

CD =	Classe de différenciation
CHU =	Centre hospitalier universitaire
CRP =	Protéine C réactive
CSA =	Chondroïtin Sulfate A
CSREF =	Centre de Santé de Référence
EDM =	Electron-Dense-Material
EDTA =	Ethylène Diamine Tétracétique
FM =	Frottis mince
FMPOS =	Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
GE =	Goutte épaisse
GPIV =	Glycoprotéine IV
G6PD =	Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase
Hb =	Hémoglobine
HbA =	Hémoglobine Adulte
HbC =	Hémoglobine C
CLHP =	Chromatographie liquide à haute performance
HbS =	Hémoglobine S
HbF =	Hémoglobine Fœtale
ICAM1 =	Inter Cellular Adhesion Molecule-1
Ig G =	Immunoglobuline G
IL =	Interleukine
KAHRP =	Knob-Associated Histidin-Rich Protein
NO =	Monoxyde d'azote
OMS =	Organisation Mondiale de la Santé
PCR =	Polymérase Chain Réaction
PECAM-1 =	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PfEMP-1 et 2 =	Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 et 2
PfHRP-1 =	Plasmodium falciparum Histidin Rich Protein-1
PHHF =	Persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale

- pH** = **Potentiel d'hydrogène**
RESA = Ring Erythrocyte Surface Antigen
TNF = Tumor Necrosis Factor
VCAM-1 = Vascular Cell Adhesing Molecular-1
VWF = Von Willebrand Factor

Table des Matières

Ministère de l'Enseignement	République du Mali.....1
.....1	1
.....1	1
Présentée et soutenue publiquement le/...../2010.....1	1
Thèse Pharmacie	

PAR AMADOU DJIGUIBA.....	1
.....	1
CHU= Centre hospitalier universitaire	9
CRP = Protéine C réactive.....	9
PfEMP-1 et 2 = Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 et 2.....	9
pH = Potentiel d'hydrogène.....	10
1. INTRODUCTION.....	13
2. OBJECTIFS.....	15
2.1. OBJECTIF GÉNÉRAL.....	15
2.2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.....	15
3. GENERALITES.....	16
3.1. LE PALUDISME.....	16
3.1.1. Définition du paludisme :.....	16
3.1.2. Classification des parasites du paludisme :.....	19
3.1.3. Transmission du paludisme:.....	19
3.1.4. Cycle évolutif de P. falciparum [33].....	19
a) Chez l'homme :.....	19
b) Chez l'anophèle :.....	20
3.1.5. Manifestations cliniques du paludisme [33].....	24
3.1.5.1. La Primo-infestation :.....	24
3.1.6. Critère de gravité du paludisme OMS 2000 [35].....	25
3.1.7. Physiopathologie du paludisme grave [20].....	26
3.1.7.1 La séquestration :.....	26
c) Le Phénomène de l'auto- agglutination :.....	26
d) Le Phénomène de « rosetting ».....	26
e) Le Phénomène de cytoadhérence :.....	27
3.1.7.2. Mécanisme Immunologique :.....	28
3.1.8. Diagnostic biologique du paludisme :.....	28
3.1.8.1. La microscopie :.....	28
a) La goutte épaisse (GE) :.....	28
b) Le frottis mince (FM) :.....	29
3.1.8.2. Les tests de diagnostic rapide :.....	29
3.1.8.3. La PCR (Polymerase Chain Reaction) :.....	29
3.2. Généralité sur l'Hémoglobine S:.....	29
Histoire Naturelle de la Forme Majeure [36].....	29
a) La période néonatale (0 à 3 mois) :.....	29
b) La période des 5 premières années de vie :.....	30
c) La période de la seconde enfance (5 à 15 ans) :.....	30
d) A partir de 20 ans et chez l'adulte :.....	30
3.2.1. Transmission de l'HbS :.....	31
3.2.2. Distribution Géographique :.....	32
3.2.3. Pathologie et physiopathologie [13- 28- 31]	34
a) La Polymérisation de l'hémoglobine S :.....	35
b) Falciformation du globule rouge :.....	36
c) Le drépanocyte et la circulation :.....	37
d) Rôle de l'endothélium vasculaire :.....	37
e) Les conséquences cliniques des phénomènes cellulaires et vasculaires :	38
f) Rôle de certaines hémoglobines :.....	38
g) Rôle des facteurs nutritionnels :.....	39
3.3. RELATION PALUDISME- DREPANOCYTOSE.....	41

3.4. GENERALITES SUR ALPHA- THALASSEMIE.....	44
3.4 1. GENERALITES.....	44
3.4.2. Alpha- thalassémie et paludisme :.....	45
4. METHODOLOGIE.....	47
1.4 Site d'étude :.....	47
2.4 Période d'étude :.....	48
3.4 Type d'étude :.....	48
4.4 Population d'étude :.....	49
5.4 Critères d'inclusion :.....	49
6.4 Critères de non-inclusion :.....	49
7.4 Definition des cas :.....	49
Paludisme simple:.....	49
Paludisme grave:.....	49
8.4 Paramètres mesurés :.....	50
4.2. Techniques d'analyses biologiques :.....	51
4.2.1.1 Principe :.....	51
4.2.1.2.1 Prélèvement :.....	52
4.2.2 Extraction de l'ADN humain par le Kit QIAamp® (QIAGEN).....	53
a) Matériels :.....	55
b) Réactifs :.....	55
3- Modes opératoires :.....	55
a) Préparations des contrôles de qualité :.....	55
b) Préparation des échantillons de patients :.....	56
c) Exécution d'une série :.....	56
4- Résultats :.....	56
4.2.4 Détection de la délétion 3. 7- kb responsable de l'alpha- thalassémie par PCR.....	56
1. Matériels et réactifs :.....	57
a) Matériels :.....	57
b) Réactifs :.....	57
2. Procédure :.....	57
a) Première amplification :.....	57
b) Deuxième amplification :.....	58
c) Migration du produit de PCR :.....	58
d) Interprétation :.....	59
4.3 Analyse des données :.....	59
5. RESULTATS.....	60
5.1 Résultats descriptifs :.....	60
5.1.1 Caractéristiques Socio-démographiques :.....	60
6. DISCUSSION.....	68
7. CONCLUSION.....	71
.....	72
8. RECOMMADATIONS.....	72
9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	73

1. INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à la présence et à la multiplication dans l'organisme humain d'un hématozoaire du genre plasmodium transmis par l'anophèle femelle. Quatre espèces de genre plasmodium sont inféodées à l'homme : *P vivax*, *P ovale*, *P malarie* et *P falciparum*. Mais c'est *P. falciparum* qui est responsable des formes les plus graves et de la presque totalité des cas de décès. Selon l'OMS, 300 à 500 millions de cas de paludisme sont enregistrés chaque année dont 1,5 à 2,7 millions des cas de décès. Cet état fait du paludisme, la parasitose la plus importante [34]. Plus de 90% des cas et décès sont concentrés en Afrique subsaharienne. Au Mali il constitue la première cause de mortalité (13%) et de morbidité (15,6%) dans la population générale [8]. En Afrique subsaharienne, particulièrement dans les zones rurales, chaque enfant est susceptible de faire un épisode de paludisme. L'incidence élevée de l'hémoglobine S (HbS) dans certaines populations a suggéré que cette hémoglobinopathie conférerait un avantage sélectif en faveur des individus qui en sont porteurs. Cet avantage s'exercerait comme une résistance accrue aux manifestations graves dues au *Plasmodium falciparum*. Les arguments positifs en faveur de cette hypothèse sont émis dans une revue récente [27]. Ainsi il a été observé qu'un certain nombre d'enfants résistent à l'infection palustre. Cette résistance au paludisme fut observée chez les sujets porteurs d'hémoglobine S ou déficitaire en G6PD [32].

C'est ainsi que plusieurs études portant sur l'hémoglobine S en régions d'endémies palustres ont confirmé l'effet protecteur de cette hémoglobinoase contre le paludisme [6]. L'état hétérozygote AS fut la première des situations polymorphiques du globule rouge à être cité dans la protection contre le paludisme grave [3]. Williams et *al.* en

2005 dans une étude au Kenya ont rapporté une réduction du risque de 90% contre les formes graves de paludisme chez les sujets porteurs du gène de l'HbS. Plusieurs arguments ont été avancés pour expliquer cette protection. Parmi eux on pourrait citer :

- l'élimination rapide et précoce des hématies parasitées contenant l'HbS.
- une réduction du phénomène de cytoadhérence [38].

Les thalassémies sont des anomalies de synthèse de l'Hb caractérisées par un défaut quantitatif de synthèse de la globine.

Les plus connues sont l'alpha thalassémie et la beta thalassémie. La protection conférée par les thalassémies reste encore faiblement explorée faute d'étude de cohorte. Les seuls arguments en faveur de cette protection contre les formes graves de paludisme reposent sur la grande fréquence de l'alpha thalassémie dans les zones d'endémie palustre ou ayant connu une histoire d'endémie [16, 2, 22].

Dans le contexte actuel, il n'est pas rare de voir les deux anomalies génétiques chez un même individu [4]. Malgré l'effet protecteur communément admis pour les deux polymorphismes érythrocytaires, l'effet protection des sujets porteurs à la fois ces deux anomalies demeurent une question d'actualité. Récemment, Williams et *al* à travers une étude conduite au Kenya ont démontré que l'hémoglobine S et l'alpha – thalassémie protégeaient chacun contre le paludisme et que l'association hémoglobine S et alpha-thalassémie était désavantageuse pour les individus qui portent les deux tares [37].

Le Mali est un pays de forte prévalence d'hémoglobine S mais aussi d'alpha-thalassémie, et à notre connaissance aucune étude portant sur l'association hémoglobine S et alpha-thalassémie et la protection contre le paludisme grave n'a été réalisée. Notre étude se propose de déterminer la fréquence et l'impact de l'association hémoglobine S et alpha-thalassémie sur l'évolution du paludisme dans la ville de Kangaba et le village de Kela.

2. OBJECTIFS

2.1. OBJECTIF GÉNÉRAL

Etudier l'impact de l'association hémoglobine S et alpha- thalassémie sur l'évolution du paludisme.

2.2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

- Déterminer la fréquence de l'hémoglobine AS dans la population d'étude.
- Déterminer la fréquence de l'alpha- thalassémie dans la population d'étude.
- Déterminer la prévalence de l'association HbAS et l'alpha- thalassémie dans la population drépanocytaire.
- Evaluer l'effet de protection de l'hémoglobine AS et de l'alpha- thalassémie contre le paludisme grave.
- Evaluer l'effet de protection de l'association de l'hémoglobine AS et alpha- thalassémie dans la population d'étude.

3. GENERALITES

Dans cette partie, nous allons faire une présentation du paludisme (ou malaria). Cette présentation générale va porter sur la définition de la maladie, ses modes de transmission, les symptômes de la maladie, les chiffres clés et les zones d'infections de la maladie et les groupes à risques.

3.1. LE PALUDISME

3.1.1. Définition du paludisme :

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à la présence et à la multiplication dans l'organisme d'un hématozoaire du genre plasmodium transmis par l'anophèle femelle [34].

Sur plus d'une centaine d'espèces de plasmodium parasitant les mammifères, les rongeurs, les oiseaux ou même les batraciens, seules quatre sont spécifiques à l'homme et peuvent déclencher la maladie sous des formes plus ou moins graves.

Ce sont :

- *le Plasmodium falciparum*, qui est à l'origine de la fièvre tierce maligne (espèce prédominante et responsable de 90% de mortalité due au paludisme) ;
- *le Plasmodium vivax* et *le Plasmodium ovale* qui sont à l'origine de la fièvre tierce bénigne avec des rechutes jusqu'à 5 ans après la primo- infection ;
- *le Plasmodium malarie*, qui est à l'origine de la fièvre quarte, et qui peut provoquer des rechutes jusqu'à 20 ans après la primo- infection.

Avec 2,5 milliards de personnes exposées soit 40% de la population mondiale, 300 à 500 millions de malades dont 10 millions de cas graves, et 1,5 à 2,7 millions de

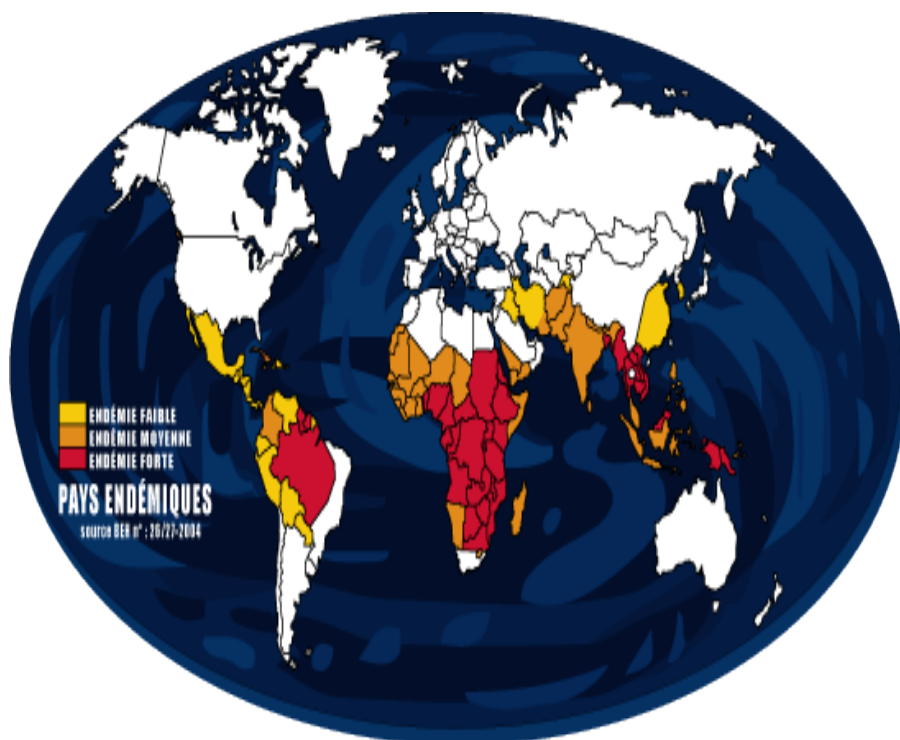
décès par an, le paludisme est la plus importante parasitose dans le monde. Il constitue la première cause de mortalité et de morbidité en Afrique subsaharienne où environ 90% de ses victimes sont enregistrées, 10% en Asie et à l'Ouest de l'Océanie, et moins de 1% en Amérique [34].

