

## **Abréviations**

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

G6PD : Glycose-6-Phosphate Déshydrogénase

Hb : Hémoglobine

HD : Hôte Définitif

IL: Interleukine

TNF: *Tumor Necrosis Factor* (facteur nécrosant des tissus)

GR: Globule Rouge

ICAM-1: *Inter-cellular adhesive molecule-1*

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Réduit

PfEMP-1: *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein -1*

DBL: *Duffy binding likes* (attachement semblable au Duffy)

CIDR: *Cystein –Rich interdomain*

CTA : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine

SP : Sulfadoxine-Pyriméthamine

HPLC : Chromatographie Liquide de Haute Performance

PCR-REA: *Polymerase Chain Reaction, Restriction Enzyme Analysis*

NIH: *National Institutes of Health*

Pf: *Plasmodium falciparum*

µl: microlitre

Kb : Kilobase

Km : Kilomètre

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

FMPOS : Faculté de Médecine, de Pharmacie et D'odontostomatologie.

FAST : Faculté de Science et Technique.

LBMA: Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée

kDa : kiloDalton

LMVR: *Laboratory of Malaria and Vector Research*

NIAID: *National Institute of Allergy and Infection Diseases*

bp : base paire

**Table des matières**

DEDICACE ..... - 2 -

REMERCIEMENT ..... - 3 -

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY..... - 5 -

ABREVIATIONS ..... - 7 -

Liste des tableaux..... 12

Liste des figures..... 13

1. INTRODUCTION..... 14

2. OBJECTIFS ..... - 16 -

2.1. Objectif Général..... - 16 -

2.2. Objectifs spécifiques ..... - 16 -

3. GENERALITE SUR LE PALUDISME ..... 17

3.1. Epidémiologie ..... 17

3.1.1. Groupe à risque ..... 17

3.1.2. Cycle de développement du parasite..... 18

3.1.2.1. CYCLE CHEZ LE MOUSTIQUE (SPOROGONIE ; FIGURE1 C)..... 18

3.1.2.2. CYCLE CHEZ L’HOMME ..... 18

3.1.2.3. CYCLE DANS LA POPULATION ..... 20

3.2. Physiopathologie du paludisme ..... 22

3.2.1. Accès palustre simple..... 22

3.2.2. Accès palustre grave et compliqué..... 23

3.3. Variants génétiques et protection contre le paludisme..... 24

3.3.1. RAPPEL SUR L’HEMOGLOBINE NORMALE ..... 24

3.3.2. Hémoglobine anormale et les hémoglobinopathies .....	25
3.3.2.1. HEMOGLOBINE S (DREPANOCYTOSE).....	26
3.3.2.2. HEMOGLOBINE C.....	27
3.3.2.3. THALASSEMIES.....	28
3.3.2.4. DEFICIT EN G6PD.....	31
3.3.2.5. GROUPES SANGUINS ABO.....	34
3.4. Problématique socio-économique du paludisme.....	36
3.5. Difficultés de la prévention et du traitement.....	36
3.5.1. Médicaments antipaludiques.....	37
3.5.1.1. DERIVES DE L'ARTEMISININE .....	40
3.5.1.2. ASSOCIATIONS A BASE D'ARTEMISININE .....	42
3.5.1.3. PRINCIPE DES CTA .....	42
3.5.2. Vaccins antipalustres.....	43
4. MATERIEL ET METHODES.....	45
4.1. Cadre d'étude .....	45
4.1.1. Situation géographique, climat et végétation .....	- 48 -
4.1.2. Infrastructures socio-sanitaires.....	- 49 -
4.1.3. Activités socio-économiques et culturelles .....	- 49 -
4.2. Population d'étude et échantillonnage .....	- 50 -
4.3. Critères d'inclusion et de non inclusion.....	- 50 -
4.3.1. Critères d'inclusion .....	- 50 -
4.3.2. Critères de non inclusion.....	- 50 -
4.4. Méthodes de collecte et de gestion des données .....	- 51 -
4.5. Variables mesurées .....	- 51 -
4.6. Examens de laboratoires utilisées .....	- 51 -
4.7. DEFINITION DES TERMES.....	- 52 -
4.7.1. Alpha-thalassémie .....	- 52 -

4.7.2. Beta-thalassémie .....	- 54 -
4.7.3. Classification des variants G6PD.....	- 56 -
4.7.4. Variants de la beta-globine (HbS et HbC) .....	- 58 -
4.7.5. Anémie .....	- 58 -
4.8. Considérations éthiques et déontologiques .....	- 58 -
4.8.1. Risques et effets secondaires potentiels .....	- 58 -
4.8.2. Compensation.....	- 59 -
4.8.3. Diffusion des résultats.....	- 59 -
4.9. Gestion et analyse des données.....	- 60 -
5. RESULTATS .....	- 61 -
5.1. Résultats globaux .....	- 61 -
5.2. Caractéristiques sociodémographiques .....	- 61 -
5.3. Résultats analytiques.....	- 63 -
6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION .....	- 74 -
6.1. Au plan méthodologique .....	- 74 -
6.2. Distribution des variants d'hémoglobine dans notre population d'étude.....	- 74 -
6.3. Distribution du groupe sanguin ABO dans notre population d'étude.....	- 78 -
6.4. Distribution du déficit en G6PD dans notre population d'étude.....	- 80 -
6.5. Distribution de l'alpha-thalassémie dans notre population d'étude.....	- 81 -
6.6. Taux moyen d'hémoglobine par variant génétique.....	- 82 -
6.7. Limites de notre étude.....	- 84 -
7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....	- 85 -
7.1. Conclusion .....	- 85 -
7.2. Recommandations .....	- 86 -
FICHE SIGNALÉTIQUE .....	- 87 -
9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	- 90 -
10. ANNEXE .....	- 99 -

10.1. Détermination du Taux d'hémoglobine ..... - 99 -

10.2. Détermination du groupe sanguin ABO..... - 101 -

10.3. Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10 ..... - 102 -

10.4. Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alpha-thalassémie par PCR..... - 104 -

10.5. Détection de la mutation 202 A/G responsable du déficit en G6PD par PCR..... - 106 -

## Liste des tableaux

Tableau I: Distribution et sévérité clinique du paludisme à <i>P. falciparum</i> dans les groupes sanguins.....	35
Tableau II: Médicaments antipaludiques autorisés par l'organisation mondiale de la santé pour le contrôle et le traitement du paludisme en 2009.....	40
Tableau III: Résumé des caractéristiques principales des alpha-thalassémies.....	54 -
Tableau IV: Résumé des caractéristiques principales des beta-thalassémies .....	56 -
Tableau V: Répartition de la population d'étude selon le village, le sexe et les groupes d'âge.....	61 -
Tableau VI: Répartition des sujets selon le groupe ethnique .....	62 -
Tableau VII: Répartition du groupe sanguin ABO selon l'ethnie.....	63 -
Tableau VIII: Répartition du type d'hémoglobine selon l'ethnie .....	63 -
Tableau IX: Répartition du Génotype de l' $\alpha$ -Thalassémie selon le village .....	64 -
Tableau X: Répartition du Groupe Sanguin ABO selon le village .....	65 -
Tableau XI: Répartition du type d'hémoglobine selon le village .....	66 -
Tableau XII: Répartition du génotype de G6PD selon le village.....	67 -
Table 13: Répartition des sujets en fonction du nombre de variants génétiques .....	68 -
Tableau XIV: Taux moyen d'hémoglobine selon le groupe d'âge et le type de variants génétiques .....	70 -
Tableau XV: Distribution de l'anémie dans la population d'étude.....	72 -
Tableau XVI: Répartition des cas d'anémie par classe d'âge.....	73 -

## Liste des figures

Figure 1: Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> chez l'Anophèle et chez l'homme .....	20
Figure 2: Synthèse de l'hémoglobine.....	25
Figure 3: globules rouges normaux et globules rouges en faucille .....	27
Figure 4: Groupes sanguins érythrocytaire selon le système ABO.....	34
Figure 5: Schéma de classification des différents dérivés de l'artémisinine.....	40
Figure 6: Structures chimiques des dérivés de l'artémisinine (Chekem and Wierucki, 2008) .....	41
Figure 7a: Site d'étude .....	47
Figure 8 : Répartition de la population d'étude selon les groupes d'âge .....	- 62 -
Figure 9: Répartition de la population d'étude selon le génotype de l' $\alpha$ -thalassémie.....	- 64 -
Figure 10: Répartition des enfants selon le groupe sanguin ABO .....	- 65 -
Figure 11: Répartition des enfants selon le type d'hémoglobine .....	- 66 -
Figure 12: Répartition des enfants selon le déficit en G6PD .....	- 67 -
Figure 13: Répartition des enfants selon le type d'hémoglobine à Fourda .....	- 68 -
Figure 14: Répartition des enfants selon le type d'hémoglobine à Kenieroba.....	- 69 -
Figure 15: Répartition des enfants selon le type d'hémoglobine à Bozokin.....	- 69 -
Figure 16: Répartition du taux moyen d'hémoglobine selon le type d'hémoglobine .....	- 71 -
Figure 17: Répartition du taux moyen d'hémoglobine selon le type de déficit en G6PD .....	- 71 -
Figure 18: Répartition du taux moyen d'hémoglobine selon le type d'alpha-thalassémie .....	- 72 -
Figure 20 : Analyseur et Microcuvette HemoCue .....	- 99 -
Figure 21 : Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+.....	- 100 -
Figure 22 : photographie d'une bande d'ADN de la G6PD après digestion.....	- 112 -

## 1. Introduction

Considéré comme problème de santé publique à cause de sa grande mortalité et morbidité infantile dans le monde surtout dans les zones intertropicales, le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. Elle constitue un risque majeur pour plus de trois milliards d'être humains et est responsable de nombreux cas de décès dans le monde, notamment en Afrique où il touche surtout les enfants de moins de cinq ans et les femmes en ceintes. En effet, selon la dernière statistique de l'OMS, sur 3,3 milliards de personnes exposées au risque de paludisme en 2008, 243 millions de cas de paludisme ont été enregistrés dont près d'un million de cas mortels (WHO, 2009). En 2008, le paludisme était endémique dans 109 pays dont 45 situés en Afrique (WHO, 2008).

En Afrique subsaharienne, particulièrement dans les zones rurales pendant la saison de transmission de paludisme (l'hivernage), chaque enfant est susceptible de faire un épisode de paludisme (Greenwood, 2008a). Cependant, il a été observé que certains sujets font une résistance au paludisme (surtout aux formes graves) allant de la protection contre la mortalité palustre à l'absence d'infection par le *Plasmodium*. Cet état de résistance est essentiellement constitutif donc lié à certains caractères génétiques. L'identification de ces caractères et les différents mécanismes par lesquels ils protègent contre le paludisme permet sans doute d'améliorer la lutte contre le paludisme.

De nos jours, l'effet protecteur contre les formes graves du paludisme de certains traits génétiques a été établi par des études épidémiologiques et cliniques de terrain. Ces caractères génétiques communément appelés allèles classiques de protection contre les formes graves du paludisme sont pour la plupart des caractères polymorphiques liés à l'hémoglobine et au globule rouge comme HbS (Livingstone, 1971), HbC (Agarwal et al., 2000, Modiano et al., 2001),  $\alpha$ -thalassémie (Allen et al., 1997, Williams et al., 2005b), déficit en G6PD (Baird et al., 1991, Mockenhaupt et al., 2003) et le groupe sanguin O (Lell et al., 1999).

Ces polymorphismes de protection peuvent être un facteur confondant lors des essais vaccinaux ou médicamenteux, d'où l'importance de connaître la prévalence des polymorphismes de l'Hb et

du globule rouge avant toute étude de l'immunisation ou d'essais de médicament antipaludique dans une zone endémique de paludisme.

Il a été observé des sujets résistants au paludisme ne portant aucun de ces allèles classiques de protection (Kwiatkowski, 2005). L'identification de ces nouveaux allèles de protection nécessite de tenir compte des effets confondants que constituent les allèles classiques de protection. Certaines études ont démontré une diminution du taux moyen d'hémoglobine chez les personnes porteuses de ces gènes classiques de résistance au paludisme sévère (Haldar and Mohandas, 2009). Cette étude se propose de distinguer les sujets porteurs de traits génétiques de protection contre le paludisme des sujets naïfs.

## **2. Objectifs**

### **2.1. Objectif Général**

Etudier la distribution des différents variants génétiques de protection contre le paludisme chez les enfants, dans les villages de Keniéroba, Bozokin et Fourda dans la commune de Bancoumana.

### **2.2. Objectifs spécifiques**

- Déterminer la prévalence des variants génétiques de la beta-globine (HbS et HbC) dans notre population d'étude ;
- Déterminer la prévalence du déficit en G6PD dans la population d'étude ;
- Déterminer la prévalence du groupe sanguin ABO dans la population d'étude ;
- Déterminer la prévalence de l'alpha-thalassémie dans la population d'étude ; et
- Déterminer la prévalence de l'anémie dans la population d'étude.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons fait une revue de la littérature sur le sujet.

### 3. Généralité sur le paludisme

Le paludisme est une protozoose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* et transmis par un moustique femelle du genre *Anopheles*. Quatre espèces plasmodiales sont responsables de presque tous les cas humains de paludisme : *P. falciparum* ; *P. vivax* ; *P. ovale* et *P. malariae*. Une cinquième espèce, *P. knowlesi*, a été décrite comme infectant l'homme (Singh et al., 2004). La grande mortalité palustre est associée à l'infection par *P. falciparum*.

C'est en 1880 qu'Alphonse Laveran découvre l'hématozoaire du paludisme à partir de l'observation d'une goutte de sang provenant d'un patient infecté par *Plasmodium falciparum*, ce qui lui a valu le prix Nobel de médecine en 1907 (Diakite, 2008). De 1895 à 1897, la transmission de cette affection par la piqûre des moustiques du genre *Anopheles* a été soupçonnée par Ross et confirmée par Grassi en 1898 (Diakite, 2008).

#### 3.1. Epidémiologie

L'épidémiologie du paludisme concerne trois acteurs (le parasite, le vecteur et l'homme), qui sont en relation par des facteurs environnementaux et socio-économiques.

##### 3.1.1. Groupe à risque

Les personnes à risque sont :

- Les enfants dans les régions de forte endémicité en particulier ceux âgés de six mois à cinq ans ;
- Les sujets de tout âge dans les régions de faible endémicité ;
- Les voyageurs venant de régions où il n'existe pas de transmission de paludisme qui se rendent dans une région impaludée ;
- Les personnes qui retournent dans des régions fortement endémiques après quelques années d'absence ;
- Les femmes enceintes (à risque pour toutes les complications) ;

### 3.1.2. Cycle de développement du parasite

#### 3.1.2.1. Cycle Chez le moustique (Sporogonie ; Figure1 C)

Il s'agit du moustique de l'ordre des diptères, de la famille des *Culicidae*, de la sous famille des *Anophelinae*, du genre *Anopheles* qui est l'hôte définitif (HD) du cycle de développement du *Plasmodium*.

Lors d'un repas sanguin (figure1-8) sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des formes sexuées du *Plasmodium*, les gamétocytes mâles (microgametocytes) et femelles (macrogamétocytes). Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'exflagellation (figure1-9) à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés. Il en résulte un zygote appelé ookinète (figure1-10); celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste (figure1-11).

Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique suivie par plusieurs milliers de mitose qui conduit à la production de sporozoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments mobiles et haploïdes dans l'hémolymphe (figure 1-12). Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infectante (figure 1-1). Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule entre 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et l'espèce en cause (figure 1).

#### 3.1.2.2. Cycle chez l'homme

##### 3.1.2.2.1. Cycle exo érythrocytaire: (figure 1A)

Au cours de la piqûre (figure1-1), l'anophèle femelle infecté injecte dans un capillaire des sporozoïtes. Les sporozoïtes transitent dans la circulation générale et, en quelques minutes, ils envahissent les hépatocytes (figure1-2) grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte (CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte du côté de l'espace de Disse, espace directement en contact avec le sang circulant. Le sporozoïte entre alors dans une phase de réplication, au sein de la vacuole parasitophore et de prolifération intracellulaire qui repousse en périphérie le noyau de la cellule (figure1-3) et finit par constituer une masse multinucléée appelée schizonte (schizonte

hépatocytaires) qui conduit à la libération de plusieurs dizaines de milliers de mérozoïtes (figure 1-4) dans la circulation sanguine. Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure 8 à 15 jours, selon les espèces (figure 1).

#### **3.1.2.2.2. Cycle intra érythrocytaire (figure 1B)**

C'est la seule phase symptomatique du cycle, d'intensité variable selon les individus. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte vont débiter le cycle sanguin **asexué** de prolifération de *P. falciparum* en infectant les érythrocytes (figure 1-5). Le mérozoïte pénètre grâce à un processus parasitaire actif et se différencie au sein de la vacuole parasitophore en anneau (trophozoïte jeune), puis en trophozoïte mature, stade à partir duquel une intense phase répliquative commence. Il donne alors naissance au schizonte (schizonte érythrocytaire), celui-ci après segmentation montre une forme caractéristique de rosace, puis libère 8 à 32 mérozoïtes (figure 1-6) qui rapidement réinfectent des érythrocytes sains. L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*.

L'apparition des gamétocytes (figure 1-7) se déroule en général la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison (figure 1-7). A la suite d'une nouvelle piqûre par un anophèle (figure 1-8), les gamétocytes mâles et femelles (au dimorphisme sexuel marqué) sont ingérés avec le repas sanguin (figure 1). Il est à noter que moins de 20% des piqûres de moustiques contenant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires sont responsables d'infections en zone endémique.



dire que le climat et l'altitude sont les deux éléments environnementaux clés jouant un rôle majeur dans la transmission du paludisme.

L'indice de *stabilité*, déterminé par Macdonald (Macdonald, 1957) caractérise l'enracinement du paludisme et permet de distinguer :

- **les zones de paludisme stable** où la forte transmission entraîne une prémunition. Celle-ci n'empêche pas les habitants d'être parasités mais limite les manifestations pathologiques aux classes d'âge les plus jeunes alors que les adultes sont peu touchés.
- **les zones de paludisme instable** où le caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition; la maladie sévit alors sous forme d'épidémie touchant toutes les classes d'âges.

Au Mali, cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme ont été décrits (Doumbo, 1992):

- **La zone de transmission saisonnière longue de quatre à six mois au sud** qui correspond à la région soudanoguinéenne. Le paludisme y est holo-endémique avec un indice plasmodique supérieur à 75% de juin à novembre.
- **La zone de transmission saisonnière courte à quatre mois** dans les régions de la savane nord soudano-sahélienne ; le paludisme y est hyper endémique avec un indice plasmodique variant entre **50 et 75%**.
- **La zone sub-saharienne** au Nord où la transmission est sporadique voire **épidémique**, l'indice plasmodique est inférieur à 50%.
- **La zone du delta intérieur du fleuve Niger et les zones de retenue d'eau et de riziculture** (barrages) où la transmission est bimodale voire plurimodale. En début de pluie, la période de décrue et de mise en eau des casiers rizicoles. Le paludisme est de type méso endémique avec un indice plasmodique inférieur à 40%.
- **Le milieu urbain** en particulier celui de Bamako est impropre à l'impaludation (Pollution des gîtes, médicalisation etc.). Le paludisme y est de type hypo endémique avec un indice plasmodique inférieur à 10%.

### **3.2. Physiopathologie du paludisme**

Le paludisme et ses complications sont la résultante d'une cascade d'évènements physiopathologiques, influencés à la fois par le parasite et les facteurs liés à l'hôte (y compris l'immunité et les facteurs de susceptibilité génétiques).

#### **3.2.1. Accès palustre simple**

Les symptômes du paludisme commencent à se prononcer à partir du stade intra-érythrocytaire du cycle de développement du parasite.

La fièvre est surtout due à une substance pyrogène (hémozoïne) déversée lors de l'éclatement des globules rouge parasités. En plus, plusieurs cytokines ont un effet pyrogène comme IL-1, IL-2, IL-6 et surtout la TNF- $\alpha$ . (Kwiatkowski, 1991). Plusieurs éclatement conduisent à l'anémie, comme d'autres mécanismes auto-immune peuvent provoquer cette anémie tel que :

- La fixation de l'antigène plasmodial soluble sur les membranes érythrocytaires.
- L'action de facteur plasmatisque libéré par les parasites et fragilisant les parois érythrocytaires.
- L'activité opsonisante d'autres produits du métabolisme parasitaire favorisant la phagocytose des hématies par les monocytes.

Pendant l'infection, le système monocyte macrophage débarrasse l'organisme non seulement des pigments malariques mais aussi des débris érythrocytaires, ce qui entraîne l'Hépatosplénomégalie.

A noter qu'il faut que la parasitémie atteigne un seuil critique avant que la rupture des schizontes ne déclenche un accès clinique. Par conséquent, les premiers cycles érythrocytaires restent généralement asymptomatiques. Le seuil de parasitémie est néanmoins variable d'un sujet à l'autre. Un sujet naïf qui n'a jamais fait de paludisme, est susceptible de faire un accès clinique avec une parasitémie à peine détectable (0,001%) alors qu'un enfant d'âge scolaire (6-9ans) en zone d'endémie restera le plus souvent asymptomatique, même à une parasitémie très élevée (Newton and Krishna, 1998).

### 3.2.2. Accès palustre grave et compliqué

Le paludisme simple mal ou non traité peut se compliquer. La schizogonie profonde de *P. falciparum* est à l'origine de ces complications redoutables dont le neuropaludisme. Celui-ci consiste en des thromboses capillaires responsables de lésions vasculaires et hémorragiques provoquant des altérations dégénératives des cellules nerveuses entourées d'infiltrats cellulaires.

Plusieurs théories expliquent ces phénomènes:

- Obstacles mécaniques sur la circulation micro-capillaire et veineuse à cause d'une déformabilité diminuée des érythrocytes parasités et de la formation de "rosettes" constituées d'un globule rouge parasité auquel adhèrent, par un mécanisme non élucidé (les antigènes et les immunoglobulines exposés à sa surface joueraient un rôle), des érythrocytes normaux; ces phénomènes causent une diminution du débit circulatoire et un coma métabolique réversible (Newton and Krishna, 1998) ;
- adhérence immunologique de globules rouges parasités à l'endothélium vasculaire post-capillaires causant des ralentissements circulatoires importants, cette adhérence serait sous la dépendance de certaines protéines de surface des globules rouge parasités visibles au microscope électronique (protubérances ou "*knobs*"), des lymphocytes T CD4+, de certaines interleukines, en particulier le TNF et de récepteurs endothéliaux du type ICAM-1 (Newton and Krishna, 1998). ;

L'expression symptomatologique consiste en une hémiplégie ou des convulsions (zones motrices), des troubles thermorégulateurs avec hyper pyrexie (hypothalamus), une altération progressive de la conscience si le cerveau entier est entrepris. Le neuropaludisme évolue rapidement sans traitement vers le coma puis le décès du malade (Newton and Krishna, 1998).

### **3.3. Variants génétiques et protection contre le paludisme**

Dans les zones d'endémie palustre, on observe que certains enfants font moins d'épisode palustre pendant la saison de transmission ou rarement la forme sévère du paludisme. Dans les mêmes zones, on observe également l'existence de certaines anomalies érythrocytaires génétiques. Ce qui amène à rechercher la relation entre ces variants génétiques et la résistance au paludisme sévère.

#### **3.3.1. Rappel sur l'hémoglobine normale**

L'hémoglobine est une protéine dont la principale fonction est le transport de l'oxygène dans l'organisme humain et chez les autres vertébrés. L'hémoglobine se trouve essentiellement à l'intérieur des globules rouges du sang ce qui leur confère leur couleur rouge. L'hémoglobine est constituée de quatre molécules de globines et de quatre molécules d'hème. L'hémoglobine est synthétisée dans la moelle osseuse par des érythroblastes médullaires ou précurseurs des hématies qui sont des hématies non totalement élaborées. Ils ont encore un noyau et sont plus volumineux que les hématies normales.

La synthèse de l'hémoglobine est stimulée par une hormone appelée érythropoïétine. L'érythropoïétine est synthétisée par les reins et sa synthèse peut être stimulée par un faible taux d'hémoglobine ou par une hypoxie. La synthèse de l'hémoglobine nécessite la présence de certains éléments comme : le fer, le cuivre, la vitamine B12, la pyridoxine (vitamine B6), l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide folique etc.

La molécule de globine des adultes sains se compose de deux chaînes  $\alpha$  et de deux chaînes  $\beta$  (HbA de l'adulte). Chez le nouveau-né, environ 70 à 90% de l'hémoglobine est constitués par HbF ( $\alpha_2 \gamma_2$ ) et seul 10 à 30% est constitué par l'HbA ( $\alpha_2 \beta_2$ ). Cependant, dès l'âge de 6 à 8 mois, la quantité de l'hémoglobine F chez l'enfant s'abaisse à 1-2% et respectivement le taux de l'HbA augmente. Chez les adultes, il n'y a pas plus de 0,1 à 2% de l'HbF et l'essentielle de l'hémoglobine est constitué de l'HbA ( $\alpha_2 \beta_2$ ) et de l'HbA2 ( $\alpha_2 \delta_2$ ) 2 à 2,5%. L'HbA, HbA2 et HbF sont des hémoglobines normales.

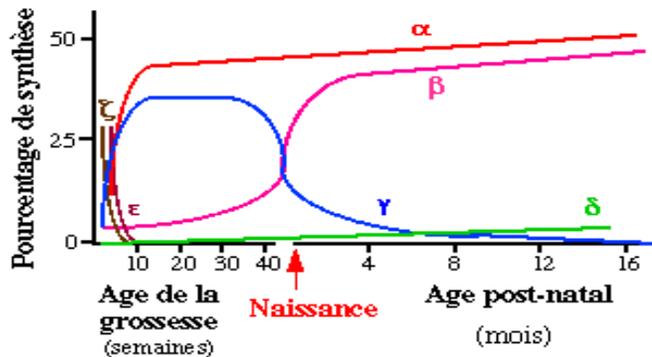


Figure 2: Synthèse de l'hémoglobine

### 3.3.2. Hémoglobine anormale et les hémoglobinopathies

Les érythrocytes sont essentiellement remplis d'hémoglobine, et les parasites du paludisme ont développé un style de vie qui dépend largement de son environnement d'hémoglobine. Les altérations de l'hémoglobine peuvent affecter la biochimie et la machinerie cellulaire du développement du parasite. Elles pourront affecter l'habilité de la rate et d'autres mécanismes immunitaires à reconnaître les hématies parasitées en affectant leur morphologie, leurs propriétés mécaniques ou leurs structures de surface. L'importance biologique de ces dépendances est appuyée par la très grande pression que le paludisme a exercé sur la structure et la régulation de l'alpha globine (encodée par les gènes identiques HBA1 et HBA2) et la beta globine (encodée par le gène HBB) qui ensemble constituent la protéine tétramérique de l'hémoglobine chez l'adulte. Des perturbations peuvent survenir dans la synthèse de l'hémoglobine dues à une mutation (le plus souvent ponctuelle) ou une délétion au niveau des gènes gouvernant la synthèse de telle ou telle chaîne. Ces perturbations aboutissent aux anomalies génétiques de l'hémoglobine appelées hémoglobinopathie. L'hémoglobinopathie peut être qualitative : HbS (drépanocytose), HbC, etc. ou quantitative : thalassémies.

