la lame (cf. figure) ;
- Assurer cette défibrination mécanique pendant quelques secondes et étendre la goutte sur environ 1 cm de diamètre ;
- Laisser la préparation à plat, à l'abri de la poussière, de la chaleur et des mouches pendant deux heures en zone sahélienne. Respecter ce long temps de séchage sinon il y a risque de décollement de la préparation lors de la coloration (cf. figure).

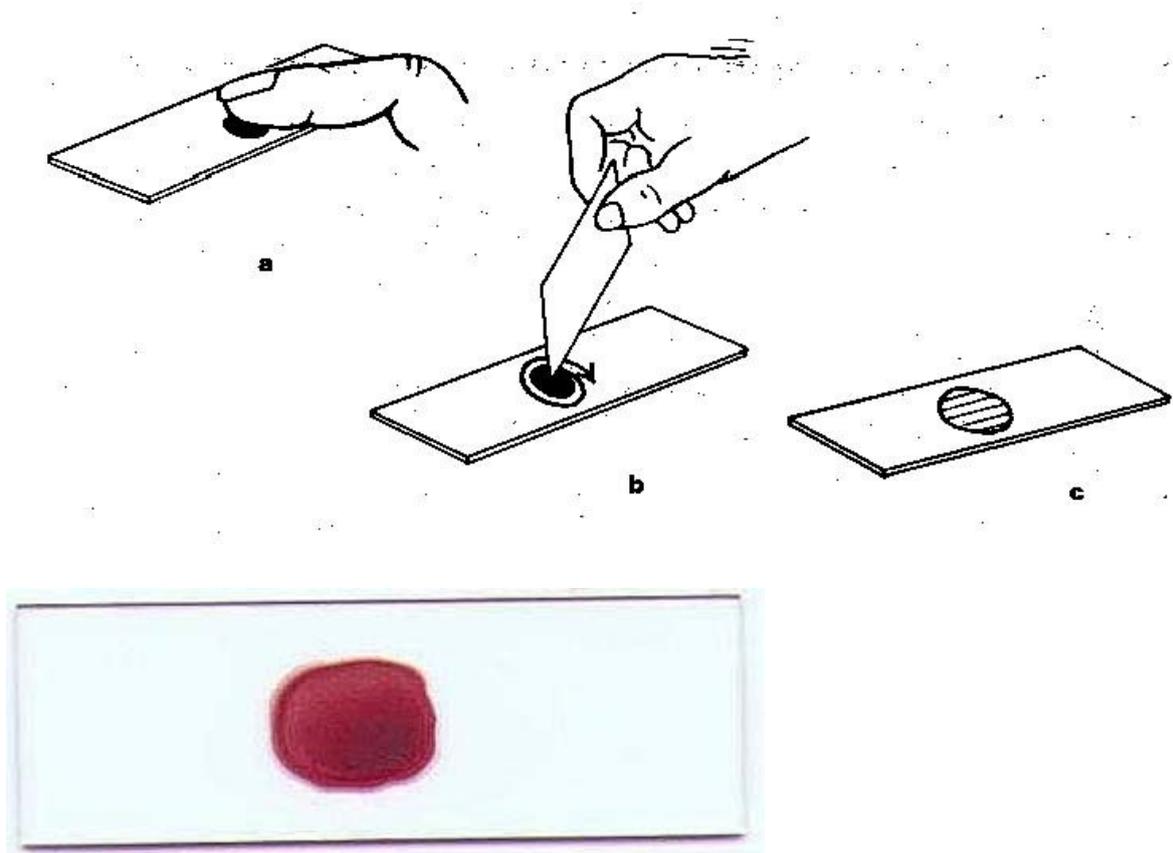


Figure 2: Technique de la goutte épaisse

✚ Technique de coloration de Giemsa

C'est une méthode de coloration classique employée en routine pour la coloration des étalements sanguins et pour le diagnostic du paludisme.

Toujours maintenir la bouteille bien fermée dans un endroit frais, à l'abri de la lumière solaire directe. Les bouteilles en verre blanc peuvent être recouvertes d'une enveloppe de papier noir épais pour les protéger de la lumière.

- Fixer le frottis mince en le tapotant doucement avec un tampon de coton imbibé de méthanol, ou en le trempant dans un récipient de méthanol pendant quelques secondes.
- Préparer la solution de Giemsa à 3ou 5 dans l'eau tamponnée (PH 7,2) et bien mélanger le colorant ;
- Verser doucement le colorant dans la bague jusqu'à ce que la lame soit entièrement recouverte ;
- Laisser colorer pendant 30 à 45 mn pour 30 (15mn pour 10), à l'abri de la lumière solaire et de la poussière ;
- Les lames sont ensuite rincées et séchées sur un râtelier.

✚ Aspects

La lecture se fait au microscope à l'objectif 100 à l'huile d'immersion

- Le fond doit être propre, exempt de débris, coloré en bleu ;
- Les noyaux des leucocytes sont en violet foncé ;
- Les parasites du paludisme sont bien définis, avec une chromatine rouge foncée et un cytoplasme bleu pale. Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, on peut voir un semis de granulations de Schuffner dans le fantôme de l'érythrocyte hôte, en particulier sur les bords du frottis.

✚ Méthodes de numération des parasites du paludisme dans les gouttes épaisses

Parasites par μl (= mm^3) :

On trouvera ci-dessous une méthode pratique de précision suffisante. Elle consiste à dénombrer les parasites par μl de sang dans un frottis épais, par rapport à un nombre prédéterminé de leucocytes. On prend comme norme une moyenne de 7 500 leucocytes par μl . Malgré l'imprécision due aux variations du nombre de leucocytes parmi des personnes en bonne santé et aux variations encore plus grandes observées chez les malades, cette valeur permet des comparaisons valables. Avant de commencer à compter, on examinera l'équivalent de 0,25 μl de sang (environ 100 champs, avec un oculaire 7 X (ou 10X) et un objectif à immersion dans l'huile 100X) dans le frottis épais pour déterminer l'espèce de parasite et les stades présents. Ensuite, on appliquera la méthode suivante qui convient pour les frottis positifs :

1. Un compteur manuel à 4 chiffres nécessaire pour dénombrer séparément les parasites et les leucocytes.
2. a) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié 10 parasites ou plus, noter les résultats sur le formulaire de notification, en indiquant le nombre de parasites par 300 leucocytes.
b) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié neuf parasites ou moins, continuer de compter jusqu'à 500 leucocytes et noter le nombre de parasites par 500 leucocytes.
3. Dans chaque cas, le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes peut être converti en nombre de parasites par μl par la simple formule mathématique suivante :

$$\frac{\text{Nombre de parasites} \times 7\,500}{\text{Nombre de leucocytes}} = \text{parasites par } \mu\text{l}$$

6.7.4. Procédures Standard Opératoires (SOP) de Frottis Mince

Le frottis sanguin consiste en la réalisation d'un étalement monocellulaire des éléments sanguins. Lames à tenir par les bords pour éviter les empreintes digitales grasseuses. Plus la lamelle utilisée pour faire le frottis est mince, plus fin le frottis sera.

✚ Matériel

2 lames porte-objet dégraissées, vaccinostyle stérile, alcool 70°, colorant de giemsa pur, coton hydrophile sec, eau tamponnée (pH= 7,2), méthanol absolu.

✚ Lieu du prélèvement

- A l'extrémité d'un doigt gauche (ni index, ni pouce), sur la face latérale du doigt qui ne doit être ni oedémateux, ni cyanosé, ni traumatisé, ni infecté ;
- Au lobe de l'oreille, après l'avoir réchauffé entre les doigts ;
- Au talon ou au gros orteil chez le nourrisson, après l'avoir réchauffé.

✚ Technique

- Dégraisser la lame à l'alcool (ou au toluène); faire sécher à l'air ou près d'une flamme ou avec un appareil-sèche cheveu (fig. 11a) ;
- Désinfecter le bout du 3eme ou 4eme doigt avec de l'alcool 70° ;
- Piquer le doigt avec un vaccinostyle stérile, d'un seul geste ;
- Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec ;
- Déposer une goutte de sang capillaire ou veineux à l'une des extrémités de la lame ;
- Poser le bord de la deuxième lame en avant de la goutte de sang, le faire glisser en arrière jusqu'au contact de la goutte de sang qui va se répandre sur toute la largeur du bord de la lame supérieure dans l'angle formé par les 2 lames (fig. 11b) ;
- Incliner la lame supérieure de 45° ;
- Pousser fermement la deuxième lame le long de la lame de sang, en la tenant inclinée à 45°, d'un geste rapide et régulier, en avant, vers l'extrémité libre de la lame porte-objet. S'assurer que la deuxième lame reste bien en contact avec la surface de la lame de sang pendant qu'on procède à l'étalement ;
- Faire sécher le film mince de sang obtenu en agitant la lame à l'air. Le frottis doit présenter deux bords et une queue, zones électives de lecture (fig.11c) ;
- Porter le nom du patient ou le numéro de l'examen sur la marge de la lame ou sur la partie large du frottis sanguin au crayon de papier (fig. 11d, 11e) ;
- Placer la lame dans la boîte horizontale (type OMS), à l'abri des mouches, de la poussière et d'une trop forte chaleur si on ne peut la colorer immédiatement ;

- Fixer le frottis sanguin avec le méthanol ;
- Appliquer le colorant de May-Grunwald-Giemsa, ou l'Hémacolor ou colorer avec le Giemsa 3% dans de l'eau tamponnée.

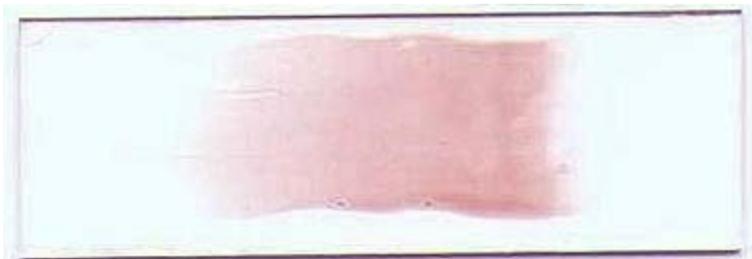
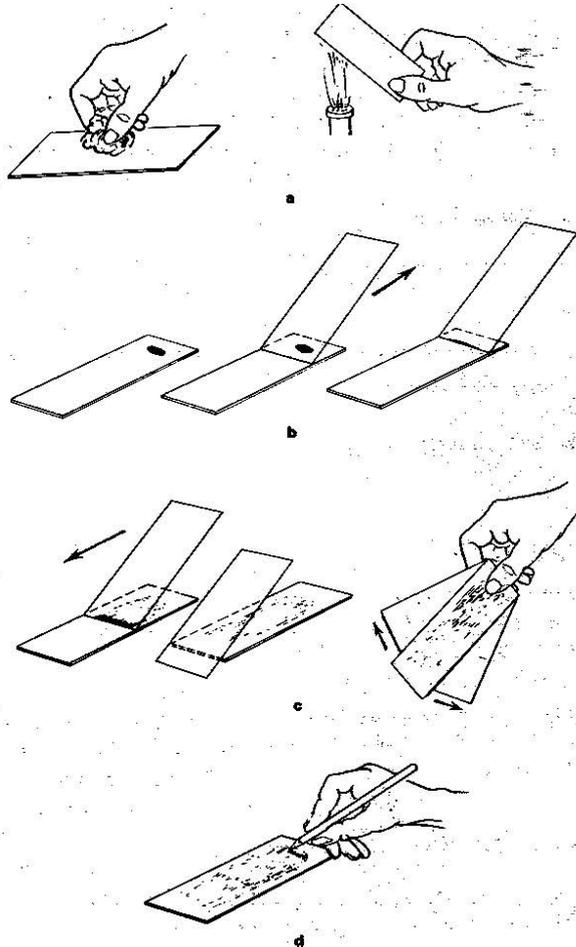


Figure 3: technique du frottis mince.

6.7.5. Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alphathalassémie par PCR

La détection de la suppression de 3,7kb d'alphathalassémie a été faite par la technique de réaction de polymérisation en chaîne nichée (Nested-PCR) afin d'identifier les enfants sans délétion et ceux avec les formes hétérozygote ($-\alpha/\alpha\alpha$) et homozygote ($-\alpha/-\alpha$) [16, 27].

✚ Matériel et réactifs

- Matériel
 - Termocycler, micropipette (1000 μ l, 200 μ l et 10 μ l), embout pour micropipette (1000 μ l, 200 μ l et 10 μ l) et tube PCR 0.2ml.
- Réactifs
 - Le Tris-HCl (pH 8.5), KCl, Betaine (Sigma);
 - dNTP (ATP, GTP, TTP, CTP), Taq polymerase;
 - Les Amorces:
 - $\alpha 2/3.7F = 5'-CCCCTCGCCA AGTCCACC C-3'$
 - $\alpha 2R = 5'-AGACCAGGAAGGGCCGGTG-3'$
 - $3.7/20.5R = 5'-AAAGCACTCTAGGGTCCAG CG-3'$
 - $A3.7F = 5'-CTTTCCCTACCCAGAGCCAGGTT -3'$
 - $3.7R1 = 5'-CCACTTTCCTCCTCCATCCC-3'$
 - $\alpha 2R1 = 5'-AGGAG GGCCCGTTGGGAGGC-3'$.

✚ Procédure

- 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 délété). 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 MgCl₂
- 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).

○ 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 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.

✚ 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.

✚ 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 :

- 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 ;
- 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 ;
- 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.

6.7.6. Détection du déficit en G6PD érythrocytaire par la technique de Polymérase

Chain Réaction (PCR nichée : Méthode de digestion)

La détection du déficit en G6PD a été faite par le génotypage avec la technique d'analyse du polymorphisme de restriction basé sur la longueur des fragments sur les produits d'ADN amplifiés par la PCR. Cette technique a permis d'identifier les enfants sans délétion (A+), ceux ayant la forme hétérozygote et la forme hémizyote [8].

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, elles se positionnent en face de leurs séquences complémentaires respectives. Puis en faisant agir une ADN polymérase (Taq polymerase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'=>3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié.

Matériel technique

- Ciseaux, gants stériles
- Tubes de 0.5ml, 1.5ml, 15ml et 50ml
- Pipettes de 2µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Embouts de 2µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Agitateur, chronomètre, congélateur, four
- Box de conservation Marqueur indélébile Cuve pour migration Cuve pour gel
- Peignes pour gel Chambre à PCR Scotch pour papier Bics
- Balance pèse produit
- Erlenmeyer, paraffine, mouchoir
- Racks pour les tubes Thermocycler Appareil photo UV Film polaroid Centrifugeuse.

Matériel biologique

Confettis logés dans des enveloppes et conservés dans de tiroir à la température ambiante du laboratoire.

Réactifs

Agarose ultra-pure GIBCO BRL Bromure d'Ethidium (Sodium) Amorces :

- Première amplification : A2 : GTCTTCTGGGTCAGGGAT B2 : GGAGAAAGCTCTCTCTCC ;
- Deuxième amplification : NA4 : CCTGTTCCCTCTGCCACA NB4 : GGGGGTCTCAAGAAGTAC ;
- dNTP : desoxy Nucléotide Tri Phosphate ;
- 10 X PCR-Buffer ;
- 50 mM Chlorure de magnésium ;
- Taq polymérase ;
- Eau dé-ionisée.

Préalable : porter des gants stériles et nettoyer l'aire de travail ainsi que les pipettes avec de l'alcool à 70%.

Mode opératoire

✓ Première amplification :

- Identifier les tubes nécessaires pour la réaction PCR envisagée ;
- Ensuite, préparer la mixture (mélange réactionnel) en fonction du nombre total d'échantillon à traiter.

Préparation du MIX (mélange réactionnel) de la première amplification

Table I : Préparation du volume final de 40.7L

Composants	Concentrations finales	Volume/réaction en l
H2O		31,5
10X PCR Buffer		5
50mM MgCL2		1,5
100mM dNTP	10mM	1
Amorces (A2+B2)		1
Taq polymerase		0,2
Total		40,7

- Repartir dans chaque tube 40,7 l de MIX :
- Ajouter 2,5 l d'ADN dans chaque tube correspondant au numéro d'ADN ;
- Placer les tubes bien fermés dans le thermocycler pour la première amplification en utilisant le programme ci-dessous :

Dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes, puis 45 cycles de :

- Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes ;
- Hybridation à 60°C pendant 30 secondes ;
- Extension à 72°C pendant 1 minute ;

- Extension finale à 72°C pendant 4 minutes ;
- Conservation à + 4°C pendant un temps indéterminé ;
- Sortir les tubes et les garder au réfrigérateur à 4°C.
- ✓ Deuxième amplification
- Identifier les tubes pour la deuxième amplification en reportant les numéros précédents ;
- Préparer le MIX pour la deuxième amplification en fonction du nombre d'échantillons à traiter :

Table II : Préparation du MIX

Composants	Concentrations finales	Volume/réaction en μ l
H ₂ O		31,5
10X PCR Buffer		5
50mM MgCl ₂		1,5
100mM dNTP	10mM	1
Amorces (NA4/NB4)		1
Taq polymérase		0,2
Total		40,7

Repartir dans chaque tube 40,7 μ l de MIX :

- Ajouter 1 μ l du produit de la première amplification dans chaque tube correspondant ;
- Placer les tubes dans le thermocycler pour la 2^{ème} amplification suivant le programme ci-après :

Dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes, puis 35 cycles de :

- Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes ;
- Hybridation à 60°C pendant 30 secondes ;
- Extension à 74°C pendant 45 secondes ;
- Extension finale à 74°C pendant 5 minutes ;
- Conservation à 4°C pendant une durée illimitée.

🚦 Révélation

- Préparer le moule à gel contenant les peignes en fonction du nombre d'échantillons à traiter ;
- Préparer un gel d'agarose à 2% comme suit : dissoudre 2 g d'agarose dans 100 ml de TBE à 0,5X, faire bouillir ce mélange dans un four à micro-onde pendant 3mn, ajouter 3L de Bromure d'Ethidium à 10mg/ml dans l'agarose bouillie ;

- Couler le gel dans le moule et attendre sa solidification ;
- Enlever les peignes et placer le gel avec moule dans la cuve de migration contenant le TBE à 0,5X. Le gel doit être entièrement immergé ;
- Découper le papier parafilm ;
- Placer sur le parafilm 1µl de Dye pour chaque échantillon à migrer ;
- Placer 5µl du marqueur de poids moléculaire dans le premier puits ;
- Mélanger 10µl de chaque échantillon au Dye puis loger dans les puits les échantillons ;
- Faire migrer à 188 volts, 500 ampères pendant 20-30 minutes ;
- Sortir le gel du moule et le placer sur l'appareil à UV pour la photographie ;
- Annoter la photo en marquant devant chaque puits le numéro de l'échantillon correspondant.

 Interprétation de la photographie

Une bonne réaction se traduit par la présence de bandes. Dans ce cas, il faut apprécier la conformité de la taille du produit attendu ainsi que les témoins négatifs et positifs.

- Digestion des produits d'amplification
- Identifier les tubes avec numéros correspondants ;
- Préparer le MIX pour la digestion (le volume dépend du nombre de réactions).

Table III: Composition du MIX de digestion

REACTIFS	VOLUME PAR REACTION
10X Buffer K	3 1
10X BSA	3 1
HSP92II ou NLAIII	1 1
H2O	13 1
Total	20 1

- Mettre dans chaque tube 20µl de MIX ;
- Ajouter 10µl du produit de la 2^{ème} amplification dans les tubes correspondants ;
- Mettre les tubes bien fermés dans le bain-marie à 37°C pendant 1 à 2 heures de temps ;
- Enlever les tubes dans le bain-marie et les placer à +4°C dans le réfrigérateur ;
- Faire migrer à 188 volts, 500 ampères pendant 20-30 minutes et photographier.

 Interprétation de la photographie

L'interprétation se fait de manière comparative, ainsi les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin déficitaire correspondent aux sujets déficients en G6PD et ceux

avec des bandes de même taille que le témoin normal correspondent aux sujets normaux pour la G6PD du type.



Figure 4 : Photographie de gel (résultat)

6.8. Aspects opérationnels des variables de l'étude

- ❖ variables dépendantes (variables d'intérêt): incidence du paludisme et la densité parasitaire ;
- ❖ variables indépendantes (variables explicatives): sexe, l'âge, polymorphismes du globule rouge et utilisation de moustiquaires.

6.9. Définitions opérationnelles

- ✚ incidence du paludisme : défini par la survenue du premier épisode palustre au cours du suivi ;
- ✚ parasitémie : définie par une densité parasitaire supérieure ou égale à 25 de *Plasmodium falciparum* (formes asexuées) par microlitres de sang périphérique ;
- ✚ polymorphisme du globule rouge : tout enfant ayant une anomalie du globule rouge comme les traits drépanocytaires (AC, AS), le déficit en G6PD (hétérozygote ou hémizygote), une déficience en alphathalassémie (hétérozygote ou homozygote) et le groupe sanguin O ;
- ✚ indicateur : variable qui permet de décrire l'état de santé d'une population [28]. Les indicateurs de morbidité du paludisme mesurés au cours de cette étude étaient: l'incidence du paludisme et la densité parasitaire.

6.10. Techniques de collecte des données

L'enquête par questionnaire a concerné deux cibles :

- ❖ unité répondant : L'interview des répondants des enfants a porté sur les manifestations cliniques du paludisme et les données sociodémographiques à partir de la carte d'étude établie au début de l'étude pour chaque enfant ;
- ❖ unité statistique : La mesure des caractéristiques des enfants a porté sur les signes de l'examen physique et la parasitémie dans le sang périphérique.

6.11. Outils de collecte des données

- ✓ registre de consultation : Les informations de l'interview des répondants des enfants sur les manifestations cliniques et les caractéristiques sociodémographiques étaient recueillies dans le registre de consultation externe ;
- ✓ formulaire de Report de Cas individuel (CRF) : un dossier médical était ouvert pour tout cas de paludisme confirmé par la goutte épaisse. Les résultats du prélèvement sanguin ainsi que les données de l'examen physique étaient portés ensuite dans le CRF.

6.12. Déroulement d'étude

Avant le démarrage de l'étude, une autorisation a été obtenue auprès du chef du village, des chefs de famille et des autorités communautaires et administratives.

Au début de l'étude en mai 2008, nous avons procédé à l'identification des enfants qui a consisté à administrer un consentement libre et éclairé à chaque répondant d'enfant suivi d'un examen physique. Un prélèvement sanguin était ensuite effectué pour déterminer le groupe sanguin, le type d'hémoglobine, le statut en G6PD et le statut en alphathalassémie. Une carte était établie pour chaque enfant comportant son numéro d'étude et de la concession, son nom/prénom et son âge en année. Une copie de consentement individuel éclairé et volontaire était remise au parent/tuteur de chaque enfant à la fin de la procédure.

Il a été demandé aux parents/tuteurs des enfants d'amener les enfants au centre de santé de Kéniéroba chaque fois qu'ils se sentaient malade. Chaque enfant qui se présentait au centre de santé avec un symptôme de paludisme a bénéficié d'un examen physique et un prélèvement sanguin pour déterminer la parasitémie par la technique de la goutte épaisse. Pour chaque cas confirmé de paludisme, un prélèvement sanguin était effectué pour déterminer la glycémie et le taux d'hémoglobine dont les résultats étaient reportés dans un CRF, qui permettait ensuite de classer le paludisme en forme simple ou grave selon l'OMS [29].

Chaque enfant atteint de paludisme a bénéficié d'un traitement antipaludique à base d'artémisinine (Artésunate + Amodiaquine) ou de la quinine injectable ou de l'artemether en fonction de la forme du paludisme. En cas de complications nécessitant des actions thérapeutiques particulières, l'enfant était référé à Bamako pour une meilleure prise en charge.

Chaque épisode de paludisme était mentionné à la partie réservée de la carte à cet effet, permettant le dénombrement facile et correct de tous les cas de paludisme pour chaque enfant.

Tout enfant qui changeait de résidence en dehors des villages d'étude était retiré du suivi. Ce processus permettait de faire la mise à jour régulière du fichier d'identification des enfants pour un meilleur suivi.

6.13. Gestion et analyse des données

Les données ont été enregistrées d'abord dans les registres de consultation, puis un formulaire de report de cas individuel (*CRF*) était ouvert pour tout cas de paludisme. Une vérification était effectuée chaque jour pour porter les corrections nécessaires avant la saisie.

Le masque de saisie a été élaboré avec le logiciel Excel 2007 et les données ont été saisies sur le même logiciel Excel 2007. Les dossiers étaient enregistrés systématiquement après la fin du traitement de chaque cas. Une vérification des données étaient faites à partir des documents sources pour s'assurer que de la saisie correcte des données.

Les analyses de fréquence et de régression ont été faites avec le logiciel STATA14. Ces données ont été présentées sous forme de tableaux. Avant les analyses de régression, les tableaux 2x2 ont été faits pour vérifier l'existence des facteurs modificateurs où les facteurs de confusion.

Le risque relatif a été utilisé pour comparer le risque de survenue du premier épisode palustre entre les sujets ayant les polymorphismes du globule rouge et ceux sans polymorphisme du globule rouge.

La régression de cox a été utilisée pour étudier la relation entre les variables dépendantes (incidence) et les variables explicatives comme le sexe, les groupes d'âge, les polymorphismes du globule rouge et l'utilisation de moustiquaire. La régression linéaire multiple a été utilisée pour étudier la relation entre la densité parasitaire et les variables explicatives comme le sexe, les groupes d'âge, les polymorphismes du globule rouge et l'utilisation de moustiquaire.

Le seuil de signification statistique alpha (α) a été fixé à 5% et la puissance du test à 80%. Les données manquantes n'ont pas été prises en compte dans l'analyse.

6.14. Considérations éthiques

Le protocole de recherche a été soumis à l'approbation du comité d'éthique des Facultés de Médecine et d'Odontostomatologie et de la Pharmacie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, ainsi qu'à celui des Instituts Nationaux de Santé des Etats-Unis d'Amérique.

L'autorisation communautaire a été obtenue auprès des autorités administratives et coutumières, le consentement individuel a été obtenu auprès des parents/tuteurs des enfants. Les activités étaient réalisées selon les bonnes pratiques de recherche clinique sur l'homme telles énoncées dans les conventions internationales (déclaration d'Helsinki, Conférence internationale d'harmonisation des bonnes pratiques de recherche biomédicale). Les résultats ont fait l'objet de restitution, présentés au cours des rencontres scientifiques et aux communautés villageoises.

Les investigateurs ont assuré la confidentialité et la sécurité des données durant toute la période de l'étude, seul le numéro d'identification était porté sur le CRF permettant de faire le suivi tout au long de l'étude.

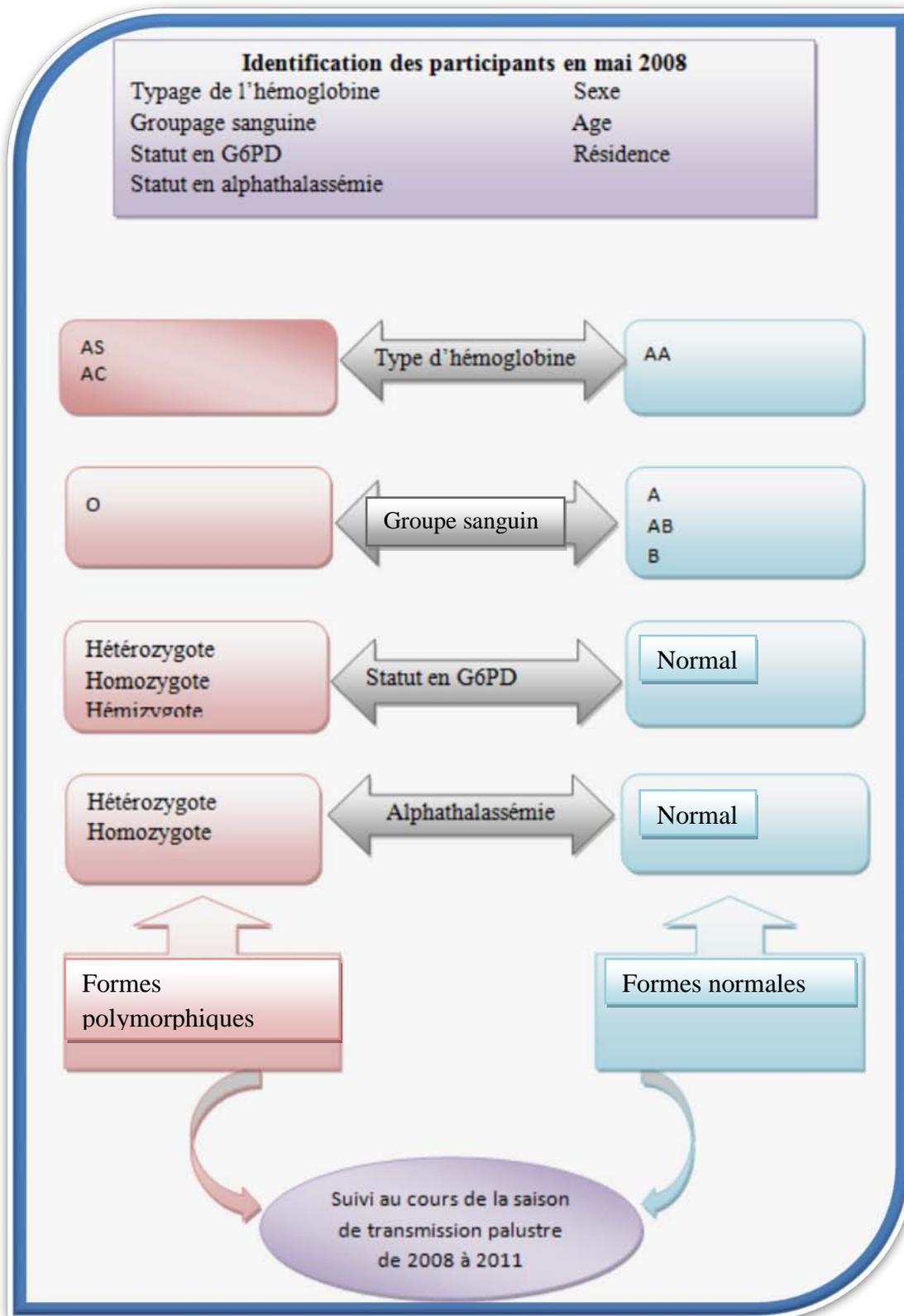


Figure 5 : Identification des enfants au début de l'étude

7. Résultats

Au total, 926 enfants sélectionnés au début de l'étude ont été suivis pendant les 4 saisons de transmission pour déterminer le risque de souvenue du palustre.

7.1. Résultats descriptifs

Tableau IV: Caractéristiques des enfants de l'étude au cours des saisons de transmission de 2008 à 2011

Variabes	Effectifs	Pourcentage
Villages		
Kéniéroba	727	78,5
Fourda	110	11,9
Bozokin	89	9,6
Sexe		
Masculin	467	50,4
Féminin	459	49,6
Groupe d'âge		
0 à 5ans	454	49,0
6 à 10ans	285	30,8
11 à 17ans	187	20,2
Type d'hémoglobine		
HbAA	734	79,3
HbAS	62	6,7
HbAC	130	14,0
Alphathalassémie		
Normale	659	71,2
Hétérozygote	250	27,0
Homozygote	17	1,8
Glucose-6-phosphate déshydrogénase		
Normale	778	84,0
Hémizygote	47	5,1
Hétérozygote	101	10,9
Groupe sanguin		
A	275	29,7
B	209	22,6
AB	64	6,9
O	378	40,8
Utilisation moustiquaire		
Oui	352	62,5
Non	578	37,8

La majorité des enfants résidait à Kéniéroba avec 78,5% suivi par Fourda et Bozokin avec respectivement 11,9% et de avec 9,6%. Le sexe ratio était de 1,02 homme pour une femme. Le groupe d'âge d'enfants de 6 mois à 5 ans était le plus représenté avec 49,0% suivi par ceux

de 6 à 10 ans et de 11 à 17 ans avec respectivement 30,8% et 20,2%. Les enfants porteurs de trait drépanocytaire représentaient 20,7% dont 14,0% pour l'hémoglobine AS et 6,7% pour l'hémoglobine AC. Les enfants déficitaires en alphathalassémie représentaient 28,8% dont 27,0% pour la forme hétérozygote et 1,8% pour la forme homozygote. Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase a été retrouvé chez 16,0% parmi les enfants dont 10,9% pour la forme hétérozygote et 5,1% pour la forme hémizyote. La majorité des enfants était du groupe O avec 40,8%. Le taux d'utilisation des moustiquaires était de 62,5% dans notre étude.

7.2. Résultats analytiques

Table V: relation entre risque du paludisme, le sexe, les groupes d'âge, l'utilisation de moustiquaire et les polymorphismes du globule rouges chez les enfants au cours des saisons de transmission de 2008 à 2011 dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin après ajustement

Caractéristiques	RR	95% IC	p
Sexe			
Masculin	1		
Féminin	1,00	[0,87 ; 1,16]	0,96
Classe âge			
0 à 5ans	1		
6 à 10ans	0,85	[0,73 ; 0,99]	0,03
11 à 17ans	0,59	[0,49 ; 0,70]	<10 ⁻³
moustiquaire			
Non	1		
Oui	0,70	[0,61 ; 0,81]	<10 ⁻³
Hémoglobine			
AA	1		
AC	0,95	[0,72 ; 1,24]	0,71
AS	0,70	[0,58 ; 0,85]	<10 ⁻³
Statut en G6PD			
Normale	1		
Hémizyote	1,05	[0,84 ; 1,31]	0,97
Hétérozygote	0,86	[0,63 ; 1,17]	0,33
Statut en alphathalassémie			
Normale	1		
Hétérozygote	1,00	[0,87 ; 1,16]	0,97
Homozygote	1,91	[1,17 ; 3,11]	0,01
Groupe sanguin			
O	1		
A	1,12	[0,96 ; 1,31]	0,14
B	1,08	[0,91 ; 1,23]	0,38
AB	0,92	[0,70 ; 1,20]	0,53

Modèle de l'équation de la régression de survie (S) :

$$S(\text{temps}|\text{sexe, age, mii, type_Hb, G6PD, } \alpha_{\text{thal}}, \text{ABO}) = S_0(t) \exp(\beta_1 \text{sexe} + \beta_2 \text{age} + \beta_3 \text{mii} + \beta_4 \text{type_Hb} + \beta_5 \text{G6PD} + \beta_6 \alpha_{\text{thal}} + \beta_7 \text{ABO})$$

β_0 =constante ; $\exp(\beta_1 + \dots + \beta_7)$ = risque relatif lié à la variable explicative ajustée sur les autres

L'analyse par la régression de cox a montré, après ajustement sur les autres variables, que le risque de survenue du palustre était comparable dans les deux sexes (RR=1,00 95%IC [0,87 ; 1,16]). L'âge était significativement associée à une réduction de risque de survenue du paludisme (6-10 ans : RR=0,85 95%IC [0,73 ; 0,99] et 11-17 ans : RR=0,59 95%IC [0,49 ; 0,70]). L'utilisation de moustiquaire était également associée à une réduction de risque de survenue du paludisme (RR=0,70 95%IC [0,61 ; 0,81]).

L'hémoglobine AS était associée à une réduction de risque de survenue du palustre (RR=0,70 95%IC [0,58 ; 0,85]), cette réduction n'était pas significative avec la forme AC (RR=0,95 95%IC [0,72 ; 1,24]). Le risque de survenue du paludisme était plus élevé avec la forme homozygote du déficit en alphathalassémie (RR=1,95 95%IC [1,17 ; 3,11]), mais significatif pour la forme hétérozygote (RR=1,00 95%IC [0,87 ; 1,16]). Par contre, le déficit en G6PD (RR_{hémigzyote}=1,05 95%IC [0,84 ; 1,31] ; RR_{hétérozygote}=0,86 95%IC [0,63 ; 1,17]) et le groupe sanguin (RR_A=1,12 95%IC [0,96 ; 1,31] ; RR_B=1,08 95%IC [0,91 ; 1,23] ; RR_{AB}=0,92 95%IC [0,70 ; 1,20]) ne constituaient pas un risque significatif pour la survenue du premier épisode palustre chez les enfants dans notre étude.

Table VI: Relation entre la parasitémie symptomatique, le sexe, l'âge, l'utilisation de moustiquaire et les polymorphismes du globule rouge chez les enfants au cours des saisons de transmission de 2008 à 2011 dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin après ajustement

Parasitémie	Coefficient	95% IC	p
Sexe			
Masculin	0		
Féminin	-1246,97	[-6331,7462 ; 3837,68]	0,9
Groupe d'âge			
0 à 5 ans	0		
6 à 10 ans	-19370,23	[-24710,30 ; -14030,16]	<10 ⁻³
11 à 17 ans	-25772,62	[-31890,99 ; -19654,25]	<10 ⁻³
Moustiquaire			
Non	0		
Oui	575,42	[-4221,48 ; 5372,33]	0,81
Hémoglobine			
AA	0		
AC	-2579,13	[-11863,11 ; 6704,84]	0,58
AS	-1964,21	[-8642,23 ; 47134,79]	0,56
Statut en G6PD			
Normale	0		
Hémizygotte	4985,44	[-2945,06 ; 12915,95]	0,23
Hétérozygotte	640,47	[-10224,78 ; 11505,74]	0,91
Statut en alphathalassémie			
Normale	0		
Hétérozygotte	-2336,81	[-7546,02 ; 2872,40]	0,38
Homozygotte	-5609,58	[-22897,88 ; 11678,72]	0,52
Groupe sanguin			
O	0		
A	1152,32	[-4421,64 ; 6726,30]	0,69
B	1233,73	[-4820,99 ; 7278,46]	0,69
AB	1389,13	[-8142,45 ; 10920,72]	0,78

Modèle de l'équation de la régression linéaire :

$$E(\text{parasitémie}|\text{sexe, age, mii, type_Hb, G6PD, } \alpha_thal, \text{ ABO}) = \beta_0 + \beta_1 \text{sexe} + \beta_2 \text{age} + \beta_3 \text{mii} + \beta_4 \text{type_Hb} + \beta_5 \text{G6PD} + \beta_6 \alpha_thal + \beta_7 \text{ABO}$$

β_0 =constante, β_17=variation de la parasitémie quand les valeurs explicatives changent d'une unité.

Le résultat de l'analyse par la régression linéaire, après ajustement sur les autres variables, a montré que la parasitémie moyenne ne variait pas significativement selon le sexe ($p=0,9$) et en fonction de l'utilisation ou non de moustiquaire par les enfants ($p=0,81$). Cette parasitémie diminuait significativement avec l'âge, soit 19370 trophozoïtes de *Plasmodium falciparum*/ μ l de sang chez les enfants du groupe d'âge 6 à 10ans ($p<10^{-3}$) et de 25772 trophozoïtes de *Plasmodium falciparum*/ μ l de sang de ceux du groupe d'âge 11 à 17 ans ($p<10^{-3}$) par rapport aux enfants de 6mois à 5 ans.

L'hémoglobine AS et l'hémoglobine AC étaient associés à une réduction de la parasitémie moyenne au premier épisode palustre, mais elle n'était pas significative ($p=0,56$; $p=0,58$). Nous n'avons pas observé une variation significative de la parasitémie moyenne au premier épisode en fonction du statut de G6PD (forme hémizygote $p=0,23$; forme hétérozygote $p=0,91$). Une variation significative de la parasitémie moyenne n'était pas observée également en fonction du statut en alphathalassémie ($p=0,38$; $p=0,52$). L'augmentation de la parasitémie chez les enfants de groupe sanguin A ($p=0,69$), de groupe sanguin B (0,69) et le groupe sanguin AB (0,78) n'était pas significative par rapport au groupe sanguin O.

8. Discussion

Notre étude avait pour but d'étudier l'influence des polymorphismes du globule rouge sur les indicateurs de morbidité palustre chez les enfants. Ces indicateurs étaient l'incidence du paludisme et la densité parasitaire. L'étude s'est déroulée dans trois villages dans la commune rurale de Bancoumana (Figure 1). Cette commune constitue une zone d'endémie palustre [30, 31], mais également une zone où les polymorphismes du globule rouge sont fréquemment rencontrés [8, 22].

Sur le plan validation des données, une formation a été faite sur les bonnes pratiques en clinique et de laboratoire avant le démarrage des activités pour que les données soient de bonne qualité et uniformisées. Un contrôle était fait de façon périodique pour s'assurer de la bonne qualité des données collectées et saisies. Le monitoring externe était effectué à des intervalles réguliers pour vérifier le bon déroulement de l'étude.

La majorité de nos enfants résidait à Kéniéroba avec 78,5% suivi par Fourda et Bozokin avec respectivement 11,9% et 9,6%. Cette différence s'expliquerait par la grande taille de la population de Kéniéroba, mais pourrait s'expliquer par le fait que l'équipe de recherche était basée dans ce village, chose qui facilite l'accès de la population de ce village au centre de santé (Tableau IV). Le sexe ratio était de 1,02 homme pour une femme dans notre étude. Le groupe d'âge d'enfants de 6 mois à 5 ans était plus représenté avec 49,0% suivi par ceux de 6 à 10 ans et de 11 à 17 ans avec respectivement 30,8% et 20,2%. Le taux d'utilisation des moustiquaires était de 62,5% dans notre étude (Tableau IV). Ce taux est similaire à celui apporté par l'enquête sur les indicateurs du paludisme en 2015 au Mali [4].

Les enfants porteurs de trait drépanocytaire représentaient 20,7% dont 14,0% pour l'hémoglobine AS et 6,7% pour l'hémoglobine AC (Tableau IV). Mounkaila et collaborateurs ont trouvé une fréquence de 16,9% pour l'hémoglobine AS dans la même zone en 2012 [22]. Par contre, Coulibaly et collaborateurs ont rapporté une fréquence plus élevée de la forme AC de l'hémoglobine avec 13% et une faible proportion de l'hémoglobine AS avec 6,3% chez les enfants en 2014 à Bandiagara, une autre zone d'endémie palustre au Mali [32]. Cette fréquence élevée de l'HbAC s'expliquerait par le fait que la majorité des habitants de Bandiagara sont de l'ethnie dogon et le phénotype de l'hémoglobine le plus couramment rencontré chez cette ethnie est l'HbAC [33].

Les enfants déficitaires en alphathalassémie représentaient 28,8% dont 27,0% pour la forme hétérozygote et 1,8% pour la forme homozygote (Tableau IV). Sammy et collaborateurs ont

apporté des fréquences élevées du déficit en alphathalassémie, avec 18,4% pour la forme hétérozygote et 13,5% pour la forme homozygote chez les enfants dans une zone d'endémie palustre en 2006 au Kenya [34]. Cette prévalence élevée des déficits en alphathalassémie s'expliquerait par le rôle sélectif du *Plasmodium falciparum* procurant un avantage de survie, comme le cas de l'hémoglobine AS, dans les zones d'endémie palustre. Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase a été retrouvé chez 15,9% parmi les enfants dont 10,9% pour la forme hétérozygote et 5,1% pour la forme hémizyote (Tableau IV). Guindo et collaborateurs ont rapporté dans son étude en 2007 une proportion de 21,8% pour la forme hémizyote et 25,3% pour la forme hétérozygote chez les enfants à Kangaba dans la même zone géographique [8]. Ce pourcentage élevé pourrait s'expliquer par la taille élevée de leur échantillon, mais aussi une variation de la prévalence de ces polymorphismes d'une localité à l'autre dans la même zone géographique. Coulibaly et collaborateurs ont rapporté aussi des proportions élevées du déficit en G6PD en Bandiagara en 2014 chez les enfants de moins de 14 ans, avec 17% pour la forme hétérozygote et 16% pour la forme hémizyote [32].

La majorité des enfants était du groupe O avec 40,8% (Tableau IV). Le même constat a été fait par Mounkaila chez les enfants en 2012 au Mali [22]. Ces résultats suggèrent que ces polymorphismes du globule rouge sont fréquents dans les zones d'endémie palustre, cette coïncidence entre le paludisme et les polymorphismes du globule rouge pourrait être due au rôle sélectif du *Plasmodium falciparum* dans ces zones.

En étudiant par la régression de cox, le risque de survenue du premier épisode palustre chez les enfants après ajustement sur les autres variables explicatives :

Le sexe n'était pas associé à une variation significative de risque de survenue du paludisme dans notre étude (RR=1,00 95%IC [0,87 ; 1,16]). Ce risque était significativement réduit chez le groupe d'âge 6 mois à 10 ans (RR=1,69 95%IC [1,46 ; 1,94]) et ceux du groupe d'âge 11 à 17 ans (RR=1,14 95%IC [0,96 ; 1,34]) comparativement aux enfants de 5 ans et moins (Tableau V). Mounkaila et collaborateurs ont rapporté en 2012 à Bancoumana que le risque du paludisme était plus élevé chez les enfants du groupe d'âge 5 à 9ans (RR=1,98 95%IC [1,28 ; 3,08] [22]. D'autres études menées par Touré et collaborateurs en 1998 dans la même zone ont rapporté que les enfants de moins de 10 ans étaient plus touchés par le paludisme comparativement à ceux de plus de 10 ans [31] et par Bloland et collaborateurs en 1999 au Kenya [35]. L'immunité acquise a été évoquée pour expliquer la protection des grands enfants contre le paludisme dans les zones d'endémie palustre [36, 37]. L'utilisation de moustiquaire

était associée à une réduction significative de 30% de risque du paludisme (RR=0,70 95%IC [0,61 ; 0,81]) par rapport à ceux qui n'utilisaient pas (Tableau V). Ce même constat a été fait par Mounkaila et collaborateurs en 2012 au Mali [22] et par Clark et collaborateurs en 2008 en Uganda [38]

Nous avons observé que l'hémoglobine AS était associée à une réduction 30% de risque du paludisme le risque (RR=0,70 95%IC [0,58 ; 0,85]), mais cette réduction n'était pas significative avec la forme AC de l'hémoglobine (RR=0,95 95%IC [0,72 ; 1,24]) (Tableau V). Mounkaila et collaborateurs ont rapporté en 2012 que la forme AS était associée à une réduction significative du risque du paludisme (RR=0,56 95%IC [0,33 ; 0,96]) et non la forme AC (RR=0,41 95%IC [0,14 ; 1,24]) [22].

La forme homozygote du déficit en alphathalassémie était associée à un risque élevé du paludisme (RR=1,95 95%IC [1,17 ; 3,11]), mais cette association n'était pas significatif pour la forme hétérozygote (RR=1,00 95%IC [0,87 ; 1,16]) (Tableau V). Cependant, Ander et collaborateurs ont rapporté en 2008 que les formes Hétérozygote et homozygote de l'alphathalassémie étaient associées à une réduction de risque du paludisme respectivement (OR=0,30; 95%CI [0,10 ; 0,85] ; OR=0,12; 95%CI [0,02 ; 0,83]) chez les enfants fébrile ou ayant une notion de fièvre en Tanzanie [39]. Par contre, Ghartey et collaborateurs n'ont pas trouvé une association significative entre le paludisme et les déficits en alphathalassémie en 2016 au Ghana dans une étude transversale chez les enfants dans deux zones écologiques distinctes ($p < 0,05$) [40].

Le déficit en G6PD ne constituait pas un risque significatif de survenue du premier épisode palustre par rapport à la forme normale (RR_{hémigzote}=1,05 95%IC [0,84 ; 1,31] ; RR_{hétérozygote}=0,86 95%IC [0,63 ; 1,17]) (Tableau V). Les mêmes observations ont été faites par Amoako en 2014 chez les enfants fébriles au Ghana [41]. L'association entre le déficit en G6PD et la réduction du paludisme reste un sentier énorme, puisque l'activité enzymatique des globules rouges déficients en G6PD varie en fonction d'exposition au stress oxydant. Or, il semblerait que l'absence de cette enzyme affecte le développement du parasite à l'intérieur des globules rouges. Alors que les érythrocytes produites juste après l'hémolyse des globules rouges possèdent une activité normale de G6PD qui diminue en fur et à mesure de la maturation. Toutefois, les études se contredisent quant à l'association réelle entre la réduction du risque du paludisme et les déficits en alphathalassémie ou en G6PD. Il semblerait

également que l'existence de deux formes de polymorphisme chez le même sujet peut entraîner la perte de la protection contre le paludisme.

Une association significative n'était pas observée en fonction du groupe sanguin ($RR_A=1,12$ 95%IC [0,96 ; 1,31] ; $RR_B=1,08$ 95%IC [0,91 ; 1,23] ; $RR_{AB}=0,92$ 95%IC [0,70 ; 1,20]) (Tableau V). le même constat a été fait par Degarege et collaborateurs chez les patients fébriles en 2012 en Ethiopie [42]. Cependant, Zerihun et collaborateurs ont rapporté dans son étude en 2011 que le risque était 2,5 fois plus élevé chez les enfants du groupe sanguin A ($p=0,008$) et le groupe sanguin B (0,009), mais que ce risque n'était pas significatif pour les enfants du groupe sanguin AB en Ethiopie ($p=0,13$) [43]. L'affinité pour les espèces *anophèles*, l'altération de la pénétration des merozoïtes dans les globules rouges ainsi que la réduction du phénomène de rosetting ont été mentionnés pour expliquer cette protection du groupe sanguin O [44].

En étudiant par la régression linéaire la variation de la parasitémie moyenne au premier épisode palustre chez les enfants après ajustement sur les autres variables explicatives :

Nous avons observé que la parasitémie moyenne ne variait pas significativement selon le sexe ($p=0,9$) et selon l'utilisation ou non de moustiquaire ($p=0,81$) dans notre étude. Une diminution significative de la parasitémie moyenne était observée avec l'âge, soit 19370 trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* chez les enfants de 6 à 10ans ($p<10^{-3}$) et de 22772 trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* chez ceux de 11 à 17 ans ($p<10^{-3}$) par rapport aux enfants de 6mois à 5 ans (Tableau VI). Le même constat a été fait par Owusu et collaborateurs en 2009 chez les enfants de moins de 5 ans au Ghana [45].

L'hémoglobine AS et l'hémoglobine AC étaient associés à une réduction de la parasitémie moyenne au premier épisode palustre, mais elle n'était pas significative ($p=0,56$; $p=0,58$) (Tableau VI). Mounkaila et collaborateurs ont apporté une réduction significative de la parasitémie moyenne chez les enfants avec la forme AS de l'hémoglobine dans son étude cas-témoins en 2012 au Mali ($p=0,002$) [22]. D'autres études menées par Williams et collaborateurs en 2005 au Kenya [27] et par Fleming et collaborateurs en 1979 au Nigeria [46] ont tous rapporté une association significative entre la forme AS de l'hémoglobine et la réduction de la parasitémie moyenne chez les enfants. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que notre étude a concerné seulement la parasitémie moyenne au premier épisode palustre.

Nous n'avons pas observé une variation significative de la parasitémie moyenne au premier épisode en fonction du statut de G6PD (forme hémizygote : $p=0,23$; forme hétérozygote : $p=0,91$) (Tableau VI). Guindo et collaborateurs ont rapporté des résultats similaires en fonction du déficit en G6PD dans la même zone en 2007 chez les enfants [8]. Une variation significative de la parasitémie moyenne n'était pas observée également en fonction du statut en alphathalassémie (forme hétérozygote : $p=0,38$; forme homozygote : $p=0,52$) (Tableau VI). Des observations similaires ont été faites par Sammy entre la parasitémie moyenne et les déficits en alphathalassémie chez les enfants en 2006 au Kenya [34].

L'augmentation de la parasitémie chez les enfants de groupe sanguin A ($p=0,69$), de groupe sanguin B ($0,69$) et le groupe sanguin AB ($0,78$) n'était pas significative par rapport au groupe sanguin O. Zerihun et collaborateurs ont rapporté en 2011 que cette augmentation de la parasitémie moyenne était significative chez les patients du groupe sanguin A, B et AB par rapport au groupe sanguin O ($p<0,01$) en Ethiopie [43].

Différents mécanismes ont été mentionnés pour expliquer la protection de ces polymorphismes du globule rouge contre le paludisme. Notamment, l'immunité acquise contre le paludisme dans les zones d'endémie palustre [37, 47], l'inhibition de la croissance du parasite dans les globules rouges, la rétention des parasites au niveau splénique [48] et la réduction de la cytoadhérence [49].

Toutefois, la recherche doit être poursuivie pour mieux éclairer ces différents mécanismes de protection contre le paludisme, mais aussi investiguer d'avantages d'autres mécanismes impliqués dans cette protection contre le paludisme qui nous permettra de trouver un candidat vaccin efficace contre le paludisme dans les années à venir.

9. Limites

Cette étude avait pour but d'étudier les associations entre les polymorphismes du globule rouge et le risque du paludisme chez les enfants. L'analyse a surtout pris en compte une seule forme de polymorphisme portée par le sujet, alors qu'un enfant pouvait avoir à la fois deux formes différentes de polymorphisme. Or, cet effet épistatique peut entraîner une modification de l'effet d'un polymorphisme en fonction de la coexistence de l'autre.

Une autre étude serait nécessaire pour tenir compte de ce facteur qui pourra nous édifier d'avantage sur le rôle protecteur des polymorphismes du globule rouge.

10. Conclusion

Au terme de cette étude, nous avons observé l'utilisation de moustiquaire, l'accroissement en âge et la forme AS de l'hémoglobine étaient associés à une réduction de risque de survenue du premier épisode palustre chez les enfants. Par contre, ce risque était plus élevé chez les enfants ayant la forme homozygote du déficit en alphathalassémie. Une variation significative de risque du paludisme n'était pas observée en fonction du statut en G6PD et le groupe sanguin.

Parmi les variables étudiées, seulement le groupe d'âge 6 à 10 ans et 11 à 17 ans était associé à une diminution de la parasitémie du premier épisode palustre dans notre étude.

11. Recommandations

Aux chercheurs

- ✓ renforcer la recherche en investiguant d'avantages les associations entre les polymorphismes du globule rouge et les indicateurs palustres dans d'autres zones endémie palustre au Mali ;
- ✓ poursuivre les études sur les indicateurs palustres pour identifier d'autres facteurs qui sont associés à la réduction du risque du paludisme.

12. Perspectives

Cette formation en master d'épidémiologie nous a permis de comprendre les principes de base de l'épidémiologie, d'avoir les outils nécessaires pour rédiger un protocole de recherche. Au cours de notre stage d'insertion professionnelle de master2 en épidémiologie dans l'unité Immunogénétique et Parasitologie de l'ICER-Mali, nous avons participé à un projet de recherche sur le paludisme. Ce projet consistait à étudier les associations entre les polymorphismes du globule rouge et les indicateurs palustres, mais aussi les mécanismes de protection de ces polymorphismes du globule rouge chez les enfants. Dans la projection de faire une thèse, nous souhaitons continuer la recherche pour explorer d'avantages les mécanismes de protection de ces polymorphismes du globule rouge contre le paludisme. Cette thèse sera l'occasion d'outiller sur le terrain les principes de base que nous avons appris en théorie en l'épidémiologie.

13. Références

1. World Health Organization. World malaria report 2016. Geneva, 2016. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf?ua=1>, consulter le 11/01/2017.
2. World Health Organization. World malaria report 2016. Geneva, 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf, consulter le 05/11/2016.
3. Enquête Démographique et de Santé (EDSM-V). 2014, 5: p. 577.
4. Orjih, A.U., Comparison of Plasmodium falciparum growth in sickle cells in low oxygen environment and candle-jar. *Acta Trop*, 2005. **94**(1): p. 25-34.
5. De Beaudrap, P., et al., Heterogeneous decrease in malaria prevalence in children over a six-year period in south-western Uganda. *Malar J*, 2011. **10**: p. 132.
6. Sagna, S., Facteurs génétiques (HLA) liés au paludisme. <http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/SAGNASadio.pdf> consulter 14/01/2017.
7. Traore, K., Déficit en g6pd érythrocytaire et paludisme dans une population âgée de 3 mois à 20 ans de la ville de Bandiagara (Mali). 2011. <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2005/pharma/pdf/05P34.pdf>. consulter le 08/01/2017.
8. Guindo, A., Fairhurst, R.M., Doumbo, O.K., Wellems, T.E. and Diallo, D.A., X-Linked G6PD Deficiency Protects Hemizygous Males but Not Heterozygous Females against Severe Malaria. *PLoS Med*, 2007, 4(3): e66. doi:10.1371/journal.pmed.0040066
9. Monchy, D., et al., [Frequency of G6PD deficiency in a group of preschool-aged children in a centrally located area of Cambodia]. *Med Trop (Mars)*, 2004. **64**(4): p. 355-8.
10. Olsson, M.L. and M.A. Chester, Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Transfus Med*, 2001. **11**(4): p. 295-313.
11. Amory, S., Dugoujon, J.M., Despiau, S., and al. , Diversité génétique de l'allèle O dans des populations berbères *Bulletins et mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, 2005. 17 (3-4)
12. Aidoo, M., et al., Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet*, 2002. **359**(9314): p. 1311-2.
13. Bauduer, F., Red cell polymorphisms and malaria: an evolutionary approach. *Bull. Mém. Soc. Anthropol*, 2013. 25: 55.
14. Clarke, G.M., et al., Characterisation of the opposing effects of G6PD deficiency on cerebral malaria and severe malarial anaemia. *Elife*, 2017. 6:e15085.
15. Luzzatto, L., G6PD deficiency: a polymorphism balanced by heterozygote advantage against malaria. *Lancet Haematol*, 2015. **2**(10): p. e400-1.
16. Samuel, S.C., Corinne, D.B., Douglas, R.H. and Garry R.C., Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia. *Blood*, 2000, 95:360-362.
17. Peters, A.L. and C.J. Van Noorden, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. *J Histochem Cytochem*, 2009. **57**(11): p. 1003-11.
18. Aluoch, J.R., Higher resistance to Plasmodium falciparum infection in patients with homozygous sickle cell disease in western Kenya. *Trop Med Int Health*, 1997 Jun;2(6):568-71.

19. Benno, K., Christina, K., Robin, K., and al. , Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth. *Blood*, 2010,115:4551-4558.
20. 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.
21. Rowe, J.A., et al., Blood group O protects against severe Plasmodium falciparum malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(44): p. 17471-6.
22. Mounkaila, A.B., Eric, S.J., Seydou, O.D. and al., Sickle Cell Trait Protects Against Plasmodium falciparum Infection. *Am J Epidemiol*, 2012. 176(Suppl 7): S175–S185.
23. Opi, D.H., et al., Mechanistic Studies of the Negative Epistatic Malaria-protective Interaction Between Sickle Cell Trait and alpha+thalassemia. *EBioMedicine*, 2014. **1**(1): p. 29-36.
24. Storry, J.R., Olsson, M.L, The ABO blood group system revisited: a review and update. **Journal of Blood Group Serology and Education. IMMUNOHEMATOLOGY**, 2009, 25: pp:(48-59).
25. Theresa, K.N., Paul, W., Aloachere, J.F, Effects of ABO/Rh group, G6PD enzyme activity and haemoglobin genotypes on malaria parasitemia and parasite density. *Afr J Health Sci*. 2004, 11: 93-97.
26. Joutovsky, A., J. Hadzi-Nesic, and M.A. Nardi, HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clin Chem*, 2004. **50**(10): p. 1736-47.
27. Williams, T.N., et al., Both heterozygous and homozygous alpha+ thalassemias protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya. *Blood*, 2005. **106**(1): p. 368-71.
28. Marion, A.L., Indicateur de santé. IFSI, 2009. http://medphar.univ-poitiers.fr/santepub/doc_source/Enseignements/IDE/IDE_indicsante.pdf consulter le 28_12_2016.
29. Andrej, T., Matjaz, J., Igor, M., and al., Clinical review: Severe malaria. *Crit Care*, 2003. 7(4): 315–323.
30. Dolo, A., et al., [Epidemiology of malaria in a village of Sudanese savannah area in Mali (Bancoumana). 2. Entomo-parasitological and clinical study]. *Bull Soc Pathol Exot*, 2003. **96**(4): p. 308-12.
31. Toure, Y.T., et al., Gametocyte infectivity by direct mosquito feeds in an area of seasonal malaria transmission: implications for Bancoumana, Mali as a transmission-blocking vaccine site. *Am J Trop Med Hyg*, 1998. **59**(3): p. 481-6.
32. Coulibaly, D., et al., Stable malaria incidence despite scaling up control strategies in a malaria vaccine-testing site in Mali. *Malar J*, 2014. **13**: p. 374.
33. 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.
34. Sammy, W., Tabitha, W.M., Moses, K., and al., The Effect of α +-Thalassaemia on the Incidence of Malaria and Other Diseases in Children Living on the Coast of Kenya. *PLoS Med*, 2006. 3(5): e158. .
35. Bloland, P.B., et al., Longitudinal cohort study of the epidemiology of malaria infections in an area of intense malaria transmission II. Descriptive epidemiology of malaria infection and disease among children. *Am J Trop Med Hyg*, 1999. **60**(4): p. 641-8.
36. Andreas, C., Bolaji. O., Hubert, D., and al., Protection Against Malaria in Man: a Probe into Some of the Implicated Mechanisms in Sub-Saharan Africa. *The Open Area Studies Journal*, 2013. 5, 22-29.

37. Kazutoyo, M., Diakite, M., Diouf, A., and al. , Relationship between Malaria Incidence and IgG Levels to Plasmodium falciparum Merozoite Antigens in Malian Children: Impact of Hemoglobins S and C. PLoS ONE, 2013. 8(3): e60182.
38. Clark, T.D., et al., Factors determining the heterogeneity of malaria incidence in children in Kampala, Uganda. J Infect Dis, 2008. **198**(3): p. 393-400.
39. Enevold, A., et al., Reduced risk of uncomplicated malaria episodes in children with alpha+-thalassemia in northeastern Tanzania. Am J Trop Med Hyg, 2008. **78**(5): p. 714-20.
40. Ghartey-Kwansah, G., et al., The Prevalence of alpha-Thalassemia and Its Relation to Plasmodium falciparum Infection in Patients Presenting to Clinics in Two Distinct Ecological Zones in Ghana. Hemoglobin, 2016. **40**(1): p. 32-7.
41. Amoako, N., et al., Associations between red cell polymorphisms and Plasmodium falciparum infection in the middle belt of Ghana. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e112868.
42. Degarege, A., et al., Association of ABO blood group and P. falciparum malaria related outcomes: a cross-sectional study in Ethiopia. Acta Trop, 2012. **123**(3): p. 164-9.
43. Zerihun, T., A. Degarege, and B. Erko, Association of ABO blood group and Plasmodium falciparum malaria in Dore Bafeno Area, Southern Ethiopia. Asian Pac J Trop Biomed, 2011. **1**(4): p. 289-94.
44. Loscertales, M.P., et al., ABO blood group phenotypes and Plasmodium falciparum malaria: unlocking a pivotal mechanism. Adv Parasitol, 2007. **65**: p. 1-50.
45. Owusu-Agyei, S., et al., Epidemiology of malaria in the forest-savanna transitional zone of Ghana. Malar J, 2009. **8**: p. 220.
46. Fleming, A.F., et al., Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria. I. Prevalence of haemoglobins and relationships between sickle cell trait, malaria and survival. Ann Trop Med Parasitol, 1979. **73**(2): p. 161-72.
47. Allison, A.C., Genetic control of resistance to human malaria. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(5): p. 499-505.
48. Dominique, L., Hémoglobinopathies et paludisme à Plasmodium falciparum exemple d'effet épistatique négatif? Hématologie, 2006. 12 (2) : 146–7.
49. Diakite, S.A., et al., Stage-dependent fate of Plasmodium falciparum-infected red blood cells in the spleen and sickle-cell trait-related protection against malaria. Malar J, 2016. **15**(1): p. 482.

14. Annexes

Fiche de consentement

Nom du sujet _____ Âge (en années) _____ N° d'identification de l'étude _____

INFORMATIONS GÉNÉRALES

Nous invitons votre enfant à participer à une étude de recherche intitulée : « Études de résistance innée et acquise au paludisme à *Plasmodium falciparum* au Mali ». Cette étude est subventionnée par la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université de Bamako, au Mali et par les Instituts Nationaux de la Santé (National Institutes of Health/NIH) des États-Unis. La participation à cette étude est entièrement volontaire. Avant de décider d'enrôler votre enfant, prenez tout le temps nécessaire pour poser toutes les questions que vous pourriez avoir et discuter de cette étude avec quiconque au centre médical ou avec votre famille, vos amis, votre médecin traitant ou tout autre professionnel de la santé.

OBJECTIF DE L'ÉTUDE/INFORMATIONS GÉNÉRALES

Le paludisme est une maladie provenant d'un très petit parasite pouvant s'infiltrer dans l'organisme de votre enfant à la suite d'une piqûre de moustique. Il peut provoquer de la fièvre et d'autres symptômes comme des maux de tête et des douleurs corporelles continues. En l'absence de traitement, il peut rendre certains enfants gravement malades. Lorsqu'un épisode de paludisme est traité à l'aide de médicaments efficaces, il peut être totalement guéri. L'objectif de cette étude consiste à découvrir comment certains enfants qui sont exposés aux parasites développent des cas légers ou graves de la maladie.

IDENTIFICATION DE LA POPULATION DE L'ÉTUDE

Si votre enfant est âgé d'au moins 6 mois, mais de moins de 18 ans et s'il est résident du village de Kenieroba, de Fourda ou de Bozokin, il peut participer à cette étude. Nous prévoyons d'enrôler environ 1 300 enfants dans cette étude.

DESCRIPTION DES PROCÉDURES

Si vous acceptez d'enrôler votre enfant dans cette étude, nous prélèverons quelques gouttes de sang par ponction du bout d'un doigt à l'aide d'une petite aiguille. Grâce à cet échantillon, nous essaierons de découvrir des informations sur des particularités sanguines susceptibles de protéger les enfants contre le paludisme.

Si votre enfant a de la fièvre ou d'autres symptômes du paludisme dans l'avenir, nous évaluerons son état au centre médical. Nous serons disponibles pour évaluer et traiter votre enfant contre le paludisme pendant une période de 5 années ou jusqu'à ce qu'il atteigne l'âge de 18 ans. Nous sommes intéressés à étudier l'état de votre enfant chaque fois qu'il est atteint de paludisme et c'est pourquoi nous vous demanderons de l'apporter à la clinique chaque fois qu'il présente de la fièvre ou d'autres symptômes du paludisme. Chaque fois que nous diagnostiquerons un cas de paludisme chez votre enfant, nous prélèverons l'équivalent d'environ une cuillère à soupe de sang du bras. Cette procédure peut entraîner des contusions et un certain inconfort ou plus rarement une infection. Nous fournirons alors trois doses d'artésunate et trois doses d'amodiaquine à prendre sur trois jours. Cette combinaison de médicaments est efficace pour l'élimination des parasites et elle est désormais recommandée comme traitement de première intention par le Programme national de lutte contre le paludisme au Mali. Si votre enfant est atteint d'un cas grave de paludisme, il sera transféré à Bancoumana pour y être hospitalisé. Pour les cas graves de paludisme, nous traiterons votre enfant à l'aide de quinine, conformément à la politique nationale du Mali.

Si votre enfant est une jeune fille, âgée de 14 à 17 ans ou en cas de grossesse soupçonnée, nous procéderons à une analyse d'urine, afin de déterminer si elle est enceinte. Si votre fille est enceinte, nous utiliserons un médicament différent (quinine) pour traiter le paludisme, conformément aux recommandations du Programme national malien de lutte contre le paludisme et nous la préviendrons directement, afin qu'elle puisse commencer à bénéficier de soins prénatals.

Afin de nous assurer de la bonne réponse de votre enfant au médicament, nous prendrons sa température chaque jour pendant 3 jours et compterons les parasites présents dans une petite goutte de sang obtenue par ponction du bout du doigt au quatrième jour. Nous espérons que le médicament que nous fournissons sera efficace et que votre enfant n'aura pas besoin d'être de nouveau examiné, à moins qu'il ne contracte à nouveau le paludisme dans l'avenir. Dans certains cas, les investigateurs peuvent transférer des enfants atteints de paludisme grave à Bancoumana pour un niveau de soins plus élevé.

À la fin de la saison sèche et si votre enfant est en bonne santé, il se peut que nous l'invitions à fournir une faible quantité de sang de son bras. Si vous êtes d'accord avec cela, nous prélèverons l'équivalent d'environ une à deux cuillères à café de sang de votre enfant.

Si nous prélevons du sang de votre enfant à la saison sèche, nous voudrions également obtenir un autre échantillon similaire à la fin de la saison humide. Grâce à ces échantillons, nous étudierons les facteurs sanguins susceptibles de protéger les enfants contre le paludisme. Nous prévoyons de prélever ces quantités de sang auprès de seulement 200 enfants provenant du plus grand nombre de familles différentes possible.

Quelquefois, il se peut que nous ayons besoin d'obtenir du sang frais pour des études réalisées à l'université de Bamako. Lors de la réalisation de ces études, il se peut que nous invitions votre enfant à fournir une faible quantité de sang de son bras. Si vous êtes d'accord avec cela, nous prélèverons l'équivalent d'environ une cuillère à café de sang de votre enfant. Il se peut que nous invitions votre enfant à fournir un second échantillon sanguin plus tard, mais nous ne prélèverons pas de sang d'un enfant plus de deux fois par an. Nous prélèverons ce sang uniquement auprès d'enfants âgés de 2 ans à 17 ans.

L'alternative à la participation à cette étude pour votre enfant est de ne pas y participer. La non-participation à cette étude n'empêchera pas votre enfant d'être évalué et traité par notre équipe d'étude à une date ultérieure s'il devait contracter le paludisme à l'avenir. Si votre enfant est atteint de paludisme, nous le traiterons gratuitement contre cette maladie, que vous décidiez ou non qu'il participe à cette étude. Le traitement gratuit contre le paludisme sera disponible pendant une période maximale de 5 années ou jusqu'à ce que votre enfant atteigne l'âge de 18 ans. Votre enfant recevra le même traitement, peu importe ce que vous décidez. Si vous souhaitez retirer votre enfant, de l'étude, vous pouvez le faire à tout moment. Nous retirerons votre enfant de cette étude s'il n'habite plus dans l'un des trois villages de l'étude ou lorsqu'il atteint l'âge de 18 ans. Le promoteur de cette étude peut l'arrêter à tout moment.

Une partie du sang prélevé sur votre enfant, dans le cadre de cette étude, sera utilisée pour des tests génétiques à l'avenir. Certains résultats de tests peuvent indiquer que votre enfant souffre d'un trouble sanguin susceptible d'être néfaste pour sa santé. La prise de connaissance d'une telle information pourrait s'avérer troublante, au cas où vous n'en auriez pas été informé auparavant. Notre politique consiste à ne pas discuter d'une telle information avec vous, à moins qu'elle n'ait des implications médicales directes pour votre enfant. Ces tests peuvent également révéler que les parents biologiques d'un enfant sont d'autres personnes que ses parents légaux. Toute information génétique recueillie ou découverte à propos de votre enfant sera considérée comme confidentielle. Les dossiers médicaux contenant ces informations seront conservés sous clé. Nous ne révélerons aucune information concernant

votre enfant à votre famille ou à un tiers, à moins que vous ne signiez une décharge nous demandant de le faire.

SANG CONSERVÉ

Nous conserverons une partie du sang prélevé, au cas où nous souhaiterions procéder à des tests supplémentaires à l'avenir. Ces échantillons conservés seront utilisés uniquement pour des études portant sur le paludisme et des maladies associées et seront envoyés à l'étranger, aux États-Unis, pour y être étudiés. Les échantillons seront étiquetés non pas avec le nom de votre enfant mais avec un code que seule l'équipe d'étude pourra retracer jusqu'à votre enfant et auquel seuls les investigateurs de l'étude auront accès. Nous conserverons confidentiellement toutes les informations pouvant être retracées jusqu'à votre enfant, dans la mesure autorisée par la loi. En autorisant votre enfant à participer à cette étude, vous nous autorisez à stocker des échantillons sanguins de votre enfant. À tout moment dans l'avenir, vous pouvez contacter le personnel de l'étude ou le Professeur Mahamadou Diakité à l'université de Bamako pour demander que les échantillons ne soient pas conservés, mais au contraire détruits.

DESCRIPTION DES RISQUES ET DES DÉSAGRÉMENTS

Les risques associés à cette étude sont minimes, bien qu'il puisse y avoir des risques imprévisibles. Bien que nous utiliserons de nouvelles aiguilles très petites pour réaliser la ponction du bout du doigt ou pour prélever du sang du bras de votre enfant, ces procédures peuvent s'avérer quelque peu désagréables. Rarement, un bleu ou une infection peut survenir au site de ponction de l'aiguille. Si votre enfant a un épisode de paludisme, les médicaments que nous utilisons pour le guérir (l'amodiaquine, quinine) peuvent entraîner des nausées, mais cela tend à disparaître en même temps que la fièvre. Nous ne prévoyons aucun problème avec la prise d'artésunate par votre enfant. Si votre enfant souffre d'un cas grave de paludisme et reçoit de la quinine, vous devez savoir que la quinine peut entraîner des désagréments abdominaux, vomissements, bourdonnements d'oreilles ou vertiges.

DESCRIPTION DES AVANTAGES ÉVENTUELS

Il est possible que votre enfant ne retire aucun avantage de sa participation à cette étude, mais il est possible que nous fassions l'acquisition de connaissances susceptibles d'aider d'autres personnes. Votre participation à cette étude ne vous coûtera absolument rien.

DESCRIPTION DES COMPENSATIONS

En compensation de votre temps de travail perdu et de votre dérangement pour apporter votre enfant à la clinique pour le suivi, vous recevrez 1kg de sucre au début de l'étude. Chaque fois que votre enfant est diagnostiqué avec le paludisme et traité, vous recevrez 1 kg de sucre. Chaque fois que nous prélèverons du sang du bras de votre enfant lorsqu'il est en bonne santé, vous recevrez 5 kg de sucre.

DISCUSSION DE TRAITEMENTS PARALLÈLES

Le paludisme peut évoluer en une maladie parfois mortelle et il doit être traité avec des médicaments efficaces comme ceux fournis dans cette étude. Si vous ne souhaitez pas que votre enfant prenne le médicament fourni dans cette étude, les investigateurs peuvent suggérer d'autres médicaments ou vous référer au centre médical de Bancoumana où les docteurs peuvent suggérer et fournir d'autres médicaments ou traitements de remplacement.

DÉCLARATION DE DISCUSSION DES NOUVEAUX RÉSULTATS

Les découvertes réalisées à la suite de cette étude peuvent être rapportées lors de réunions ou dans des revues médicales, sans toutefois mentionner le nom de votre enfant. Bien que les informations spécifiques concernant votre enfant, ne seront pas partagées avec quiconque, excepté les investigateurs de l'étude, le NIH et ses représentants dûment autorisés, une confidentialité absolue ne peut pas être garantie.

CONFLIT D'INTÉRÊT

Les Instituts Nationaux de la Santé (National Institutes of Health/NIH) passent en revue les chercheurs scientifiques membres de leur personnel, au moins une fois par an pour détecter tout conflit d'intérêt de nature financière ou autre dans le domaine de la recherche sur des sujets humains. Vous pouvez demander à votre équipe de recherche des renseignements supplémentaires ou une copie du Guide d'examen des protocoles (Protocol Review Guide). Ce protocole peut comporter des investigateurs qui ne sont pas des employés du NIH. Il est demandé aux investigateurs n'appartenant pas au NIH d'adhérer aux principes du Guide d'examen des protocoles (Protocol Review Guide), mais ils ne sont pas tenus de rapporter leurs actifs financiers personnels au NIH.

LISTE DE CONTACTS

Pour toute question ou préoccupation que vous pourriez avoir concernant la participation de votre enfant à cette étude, maintenant ou à une date ultérieure, vous pouvez parler à l'un des

membres de notre personnel au centre médical de Kenieroba ou transmettre un message au Professeur Mahamadou Diakité à l'université de Bamako. Vous pouvez également contacter le président du comité d'éthique, à savoir le Dr Marouf Keita à l'hôpital Gabriel Touré de Bamako. Les médecins du centre médical peuvent vous aider à contacter les professeurs Diakité ou Keita.

Si vous acceptez que votre enfant participe à cette étude, veuillez apposer votre signature ou votre empreinte digitale ci-dessous.

_____ Empreinte digitale	- ou -	_____ Signature	_____ Date
_____ Nom complet			
_____ Parenté		_____ Signature de l'investigateur	_____ Date
Âge		Témoin	Date