Environ 110 millions d'Africains vivent dans des zones exposées au risque d'épidémie de paludisme ; l'OMS estime que 803000 enfants de moins de 5 ans en Afrique subsaharienne sont morts du paludisme en 2000 et le nombre annuel de décès directement imputables au paludisme est estimé entre 1,1 et 1,3 millions [25].

Selon le rapport de l'OMS 2005 sur le paludisme en Afrique, le paludisme serait responsable de près de 20% de décès d'enfants de moins de 5 ans en Afrique et le nombre annuel de décès infantiles dûs au paludisme se situe entre 75000 et 200000. Il serait également responsable de 25 à 40% de toutes les consultations externes et de 20 à 50% des hospitalisations dans les pays endémiques [25].

Au Mali, le paludisme serait responsable de 14 à 20% de mortalité juvénile-infantile [10] et de 36% des fièvres chez les enfants de moins de 10 ans pendant la saison des pluies ainsi que de 15% des hospitalisations des adultes [15]. L'espèce *Plasmodium falciparum* prédomine avec 85 à 90% de la formule parasitaire, suivie des espèces *Plasmodium malariae* (10 à 14%), *Plasmodium ovale* (1%), et un cas de *Plasmodium vivax* au Nord [5].





Carte actualisée en Octobre 2004 - Source BEH

Figure 1: Répartition du paludisme dans le monde (source:travelsante. com [14]).

3.1.2. Classification des parasites du paludisme :

Les parasites responsables du paludisme appartiennent :

- Au Règne des Protistes,
- A l'Embranchement des Apicomplexa (sporozoaires) caractérisés par la présence d'un complexe apical facilitant la pénétration dans la cellule hôte
- A l'Ordre des Haemosporoda
- A la Famille des Plasmodiidae
- Au genre Plasmodium
- Aux espèces : *falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale*.

3.1.3. Transmission du paludisme:

Il y a trois modes de transmission du paludisme :

- La transmission par piqûre d'un moustique femelle (anophèle).
- La transmission par transfusion sanguine ou par greffe d'organe.
- La transmission trans- placentaire de la mère à l'enfant.

3.1.4. Cycle évolutif de *P. falciparum* [33]

a) Chez l'homme :

L'homme est contaminé par la piqûre infestante de l'anophèle femelle. Les formes infectantes du parasite (sporozoïtes) contenues dans la salive sont injectées dans le tissu sous-cutané. A travers le sang ils atteignent le foie où chaque sporozoïte pénètre dans un hépatocyte. Ils s'y reproduisent de façon asexuée : c'est la schizogonie hépatique ou extra-érythrocytaire. Cette schizogonie aboutit à un trophozoïte endocytoplasmique qui grossit et dont le noyau se divise plusieurs fois. L'hépatocyte parasité éclate et les mérozoïtes libérés pénètrent dans la circulation des capillaires le jouxtant. Chaque mérozoïte va pénétrer dans une hématie.

Dans chaque hématie infestée par un mérozoïte va se dérouler un cycle de reproduction asexuée. Le passage par les formes trophozoïtes jeunes (forme en anneau), puis schizonte mûr à nombre de noyaux défini: c'est la schizogonie érythrocytaire ou endo-érythrocytaire.

A l'issue de chaque cycle, les hématies parasitées éclatent de façon généralement synchrone et les mérozoïtes libérés envahissent des hématies saines. Plusieurs cycles se succèdent. Ce cycle dure 48 à 72 H en fonction des espèces.

Après environ une semaine, certains mérozoïtes vont se distinguer en commençant le cycle sexué du parasite; les uns vont devenir des gamétocytes mâles, les autres deviendront des gamétocytes femelles.

NB : Durant toute la partie du cycle de développement du parasite chez l'homme, celui-ci est sous forme haploïde.

b) Chez l'anophèle :

Au cours de la piqûre, l'anophèle ingère des hématies parasitées, seuls les gamétocytes évolueront.

Dès leur arrivée dans l'estomac de l'anophèle, les gamétocytes mâles subissent l'exflagellation et donnent des gamètes mâles mobiles. Chaque gamétocyte femelle mûrit pour donner un gamète femelle volumineux et immobile.

La fécondation de chaque gamète femelle par un gamète mâle donne autant de zygotes appelés ookinètes (de oo = oeuf et kino = mobile) d'aspect vermiforme (10 µm x 3 - 4 µm). Les ookinètes sont déformables (aspect amoéboïde) et se fixent aux cellules de la paroi stomacale si l'espèce d'anophèle convient au parasite. Les ookinètes s'insinuent entre les cellules de la paroi stomacale du moustique et vont se localiser à la face externe de l'estomac, ils deviennent alors des oocystes.

La durée totale entre le repas contaminant du moustique et la sortie des ookinètes est de l'ordre de 24 heures.

NB : La forme diploïde du parasite est observée seulement au cours de cette brève période s'étendant de la fécondation du gamétocyte femelle par le gamétocyte mâle à la sporogonie.

A l'intérieur de l'oocyste vont se former des sporocystes qui donneront plusieurs centaines de sporozoïtes.

A maturité, les oocystes éclatent et les sporozoïtes sont libérés dans l'hémolymphe, en 24 heures environ, la majorité d'entre eux va se concentrer dans les glandes salivaires. Lors de la piqûre d'un humain, l'anophèle injectera de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de sporozoïtes dans le sang humain.

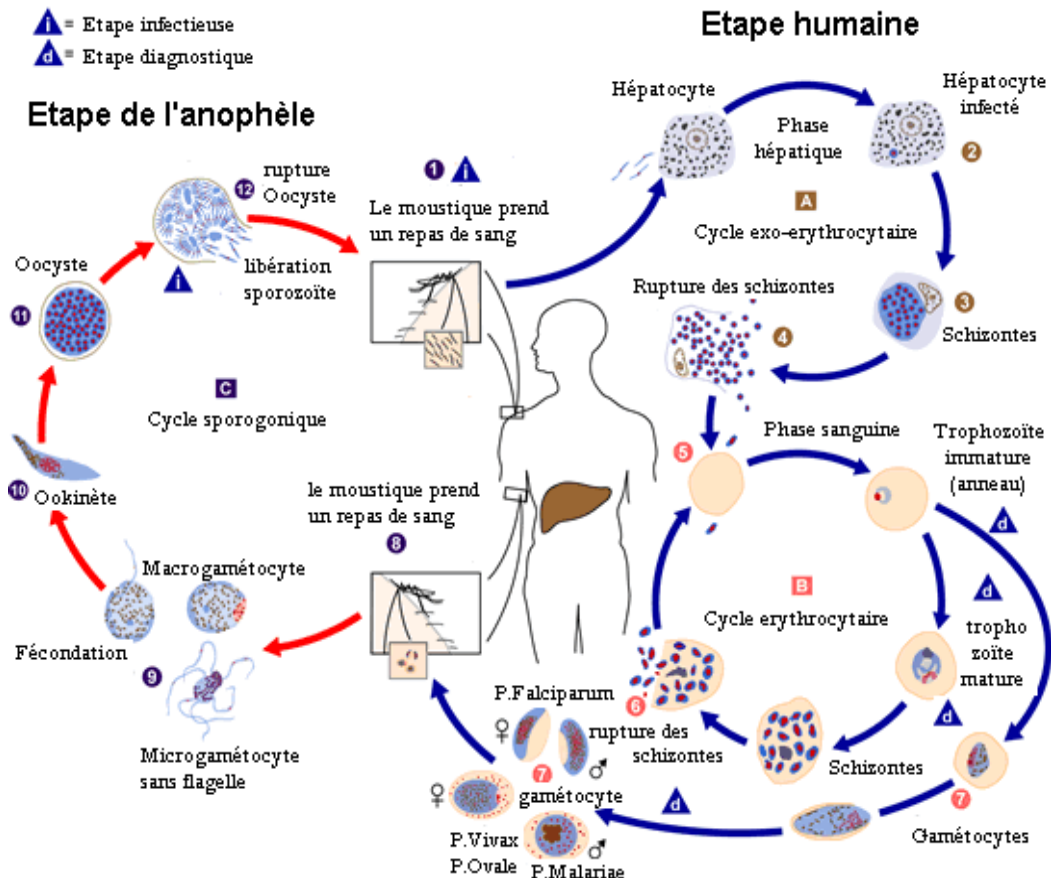


Figure 2: Cycle de développement du plasmodium source: National Center for Infectious Diseases, Division of Parasitic Diseases [Department of Health and

3.1.5. Manifestations cliniques du paludisme [33]

3.1.5.1. La Primo-infestation :

Phase d'incubation :

Entre une et plusieurs semaines après la piqûre infectante, elle correspond à la schizogonie hépatique et aux premiers cycles érythrocytaires; pas de signe clinique.

Phase d'invasion :

Cette phase est caractérisée par le syndrome pseudo- grippal avec fièvre continue au début, accompagnée de myalgies, céphalées, courbatures. Chez l'enfant on observe des troubles digestifs: nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales et hépatomégalie.

Phase d'état :

Elle Correspond aux schizogonies érythrocytaires, la fièvre est intermittente en principe rythmée par l'éclatement des schizontes mûrs et le déversement du pigment palustre pyrogène dans le sang.

On distingue deux types de fièvre :

- fièvre tierce: accès les 1er, 3ème, 5ème jour etc... soit un rythme de 48 heures,
- fièvre quarte: accès les 1er, 4ème, 7ème jour etc.... soit rythme de 72 heures.

- Chaque accès palustre est caractérisé par la succession de "frisson puis chaleur puis sueur", l'ensemble dure de 10 à 12 heures et est suivi d'une apyrexie. En principe une dizaine d'accès palustres se suivent pour constituer une crise de paludisme. Quand un sujet fait de nouveaux accès après guérison des précédents, il peut s'agir :
 - soit de ré- infection (nouvelle piquête d'anophèle infectée),
 - soit de recrudescence (augmentation de la parasitémie jusqu'à un niveau décelable cliniquement chez un sujet après traitement incomplet ou inefficace, ou chez un sujet semi- immun),
 - soit de rechute (poussée de parasitémie à partir d'hypnozoïtes hépatiques dans le cas de *P. vivax* et de *P. ovale*).

3.1.6. Critère de gravité du paludisme OMS 2000 [35]

Les formes graves de paludisme à *P. falciparum* sont définies par la présence dans le sang de trophozoïtes de *P. falciparum* associée à au moins un des critères suivants :

- **Paludisme cérébral ou neuropaludisme** : score de Glasgow inférieur ou égal à 9 ou score de Blantyre inférieur ou égal à 2
- **Trouble de conscience** : score de Glasgow compris entre 9 et 15 ou score de Blantyre compris entre 2 et 5,
- **Convulsions répétées** : fréquence supérieure à une fois par 24 heures,
- **Prostration,**
- **Syndrome de détresse respiratoire,**
- **Ictère,**
- **Acidose métabolique** : taux de bicarbonates plasmatiques inférieur à 15 mmol/L,
- **Anémie sévère** : taux d'hémoglobine inférieur à 5g/dl ou hématocrite inférieur à 15%
- **Hyperparasitemie** : parasitemie supérieure ou égal à 4% chez les sujets non-immuns et 20% chez les sujets immuns.

- **Hémoglobinurie macroscopique**
- **Insuffisance rénale :**
 - diurèse inférieure à 40ml/24h ou créatinémie supérieure à 265 mmol chez l'adulte
 - diurèse <12ml/Kg/24h ou Créatinémie trop élevée pour l'âge de l'enfant
- **Collapsus circulatoire :** tension artérielle systolique inférieure à 60mmHg avant 5 ans ou inférieure à 8mmHg après 5 ans ;
- **Saignement anormal**
 - Œdème pulmonaire

3.1.7 Physiopathologie du paludisme grave [20]

Les concepts physiopathologiques du paludisme grave font intervenir trois types de modifications physiopathologiques :

- la séquestration des hématies parasitées,
- l'activation du système immunitaire à médiation cellulaire et la libération des cytokines
- pro- inflammatoires.