Un taux d'hémoglobine inférieur à 5 g /dl (ou un taux d'hématocrite < 15%) associé à une parasitémie  $\geq 10\ 000$  formes asexuées / $\mu$ l est un signe majeur de paludisme grave selon l'OMS(WHO, 2000b, WHO, 2003a). En pratique, l'anémie palustre peut être définie comme

une réduction du taux d'hémoglobine ou d'hématocrite en dessous de l'échelle normale pour l'âge, le sexe, et l'état de grossesse dans une région endémique et en présence d'une parasitémie quelque soit la densité parasitaire. De nombreux enfants présentant une anémie sévère sans goutte épaisse positive répondent bien au traitement antipalustre (Menendez et al., 1997, WHO, 2000b).

### **3.3.2.1. Hémoglobine S (drépanocytose)**

La drépanocytose ou anémie falciforme est une maladie génétique récessive autosomique. C'est une maladie rare sauf dans certaines régions notamment l'Afrique équatoriale, certaines régions de l'Inde et le pourtour méditerranéen. Cette affection est un syndrome hémolytique dû à un défaut de synthèse de la chaîne bêta de l'hémoglobine. Il s'agit d'une mutation ponctuelle au niveau de la position 6 de gène de la chaîne bêta globine, c'est-à-dire la séquence GAG est remplacée par la séquence GTG ce qui conduit au remplacement de l'acide glutamique par la valine conduisant au remplacement de l'HbA par l'HbS (Williams and Mackey, 1949). Par conséquent, dans la condition d'hypoxie, l'hémoglobine perd sa forme et sa fonctionnalité pour prendre la forme en faucille incapable de survivre dans cette condition, d'où l'hémolyse aboutissant à une anémie.

Les sujets homozygotes (Hb SS) ont la drépanocytose généralement fatale au jeune âge, les sujets hétérozygotes (Hb AS) n'ont généralement pas d'anomalie clinique, Il a même été suggéré que cette forme pourrait conférer un avantage de protection contre certaines formes de paludisme (Lehmann and Raper, 1949). La distribution géographique du paludisme et du gène drépanocytaire supporte cette suggestion (Lehmann and Raper, 1949), mais aussi les études épidémiologiques et cliniques réalisées dans les zones endémiques du paludisme en confirment (Beet, 1949).

En effet, les premières observations entre le trait drépanocytaire et le paludisme provenaient de la Rhodésie du Nord où Beet notait que le parasite du paludisme était moins fréquent dans le sang des sujets ayant le trait drépanocytaire (Beet, 1949).

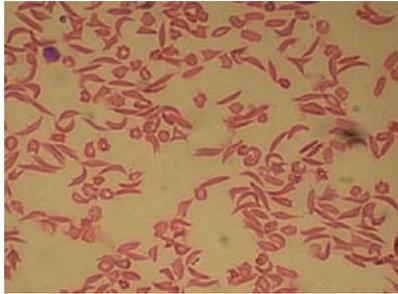


Figure 3: globules rouges normaux et globules rouges en faucille

Le mécanisme par lequel le trait drépanocytaire protège contre le paludisme à *P. falciparum* n'est pas totalement élucidé, mais les principaux facteurs sont la falciformation accélérée facilitant l'élimination des cellules infectées de la circulation (Luzzatto et al., 1970) et la mauvaise croissance parasitaire. Cette croissance est normale dans les hématies AS exposées à 17% d'oxygène mais les parasites meurent à 3% d'oxygène en quelque jours (Friedman, 1978).

### 3.3.2.2. Hémoglobine C

L'hémoglobine C est retrouvée à travers l'Afrique de l'ouest surtout sur le plateau Voltaïque. Elle est asymptomatique chez les sujets hétérozygotes et ne comportant qu'une hémolyse extrêmement modérée souvent accompagnée d'une grosse rate chez les sujets homozygotes. C'est une affection génétique à transmission récessive, il s'agit d'une mutation ponctuelle au niveau de la position 6 de la chaîne  $\beta$  globine, c'est-à-dire, la séquence GAG est remplacée par AAG conduisant au remplacement de l'acide Glutamique par la Lysine par conséquent l'HbA est remplacé par l'HbC.

La coïncidence de la distribution géographique de cette affection génétique érythrocytaire avec celle d'endémie palustre passée ou présente suggère qu'elle est impliquée dans la protection contre le paludisme. En effet, l'HbC Hétéro- et Homozygote protègent tous contre le paludisme sévère ; mais il semble que cette protection soit élevée pour les sujets homozygotes (Mockenhaupt et al., 2004a). Une étude menée sur 4348 sujets au Burkina Faso suggère une réduction de 29 à 93% de risque de paludisme clinique chez les sujets respectivement de type d'HbC hétérozygotes et homozygotes (Modiano et al., 2001).

Certaines études récentes ont démontré l'effet protecteur de cette hémoglobinopathie contre le paludisme grave, comme l'étude réalisée au Mali chez les Dogon, qui a démontré que l'HbAC était associée à approximativement 80% de réduction du risque de paludisme grave (Agarwal et al., 2000) Aucun cas de paludisme grave n'a été observé chez les 7 sujets homozygotes CC inclus dans cette étude. Ce résultat montre que les sujets homozygotes sont plus protégés que les sujets hétérozygotes (Agarwal et al., 2000).

Le mécanisme de protection induite par l'HbC n'est pas élucidé mais une étude récente à démontré deux mécanismes :

- **la diminution de la séquestration des GR parasités** dans la micro circulation sanguine reconnue comme facteur déterminant la survenue des formes graves de paludisme ;
- **une augmentation de la clairance splénique des GR parasités.**

Le premier mécanisme semble être le mécanisme prépondérant. On expliquerait ainsi la protection conférée par l'HbC contre la plupart des formes graves du paludisme même chez les enfants de moins de cinq ans qui manquent encore d'immunité spécifique acquise anti paludique suffisante (Diakite, 2005)

### **3.3.2.3. Thalassémies**

Le terme grec "thalassémie", qui signifie "la mer" reflète la fréquence élevée de la thalassémie dans les populations italienne et costale grecque. Présentement, le terme thalassémie est utilisé pour décrire un groupe de désordres de synthèse des chaînes de la globine. Alpha-thalassémie réfère aux anomalies de synthèse de la chaîne alpha et la beta-thalassémie reflète une synthèse défectueuse de la chaîne beta de la globine (Luo et al., 2005)

Les thalassémies sont les plus fréquentes des maladies mendéliennes de l'homme et constituent un problème majeur de santé publique. Elles incluent un groupe de désordres cliniques qui résultent d'une mauvaise production des chaînes alpha et beta de la globine, suite à une suppression ou autres perturbations des gènes de la globine sur les chromosomes 11 et 16. Il existe un large spectre de phénotypes cliniques, reflétant le nombre de variants

génétiques qui existent, et vu la grande complexité par le fait que l'alpha-globine est produite par deux gènes identiques, HBA1 et HBA2. Globalement, les thalassémies homozygotes sont des maladies graves ou mortelles alors que les hétérozygotes sont bien portants avec une anémie mineure. Une exception à cette règle arrive quand soit l'un des deux gènes HBA1 ou HBA2 est perturbé, mais pas les deux à la fois de telle manière qu'une certaine production de l'alpha-globine est possible. Ceci est connue comme alpha<sup>+</sup>-thalassémie, et les alpha<sup>+</sup>-thalassémies homozygotes ont seulement des anémies modérées (Weatherall and Clegg, 2001). L'alpha-thalassémie et dans un degré mineur, la beta-thalassémie sont toutes deux protectrices contre l'infection palustre, bien que peu d'études supportent l'avantage sélectif des thalassémies comparée à d'autres polymorphismes du globule rouge.

Les thalassémies sont des maladies génétiques caractérisées par une diminution de synthèse des chaînes de globine due à une anomalie de leurs gènes de régulation. Les thalassémies sont extrêmement fréquentes et marquées par une répartition géographique particulière. Elles déterminent le plus souvent l'anémie hypochrome, microcytaire, génétiquement déterminées sur le mode autosomal récessif. Des cas sporadiques peuvent s'observer dans toutes les ethnies. Les thalassémies sont la conséquence de mutations des gènes conduisant à un arrêt ( $\alpha^0$  ou  $\beta^0$ - thalassémie) ou une réduction de synthèse ( $\alpha^+$  ou  $\beta^+$ - thalassémie) d'une chaîne de globine. Il existe 2 types de Thalassémies ( $\alpha$ -thalassémies et  $\beta$ -thalassémies), en rapport avec la diminution élective de synthèse de la chaîne  $\alpha$  ou de la chaîne  $\beta$  de la globine. L' $\alpha$ -Thalassémie est répandue dans le bassin méditerranéen, en Afrique et dans le sud-est asiatique, la  $\beta$ -thalassémie est particulièrement fréquente dans le sud-est asiatique.

#### **3.3.2.3.1. Beta-Thalassémie**

Dans la  $\beta$ -thalassémie hétérozygote, la diminution de synthèse de la chaîne  $\beta$ -globine entraîne une diminution de la quantité d'hémoglobine dans chaque hématie et explique la microcytose et l'hypochromie. La petite taille des hématies est compensée par l'augmentation de leur nombre. On observe alors une pseudo-polyglobulie sans anémie.

Le potentiel de protection du trait de beta-thalassémie a été étudié dans le nord de Liberia (Willcox et al., 1983a, Willcox et al., 1983b) . Il y avait une fréquence élevée de la

thalassémie parallèlement à l'âge suggérant que les porteurs avaient un taux de survie élevé, bien que la prévalence de *P. falciparum* fût similaire chez les enfants normaux ou thalassémiques, ce dernier groupe avait une densité parasitaire faible. La croissance parasitaire diminuée et l'altération de la fonction des hématies parasites peuvent expliquer le mécanisme de protection des sujets beta-thalassémiques (Pattanapanyasat et al., 1999)

### 3.3.2.3.2. Alpha-Thalassémie

Contrairement à la chaîne  $\beta$  dont la synthèse est déterminée par deux allèles  $\beta$  où on a deux cas de phénotypes (Homo et Hétérozygote), la synthèse de la chaîne  $\alpha$  est déterminée par quatre allèles (deux sur chaque chromosome 16). Ainsi, nous avons quatre phénotypes cliniques :

- l' $\alpha^+$ -**Thalassémie hétérozygote** est caractérisée par une seule délétion c'est l' $\alpha$ -Thalassémies 2 : asymptomatique (20 à 40% des Noirs africains, et très répandue dans les régions méditerranéennes et en Asie) ;
- l' $\alpha^+$ -**Thalassémie homozygote** est caractérisée par 2 délétions en trans. Elle se présente sous la forme d'une Thalassémie mineure, c'est l'alpha-thalassémie 1 : (2 à 4% des Noirs africains) ;
- l' $\alpha^0$ -**Thalassémie hétérozygote** est caractérisée par 2 délétions en cis: elle se présente sous la forme d'une Thalassémie mineure ;
- l' $\alpha^0$ -**Thalassémie homozygote** est caractérisée par 4 délétions en trans.

L'alpha-thalassémie a suscité plusieurs études à partir de l'observation de sa distribution géographique qui est en parallèle avec celle de l'endémicité du paludisme, tendant à vérifier l'hypothèse qu'elle est impliquée dans la protection contre la forme sévère du paludisme. Bien que l'évidence de la génétique des populations soit patente, c'est récemment que l'évidence directe que les thalassémies protègent contre le paludisme a émergé et elles ne sont pas absolument toujours claires.

Ainsi une étude menée en Papouasie (Nouvelle Guinée) où l' $\alpha^+$ -thalassémie touche 90% de la population a démontré l'effet protecteur de l' $\alpha^+$ -thalassémie à l'état homozygote (Allen et al., 1997). D'autres études ont montré que le risque relatif de paludisme sévère était significativement réduit à la fois chez les hétérozygotes et les homozygotes (Mockenhaupt et al., 2004b) (Williams et al., 1996) des résultats similaires ont été observés pour d'autres

infections que le paludisme (Allen et al., 1997). Une autre étude effectuées sur les enfants aux Kenya a démontré que les hétérozygotes et homozygotes étaient tous protecteurs contre le paludisme sévère (Williams et al., 2005c) par contre dans d'autres études, seuls les hétérozygotes étaient protégés (Veenemans et al., 2008).

Le mécanisme de protection des thalassémies n'est pas bien élucidé. Les études en cryométrie de flux *in-vitro* ont démontré que les érythrocytes ayant le phénotype alpha+ thalassémie présentaient une réduction de la croissance des parasites et une augmentation de leur adhésion aux anticorps. L'augmentation de la clairance des cellules infectées est une autre possibilité, mais il est difficile de la tester *in-vivo*. Cependant, d'autres explications plus complexes sont aussi possibles (Williams et al., 2002) .

#### **3.3.2.4. Déficit en G6PD**

Il y a cinquante ans, trois déficit enzymatiques qui entraînent des maladies chez l'homme ont été identifiés, tous dans les érythrocytes humains. Ces enzymes étaient la catalase (Takahara and Miyamoto, 1948), (Goth et al., 2004), la galactose-1-phosphate uridylyltransférase (Isselbacher et al., 1956) et le glucose-6-phosphate déshydrogénase (Alving et al., 1956) . Bien que tous ces déficits aient été découverts au niveau de l'érythrocyte, seul le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) entraîne un désordre hématologique, appelé anémie hémolytique.

Le gène du G6PD est localisé dans la région télomérique sur le bras long (Xq28) du chromosome sexuel X (Keats, 1983, Pai et al., 1980), Le gène du G6PD comprend treize exons s'étendant sur approximativement 18 kb [33, 34]. La protéine G6PD à un poids moléculaire de 59 kDa, et l'enzyme active est composée variablement de 2 à 4 sous-unités identiques de 515 aminoacides (Martini et al., 1986) . Le G6PD est une enzyme cytoplasmique, appelé "*house-keeping*" (Une enzyme impliquée dans les fonctions de base nécessaires à la subsistance de la cellule. Ces enzymes sont toujours exprimées et de manière constitutive) qui catalyse la première et l'étape limitant le taux de la voie de l'hexose monophosphate pour la synthèse du phosphate de pentose. Cette voie est une importante source de NADPH qui est nécessaire à plusieurs réactions biosynthétiques et est essentielle pour maintenir un niveau adéquat intracellulaire des formes réduites du glutathion et autres

groupes sulfhydryl. En préservant et en régénérant les formes réduites du glutathion aussi bien qu'en promouvant la stabilité de la catalase, le NADPH joue un rôle majeur dans l'habilité des cellules à résister au stress oxydatif. La voie de l'hexose monophosphate catalysée par le G6PD est aussi une importante source de ribose lequel est essentiel pour la production des coenzymes nucléotides, la réplication des acides nucléiques et, dès lors la division cellulaire (Sodeinde, 1992). L'importance biologique du G6PD est soulignée par le fait que cette enzyme a été détectée virtuellement dans chaque type de cellule chez les organismes contemporains (Vulliamy et al., 1992).

En Afrique, le G6PD est essentiellement un polymorphisme tri-allélique. Le G6PD B, le variant normal associé à une activité enzymatique normale ou 100%, est l'allèle le plus fréquent, avec des fréquences de 60-80%. Le G6PD A lequel a 90% de l'activité du G6PD B est le second allèle fréquent avec une fréquence entre 15-40%. Le troisième allèle lequel est l'allèle déficient fréquent en Afrique est le G6PD A<sup>-</sup>. C'est le variant de classe III avec une activité enzymatique de 12%, et il varie en fréquence entre 0% et 25% (Mehta et al., 1989). Le G6PD A<sup>-</sup> est unique car il contient deux mutations. Le premier au niveau du nucléotide 376 (exon 5), lequel seul donne naissance au G6PD A (Vulliamy et al., 1988) est une substitution d'adénine pour la guanine qui résulte en substitution d'acide aminé de l'asparagine par l'aspartate alors que la seconde mutation, généralement une substitution de la guanine par l'adénine au nucléotide 202 (exon 4), conduit à la substitution de la valine par la méthionine (Hirono and Beutler, 1988). Bien que la substitution 202 du nucléotide compte pour au moins 95% du variant moléculaire du G6PD A<sup>-</sup> en Afrique, dans une minorité d'individus deux autres alternatives sites de mutation ont été identifiés à la position 680 (exon 7) et 968 (exon 9 ; (Hirono and Beutler, 1988, Beutler et al., 1989)). La substitution à la position 376 encode le changement de G6PD B en G6PD A tandis que la substitution 202 qui différencie l'allèle A avec 85% d'activité enzymatique de l'allèle A<sup>-</sup> avec 12% d'activité (Hirono and Beutler, 1988, Beutler et al., 1989).

L'enzyme de référence est dénommée G6PD (B<sup>+</sup>) dont l'activité enzymatique est de 100% avec une fréquence de 60-80% dans la population. Le variant (A<sup>+</sup>) a une fréquence de 15-40% avec une activité enzymatique de 80%, elle diffère de (B<sup>+</sup>) par un nucléotide en position 376 de la séquence nucléotidique (l'adénine est remplacée par la guanine). Cette mutation n'a pas de conséquence clinique et ne confère pas de résistance au paludisme (Ruwende et al.,

1995). Le variant (A<sup>-</sup>) 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. Ce variant a une activité enzymatique de 12% (Luzzatto, 1995) et a été décrit comme un facteur de réduction du risque de paludisme grave pour les hétérozygotes femelles et les mâles hémizygotes (Ruwende and Hill, 1998).

L'allèle (A<sup>-</sup>) diffère de (A<sup>+</sup>) par un nucléotide en position 202 (la guanine est remplacée par l'adénine) (Hirono and Beutler, 1988) et la conséquence de cette mutation se traduit:

- sur le plan du métabolisme cellulaire, par une accumulation des ions peroxydes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entraînant la mort des cellules,
- sur le plan clinique par une anémie hémolytique,
- sur le plan biochimique par un déficit de l'activité enzymatique de la G6PD.

La distribution géographique du déficit en G6PD est consistante avec une sélection évolutive récente par le paludisme (Ganczakowski et al., 1995), et l'analyse de la structure haplotypique du locus G6PD supporte cette hypothèse de sélection récente positive (Tishkoff et al., 2001)(Sabeti et al., 2002). Ce qui supporte l'hypothèse selon laquelle il existerait une relation entre ce déficit et le paludisme ; mais, cette hypothèse suscite plusieurs questions. Premièrement, est-ce que le déficit en G6PD protège contre le paludisme, si oui, quel degré de protection contre le paludisme simple, le paludisme sévère ou les deux ? Deuxièmement, si ce désordre est protecteur, quel est son degré de protection, et les hommes et les femmes avec des génotypes déficitaires ont-ils des protections similaires ?

Des études épidémiologiques ont apporté des éléments de réponse à ces questions, comme celle de Gille et Fletcher qui ont trouvé une activité enzymatique déficiente du G6PD corrélée à une protection contre le paludisme grave chez les enfants Nigériens (Gilles et al., 1967) . Une étude effectuée en Gambie et au Kenya chez les enfants a démontré que le déficit en G6PD (dans sa forme G6PD A<sup>-</sup>) est associée avec approximativement 46 à 58% de réduction de développer le paludisme sévère chez les femelles hétérozygotes et les mâles hémizygotes (Ruwende et al., 1995).

Le mécanisme de protection conféré par le déficit en G6PD est mal connu. Cependant, les résultats de certaines études ont démontré une mauvaise croissance de *P. falciparum* dans les

érythrocytes déficients (Roth et al., 1983) et une réplication réduite de parasites dans les érythrocytes déficients en G6PD mais les parasites paraissent contourner ceci en élaborant leur propre G6PD (Luzzatto et al., 1969)(Usanga and Luzzatto, 1985).

### 3.3.2.5. Groupes sanguins ABO

Le groupe sanguin ABO érythrocytaire est un ensemble d'antigènes glucidiques allotypiques à la membrane des globules rouges. Le système ABO est défini selon :

- la présence ou non d'antigènes A ou B à la surface des globules rouges. Ainsi, les globules rouges du groupe sanguin A possèdent des antigènes A, ceux du groupe B des antigènes B, ceux du groupe AB des antigènes A et B alors que ceux du groupe O ne contiennent pas d'antigènes de type A ni de type B.
- La présence ou non d'anticorps anti-A ou anti-B dans le sérum.

La présence d'un antigène dans un organisme implique l'absence de son anticorps spécifique dans cet organisme (sous peine de formation d'un complexe anticorps-antigènes !).

La recherche des antigènes définit l'épreuve de Beth-Vincent alors que celle des anticorps définit l'épreuve de Simonin-Michon et sont obligatoires et doivent être concordantes pour établir un groupe sanguin ABO. Une exception, toutefois, chez le nouveau-né de moins de six mois dont les anticorps ne sont pas bien développés, et chez lequel ne sont donnés que des résultats non définitifs.

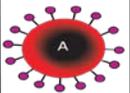
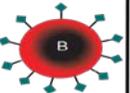
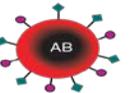
	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	Antigène A	Antigène B	Antigène A et B	Pas d'antigène

Figure 4: Groupes sanguins érythrocytaire selon le système ABO

Les études effectuées sur la relation entre le groupe sanguin ABO et le paludisme ont suggéré que le groupe O peut avoir un avantage de survie dans le cas du paludisme sévère. Le tableau ci-dessous récapitule quelques résultats.

**Tableau I:** Distribution et sévérité clinique du paludisme à *P. falciparum* dans les groupes sanguins

Taille de l'échantillon	Focus	Conclusion	références
209 cas de paludisme simple vs. 280 cas de paludisme sévère	Coma et anémie sévères selon le groupe sanguin	Coma chez 3% du groupe non-A vs. 9% du groupe A, $p = 0.008$	(Fischer and Boone, 1998) Zimbabwe
100 cas de paludisme simple vs. 100 cas de paludisme sévère	Proportion de cas sévères parmi les groupes sanguins ABO	Paludisme sévère : Groupe : 46% Groupe A : 71% $p < 0.01$	(Lell et al., 1999) Gabon
163 cas d'accès simple de paludisme et 80 cas sévère de paludisme, et 65 contrôles non-paludiques d'autres infections	Distribution des groupes sanguins parmi les cas sévères et simples  Odds ratio pour le paludisme sévère le groupe O vs. non-groupe O	Groupes sanguins : simple/sévère : Groupe O : 48%/24% Groupe B : 23%/28% Groupe A : 25%/33% Groupe AB : 5%/16%, $p < 0.0001$ Odds ratio (sévère : contrôle) pour le groupe O : 0,37 $p < 0.0001$	(Pathirana et al., 2005)  Sri Lanka
41 primipares avec infection placentaire active	Hémoglobine maternelle et fœtale ; poids et taille infantiles ; poids du placenta, parasitémie placentaire	Poids placentaire : Groupe O : 2893 g Non-groupe O : 2639 g, $p = 0.04$	(Loscertales and Brabin, 2006) Gambie

Le mécanisme par lequel le groupe O à un avantage sur le groupe A par rapport au paludisme met en avant l'hypothèse de cytoadhérence et le phénomène de rosetting (Ho et al., 2000, Fernandez et al., 1998, Chotivanich et al., 1998).

### **3.4. Problématique socio-économique du paludisme**

Directement liées à l'établissement de l'immunité, les manifestations cliniques du paludisme se traduisent de façons différentes selon qu'il s'agit d'adulte, d'enfants ou de femmes enceintes. Les conséquences du paludisme aussi différent, qu'elles s'expriment plutôt en termes de morbidité ou de mortalité chez les femmes enceintes et les enfants, ou en termes d'incapacité de travail chez les adolescents et les adultes, les conséquences ont un coût économique direct (diagnostic, transport des malades, coût du traitement et des programmes de lutte antipaludique, etc.) ou indirect (perte de revenus entraînée par la maladie ou la mort, temps perdu par les mères pour amener leurs enfants au dispensaire, etc.) qui se répercute au niveau de l'individu, de la famille et de la collectivité.

La plus lourde conséquence du paludisme concerne surtout les enfants en zone endémique. En effet, dans les régions de forte endémicité comme au Kenya, le paludisme est responsable de 11% de l'absentéisme scolaire pendant le cycle primaire et de 4,3% dans le cycle secondaire (Brooker et al., 2000) . Il a été observé que 5-20% des enfants ayant survécus au paludisme cérébral présentent des séquelles neurologiques et sont par la suite souvent incapables de travaux créatifs (Murphy and Breman, 2001). Une étude menée au Yémen en 2000 a démontré que le paludisme asymptomatique diminuerait, les facultés cognitives des enfants d'âge scolaires (Al Serouri et al., 2000) .

### **3.5. Difficultés de la prévention et du traitement**

La prévention du paludisme consiste en différentes mesures qui peuvent protéger soit contre l'infection, soit contre le développement de la maladie chez les individus infectés. Les mesures qui protègent contre l'infection visent le vecteur de la maladie, à savoir l'anophèle. Celles-ci peuvent être des mesures de protection personnelle (individuelles ou familiales): vêtements de protection, insectifuges, traitement intradomiciliaire des habitations en utilisant des insecticides à effet rémanent, ou des mesures de protection de la collectivité ou population: gestion environnementale en vue de limiter la transmission. Ainsi, la chimioprophylaxie doit être limitée aux seules femmes enceintes en zone endémique et aux voyageurs venant d'une zone impaludée.

Pour le traitement, l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine CTA est recommandée par l'OMS depuis 2004. En cas de paludisme grave, le traitement se fera par les sels de quinine en perfusion intraveineuse ou par les dérivés de l'artémisinine. Tous ces moyens nécessitent une politique économique et sociale onéreuse impliquant la participation de chacun pour une meilleure amélioration de la couverture sanitaire de la population. Le paludisme est un véritable handicap pour le développement socio-économique des pays en voie de développement. La mortalité et la morbidité attribuée au paludisme dans les pays africains sont de plus en plus élevées et les fragilisent en termes de ressources humaines et économiques.

### **3.5.1. Médicaments antipaludiques**

Depuis la découverte du *Plasmodium*, plusieurs molécules chimiques naturelles ou synthétiques ont été mises au marché pour traiter la maladie ou pour éviter l'enclenchement de la maladie. La plus ancienne des ces molécules est la Quinine, qui est toujours recommandé par l'OMS pour traiter l'accès palustre grave en injection.

Le traitement du paludisme implique des mesures complémentaires aussi bien que des médicaments spécifiques antipalustres. La tendance actuelle est le traitement combiné utilisant un dérivé de l'artémisinine associé soit à un amino-4-quinoléine (amodiaquine de préférence) ou soit à l'association sulfadoxine-pyriméthamine ou Mefloquine. Il n'existe actuellement qu'un nombre limité d'antipaludiques, avec chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Entre autre, nous pouvons citer les amino-4-quinoléines, les amino-alcools, les antibiotiques, les dérivés de l'artémisinine, les amino-8-quinoléines et les associations d'antipaludiques.