3.1.7.1 La séquestration :

Elle aboutit à une obstruction des micros capillaires par les globules rouges. Pour l'expliquer trois mécanismes ont été identifiés :

1. l'auto- agglutination,
2. le « rosetting », et la cytoadhérence.

c) **Le Phénomène de l'auto- agglutination :**

L'auto- agglutination des hématies parasitées a été observée sur de nombreuses souches de *P. falciparum* étudiées en culture au laboratoire. Il s'agit d'un regroupement des érythrocytes infectés entre eux pour former des micro agrégats susceptibles d'obstruer les capillaires profonds. Ce phénomène a été observé chez les patients porteurs de fortes parasitemies en dehors de tout phénotype d'adhésion.

d) Le Phénomène de « rosetting »

Les hématies parasitées ont la faculté d'attirer au tour d'elles des hématies saines pour les infester en formant des rosettes : c'est le phénomène de rosetting. Il y a donc formation d'un agrégat par une hématie parasitée autour de laquelle adhèrent des hématies normales. Ce phénomène a été bien étudié *in vitro*.

Il varie d'une souche plasmodiale à l'autre. < Il a été montré que seul le niveau élevé des rosettes et l'absence d'anticorps anti-rosettes sont corrélés positivement au neuropaludisme >.

La formation de rosettes constitue un mode de protection pour le parasite contre le système phagocytaire de la rate et exerce un effet délétère pour l'hôte par blocage du flux sanguin.

e) Le Phénomène de cytoadhérence :

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

Parmi ces protéines parasitaires associées aux knobs, PfEMP-1 est le ligand parasite le mieux caractérisé. PfEMP-1 interagit avec des récepteurs spécifiques au niveau des cellules endothéliales vasculaires et du syncytiotrophoblaste. Comme l'ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1), le CD36, le VCAM-1 (Vascular Cell Adhesing Molecular-1 et 2) le CD31 ou PCAM-1, Le CSA (Chondroitin

Sulfate A), la selectin [9] **etc...** L'adhésion des hématies parasitées à ces récepteurs entraîne leur séquestration à l'intérieur de la micro circulation.

La séquestration permet aux hématies parasitées d'échapper à la clearance splénique et contribue à la gravité du paludisme.

Elle entraîne aussi une obstruction des micros vaisseaux surtout au niveau cérébral, ce qui est cité comme principale cause du neuropaludisme. La séquestration entraînerait aussi une dilatation des micros vaisseaux par libération du monoxyde d'azote (NO) : Ce qui est responsable d'œdème cérébral et pulmonaire.

3.1.7.2. Mécanisme Immunologique :

Le système à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes CD4 et les macrophages jouent un rôle très important dans la pathogénie du neuropaludisme. Les antigènes plasmodiaux facilitent l'activation des macrophages et la libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par ces derniers (Interféron gamma, TNF alpha, IL-1, IL-6...) Parmi les médiateurs macrophagiques, le TNF α est un acteur important. Expérimentalement l'injection de TNF α chez les souris reproduit la plupart des manifestations cliniques et biologiques du paludisme grave. On pense aussi que la libération du TNF α stimulerait l'expression des récepteurs des knobs au niveau endothélial, donc la séquestration.

Il faut rappeler que les fièvres observées au cours des accès palustres seraient dues à la libération dans le sang de l'hémozoïne (substance pyrogène résultant de la dégradation de l'hémoglobine par le plasmodium) après éclatement des schizontes. Cette fièvre peut également être due aux cytokines pro-inflammatoire comme ; TNF α , IL-1, IL-6

3.1.8. Diagnostic biologique du paludisme :

Plusieurs méthodes sont utilisées :

3.1.8.1. La microscopie :

Elle est basée sur l'observation au microscope en immersion à l'objectif 100 des différents stades du parasite (gamétocyte, trophozoïte, schizonte) dans le sang après coloration au Giemsa et séchage. Deux techniques sont utilisées.

a) La goutte épaisse (GE) :

C'est la technique de diagnostic de référence du paludisme. Il s'agit d'une technique de concentration des parasites sur lame à partir d'une goutte de sang capillaire suivie de coloration au Giemsa et de l'observation au microscope.

b) Le frottis mince (FM) :

C'est la technique de référence pour le diagnostic d'espèce, car elle permet non seulement de voir les parasites mais aussi d'apprécier la forme des GR parasités.

3.1.8.2. Les tests de diagnostic rapide :

Ce sont des tests basés sur les réactions anticorps- antigènes suivies de la révélation du complexe Ag- Ac avec un chromogène. On a: OptiMAL- IT (PfLDH) et Parasight F (PfHRP II).

3.1.8.3. La PCR (Polymerase Chain Reaction) :

C'est une technique de biologie moléculaire basée sur la sélection puis l'amplification d'un gène spécifique du parasite à partir d'amorces spécifiques de ce gène. Elle a l'avantage de pouvoir détecter une souche spécifique du parasite par des amorces spécifiques de gène ou après digestion du produit de PCR avec des enzymes de restriction spécifiques.

3.2. Généralité sur l'Hémoglobine S:

Histoire Naturelle de la Forme Majeure [36]

L'anémie falciforme ou drépanocytose est une maladie génétique qui touche des millions de personnes, principalement d'origine africaine.

L'histoire naturelle de la drépanocytose se caractérise par une anémie chronique et des épisodes de crises douloureuses vaso-occlusives qui reconnaîtront très souvent un facteur déclenchant. Schématiquement, on distingue 4 périodes dans la vie du drépanocytaire majeur.

a) La période néonatale (0 à 3 mois) :

C'est la période asymptomatique de la maladie. C'est également la période où le diagnostic doit être fait en vue d'une prise en charge du drépanocytaire avant l'apparition des complications. Ce silence clinique est dû à l'effet protecteur du taux élevé de l'HbF qui inhibe la polymérisation de l'oxyhémoglobine S dans le globule rouge.

b) La période des 5 premières années de vie :

C'est la période où la morbidité et la mortalité dues à la maladie sont plus importantes: Fréquence des crises comprise entre 2 et 5 par an avec des hospitalisations fréquentes, mortalité au tour de 50%. Elle est caractérisée par une grande fréquence des infections graves (méningites, septicémies), une grande fréquence des séquestrations spléniques responsables d'anémies aiguës et de collapsus cardiovasculaires mortels et des crises douloureuses ostéo-articulaires réalisant le plus souvent des dactylites ou "syndromes pieds-mains"

c) La période de la seconde enfance (5 à 15 ans) :

Au cours de cette période, les crises douloureuses ostéo-articulaires dominent le tableau clinique. C'est la période où les accidents vasculaires cérébraux (AVC) par obstruction partielle ou complète des vaisseaux de la base du crâne et les syndromes pulmonaires aigus sont fréquents. Ces complications sont redoutables car elles peuvent mettre en jeu le pronostic vital et elles sont récidivantes. Le risque infectieux aigu grave est moindre, mais l'incidence de certaines complications comme l'ostéomyélite devient élevée.

La période de la seconde enfance est la période où le dépistage actif des complications dégénératives doit commencer.

d) A partir de 20 ans et chez l'adulte :

Les crises anémiques et les complications infectieuses sont plus rares.

Les crises douloureuses sont également rares mais elles représentent la première cause d'hospitalisation. C'est la période des atteintes dégénératives engageant le pronostic vital (insuffisance cardiaque, insuffisance rénale, insuffisance respiratoire, complications de lithiases biliaires) ou fonctionnel (rétinopathie, ostéonécrose de hanche, ulcère de jambe,...).

Le drépanocytaire hétérozygote est en règle générale asymptomatique.

Toute manifestation doit faire rechercher une pathologie associée: syndrome thalassémique, enzymopathie ou déficit membranaire le plus souvent. Les quelques exceptionnels cas de crises aiguës qui ont pu être rattachés à la drépanocytose hétérozygote ont été observés dans des circonstances très particulières : rhabdomyolyse aiguë par effort physique extrême, séjour en très haute altitude (plus de 3500 m).

3.2.1. Transmission de l'HbS :

L'HbS, comme les autres anomalies de l'hémoglobine, portées par la chaîne bêta, est transmise selon le mode Mendélien codominant.

Lorsque l'un des parents est normal et l'autre hétérozygote pour l'HbS, la moitié des enfants seront hétérozygotes. Lorsque les deux parents sont hétérozygotes, 50% des enfants seront hétérozygotes, 25% seront homozygotes et 25% normaux.

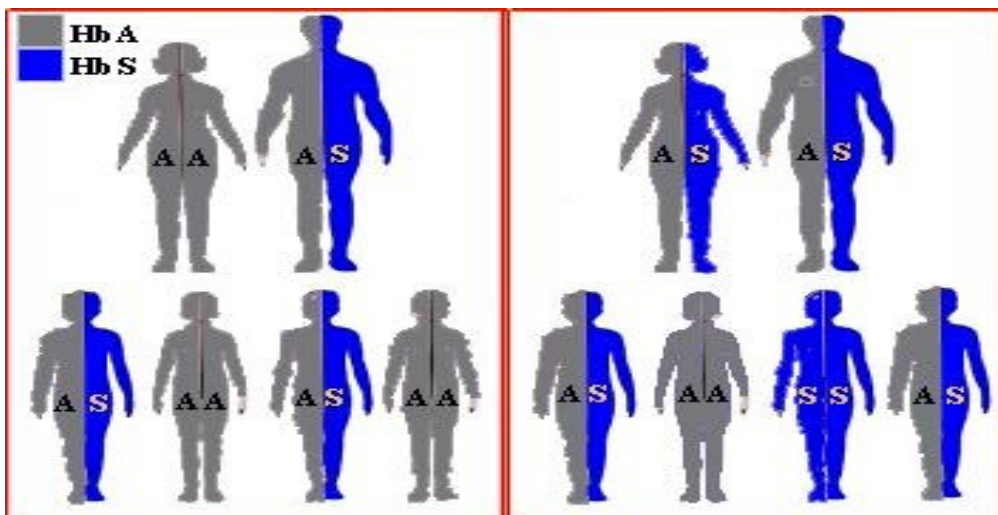


Figure 3: <file:///A:/Transmission%20HbS.htm>

3.2.2. Distribution Géographique :

Parmi les maladies génétiques, la drépanocytose est la plus répandue dans le monde. En Afrique centrale 25 % de la population est porteuse du trait drépanocytaire, 15 à 20% en Afrique de l'Ouest ; 10 à 12% dans les DOM antillais ; 1 à 15% dans les régions méditerranéennes. En France, 220 à 250 nouveau-nés drépanocytaires sont dépistés chaque année (160 en métropole, 90 dans les DOM) et bénéficient d'une prise en charge.

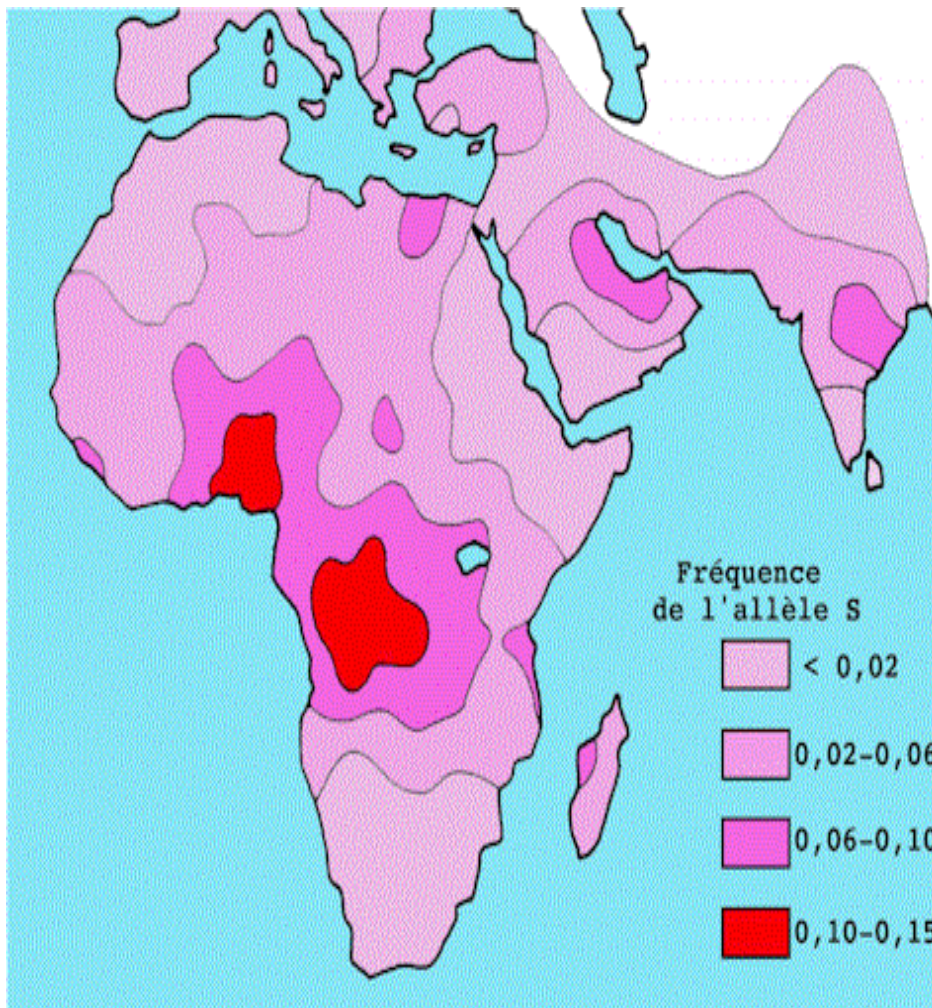


Figure 4: Population atteinte de l'anémie falciforme en Afrique, principal continent touché par cette maladie. La fréquence de l'allèle S en Afrique et dans certaines régions du monde (source : www.sciences.uqam.ca) [12].

Les travaux épidémiologiques les plus significatifs conduits entre 1973 et 1985 situent la fréquence du trait drépanocytaire entre 4 et 17% pour les enquêtes de masse, 10 et 13,5% pour les études hospitalières. La fréquence de la forme homozygote est estimée entre 0 et 0,4% selon les enquêtes de masse et 0 à 1% selon les enquêtes hospitalières [30]. Autrefois la drépanocytose était une anomalie génétique létale responsable d'environ 100 000 morts par an. Environ 80% des homozygotes mourraient alors avant l'âge de la reproduction. Compte-tenu d'une sélection aussi puissante contre l'allèle HbS, il a été longtemps difficile de comprendre pourquoi, dans certaines populations humaines, sa fréquence atteint et

même dépasse largement les 10 %. Comparant les cartes de répartition du paludisme d'une part, de la drépanocytose d'autre part, Haldane fut frappé de leur ressemblance.

Figure 5: Répartition de la population porteuse de l'allèle HbS

Figure 6: Répartition de la population porteuse du parasite du Paludisme

Une telle coïncidence suggérait que l'HbS pouvait apporter un avantage en milieu impaludé. En effet, si l'homozygote succombe de drépanocytose, l'hétérozygote résiste mieux au paludisme. Cette résistance au paludisme conférée aux hétérozygotes explique la répartition géographique et ethnique de l'anémie falciforme.

3.2.3. Pathologie et physiopathologie [13- 28- 31]

La survenue de la crise drépanocytaire est la conséquence de phénomènes à la fois moléculaires (polymérisation de l'hémoglobine S), cellulaires (falciformation) et vasculaires (adhésion cellulaire).

a) La Polymérisation de l'hémoglobine S :

L'HbS a la propriété de perdre sa solubilité quand elle est désoxygénée et de se polymériser. La polymérisation de l'HbS aboutit à la formation de fibres protéiques rigides de désoxyhémoglobine S responsables de la déformation du globule rouge en

faucille. La cinétique d'apparition des polymères d'oxyhémoglobine S est fonction de la concentration en HbS du globule rouge. C'est pourquoi les sujets hétérozygotes ne font que très rarement de manifestations cliniques. Elle dépend aussi de la concentration en hémoglobine F du globule rouge, de l'existence ou non d'une autre hémoglobinopathie ou d'une enzymopathie associée. Les facteurs qui déclenchent le phénomène de falciformation sont l'hypoxie, la déshydratation, l'acidose et la fièvre.

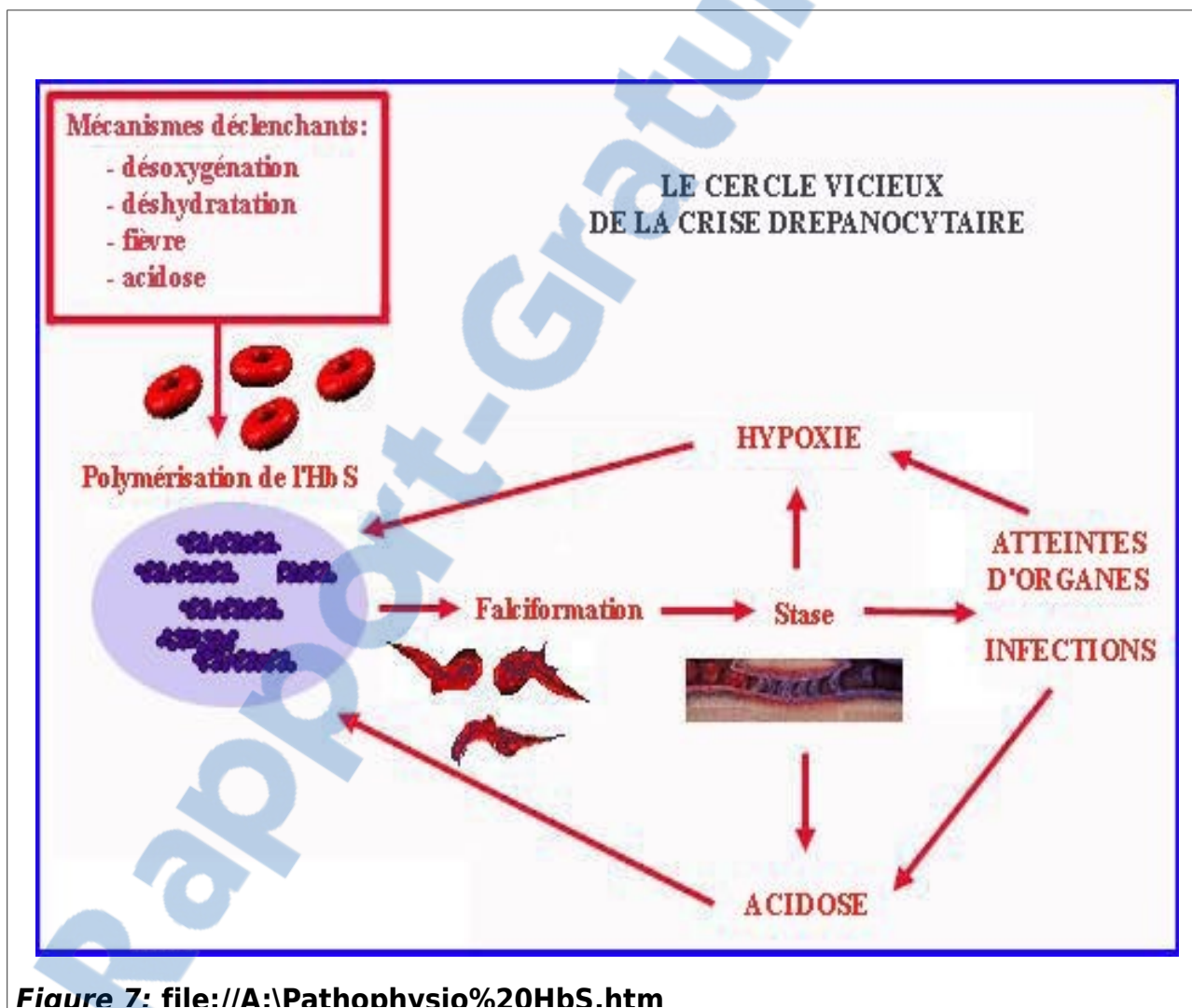


Figure 7: file:///A:\Pathophvsio%20HbS.htm

b) Falciformation du globule rouge :

La polymérisation de l'HbS est à l'origine de la déformation du globule rouge en faucille ou drépanocyte. Il s'agit d'un processus dynamique caractérisé par un temps de latence très variable. Elle conduit à une population très hétérogène de

drépanocytes chez un même malade et d'un sujet à l'autre. Les drépanocytes sont des cellules denses dont la particularité est d'être déshydratées, riches en calcium et pauvres en potassium. Les mécanismes responsables de la déshydratation du globule rouge sont l'augmentation de l'activité de co-transport K^+/Cl^- de la cellule, l'activation du canal potassique de Gardos. Cette activation du canal de Gardos est provoquée par la surcharge calcique du globule rouge ; elle entraîne une fuite extracellulaire importante d'ions K^+ et d'eau.

Les essais d'inhibition de l'activité du canal de Gardos par la chlorpromazine et du co-transport K^+/Cl^- par l'administration de magnésium sont encourageants.

La falciformation est un phénomène réversible lorsque l'état de la membrane du globule rouge permet une réhydratation. Elle est associée au niveau de spicules formés par les fibres d'HbS sur la membrane du globule rouge à une translocation appelée "Flip flop" par les anglo-saxons des phospholipides qui peuvent se déplacer librement du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane érythrocytaire. La conséquence de ce réarrangement de la bicouche lipidique du globule rouge est l'extériorisation de la phosphatidylérase à activité pro coagulante car capable d'activer la transformation de la prothrombine en thrombine. Une des caractéristiques fondamentales reconnues récemment au drépanocyte est son adhérence accrue à l'endothélium vasculaire. Cette adhérence accrue se fait soit de façon non spécifique par l'intermédiaire des IgG qui sont augmentées à la surface de la cellule, soit de façon spécifique par l'intermédiaire de molécules adhésives très exprimées chez le drépanocytaire et qui sont : la GPIV ou CD36 capable de se lier à la thrombospondine et l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ elle, capable de se lier à la protéine adhésive ICAM1 (Intracellular Adhesion Molecule1) de la cellule endothéliale. Le taux d'expression de ces molécules adhésives est très important même chez les drépanocytaires en période inter critique (absence de crise)

c) Le drépanocyte et la circulation :

Le drépanocyte est une cellule caractérisée également par une diminution extrême de sa déformabilité et une augmentation de sa viscosité interne ; l'indice de rigidité

des érythrocytes du drépanocytaire homozygote est 10 fois supérieur à celui du sujet normal [25]. Cette diminution de la déformabilité de la cellule drépanocytaire est à l'origine des obstructions vasculaires lorsque la concentration des drépanocytes augmente dans le sang car celles-ci ne sont plus filtrables.

La conséquence de l'obstruction vasculaire est l'ischémie tissulaire. L'augmentation de l'hématocrite qu'on peut observer au cours des déshydratations augmente la viscosité sanguine et rend le globule rouge moins filtrable.

L'obstruction vasculaire par les drépanocytes crée localement une acidose qui maintient l'HbS à l'état désoxygéné par déplacement de la P50 à droite et entretient la polymérisation de la désoxyhémoglobine S.

Les tissus à vascularisation terminale et la moelle osseuse sont les plus menacés par la vaso-occlusion et l'ischémie. Les zones préférentielles pour l'occlusion sont les bifurcations artérielles (gros vaisseaux) et les sphincters pré capillaires (micro circulation). Le risque est d'autant plus important que l'organe fonctionne à basse pression d'oxygène. Ainsi la rate, la médullaire rénale, la rétine périphérique sont des cibles privilégiés des épisodes ischémiques. Le froid créant des vasospasmes peut ainsi amorcer le phénomène ischémique.

d) Rôle de l'endothélium vasculaire :

L'extrême polymorphisme de l'expression clinique de la maladie drépanocytaire caractérisée par une mutation unique a fait évoquer le rôle d'autres déterminants physiopathologiques dont l'endothélium vasculaire.

Dès 1980 en effet, Solovey et coll [31] apportent l'existence d'un nombre significativement important de cellules endothéliales circulantes chez le drépanocytaire et évoquent le rôle de l'activation de l'endothélium vasculaire dans le déclenchement de l'adhésion du globule rouge au vaisseau. Ainsi la grande fréquence des obstructions vasculaires au cours des épisodes infectieux et inflammatoires a trouvé une explication dans l'interaction du globule rouge drépanocytaire avec l'endothélium. Au cours des infections et des maladies inflammatoires, l'endothélium peut être activé par les endotoxines bactériennes, les

particules virales, les cytokines de l'inflammation notamment le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et l'interleukine 1. L'activation de la cellule endothéliale est associée à l'expression par celle-ci, de molécules adhésives dont le VCAM1 (Vascular Adhesion Molecule1) qui reconnaît l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ sur le globule rouge, le DC36 capable de fixer la thrombospondine et le collagène, les selectines (E-selectine et P-selectine) qui médient l'adhésion des polynucléaires neutrophiles et des monocytes à l'endothélium.

On observe également une augmentation du taux des protéines de l'inflammation dont le fibrinogène, le facteur Von Willebrand (VWF), la C-Réactive Protéine (CRP), la production de thromboxane A2 par les plaquettes activées, l'activation de la coagulation et la formation d'hémichromes.

e) Les conséquences cliniques des phénomènes cellulaires et vasculaires :

La falciformation des globules rouges drépanocytaires est associée à une diminution de leur déformabilité. Ceci est responsable d'accidents vaso-occlusifs aigus avec ischémie provoquant des douleurs souvent insupportables. Les modifications cellulaires et rhéologiques sont associées à une fragilisation de la membrane du globule rouge favorisant l'hyperhémolyse. Cette hyperhémolyse est non compensée par une production médullaire de compensation insuffisante ; il apparaît alors une anémie chronique avec des taux d'hémoglobine de base variant entre 6 et 10 g/dl.

f) Rôle de certaines hémoglobines :

Le rôle inhibiteur de la polymérisation de l'oxyhémoglobine S par l'hémoglobine fœtale (HbF) a été démontré depuis de longues dates. Ce phénomène explique le caractère silencieux de la maladie dans la période néonatale caractérisée où le taux d'HbF est élevé et le début des crises vers l'âge de 4 - 6 mois correspondant à l'effondrement de la production d'HbF.

L'association d'une b-thalassémie à la drépanocytose favorise la polymérisation de l'HbS. C'est le cas également de l'association d'une hémoglobinose C, D Punjab ou O Arab. Ainsi les doubles hétérozygotes encore appelés hétérozygotes composites S/C, S/ b-thalassémie, S/D Punjab, S/O Arab s'expriment comme la forme

homozygote de la drépanocytose et sont considérés comme des drépanocytoses majeures (syndromes drépanocytaires majeurs).