Les antipaludiques sont destinés à prévenir ou à supprimer l'apparition des symptômes cliniques du paludisme. La plupart sont des schizonticides qui agissent sur les formes endoérythrocytaires de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. Selon leur rapidité d'action et leur aptitude à induire une résistance de la part de *P. falciparum*, on distinguera :

- Le groupe des amino-4-quinoléines (chloroquine et amodiaquine) des aminoalcools, (quinine, méfloquine et halofantrine) et des sesquiterpènes (artéméther, artésunate et

artéméther) d'action rapide et pour lesquels la résistance est longue et difficile à apparaître ;

- Le groupe des antibiotiques (sulfamides et sulfones), antifoliques (pyriméthamine et proguanil) et inhibiteurs des fonctions mitochondriales (atovaquone) d'action lente et pour lesquels la résistance apparaît rapidement. Ces molécules sont utilisées en association afin d'obtenir une synergie parasiticide et de retarder l'émergence de la résistance plasmodiale.

Les antipaludiques sont classés en fonction des stades parasitaires sur lesquels ils agissent (tableau II). On distingue :

- les schizonticides, actifs sur les formes endoérythrocytaires du cycle schizogonique. Ils regroupent les schizonticides d'action rapide, les antimétabolites d'action plus lente et plus accessoirement certains antibiotiques. Ils suppriment (traitement curatif) ou préviennent (prophylaxie suppressive) l'apparition des symptômes cliniques ;
- les gamétocytocides qui inhibent la transformation des gamétocytes et bloquent la transmission de l'espèce plasmodiale. Ils sont partiellement actifs sur les parasites intra-hépatiques. Ils sont représentés par la seule primaquine dont la toxicité limite l'utilisation.

Plusieurs classes de produits ont successivement vu le jour, avec chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Dans leur grande majorité, ces produits sont uniquement actifs sur les formes sanguines (intra érythrocytaires asexuées) du parasite et n'ont pas d'activité ni sur les stades initiaux intrahépatiques, ni sur les gamétocytes sanguins.

La tendance actuelle est le traitement combiné utilisant un dérivé de l'artémisinine associé soit à un amino-4-quinoléine (amodiaquine de préférence) ou soit à l'association sulfadoxine-pyriméthamine ou Mefloquine (Greenwood, 2008b, Na-Bangchang and Karbwang, 2009). Ces dernières années, l'OMS encourage vivement tous les pays à passer à ce traitement combiné pour accroître l'efficacité des antipaludiques d'une part et d'autre part raccourcir la durée du traitement (donc augmenter la compliance), et diminuer ou retarder l'émergence de parasites résistants. Dans le passé, des niveaux élevés de mauvais diagnostic du paludisme

ont été tolérés parce que les médicaments de première ligne telle que la chloroquine étaient relativement moins chers et non toxiques. Les nouvelles combinaisons d'antipaludiques, particulièrement ceux à base de dérivés d'artémisinine, sont plus efficaces pour traiter le paludisme, mais sont aussi très chères. Cela signifie qu'il n'est plus économique de traiter tous les cas suspects (fièvres) comme étant d'origine palustre. De plus, en prenant en compte qu'une large proportion d'autres affections non palustres ne sont pas diagnostiquées et traitées, il n'est plus éthique pour les professionnels de santé de cautionner le niveau actuel élevé de faux diagnostic palustre. Il est de nos jours très important que tous les cas suspects de paludisme soient confirmés proprement avant tout traitement à base d'artémisinine.

Les options thérapeutiques actuellement recommandées par l'OMS sont les suivantes :

- **artéméther-luméfantrine** (dans tous les pays du monde),
- **artésunate plus amodiaquine** (dans les zones où le taux de succès thérapeutique de l'amodiaquine en monothérapie est supérieur à 80%),
- **artésunate plus sulfadoxine-pyriméthamine** (SP ; dans les zones où le taux de succès thérapeutique de la SP en monothérapie est supérieur à 80%). Au Mali, l'association sulfadoxine-pyriméthamine est actuellement préconisée pour le traitement intermittent préventif chez les femmes enceintes,
- **artésunate plus méfloquine** (données de toxicité insuffisantes pour recommander son utilisation en Afrique) qui est contre-indiquée en cas d'épilepsie.

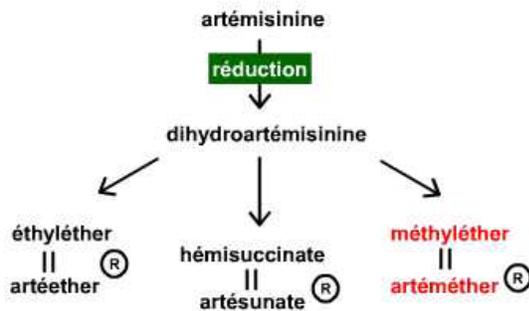
L'association amodiaquine plus sulfadoxine-pyriméthamine est une option intérimaire réservée aux pays qui, pour quelque raison que ce soit, sont dans l'impossibilité d'adopter les ACT immédiatement et dans les zones où l'amodiaquine et la SP restent très efficaces.

**Tableau II:** Médicaments antipaludiques autorisés par l'organisation mondiale de la santé pour le contrôle et le traitement du paludisme en 2009

Médicaments	Indications principales
Artéméther + luméfantrine Artésunate + amodiaquine Artésunate + méfloquine Artésunate + sulfadoxine-pyriméthamine	Traitement combiné à base d'artémisinine (CTA) recommandés par l'OMS pour le traitement de l'accès palustre simple
Dihydroartémisinine-pipéraquline Artésunate + chlorproguanil-dapsone	CTA récemment recommandés par l'OMS pour le traitement de l'accès palustre simple
Quinine Artésunate, Artéméther	Traitement recommandé du paludisme sévère et compliqué
Chloroquine	Traitement du paludisme non du à P. falciparum
Sulfadoxine-pyriméthamine	Traitement préventif intermittent chez les femmes enceintes et chez les enfants
Primaquine	Prévention des rechutes et/ou traitement radical du paludisme à P. vivax

### 3.5.1.1. Dérivés de l'artémisinine

Les dérivés de l'artémisinine utilisés depuis 1979 comprennent l'artémisinine, l'artéméther, l'artéether, et l'artésunate (Klayman, 1985). Les dérivés de l'artémisinine, actifs sur tous les stades du cycle érythrocytaire et sur les gamétocytes réduisent rapidement la charge parasitaire et limitent la transmission de l'espèce.

**Figure 5:** Schéma de classification des différents dérivés de l'artémisinine

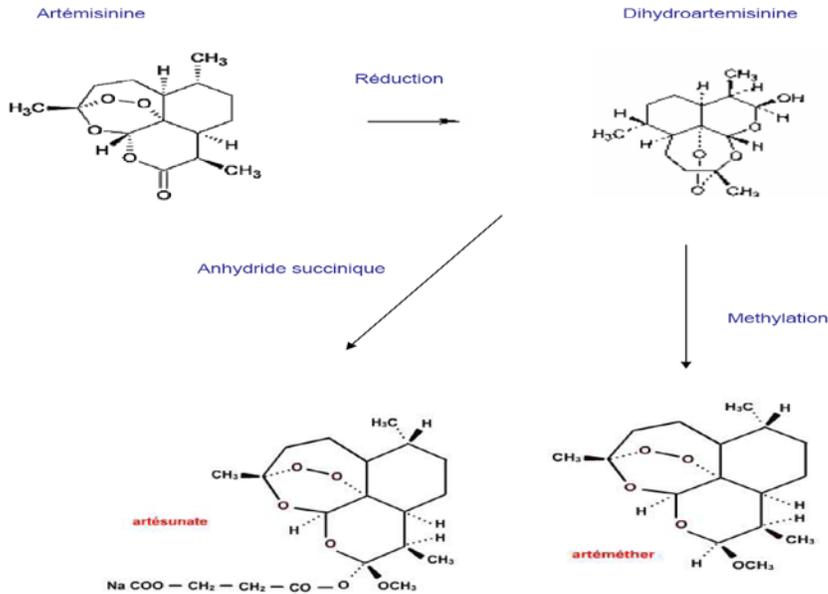


Figure 6: Structures chimiques des dérivés de l'artémisinine (Chekem and Wierucki, 2008)

L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique contenant un radical peroxyde qui n'a aucune parenté structurale avec un antipaludéen connu. Le Qinghaosu, dérivé de la plante cultivée *Artemisia annua*, est offert sous plusieurs formes. La molécule mère artémisinine (préparations orales, parentérales et suppositoires) ou trois dérivés semi-synthétiques, soit un hémisuccinate hydrosoluble (artésunate) pour administration parentérale ou orale et deux composés liposolubles, artéméther et artééther, pour injection intramusculaire. Toutes les préparations ont été étudiées et utilisées seulement à des fins thérapeutiques. Leur emploi est recommandé uniquement dans le cadre d'un traitement curatif et non pour la chimio suppression.

En pratique, seuls l'artéméther, l'artésunate et la dihydroartémisinine sont recommandés en association pour le traitement de l'accès palustre simple et/ou compliqué.

Leur mécanisme d'action est complexe et 3 hypothèses sont avancées :

- endoperoxydes : génération de radicaux actifs d'oxygène ( $O^{\cdot}$ ) aboutissant à la mort du parasite ;
- pouvoir alkylant de l'artémisinine entraînant la formation d'adduits covalents avec l'hème et l'hème polymérase ;
- action sur la PfATPase 6 (SERCA).

### **3.5.1.2. Associations à base d'artémisinine**

C'est une combinaison ou association de deux antipaludiques dont l'un des composants est forcément un dérivé de l'artémisinine ou l'artémisinine lui-même et l'autre un antipaludique habituellement utilisé en monothérapie.

Comme dans la prise en charge des affections bactériennes, l'association de plusieurs molécules antipaludiques vise à améliorer l'efficacité du traitement, dans certains cas par synergie potentialisatrice, en rendant de toute façon hautement improbable l'émergence de résistance (Diakite, 2008). Idéalement le régime thérapeutique doit être sûr et bien toléré (pas d'effets secondaires sérieux, ni d'évènements fatals adverses), stable (pas de problème de stockage en terme d'humidité et de température), efficace (taux de guérison au moins égale à 75-90%), pouvant être administré par voie orale, rectale ou parentérale (régime utilisable en toute circonstance), disponible en monodose (pour minimiser l'inobservance du traitement, possibilité d'administration par des illettrés à domicile, ou à défaut un régime simple court ≤ 3 jours), efficace contre tous les stades de développement du parasite (l'effet gamétocytocide pourrait réduire la transmission si le médicament est utilisé à large spectre), non susceptible d'induire la résistance (le médicament doit en tout cas minimiser le développement ou le taux d'acquisition de la résistance par les parasites) et accessible à tous (coût et disponibilité géographique) (Diakite, 2008).

### **3.5.1.3. Principe des CTA**

C'est d'associer un dérivé de l'artémisinine à action rapide, mais de courte durée avec un autre partenaire à action lente mais prolongée (7 jours).

Les principes actifs contenus dans le régime doivent avoir une demi-vie d'élimination pareille et ne présenter aucune autre interaction pharmacocinétique négative significative sur le plan clinique (parce que les parasites exposés à des concentrations décroissantes d'un des

principes actifs en combinaison sont plus susceptibles d'être transmis si la sélection pour la résistance à ce principe actif prenait place). Ils doivent avoir un mode d'action indépendant (réduire la chance de survenue de résistance), agir synergistiquement *in-vivo* (augmente l'efficacité d'une seule goutte), et être produits sous forme de combinaison de dose fixe dans une seule formulation (éviter le risque qu'une seule part du médicament associé à été pris). Quand combinés, le potentiel d'être nocif, causé en combinant les effets secondaires de plus d'un principe actif ou en générant de nouveaux effets secondaires à travers une interaction médicamenteuse imprévisible doivent être pesé contre le bénéfice potentiel de la combinaison (Diakite, 2008).

#### **3.5.1.4. But des CTA**

- Augmenter l'efficacité thérapeutique des deux médicaments
- Raccourcir la durée du traitement
- Retarder l'apparition de la résistance des parasites à cette combinaison.

Donnés seuls, les dérivés de l'artémisinine doivent être administrés pendant 7 jours pour avoir un taux de succès optimum. Les régimes de cinq jours donnent un taux de guérison faible et les régimes de trois jours d'artémisinine en monothérapie sont associés à un taux d'échec très élevé (40-80%) chez les patients sans immunité (Tran et al., 2004).

Combiner un dérivé d'artémisinine avec un autre antipaludique qui est lentement éliminé permet le traitement complet sur trois jours et est maintenant considéré comme le traitement de choix du paludisme à *P. falciparum* (WHO, 2006, Dondorp and Day, 2007). Deux moyens peuvent être utilisés afin de protéger les dérivés de l'artémisinine en les associant avec une molécule : d'une demi-vie supérieure à 24 heures encore efficace en monothérapie.

#### **3.5.2. Vaccins antipalustres**

Depuis l'avènement de la biologie moléculaire et les techniques de génie génétique, plusieurs scientifiques se sont intéressés à la recherche du vaccin pouvant immuniser l'homme contre l'infection palustre (Abdulla et al., 2008, Sagara et al., 2009) . Cette volonté est rendue difficile par la complexité du génome parasitaire et la mauvaise compréhension du mécanisme naturelle de l'immunité antiparasitaire (Hanson and Silfverdal, 2008, Vanderberg, 2009) . En matière de paludisme, le vaccin peut être de trois types (Miller and Hoffman, 1998, Carvalho et al., 2002, Greenwood, 2005, Hill, 2006) .

- **les vaccins antisporozoïtes** sont conçus pour prévenir l'infection. Ces vaccins sont déterminés pour stopper le cycle de vie du parasite à partir de la progression des sporozoïtes ou des stades hépatiques.
- **les vaccins contre les stades sanguins asexués** visent à atténuer les manifestations graves et compliquées de la maladie. Ces vaccins pourraient permettre de réduire la morbidité et la mortalité du paludisme.
- **les vaccins qui agissent en bloquant la transmission**, conçus pour arrêter le développement du parasite chez le moustique et pour réduire ainsi ou arrêter la transmission de la maladie.

Ainsi, des candidats vaccinaux ont été proposés à travers des études immunogénétiques sur le génome humain et parasitaire. Le plus connu et le plus avancé est le RTS,S/AS02A, développé par les laboratoires « *GlaxoSmithKline Biologicals* » et le « *Walter Reed Army Institute of Research* » des États-Unis d'Amérique.

Après cette revue de la littérature, nous avons suivi la méthodologie suivante.

## **4. Matériel et Méthodes**

### **4.1. Cadre d'étude**

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche sur l'immunité innée et acquise du paludisme au Mali. Ce projet est une collaboration entre le centre de recherche et de formation sur le paludisme (MRTC) de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS) le laboratoire de recherche sur le paludisme et les vecteurs de l'Institut national d'allergie et de maladies infectieuses des Instituts Nationaux de la sante des Etats-Unis d'Amérique (LMVR/NIAID/NIH). Elle s'est déroulée dans les villages de Kenieroba, Bozokin et Fourda dans la commune rurale de Bancoumana (figure 7b).

#### **- Village de Keniéroba**

Ancien village de bataille situé à 74 Km au sud-ouest de Bamako sur la route de Kangaba. Refondé il y a plus de cent ans après son premier déclin par Mare Famissa KEITA, qui fut réunir ses frères dispersés, dans la terre de leur ancêtre Kenieroba. Il compte 2079 habitants (recensement MRTC/FMPOS, 2008) composé essentiellement de malinké, de peulh et de bambara.

#### **- Village de Fourda**

C'est un hameau de pêche situé à 3Km au sud-ouest de Kenieroba. Il fut fondé par les frères SOGORE dans le but de faire la pêche. Il s'agit de Kalifa ; de Sinimba, de Fodé, de Mamady et de Drissa. Fourda compte 269 habitants (recensement MRTC/FMPOS, 2008) dont la majorité est Somono (malinké) en plus de quelque Bambara et peuhl.

Kenieroba et Fourda partagent une école fondamentale, une medersa et un centre de santé ou est base notre équipe de recherche.

#### **- Village de Bozokin**

C'est un hameau de pêche du village de Bancoumana situé à 7 Km au sud-est. Il a été fondé par Soungalo TRAORE il y a plus de 100 ans. Il est essentiellement habité les Bozo (Konta) convertis en Konate par le langage mandingue. Il compte 247 habitants (recensement MRTC/FMPOS, 2008). Les Malinké constituent le groupe ethnique majoritaire, suivi par les

Peuhl et les Dogon. Le village utilise le centre de sante communautaire et l'école fondamentale de Bancoumana.

Ces trois villages se situent dans une zone climatique soudanoguinéenne (figure 7a et figure 7b). Deux grandes saisons se succèdent dans cette zone : la saison des pluies de juin à octobre et la saison sèche de novembre à mai avec cependant une courte saison de transition que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de *fôbònda*. Elle est représentée par un adoucissement voire un rafraîchissement des températures par l'arrivée des côtes atlantiques de l'harmattan. Elle s'étale de novembre à janvier.

L'habitat est de type traditionnel. Il est constitué de cases rondes et rectangulaires, en terre battue, aux toitures en chaumes coniques. Quelques maisons ont des toits en tôle. Ces différents types de maisons encourageant le repos des moustiques, favorisent une densité et une agressivité anophélienne élevées. L'environnement physique des villages est propice à la transmission du paludisme. Les villages sont situés dans une grande plaine qui s'étend jusqu'au fleuve Niger. La plaine présente de nombreuses retenues d'eau pendant la saison des pluies. C'est une plaine de riziculture. Les retenues d'eau avec des crevasses naturelles du sol peuvent être des gîtes larvaires potentiels. Pendant la saison des pluies, il existe des cultures intra domiciliaires et une prolifération d'herbes sauvages dans le village, contribuant ainsi à augmenter l'agressivité des moustiques.

La température la plus élevée se situe à 40°C au mois de mai et la plus basse est voisine de 18°C au mois de décembre-janvier. La température moyenne annuelle est autour de 23°C. D'une manière générale le climat y est assez agréable et la végétation est luxuriante.

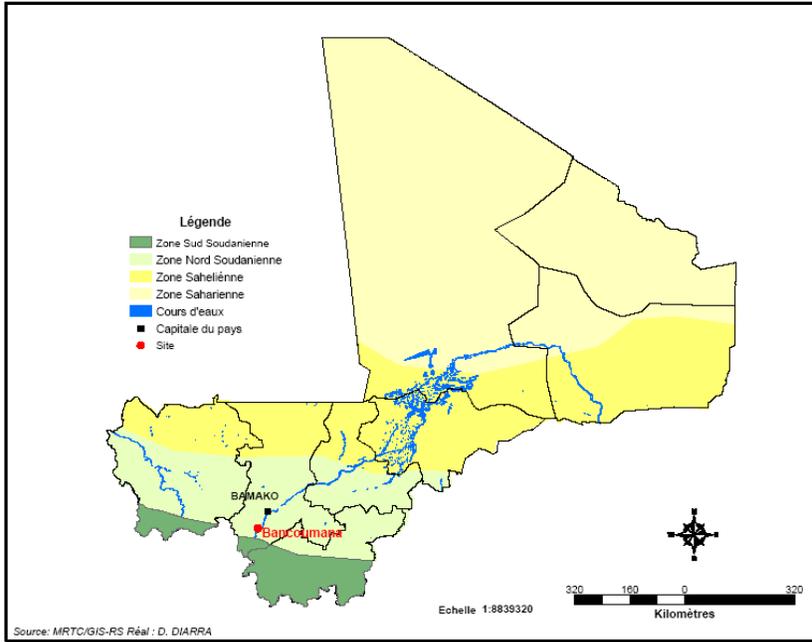


Figure 7a: Site d'étude

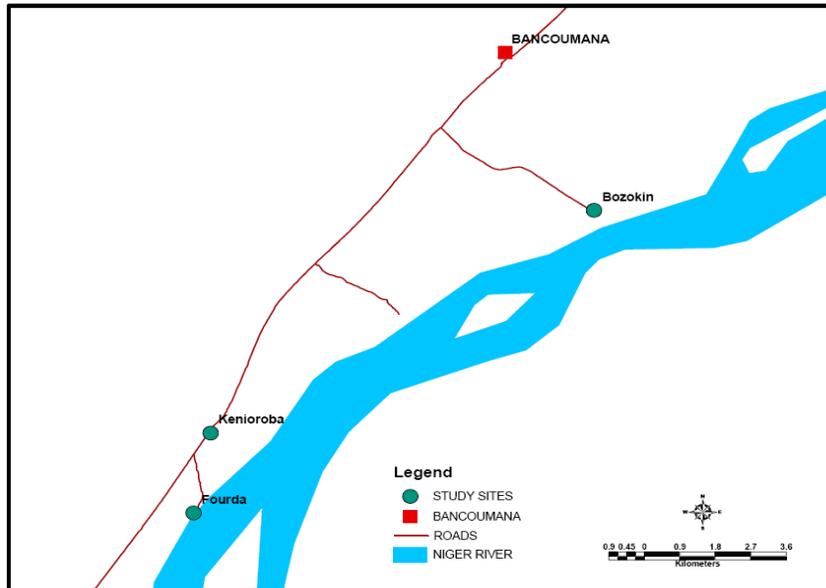


Figure 7b: Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana  
Source : Unité GIS MRTC/FMPOS

#### 4.1.1. Situation géographique, climat et végétation

Située à 60 Km de Bamako (la capitale Malienne) en zone soudanoguinéenne, la commune rurale de Bancoumana est facilement accessible par la route nationale 15 (RN 15) Bamako –Kangaba. Elle est limitée au Nord par la commune rurale de Siby, à l'est par la commune rurale du Mandé, au Sud et au Sud-ouest par la commune rurale de Minindian, au Sud-est par les communes rurales de Niagadina et Kourouba (toutes situées sur la rive droite du fleuve Niger)

La principale formation végétale est une savane arborée (25% du terroir) avec quelques galeries forestières le long du fleuve Niger. On y distingue :

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

Le réseau hydrographique est dominé par le fleuve Niger.

La couverture végétale originale rencontrée sous un climat soudano-guinéen marque la transition entre la savane arborée et la forêt claire guinéenne. Ce type de végétation existe encore à l'état délictuel au niveau des bois sacrés et le long du fleuve Niger. Les feux de brousse, l'exploitation du bois de chauffage, les défrichements nécessaires aux cultures ont profondément dégradé cette végétation, devenant propice à l'implantation des moustiques.

La faune entomologique est constituée d'invertébrés et d'arthropodes. *Anopheles gambiae* et *A. funestus* abondent dans les villages où ils assurent la transmission du paludisme et de la filariose de Bancroft surtout en saison des pluies. Les similies transmettent l'onchocercose durant l'hivernage

tandis que les glossines (mouche tsé-tsé) transmettent la maladie du sommeil. *Anopheles gambiae* est le vecteur majeur du paludisme rencontré dans la zone d'étude.

#### **4.1.2. Infrastructures socio-sanitaires**

La commune dispose

- dans le domaine de l'éducation :

- Dix(10) écoles publiques dont 4 seconds cycles
- Trois (03) écoles communautaires
- Sept(07) medersas communautaires
- Dix Huit (18) centres d'alphabétisation.

-dans le domaine de la santé

- Quatre (04) dispensaires (Kenieroba, Djiguidala, Ouoronina et Niame)
- Cinq (05) maternités
- Huit (08) dépôts pharmaceutiques
- Un CSCOM : celui de Bancoumana
- Une pharmacie (officine privée)

#### **4.1.3. Activités socio-économiques et culturelles**

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

L'agriculture constitue la principale activité économique des populations. La plaine de Bancoumana est propice aux cultures vivrières et industrielles. Aux abords du village, dans les retenues d'eau (deux digues), la culture du riz (*Oryza sativa L.*, *O. glaberrima S.*) est très développée. Celle du sorgho (*Sorghum vulgare J.*), du mil (*Pennisetum typhoides Stapf. & Hubb*), du maïs (*Zea mays L.*), du haricot (*Vigna unguiculata L.*), du papayer (*Carica papaya L.*), de l'orange (*Citrus sinensis L.*) et du citron (*Citrus limonum* RISSO.) a lieu surtout dans les enlours des concessions ou dans des jardins.

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

L'élevage des ovins, des caprins et des bovins y est pratiqué comme une activité économique secondaire. On y retrouve aussi quelques équidés (ânes et chevaux) utilisés comme animaux de trait. La plupart des villageois thésaurisent leurs revenus dans l'élevage et dans les cultures industrielles.

La pêche est également pratiquée par les ethnies Bozo et Somono principalement dans les villages de Fourda et de Bozokin. L'artisanat local est peu développé (cordonnerie, forgerie, maçonnerie, poterie)

En dehors de la commercialisation des produits agricoles ; le commerce des produits de consommation courante y est pratiqué. Une foire hebdomadaire a lieu à Kenieroba chaque jeudi favorisant ainsi le phénomène d'automédication par la circulation facile des médicaments.

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

## **4.2. Population d'étude et échantillonnage**

La population d'étude était constituée par l'ensemble des sujets âgés de 6 mois à 17 ans résidants dans les villages de Keniéroba, Bozokin et Fourda dont le consentement libre et éclairé a été obtenu. Nous avons fait un échantillonnage exhaustif de l'ensemble des enfants vivants dans les trois villages.

## **4.3. Critères d'inclusion et de non inclusion**

### **4.3.1. Critères d'inclusion**

Tous les sujets répondant aux critères suivants étaient inclus dans l'étude :

- Résider dans les villages de Kenieroba, Fourda ou Bozokin
- accepter volontairement de participer à l'étude comme attestée par le consentement libre et éclairé obtenu des parents ou des tuteurs de l'enfant,
- être âgé de 6 mois à 17 ans.

### **4.3.2. Critères de non inclusion**

N'ont pas été inclus dans l'étude tous les sujets ne répondant pas aux critères d'inclusion entre autres :

- Etre résidant hors des villages de Keniéroba, Bozokin ou Fourba
- être âgé de moins de 6 mois ou de plus de 17ans,
- refuser volontairement de participer à l'étude,

#### **4.4. Méthodes de collecte et de gestion des données**

Les données ont été enregistrées sur des fichiers standards de rapport de cas (CRF). Elles ont été saisies sur Microsoft Excel 2003 et analysées avec les logiciels SPSS 12.0 et Epi Info version 6.0.

#### **4.5. Variables mesurées**

Les variables suivantes ont été mesurées :

- **Variables sociodémographiques** il s'agissait de l'âge, du sexe, de l'ethnie et du village
- **Variables biologiques** il s'agissait du taux d'hémoglobine, du type d'hémoglobine, de l'alpha-thalassémie, du groupe sanguin ABO et du déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD).