L'association d'une α -thalassémie, d'une persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale (PHHF) ou de certaines hémoglobines comme l'hémoglobine Korle Bu en revanche inhibe le phénomène de polymérisation.

g) Rôle des facteurs nutritionnels :

Le rôle des micros nutriments dans la physiopathologie de la drépanocytose fait actuellement l'objet de controverses. Nous avons vu plus haut que la concentration en HbS dans le globule rouge est un paramètre important dans le déclenchement de la polymérisation de l'oxyhémoglobine S. La carence martiale, en diminuant cette concentration, crée une protection paradoxale contre le phénomène de polymérisation (comme c'est le cas au cours des α -thalassémies par déficit de synthèse des chaînes α), mais elle aggrave l'anémie par déficit de synthèse de l'hémoglobine et donc l'hypoxie tissulaire. C'est pourquoi elle doit être corrigée. Un taux significativement plus bas de vitamine E connue pour son pouvoir de protection contre les stress oxydatifs est rapporté chez le drépanocytaire.

3.2.4. Diagnostic biologique :

Quelle que soit la forme génétique de drépanocytose, son diagnostic repose toujours sur l'identification formelle de l'hémoglobine S (HbS).

Les examens de laboratoire seront le plus souvent les seuls arguments d'une forme hétérozygote (HbA/HbS), habituellement cliniquement muette. Dans les syndromes drépanocytaires majeurs ils permettront de préciser s'il s'agit d'une forme homozygote (HbS/HbS) ou d'une hétérozygotie composite associant l'HbS à une β -thalassémie ou à une autre anomalie de l'hémoglobine (Hb D- Punjab, HbC ou Hb Arab, le plus souvent) et dans une certaine mesure de la ranger dans une catégorie pronostique. Le premier temps du diagnostic d'une HbS s'effectue généralement par électrophorèse, le test d'Emmel ou mieux, par focalisation isoélectrique. Dans certains laboratoires, la priorité est plutôt donnée à la HPLC sur échangeurs de cations, qui est une méthode plus facilement automatisable. Dans tous les cas le

résultat d'un seul test est insuffisant pour affirmer le diagnostic d'HbS. Il doit toujours être confirmé par un test fonctionnel mettant en évidence la solubilité diminuée de la désoxyHbS ou par une électrophorèse sur gel d'agar.

Des tests de biologie moléculaire faisant appel à des enzymes de restriction sont parfois nécessaires. Les divers examens de laboratoire utiles au diagnostic et à la caractérisation moléculaire précise d'un drépanocytaire sont énumérés dans le tableau ci- dessous:

Electrophorèse sur acétate de cellulose	Isoélectrofocalisation	CLHP sur colonne échangeuse de cations
Electrophorèse sur gel d'agar	Caractérisation structurale	Test de Solubilité
Biologie Moléculaire	Détermination de l'Haplotype	Etudes fonctionnelles
Etude de l'HbF	Recherche d'une alpha thalassémie	HPLC (D- 10)

<file://A\Laboratory%20%Diagnosis%20of%20SCD.htm>

Enfin dans tout syndrome drépanocytaire, le laboratoire doit également évaluer les autres facteurs génétiques susceptibles de modifier l'expression clinique de la maladie [HbF, - thalassémies, haplotypes (sénégalais, béninois, camerounais, Bantou, Arabo- Indiens)].

3.3. RELATION PALUDISME- DREPANOCYTOSE

Les hautes fréquences de l'HbS se trouvent dans une zone géographique comprise entre le 10^{ème} parallèle Nord et le 15^{ème} parallèle Sud. Cette zone qui s'étend du Sud du Sahara à la rivière Zambèze a été baptisée "ceinture sicklémique" par Lehmann [7]. Cette aire géographique à haute fréquence drépanocytaire correspond à la zone d'endémie palustre en Afrique (**fig 8**).

La superposition des cartes de distribution de l'HbS et du *Plasmodium falciparum* est à l'origine de plusieurs théories sur les relations entre drépanocytose et paludisme.

La première théorie, celle de "malaria hypothesis" ou du "polymorphe équilibre" émise en 1949 par Haldane [15], reprise et argumentée en 1954 par Allison [3] plaide en faveur d'un avantage sélectif des sujets hétérozygotes AS vis à vis du paludisme.

Il est établi actuellement que les sujets hétérozygotes pour l'HbS font l'infection plasmodiale, mais ils développent beaucoup moins fréquemment les formes graves et compliquées (neurologiques en particulier) de la maladie que les sujets ayant une hémoglobine normale. Ainsi les sujets de phénotype normal (AA) mourraient plus souvent de paludisme que les sujets drépanocytaires hétérozygotes (AS) en zone d'endémie palustre. Selon certaines études pédiatriques en Afrique, le paludisme est la première cause de mortalité chez le drépanocytaire majeur [5]. Ce constat ne remet pas en cause l'effet de protection assurée par le gène de la drépanocytose contre les formes neurologiques de la maladie. Elle s'explique vraisemblablement dans la majeure partie des cas par une décompensation anémique brutale chez un sujet souffrant déjà d'une anémie chronique par des perturbations rhéologiques créées par l'infection parasitaire; les travaux fondamentaux sur l'invasion de l'érythrocyte par le *Plasmodium* n'ont pas montré en effet de particularités pour l'érythrocyte drépanocytaire. L'interruption du cycle du parasite dans le globule rouge drépanocytaire est en revanche démontrée [14].

Au Mali, les fréquences de l'HbS varient selon les ethnies [21, 23] et nous ne possédons aucune documentation fiable quant à la protection conférée par l'HbS contre les formes graves du paludisme. Des études préliminaires effectuées aux pays Dogon et Malinké restent encore contradictoires par rapport à l'effet de protection conférée par l'HbS [1, 30].

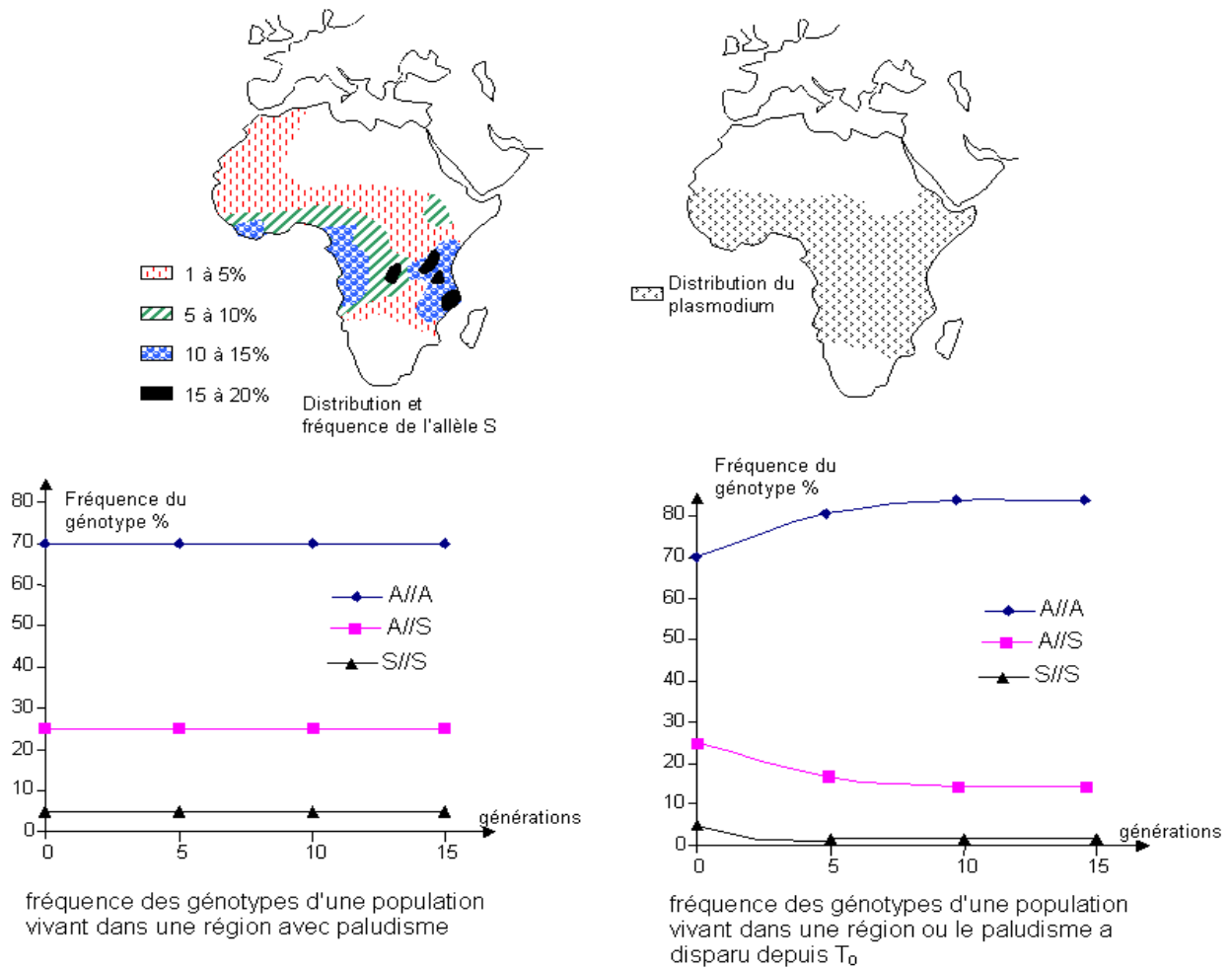


Figure 8: Les zones de très hautes fréquences de la drépanocytose et du paludisme (source : drépanocytose paludisme. htm [32])

3.4. GENERALITES SUR ALPHA- THALASSEMIE

3.4 1. GENERALITES

Il s'agit d'une anémie hémolytique corpusculaire chronique liée à une anomalie quantitative (défaut de synthèse) de l'hémoglobine (Hb).

L'hémoglobine est l'association de 4 atomes de fer (hème) à 4 chaînes de globine identiques 2 à 2.

L'hémoglobine A (Adulte) apparaît progressivement 6 mois après la naissance et est constituée de 2 chaînes alpha et de 2 chaînes bêta de globine. La chaîne alpha globine est codée par un gène présent en 2 exemplaires sur chaque chromosome 16 (soit 4 exemplaires au total), la chaîne bêta par gène existant en un seul exemplaire).

En fonction du type et du nombre de gène mutés, le déficit de synthèse est plus ou moins important et concerne soit la chaîne alpha de la globine (alpha- thalassémie), soit la chaîne bêta de la globine (beta- thalassémie).

Lorsqu'une globine est insuffisamment synthétisée, il existe une hyperproduction compensatrice de l'autre globine : les chaînes de globine libres hyper produites précipitent dans le globule rouge et entraînent son hémolyse.

La répartition géographique concerne le bassin méditerranéen, le Moyen- Orient, l'Inde, l'Afrique Noire.

Le mode de transmission est autosomique récessif [17].

Les alpha- thalassémies se caractérisent par un déficit de chaîne de globine- alpha dans l'hémoglobine. Elles affectent donc la synthèse des 3 sortes d'hémoglobine : HbA, HbA₂ et HbF, puisque toutes contiennent la chaîne alpha; dans ces cas la vie n'est possible que grâce à la formation de quantités importantes d'hémoglobines anormales ne se composant que des chaînes dont la synthèse n'est pas entravée : l'HbH et l'Hb Bart's. Ces maladies sont rares et à distribution raciale localisée [18].

Les alpha- thalassémies sont fortement répandues dans les régions où le paludisme est endémique. Les formes α^0 sont très fréquentes dans les pays orientales (incidence 3-10%), plutôt rares dans le bassin méditerranéen (jusqu'à 2%).

Les mutations α^+ sont les anomalies génétiques les plus communes globalement: à l'Orient, en Afrique noire, mais aussi dans quelques régions de l'Italie (Sardaigne, Sicile) elles atteignent en partie une incidence de 30%. Par l'immigration récente de personnes venant de pays endémiques l'identification de porteurs du trait devient de plus en plus importante [19].

On a longtemps cru que l'alpha- thalassémie était absente dans la race noire. En fait plusieurs études menées en Afrique ont prouvé que l'alpha- thalassémie existe mais elle est asymptomatique et comprend génétiquement deux formes α_1 et α_2 thalassémie.

C'est le caractère asymptomatique et surtout la difficulté du diagnostic chez l'adulte qui avaient fait dire que l'affection est absente dans la race noire.

3.4.2. Alpha- thalassémie et paludisme :

La fréquence élevée de l'alpha- thalassémie dans certaines zones d'endémie palustre suggère que l'alpha - thalassémie conférerait une protection en faveur des individus qui en sont atteints.

Plus précisément, les thalassémies concernent les populations des pays riverains de la Méditerranée (Iran, Extrême- Orient), l'Afrique subsaharienne, l'Inde, tout le Sud- est asiatique ainsi que le sud de la Chine et toutes les régions où le paludisme sévit.

Il ya plus de 50 ans, Haldane a suggéré que certaines formes de thalassémie conféreraient une protection contre le Paludisme [16]. La coïncidence de la distribution géographique de ces affections génétiques érythrocytaires avec celle d'endémie palustre passée ou présente est en faveur de cette hypothèse. Par ailleurs la présence concomitante de la forte fréquence de l'alpha thalassémie et du paludisme à *P. falciparum* dans des citées ci-dessus suggère que le gène de l'alpha thalassémie a été sélectionné pour son effet de protection contre le paludisme [16].

En effet, certaines études avaient rapporté qu'il y avait une protection que l'alpha thalassémie pourrait conférer au paludisme grave [2, 23]. Dans une étude cas témoin dans la Nouvelle Guinée le risque du paludisme grave était réduit de 60% et 34% chez les enfants homozygotes et hétérozygotes thalassémiques [2].

Plusieurs lignes d'évidences dont le mécanisme cellulaire confirme que cette hémoglobinopathie fournit plus de 90% de protection contre la mort due au paludisme grave [23]. Par contre dans une étude réalisée en Afrique subsaharienne l'alpha-thalassémie affectant plus de 50% de la population, sa protection contre le paludisme grave n'a pas pu être démontré [24, 25, 26].

Rapport-Gratuit.com

4. METHODOLOGIE

1.4 Site d'étude :

Notre étude s'est déroulée dans les locaux du centre de santé de référence (CSREF) de Kangaba chef lieu de cercle et de la case de santé de Kéla, un village situé à 6Km de Kangaba, tous deux situés dans la région de Koulikoro. Ces deux sites d'étude ont été identifiés sur la base d'enquêtes anthropologiques et paludométriques faites pendant plusieurs saisons. Ils sont situés à 95 km au sud- ouest de Bamako la capitale du Mali et sont tous accessibles par la route (moins de 2 heures de route à partir du Point G). Kangaba compte environ 6500 habitants tandis que Kéla compte environ 1600 habitants. La population est majoritairement constituée de Malinké (76,9%).

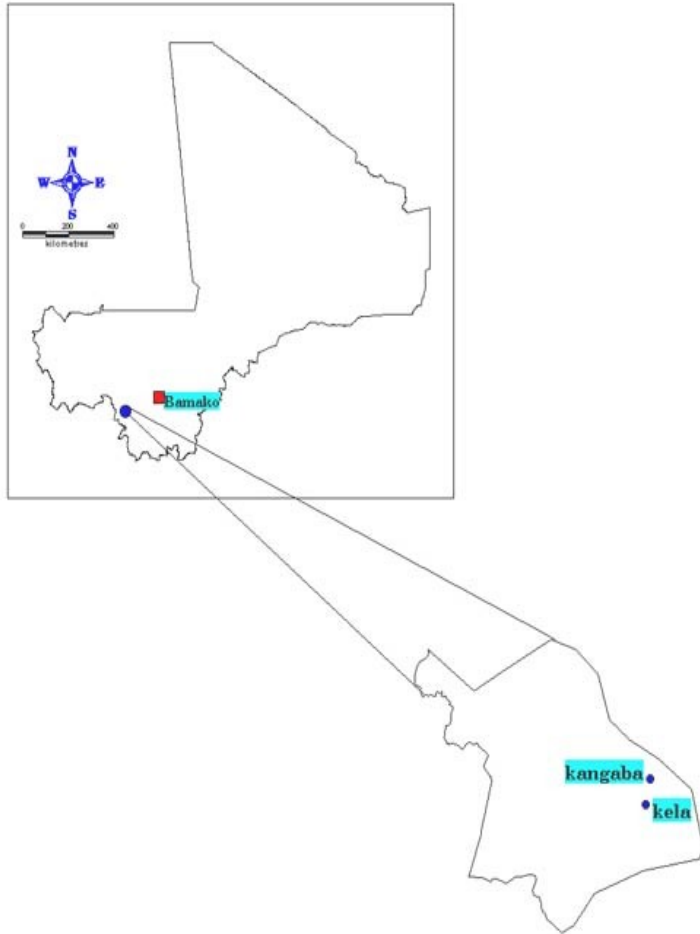


Figure 9: CARTE DU MALI (avec localisation du site d'étude) Source : GIS/RS MRTC/FMPOS -Bamako (Mali) Janv. 2003

2.4 Période d'étude :

Notre étude a couvert les périodes de forte transmission du paludisme de juin 2005 à janvier 2007.

3.4 Type d'étude :

Il s'agit d'une étude prospective avec une composante cas- témoins non appariés.

Les cas : étaient des sujets atteints de paludisme grave, selon la définition de l'OMS 2000

Les témoins : correspondaient aux sujets avec paludisme simple.



4.4 Population d'étude :

Cette étude a concerné des sujets de tout sexe âgés de 3 mois à 5 ans résidents de la ville de Kangaba et du village de Kéla.

5.4 Critères d'inclusion :

- Sujets âgés de 3 mois à 5 ans, consultant au CSREF de Kangaba ou à la case de santé de Kéla pour des symptômes de paludisme et chez lesquels une goutte épaisse positive à *P falciparum* a été obtenue.
- Avoir un consentement signé d'un parent ou d'un tuteur adulte de l'enfant après explication du protocole en langue malinké.

6.4 Critères de non-inclusion :

- Avoir une pathologie grave aiguë ou chronique responsable de fièvre (Pneumonie bactérienne, kwashiorkor....)
- Avoir une goutte épaisse négative à la recherche de *Plasmodium falciparum*.
- Refuser d'adhérer à l'étude.

7.4 Définition des cas :

Paludisme simple:

Une fièvre (température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$), frissons, céphalées, myalgies, douleurs abdominales, vomissements et avec une goutte épaisse positive à *P. falciparum* sans signes de gravité.

Paludisme grave:

Parasitémie $> 500000\text{tf/ml}$ ou toute autre parasitémie avec l'un des critères ci-dessous :

- Coma (score de Glasgow ≤ 9 ou score de Blantyre ≤ 2);

- Convulsions répétées (plus d'une par 24 heures) ;
- Prostration;
- Syndrome de détresse respiratoire ;
- *Ictère* ;
- Acidose métabolique (taux de bicarbonates plasmatiques inférieur à 15 mmol/L),
- Hémoglobinurie macroscopique ;
- Insuffisance rénale (diurèse < 12ml/kg/24h ou créatinémie trop élevée pour l'âge de l'enfant),
- Anémie sévère (taux d'hémoglobine \leq 5g/dl ou hématocrite \leq 15%) ;
- Collapsus circulatoire (tension artérielle systolique inférieure à 60 mmHg) ;
- Saignement anormal ;
- Hypoglycémie (glycemie < 2,2 mmol/l ou 40mg/dl >) ;
- Œdème pulmonaire (radiologique).

◆ NB: De façon générale, tous les sujets qui ont un taux d'Hb<12 g/dl étaient considérés comme anémie.

8.4 Paramètres mesurés :

8.4.1 Paramètres sociodémographiques :

Age, sexe, ethnie, lieu de résidence habituelle.

8.4.2 Paramètres biologiques :

Parasitémie, Taux d'hémoglobine, Type d'hémoglobine, Glycémie et Alpha-thalassémie.

4.2. Techniques d'analyses biologiques :

4.2.1 Technique de détermination de la parasitémie : goutte épaisse

4.2.1.1 Principe :

La goutte épaisse est une technique de concentration des hématies en vue de la recherche du parasite dans le sang.

Matériel consommable pour la goutte épaisse :

- Tabouret
- Coton hydrophile
- Alcool à 70°
- Gants en polyvinyle
- Lames porte-objet
- Vaccinostyles
- Boîte de collection de l'OMS
- Crayon de papier
- Paires de ciseaux
- Scotch
- Giemsa pur
- Comprimé tampon (Buffer Tablet pH=7,2)
- Papier hygiénique
- Râtelier
- Bac de coloration
- Microscope optique biloculaire
- Huile d'immersion
- Compteur manuel, calculatrice
- Poubelle
- Éprouvette graduée

➤ Source d'électricité

4.2.1.2 Mode opératoire :

4.2.1.2.1 Prélèvement :

Prélever une goutte de sang capillaire, par une piqûre au doigt après désinfection à l'alcool à 70°.

Essuyer la première goutte de sang puis déposer la seconde au milieu d'une lame.

A l'aide du coin d'une deuxième lame, étaler la goutte sur 1 cm de diamètre en tournant pendant quelques secondes.

Laisser sécher.

La goutte épaisse doit être transparente.

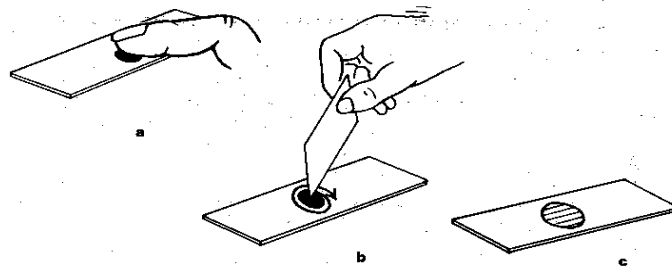


Figure 10: Schéma de confection de la goutte épaisse

Coloration :

La coloration des lames se faisait sur place au Giemsa dilué à 3% (c'est à dire 3 ml de Giemsa pur pour 97 ml d'eau distillée tamponnée). L'eau tamponnée était préparée en dissolvant 1 comprimé tampon dans 1 litre d'eau distillée.

Les lames étaient immergées dans un bac de coloration contenant la solution de Giemsa à 3% pendant 45 minutes. Après 45 minutes les lames étaient rincées à l'eau de robinet, puis séchées sur le râtelier à l'air ambiant.

Les gouttes épaisses séchées étaient immédiatement examinées et les résultats portés sur le registre de parasitologie puis sur les fiches cliniques de suivi.

Lecture :

La lecture s'effectuait au microscope optique sur place à l'objectif 100 en immersion. A l'aide d'un compteur manuel, les parasites et les leucocytes étaient comptés. Ce comptage débutait dès l'observation d'un parasite dans le champ qui était visionné et finissait quand le nombre de leucocytes comptés atteignait 300. La charge parasitaire était exprimée en rapportant le nombre de parasites pour les 300 leucocytes à 7500 leucocytes. Nous avons considéré 7500 leucocytes comme étant la moyenne du nombre des leucocytes par mm³ de sang.

Mode de calcul de la parasitémie :

Soit P la parasitémie par mm³ de sang, X le nombre de parasites comptés et Y le nombre de leucocytes correspondant à X.

La parasitémie P est déterminée par la formule suivante :

$$P = \frac{X}{Y} \times 7500 \text{ parasites par mm}^3 \text{ de sang.}$$

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

Les spots de confettis imbibés de sang étaient découpés à l'aide de ciseaux et introduits dans les tubes Eppendorf de 1,5 ml (Robbins Scientifi Sunnyvale, CA).

1. La lyse des hématies, ajouter :

- 180 µl de Buffer ATL, incuber à 85°C pendant 10 minutes, centrifuger

- 20 µl de protéinase K, mélanger à l'aide d'un agitateur, incubé à 56°C pendant 1 heure ensuite centrifuger brièvement pour faire descendre le liquide sur la paroi du tube.
- 200 µl de Buffer AL, agiter à l'aide d'un agitateur et incubé à 70°C pendant 10 minutes, centrifuger.

2. Extraction proprement dite, ajouter :

- 200 µl d'éthanol (96- 100%), agiter et centrifuger brièvement ; l'ADN se présente sous forme de cristaux. Appliquer tout le contenu dans le tube QIAGEN (2 ml) avec filtre, fermer le tube QIAGEN avec filtre, centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute. Placer le filtre QIAGEN dans un autre tube de 2 ml (fourni) et jeter le tube contenant le filtrat;
- 500 µl de Buffer AW1 dilué avec de l'éthanol (19 ml de Buffer AW1 plus 25 ml de l'éthanol), centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute ensuite éliminer le tube contenant le filtrat. Placer le tube QIAGEN dans un autre tube de 2 ml;
- 500 µl de Buffer AW2 dilué avec de l'éthanol (13 ml de Buffer AW2 plus 30 ml de l'éthanol), centrifuger à 1400 tours par minute pendant 3 minutes. Éliminer le tube contenant le filtrat et placer le tube QIAGEN dans un autre tube de 1,5 ml;
- 150 µl de Buffer AE incubé à la température ambiante de la salle pendant une minute, centrifuger à 8000 tours par minute et on a de l'ADN qui doit être conservé à + 4°C.

4.2.3 Technique de détermination des types d'Hb :

La détermination des types d'hémoglobine a été faite par HPLC à l'aide d'un **D-10**

1- Principe : D- 10 est un système HPLC permettant de faire la quantification et la détermination des différentes fractions de l'hémoglobine (AA, F, S, C, glycyquée).

2- Matériels et réactifs :

a) Matériels :

- Pipette de 1000 µl
- Embouts de 1000 µl
- Pipette de 10 µl
- Embouts de 10 µl
- Portoir d'échantillons (rack d'échantillons au maximum 10, position pour micro-tubes)
- Micro- tubes de 2 ml
- Tubes a EDTA
- Réservoir à déchets externes

b) Réactifs :

- Buffer (wash/diluent)
- Solutions contrôles de qualité (<< A2/F >> control ref 553)
- Eau distillée

3- Modes opératoires :

a) Préparations des contrôles de qualité :

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

2. Écrire la date de reconstitution sur l'étiquette. Le contrôle de qualité << A2/F control >> reconstitué est stable pendant 21 jours conservé entre 2°C et 8°C.