#### **4.6. Examens de laboratoires utilisés**

Chaque enfant inclus a fait l'objet d'un prélèvement sanguin au bout du doigt. Sur ce prélèvement, nous avons effectué les analyses suivantes (décrites en détails en annexe) portant sur :

- la détermination du type d'hémoglobine par l'appareil D-10 de Bio-Rad dont le principe est basé sur la chromatographie liquide de haute performance (cf. annexe, (Higgins et al., 2009));
- le taux d'hémoglobine a été mesuré avec l'appareil HemoCue 201<sup>+</sup> selon les spécifications du fabricant (cf. annexe, (Munoz et al., 2005));
- la détection de la suppression de 3,7kb d'alpha-thalassémie a été faite en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne nichée (*Nested-PCR*) afin d'identifier les enfants l'hétérozygote (- $\alpha/\alpha\alpha$ ) et homozygotes (- $\alpha/-\alpha$  ; cf. annexe ; (Williams et al., 2005c) ;
- le déficit en G6PD a été identifié en utilisant l'analyse du polymorphisme de restriction basé sur la longueur des fragments sur les produits d'ADN amplifiés par PCR (Guindo et al., 2007);
- le groupe sanguin ABO a été déterminé par le test d'agglutination en utilisant des kits commerciaux à base d'anticorps monoclonaux (*Linear Chemicals* ; cf. annexe ; (Fry et al., 2008)).

## 4.7. Définition des termes

Bien que les thalassémies soient profondément hétérogènes d'un point de vue génétique, certains termes cliniques sont disponibles pour décrire l'expression phénotypique des alpha-thalassémies. Parce que le locus du gène alpha est dupliqué chez l'homme, chaque individu normal porte 4 chaînes alpha gènes (par exemples,  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ).

### 4.7.1. Alpha-thalassémie

L' $\alpha^+$ -thalassémie se réfère à la suppression d'un des quatre gènes de l' $\alpha$ -globine. L' $\alpha^+$ -thalassémie se réfère à plus de 15 différentes mutations génétiques lesquelles entraînent la diminution de production de l' $\alpha$ -globine, généralement due à la suppression d'un des deux loci de chaînes alpha dans le chromosome affecté. Comme conséquence, il existe 3 formes générales d' $\alpha^+$ -thalassémie basées sur le nombre de gènes alpha hérités :

- L'héritage de 3 gènes normaux alpha ( $\alpha\alpha/\alpha^-$ ) a été appelé alpha-thalassémie minime, portage silencieux d'alpha-thalassémie, trait d'alpha-thalassémie-2 ou hétérozygotie pour  $\alpha^+$ -thalassémie. Les sujets affectés sont cliniquement normaux et peuvent aussi être hématologiquement normaux. Le diagnostic ne peut se faire de façon fiable que via l'analyse de l'ADN.
- L'héritage de deux gènes alpha normaux a été appelé alpha-thalassémie mineure ou trait d'alpha-thalassémie-1 et est due soit à l'hétérozygotie pour  $\alpha^0$ -thalassémie ( $\alpha\alpha/--$ ) ou homozygotie pour  $\alpha^+$ -thalassémie ( $\alpha^-/\alpha^-$ ). Ces sujets sont cliniquement normaux mais peuvent avoir une anémie avec la réduction du volume corpusculaire moyen en hémoglobine (MCH ou VCMH).
- L'héritage d'un gène alpha normal ( $--/--$ ) a été appelé alpha-thalassémie maladie parce que la formation d'HbH, laquelle est composée de tétramères de chaînes beta en excès. Ces patients ont un degré d'anémie modéré à sévère tout au long de leur vie, de degrés modestes d'érythropoïèse inefficace et une splénomégalie.
- Comme mentionné ci-dessus, l'héritage d'aucun gène alpha ( $--/--$ ) est incompatible avec la vie extra-utérine car le fœtus affecté sera incapable de fabriquer un type

d'hémoglobine normalement produits après la naissance (par exemple, l'hémoglobine A, F et A2), tous vont nécessiter la capacité à produire les chaînes d'alpha-globine.

- L' $\alpha^0$ -thalassémie se réfère à la suppression de deux gènes  $\alpha$ -globine :
  - o soit en **trans** (suppression d'un gène  $\alpha$ -globine sur chacun des différents allèles)
  - o ou en **cis** (suppression de deux gènes  $\alpha$ -globine sur le même allèle)

L' $\alpha^0$ -thalassémie se réfère à plus de 20 différentes mutations génétiques du locus alpha-thalassémie lesquelles entraînent la suppression des loci des deux chaînes alpha-globine sur le chromosome 16. Les patients qui portent les mutations du gène  $\alpha^0$  sur les deux chromosomes ne peuvent pas fabriquer les chaînes alpha et sont dès lors incapables de fabriquer tout type d'hémoglobine A, F ou A2. Cette condition est incompatible avec la vie extra-utérine.

#### Génotype de l' $\alpha$ -thalassémie

- **Homozygote** :  $\alpha^+$ -Thalassémies homozygote, caractérisée par 2 délétions (3.7Kb) en trans
- **Hétérozygote** :  $\alpha^+$ -Thalassémies hétérozygote, caractérisée par une seule délétion (3.7Kb)

**Normal** : sans délétion

Ces définitions sont utiles comme point de départ mais la classification des alpha-thalassémies peut être extrêmement complexe. Par exemple, deux formes générales de la maladie HbH a été reconnue, la forme délétionnelle et la forme non-délétionnelle. Dans cette dernière, les patients héritent seulement un seul gène alpha-globine (par exemple,  $(\alpha/-)$ ). Dans la forme non-délétionnelle, le patient a hérité deux gènes alpha-globine d'un seul parent (par exemple,  $(\alpha\alpha^*/-)$ , ou \* représente la chaîne alpha mutée). La maladie HbH tend à être plus sévère chez les patients avec la forme non-délétionnelle, due, au moins, en partie, à l'interférence avec la transcription de la chaîne alpha du gène par l'anormale.

Un autre exemple de la complexité potentielle de ces désordres, les individus peuvent avoir des combinaisons des mutations de gène alpha et beta-globine de diverse nature et sévérité (par exemple, les combinaisons ou variants d' $\alpha$  partir d'un parent  $\alpha\alpha^+$  de l'autre avec une ou plusieurs anomalies de la chaîne beta).

Tableau III: Résumé des caractéristiques principales des alpha-thalassémies

Type	Défaut génétique	Phénotype	Electrophorèse de l'hémoglobine
Porteur silencieux d' $\alpha$ -thalassémie ( $\alpha^+$ -thalassémie)	Suppression d'un seul gène alpha ( $-\alpha/\alpha\alpha$ )	Asymptomatique ; aucune anomalie hématologique	Normale
$\alpha^0$ -thalassémie mineure ( $\alpha^0$ -thalassémie)	Suppression de deux gènes alpha en trans ( $-\alpha/-\alpha$ ) ou en cis ( $--/\alpha\alpha$ )	Asymptomatique ; érythrocytes, microcytose, hypochromie mineure à modérée	Normale
Maladie HbH	Suppression de trois gènes alpha	Anémie microcytique, anémie sévère épisodique	Hb Bart ( $\gamma_4$ ) HbH ( $\beta_4$ )
Hémoglobine Bart (Hydrops fetalis*)	Suppression de quatre gènes alpha	Hydrops fetalis	HbH, Hb Bart

\*une condition dans laquelle le fœtus ou le nouveau-né accumule des fluides, entraînant des bras et des jambes ballonnés et des difficultés respiratoires.

#### 4.7.2. Beta-thalassémie

- $\beta^{wt}$  représente l'allèle normal  $\beta$ -globine avec une production normale de chaîne.
- $\beta^+$  dénote des mutations du gène  $\beta$ -globine qui diminue la production de la chaîne  $\beta$ -globine mais n'élimine pas entièrement sa production.
- $\beta^0$  dénote des mutations du gène  $\beta$ -globine qui abolit complètement la production de la chaîne  $\beta$ -globine à partir de l'allèle affecté.
- Les types d'hémoglobine retrouvés à l'électrophorèse sont :
  - o hbA2, Hb adulte « mineure » ( $\alpha_2\delta_2$ ) ;
  - o HbF, Hb fœtale ( $\alpha_2\gamma_2$ )
- Les composés hétérozygotes sont des individus portant différentes mutations  $\beta^0$  ou  $\beta^+$  sur les deux allèles.

**Beta (0) thalassémie** – la  $\beta^0$ -thalassémie réfère à plus de 40 mutations génétiques différentes du locus de la beta-globine lesquelles entraînent l'absence de la production de la beta-globine. Les

patients homozygotes ou doubles heterozygotes pour les gènes beta (0)-thalassémiques ne peuvent pas fabriquer les chaînes beta et ainsi, sont incapables de fabriquer toute hémoglobine A.

**Beta (+)-thalassémie** – la  $\beta$ -thalassémie majeure est le terme appliqué aux patients qui n'ont soit aucune production effective (comme dans la beta (0) thalassémie) ou une production très limitée de la beta-globine. Ce sont des patients originellement décrits par Cooley (anémie de Cooley). Commençant durant la première année de la vie, ces patients ont une anémie profonde et dépendante d'une transfusion sanguine tout au long de la vie, une hépato-splénomégalie et des déformations du squelette due à l'expansion de la moelle osseuse ; ils sont sujets à des infections et à des fractures et sans traitement approprié, meurent durant l'adolescence d'un syndrome hyperferrémique.

**Beta thalassémie mineure** – la beta thalassémie mineure, appelée aussi le trait de beta-thalassémie, est le terme appliqué aux heterozygotes qui ont hérités un seul gène conduisant à une production réduite de beta-globine. De tels patients sont asymptomatiques, peuvent avoir seulement une anémie mineure et sont généralement découverts quand la formule leucocytaire a été effectuée pour autres raisons.

**Beta-thalassémie intermédiaire** – la beta-thalassémie intermédiaire est le terme appliqué aux patients ayant une maladie de sévérité intermédiaire telle que ceux qui ont des composés hétérozygotes de deux variants thalassémiques. De tels patients peuvent avoir des anomalies du squelette et de l'hépatosplénomégalie observée dans la thalassémie majeure. Cependant, leur concentration en hémoglobine va généralement de 5 à 10 mg/dL et ils ne nécessitent généralement des transfusions seulement quand ils ont un événement intercurrent, telle qu'une infection, laquelle affaiblit l'érythropoïèse. Leurs symptômes cliniques peuvent ne pas être apparents jusqu'à bien après la première année de vie.

**L'anémie** dans la beta-thalassémie est généralement causée par la présence de deux phénomènes inter liés : la mort des globules rouges précurseurs à l'intérieur de la moelle osseuse (érythropoïèse inefficace, appelée aussi hémolyse intra médullaire) et la destruction élevée des globules rouges circulants (anémie hémolytique). Chacun de ces phénomènes peut être décrit séparément, bien qu'à la fois sont en fin de compte attribuable au déséquilibre de synthèse de la chaîne beta-globine.

Tableau IV: Résumé des caractéristiques principales des beta-thalassémies

Type	Génotype	Phénotype	Electrophorèse de l'hémoglobine
<b><math>\beta</math>-thalassémie mineure</b>	Hétérozygote : $\beta^+/\beta^{wt}$ , $\beta^0/\beta^{wt}$	Porteurs asymptomatique, anémie modérée microcytique (Hb > 10 g/dL)	HbA2 élevée et HbF fréquente
<b><math>\beta</math>-thalassémie majeure</b>	Composé hétérozygote : $\beta^+/\beta^0$ , $\beta^+/\beta^+$ (deux mutations $\beta$ distinctes). Homozygote : $\beta^0/\beta^0$ , $\beta^+/\beta^+$ (deux mutations identiques)	Anémie sévère, dépendante de la transfusion (Hb < 7 g/dL)	HbA2 élevée, élévation prononcée d'HbF
<b><math>\beta</math>-thalassémie intermédiaire</b>	Homozygote : $\beta^+/\beta^+$ composé hétérozygote : $\beta^+/\beta^+$ , $\beta^+/\beta^0$	Intermédiaire (Hb 7 – 10g/dL)	Variable

#### 4.7.3. Classification des variants G6PD

L'organisation mondiale de la santé a classé les différents variants du G6PD selon la magnitude du déficit enzymatique et la sévérité de l'hémolyse. Les classes IV et V n'ont aucune signification clinique.

**Variants de classe I**, lesquels sont rares, ont un déficit sévère enzymatique (moins de 10% du normal) et ont une anémie chronique hémolytique.

**Variants de classe II** ont aussi un déficit enzymatique sévère mais, il y a généralement qu'une hémolyse intermédiaire.

**Variants de classe III** ont un déficit enzymatique modéré (10 à 60% du normal) avec une hémolyse intermédiaire généralement associée à l'infection ou aux médicaments.

**Variants de classe IV** n'ont aucun déficit enzymatique ou hémolyse.

**Variants de classe V** ont une activité enzymatique élevée.

**Le type sauvage d'enzyme** – l'enzyme normale de type sauvage, le G6PD B, est retrouvée principalement chez les caucasiens, les asiatiques et une majorité de noirs. Il a une activité enzymatique catalytique normale et n'est pas associé à l'hémolyse (Classe IV). Un variant fréquent est le **G6PD A<sup>+</sup>** lequel est retrouvé chez 20 à 30% des africains. Il diffère du G6PD B par une substitution d'un seul acide-aminé, une asparagine par l'acide aspartique à la position 126 et a une grande mobilité électrophorétique (la lettre A et B réfèrent aux mobilités électrophorétiques). G6PD A<sup>+</sup> a des propriétés catalytiques normales et ne cause pas d'anémie.

**Variante G6PD A<sup>-</sup>** - un autre variant G6PD, G6PD A<sup>-</sup>, est l'enzyme responsable de la sensibilité à la primaquine chez les noirs, et est le variant le plus fréquent associé à l'hémolyse intermédiaire ou modérée (classe III). Il est retrouvé chez 10 à 15% des africains-américains, et avec des fréquences similaires en Afrique de l'Ouest et du Centre.

G6PD A<sup>-</sup> a une mobilité électrophorétique identique à celle du G6PD A<sup>+</sup>. Cependant, le G6PD A<sup>-</sup> est une enzyme instable et est sans activité catalytique, laquelle est presque normale dans la moelle osseuse et dans les réticulocytes, diminue remarquablement dans les globules rouges âgés due au catabolisme élevé (le + et - dénotent l'activité enzymatique).

Tous les cas de G6PD A<sup>-</sup> ont une mutation au nucléotide 376 (A → G), laquelle aussi est la substitution nucléotidique caractéristique du G6PD A<sup>+</sup>. Cependant, les variants G6PD A<sup>-</sup> ont une seconde mutation, laquelle est généralement au nucléotide 202 (G → A) et, moins souvent, au nucléotide 680 (G → T) ou au nucléotide 968 (T → C). Les mutations sont ensemble proches dans la structure tridimensionnelle de la protéine.

### **Génotypes de G6PD**

- **normal** : génotype A<sup>+</sup>, une mutation en position de la séquence nucléotidique (l'adénine est remplacée par la guanine), avec une activité enzymatique de 80% sans conséquence clinique, considéré, dans le contexte africain comme normal.
- **filles homozygotes** : les filles de génotype A<sup>-</sup>, une mutation en position 202 de la séquence nucléotidique (la guanine est remplacée par l'adénine) avec une activité enzymatique de 12%, c'est la forme symptomatique du déficit en G6PD.
- **filles hétérozygotes** : les filles de génotype A<sup>-</sup> avec un chromosome X portant une mutation.
- **garçons hémizygotes** : les garçons de génotype A<sup>-</sup> avec le chromosome X portant une mutation

#### **4.7.4. Variants de la beta-globine (HbS et HbC)**

- **L'allèle HbS** est une substitution de l'acide glutamique pour la valine à la position 6 de la chaîne beta globine
- **L'allèle HbC** est une substitution de l'acide glutamique pour la lysine à la position 6 de la chaîne beta globine

#### **4.7.5. Anémie**

Nous avons utilisé la définition des différents degrés d'anémie en Afrique selon Newton et Krishna (Newton and Krishna, 1998).

- **Anémie sévère** : un taux d'hémoglobine < 7g/dl
- **Anémie modérée** : un taux d'hémoglobine compris entre 7 et 9,9g/dl
- **Absence d'anémie** : un taux d'hémoglobine  $\geq$  10g/dl.

#### **4.8. Considérations éthiques et déontologiques**

Le protocole de recherche a été soumis à l'approbation du comité d'éthique institutionnel de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université de Bamako ainsi qu'aux instituts nationaux de santé des Etats-Unis d'Amérique. Nous avons également travaillé selon les bonnes pratiques de recherche clinique sur l'homme et selon les bonnes pratiques de laboratoire telles que énoncés dans les conventions internationales (déclaration d'Helsinki, Conférence internationale d'harmonisation des bonnes pratiques de recherche biomédicale).

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

#### **4.8.1. Risques et effets secondaires potentiels.**

##### **4.8.1.1. Effets secondaires des prélèvements sanguins**

Le protocole soumis aux comités d'éthique a été rigoureusement appliqué par un personnel médical et paramédical qualifié et professionnel. L'équipe de recherche a respecté les lignes directrices concernant les bonnes pratiques en matière de recherche (bonne pratique clinique et bonne pratique de laboratoire). Afin de prévenir toute contamination induite par les instruments souillés de sang, chaque prélèvement sanguin a été effectué à l'aide d'un matériel stérile à usage unique, le port de

gants à usage unique et nous avons nettoyé le doigt de l'enfant avec de l'alcool à 70% avant de faire le prélèvement sanguin. Chaque fois qu'un gant était souillé, il était remplacé immédiatement.

#### **4.8.1.2. Risques contre bénéfices**

Le rapport entre le risque et le bénéfice a favorisé la participation dans cette étude. Le risque relatif a été l'inconfort occasionné par le prélèvement capillaire et la perte de temps lors des différents rendez-vous. Le grand bénéfice a été le traitement médical gratuit, le suivi clinique durant l'étude et la proximité d'un service médical permanent dont la population ne bénéficiait pas auparavant. En plus, le besoin de développer de nouvelles stratégies pour diagnostiquer et/ou retarder la chimiorésistance est une urgence au Mali et en Afrique sub-saharienne. Tout le matériel utilisé pour le traitement et les prélèvements (seringues, vaccino-styles, gants, lames, etc.) ont été mis à l'abri des enfants dans un puits et incinéré; évitant ainsi tout usage du matériel souillé par les enfants.

#### **4.8.2. Compensation**

Les modalités de compensation ont été discutées avec les villageois. Il leur a été notifié qu'un volontaire du protocole ne pourra pas recevoir directement de l'argent liquide pour sa participation libre et éclairée au protocole. Un autre aspect du bénéfice a été la prise en charge par le projet de tous les cas de paludisme simple et compliqué. Les autres pathologies des volontaires de l'étude ont été également prises en charge par le projet. Le centre de santé de Kenieroba a reçu une compensation pour les pertes de recettes occasionnées par la prise en charge des enfants du protocole.

#### **4.8.3. Diffusion des résultats**

A la fin de chaque saison de transmission du paludisme, nous avons présenté l'état de l'étude aux villageois et aux bailleurs (notamment les instituts nationaux de santé des USA) et au comité d'éthique de la FMPOS. A la fin de l'étude, un rapport sera présenté aux instituts nationaux de santé des USA par les investigateurs. Suite à la validation par les investigateurs de l'ensemble des résultats de cette étude, les éléments clés des résultats seront documentés et remis aux dirigeants de la communauté de Kenieroba et de Bancoumana et au Programme National de Lutte contre le Paludisme du Mali.

Les résultats de cette étude seront présentés au cours des réunions scientifiques nationales et internationales, et seront publiés dans des revues scientifiques. Cependant, l'équipe de recherche

garantit la confidentialité des informations recueillies sur les volontaires qui ne seront pas accessibles en dehors des investigateurs de l'étude.

#### **4.9. Gestion et analyse des données**

Les données ont été collectées sur le terrain dans les trois villages au moyen d'un questionnaire individuel standardisé, élaboré conformément aux objectifs de l'étude. Il comporte essentiellement les variables pertinentes à mesurer (Cf. questionnaire). Les dossiers individuels ont été classés dans des chemises individuelles en plastique et gardés dans une cantine métallique sous la responsabilité du chef d'équipe. Les fiches individuelles d'enquête, les lames porte-objets, les confettis portaient le même numéro pour chaque enfant malade à travers lequel il a été identifié. Les lames préparées ont été rangées par ordre dans des boîtes d'arrangement. Les confettis ont été placés dans des enveloppes individuelles portant également le même numéro que les lames et gardés dans une cantine métallique.

Les fiches d'enquête individuelle et les différents prélèvements sanguins ont été systématiquement vérifiés sur le terrain à la fin de la journée et complétées au besoin, rangées par ordre dans des chemises cartonnées et stockées dans une cantine métallique.

Afin de réduire significativement des erreurs de saisie des données, nous avons utilisé le programme automatique de contrôle de qualité "module check" et le système de double saisie.

Les données ont été saisies doublement, nettoyées et analysées sur micro-ordinateur à l'aide du logiciel Microsoft Excel et analyse avec le logiciel SPSS version 12.0 et EPI-INFO version 0.6. Les graphiques ont été réalisés sur MS Excel, MS Word et sur *Graphic path Prism 5*. Le test de Chi carré avec un seuil de signification fixé à 5% a été utilisé pour vérifier l'hypothèse de recherche ainsi que le lien entre les variables croisées. Nous avons utilisé le test de probabilité exacte de Fisher lorsque les conditions d'application du Chi carré normal n'ont pas été remplies c'est-à-dire une valeur attendue inférieure à 5. Cette méthodologie m'a permis d'atteindre les résultats suivants.

## 5. Résultats

### 5.1. Résultats globaux

Au total, 1244 enfants ont été inclus dans l'étude avec un sexe ratio égal à 1,0.

La population d'étude comprenait 150 enfants de Bozokin (12,0%), 150 enfants de Fourda (12,0%) et 944 enfants de Kenieroba (76%). Elle était principalement composée de l'ethnie Malinke (86,0%), Bambara (4,5%), Peulh (7,4%), Sarakolé (1,6%) et Dogon (0,3%).

Le groupe O a été plus prévalent avec 40,6%, le type Hb AS a été plus prévalent (13,80%) que le type d'Hb AC (5,03%), l'alpha-thalassémie et le déficit en G6PD ont été respectivement observé chez 25,4% et 17,6% et l'anémie a été observé chez 42,1% de la population d'étude. Globalement 27,7% des sujets étaient dépourvu de tous polymorphisme érythrocytaire génétique protecteur contre le paludisme grave.

### 5.2. Caractéristiques sociodémographiques

Tableau V: Répartition de la population d'étude selon le village, le sexe et les groupes d'âge

	Villages			
	Fourda n (%)	Kenieroba n (%)	Bozokin n (%)	Total (%)
<b>Féminin</b>	76 (50.7)	471 (49.9)	75 (50.0)	50,0
<b>groupe d'âge (ans)</b>				
<b>0 - 5</b>	66 (44.0)	346 (36.7)	71 (47.3)	42,7
<b>6 - 10</b>	45 (30.0)	313 (33.1)	36 (24.0)	29,0
> 10	39 (26.0)	285 (30.2)	43 (28.7)	28,3

Le sexe ratio dans l'étude était de 1,0. Globalement, les enfants de moins de 5 ans constituaient 42,7%. Cette proportion atteignait 47,3% à Bozokin contre 36,7% à Kenieroba.

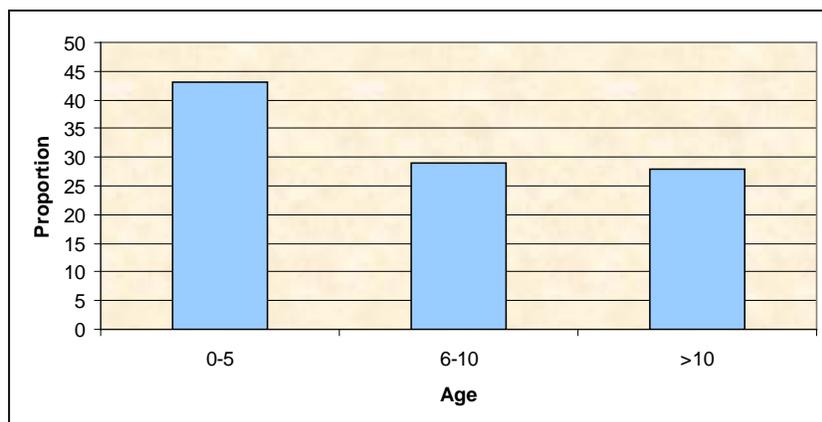


Figure 8 : Répartition de la population d'étude selon les groupes d'âge

Sur l'ensemble, les enfants de moins de 5 ans étaient majoritaires avec 43,0 % tandis que ceux de 11-17 ans constituaient 28,9%.

Tableau VI: Répartition des sujets selon le groupe ethnique

Ethnies	Effectifs	Fréquence (%)
<b>Bambara</b>	49	4,0
<b>Dogon</b>	4	0,3
<b>Peulh</b>	97	7,8
<b>Malinké</b>	1074	86,3
<b>Sarakolé</b>	20	1,6
<b>Total</b>	1244	100

L'ethnie malinké était majoritaire avec 86,3%, suivi par l'ethnie Peulh (7,6%) et l'ethnie Bambara (3,9%).

### 5.3. Résultats analytiques

Tableau VII: Répartition du groupe sanguin ABO selon l'ethnie

Groupe Sanguin	Ethnie					Total (n)
	Bambara n (%)	Dogon n (%)	Peulh n (%)	Malinké n (%)	Sarakolé n (%)	
<b>A</b>	15 (30,6)	1 (25)	34 (35,1)	332 (31,0)	1 (5)	<b>383</b>
<b>AB</b>	2 (4,1)	0	8 (8,2)	66 (6,1)	0	<b>76</b>
<b>B</b>	11 (22,4)	2 (50)	20 (20,6)	241 (22,4)	6 (30)	<b>280</b>
<b>O</b>	21 (42,9)	1 (25)	35 (36,1)	435 (40,5)	13 (65)	<b>505</b>
<b>Total</b>	<b>49 (100)</b>	<b>4 (100)</b>	<b>97 (100)</b>	<b>1074 (100)</b>	<b>20 (100)</b>	<b>1244</b>

Le groupe O était le plus fréquent dans toutes les ethnies excepté l'ethnie Dogon. Le groupe sanguin AB était absent chez les Dogons et les Sarakolés et était en faible proportion dans les autres groupes ethniques. Nous n'avons pas observé de différence Statistiquement significative entre la distribution du groupe sanguin ABO et l'ethnie  $P > 0.05$

Tableau VIII: Répartition du type d'hémoglobine selon l'ethnie

Type d'hémoglobine	Ethnie					Total (n)
	Bambara n (%)	Dogon n (%)	Peulh n (%)	Malinké n (%)	Sarakolé n (%)	
<b>AA</b>	37 (75,5)	4 (100)	79 (81,5)	830 (77,30)	20 (100)	<b>970</b>
<b>AC</b>	8 (16,4)	0	10 (10,3)	62 (5,80)	0	<b>80</b>
<b>AS</b>	3 (6,1)	0	8 (8,2)	173 (16,12)	0	<b>184</b>
<b>CC</b>	0	0	0	1 (0,09)	0	<b>1</b>
<b>SC</b>	1 (2,0)	0	0	7 (0,60)	0	<b>8</b>
<b>SS</b>	0	0	0	1 (0,09)	0	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>49 (100)</b>	<b>4 (100)</b>	<b>97 (100)</b>	<b>1074 (100)</b>	<b>20 (100)</b>	<b>1244</b>

Les ethnies Dogon et Sarakolé n'avaient aucun cas d'anomalie d'hémoglobine. Par contre, chez les Malinkés 0,1% (HbC et d'HbS homozygotes, respectivement) et 0,6% HbSC. La forte prévalence

d'HbAC était observée chez les Bambara (16,4%) alors que celle d'HbAS était observée chez les Malinke (16,12%).

Tableau IX: Répartition du Génotype de l' $\alpha$ -Thalassémie selon le village

$\alpha$ -thalassémie	Villages			
	Fourda n (%)	Kenieroba n (%)	Bozokin n (%)	Total (%)
Type sauvage	120 (80.0)	652 (69.1)	112 (74.7)	74,6
Homozygote	1 (0.7)	21 (2.2)	4 (2.6)	1,8
Hétérozygote	29 (19.3)	271 (28.7)	34 (22.7)	23,6

La prévalence globale de l' $\alpha$ -thalassémie était de 25,4%. Le phénotype hétérozygote de l' $\alpha$ -thalassémie était la plus représenté dans les trois villages après le phénotype normal ( $p < 0.01$ ). La prévalence globale de  $\alpha$ -thalassémie a été de 25.3% à Bozokin, 20% à Fourda et 30,9% à Kenieroba ( $p > 0,05$ ).

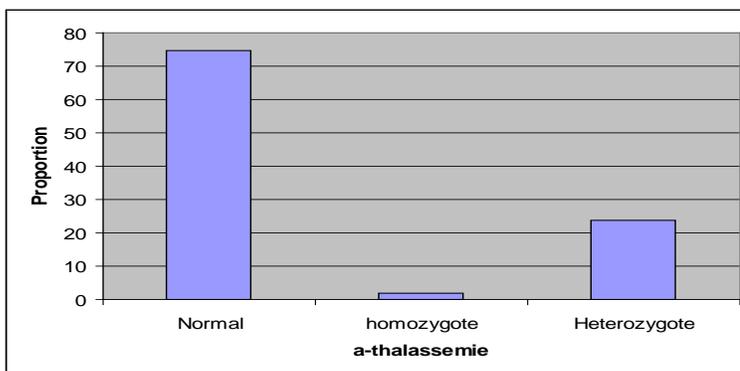


Figure 9: Répartition de la population d'étude selon le génotype de l' $\alpha$ -thalassémie

Globalement, l'alpha-thalassémie hétéro- et homozygote a été identifié, respectivement, chez 23.6% et 1.8% des enfants.

Tableau X: Répartition du Groupe Sanguin ABO selon le village

Groupe sanguin ABO	Villages			
	Fourda n (%)	Kenieroba n (%)	Bozokin n (%)	Total (%)
<b>A</b>	67 (44,7)	254 (26,9)	63 (42,0)	37,9
<b>B</b>	17 (11,3)	234 (24,8)	24 (16,0)	17,4
<b>AB</b>	13 (8,7)	64 (6,8)	3 (2,0)	5,8
<b>O</b>	53 (35,3)	392 (41,5)	60 (40,0)	40,6

Le groupe O était le plus représenté avec 40,6% de l'échantillon d'étude, les groupes A et B ont été retrouvés chez respectivement 37,9% et 17,4% de l'échantillon étudié, le groupe AB était le moins représenté avec 5,8%. Il existe une différence statistique significative quand à la distribution des groupes sanguins ABO dans la population d'étude ( $p < 0,01$ ).

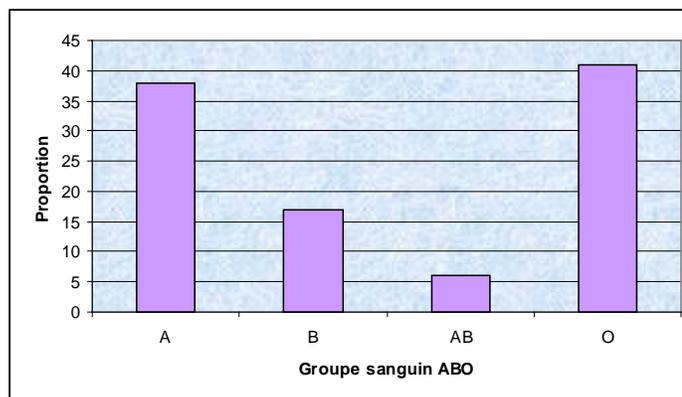


Figure 10: Répartition des enfants selon le groupe sanguin ABO

Dans l'ensemble, le groupe sanguin O a été identifié chez ~39% des enfants, suivi du groupe sanguin A (36,0%) alors que le groupe sanguin AB ne constituait que 5,3% de notre population d'étude.

Tableau XI: Répartition du type d'hémoglobine selon le village

Hémoglobine type	Villages			
	Fourda n (%)	Kenieroba n (%)	Bozokin n (%)	Total (%)
AA	129 (86.0)	720 (76.3)	118 (78.6)	77,9
AS	14 (9.3)	144 (15.3)	25 (16.7)	13,80
AC	7 (4.7)	73 (7.7)	4 (2.7)	5,03
SC	0 (0.0)	5 (0.5)	3 (2.0)	0,81
CC	0 (0.0)	1 (0.1)	0 (0.0)	0,03
SS	0 (0.0)	1 (0.1)	0 (0.0)	0,03

Les sujets porteurs de l'HbAA étaient majoritaires avec 77,9% suivis par les sujets AS (13,80%), AC (5,03%) et SC (0,81%). Il a été observé un seul cas d'HbCC et HbSS dans l'échantillon étudié. Le trait HbC était plus prévalent à Kenieroba (7,7%) qu'à Bozokin (2,7%,  $p = 0.02$ ) et à Fourda (4,7%,  $p = 0.05$ ).

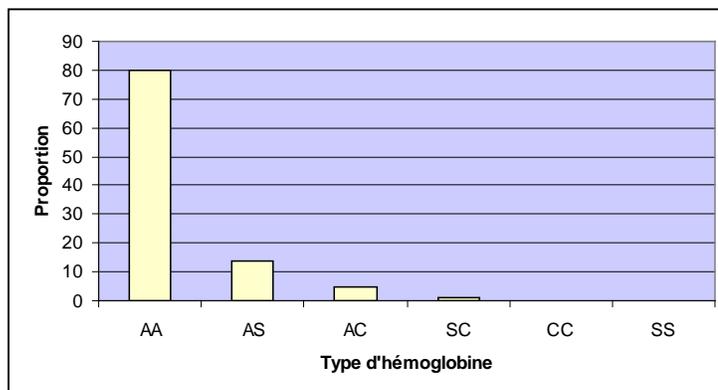


Figure 11: Répartition des enfants selon le type d'hémoglobine

Globalement, après le type d'Hb AA(80%), les sujets HbAS représentaient 13.8%, suivis par les sujets HbAC (5,0%) et les individus HbSC (<1%).

Tableau XII: Répartition du génotype de G6PD selon le village

Déficit en G6PD	Villages			
	Fourda n (%)	Kenieroba n (%)	Bozokin n (%)	Total %
Normal	120 (80.0)	760 (80.5)	130 (86.7)	82,4
Fille hétérozygote	20 (13.3)	115 (12.2)	9 (6.0)	10,5
Fille homozygote	2 (1.3)	10 (1.0)	0 (0.0)	0,8
Garçon hémizyote	8 (5.4)	59 (6.3)	11 (7.3)	6,3

Les sujets normaux étaient majoritaires avec 82,4%. Cependant, 10,5 % et 0,8 étaient des femmes hétéro- et homozygotes, alors que 6,3% était des mâles hémizyotes.

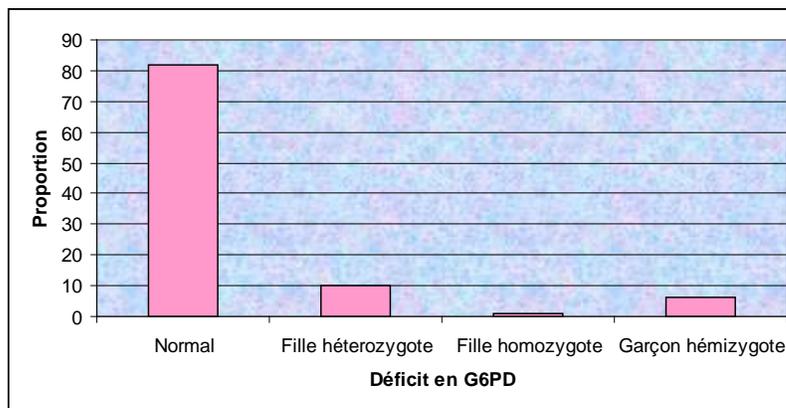


Figure 12: Répartition des enfants selon le déficit en G6PD

Dans la population d'étude, le déficit en G6PD hétéro- et homozygote a été identifié respectivement chez 10.5% et 0.8% des femmes. Par contre, le déficit en G6PD hémizyote était identifié chez 19% des mâles.

Tableau XIII: Répartition des sujets en fonction du nombre de variants génétiques

Nombre de variants génétiques	Villages			
	Fourda n (%)	Kenieroba n (%)	Bozokin n (%)	Total %
Normal	36 (24.0)	262 (27.8)	47 (31.3)	27,7
1 variant génétique	75 (50.0)	395 (41.8)	74 (49.4)	47,1
Au moins 2 variants génétiques	32 (21.3)	235 (24.9)	20 (13.3)	19,8
Au moins 3 variants génétiques	7 (4.7)	52 (5.5)	9 (6.0)	5,4

Sur l'ensemble, 47,1% des enfants portaient au moins un polymorphisme d'hémoglobine ou du globule rouge, 19,8% au moins deux polymorphismes et 5,4% au moins 3 polymorphismes connus être protecteurs contre le paludisme en Afrique. Le nombre d'enfants porteurs d'un polymorphisme génétique a été similaire à Bozokin et à Fourda (~50%) alors que le nombre d'enfants porteurs d'au moins 3 polymorphismes génétiques a été similaire dans les trois villages (~5%).

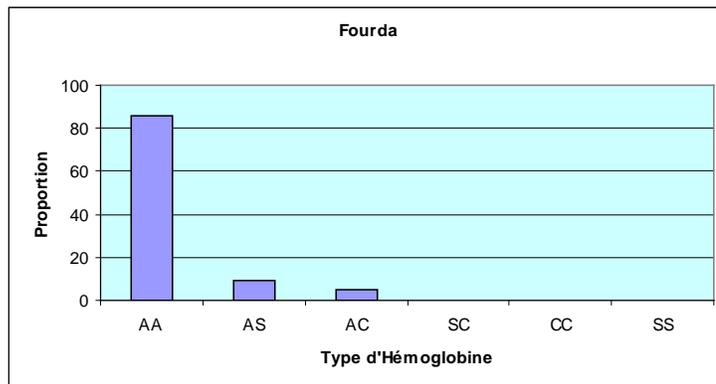


Figure 13: Répartition des enfants selon le type d'hémoglobine à Fourda

Le taux de portage des HbAS et HbAC était de 10% et 5% respectivement à Fourda. Aucun cas d'hémoglobinopathie homozygote n'a été observé.

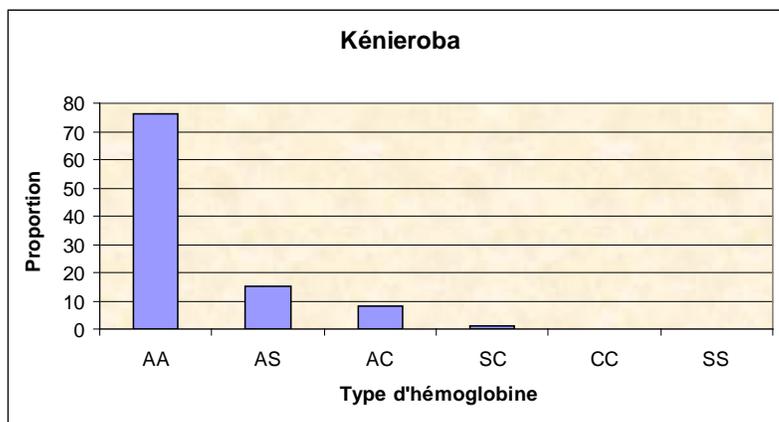


Figure 14: Répartition des enfants selon le type d'hémoglobine à Kenieroba

A Kenieroba, 13% des enfants sont porteurs d'hémoglobine S contre 7% d'hémoglobine C. nous n'avons pas observé de cas d'hémoglobinopathies homozygotes (HbSS ou d'HbCC)

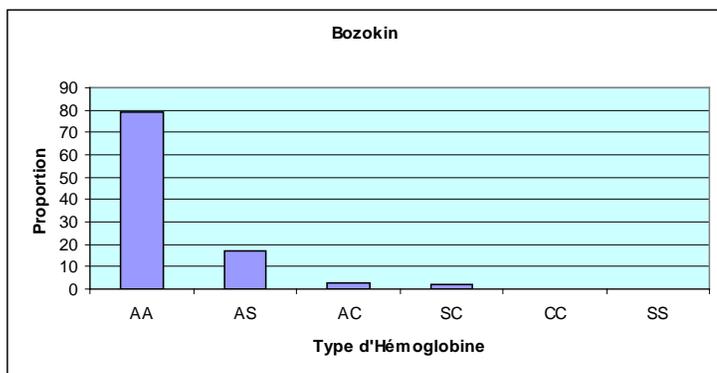


Figure 15: Répartition des enfants selon le type d'hémoglobine à Bozokin

Dix-sept pour cent des enfants sont porteurs d'HbAS à Bozokin contre ~2% d'HbAC et HbSC.

Tableau XIV: Taux moyen d'hémoglobine selon le groupe d'âge et le type de variants génétiques

Groupe d'âge (ans)	Génotype	Taux moyen d'hémoglobine $\pm$ écart-type	Fréquence	p
<b>0,6 – 5</b>	<b>*Tous les types sauvages</b>	<b>10,4 <math>\pm</math> 1,5</b>	<b>295</b>	<b>-</b>
	G6PD A <sup>-</sup> hétérozygote	10,0 $\pm$ 1,5	29	0,27
	G6PD A <sup>-</sup> homo- ou hemizygote	10,1 $\pm$ 1,5	22	0,40
	HbAS	10,2 $\pm$ 1,2	39	0,62
	HbC	10,1 $\pm$ 1,6	15	0,63
	$\alpha$ -thalassémie hétérozygote	10,3 $\pm$ 1,3	94	0,58
	$\alpha$ -thalassémie homozygote	10,3 $\pm$ 0,4	5	0,56
<b>6 – 10</b>	<b>*Tous les types sauvages</b>	<b>11,6 <math>\pm</math> 1,5</b>	<b>228</b>	<b>-</b>
	G6PD A <sup>-</sup> hétérozygote	11,7 $\pm$ 1,4	24	0,76
	G6PD A <sup>-</sup> homo- ou hemizygote	11,4 $\pm$ 1,3	11	0,56
	HbAS	11,6 $\pm$ 1,1	37	0,88
	HbC	11,5 $\pm$ 0,9	16	0,56
	$\alpha$ -thalassémie hétérozygote	11,8 $\pm$ 1,1	65	0,43
	$\alpha$ -thalassémie homozygote	11,3 $\pm$ 0,9	5	0,64
<b>11 – 17</b>	<b>*Tous les types sauvages</b>	<b>12,6 <math>\pm</math> 1,4</b>	<b>222</b>	<b>-</b>
	G6PD A <sup>-</sup> hétérozygote	12,7 $\pm$ 1,1	18	0,7
	G6PD A <sup>-</sup> homo- ou hemizygote	12,3 $\pm$ 1,1	8	0,56
	HbAS	12,7 $\pm$ 1,2	27	0,75
	HbC	12,0 $\pm$ 1,3	15	0,08
	$\alpha$ -thalassémie hétérozygote	12,0 $\pm$ 1,1	59	<b>0,001</b>
	$\alpha$ -thalassémie homozygote	11,2 $\pm$ 0,6	10	<b>0,02</b>

\*groupe de comparaison

Aucune différence n'a été observée dans le taux moyen d'hémoglobine chez les enfants de moins de 10 ans et cela quelque soit le type de variant génétique. Par contre, il existait une différence statistiquement significative du taux moyen d'hémoglobine chez les enfants alpha-thalassémiques hétérozygote ( $p = 0,001$ ) et homozygotes ( $p = 0,02$ ) et âgés entre 11 et 17 ans comparés aux enfants ne présentant aucun variant génétique.

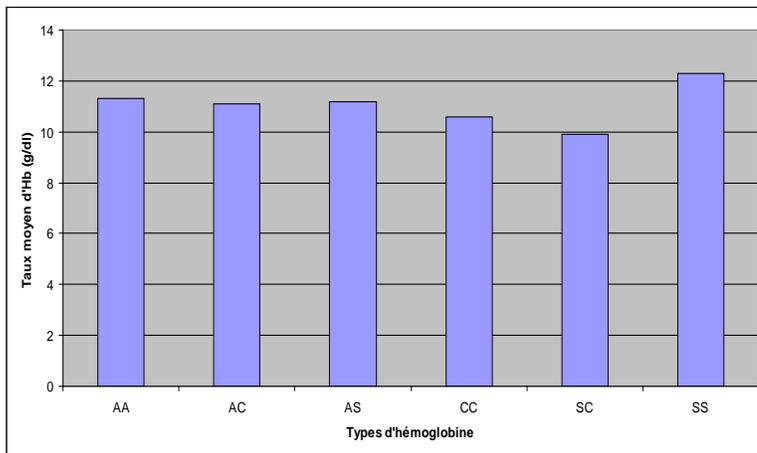


Figure 16: Répartition du taux moyen d'hémoglobine selon le type d'hémoglobine

Le taux moyen d'hémoglobine selon le type d'hémoglobine était supérieur sinon égale 10 g/dl quelque soit le type. Seuls les enfants HbSC avaient un taux faible d'hémoglobine ( $p = 0,01$ ) comparés aux porteurs d'hémoglobine normal (HbAA).

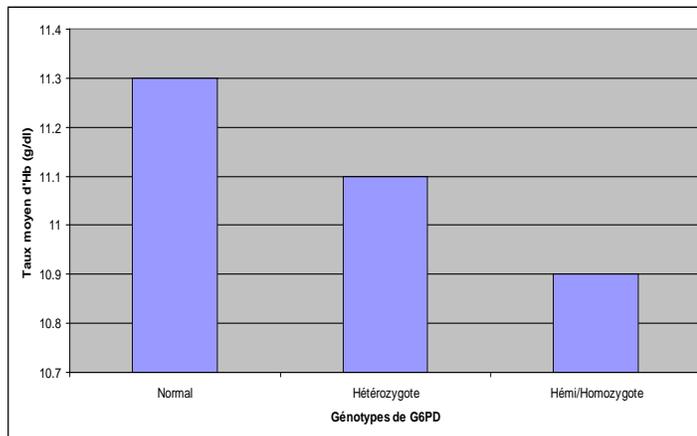
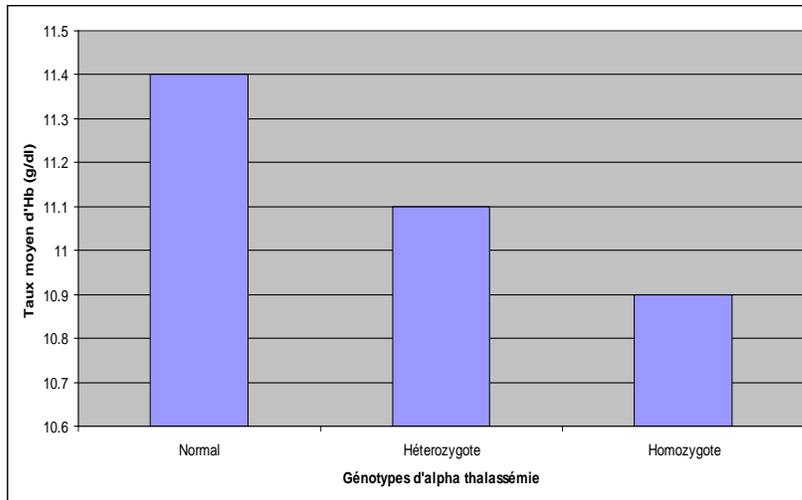


Figure 17: Répartition du taux moyen d'hémoglobine selon le type de déficit en G6PD

Les filles homozygotes et les garçons hémizygotes avaient un taux d'hémoglobine inférieur à celui des enfants normaux ( $p = 0,04$ ). Il n'existe aucune différence statistiquement significative entre les enfants déficients G6PD hétérozygotes et ceux G6PD normal ( $p = 0,20$ ).



**Figure 18: Répartition du taux moyen d'hémoglobine selon le type d'alpha-thalassémie**

Comparés aux enfants normaux, les enfants alpha-thalassémiques hétérozygotes ( $p = 0,001$ ) ou homozygotes ( $p = 0,09$ ) avaient des taux d'hémoglobine relativement faibles.

**Tableau XV: Distribution de l'anémie dans la population d'étude**

Anémie	Effectifs	Fréquence (%)
Sévère (Hb<7g/dl)	15	1,2
Modérée (7<Hb<9,9g/dl)	493	39,6
Normale (Hb>10g/dl)	736	59,2
<b>Total</b>	1244	100

La proportion d'anémie sévère dans notre population d'étude était de 1,2% contre 39,6% d'anémie modérée.

Tableau XVI: Répartition des cas d'anémie par classe d'âge

Classe d'âge (année)	anémie			Total
	Sévère n (%)	Modérée n (%)	Normal n (%)	
0.6 - 5	10 (66,7)	349 (67,2)	150 (20,4)	499
6 - 10	5 (33,3)	110 (21,2)	279 (37,9)	386
11 - 17	0	60 (11,6)	307 (41,7)	359
<b>Total</b>	<b>15 (100)</b>	<b>519 (100)</b>	<b>736 (100)</b>	<b>1244</b>

L'anémie sévère était plus présente chez les enfants de 6 mois à 5 ans avec 66,7% des cas alors que 21,2% des cas d'anémie modérée étaient présente chez les enfants de 6-10 ans. Nous n'avons pas observé de cas d'anémie sévère dans la classe d'âge 11-17 ans.

Après la présentation de nos résultats, nous les avons commentés et discutés par rapport aux travaux antérieurs.

## **6. Commentaires et discussion**

### **6.1. Au plan méthodologique**

Cette étude constitue un travail préliminaire qui rentre dans le cadre d'une étude quinquennale portant sur l'immunité innée et acquise du paludisme au Mali. Notre objectif était de déterminer la distribution des gènes impliqués dans la protection contre le paludisme dans les villages de Kenieroba, Bozokin et Fourda. Nous avons ainsi mesuré certains paramètres sociodémographiques (sexe, âge, ethnie) et biologiques (taux et types d'hémoglobine, groupe sanguin ABO, phénotype de G6PD et phénotype de l' $\alpha$ -thalassémie).

Cette étude était destinée à déterminer la distribution de 5 variants de l'hémoglobine et du globule rouge connus comme facteurs génétiques de protection contre le paludisme sévère en Afrique. De ce fait, nous n'avons pas déterminé le rôle protecteur de ces variants contre le paludisme ni leur mécanisme de protection. Ces deux volets seront pris en compte dans du projet père qui étudiera l'immunité innée et acquise contre le paludisme au Mali. La connaissance du statut des enfants concernant ces facteurs génétiques de protection permettra d'utiliser ces facteurs lors de l'analyse des données du projet proprement dit comme covariants.

Cette étude a porté sur tous les enfants dont les parents ou tuteurs ont donné le consentement libre et éclairé, soit 1244 sujets âgés de 6 mois à 17 ans dont la majorité était des enfants de moins de 5 ans (40,1% ; tableau III et figure 8). Dans les régions de transmission élevée, ce groupe d'âge constitue avec les femmes enceintes les groupes cibles du paludisme sévère. Le principal groupe ethnique rencontré était les Malinké (86.6%) alors que les Dogon ne constituent que 0,3% de notre population (tableau IV).

### **6.2. Distribution des variants d'hémoglobine dans notre population d'étude**

La beta globine (HBB) a trois mutations ponctuelles codantes qui confèrent la résistance au paludisme, et qui ont atteint des fréquences élevées dans différentes populations vivant dans les régions endémiques de paludisme : (i) l'allèle HbS est une substitution de l'acide glutamique pour la valine à la position 6 de la chaîne beta globine ; (ii) l'allèle HbC est une substitution de l'acide

glutamique pour la lysine à la position 6 de la chaîne beta globine ; et (iii) HbE allèle est une substitution de l'acide glutamique pour la lysine à la position 26 de la beta globine. Les protéines correspondantes sont connues sous le nom d'hémoglobine (Hb) S, HbC et HbE.

On note premièrement, différents polymorphismes de la beta-globine sont retrouvés chez différentes populations. Deuxièmement, que différentes populations ont développé indépendamment une réponse évolutive au paludisme, et ceci est constaté à la fois au niveau global et au niveau local (Kwiatkowski, 2005, Roberts and Williams, 2003) . HbS allèle est fréquente en Afrique et rare en Asie du sud-est et l'inverse est aussi vrai pour allèle HbE (Richer and Chudley, 2005). Cependant, une image plus complexe émerge au niveau local, par exemple, les Dogon du Mali qui ont une fréquence faible de HbS allèle que le reste des groupes ethniques en Afrique de l'ouest ont une fréquence élevée d'allèle HbC (Dufrenot and Legait, 1970, Agarwal et al., 2000). La mutation HbS est survenue indépendamment dans plusieurs régions (Daar et al., 2000). Un autre niveau de complexité est qu'à l'intérieur de l'Afrique, l'allèle HbS est retrouvé dans quatre différents haplotypes, un phénomène qui a été interprété par le fait que la même mutation est arrivée indépendamment dans quatre différentes populations africaines, bien qu'il ait été signifié que ceci pourrait aussi avoir plusieurs explications (Hanchard et al., 2007, Modiano et al., 2008, Mouele et al., 1999). Ce qui est remarquable est la grande variété de variants d'érythrocyte, qui sont la conséquence de la force sélective évolutive exercée par le paludisme.

Lors des études basées sur la détection de l'alpha-thalassémie par analyse d'ADN, il a été établi que la fréquence élevée et la distribution de cette anomalie en Mélanésie a été le résultat de la sélection naturelle par le paludisme (Flint et al., 1986a). La fréquence des thalassémies, mais pas celle d'autres polymorphismes de l'ADN non liés, exhibent une distribution dépendante de l'altitude et de l'attitude qui corrobore avec la présence de l'endémicité palustre à travers la Mélanésie. En Papouasie Nouvelle-Guinée, par exemple, il y a une intense transmission palustre, et l'alpha-thalassémie est présent chez plus de 90% de la population.

L'hémoglobine (Hb) C est retrouvée à travers l'Afrique de l'ouest même si elle est moins répandue que HbS. HbC a moins de conséquences cliniques que l'HbS. La proportion d'HbS et d'HbC était de 13,8% et 5,03%, respectivement alors que celle de l'HbSC était de 0,8% (tableau XI). Les sujets homozygotes ont relativement une anémie hémolytique mineure, et les hétérozygotes n'ont pas de réduction significative du taux d'hémoglobine (Diallo et al., 2004) .

Au cours de notre étude, nous avons observé un seul cas d'HbSS et un cas d'HbCC (tableau IX). Cette faible proportion des formes homozygotes de l'HbS et de l'HbC peut s'expliquer par le taux élevé de décès à bas âge observé chez les sujets homozygotes. HbC hétéro- et homozygotes protègent tous contre le paludisme sévère ; mais il semble que cette protection soit élevée pour les homozygotes (Agarwal et al., 2000, Modiano et al., 2001, Mockenhaupt et al., 2004b) . Chez les dogons au Mali on a trouvé 15,8% d'HbAC et une faible fréquence de l'HbAS (3,05% ; (Diallo et al., 1994). Cette étude n'a pas recensé de cas d'HbSS, SC ou CC. En 1992, Baby avait trouvé 80,9% de type d'HbAA, 14,75% d'HbAC ; 3,05% d'HbAS ; 1,07% d'HbCC et 0,23% d'HbSC. Au Burkina Faso, Simpore et coll. en 2002 lors d'une étude dans 45 écoles de la capitale Ouagadougou et 13 villages non loin de la capitale Ouagadougou avaient trouvé 69,92% d'HbAA, 8,36% d'HbAS, 19,18% d'HbAC, 1,37% d'HbCC et 0,2% d'HbSS chez les écoliers. Dans les 13 villages environnants de la capitale Ouagadougou, les auteurs avaient trouvé 70% d'HbAA, 6,9% d'HbAS, 19,16% d'HbAC, 1,7% d'HbCC, 1,99% d'HbSC et 0,25% d'HbSS (Simpore et al., 2002) .

Le gène HbC atteint sa fréquence maximale dans le nord du Burkina Faso (anciennement appelé la Haute Volta) et la prévalence diminue du centre aux régions périphériques. Une étude cas-contrôle (témoins) sur 4 348 Mossi du Burkina Faso suggérait une réduction de 29 à 93% du risque de paludisme clinique chez les porteurs d'HbC hétérozygotes et homozygotes, respectivement (Modiano et al., 2001). L'allèle HbC semble avoir eu des conditions de sélection dans une zone unique centrée sur le plateau Mossi et comprenant presque tout le Burkina-Faso, une partie du Mali et le nord de la Côte-d'Ivoire, du Ghana, du Togo et du Bénin. Or, comme cela a été déjà noté, c'est dans cette zone que s'est vraisemblablement vérifiée l'introgression des arrangements 2La et 2Rb d'*A. arabiensis* et l'occupation de la savane par *A. gambiae* après son origine en forêt. C'est donc là que se vérifie le maximum d'hétérogénéité chromosomique du système vectoriel afrotropical qui comprend, trois taxons polymorphiques du complexe « *gambiae* », deux taxons polymorphiques du complexe *funestus* » et *A. arabiensis*. Leur capacité vectorielle totale exceptionnellement élevée, pourrait rendre compte de la distribution de la mutation HbC à l'état hétérozygote (Modiano et al., 2001, Coluzzi et al., 2002). En accord avec l'hypothèse de Modiano et coll., le contexte épidémiologique idéal pour la sélection d'un tel facteur génétique de protection serait caractérisé par une transmission très élevée (Modiano et al., 2008).

L'HbS est retrouvé dans une large partie d'Afrique sub-saharienne aussi bien qu'au Moyen-Orient et en Europe. Il a la particularité d'être l'un des premiers variants génétiques humains à être associé avec une défection moléculaire spécifique. L'HbS tend à se polymériser sous des concentrations

faibles d'oxygène, entraînant l'érythrocyte à se déformer en forme de faucille. Les sujets homozygotes (HbSS) ont la maladie drépanocytaire, une maladie généralement fatale au jeune âge. Les sujets hétérozygotes HbS (HbAS) n'ont généralement pas l'anomalie clinique. Raper a été le premier à suggérer que le trait drépanocytaire pourrait conférer un avantage de survie contre certaines conditions adverses dans les régions tropicales (Lehmann and Raper, 1949), puis Mackey et Vivarelli suggéraient que ce facteur pourrait être le paludisme (Kwiatkowski, 2005). La distribution géographique très proche du paludisme et du gène de HbS supporte ce concept et conduisit à une période très excitante dans l'historique de la recherche sur la maladie drépanocytaire.

Les premières observations entre le trait drépanocytaire et le paludisme provenaient de la Rhodésie du Nord où il était noté que les parasites du paludisme étaient moins fréquents dans le sang des sujets ayant le trait drépanocytaire (Wiesenfeld, 1967). Allison attirait l'attention sur cette association et concluant que les personnes ayant le trait drépanocytaire développaient un paludisme moins fréquent et moins sévère que ceux n'ayant pas ce trait (Allison, 1954). Allison observa le premier dès 1949 qu'il y'avait une fréquence élevée du trait drépanocytaire HbAS (au moins 20%) dans les populations vivant près des régions côtières kenyanes et autour du lac Victoria à l'opposé d'une faible fréquence de l'hémoglobine S sur les hautes terres où le paludisme est inexistant. Depuis, il y a eu une forte sélection contre les drépanocytaires homozygotes. Il proposait alors que le trait drépanocytaire conférait à certain degré une protection contre le paludisme à *P. falciparum*. Afin de tester cette hypothèse, il étudia chez les enfants de 4 mois à 4 ans où la morbidité et la mortalité palustre est très grande et ; trouva que les enfants drépanocytaires Ougandais de cette classe d'âge avaient une faible prévalence du paludisme comparés à ceux ne portant pas ce trait drépanocytaire qui avaient une hémoglobine normale A (Allison, 1954) .

Cette observation a été confirmée plusieurs fois dans différentes régions africaines, et les manifestations potentiellement létales du paludisme (atteinte cérébrale et anémie sévère) sont rares chez les traits drépanocytaires (Allison, 1954, May et al., 2007). Dans une autre étude, l'état de porteur d'hémoglobine S était associé négativement avec toutes les formes létales du paludisme à *P. falciparum*, alors que l'association négative avec les porteurs de l'hémoglobine C et l'alpha-thalassémie était limitée au paludisme cérébral et à l'anémie sévère, respectivement (May et al., 2007). Ces résultats suggéraient que sous les conditions d'intense transmission du paludisme à *P. falciparum*, les jeunes enfants ayant le trait drépanocytaire survivent mieux que ceux ayant l'hémoglobine normale, alors que ceux ayant la forme homozygote HbSS survivent rarement bien que tous les trois autres génotypes.

### **6.3. Distribution du groupe sanguin ABO dans notre population d'étude**

La sévérité clinique plutôt que l'incidence ou la prévalence de la parasitémie détectable, est un bon indicateur pour étudier la relation du groupe sanguin ABO et la survie des enfants. Par exemple, un faible pourcentage d'érythrocytes circulants infectés pourrait refléter soit une infection moins sévère (de bon pronostic), soit un degré élevé d'adhésion des cellules parasitées à l'endothélium vasculaire (mauvais pronostic (Newbold et al., 1997) ; (Gravenor et al., 1998, Hearn et al., 2000)).

Dans notre étude, le groupe O a été le plus prévalent avec 40,6% suivi du groupe A (37,9%) et le moins prévalent a été le groupe AB avec 5,8% (tableau X). Ce résultat est en accord avec la sélection naturelle du groupe sanguin ABO au Mali (Rowe et al., 2007) et en Afrique qui stipule une fréquence élevée du groupe sanguin O (Fry et al., 2008). En effet, selon une étude menée au CNTS en 2004 sur 136 donneurs, la fréquence du groupe O a été de 48,5% et celle du groupe AB a été de 9,6% (Diawara, 2004 N°55). D'autres études menées en Afrique notamment celle menée en Cote d'Ivoire chez les Nouveau-nés a rapporté, respectivement, une fréquence de 62% et 2.5% pour les groupes O et AB (Folquet Amorissani et al., 2007). En Guinée Conakry, Loua et coll. en 2008 en étudiant la prévalence du groupe sanguin ABO et rhésus, ont trouvé une fréquence du groupe O à 48,8% et celle du groupe AB à 4,7% (Loua et al., 2007).

En faisant l'hypothèse selon laquelle durant l'infection à *P. falciparum*, le groupe O offre un avantage de survie, le groupe A confère un désavantage, et le groupe B a un effet intermédiaire. Selon cette hypothèse, on pourrait supposer que le ratio du groupe O sur le groupe A est très élevé dans les régions actuelles ou anciennes où le paludisme est ou a été endémique. Cela semble être le cas (Godber et al., 1976, Uneke et al., 2006, Fry et al., 2008). Une prévalence spécialement très élevée du groupe O couplée à une faible prévalence du groupe A est retrouvée à travers l'Afrique au sud du Sahara où *P. falciparum* persiste de nos jours (Kwiatkowski, 2005). Dans l'hémisphère occidentale, la distribution du groupe A et O généralement superpose la distribution tropicale du paludisme (Mourant et al., 1976). Dans les régions tropicales d'Amérique du sud et du centre, les populations indigènes sont presque exclusivement du groupe O. En Asie, la prévalence du groupe O est élevée parmi les populations qui vivent très proche de l'équateur. Par exemple, à Beijing (Pékin), en Chine, une région très fraîche, la prévalence du groupe O est de 29% et celle du groupe A est de 27% (Mourant et al., 1976). Mais, en Canton, en Chine tropicale, le groupe O a une prévalence de 46% et celle du groupe A est de 23%. Le groupe O est le plus fréquent groupe sanguin en Turquie et

en Iran (Mourant et al., 1976). Au contraire, le groupe A est le groupe sanguin prédominant dans les régions tempérées du globe où le paludisme n'a pas été endémique (tableau I). En fait, le groupe A est retrouvé en fréquence élevée en Scandinavie, et les régions subarctique d'Europe et d'Amérique du nord. Ainsi, si la survie au paludisme est associée au groupe O, et la mortalité est associée au groupe A, alors la distribution mondiale du groupe ABO est consistante avec la pression de sélection exercée par le paludisme sur l'homme.

La coévolution homme-*P. falciparum* a transformé la distribution des antigènes du groupe sanguin ABO observée dans les régions endémiques de paludisme. Cependant, il faut reconnaître que d'autres facteurs peuvent aussi influencer la distribution du groupe sanguin ABO (Sabeti et al., 2006), (Cserti and Dzik, 2007), incluant la migration des populations avec un effet fondateur, les guerres et la famine des populations, et d'autres maladies pédiatriques létales dans lesquelles la survie peut être associée à un antigène spécifique du groupe ABO. Par exemple, la possibilité que les isohémagglutinines retrouvées chez les individus du groupe O fournissent un spectre d'immunité large contre divers agents pathogènes a été suggéré dans le passé (Harrison and Ridley, 1975). La survie après une infection est connue et dépend des complexes interactions entre à la fois des gènes de l'hôte et du parasite (Hill, 1992, Lell et al., 1999).

Le paludisme est connu d'avoir affecté beaucoup de gènes des érythrocytes, incluant ceux concernant la synthèse des globines, les protéines membranaires, et les enzymes érythrocytaires. A cause de l'importance des hématies dans le paludisme, une influence sur les gènes encodant plusieurs gènes sur les membranes érythrocytaires n'est pas surprenant. Les études effectuées suggèrent que *P. falciparum* a été présent au moment opportun et à l'endroit précis durant l'histoire évolutive pour affecter l'origine et la proportion relative des antigènes du groupe sanguin ABO ; que la distribution géographique des antigènes du groupe ABO est consistante avec l'avantage de survie contre le paludisme des individus du groupe sanguin O ; que les études cliniques fournissent une évidence en faveur de l'effet du groupe ABO sur la sévérité de la maladie ; et que les découvertes récentes suggèrent un mécanisme biologique liant la pathogenèse de la maladie à l'expression des antigènes. Prenant en compte toutes ces données, nous pouvons affirmer que l'évolution et la distribution du groupe sanguin ABO est liée à l'infection palustre dans les régions endémiques.

#### **6.4. Distribution du déficit en G6PD dans notre population d'étude**

Le déficit en G6PD est le plus fréquent des enzymopathies chez l'homme affectant plus de 400 millions de personnes dans le monde (Beutler et al., 1991). Ce désordre, lequel est causé par de multitudes variants alléliques structurels du gène du G6PD, est retrouvé principalement dans les régions tropicales et subtropicales à travers le monde, avec des taux élevés, généralement 5-30%, retrouvés en Afrique, en Asie, le Moyen-Orient, le pourtour méditerranéen et la Papouasie Nouvelle-Guinée (Luzzatto, 2006). Mondialement, la fréquence varie entre 62% chez les juifs kurdes à 0,1% au Japon et l'Europe du Nord (WHO, 2000a).

Dans notre population d'étude, le phénotype normal de G6PD a été le plus prévalent avec 82,4%. Par contre, le déficit en G6PD hétéro- et homozygote a été identifié respectivement chez 10,5% et 0,8% des filles alors que 6,3% garçons présentait un déficit en G6PD hémizyote (tableau XII). Cependant, en 2005, Traoré avait trouvé à Bandiagara 12,1% garçons hémizyotes, 20,7% des filles homozygotes dans un échantillon de 458 sujets (Traore, 2005 N°34).

La distribution géographique du déficit en G6PD est consistant avec une sélection évolutive par le paludisme (Ganczakowski et al., 1995) et l'analyse de la structure haplotypique du locus G6PD supporte cette hypothèse de sélection récente positive (Tishkoff et al., 2001, Sabeti et al., 2002). Une activité enzymatique déficiente du G6PD a été corrélée à une protection contre le paludisme grave chez les enfants nigériens (Gilles et al., 1967). Une étude portant sur plus de 2000 enfants gambiens et kenyans a démontré que la forme fréquente du déficit en G6PD (G6PD A<sup>-</sup>) est associée avec approximativement 46 à 58% de réduction de développer le paludisme sévère chez les femelles hétérozygotes et les mâles hémizyotes (Ruwende et al., 1995). Cependant, les données actuelles provenant de plusieurs pays d'Afrique de L'ouest et d'Est n'ont pas confirmé la protection observée chez les féminins hétéro- et homozygotes (Clark et al., 2009). Nous avons surtout observé une protection contre le paludisme sévère chez les masculins hémizyotes de l'ordre de 36% (Clark et al., 2009). Nos conclusions corroborent avec celles de Guindo et coll. au Mali en 2007 (Guindo et al., 2007). Cette discrédance semble être expliquée par l'hétérogénéité allélique (Clark et al., 2009). Une réplication réduite de parasites dans les érythrocytes déficients en G6PD est considérée être le mécanisme de protection mais les parasites paraissent contourner ceci en élaborant leur propre G6PD (Luzzatto et al., 1969, Luzzatto and Bienzele, 1979, Usanga and Luzzatto, 1985).

### **6.5. Distribution de l'alpha-thalassémie dans notre population d'étude**

En 1949, Haldane avait proposé le concept de polymorphisme équilibré comme explication pourquoi les thalassémies atteignent des fréquences élevées, approchant la fixation dans certaines populations. Il avait argumenté que les hétérozygotes peuvent être protégés contre certaines importantes maladies, et le paludisme était un candidat sérieux, comme l'atteste la distribution globale des thalassémies qui couvrent une large partie de l'Afrique, de l'Asie, et les régions méditerranéennes où le paludisme était prévalent. Il y a d'autres circonstances évidentes qui supportent ce concept. Par exemple, le peuple Tharu a à la fois une fréquence élevée de l'alpha-thalassémies, approximativement 0.80, et ont une faible incidence de paludisme que d'autres groupes ethniques habitant les mêmes régions du Népal (Kwiatkowski, 2005). L'argument irréfutable provient d'une étude sur la génétique des populations en Malaisie, qui a démontré que la fréquence élevée de l'alpha<sup>+</sup>-thalassémie varie à la fois en fonction de l'altitude et de la latitude, de manière à être parfaitement corrélée avec l'endémicité palustre ; qui a été confirmé par des analyses haplotypiques démontrant la possibilité que cela soit arrivé suite un effet fondateur (Haldane, 1949, Haldane, 1956, Esposito et al., 1991). Environ 60 ans après l'hypothèse de Haldane, la base moléculaire par laquelle les gènes résistants confèrent la protection contre le paludisme reste l'objet d'un intérêt majeur et une piste potentielle pour de nouvelles stratégies thérapeutique contre cette maladie.

Lors d'études basées sur la détection de l'alpha-thalassémie par analyse d'ADN, il a été établi que la fréquence élevée et la distribution de cette anomalie en Mélanésie a été le résultat de la sélection naturelle par le paludisme (Flint et al., 1986b). La fréquence des thalassémies, mais pas celle d'autres polymorphismes de l'ADN non liés, exhibent une distribution dépendante de l'altitude et de l'attitude qui corrobore avec la présence de l'endémicité palustre à travers la Mélanésie. En Papouasie Nouvelle-Guinée, par exemple, il y a une intense transmission palustre, et l'alpha thalassémie est présent chez plus de 90% de la population (O'Donnell et al., 2009). Dans deux autres études, une dans le pacifique sud et l'autre dans la région côtière kenyane (Williams et al., 2005a), le risque relatif de paludisme sévère était significativement réduit à la fois chez les hétérozygotes et les homozygotes d'alpha thalassémie. Des valeurs similaires ont été observées lors d'hospitalisation pour d'autres infections autre que le paludisme (Allen et al., 1997), aussi bien chez les enfants qui sont décédés après admission pour paludisme sévère (Williams et al., 2005b).

La prévalence de  $\alpha$ -thalassémie était de 25,4% dans notre population d'étude dont 23,6% d'hétérozygote et 1,8% d'homozygote (tableau 9,  $p < 0,01$ ). Labie et coll. avaient trouvé, chez les immigrés West-africains en France, une prévalence de  $\alpha$ -thalassémie à 3,1% à partir d'une population de 540 sujets (Labie et al., 1978). En 2006, Tania et coll. avaient trouvé en Guinée Bissau, une prévalence de 13,8% de  $\alpha$ -thalassémie hétérozygote et 1,5% d'homozygote (Masmass et al., 2006).

Une étude sur des enfants kenyans montrait que les hétérozygotes et homozygotes étaient tous deux protecteurs contre le paludisme sévère (Williams et al., 2005a), alors que dans une autre étude au Ghana, seuls les hétérozygotes étaient protégés (Mockenhaupt et al., 2005). En Papouasie Nouvelle-Guinée, le risque de paludisme sévère a été réduit de 60% chez les enfants qui étaient homozygotes pour l' $\alpha$ -thalassémie, et à un degré moins pour les hétérozygotes. Mais le résultat semble ne pas être spécifique au paludisme car l'effet protecteur a été observé dans d'autres maladies infectieuses infantiles (Allen et al., 1997). May et coll. ont démontré chez les enfants ghanéens atteints de paludisme sévère, le portage de l'HbS était négativement associé à toutes les formes de paludisme sévère alors que le portage de l'HbC était négativement associé au paludisme cérébral et l' $\alpha$ -thalassémie était négativement associée à l'anémie sévère palustre (May et al., 2007).

### **6.6. Taux moyen d'hémoglobine par variant génétique**

L'anémie est définie comme un bas niveau d'hémoglobine dans le sang, comme attestée par la réduction de la qualité et de la quantité d'hématies associée à une réduction de la capacité de transport d'oxygène. Elle a de sérieuses conséquences négatives, incluant une augmentation de la mortalité chez les femmes et les enfants, une diminution de la capacité d'apprentissage, et une diminution de la productivité chez tous les individus. Ses effets néfastes sur la productivité sanitaire, physique et intellectuelle affectent la qualité de la vie et se traduit par une perte économique considérable pour l'individu et pour la communauté ayant de forte prévalence d'anémie. L'anémie est l'un des problèmes majeurs de santé publique les plus répandus dans le monde. Elle affecte plus de 2 milliards d'individus dans le monde, soit le tiers de la population mondiale. Presque dans tous les pays en voie de développement, entre un tiers et 50% des femmes et des enfants sont anémiques. La prévalence chez les femmes enceintes et les enfants de moins de deux ans (les groupes à grand risque) est typiquement supérieure à 50%. Dans les régions endémiques palustres d'Afrique, la

prévalence de l'anémie varie entre 31% et 91% chez les enfants, et entre 60% et 80% chez les femmes enceintes (Menendez et al., 2000, Schellenberg et al., 2003);

Quelque que soit l'anémie, sa cause semble être multifactorielle. Les causes directes peuvent être globalement une insuffisance ou une anomalie de la production des globules rouges ; leur destruction excessive et leur perte élevée. Les facteurs contribuant à l'anémie sont une mauvaise alimentation, un mauvais comportement sanitaire, les conditions environnementales ; le manque d'accès à un service sanitaire efficient, la pauvreté. L'importance relative de ces causes varie selon les régions. Dans les pays tropicaux, l'infection palustre est une cause majeure d'anémie chez les femmes enceintes et les enfants. L'anémie sévère est une des plus importantes complications du paludisme chez les enfants vivant en zone endémique, spécialement chez ceux infectés par *P. falciparum* (WHO, 1990, WHO, 2003b), probablement en raison des hauts niveaux de parasitémie en relation avec cette espèce. En Afrique, le pic de mortalité par anémie sévère survient à un plus jeune âge que le pic de mortalité par neuropaludisme (entre 6 mois et 2 ans pour l'anémie, 2 à 3 ans pour le neuropaludisme).

Au Mali, la prévalence de l'anémie (hémoglobine (Hb) < 11g/dl) chez les femmes enceintes est de 73,4%. L'anémie sévère (Hb < 7g/dl) a une prévalence estimée à 5,25%, l'anémie modérée (Hb 7 – 9,9g/dl) 43,6% et l'anémie faible (Hb 10 – 10,9g/dl) 24,5%. Chez les enfants maliens de moins de deux ans, la prévalence de l'anémie est de 85,1% (15,4% d'anémie sévère, 56,0% d'anémie modérée et 13,7% d'anémie faible). Chez les enfants de 2 – 5 ans, l'anémie globale est de 82,7%, l'anémie sévère 11,5%, l'anémie modérée 53,0% et l'anémie faible 18,2% (WHO/UNICEF/UNU, 2001). La prévalence de l'anémie palustre chez les femmes enceintes varie entre 8,7% (saison sèche) et 41,2% (saison des pluies ; (Bouvier et al., 1997)). Avec les autres manifestations de la maladie, elle est une cause possible de petit poids de naissance (Bouvier et al., 1997), (Dicko et al., 2003), de mortalité maternelle et d'issue défavorable de la grossesse, en particulier de mortalité fœtale ou néonatale (Fleming, 1987). Ces études ont porté essentiellement sur la relation entre infection palustre et anémie.

Dans notre étude, nous avons observé l'anémie sévère chez 1,2% des enfants contre 39,6% d'anémie modérée (tableau XV). Nous avons également observé de faibles taux moyens d'hémoglobine chez les sujets alpha-thalassémiques hétérozygote ( $p = 0,02$ ) et homozygote ( $p = 0,001$ ) comparés aux enfants normaux (tableau XII) dans le groupe d'âge de 11 - 17 ans. Seuls les enfants HbSC avaient un taux faible d'hémoglobine ( $p = 0,01$ ) comparés aux porteurs d'hémoglobine normal (HbAA ;

figure 15). Similairement, de faible taux d'hémoglobine ont été observés chez les femelles homozygotes et chez les mâles hemizygotés déficients en G6PD (figure 16 ;  $p = 0,04$ ). La même tendance a été observée chez les enfants alpha-thalassémiques heterozygotes ( $p = 0,001$ ) ou homozygotes ( $p = 0,09$  ; figure 17). En 2005, Traoré avait trouvé une fréquence d'anémie de 20% chez les enfants de 0-5ans atteints de paludisme sévère contre 56,3% dans de paludisme simple (Traore, 2005 N°34). L'anémie sévère était plus présente par les enfants de 6 mois à 5 ans avec 66,7% des cas alors que 21,2% des cas d'anémie modérée était présente chez les enfants de 6-10 ans dans notre étude. Atanda et coll. en 1997 avaient rapporté 16,80% d'anémie chez les enfants de 1 mois à 14 ans en république démocratique du Congo (Atanda et al., 1997) .

Au total, 47.1% des enfants portaient au moins un polymorphisme d'hémoglobine ou du globule rouge, 19.8% au moins deux polymorphismes et 5.4% au moins 3 polymorphismes connus être protecteurs contre le paludisme en Afrique (tableau XI). Le nombre d'enfants porteurs d'un polymorphisme génétique a été similaire à Bozokin et à Fourda (~50%) alors que le nombre d'enfants porteurs d'au moins 3 polymorphismes génétiques a été similaire dans les trois villages (~5%).

### **6.7. Limites de notre étude**

Notre étude s'est limitée à déterminer la proportion des enfants porteurs des variants génétiques connus pour leur rôle protecteur contre le paludisme sévère lors d'études *in-vitro* ou *in-vivo*. Nous n'avons pas étudié leur rôle dans la protection contre le paludisme ni leurs mécanismes de protection. Cependant, leurs mécanismes et le degré de protection font l'objet du projet qui s'étend sur cinq années. Ce projet étudiera, en outre, l'impact de ces polymorphismes sur l'acquisition de l'immunité contre le paludisme. En plus, les sujets ne possédant aucun allèle classique de protection font également l'objet d'étude poussée à la recherche d'autres mécanismes de protection contre le paludisme.

Après avoir commenté et discuté nos résultats, nous pouvons tirer la conclusion et formuler les recommandations suivantes.

## **7. Conclusion et Recommandations**

### **7.1. Conclusion**

Au terme de cette étude, il ressort que les polymorphismes génétiques de l'hémoglobine et du globule rouge qui protègent contre le paludisme sévère sont très fréquents au Mali. Nos résultats montrent que ces trois villages peuvent être un bon site pour étudier le mécanisme de protection conférée par ces variants contre le paludisme au Mali ainsi que leur impact sur l'acquisition de l'immunité antipalustre. Nous avons trouvé que 40,6% des enfants étaient du groupe sanguin O. Le trait drépanocytaire et le trait d'hémoglobine C ont été observés chez 13,80% et 5,03%, respectivement. Les proportions d'alpha-thalassémie hétéro- et homozygote étaient de 23,6% et 1,8%, respectivement. Le déficit en G6PD était observé chez 10,5% des filles hétérozygotes contre 0,8% d'homozygote fille et 6,3% de garçons hémizygotes. Globalement, 47,1% des enfants possédait au moins un variant génétique alors qu'au moins 5,4% possédait au moins trois polymorphismes du globule rouge ou d'hémoglobine.

Les cinq polymorphismes étudiés dans notre étude sont facilement détectés par des techniques de laboratoires relativement simples et doivent être identifiés et analysés comme covariants (facteurs de confusion) dans les études portant sur le paludisme sévère ainsi que lors des essais cliniques de médicaments ou de vaccins antipalustres au Mali ou ailleurs en Afrique.

## **7.2. Recommandations**

Au terme de cette étude et au vu de nos résultats, je peux formuler les recommandons suivantes :

- **Aux autorités sanitaires et administratives :**
  - d'encourager la recherche contre le paludisme et autres maladies infectieuses au Mali ;
  - de financer d'avantage la recherche médicale pour accélérer le développement de nouveaux médicaments ou vaccins antipaludiques.
  
- **Aux populations de la commune rurale de Bancoumana :**
  - de porter l'intérêt aux études sur le paludisme dans leur village, en acceptant et en adhérant aux protocoles des études sur le paludisme dans leurs communes.
  - de collaborer avec les agents de santé des projets de recherche sur le paludisme dans leur village, en amenant les enfants au centre de santé au moment indiqué par ces agents.
  
- **Aux chercheurs :**
  - de continuer ce type d'étude dans les autres localités du pays afin de cartographier la distribution des variants génétiques connus comme protecteurs afin de tenir compte de leur effets protecteurs lors des études futures sur le paludisme ;
  - d'explorer d'autres polymorphismes impliqués dans la protection contre le paludisme au Mali ou ailleurs en Afrique.

**Fiche Signalétique**

**Nom :** DOUMBOUYA **Prénom :** MORY

**Nationalité :** Malienne **Date de naissance :** 10/03/1981

**Ville de soutenance :** Bamako

**Titre :** Prévalence des polymorphismes de l'hémoglobine (HbS, HbC, alpha-thalassémie) du globule rouge (déficit en G6PD, groupe sanguin ABO) protecteurs contre les formes graves du paludisme dans la commune rurale de Bancoumana, sous-préfecture de Siby, préfecture de Kati, région de Koulikoro, Mali

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

**Secteur d'intérêt :** Immunogénétique, Santé publique

**Résumé**

En mai 2008, nous avons entrepris une étude transversale dans trois villages (Kenieroba, Bozokin et Fourda) situés tous dans la commune rurale de Bancoumana, située à 70 km au sud-ouest de Bamako. Nous avons inclus 1244 enfants âgés de 6 mois à 17 ans et nous leur avons obtenus un seul prélèvement sanguin au bout du doigt. Pour chaque enfant, nous avons déterminé le groupe sanguin ABO en utilisant un kit commercial de test d'agglutination et le type d'hémoglobine a été déterminé en utilisant la chromatographie liquide de haute performance HPLC (appareil D-10 de Bio-Rad). Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été utilisées afin d'identifier la suppression de 3,7 kb responsable de l'alpha-thalassémie et le déterminant mutationnel de la forme A` du déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Nous avons trouvé que 40,6% des enfants possédait le groupe sanguin O. HbC et HbS étaient identifiés chez 5,03% et 13,8%, respectivement. L'alpha-thalassémie hétéro- et homozygote a été identifiée respectivement chez 23,6% et 1,8% des enfants. Les femmes hétéro- et homozygote en déficit en G6PD étaient de 10,5% et 0,8%, respectivement tandis que les mâles hemizyote en déficit en G6PD étaient 6,3%. Le trait HbC était plus prévalent à Kenieroba (7,7%) qu'à Bozokin (2,7% ;  $p = 0,02$ ) et à Fourda (4,7% ;  $p = 0,05$ ). Les autres 4 variants génétiques étaient distribués similairement dans les trois villages. Globalement, 47,1 des enfants avaient au moins un polymorphisme alors qu'au moins 5,4% avait au moins 3 polymorphismes. Les polymorphismes génétiques d'hémoglobine et du globule rouge sont extrêmement fréquents au Mali et ont le potentiel de confondre les études portant sur la protection contre le paludisme sévère incluant l'histoire naturelle et les essais cliniques futures sur les vaccins ou médicaments antipaludiques qui utilisent généralement un petit échantillon. Les 5 polymorphismes génétiques sont facilement détectables en utilisant de simples techniques de laboratoire et doivent être identifiés et analysés comme covariants dans les études sur le paludisme sévère au Mali et en Afrique.

**Mots clés :** Paludisme, hémoglobinopathies, prévalence, résistance

**Summary**

**Background:** Each year, *P. falciparum* malaria kills nearly a million African children. The intense evolutionary pressure that malaria fatalities exert on human survival has led to the natural selection of genetic polymorphisms affecting hemoglobin (Hb) and other components of red blood cells (RBC). Epidemiologic studies in Mali and elsewhere in Africa have shown that HbC, sickle HbS, alpha-thalassemia, hemizygous G6PD deficiency, and type O blood group confer protection against severe malaria and death in young African children. We sought to determine the distribution of these 5 malaria-protective traits in Mali. We plan to treat these polymorphisms as covariates in the context of our 5-year longitudinal cohort study, which aims to identify putative genetic polymorphisms that protect wildtype children (i.e. those children lacking all 5 polymorphisms) from life-threatening malaria.

**Methods:** In May 2008, we carried out a cross-sectional survey in 3 Malian villages (Bozokin, Fourda and Kenieroba) located within 3 km of the Niger riverbank about 70 km from Bamako. We enrolled 1244 children aged 6 months to 17 years and obtained from them a single finger prick blood sample. For each child, we determined the ABO blood group by a standard agglutination assay and the Hb type by HPLC (Bio-Rad D-10 instrument). PCR assays were performed to identify the 3.7-kb deletional determinant of alpha-thalassemia and the mutational determinant of the A- form of G6PD deficiency.

**Results:** We found that 40,6% of children had type O blood group. HbC and HbS traits were identified in 5.03% and 13.8% of children, respectively. Hetero- and homozygous alpha-thalassemia were detected in 23.6% and 1.8% of children, respectively. Hetero- and homozygous G6PD deficiency were identified in 10.5%, and 0.8% of females, respectively, and hemizygous G6PD deficiency in 6.3% of males. HbC trait was more prevalent in Kenieroba (7.7%) than in Bozokin (2.7%,  $p = 0.02$ ) and Fourda (4.7%,  $p = 0.05$ ). The other 4 malaria-protective traits were similarly distributed in the 3 villages. Overall, 47.1% of the children in our cohort study carry at least 1 Hb or RBC polymorphism known to protect against severe malaria in Africa while 5.4% carry at least three polymorphisms.

**Conclusion:** Genetic polymorphisms of Hb and RBC are extremely common in Mali and have the potential to confound studies of severe malaria protection, including natural history studies and future vaccine trials that may initially enroll only small numbers of children. The 5 commonest Hb and RBC polymorphisms are readily detected by simple laboratory methods and should be identified and analyzed as covariates in studies of severe malaria in Mali and elsewhere in Africa.

**Key words: Malaria, Hemoglobinopathies, Prevalence, Resistance**

## 9. Références bibliographiques

ABDULLA, S., OBERHOLZER, R., JUMA, O., KUBHOJA, S., MACHERA, F., MEMBI, C., OMARI, S., URASSA, A., MSHINDA, H., JUMANNE, A., SALIM, N., SHOMARI, M., AEBI, T., SCHELLENBERG, D. M., CARTER, T., VILLAFANA, T., DEMOITTE, M. A., DUBOIS, M. C., LEACH, A., LIEVENS, M., VEKEMANS, J., COHEN, J., BALLOU, W. R. & TANNER, M. (2008) Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02D malaria vaccine in infants. *N Engl J Med*, 359, 2533-44.

AGARWAL, A., GUINDO, A., CISSOKO, Y., TAYLOR, J. G., COULIBALY, D., KONE, A., KAYENTAO, K., DJIMDE, A., PLOWE, C. V., DOUMBO, O., WELLEMS, T. E. & DIALLO, D. (2000) 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*, 96, 2358-63.

AL SEROURI, A. W., GRANTHAM-MCGREGOR, S. M., GREENWOOD, B. & COSTELLO, A. (2000) Impact of asymptomatic malaria parasitaemia on cognitive function and school achievement of schoolchildren in the Yemen Republic. *Parasitology*, 121 ( Pt 4), 337-45.

ALLEN, S. J., O'DONNELL, A., ALEXANDER, N. D., ALPERS, M. P., PETO, T. E., CLEGG, J. B. & WEATHERALL, D. J. (1997) alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 14736-41.

ALLISON, A. C. (1954) Notes on sickle-cell polymorphism. *Ann Hum Genet*, 19, 39-51.

ALVING, A. S., CARSON, P. E., FLANAGAN, C. L. & ICKES, C. E. (1956) Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*, 124, 484-5.

ATANDA, H. L., BON, J. C., FORCE-BARGE, P. & RODIER, J. (1997) [Study of main pathogenic agents of dysenteric syndromes in children]. *Arch Pediatr*, 4, 585.

BAIRD, J. K., JONES, T. R., DANUDIRGO, E. W., ANNIS, B. A., BANGS, M. J., BASRI, H., PURNOMO & MASBAR, S. (1991) Age-dependent acquired protection against Plasmodium falciparum in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 45, 65-76.

BEET, E. A. (1949) The genetics of the sickle-cell trait in a Bantu tribe. *Ann Eugen*, 14, 279-84.

BEUTLER, E., KUHL, W., VIVES-CORRONS, J. L. & PRCHAL, J. T. (1989) Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase A. *Blood*, 74, 2550-5.

BEUTLER, E., WESTWOOD, B. & KUHL, W. (1991) Definition of the mutations of G6PD Wayne, G6PD Viangchan, G6PD Jammu, and G6PD 'LeJeune'. *Acta Haematol*, 86, 179-82.

BOUVIER, P., ROUGEMONT, A., BRESLOW, N., DOUMBO, O., DELLEY, V., DICKO, A., DIAKITE, M., MAURIS, A. & ROBERT, C. F. (1997) Seasonality and malaria in a west African village: does high parasite density predict fever incidence? *Am J Epidemiol*, 145, 850-7.

BROOKER, S., GUYATT, H., OMUMBO, J., SHRETTA, R., DRAKE, L. & OUMA, J. (2000) Situation analysis of malaria in school-aged children in Kenya - what can be done? *Parasitol Today*, 16, 183-6.

CARVALHO, L. J., DANIEL-RIBEIRO, C. T. & GOTO, H. (2002) Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol*, 56, 327-43.

CHEKEM, L. & WIERUCKI, S. (2008) Extraction de l'artémisinine et synthèse de ses dérivés: artésunate et artéméter. [www.propharex.com](http://www.propharex.com), 1-12.

- CHOTIVANICH, K. T., UDOMSANGPETCH, R., PIPITAPORN, B., ANGUS, B., SUPUTTAMONGKOL, Y., PUKRITTAYAKAMEE, S. & WHITE, N. J. (1998) Rosetting characteristics of uninfected erythrocytes from healthy individuals and malaria patients. *Ann Trop Med Parasitol*, 92, 45-56.
- CLARK, T. G., FRY, A. E., AUBURN, S., CAMPINO, S., DIAKITE, M., GREEN, A., RICHARDSON, A., TEO, Y. Y., SMALL, K., WILSON, J., JALLOW, M., SISAY-JOOF, F., PINDER, M., SABETI, P., KWIATKOWSKI, D. P. & ROCKETT, K. A. (2009) Allelic heterogeneity of G6PD deficiency in West Africa and severe malaria susceptibility. *Eur J Hum Genet*.
- COLUZZI, M., SABATINI, A., DELLA TORRE, A., DI DECO, M. A. & PETRARCA, V. (2002) A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science*, 298, 1415-8.
- CSERTI, C. M. & DZIK, W. H. (2007) The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood*, 110, 2250-8.
- DAAR, S., HUSSAIN, H. M., GRAVELL, D., NAGEL, R. L. & KRISHNAMOORTHY, R. (2000) Genetic epidemiology of HbS in Oman: multicentric origin for the betaS gene. *Am J Hematol*, 64, 39-46.
- DIAKITE, M. (2008) *Paludisme up to date, 1e édition*, Bamako, Mali, MRTC/FMPOS.
- DIAKITE, S. A. (2005) Les mécanismes de protection de l'hémoglobine C contre les formes graves du paludisme à *P. falciparum*: résultats d'études préliminaires in-vitro. *Hématologie*. Bamako, Université de Bamako, Mali N°.
- DIALLO, D., TRAORE, A. K., BABY, M., RHALLY, A. A., BELLIS, G. & CHAVENTRE, A. (1994) Haemoglobinopathies C and S in the Dogons. *Nouv Rev Fr Hematol*, 35, 551-4.
- DIALLO, D. A., DOUMBO, O. K., DICKO, A., GUINDO, A., COULIBALY, D., KAYENTAO, K., DJIMDE, A. A., THERA, M. A., FAIRHURST, R. M., PLOWE, C. V. & WELLEMS, T. E. (2004) A comparison of anemia in hemoglobin C and normal hemoglobin A children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop*, 90, 295-9.
- DIAWARA, A. (2004 N°55) Le déficit en G6PD chez les donneurs de sang du CNTS de Bamako *Faculté de médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie* Université de Bamako
- DICKO, A., MANTEL, C., THERA, M. A., DOUMBIA, S., DIALLO, M., DIAKITE, M., SAGARA, I. & DOUMBO, O. K. (2003) Risk factors for malaria infection and anemia for pregnant women in the Sahel area of Bandiagara, Mali. *Acta Trop*, 89, 17-23.
- DONDORP, A. M. & DAY, N. P. (2007) The treatment of severe malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 101, 633-4.
- DOUMBO, O. (1992) Epidémiologie du paludisme au Mali, étude de la chimiorésistance, essai de stratégie de contrôle basé sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associé au traitement systématique des accès fébriles. *Thèse de doctorat, Parasitologie, Pathologie, Ecologie, Montpellier II, France*.
- DUFRENOT & LEGAIT, J. P. (1970) [Distribution of hemoglobin S and C genes in Upper Volta, Mali and Niger]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, 63, 606-14.
- ESPOSITO, F., GAMBELLA, R., MODIANO, D., LAMIZANA, L., LOMBARDI, S., ROTIGLIANO, G. & HABLUETZEL, A. (1991) Waiting for the vaccine: sporozoite vaccine research entails important progress in malaria epidemiology. *Parassitologia*, 33, 85-91.
- FERNANDEZ, V., TREUTIGER, C. J., NASH, G. B. & WAHLGREN, M. (1998) Multiple adhesive phenotypes linked to rosetting binding of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*, 66, 2969-75.
- FISCHER, P. R. & BOONE, P. (1998) Short report: severe malaria associated with blood group. *Am J Trop Med Hyg*, 58, 122-3.
- FLEMING, A. (1987) Anémie maternelle dans le nord du Nigeria: causes et solutions. *Forum mondial de la santé*, 8, 365-370.

- FLINT, J., HILL, A. V., BOWDEN, D. K., OPPENHEIMER, S. J., SILL, P. R., SERJEANTSON, S. W., BANAKOIRI, J., BHATIA, K., ALPERS, M. P., BOYCE, A. J. & ET AL. (1986a) High frequencies of alpha-thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature*, 321, 744-50.
- FLINT, J., HILL, A. V., WEATHERALL, D. J., CLEGG, J. B. & HIGGS, D. R. (1986b) Alpha globin genotypes in two North European populations. *Br J Haematol*, 63, 796-7.
- FOLQUET AMORISSANI, M., SYLLA, M., DAINGUY, M. E., KOUAKOU, C., SEUCHI, P., HOUENOU-AGBO, Y. & KOUAME KONAN, J. (2007) [Anemia in the premature newborn]. *Mali Med*, 22, 1-5.
- FRIEDMAN, M. J. (1978) Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 1994-7.
- FRY, A. E., GRIFFITHS, M. J., AUBURN, S., DIAKITE, M., FORTON, J. T., GREEN, A., RICHARDSON, A., WILSON, J., JALLOW, M., SISAY-JOOF, F., PINDER, M., PESHU, N., WILLIAMS, T. N., MARSH, K., MOLYNEUX, M. E., TAYLOR, T. E., ROCKETT, K. A. & KWIATKOWSKI, D. P. (2008) Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe Plasmodium falciparum malaria. *Hum Mol Genet*, 17, 567-76.
- GANCZAKOWSKI, M., TOWN, M., BOWDEN, D. K., VULLIAMY, T. J., KANEKO, A., CLEGG, J. B., WEATHERALL, D. J. & LUZZATTO, L. (1995) Multiple glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient variants correlate with malaria endemicity in the Vanuatu archipelago (southwestern Pacific). *Am J Hum Genet*, 56, 294-301.
- GILLES, H. M., FLETCHER, K. A., HENDRICKSE, R. G., LINDNER, R., REDDY, S. & ALLAN, N. (1967) Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria. *Lancet*, 1, 138-40.
- GODBER, M., KOPEC, A. C., MOURANT, A. E., TEESDALE, P., TILLS, D., WEINER, J. S., EL-NIEL, H., WOOD, C. H. & BARLEY, S. (1976) The blood groups, serum groups, red-cell isoenzymes and haemoglobins of the Sandawe and Nyaturu of Tanzania. *Ann Hum Biol*, 3, 463-73.
- GOTH, L., RASS, P. & PAY, A. (2004) Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn*, 8, 141-9.
- GRAVENOR, M. B., VAN HENS BROEK, M. B. & KWIATKOWSKI, D. (1998) Estimating sequestered parasite population dynamics in cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7620-4.
- GREENWOOD, B. (2005) Malaria vaccines. Evaluation and implementation. *Acta Trop*, 95, 298-304.
- GREENWOOD, B. (2008a) Progress in malaria control in endemic areas. *Travel Med Infect Dis*, 6, 173-6.
- GREENWOOD, B. M. (2008b) Control to elimination: implications for malaria research. *Trends Parasitol*, 24, 449-54.
- GUINDO, A., FAIRHURST, R. M., DOUMBO, O. K., WELLEMS, T. E. & DIALLO, D. A. (2007) X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Med*, 4, e66.
- HALDANE, J. B. (1949) The association of characters as a result of inbreeding and linkage. *Ann Eugen*, 15, 15-23.
- HALDANE, J. B. (1956) Natural selection in man. *Acta Genet Stat Med*, 6, 321-32.
- HALDAR, K. & MOHANDAS, N. (2009) Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 87-93.
- HANCHARD, N., ELZEIN, A., TRAFFORD, C., ROCKETT, K., PINDER, M., JALLOW, M., HARDING, R., KWIATKOWSKI, D. & MCKENZIE, C. (2007) Classical sickle beta-globin haplotypes exhibit a high degree of long-range haplotype similarity in African and Afro-Caribbean populations. *BMC Genet*, 8, 52.
- HANSON, L. A. & SILFVERDAL, S. A. (2008) Vaccination immunology. *Scand J Infect Dis*, 40, 696-701.

- HARRISON, J. & RIDLEY, D. S. (1975) Heterologous reactions involving parasites, blood group antibodies and tissue components. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 69, 312-7.
- HEARN, J., RAYMENT, N., LANDON, D. N., KATZ, D. R. & DE SOUZA, J. B. (2000) Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun*, 68, 5364-76.
- HIGGINS, T., MACK, M. & KHAJURIA, A. (2009) Comparison of two methods for the quantification and identification of hemoglobin variants. *Clin Biochem*, 42, 701-5.
- HILL, A. V. (1992) Malaria resistance genes: a natural selection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86, 225-6, 232.
- HILL, A. V. (2006) Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol*, 6, 21-32.
- HIRONO, A. & BEUTLER, E. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 3951-4.
- HO, M., HICKEY, M. J., MURRAY, A. G., ANDONEGUI, G. & KUBES, P. (2000) Visualization of Plasmodium falciparum-endothelium interactions in human microvasculature: mimicry of leukocyte recruitment. *J Exp Med*, 192, 1205-11.
- ISSELBACHER, K. J., ANDERSON, E. P., KURAHASHI, K. & KALCKAR, H. M. (1956) Congenital galactosemia, a single enzymatic block in galactose metabolism. *Science*, 123, 635-6.
- KEATS, B. (1983) Genetic mapping: X chromosome. *Hum Genet*, 64, 28-32.
- KLAYMAN, D. L. (1985) Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 228, 1049-55.
- KWIATKOWSKI, D. (1991) Cytokines and anti-disease immunity to malaria. *Res Immunol*, 142, 707-12.
- KWIATKOWSKI, D. P. (2005) How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet*, 77, 171-92.
- LABIE, D., AMEGNIZIN, K. P., WAJCMAN, H., PEQUIGNOT, H., MAECHEL, H., PIERON, R., LESOBRE, B. & COULAUD, J. M. (1978) [Hemoglobinopathies in West-African immigrant workers in France (author's transl)]. *Sem Hop*, 54, 1343-6.
- LEHMANN, H. & RAPER, A. B. (1949) Distribution of the sickle-cell trait in Uganda, and its ethnological significance. *Nature*, 164, 494.
- LELL, B., MAY, J., SCHMIDT-OTT, R. J., LEHMAN, L. G., LUCKNER, D., GREVE, B., MATOUSEK, P., SCHMID, D., HERBICH, K., MOCKENHAUPT, F. P., MEYER, C. G., BIENZLE, U. & KREMSNER, P. G. (1999) The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clin Infect Dis*, 28, 794-9.
- LIVINGSTONE, F. B. (1971) Malaria and human polymorphisms. *An Rev Genet*, 5, 33.
- LOSCERTALES, M. P. & BRABIN, B. J. (2006) ABO phenotypes and malaria related outcomes in mothers and babies in The Gambia: a role for histo-blood groups in placental malaria? *Malar J*, 5, 72.
- LOUA, A., LAMAH, M. R., HABA, N. Y. & CAMARA, M. (2007) [Frequency of blood groups ABO and rhesus D in the Guinean population]. *Transfus Clin Biol*, 14, 435-9.
- LUO, H. Y., BOUDREAUX, J., STEINBERG, M. H. & CHUI, D. H. (2005) Patients with thalassemia in the United States. *Blood*, 105, 4896-7.
- LUZZATTO, L. (1995) About hemoglobins, G6PD and parasites in red cells. *Experientia*, 51, 206-8.
- LUZZATTO, L. (2006) Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype. *Haematologica*, 91, 1303-6.

- LUZZATTO, L. & BIENZLE, U. (1979) The malaria/G-6-P.D. hypothesis. *Lancet*, 1, 1183-4.
- LUZZATTO, L., NWACHUKU-JARRETT, E. S. & REDDY, S. (1970) Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait. *Lancet*, 1, 319-21.
- LUZZATTO, L., USANGA, F. A. & REDDY, S. (1969) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science*, 164, 839-42.
- MACDONALD, G. (1957) *The epidemiology and control of malaria*, Oxford, Oxford University Press.
- MARTINI, G., TONIOLO, D., VULLIAMY, T., LUZZATTO, L., DONO, R., VIGLIETTO, G., PAONESSA, G., D'URSO, M. & PERSICO, M. G. (1986) Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Embo J*, 5, 1849-55.
- MASMAS, T. N., GARLY, M. L., LISSE, I. M., RODRIQUES, A., PETERSEN, P. T. & BIRGENS, H. (2006) Inherited hemoglobin disorders in Guinea-Bissau, West Africa: a population study. *Hemoglobin*, 30, 355-64.
- MAY, J., EVANS, J. A., TIMMANN, C., EHMEN, C., BUSCH, W., THYE, T., AGBENYEGA, T. & HORSTMANN, R. D. (2007) Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. *Jama*, 297, 2220-6.
- MEHTA, A. B., VULLIAMY, T., GORDON-SMITH, E. C. & LUZZATTO, L. (1989) A new genetic polymorphism in the 16S ribosomal RNA gene of human mitochondrial DNA. *Ann Hum Genet*, 53, 303-10.
- MENENDEZ, C., FLEMING, A. F. & ALONSO, P. L. (2000) Malaria-related anaemia. *Parasitol Today*, 16, 469-76.
- MENENDEZ, C., KAHIGWA, E., HIRT, R., VOUNATSOU, P., APONTE, J. J., FONT, F., ACOSTA, C. J., SCHELLENBERG, D. M., GALINDO, C. M., KIMARIO, J., URASSA, H., BRABIN, B., SMITH, T. A., KITUA, A. Y., TANNER, M. & ALONSO, P. L. (1997) Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants. *Lancet*, 350, 844-50.
- MILLER, L. H. & HOFFMAN, S. L. (1998) Research toward vaccines against malaria. *Nat Med*, 4, 520-4.
- MOCKENHAUPT, F. P., BOUSEMA, J. T., EGGELTE, T. A., EHRHARDT, S., OTCHWEMAH, R. N., SAUERWEIN, R. W. & BIENZLE, U. (2005) Concurrence of Plasmodium falciparum dhfr and crt mutations in northern Ghana. *Malar J*, 4, 42.
- MOCKENHAUPT, F. P., EHRHARDT, S., CRAMER, J. P., OTCHWEMAH, R. N., ANEMANA, S. D., GOLTZ, K., MYLIUS, F., DIETZ, E., EGGELTE, T. A. & BIENZLE, U. (2004a) Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children. *J Infect Dis*, 190, 1006-9.
- MOCKENHAUPT, F. P., EHRHARDT, S., GELLERT, S., OTCHWEMAH, R. N., DIETZ, E., ANEMANA, S. D. & BIENZLE, U. (2004b) Alpha(+)-thalassemia protects African children from severe malaria. *Blood*, 104, 2003-6.
- MOCKENHAUPT, F. P., MANDELKOW, J., TILL, H., EHRHARDT, S., EGGELTE, T. A. & BIENZLE, U. (2003) Reduced prevalence of Plasmodium falciparum infection and of concomitant anaemia in pregnant women with heterozygous G6PD deficiency. *Trop Med Int Health*, 8, 118-24.
- MODIANO, D., BANCONE, G., CIMINELLI, B. M., POMPEI, F., BLOT, I., SIMPORE, J. & MODIANO, G. (2008) Haemoglobin S and haemoglobin C: 'quick but costly' versus 'slow but gratis' genetic adaptations to Plasmodium falciparum malaria. *Hum Mol Genet*, 17, 789-99.
- MODIANO, D., LUONI, G., SIRIMA, B. S., SIMPORE, J., VERRA, F., KONATE, A., RASTRELLI, E., OLIVIERI, A., CALISSANO, C., PAGANOTTI, G. M., D'URBANO, L., SANOU, I., SAWADOGO, A., MODIANO, G. & COLUZZI, M. (2001) Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. *Nature*, 414, 305-8.
- MOUELE, R., BOUKILA, V., FOURCADE, V., FEINGOLD, J. & GALACTEROS, F. (1999) Sickle-cell disease in Brazzaville, Congo: genetical, hematological, biochemical and clinical aspects. *Acta Haematol*, 101, 178-84.

- MOURANT, A. E., GODBER, M. J., KOPEC, A. C., TILLS, D. & WOODHEAD, B. G. (1976) Genetical studies at high and low altitudes in Ethiopia. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 194, 17-22.
- MUNOZ, M., ROMERO, A., GOMEZ, J. F., MANTECA, A., NAVEIRA, E. & RAMIREZ, G. (2005) Utility of point-of-care haemoglobin measurement in the HemoCue-B haemoglobin for the initial diagnosis of anaemia. *Clin Lab Haematol*, 27, 99-104.
- MURPHY, S. C. & BREMAN, J. G. (2001) Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med Hyg*, 64, 57-67.
- NA-BANGCHANG, K. & KARBWANG, J. (2009) Current status of malaria chemotherapy and the role of pharmacology in antimalarial drug research and development. *Fundam Clin Pharmacol*, 23, 387-409.
- NEWBOLD, C. I., CRAIG, A. G., KYES, S., BERENDT, A. R., SNOW, R. W., PESHU, N. & MARSH, K. (1997) P1EMP1, polymorphism and pathogenesis. *Ann Trop Med Parasitol*, 91, 551-7.
- NEWTON, C. R. & KRISHNA, S. (1998) Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther*, 79, 1-53.
- O'DONNELL, A., FOWKES, F. J., ALLEN, S. J., IMRIE, H., ALPERS, M. P., WEATHERALL, D. J. & DAY, K. P. (2009) The acute phase response in children with mild and severe malaria in Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103, 679-86.
- PAI, G. S., SPREngle, J. A., DO, T. T., MARENI, C. E. & MIGEON, B. R. (1980) Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom X chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 2810-3.
- PATHIRANA, S. L., ALLES, H. K., BANDARA, S., PHONE-KYAW, M., PERERA, M. K., WICKREMASINGHE, A. R., MENDIS, K. N. & HANDUNNETTI, S. M. (2005) ABO-blood-group types and protection against severe, Plasmodium falciparum malaria. *Ann Trop Med Parasitol*, 99, 119-24.
- PATTANAPANYASAT, K., YONGVANITCHIT, K., TONGTAWA, P., TACHAVANICH, K., WANACHIWANAWIN, W., FUCHAROEN, S. & WALSH, D. S. (1999) Impairment of Plasmodium falciparum growth in thalassemic red blood cells: further evidence by using biotin labeling and flow cytometry. *Blood*, 93, 3116-9.
- RICHER, J. & CHUDLEY, A. E. (2005) The hemoglobinopathies and malaria. *Clin Genet*, 68, 332-6.
- ROBERTS, D. J. & WILLIAMS, T. N. (2003) Haemoglobinopathies and resistance to malaria. *Redox Rep*, 8, 304-10.
- ROTH, E. F., JR., RAVENTOS-SUAREZ, C., RINALDI, A. & NAGEL, R. L. (1983) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 298-9.
- ROWE, J. A., HANDEL, I. G., THERA, M. A., DEANS, A. M., LYKE, K. E., KONE, A., DIALLO, D. A., RAZA, A., KAI, O., MARSH, K., PLOWE, C. V., DOUMBO, O. K. & MOULDS, J. M. (2007) Blood group O protects against severe Plasmodium falciparum malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 17471-6.
- RUWENDE, C. & HILL, A. (1998) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J Mol Med*, 76, 581-8.
- RUWENDE, C., KHOO, S. C., SNOW, R. W., YATES, S. N., KWIATKOWSKI, D., GUPTA, S., WARN, P., ALLSOPP, C. E., GILBERT, S. C., PESCHU, N. & ET AL. (1995) Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature*, 376, 246-9.
- SABETI, P. C., REICH, D. E., HIGGINS, J. M., LEVINE, H. Z., RICHTER, D. J., SCHAFFNER, S. F., GABRIEL, S. B., PLATKO, J. V., PATTERSON, N. J., MCDONALD, G. J., ACKERMAN, H. C., CAMPBELL, S. J., ALTSHULER, D., COOPER, R., KWIATKOWSKI, D., WARD, R. & LANDER, E. S. (2002) Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature*, 419, 832-7.

SABETI, P. C., SCHAFFNER, S. F., FRY, B., LOHMUELLER, J., VARILLY, P., SHAMOVSKY, O., PALMA, A., MIKKELSEN, T. S., ALTSCHULER, D. & LANDER, E. S. (2006) Positive natural selection in the human lineage. *Science*, 312, 1614-20.

SAGARA, I., ELLIS, R. D., DICKO, A., NIAMBELE, M. B., KAMATE, B., GUINDO, O., SISSOKO, M. S., FAY, M. P., GUINDO, M. A., KANTE, O., SAYE, R., MIURA, K., LONG, C., MULLEN, G. E., PIERCE, M., MARTIN, L. B., RAUSCH, K., DOLO, A., DIALLO, D. A., MILLER, L. H. & DOUMBO, O. K. (2009) A randomized and controlled Phase 1 study of the safety and immunogenicity of the AMA1-C1/Alhydrogel + CPG 7909 vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria in semi-immune Malian adults. *Vaccine*, 27, 7292-8.

SHELLENBERG, D., SHELLENBERG, J. R., MUSHI, A., SAVIGNY, D., MGALULA, L., MBUYA, C. & VICTORA, C. G. (2003) The silent burden of anaemia in Tanzanian children: a community-based study. *Bull World Health Organ*, 81, 581-90.

SIMPORE, J., PIGNATELLI, S., BARLATI, S. & MUSUMECI, S. (2002) Modification in the frequency of Hb C and Hb S in Burkina Faso: an influence of migratory fluxes and improvement of patient health care. *Hemoglobin*, 26, 113-20.

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

SODEINDE, O. (1992) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Clin Haematol*, 5, 367-82.

TAKAHARA, S. & MIYAMOTO, H. (1948) [The progressive, necrotic dental maxillitis that was considered to be the cause of the lack of catalase in the blood.]. *Okayama Igakkai zasshi*, 60, 90; passim.

TISHKOFF, S. A., VARKONYI, R., CAHINHINAN, N., ABBES, S., ARGYROPOULOS, G., DESTRO-BISOL, G., DROUSIOTOU, A., DANGERFIELD, B., LEFRANC, G., LOISELET, J., PIRO, A., STONEKING, M., TAGARELLI, A., TAGARELLI, G., TOUMA, E. H., WILLIAMS, S. M. & CLARK, A. G. (2001) Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science*, 293, 455-62.

TRAN, T. H., DOLECEK, C., PHAM, P. M., NGUYEN, T. D., NGUYEN, T. T., LE, H. T., DONG, T. H., TRAN, T. T., STEPNIIEWSKA, K., WHITE, N. J. & FARRAR, J. (2004) Dihydroartemisinin-piperaquine against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Vietnam: randomised clinical trial. *Lancet*, 363, 18-22.

TRAORE, K. (2005 N°34) Déficit en G6PD érythrocytaire et paludisme dans une population âgé de 3mois à 20ans dans la ville de Badiagara (MALI) *Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS)*. Université de Bamako.

UNEKE, C. J., OGBU, O. & NWOJII, V. (2006) Potential risk of induced malaria by blood transfusion in South-eastern Nigeria. *Mcgill J Med*, 9, 8-13.

USANGA, E. A. & LUZZATTO, L. (1985) Adaptation of *Plasmodium falciparum* to glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient host red cells by production of parasite-encoded enzyme. *Nature*, 313, 793-5.

VANDERBERG, J. P. (2009) Reflections on early malaria vaccine studies, the first successful human malaria vaccination, and beyond. *Vaccine*, 27, 2-9.

VEENEMANS, J., ANDANG'O, P. E., MBUGI, E. V., KRAAIJENHAGEN, R. J., MWANIKI, D. L., MOCKENHAUPT, F. P., ROEWER, S., OLOMI, R. M., SHAO, J. F., VAN DER MEER, J. W., SAVELKOUL, H. F. & VERHOEF, H. (2008) Alpha+ -thalassemia protects against anemia associated with asymptomatic malaria: evidence from community-based surveys in Tanzania and Kenya. *J Infect Dis*, 198, 401-8.

VULLIAMY, T., MASON, P. & LUZZATTO, L. (1992) The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trends Genet*, 8, 138-43.

VULLIAMY, T. J., D'URSO, M., BATTISTUZZI, G., ESTRADA, M., FOULKES, N. S., MARTINI, G., CALABRO, V., POGGI, V., GIORDANO, R., TOWN, M. & ET AL. (1988) Diverse point mutations in the human glucose-6-

phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 5171-5.

WEATHERALL, D. J. & CLEGG, J. B. (2001) Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*, 79, 704-12.

WHO (1990) Severe and complicated malaria. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84 Suppl 2, 1-65.

WHO (2000a) Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94 Suppl 1, S1-90.

WHO (2000b) WHO Expert Committee on Malaria. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 892, i-v, 1-74.

WHO (2003a) Africa malaria report 2003.

WHO (2003b) Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Geneva, World Health Organisation.

WHO (2006) *Directives pour le traitement du paludisme (WHO/HTM/MAL/2006\_1108)*, Geneva, World Health Organization.

WHO (2008) World malaria report 2008 (<http://apps.who.int/malaria/wmr2008/malaria2008.pdf>). Geneva, World Health Organization.

WHO (2009) World Malaria Report 2009. Geneva, Switzerland, World Health Organization, [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf) consulte le 30 janvier 2010.

WHO/UNICEF/UNU (2001) Macro International demographic and health surveys.

WIESENFELD, S. L. (1967) Sickle-cell trait in human biological and cultural evolution. Development of agriculture causing increased malaria is bound to gene-pool changes causing malaria reduction. *Science*, 157, 1134-40.

WILLCOX, M., BJORKMAN, A. & BROHULT, J. (1983a) Falciparum malaria and beta-thalassaemia trait in northern Liberia. *Ann Trop Med Parasitol*, 77, 335-47.

WILLCOX, M., BJORKMAN, A., BROHULT, J., PEHRSON, P. O., ROMBO, L. & BENGTTSSON, E. (1983b) A case-control study in northern Liberia of Plasmodium falciparum malaria in haemoglobin S and beta-thalassaemia traits. *Ann Trop Med Parasitol*, 77, 239-46.

WILLIAMS, A. W. & MACKEY, J. P. (1949) Rapid determination of the sickle cell trait; by the use of a reducing agent. *J Clin Pathol*, 2, 141.

WILLIAMS, T. N., MAITLAND, K., BENNETT, S., GANCZAKOWSKI, M., PETO, T. E., NEWBOLD, C. I., BOWDEN, D. K., WEATHERALL, D. J. & CLEGG, J. B. (1996) High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children. *Nature*, 383, 522-5.

WILLIAMS, T. N., MWANGI, T. W., WAMBUA, S., ALEXANDER, N. D., KORTOK, M., SNOW, R. W. & MARSH, K. (2005a) Sickle cell trait and the risk of Plasmodium falciparum malaria and other childhood diseases. *J Infect Dis*, 192, 178-86.

WILLIAMS, T. N., MWANGI, T. W., WAMBUA, S., PETO, T. E., WEATHERALL, D. J., GUPTA, S., RECKER, M., PENMAN, B. S., UYOGA, S., MACHARIA, A., MWACHARO, J. K., SNOW, R. W. & MARSH, K. (2005b) Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+ thalassaemia and the sickle cell trait. *Nat Genet*, 37, 1253-7.

WILLIAMS, T. N., WAMBUA, S., UYOGA, S., MACHARIA, A., MWACHARO, J. K., NEWTON, C. R. & MAITLAND, K. (2005c) Both heterozygous and homozygous alpha+ thalassaemias protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya. *Blood*, 106, 368-71.

WILLIAMS, T. N., WEATHERALL, D. J. & NEWBOLD, C. I. (2002) The membrane characteristics of Plasmodium falciparum-infected and -uninfected heterozygous alpha(0)thalassaemic erythrocytes. *Br J Haematol*, 118, 663-70.

## 10. Annexe

### Description des techniques de laboratoire

#### 10.1. Détermination du Taux d'hémoglobine

Le taux d'hémoglobine a été mesuré par l'appareil HemoCue Hb201<sup>+</sup> microcuvette



Figure 19 : Analyseur et Microcuvette HemoCue

Source : Photo prise à Kenieroba

##### 10.1.1. Principe de la méthode

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

##### 10.1.2. Matériel et réactifs

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

##### 10.1.3. Technique

- cibler un doigt, bien désinfecté avec le tampon d'alcool à 70°;
- piquer en un coup sec avec une lancette ; nettoyer la première goutte de sang, presser le bout du doigt pour avoir une deuxième goutte ;

- Appliquer la microcuvette sur la goutte de sang. La quantité nécessaire est aspirée automatiquement dans la microcuvette par capillarité.
  - Après avoir enlevé minutieusement toute trace de sang présente à la surface de la microcuvette, la mettre sur son support et l'insérer ensuite dans le photomètre
- Le résultat s'affiche automatiquement en 45-60 secondes.



**Figure 20 : Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+**

Le résultat est exprimé en gramme d'hémoglobine par décilitre de sang (g/dl)  
Source : [www.hemocue.com](http://www.hemocue.com)

## **10.2. Détermination du groupe sanguin ABO**

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

### **10.2.1. Principe**

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

### **10.2.2. Matériel et réactifs**

- lame porte objet
- cure-dent
- coton
- alcool 70°
- lancette
- crayon de papier
- Sérums tests, ( anticorps) :  
anti-A (couleur bleu), anti-B (couleur jaune), anti-D (incolore)

### **10.2.3. Mode opératoire**

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

-cibler un doigt

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

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

- presser le bout du doigt pour avoir d'autres gouttes et déposer une goutte (d'une) 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.

### **10.2.4. Résultat**

Observer l'agglutination avec les sérums tests :

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

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

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

### **10.3. Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10**

#### **10.3.1. Principe de la procédure du d-10**

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

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

#### **10.3.2. Prélèvement et manipulation des échantillons**

##### **10.3.3. Type d'échantillon**

On utilise le Sang total.

##### **10.3.4. Précautions relatives au prélèvement des échantillons**

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

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

##### **10.3.5. Conservation des échantillons**

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

### **10.3.6. Préparation des échantillons**

Porter les tubes d'échantillons à température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant l'essai. Les échantillons sont stables à température ambiante pendant 1 jour. Aucune préparation particulière des échantillons n'est nécessaire. Il n'est pas nécessaire d'agiter les tubes avant le chargement. Les tubes d'échantillons sont placés dans le portoir à échantillons du D-10 puis mis dans le système D-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 2,0 mL d'échantillon, une prédilution est nécessaire. Pour prédiluer, pipeter 1,5 mL de solution de lavage/dilution dans un microtube de 1,5 mL étiqueté puis ajouter de l'échantillon de sang total. Boucher le tube et bien mélanger. Utiliser un adaptateur pour les microtubes de 1,5 mL.

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

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

##### 10.4.1. Matériel et réactifs:

- **Matériel**
  - Termocycler
  - Micropipette (1000µl, 200µl et 10µl)
  - Embout pour micropipette (1000µl, 200µl et 10µl)
  - Tube PCR 0.2ml
- **Réactifs**
  - Le Tris-HCl, pH 8.5
  - KCl
  - Betaine (Sigma)
  - dNTP ( ATP, GTP, TTP, CTP)
  - Taq polymerase
  - Les Amorces:
    - $\alpha_2/3.7F = 5'-CCCCTCGCCA AGTCCACC C-3'$
    - $\alpha_2R = 5'-AGACCAGGAAGGGCCGGTG-3'$
    - $3.7/20.5R = 5'-AAAGCACTCTAGGGTCCAG CG-3'$
    - $A3.7F = 5'-CTTTCCTACCCAGAGCCAGGTT -3'$
    - $3.7R1 = 5'-CCACTTTCCTCCTCCATCCC-3'$
    - $\alpha_2R1 = 5'-AGGAG GGCCCGTTGGGAGGC-3'$

##### 10.4.2. Procedure

###### 10.4.2.1. Première amplification :

Il s'agit d'une PCR multiplex visant à amplifier en même temps dans la même réaction, le fragment d'ADN portant la délétion 3.7 et le fragment d'ADN normal sans délétion. Ces deux fragments ont en commun une amorce ( $\alpha_2/3.7F$ ) la seconde amorce étant spécifique pour chaque fragment ( $\alpha_2R$  pour le fragment normal et  $3.7/20.5R$  pour le fragment délétère). Il consiste à amplifier approximativement 5ng d'ADN (2.5 µl d'ADN extrait avec le Qiagen) dans un volume réactionnel de 25 µl dont la composition est la suivante:

- 20 mmol/L de Tris-HCl pH 8.5
- 50 mmol/L KCl
- 1.5 mmol/L  $MgCl_2$
- 1 mol/L de Betaine
- 0.3µmol/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)

#### **10.4.2.2. Deuxième amplification**

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

Dans le tube de PCR N°1, les amorces spécifique pour le fragment normal (A3.7F et  $\alpha_2R1$ ) 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 $\mu$ l d'une dilution au 1 /20 est utilisé dans un volume réactionnel de 25  $\mu$ l de même composition que dans la première amplification.

Le programme utilisé pour l'amplification est le suivant :

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

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 5 minutes

Suivit de 35 cycle de :

- Dénaturation : 97°C pendant 45 secondes
- Renaturation : 60°C pendant 1 minute et 15 secondes
- Extension : 72°C pendant 2 minutes et 30 secondes

Une extension Final à 72°C pendant 5 minutes

#### **10.4.3. Migration du produit de PCR.**

On utilise un gel d'agarose à 2% auquel est incorporé du bromure d'ethidium (~ 3 $\mu$ 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.

#### **10.4.4. Interprétation**

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

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

scenarios sont possibles :

- 1- Le sujet est Normal : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et l'absence de bande dans le tube N° 2
- 2- Le sujet est  $\alpha$ -thalassémique hétérozygote : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et aussi la présence d'une bande de 1.8kb dans le tube N° 2
- 3- Le sujet est  $\alpha$ -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

### **10.5. Détection de la mutation 202 A/G responsable du déficit en G6PD par PCR**

#### **10.5.1. Extraction de l'ADN humain par le Kit QIAamp® (QIAGEN)**

##### **10.5.1.1. Principe**

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

##### **10.5.1.2. Matériel et composition du Kit QIAamp® (QIAGEN)**

###### **Matériel :**

- Ciseaux
- Gants stériles
- Pipettes de 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Embouts de 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Agitateur
- Chronomètre
- Congélateur
- Box de conservation
- Marqueur indélébile
- Plaque chauffante
- Racks pour les tubes
- Centrifugeuse
- Mouchoir
- Thermomètre
- Tube Ependorf de 1,5ml
- Tube de 2ml
- Colonne Qiagen munie de filtre
- Confettis.
- **Réactifs :**
- Kit QIAGEN
- Ethanol absolu (96-100%)

###### **Composition du Kit QIAamp® (QIAGEN)**

- Buffer ATL
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AE
- Protéinase K

**10.5.1.3. Prélèvement**

On recueille quelques gouttes de sang sur le confetti et laisse sécher à l'air libre à l'abri des poussières et du soleil.

**10.5.1.4. Procédure**

- Découper les spots de confettis imbibés de sang à l'aide de ciseaux et les introduire dans les tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Ajouter 180 µl de Buffer ATL et incubé à 85°C pendant 10 minutes,
- Centrifuger brièvement et ajouter 20 µl de protéinase K, mélangé à l'aide d'un Vortex
- Incuber les tubes et leur contenu à 56°C pendant une heure
- Centrifuger brièvement les tubes pour faire descendre le liquide suspendu à leur paroi,
- Ajouter 200 µl de Buffer AL dans chaque tube et les agiter à l'aide d'un vortex
- Incuber les tubes à 70°C pendant 10 minutes,
- Centrifuger les tubes et ajouter 200 µl d'éthanol absolu (96-100%) dans chaque tube,
- Agiter les tubes à l'aide d'un vortex puis centrifuger brièvement les tubes
- Transférer doucement tout le contenu des tubes dans une colonne Qiagen munie de filtre
- Fermer la colonne et la centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute.
- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un autre tube de 2 ml
- Mettre 500 µl de Buffer AW1 dilué avec de l'éthanol (19 ml de Buffer AW1 plus 25 ml de l'éthanol) dans la colonne,
- Centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute,
- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un autre tube de 2 ml
- Mettre 500 µl de Buffer AW2 dilué avec de l'éthanol (13 ml de Buffer AW2 plus 30 ml de l'éthanol) dans la colonne,
- Centrifuger à 14000 tours par minute pendant 3 minutes.
- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un tube eppendorf 1,5 ml.
- Mettre 160 µl de Buffer AE dans la colonne et incubé à la température ambiante de la salle pendant une minute,
- Centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute,
- Jeter la colonne et garder le filtrat contenu dans le tube eppendorf 1.5 ml à + 4°C (Ce filtrat contient l'ADN extrait et purifié)

### **10.5.2. Amplification de l'exon 4 du gène de la G6PD par PCR**

#### **10.5.2.1. Principe**

Le principe consiste à faire le diagnostic de la mutation ponctuelle au niveau du gène de la G 6PD 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 polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'=>3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié.

#### **10.5.2.2. Matériel et réactifs :**

##### **Matériel :**

- Gants stériles
- Tubes de 0. 2ml, 1. 5ml,
- Pipettes de 2µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Embouts de 2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Marqueur indélébile
- Chambre à PCR
- Racks pour les tubes
- Thermocycler
- Réfrigérateur

##### **Réactifs :**

##### **Les amorces de la première amplification**

- A2 : GTCTTCTGGGTCAGGGAT
- B2 : GGAGAAAGCTCTCTCTCC

##### **Les amorces de la deuxième amplification**

- NA4: CCTGTTCCCTCTGCCACA
- NB4: GGGGTCTCAAGAAGTAC
- Platinum super Mix

**10.5.2.3. Procédure de la PCR :**

Il s'agit d'une PCR en deux temps où le produit de la première réaction est amplifié dans un deuxième temps.

- 1- Déterminer le nombre N d'échantillon à traiter.
- 2- Prendre un tube Eppendorf 1.5 ml.
- 3- Mettre (N+1) x 22.5 µl de Platinum supermix.
- 4- Ajouter (N+1) x 0.1 µl de chacun des amorces **A2** et **B2** pour la première amplification ou **NA4** et **NB4** pour la deuxième amplification.
- 5- Bien mélanger.
- 6- Distribuer ce mélange dans les tubes PCR 0.2 ml déjà identifié en raison de 22.7 µl de mélange par tube PCR.
- 7- Mettre dans chacun des tubes PCR 2.5 µl d'ADN de l'échantillon correspondant pour la première amplification (1µl du produit de la première amplification de l'échantillon pour la deuxième amplification).
- 8- Placer les tubes PCR dans la machine de PCR et mettre en marche le programme A (Dénaturation initial 95°C pendant 3 min, 45 cycles de : 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 45 seconde, 72°C pendant 1 min. Extension final 72 °c pendant 5 min) pour la première amplification et le programme B (Dénaturation initial 95°C pendant 3 min, 35 cycles de : 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 45 seconde, 72°C pendant 1 min. Extension final 72 °c pendant 5 min) pour la deuxième amplification.

**10.5.2.4. Programme de la première amplification :**

- Dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes

Puis 45 cycles de :

- Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
- Hybridation à 60°C pendant 45 secondes
- Extension à 72°C pendant 1 minute
- Extension finale à 74°C pendant 5 minutes
- Conservation à + 4°C pendant un temps indéterminé

**10.5.2.5. Programme de la deuxième amplification :**

- Dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes

Puis 45 cycles de :

- Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes

- Hybridation à 60°C pendant 1 minute
- Extension à 72°C pendant 45 secondes
- Extension finale à 74°C pendant 5 minutes
- Conservation à + 4°C pendant un temps indéterminé

### **10.5.3. Recherche de la mutation 202 G → A par digestion enzymatique**

#### **10.5.3.1. Matériel et Réactifs :**

##### **Matériel :**

- Tube eppendorf
- Tubes PCR
- Bain marie
- Pipettes de 2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Embouts de 2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl

##### **Réactifs :**

- Eau pour biologie moléculaire
- Solution de BSA 10X
- Solution de buffer K 10K
- Enzyme Hsp92II

#### **10.5.3.2. Procédure de la digestion enzymatique**

- Déterminer le nombre N d'échantillon à traiter,
- Mettre Nx13 µl d'eau pour Biologie moléculaire dans un tube eppendorf 1.5 ml,
- Ajouter Nx3 µl de la solution buffer K 10X,
- Ajouter Nx3 µl de la solution de BSA 10X,
- Ajouter Nx1 µl de l'enzyme Hsp92II,
- Bien mélanger et distribuer 20 µl de ce mélange sur chacun des produits de la deuxième amplification dans les tubes PCR,
- Incuber l'ensemble à 37°C pendant au moins 2 heures.

#### **10.5.3.3. Révélation et interprétation**

On utilise un gel d'agarose 1,5% au bromure d'éthidium (3ml/100ml)

**10.5.3.3.1. Préparation du gel**

**10.5.3.3.1.1. Matériel et réactifs :**

**Matériel :**

- Balance
- Erlenmeyer
- Moule
- Micro onde
- Tube 100 ml
- Pipettes de 10 µl,
- Embouts de 10 µl
- Peignes pour gel

**Réactifs :**

- Agarose ultra pure GIBCO BRL
- Solution de Bromure d’Ethidium (Sodium)
- TBE 0.5X

**10.5.3.3.1.2. Procédure :**

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

**10.5.3.3.1.3. La migration :**

**10.5.3.3.1.3.1. Matériel et réactifs :**

**Matériel :**

- Bac de migration
- Appareil photo UV
- Film polaroid
- Parafilm
- Générateur

-Source de lumière UV

**Réactifs :**

-TBE 0.5X

-Dye (buffer de chargement)

-Marqueur de poids moléculaire

**10.5.3.3.1.3.2. Procédure :**

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

**10.5.3.3.1.3.3. Interprétation de la photographie**

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

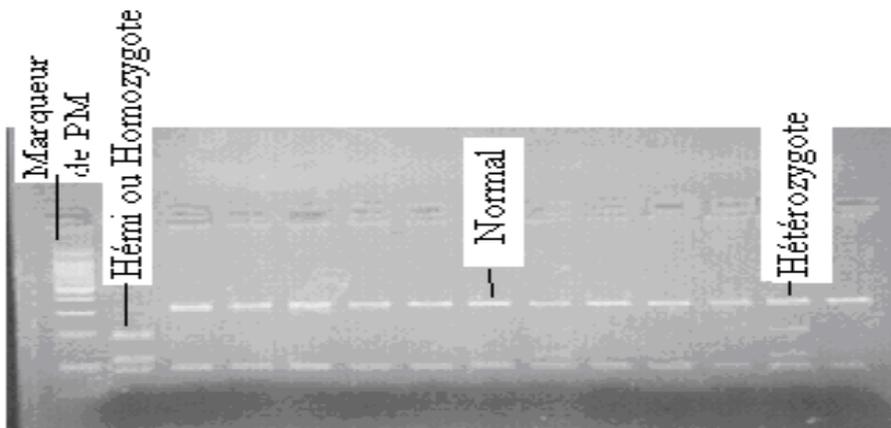


Figure 21 : photographie d'une bande d'ADN de la G6PD après digestion