Les contrôles de qualité doivent être dilués au 1 :300 avant l'analyse. Avant la préparation de l'hémolysât, veiller à retourner plusieurs fois le flacon de contrôles de qualité pour assurer son homogénéité.

b) Préparation des échantillons de patients :

Pipeter 1, 5ml de wash/ diluent dans un microtube de 2ml et ajouter 5µl de l'échantillon de sang total. Fermer le microtube et mélanger complètement. Positionner le microtube sur un adaptateur non code à barres appropriées.

c) Exécution d'une série :

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

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

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

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

4- Résultats :

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

4.2.4 Détection de la délétion 3. 7- kb responsable de l'alpha- thalassémie par PCR

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

1. Matériels et réactifs :

a) Matériels :

- Termocycler (Machine à PCR)
- Micropipette (1000ml, 200ml et 10ml)
- Embout pour micropipette (1000ml, 200ml et 10ml)
- Tube PCR 0,2ml

b) Réactifs :

- Le Tris- HCl, pH 8,5
- KCl
- Betaine (Sigma)
- dNTP (ATP, GTP, TTP, CTP)
- Tag polymérase
- Les Amorces:
- a₂/3. 7F = 5'- CCCCTCGCCA AGTCCACC C- 3'
- a₂R= 5'- AGACCAGGAAGGGCCGGTG- 3'
- 3. 7/20. 5R= 5'- AAAGCACTCTAGGGTCCAG CG- 3'
- A3. 7F= 5'- CTTTCCCTACCCAGAGCCAGGTT - 3'
- 3. 7R1= 5'- CCACTTTCCCTCCTCCATCCC- 3'
- a₂R1= 5'- AGGAG GGCCCGTTGGGAGGC- 3'

2. Procédure :

a) 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 ne portant pas de délétion. Ces deux fragments ont en commun une amorce (a₂/3. 7F) la seconde amorce étant spécifique pour chaque fragment (a₂R pour le fragment normal et 3. 7/20. 5R pour le fragment délétère). Il consiste à amplifier approximativement 5ng d'ADN (2, 5 ml d'ADN extrait avec le Qiagen) dans un volume réaction de 25 ml dont la composition est la suivante:

- 20 mmol/L de Tris- HCl pH 8, 5
- 50 mmol/L KCl
- 1, 5 mmol/L MgCl₂
- 1 mol/L de Betaine
- 0, 3mmol/l de chaque amorce (a2/3. 7F, a2R et 3. 7/20. 5R)
- 0, 2mmol/L de chaque dNTP
- 1, 25 unité de platinum Taq polymerase (Inv itrogen)

b) 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 spécifiques pour le fragment normal (A3. 7F et a₂R1) sont utilisées 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, 1ml d'une dilution au 1 :20 est utilisé dans un volume réactionnel de 25 ml 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

Suivie de 35 cycles 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.

c) Migration du produit de PCR :

On utilise un gel d'agarose à 2% auquel est incorporé du bromure d'ethidium (~ 3mg/100ml) dans TBE 0. 5X. La migration se fait à 200 volts pendant 30 minutes.

La révélation est faite à la lumière UV.

d) 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 scénarios sont possibles :

- 1- Le sujet est Normal : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et l'absence de bande dans le tube N° 2
- 2- Le sujet est α - thalassémique hétérozygote : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et aussi la présence d'une bande de 1. 8kb dans le tube N° 2
- 3- Le sujet est α - thalassémique homozygote : On observe la présence d'une bande de 1. 8 kb dans le tube N° 2 et l'absence de bande dans le tube N° 1.

4.3 Analyse des données :

Les données ont été saisies sur Microsoft Excel et analyse sur SPSS et Epi- Info.

5. RESULTATS

5.1 Résultats descriptifs :

5.1.1 Caractéristiques Socio-démographiques :

Tableau I : Répartition des sujets en fonction du sexe dans la population d'étude

Sexe	Effectifs	Fréquence
Masculin	1341	51,7%
Féminin	1255	48,3%
Total	2596	100%

Le sexe masculin était prédominant avec un ratio de 1,06

5.2 Résultats globaux :

Tableau II : Répartition des sujets en fonction du statut alpha-thalassémie

Type d'alpha thalassémie	Effectifs	Fréquence
Hétérozygote	854	32,90%
Homozygote	111	4,30%
Normal	1631	62,80%
Total	2596	100,00%

Il ressort de ce tableau que la fréquence de l'alpha-thalassémie était de 37,2% dans la population d'étude. Lorsqu'on s'intéresse à la répartition des cas d'alpha-thalassémie en fonction des différents génotypes, on note 32,9% d'hétérozygotie et 4,3% d'homozygotie.

Tableau III : Répartition des sujets en fonction du type d'hémoglobine

Type d'Hb	Effectifs	Fréquences
AA	2259	87%
AC	127	4,9%
AS	197	7,6%
CC	1	0%
SC	7	0,3%
SS	5	0,2%
Total	2596	100%

Dans la population d'étude nous avons observé 8,1% des sujets porteurs d'hémoglobine S contre 87% sujets normaux.

Tableau IV : Distribution de l'anémie dans la population

Anémie	Effectifs	Fréquences
Anémie+	1665	64%
Anémie-	931	35,90%
Total	2595	99,90%

La fréquence de l'anémie dans notre population d'étude était de 64%.

Tableau V : Répartition des formes cliniques du paludisme dans la population

Formes cliniques	Effectifs	Fréquences
Paludisme simple	2243	86,4%
Paludisme grave	353	13,6%

Total	2596	100%
-------	------	------

Sur un total de 2596 cas de paludisme, il a été observé 353 cas de paludisme grave soit 13,6%.

Tableau VI: Répartition des formes cliniques du paludisme en fonction du type d'hémoglobine

Type d'Hb	Formes cliniques		Total
	Paludisme Simple	Paludisme Grave	
AA	1933(85,6%)	326(14,4%)	2259(100%)
AC	110(86,6%)	17(13,4%)	127(100%)
AS	190(96,4%)	7(3,6%)	197(100%)
CC	1(100%)	0(0%)	1(100%)
SC	6(85,7%)	1(14,3%)	7(100%)
SS	3(60%)	2(40%)	5(100%)
Total	2243	353	2596

Le paludisme grave a été observé chez 3,6% des sujets porteurs d'hémoglobine AS contre 14,4% des sujets normaux AA.

Cette différence était statistiquement significative ($p=0,00003$ khi= 17,38 et odds ratio=0,22)

Tableau VII : Répartition des formes cliniques du paludisme en fonction du statut alpha thalassémie

Alpha thalassémie	Formes cliniques		Total
	Paludisme simple	Paludisme grave	

Association hémoglobine AS et alpha-thalassémie. Impact sur le paludisme

Hétérozygotie	743(87%)	111(13%)	854(100%)
Homozygotie	96(86,5%)	15(15,5%)	111(100%)
Normal	1404(86,1%)	227(13,9%)	1631(100%)
Total	2243(86,4%)	353(13,6%)	2596(100%)

Parmi les sujets hétérozygotes pour l'alpha thalassémie; 13% ont développés le paludisme grave contre 13,9% des sujets normaux. Cette différence n'était pas statistiquement significative ($p=0,5$ khi= 0,40)

Le paludisme grave a été observé chez 15,5% des sujets homozygotes pour l'alpha thalassémie contre 13,9% des sujets normaux. La différence n'était pas statistiquement significative ($p = 0,9$ khi= 0,01)

Tableau VIII : Distribution de l'anémie en fonction du statut alpha thalassémie

alpha thalassémie	Anémie		Total
	Anémie+	Anémie-	
Hétérozygote	592 (69,3%)	262(30,7%)	854(100%)
Homozygote	79(71,2%)	32 (28,8%)	111(100%)
Normal	994 (60,9%)	637 (30,1%)	1631(100%)

Total	1665	931	2596
-------	------	-----	------

La fréquence de l'anémie était de 69,3% chez les hétérozygotes contre 60,9% à l'état normal; cette fréquence était de 71,2% à l'état homozygote contre 60,9% à l'état normal. Cette différence était statistiquement significative (p= 0,01)

Tableau IX : Distribution de l'anémie en fonction du type d'hémoglobine

Type d'hémoglobine	Anémie		Total
	Anémie+	Anémie-	
AA	1429(63,3%)	830(36,7%)	2259(100%)
AC	82(64,6%)	45(35,4%)	127(100%)
AS	143(72,6%)	54(27,4%)	197(100%)

CC	1(100%)	0(0%)	1(100%)
SC	5(71,4%)	2(28,6%)	7(100%)
SS	5(100%)	0(0%)	5(100%)
Total	1665	931	2596

La fréquence de l'anémie était de 63,3% chez les sujets normaux, 64,6% chez les sujets hétérozygotes

AC, 71,4% chez les sujets SC, 72,6% chez les sujets hétérozygotes AS, 100% chez les sujets homozygotes SS. Cette différence était statistiquement significative ($p=0,01$ khi²=6,45).

5.3 Résultats analytiques :

Tableau X : Fréquence de l'association alpha- thalassémie et hémoglobine AS

Type d'hémoglobine	Thalassémie		Total
	Alpha-thalassémie	Normal	
AA	831(36,8%)	1428(63,2)	2258(100%)
AC	46(36,2%)	81(63,8%)	127(100%)
AS	82(41,6%)	115(58,4%)	197(100%)

CC	0(0%)	1(100%)	1(100%)
SC	1(14,3%)	6(85,7%)	7(100%)
SS	5(100%)	0(0%)	5(100%)
Total	965	1631	2596

La fréquence de alpha-thalassémie était de 41,6% chez les sujets AS contre 36,8% chez les sujets AA. ($P=0,2$ khi²=1,61).

Tableau XI : Distribution des cas d'association alpha-thalassémie et type d'hémoglobine en fonction du phénotype clinique de paludisme

Formes cliniques		THALASSEMIE		Total
		Alpha-thalassémie	Normal	
Paludisme simple	AA	720(37,2%)	1213(62,8%)	1933(100%)
	AC	39(35,5%)	71(64,5)	110(100%)
	AS	77(40,5%)	113(59,5%)	190(100%)
	CC	0(0%)	1(100%)	1(100%)
	SC	0(0%)	6(100%)	6(100%)
	SS	3(100%)	0(0%)	3(100%)
Paludisme grave	AA	111(34,1%)	215(65,9%)	326(100%)

Association hémoglobine AS et alpha-thalassémie. Impact sur le paludisme

	AC	7(41,2%)	10(58,2%)	17(100%)
	AS	5(57%)	2(43%)	7(100%)
	SC	1(100%)	0(0%)	1(100%)
	SS	2(100%)	0(0%)	2(100%)

Dans notre étude le paludisme grave a concerné 57% des sujets porteurs HbAS et d'alpha thalassémie contre 40,5% dans le cas du paludisme simple (P=0,1)

Tableau XII : La moyenne de la parasitémie en fonction du type d'hémoglobine

Type d'hémoglobine	Moyenne	Nombre	Ecart type
AA	38081,68	2259	50813,655
AC	36423,62	127	43742,973
AS	27163,07	197	35229,298
CC	3000,00	1	
SC	7692,86	7	9914,738
SS	7680,00	5	15276,804
Total	37017,98	2596	49468,363

La moyenne géométrique de la densité parasitaire a été plus élevée chez les sujets AA que chez les sujets AS. $P < 10^{-6}$

Tableau XIII : La moyenne de la parasitémie en fonction du type alpha-thalassémie.

Type Alpha-thalassémie	Moyenne	Nombre	Ecart type
Hétérozygote	35854,89	854	44112,387
Homozygote	38022,52	111	54127,413
Normal	37558,62	1631	51756,860
Total	37017,98	2596	49468,363

La moyenne géométrique de la densité parasitaire a été plus élevée chez les sujets porteurs homozygotes que chez les sujets normaux. $P < 10^{-6}$

6. DISCUSSION

Ce travail s'inscrivait dans le cadre d'une étude multidisciplinaire visant à déterminer les facteurs génétiques de protection contre les formes graves du paludisme dans la population d'étude.

Il testait l'hypothèse selon laquelle l'association hémoglobine AS et alpha-thalassémie protégerait contre les formes graves et compliquées du paludisme.

Le dépistage moléculaire de l'alpha-thalassémie a été effectué grâce à la PCR. La détermination du type d'hémoglobine a été effectuée par le D-10. La mise au point de ces deux techniques a été réalisée à Bamako au laboratoire d'hématologie et de parasitologie à la FMPOS.

Cette étude avait enrôlé tous les sujets qui se sont présentés avec une symptomatologie clinique évocatrice de paludisme au CSRF de Kangaba et à la case de santé de Kela durant la saison de transmission du paludisme de 2005 à 2007 et pour les lesquels un consentement éclairé écrit a été obtenu. Il s'agissait d'une étude cas-témoins non appariée.

Ainsi, sur un total de 2596 patients inclus dans l'étude, 353 (13,6%) souffraient de paludisme grave et 2243 (86,4%) de paludisme simple ou non compliqué.

Cette fréquence de 13,6% de cas graves de paludisme observée au cours de notre étude était inférieure à celle obtenue par Sall (53,4%) lors d'une étude réalisée au service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré [29]. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré, est un service spécialisé dans la prise en charge des cas compliqués de paludisme chez les enfants et reçoit la majorité des cas compliqués du district de Bamako.

La fréquence de l'hémoglobine S était de 8,1% dans la population des sujets impaludés. Ce taux était inférieur à celui de Bathily soit 9,56% chez les enfants malinkés de Kangaba et Kéla âgés de 3 mois à 5 ans [5].

Le paludisme grave a été observé chez 3,6% des sujets hétérozygotes AS contre 14,4 % des sujets normaux.

La recherche d'une association entre l'hémoglobine AS et les formes cliniques du paludisme, nous a montré que l'hémoglobine AS était associé à une réduction significative du risque de paludisme grave ($p= 0,00003$; $\chi^2= 17,38$). Ce résultat est similaire à celui des études menées en 1992 et 1997 à l'hôpital Gabriel Touré par Doumbo *et al* qui ont observé une réduction de l'incidence de paludisme chez les sujets porteurs d'hémoglobine S [11].

La fréquence globale de l'alpha thalassémie dans la population impaludée était 37,2% dont 32,9% d'hétérozygotie et 4,3% d'homozygotie. Cette fréquence est similaire à celle observée par Allen *et al* et WILLIAMS *et al*. [36] qui ont rapporté respectivement (36,7%) et (31,9%) comme fréquence globale d'alpha thalassémie aux USA et au GHANA. [2, 36].

Le paludisme grave a été observé chez 13% et 15,5% respectivement chez les sujets hétérozygotes et homozygotes pour l'alpha thalassémie contre 13,9% chez les sujets normaux.

La recherche d'une association entre l'alpha thalassémie et les formes cliniques du paludisme grave, nous a montré que l'alpha thalassémie (hétérozygote ou homozygote)

n'était pas associé à une réduction du paludisme grave ($p=0,5$ et $0,9$). Contrairement à notre étude en effet, des travaux antérieurs descriptifs avaient rapporté un rôle protecteur des alpha-thalassémies contre les formes graves et compliquées de paludisme [22]. Ces résultats contradictoires seraient attribués à la différence de méthodologie entre ces études. Notre étude a porté sur une population homogène (malinké) et a consisté en une étude cas-témoins pendant les saisons de forte transmission de paludisme.

L'association de ces deux polymorphismes (HbAS et Alpha-thalassémie) dans notre population d'étude nous a permis de retrouver une plus grande prévalence de l'Alpha-thalassémie chez les sujets AS soit $41,6\%$ par rapport aux sujets normaux soit $36,8\%$. Mais la différence n'était pas statistiquement significative ($p=0,2$ khi²=1,61).

Il n'a pas été observé de relation entre l'association hémoglobine S alpha-thalassémie et l'évolution du paludisme ($P=0,1$)

Williams dans une étude au Kenya avait également observé que l'association hémoglobine S –alpha thalassémie ne procurait aucune protection contre le paludisme.

Les sujets normaux pour l'alpha-thalassémie étaient moins exposés à l'anémie que les sujets hétérozygotes et homozygotes ($P= 0,00004$; $P= 0,04$).

La fréquence de l'anémie observée dans notre population d'étude était de 64% .

7. CONCLUSION

Notre étude a enregistré 2596 cas de paludisme dont 13,6% de formes graves.

La fréquence de l'hémoglobine AS et l'alpha- thalassémie a été respectivement de 8,1% et 37,2%.

L'hémoglobine AS était associé à une réduction du risque de développer le paludisme grave.

L'alpha thalassémie n'était pas associé à une réduction du risque de développer le paludisme grave.

L'association alpha thalassémie –hémoglobine AS ne montrait aucune réduction du risque de développer un paludisme grave.

8. RECOMMADATIONS

Au terme de notre étude, nous recommandons :

Aux chercheurs :

- Poursuivre ce travail par un recrutement plus important de cas permettant des études d'associations avec une puissance statistique forte pour répondre à la question d'une association significative.
- Élargir cette étude dans d'autres régions du Mali.

Aux agents de la santé :

- Proposer aux patients le dépistage de l'hémoglobine S et de l'alpha – thalassémie.

Aux autorités :

- Rendre disponible le typage de l'hémoglobine S et alpha-thalassémie au niveau des différentes structures sanitaires du district.

- Former le personnel de la santé sur la conduite à tenir devant un sujet porteur du gène S; des gènes Alpha et Bêta thalassémie.

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1-AGARWAL A, GUINDO A, CISSOKO Y, TAYLOR J G, COULIBALY D, KONE A, KAYENTAO K., DJIMDE A., PLOWE CV., DOUMBO O., WELLEMS TE, and DIALLO D

Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood*. 2000 Oct 1 ;96 :2358-63

2- ALLEN, S. J., O'DONNELL, A., ALEXANDER, N. D. E., ALPERS, M. P., PETO, T. E. A., CLEGG, J. B., WEATHER ALL, D. J.

Alpha thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:14736-14741.

3- ALLISON, A. C. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J.* 1954

4- BABY MOUNIROU

Approche pluridisciplinaire des hémoglobinopathies chez les dogons de l'arrondissement de Sangha (Mali). Thèse Pharm, 1992, 91-p-2.

5- BATHILY T.

Hémoglobine S et paludisme grave dans une population âgée de 3 mois à 5 ans dans les villages de Kangaba et de Kéla (mali) de juin 2001 à janvier 2005. Thèse de Med ; FMPOS N°138

6- BEAUVAIS P, BEAUVAIS B Drépanocytose et paludisme : données actuelles.

Arch. Franc.Pediat. 1986, **43**: 279-282

7- CATONNE.Y Aspects orthopédiques de la drépanocytose. Conférences D'enseignement de la Sofcot 2002 ; 79 : 245-262.

8- DIANI F. Situation sanitaire au Mali *Thèse Pharm, Bamako, 1985, N° 1 :214*

9- DOUKI J-B, BOUBACAR TRAORE, FABIO T. M. COSTA, THIERRY FUSAI, BRUNO POUVELLE, YVON STERKERS, ARTUR SCHERF, AND JURG GYSIN.

Sequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocyte to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria; monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates. *Blood* 2002, 100 : 1478-83

10- DOUMBO O, OUTTARA NI, KOITA O, MAHARAUX A, TOURE YT, TRAORE SF, QUILICI M. Approche éco géographique du paludisme en milieu urbain : ville de Bamako. *Ecologies* 1989 ; Hum 8 : 3-15.

11- DOUMBO O, TOURE A, COULYBALY B, KOITA O, TRAORE B, DOLO A, DIALLO M, DIALLO AN, QUILICI M. Incidence of malaria and S hemoglobinopathy in the pediatric hospital milieu in Bamako, Mali. *Med Trop.* 1992; 52: 169-74.

12- DREPAVIE La drépanocytose.19-03-06. Adresse électronique: www.eccentrix.com

13- ELLION J, LABIE D. *Drépanocytose et adhésion cellulaire. Hématologie* 1998; 4: 201-211.

14- FRIEDMAN MJ, ROTH EF, NAGEL RL, TRAGER W

The role of haemoglobin, C, S, and Nbal in the inhibition of malaria parasite development in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28:777-80.

15- HALDANE J. B. The rate of mutation of human gene. *Proc. VIII th Interm Congress on Genet and Bered.* 1949; *Suppl. 3 5:* 267-273.

16- HALDANE JBS. The rate of mutation of human gene. *Hereditas* 1949; 35(suppl 1):267-272.

17-Lionel Karlin, Tereza coman, Publié par Elevier Masson, 2009.ISBN:2294700708, 97822947007-05

18-<http://fr.wikipedia.org/wiki/Thalass%C3%A9mie#Alpha-thalass.C3.A9mies>

19-<http://www.imdlab.ch/fileadmin/templates/pdf-files/listen/genetik/f-alphathal.pdf>

20- J.-E. TOUZE, P. PAULE, T FUSAI.

Concepts physiopathologique du Paludisme grave dans le paludisme grave de Jean-marie Saissy. Arnette 2001.

21- MAHAMANE D.

Nouvelle contribution à l'étude des hémoglobinopathies et du déficit en G6PD au Mali à propos de 11506 électrophorèses de l'hémoglobine et 8844 dosages de G6PD. Thèse Pharm, Bamako ; 1983 ; N°3.

22- MOCHENHAUPT PF EHRHARDT J et al.

Manifestation and outcome of severe malaria in children in northern Ghana. Am J Trop Med Hyg 2004;71

23- MODIANO D, LUONI G, SIRIMA BS, SIMPORE J, VERRA F, et al.

Haemoglobin C and S protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. Nature. 2001; 414(6861):305-308.

24- MODIANO D, LUONI G, SIRIMA BS, SIMPORE J, VERRA F, KONATE A, RASTRELLI E, OLIVIERI A, CALISSANO C, PAGANOTTI GM, D'URBANO L, SANOU I, SAWADOGO A, MODIANO G, COLUZZI M .

Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. Nature. 2001; 414(6861):305-8.

25- OMS 2005

Cinquante-huitième assemblée mondiale de la santé. Paludisme. Rapport du secrétariat, 14 Avril 2005.

26- RIHET P, FLORI, TALL F, TRAORE AS, FUMOUX F.

Hemoglobin C is associated with reduced Plasmodium falciparum parasitemia and low risk of mild malaria attack. Hum Mol Genet.2004, 13, 1-6

27- ROBERTS DJ, WILLIAMS TN: Haemoglobinopathies and resistance to malaria. Redox Rep.2003; 8(5): 304

28- ROSSE WF, MOHANDAS N, PETZ LD, STEINBERG MH.

New views of sickle cell disease pathophysiology and treatment. Hematology 2000, Am Soc Hematol education program Book, pp2-17.

29- SALL A.H.

Incidence et mortalité de prise en charge du paludisme grave et compliqué dans le service pédiatrique du CHU Gabriel Touré.

Thèse Med.Bko, 2006 90-p-155

30- SPIVAK V A, SOU A, LUTSENKO IN.

Distribution of abnormal hemoglobins S and C in the Republic of Guinea. Genetika. 1992 Aug; 28: 159-65.

31- SOLOVEY A, LIN YI, BROWNE P, CHOONG S, WAYNER E, HEBBEL RP.

Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. N Engl J Med 1997; 337: 1584-1590.

32- SVT Drépanocytose et paludisme en Afrique. 15 décembre 2005. Adresse électronique : www.webpublic.ac-dijon.fr

33- THERESE DURIEZ, LUCIEN DUJARDIN, DANIEL AFCHAIN.

Paludisme Copyright: Laboratoire de Parasitologie Faculté de Pharmacie BP 83 59006 Lille cedex. Dernière mise à jour: 2/07/02, 12:55:54

34- WHO: World malaria situation in 1994. *Wkly Epidemiol Rec* 1997, 72 :269-74

35- WHO: World malaria situation in 1994. *Wky Epidemiol Rec* 1997, 72 :269-74

36- WILLIAMS TN, MAITLANA K, BENNETT S, GANCZAOWSKI M, PETO TE, NEWBOLD CI, BOWDEN DK, WEATHERALL DJ, CLEGG JB

High incidence of malaria in alpha-thalassémic children. *Nature*. 1996; 383:522-525.

37- WILLIAMS TN, MWANGI TW, WAMBUA S; et al.

Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+-thalassemia and the sickle cell trait.

38- WILLIAMS TN, MWANGI TW, WAMBUA S, ALEXANDER ND, KORTOK M, SNOW RW, MARSH K. Sickle cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. *J Infect Dis*. 2005 Jul 1; 192

39- BEH. Pays endémiques 2004. Adresse électronique: www.travelsante.com

10. ANNEXES

FICHE SIGNALETIQUE

Nom : DJIGUIBA

Prénom : Amadou

Nationalité: Malienne

Titre: Association hémoglobine AS et alpha-thalassémie. Impact sur le paludisme

Pays d'origine : Mali

Ville de Soutenance : Bamako

Année de Soutenance : 2009-2010

Thèse Pharmacie
DJIGUIBA

Amadou

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Secteur d'intérêt : Hématologie, Parasitologie

Résumé : Dans le but de définir la relation entre l'hémoglobine AS, l'alpha-thalassémie et le paludisme grave à *Plasmodium falciparum*, nous avons conduit une étude cas-témoin dans la ville de Kangaba et le village de Kéla. La détermination du type d'hémoglobine a été réalisée par HPLC à l'aide d'un D-10 et le typage de l'alpha-thalassémie par PCR.

Nous avons enregistré 2596 cas de paludisme dont 353 cas grave soit 13,6%.

La fréquence de l'hémoglobine AS et de l'alpha-thalassémie a été respectivement 8,1% et 37,2%.

Parmi les sujets porteurs d'hémoglobine AS, 3,6% ont développé le Paludisme grave contre 14,4% des sujets AA (Odds ratio=0,22). Par contre il n'existait aucune relation significative entre le portage de l'alpha-thalassémie et le Paludisme grave dans cette population d'étude (P=0,9).

La fréquence de l'alpha-thalassémie a été plus élevée chez les Sujets porteurs d'hémoglobine AS que chez les AA, mais cette différence n'était pas statistiquement significative (P=0,2). Il n'a pas été trouvé de relation entre l'association hémoglobine AS-alpha thalassémie et le paludisme grave dans ces deux localités.

Mots Clés : Hémoglobine AS, Alpha-thalassémie, Paludisme.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des maîtres de cette Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes chers condisciples.

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

- D'exercer dans l'intérêt de la santé publique ma profession, avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine. En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.
- Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
- Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !