



HAL
open science

Analyse anthropobiologique de la susceptibilité au paludisme chez l'homme

Karim Traore

► **To cite this version:**

Karim Traore. Analyse anthropobiologique de la susceptibilité au paludisme chez l'homme. Parasitologie. Université de Lyon; Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako (Mali), 2018. Français. NNT: 2018LYSE1016 . tel-01812768

HAL Id: tel-01812768

<https://theses.hal.science/tel-01812768>

Submitted on 11 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1016

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de

L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale : ED 205

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

Spécialité de doctorat : Micro-organismes, interactions, infections

Discipline : Parasitologie

Soutenue publiquement le 06 /02/2018

Par

Karim TRAORE

**Analyse anthropobiologique de la susceptibilité au
paludisme chez l'homme**

Devant le jury composé de :

BENOIT-VICAL Françoise, HDR, Faculté de pharmacie Toulouse :	Rapporteur
YAVO William, Professeur, Université Felix Houphoet-Boigny, Cote d'Ivoire :	Rapporteur
BIENVENU Anne-Lise, Pharm D, PhD, UCBL1, France :	Examinatrice
BRIAND Valerie, HDR, Université Paris Descartes, France :	Examinatrice
BUFFET Pierre, Professeur, Université Paris Descartes, France :	Examineur
PICOT Stéphane, Professeur, UCBL1, France :	Directeur de thèse
DOUMBO Ogobara, Professeur, USTTB, Bamako Mali :	Co-direteur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université	M. le Professeur Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G. RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y. VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E. PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ISSUES DE CE TRAVAIL :

1. **Karim Traore**, Charles Arama, Maurice Médebielle, Ogobara Doumbo and Stephane Picot. Do advanced glycation end-products play a role in malaria susceptibility? *Parasite*. 2016;23:15.

2. **Karim Traore**, Mahamadou A. Thera, Anne-Lise Bienvenu, Charles Arama, Guillaume Bonnot, Adeline Lavoignat, Ogobara K. Doumbo, Stephane Picot. Interaction between environment, nutrient-derivative metabolites and immunity: a possible role in malaria susceptibility/resistance in Fulani and Dogon of Mali. *PLoS ONE*. 2017;12(12): e0189724.

3. **Karim Traore**, Salimata Konate, Amadou Niangaly, Alhassane Ba, Alassane Niare, Julie Di Cristofaro, Mounirou Baby, Mahamadou A. Thera, Stephane Picot, Jacques Chiaroni, Gilles Boetsch, Ogobara K. Doumbo. Erythrocyte polymorphisms in different ethnic groups in malaria endemic areas of Mali. (*soumis*).

AUTRES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES EN LIEN AVEC CE TRAVAIL

1. Carlini F, **Traore K**, Cherouat N, Roubertoux P, Buhler S, et al. (2013) HLA-G UTR Haplotype Conservation in the Malian Population: Association with Soluble HLA-G. *PLoS ONE* 8(12): e82517

2.. **Karim Traore***, Adeline Lavoignat, Guillaume Bonnot, Fatimata Sow, Giuliana C Bess, Marjorie Chavant, Frederick Gay, Ogobara Doumbo and Stephane Picot. Drying anti-malarial drugs in vitro tests to outsource SYBR green assays. *Malar J*. 2015;14(1):90

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHÉES

1) **K. Traore**, O. Doumbo, S. Picot. Advanced Glycation Endproducts: implication in malaria susceptibility? Annecy ; CAPF, Jun 2014.

2) **Traore K**, Konate S, Niangaly A, Tolo Y, Coulibaly D, Thera MA, Doumbo OD. Prevalence moléculaire des espèces de Plasmodium dans une zone de transmission saisonnière de paludisme au Mali. Congrès de SOAP-SOPAMYM, Bamako 2016

3) **K. Traoré**, O. Doumbo, S. Picot: Rôle des produits terminaux de glycation dans la susceptibilité au paludisme dans deux populations sympatriques au Mali. Journée scientifique de l'EDISS, octobre 2014

4) **Karim Traore**, Mahamadou A Thera, Ogobara K. Doumbo, Stephane Picot. Differences in expression and polymorphism of gene encoding for the receptor for advanced glycation endproducts in Fulani and Dogon in Mali. Poster N° 1651, ASTMH 66th Annual Meeting, November 5-9, 2017, Baltimore Convention Center Baltimore, Maryland, USA

PARTICIPATION AUX CONGRÈS INTERNATIONAUX :

1) 9th European Congress on Tropical Medicine and International Health 2015 (ECTMIH 2015), 6 -10 September 2015, Basel, Switzerland.

2) 8^{ème} Congrès de la Société Africaine de Parasitologie (SOAP) & 1er Congrès de la Société de Parasitologie et de Mycologie du Mali (SOPAMYM) SOAP-SOPAMYM, 05, 06 et 07 décembre 2016. Palais des Sports, ACI 2000, Bamako, MALI.

3) 66th ASTMH Annual Meeting, November 5-9, 2017, Baltimore Convention Center Baltimore, Maryland, USA

Resumé

Analyse anthropobiologique de la susceptibilité au paludisme chez l'homme

Le paludisme reste la parasitose avec les taux de morbidité et mortalité les plus élevés et son impact socioéconomique constitue un frein au développement.

Il y a eu une coévolution entre l'hôte humain, le vecteur et le *Plasmodium* avec parfois des adaptations spécifiques de résistance. Cela s'est traduit aujourd'hui par la résistance du *Plasmodium* aux produits antipaludiques et des difficultés de développement de vaccin efficace. L'exploration de nouveaux axes de recherche s'avère donc pertinente pour la compréhension de certaines adaptations pouvant jouer un rôle dans la susceptibilité au paludisme.

Des différences de susceptibilités au paludisme ont été décrites chez les Peulh et Dogon sympatriques au Mali. La plupart des études faites pour comprendre cette différence de susceptibilité ont porté sur l'immunité. Dans ce travail, nous avons fait une approche novatrice plus globale, en étudiant l'interaction entre l'environnement, le système immunitaire et la susceptibilité au paludisme. Nous nous sommes ainsi intéressés à la relation entre l'alimentation, le métabolisme et l'immunité qui est un exemple d'interaction entre l'environnement et la biologie.

Nos travaux ont permis de décrire des différences entre Peulh et Dogon du Mali en termes de taux sanguins d'AGE et sRAGE, ainsi que dans l'expression et le polymorphisme du récepteur RAGE. Cela pourrait avoir des implications sur le plan immunitaire et donc dans la susceptibilité au paludisme. Ces résultats constituent d'importantes données de base pour soutenir une nouvelle voie de recherche sur le paludisme en combinant l'alimentation, le métabolisme, en associant le microbiote intestinal qui suscite aussi actuellement beaucoup d'intérêt dans le paludisme.

Abstract

Anthropobiological analysis of susceptibility to malaria in humans

Malaria remains the parasitic disease with the highest rates of morbidity and mortality and its socio-economic impact is an obstacle to development.

There has been a coevolution between human host, the vector and *Plasmodium* with sometimes specific adaptations of resistance, leading today into resistance of *Plasmodium* to antimalarial products and the difficulties to develop an effective vaccine. The exploration of new areas of research is therefore relevant for the understanding of some adaptations that may have implications in the susceptibility to malaria.

Differences in susceptibility to malaria have been described in symmetric Fulani and Dogon in Mali. Most of the studies carried out to understand this difference in susceptibility have focused on immunity. In this work, we have implemented a more global and innovative approach, studying the interplay between the environment, the immune system and susceptibility to malaria. We investigated the relationship between diet, metabolism and immunity, which is an example of interaction between environment and biology.

In our study, we described differences between Fulani and Dogons of Mali in terms of blood levels of AGE and sRAGE, as well as in expression and polymorphism of the RAGE receptor. This could have implications for the immune system and therefore for susceptibility to malaria.

These results provide important baseline data for supporting a new malaria research approach by combining diet, metabolism, and gut microbiota which is also currently of great interest in malaria.

Les mots clés : Paludisme, Alimentation, métabolisme, susceptibilité, ethnie.

Keywords: Malaria, Diet, Metabolism, Susceptibility, Ethnicity

Laboratoire de rattachement : UMR5246 - INSTITUT DE CHIMIE ET BIOCHIMIE MOLÉCULAIRES ET SUPRAMOLÉCULAIRES, SYNTHÈSE DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTHIQUE, MALARIA RESEARCH UNIT. Université Claude Bernard Lyon 1 - Campus LyonTech-la Doua, Bâtiment Raulin, 2^{ème} étage Sud 43, boulevard du 11 novembre 1918, 69622 VILLEURBANNE cedex.

Remerciements

Je remercie tout d'abord le bon Dieu pour m'avoir permis de réaliser ce travail.

Mes remerciements aux rapporteurs et aux membres du jury

Aux rapporteurs : Professeur William YAVO et Dr Françoise BENOIT-VICAL.

Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté d'être rapporteurs et membres de jury de cette thèse. Vous avez ainsi consacré une partie de votre précieux temps pour évaluer notre travail et de nous faire bénéficier de votre expérience et votre expertise scientifique. Nous en sommes très honorés. Vos critiques et remarques pertinentes ont permis d'améliorer la qualité de ce document. Veuillez accepter chers Maitres l'expression de toute notre reconnaissance.

Au Professeur Pierre BUFFET

Cher Professeur, vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury. Merci d'avoir accepté de juger ce travail et de nous faire bénéficier de votre longue et riche expérience et expertise scientifique.

Au Dr Anne-Lise BIENVENUE

Je vous remercie pour votre disponibilité et votre spontanéité chaque fois qu'il s'est agit de donner un avis scientifique durant l'élaboration de ce travail. Votre analyse scientifique pointue a toujours permis d'améliorer ce travail et d'atteindre les objectifs. C'est donc une chance pour nous que travail soit jugé par vous comme membre de jury. Recevez ici tous nos remerciements et notre profonde gratitude.

Au Dr Valérie BRIAND

Malgré vos multiples préoccupations, vous avez accepté de consacrer une partie de votre temps pour juger ce travail. Nous en sommes très honorés. Veuillez trouver ici tous nos remerciements sincères et toute notre profonde gratitude.

A notre Maitre Professeur Ogobara K. DOUMBO

J'ai eu la chance d'évoluer à vos coté et de bénéficier de vos encadrements de qualité, vos soutiens et conseils depuis plus de 10 ans. Cher maître, l'occasion est opportune pour moi de vous témoigner toute ma reconnaissance de m'avoir formé et d'avoir développé en moi une culture de rigueur scientifique. Je prie Dieu de me donner la chance de pouvoir encore évoluer le plus longtemps possible à vos cotés afin de bénéficier de votre expertise scientifique et de votre assistance.

A notre Maitre Professeur Stéphane PICOT

Cher Maitre, je ne saurais vous remercier à hauteur de souhait. Vous m'avez donné l'opportunité d'entamer des travaux de recherche de haut niveau en m'acceptant dans votre laboratoire et en mettant à ma disposition toutes les commodités scientifiques indispensables à l'épanouissement d'un chercheur. Ce sont ces travaux qui ont aboutit aujourd'hui à l'élaboration de cette thèse. Ce n'était pas évident car j'ai eu des moments de doutes sur ma capacité à réaliser ce travail, mais grâce à vos encouragements, à votre esprit scientifique et à votre accompagnement constant, j'ai pris confiance et le but a été finalement atteint. Veuillez trouver ici, cher Maitre, l'expression de toute ma gratitude.

Je remercie tous les responsables et tout le personnel de mon laboratoire d'accueil (UMR5246, ICBMS-SMITH-MALARIA RESEARCH UNIT), Merci pour m'avoir accepté et accompagné comme thésard dans le laboratoire.

A mes proches collaborateurs Guillaume Bonnot, Adeline Lavoignat, Fatimata Sow et Regine Ferreira. Merci à vous tous pour votre collaboration, votre soutien, votre hospitalité.

Je remercie mon grand frère Yacouba Traoré et sa femme Stéphanie Roschie pour leur soutien constant, leurs conseils et leurs encouragements. Ce travail est le fruit de la conjugaison des efforts de vous tous. Les débuts n'ont pas été faciles, mais avec votre soutien nous avons pu atteindre le but. Je vous dis merci pour tout.

Mes remerciements particuliers à Jean-Louis et Joëlle Clément

C'est le lieu de rappeler que sans votre humanisme, votre consideration pour le prochain et votre envie d'aider ceux qui sont dans le besoin, ce travail n'aurait probablement pas vu le jour. Vous avez accepté de m'héberger gratuitement chez vous avant même de me connaître, par ce que vous saviez simplement que j'avais des difficultés à me faire loger en France. Vous m'avez tout offert, rendu mon séjour agréable, apporté votre aide chaque fois que besoin s'est fait sentir. Durant tout mon séjour, je me suis toujours senti en famille, en sécurité parmi les parents. Les mots me manquent donc aujourd'hui pour vous exprimer toute ma reconnaissance et de toute ma gratitude.

Je remercie infiniment Lionel Giron et sa femme Pascal sans l'aide desquels je n'aurais probablement pas fait la connaissance de Jean-Louis et Joëlle. A toute et à tous, recevez mes sincères remerciements.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mon défunt père **feu Zanon Traoré** à qui Dieu n'a pas donné l'opportunité de voir ce jour mémorable. Ce travail est le fruit de l'éducation que tu nous as donné et le chemin que tu n'as tracé. Nous poursuivrons toujours ces efforts pour que tu sois toujours fier de nous.

A ma mère **Korotoumou Diamouténé** qui m'a toujours aidé avec les bénédictions, les encouragements et les conseils. Merci MAMAN.

A mon épouse Dr Maimouna Sougoulé

Sans ta compréhension, ton soutien, ton courage et ton respect, il y'aurait énormément d'obstacles à la réalisation de ce travail. Je me suis fréquemment absenté du foyer, parfois des absences très longues, mais tu as toujours compris que c'était pour atteindre un but auquel nous attachons tous une valeur inestimable. Tu t'es bien occupé de la famille. Ce résultat est vraiment le tien. Merci pour ta compréhension, ton accompagnement, ton courage et ton amour.

A mes enfants Zoumana, Khalifa et Mahamadou Karim Traoré. Votre presence m'a toujours donné la force, l'espoire et la confiance.

A tous mes frères et sœurs, merci pour votre soutien constant.

Table des matières

Resumé	5
Abstract	6
Remerciements	8
Dédicace	11
Liste des tableaux et des figures.	14
Liste des abréviations.....	15
I. Introduction.	16
II. Objectifs :.....	19
Objectif 1 : étude de la distribution des facteurs érythrocytaires susceptibles de jouer un rôle dans la susceptibilité au paludisme dans la population.....	19
Objectif 2 : Determination de la prévalence moléculaire du paludisme infection chez les Peulh et Dogon du Mali.....	19
Objectif 3 : l'impact des habitudes alimentaires sur le taux sanguin des produits terminaux de glycation.....	19
Objectif 4 : Le rôle de l'expression et le polymorphisme du gène RAGE dans la susceptibilité au paludisme dans deux populations sympatriques.....	20
III/ Etude bibliographique.....	21
A. Généralités sur le paludisme	21
1. Rappels épidémiologiques sur le paludisme et son impact socio-économique	21
2. La relation entre l'évolution, l'adaptation, facteurs génétiques et la susceptibilité au paludisme.....	25
B/ Paludisme, alimentation, métabolisme, microbiote intestinal et susceptibilité	31
1. Le microbiote intestinal, l'alimentation et le paludisme	31

2. Les produits terminaux de glycation (AGE pour Advanced Glycation Endproducts en Anglais), l'alimentation, le métabolisme et le paludisme	33
IV. Etude expérimentale	56
A. Matériels et méthodes.....	56
CHAPITRE I : Etude des systèmes érythrocytaires dans les deux populations	56
CHAPITRE II : Etude de la prévalence moléculaire des especes plasmodiales dans les deux groupes ethniques (Peulh et Dogon).....	57
CHAPITRE III : Etude du rôle des dérivées métabolites des aliments et leurs récepteurs (AGE, RAGE) dans les deux populations.....	58
CHAPITRE IV : Etude de l'expression et du polymorphisme de gène codant les récepteur de métabolisme (RAGE)	60
B. Resultats.....	63
CHAPITRE I: Résulats sur les systèmes érythrocytaires dans les deux populations.	63
CHAPITRES II, III et IV: Résultats sur les AGE, sRAGE, l'expression et le polymorphisme de RAGE.....	84
V. DISCUSSION GENERALE	102
1. Sur le plan socio anthropologique:.....	102
2. Etude des facteurs génétiques érythrocytaires chez les Peul et les Dogon.....	103
3. Prévalence des espèces de Plasmodium dans la population d'étude	105
4. Etude des produits terminaux de glycation et leurs récepteurs (AGE et RAGE).	105
VI. CONCLUSION.....	108
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	109
ANNEXES.....	121

Liste des tableaux et des figures.

Figure 1 : Cycle biologique de *P. falciparum* (Cowman AF et al., 2016)

Figure 2 : Produits majeurs issus de la réaction d'un aminoacide avec un sucre réducteur au cours de la réaction de Maillard (Traore K et al., 2016)

Figure 3 : Les domaines de structures et les isoformes RAGE les plus abondantes.

Figure 4 : Rôle de RAGE dans la réponse inflammatoire.

Tableau 1 : Apports en produits terminaux de la glycosylation (AGE) de quelques aliments d'origine animale exprimés en U/g ou U/ml ou KU/portion (Schlienger J-L et al, 2010)

Tableau 2 : Apports en produits terminaux de la glycosylation (AGE) de quelques aliments préparés exprimés en U/g ou U/ml ou KU/portion (Schlienger J-L et al, 2010)

Tableau 3 : Teneurs combinées en méthylglyoxal (MG) et carboxyméthyllysine (CML) dans quelques aliments (Uribarri J, et al., 2010)

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

AGE: Advanced Glycation endproducts

AOPP : Advanced Oxidative Proteins Products

DEAP : Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires

E. coli : *Escherichia coli*

EFS : Etablissements Français du Sang

G6PD : Glucose 6 Phosphatase Déshydrogénase

HMGB1: High Mobility Group Box 1

HSPB : Heat Shock Protein Family B

ICBMS : Institut de Chimie, de Biologie Moléculaire et Supramoléculaire

MRTC: Malaria Research and Training Center

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

P. falciparum: *Plasmodium falciparum*

P. vivax : *Plasmodium vivax*

P. malariae : *Plasmodium malariae*

P. ovale: *Plasmodium ovale*

P. Knowlesi: *Plasmodium*

PTG : Produits Terminaux de Glycation

RAGE : Receptor for AGE

UMI : Unité Mixte Internationale

USTTB : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

I. Introduction.

Le paludisme ou malaria reste un problème majeur de santé publique au monde avec près de la moitié de la population mondiale à risque. Le paludisme est toujours endémique dans 91 pays et territoires. En 2016, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a estimé le nombre de cas de paludisme à 216 millions dont 90% sont survenus en Afrique, avec plus de 455000 décès dont 91% en Afrique (WHO : World Malaria Report 2017). Grace aux interventions menées à grande échelle ces dernières années, l'incidence du paludisme a diminué de près de 18% de 2010 à 2016. De même, la mortalité du paludisme a diminué de près de 37% en Afrique, et atteignant 44% dans les régions d'Asie du sud est. Des progrès notables réalisés ont également permis l'élimination du paludisme dans 18 pays (WHO : World Malaria Report 2017). Cependant, selon le même rapport entre 2015 et 2016 la mortalité due au paludisme a augmenté, mettant à mal les stratégies actuelles de lutte contre le paludisme.

Trois acteurs interviennent dans la transmission et le maintien du paludisme : l'hôte humain, le vecteur (Anophèle femelle) et le parasite (*Plasmodium*). Il y a eu une coévolution entre ces trois acteurs avec parfois des adaptations spécifiques ou stratégies d'échappement (Kwiatkowski DP, 2005). En plus de la résistance du *Plasmodium* aux produits antipaludiques développés, des difficultés persistent également dans la mise en œuvre d'un vaccin efficace contre le paludisme. De nos jours, seul un candidat vaccin (RTS,S) dirigé contre les formes hépatiques a atteint la phase III (RTS,S Clinical Trials Partnership, 2011). D'autres candidats très prometteurs à base de sporozoïtes entiers non irradiés (PfSPZ) sont en cours d'évaluation en phase I (Sissoko MS, et al., 2017; Mordmuller B et al, 2015; Roestenberg M et al., 2011 ; Roestenberg M et al., 2009).

Au moment où l'essentiel des stratégies de recherche et de lutte s'oriente vers l'élimination du paludisme, et face aux multiples obstacles aux stratégies thérapeutiques et vaccinales, l'exploration de nouveaux axes de recherche tel que le rôle de l'alimentation et le métabolisme s'avère pertinent pour la compréhension de la susceptibilité au paludisme afin de contribuer à son contrôle ou son élimination.

Dans le processus évolutif de l'homme, l'environnement et les pathologies infectieuses ont exercé une forte action de sélection naturelle avec parfois des adaptations spécifiques (Campbell M C, et al.; 2008; Tishkoff S A, et al.; 2009). La diversité génétique inter et intra ethnique actuelle observée en Afrique sub-saharienne est donc le résultat de plusieurs facteurs. Il y a la pression de sélection exercée par les agents pathogènes infectieux tels que le *Plasmodium* d'une part, et de d'autre part il y a le rôle des facteurs anthropologiques tels que les modes de vie et les langues (González AM et col, 2006, Pereira L., 2002).

Au cours de l'évolution et avec la domestication du feu par l'homme moderne il y a environ 400 000 ans (De Lumley H. 2006.), ainsi que la pratique de l'élevage par l'homme, différentes habitudes culinaires et alimentaires se sont développées au sein des groupes ethniques. C'est ainsi que selon les groupes de populations on peut trouver des aliments peu ou pas cuits, cuits ou bien cuits. Les habitudes et régimes alimentaires varient aussi en fonction des moyens de subsistance du groupe de population (agriculteurs, pastoralismes, autres métiers).

Des évidences scientifiques démontrent de plus en plus le rôle de l'alimentation et de ses dérivées métaboliques dans le développement, la maturation et la modulation du système immunitaire (Veldhoen M and Ferreira C. 2015). Des différences de pratiques socioculturelles telles qu'alimentaire et culinaires entre les groupes ethniques

pourraient donc souvent avoir des avantages ou des inconvénients par rapport à la susceptibilité à certaines maladies notamment le paludisme (Lokki, et al.; 2011).

Au Mali, des différences de susceptibilité au paludisme entre les Peulh et les Dogon ont été décrites (Arama C, et al.; 2011, Arama C, et al.; 2015, Dolo A, et al. 2012 ; Maiga B, *et al.* 2014). Ces deux groupes de populations vivent en sympatrie dans les zones endémiques de paludisme. L'alimentation constitue la seule différence fondamentale sur le plan socioculturel entre ces deux populations. Beaucoup d'études explorant les différences de réponses immunitaires au cours du paludisme ont été menées dans ces deux groupes ethniques. Une seule a fait une approche anthropologique et biologique de cette question de susceptibilité chez les Peulh et Dogon en étudiant la persistance du gène de la lactase dans ces groupes ethniques (Lokki AI et al, 2011). Même si dans cette dernière étude les auteurs ont décrit une persistance du gène de la lactase chez les Peulh à des proportions élevées atteignant souvent 50% comparés aux Dogon, la question de la susceptibilité au paludisme reste toujours non élucidée (Lokki AI et al, 2011). Une approche globale étudiant l'interaction entre la biologie, la société et l'environnement pourrait donc contribuer à la compréhension des différences de susceptibilité au paludisme décrites dans ces populations.

Notre travail a donc consisté à faire une analyse anthropologique et biologique de la susceptibilité au paludisme dans deux groupes de populations exposées au paludisme mais ayant des différences de susceptibilités documentées à cette maladie.

II. Objectifs :

Nos activités se sont déroulées autour de 4 objectifs

Objectif 1 : Identifier les facteurs érythrocytaires susceptibles de jouer un rôle dans la susceptibilité au paludisme dans la population.

Certains facteurs génétiques érythrocytaires (système ABO, RH, Kell, MNS, Kidd) déjà connus dans la littérature pour leur rôle dans la susceptibilité au paludisme ont été étudiés dans cette population. La connaissance de la distribution de ces facteurs dans la population permettrait de mieux interpréter tout autre résultat relatif à la susceptibilité au paludisme en tenant compte de leur rôle confondant. De même, la distribution de ces facteurs génétiques érythrocytaires sensible à la pression de sélection naturelle produit des renseignements importants sur la coévolution entre l'homme et les pathogènes tel que le *Plasmodium*.

Objectif 2 : Déterminer la prévalence moléculaire du paludisme infection chez les Peulh et Dogon du Mali.

Par la PCR quantitative, nous avons déterminé la prévalence des différentes espèces de *Plasmodium* dans les deux groupes ethniques (Peulh et Dogon). Ces deux groupes ethniques vivent en sympatric dans le même environnement écoclimatique, mais présentant des différences de susceptibilité au paludisme. Dans cette étude nous sommes intéressés à l'infection palustre dans toutes les tranches d'âges dans les deux groupes ethniques.

Objectif 3 : Étudier l'impact des habitudes alimentaires sur le taux sanguin des produits terminaux de glycation.

Selon le type d'aliment fréquemment consommé, les habitudes culinaires d'un groupe ethnique, les niveaux de produits de glycation peuvent significativement varier.

(Poulsen, et al. 2013 ; Goldberg T, et al. 2004 ; Schlienger J-L, et al, 2010 ; Uribarri J, et al. 2010 ; Uribarri et al, 2005). Les produits terminaux de glycation avancé (AGE en Anglais : Advanced Glycation Endproducts) qui sont des dérivées issues de l'alimentation ont été mesurés dans le sang des volontaires. Ces produits ont la caractéristique d'interagir avec les récepteurs cellulaires RAGE (Recepteur AGE) et d'induire des réactions immunitaires de type inflammatoire. L'augmentation des AGEs dans le sang induit une réaction en cascade par la voie du nucléus factor kB (*NF kB*) avec recrutement de récepteurs RAGE et une auto amplification de l'expression du récepteur RAGE dans un cercle vicieux. Cela induit de façon chronique la réaction immunitaire de type inflammatoire et un stress oxydatif pouvant être délétère à long terme pour le système immunitaire.

Objectif 4 : Etudier le rôle de l'expression et le polymorphisme du gène RAGE dans la susceptibilité au paludisme dans deux populations sympatriques

Un lien a été décrit entre certaines mutations du gène RAGE et son expression. Selon la variant du gène exprimé, l'effet sur l'immunité peut être protecteur ou délétère. Dans ce travail nous avons d'abord déterminé le niveau d'expression du gène RAGE dans les deux populations, puis nous avons étudié la mutation -374T qui est impliquée dans les modifications de l'expression du gène RAGE.

III/ Etude bibliographique

A. Généralités sur le paludisme

1. Rappels épidémiologiques sur le paludisme et son impact socio-économique

Le paludisme (malaria en anglais) est une pathologie fébrile et hémolysante causée par le développement et la multiplication d'abord dans le foie puis dans les hématies d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique femelle du genre Anophèles. Cinq espèces de plasmodies peuvent infecter Homo sapiens : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi* (White NJ.; 2008). *P. falciparum*, présent à 90% dans la zone intertropicale d'Afrique est responsable de la quasi-totalité des décès par le paludisme. *P. ovale* est retrouvé essentiellement sur le continent africain (avec les sous-espèces *P. o. wallikeri* et *P. o. curtisi*) et *P. knowlesi* a été récemment décrit en Asie du Sud-Est (Oguike MC et al.; 2011).

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde avec les taux de morbidité et mortalité les plus élevés. Actuellement près de la moitié de la population mondiale vit en zone d'endémie palustre et est à risque de contracter le paludisme. C'est l'Afrique qui paye le lourd tribut avec 90% des cas et 91% des décès touchant surtout les enfants de moins de cinq ans (WHO 2017 : World Malaria Report 2017).

Mortalité infantile et maternelle élevées, insuffisance pondérale à la naissance, absentéisme scolaire et faible productivité agricole sont les principaux maux dont le paludisme est responsable sur ce continent.

Le cycle biologique du Plasmodium s'effectue chez deux hôtes : l'hôte humain qui est l'hôte définitif et le vecteur (moustique) qui est l'hôte intermédiaire. Le cycle commence au moment d'un repas sanguin du vecteur sur l'hôte humain, puis s'en suit une série d'évènements biologiques complexes aboutissant au développement de la maladie et la différenciation des formes sexuées qui assurent la transmission du parasite au vecteur (Fig. 1).

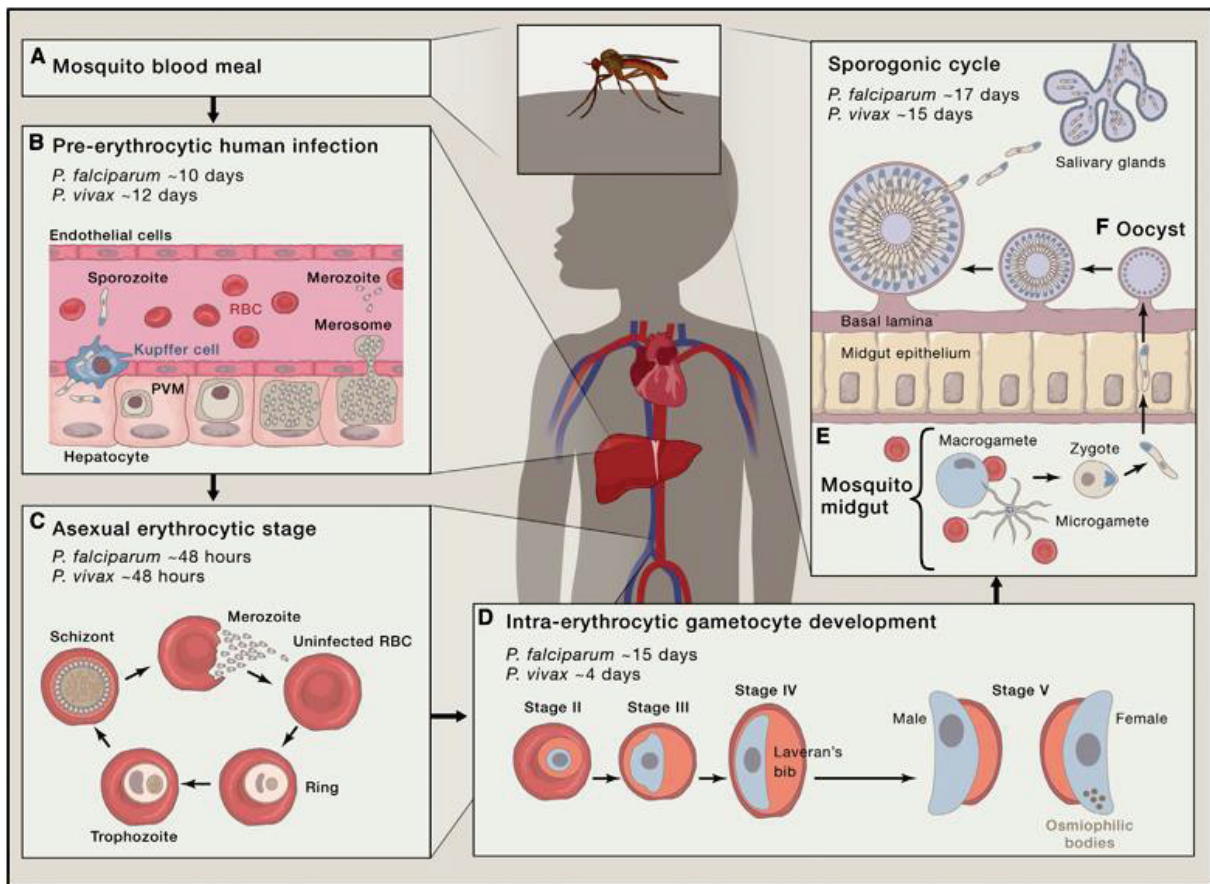


Figure 1. Cycle biologique de *P. falciparum* et *P. vivax* (Cowman AF et al. ; 2016)

(A) L'injection de sporozoïtes (spzs) dans le derme par un moustique anophèle femelle.

(B) Les spzs pénètrent dans le système vasculaire et sont transportés vers le foie, où ils sortent des sinusoides à travers des cellules Kupffer ou endothéliales et entrent dans un hépatocyte. Ils subissent une schizogonie et libèrent des dizaines de milliers de mérozoïtes filles sous forme de paquets de mérosomes dans le système vasculaire.

(C) Rencontre avec les érythrocytes et début d'un cycle chronique de schizogonie asexuée dans le sang.

(D) Une proportion de mérozoïtes à reproduction asexuée est reprogrammée pour subir une gamétocytogenèse.

(E) Dans un délai de 15 jours, les gamétocytes se séquestrent et se développent dans la moelle osseuse, et une fois arrivés à maturité, ils pénètrent dans la circulation périphérique pour être ingérés par un moustique.

(F) Fusion de micro- et macrogamètes pour former un zygote qui donne en 24 heures un ookinete qui migre ensuite à travers l'épithélium de l'intestin du moustique et s'enkyste pour devenir un oocyste. Les sporozoïtes motiles sont libérés dans l'hémocèle par la rupture de l'oocyste et passent dans les glandes salivaires où ils peuvent être injectés dans l'hôte humain suivant.

L'Impact du paludisme sur le plan socioéconomique, sur la scolarisation et la créativité des enfants est très important au monde et particulièrement en Afrique.

Le paludisme est une maladie liée à la pauvreté, affectant a priori les personnes avec un faible statut socio-économique et ayant un accès difficile aux services de santé (Klinkenberg E, et al.; 2006; Gay-Andrieu F, et al.; 2005). De ce fait, il frappe surtout les populations qui vivent en zones rurales dans des écosystèmes qui les exposent aux piqûres infestantes des moustiques.

Le paludisme peut affecter la faculté cognitive des enfants surtout dans des zones endémiques comme l'Amérique latine, l'Afrique, et joue ainsi un rôle dans le maintien de la pauvreté dans ces zones. La déficience dans le développement des capacités cognitives décrite après un épisode aigu de paludisme cérébral peut se produire à court terme (Sachs G, WHO 2000 ; Meremikwu MM, et al.; 1997; Boivin MJ, 2002; Boivin MJ, et al.; 2007) comme à long terme (Holding PA, et al.; 1999; Carter JA, et al.; 2005).

L'atteinte des capacités cognitives peut affecter toutes les sphères : le langage, l'attention, la mémoire, les aptitudes visio-spatiales et les fonctions exécutives (Kihara

M, et al.; 2006) avec un impact négatif sur les performances scolaires comme décrit au Brésil (Vitor-Silva S, et al.; 2009) et au Sri Lanka (Fernando SD et al.; 2003).

Au Mali, le paludisme est la première cause d'absentéisme scolaire et affecte significativement l'indicateur synthétique des performances cognitives des enfants et les résultats scolaires académiques des enfants (Josselin Thuilliez J et al.; 2010).

Ces résultats suggèrent que les attaques répétées de paludisme sont capables de produire un effet négatif cumulatif sur le rendement scolaire.

D'un point de vue économique, le paludisme pourrait donc être une barrière au développement dans les pays les plus touchés en affectant les générations futures et en bloquant l'accumulation de capital humain (Josselin Thuilliez J et al.; 2010).

Beaucoup de pays africains ont 1-2% de leur produit intérieur brut à risque à cause du fait que paludisme affecte les personnes en âge de travailler (Josselin Thuilliez J et al.; 2010).

L'impact socioéconomique du paludisme constitue donc un véritable frein au développement

2. La relation entre l'évolution, l'adaptation, facteurs génétiques et la susceptibilité au paludisme

Le rôle de certains facteurs génétiques de l'hôte dans le contrôle du paludisme a été démontré. Beaucoup de ces facteurs se sont développés au cours d'une longue coévolution de l'hôte et du parasite. Parmi les facteurs déjà largement étudiés, nous pouvons citer les systèmes érythrocytaires, les hémoglobinopathies, le déficit en G6PD, les systèmes HLA et KIR.

Les premières découvertes du rôle d'un groupe sanguin dans la susceptibilité au paludisme ont été faites depuis les années 1975 par Miller et al. Le rôle déterminant du système Duffy décrit dans l'invasion des hématies par *Plasmodium vivax* a ouvert une nouvelle voie dans la compréhension de la susceptibilité de l'hôte au paludisme (Miller L.H et al. 1975, Miller L.H et al. 1976). Le système Duffy est un système polymorphe et comporte entre autres deux allèles mendéliens *Fya* et *Fyb* localisés sur le chromosome 1. Le caractère Duffy (-) correspond à un manque d'expression des deux antigènes *Fya* et *Fyb* donnant le phénotype *Fy(a-b-)*. Il apparaît probable que la haute incidence de l'allèle *FY*O* en Afrique soit le résultat d'une pression sélective liée à l'avantage que confère cette homozygotie vis à vis de cette infection comme le paludisme. La fréquence élevée de l'allèle *FY*O* atteignant 100% dans certaines régions d'Afrique de l'Ouest (population noire) avait abouti à la disparition totale de *Plasmodium vivax* dans ces régions en raison de la rupture de son cycle de reproduction (Welch SG, 1977). Il a été d'abord montré que les érythrocytes *Fy(a-b-)* sont résistants à l'invasion *in vitro* par les mérozoïtes de *Plasmodium knowlesi*. Ce dernier est phylogénétiquement proche de *P. vivax* (Miller L.H et al. 1976). Puis des travaux réalisés chez les volontaires ont montré que les individus ayant le caractère Duffy (-) étaient résistants au paludisme à *P. vivax*. En effet, ces individus ont résisté à l'infection, après exposition à des moustiques infectés par *P. vivax*, alors que les autres volontaires ont été malades 11 à 15 jours après l'exposition (Miller L.H et al. 1976). Cependant, depuis les travaux de Didier Menard et al., qui ont décrit une circulation silencieuse de *P. vivax* à Madagascar où cohabitent les populations Duffy négative et positive (Menard et al, 2010 ; Menard D, 2013), de plus en plus de données remettent en cause cette résistance naturelle du groupe Duffy négatif à l'infection par *P. vivax*. Récemment au Mali, grâce à l'utilisation des outils de la biologie moléculaire,

des cas d'infections à *P. vivax* ont été décrits chez les enfants dans une zone endémique au Mali (Niangaly A, et al. 2017). Dans ces travaux, des taux de prévalence de *P. vivax* atteignant 2,5% ont été décrits dans cette population, avec un total de 25 cas de *P. vivax* dans une cohorte de 300 enfants pendant une période de suivi de 3 ans. Ces récentes données démontrent que le processus évolutif entre l'homme et le *Plasmodium* est un processus dynamique et continue.

Outre le système Duffy, il existe d'autres récepteurs impliqués dans l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *Plasmodium*. Il est aujourd'hui connu que la plupart des récepteurs de l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *P. falciparum* appartiennent à la famille des glycophorines (système MNS). Le système MNS est impliqué dans la résistance contre plusieurs pathogènes et pourrait donc avoir évolué sous la pression sélective de ces pathogènes. Les sujets déficitaires en Glycophorine A, sont plus résistants à l'invasion palustre (Miller, 1977). En effet la protéine EBA-175 de *Plasmodium falciparum* se fixe spécifiquement sur la Glycophorine A. Les sujets S-s-, qui sont déficitaires en Glycophorine B, sont aussi plus résistants mais moins que les déficitaires en Glycophorine A et B (Sim BK, 1994 ; Facer CA, 1994 ; Nagel R.L et al, 1989 ; Hadley TJ et al., 1987). La Glycophorine A est aussi le récepteur de nombreuses bactéries comme *E. Coli*, de *Vibrio cholerae*, et les virus *Influenza* (Kathan RH, 1961).

Le rôle particulier du système ABO a été aussi largement démontré dans la susceptibilité à certaines maladies infectieuses (Rowe J. A, 2009). Le polymorphisme au niveau de ce système semble très ancien. Des études récentes ont mis en évidence une résistance des sujets de groupe O aux formes graves du paludisme en Afrique (Rowe J A, 2007). Des fréquences très élevées des phénotypes O en Afrique

subsaharienne ont été reportées dans la littérature (Rowe JA, et al, 2009 ; Crubezy E, et al., 2008). Au Mali, une étude récente au niveau du centre national de transfusion sanguine a reporté 42% du phénotype O (Diarra AB et al., 2013). Dans une autre étude portant sur 5 groupes ethniques vivant en zone d'endémie palustre en 2009, les prévalences du phénotype O atteignaient 50-60% (Santovito Aet al/, 2009). La prédominance de ce phénotype O en Afrique subsaharienne est supposée être liée à la pression de sélection naturelle exercée par certaines maladies endémiques tel que le paludisme (Rowe JA et al., 2007; Mellal PDB, 2008; Arama C et al, 2011; Wagner FF and Flegel WA, 2002). Les érythrocytes infectés de ces individus O sont incapables de former des rosettes (Rosetting), ce qui favoriserait leur élimination par des moyens naturels de défense tel que la rate, tout en conférant une sélection positive de ce groupe O (Rowe JA et al., 2007).

Un autre grand groupe de facteurs génétiques ayant été considérés comme fruit des pressions de sélections est celui des hémoglobinopathies. Leur distribution géographique est très évocatrice de cette évolution sous pression de sélection naturelle exercée par des maladies infectieuses tel que le paludisme.

Les hémoglobinopathies concernent environ la moitié du globe terrestre. La distribution est inégale selon le type d'hémoglobine.

- L'hémoglobine S (Hb S) est essentiellement trouvée dans les régions tropicales, le foyer le plus important traversant en ceinture le continent Africain "ceinture sicklémique de Lehman".

- L'hémoglobine C (Hb C) se rencontre également dans les populations africaines : le réservoir de ce gène se situe dans le plateau voltaïque où, dans certaines régions, 30% des sujets peuvent en être porteurs (Labie D et al, 1984).

- L'hémoglobine E (Hb E) est essentiellement localisée au Sud-Est asiatique.
- Dans les populations Punjabi des Indes on trouve un nombre élevé d'hémoglobine D. Elle est aussi retrouvée chez les populations leucodermes du nord du Mali (Chaventre A et al, 1980).

Toutes ces hémoglobinopathies ont l'avantage de conférer aux individus porteurs de ces anomalies génétiques une résistance naturelle au paludisme. Ce qui aurait donc favorisé leur sélection dans les zones endémiques du paludisme

Le déficit en G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase), également appelé favisme, est considéré aussi une anomalie du globule rouge pouvant protéger contre le paludisme. C'est le déficit enzymatique le plus fréquent au monde : il concerne 420 millions de personnes. Il touche essentiellement des populations d'Afrique, d'Asie, du Moyen-Orient et du Bassin Méditerranéen. Il existe de nombreux variants moléculaires du déficit en G6PD dont le plus connu et le plus répandu est le variant A-. Il concerne 90 % des personnes déficitaires de G6PD en Afrique tropicale.

Le trait drépanocytaire et le déficit en G6PD sont deux anomalies génétiques communément rencontrés en Afrique sub-saharienne. Au Mali, la fréquence du trait drépanocytaire et celle du déficit en G6PD (A2) sont respectivement de 12% et 14%. La coexistence de ces deux traits serait associée à la protection contre le paludisme sévère (Guindo A et al, 2011 ; Travassos MA et al 2015).

2.1. Facteurs génétiques et susceptibilité au paludisme chez les Peulh et Dogon du Mali

Les différences de susceptibilité actuellement observées vis-à-vis du paludisme (y compris entre les ethnies) pourraient être les résultats d'une longue interaction entre

l'environnement et la biologie (coévolution/adaptation entre hôte-pathogène) (Kwiatkowski DP, 2005). Le rôle de cette coévolution/adaptation ainsi que des différences ethniques de susceptibilité au paludisme est largement étudié chez les Peulh et Dogon du Mali (Travassos MA, et al, 2015, Arama C et al, 2011 ; Lokki AI et al. 2011 ; Arama C et al, 2015 ; Agarwal A, et al, 2000 ; Israelsson E et al, 2009).

La question de la différence de susceptibilité au paludisme chez les Peulhs et des Dogons, deux groupes ethniques vivant en sympatrie au centre du Mali a fait l'objet de plusieurs études depuis plus de 10 ans. Ces études ont d'abord démontré que l'indice splénique (IS) était significativement plus élevé chez les Peulhs (38,5%) que chez les Dogons (17,4%) ; $p \leq 10^{-6}$, et que l'indice plasmodique (IP) et la densité parasitaire étaient significativement plus faibles chez les Peulhs (IP= 15,9%) que chez les Dogons (IP= 20,7%) ; $p < 0,001$. (Arama C et al, 2011 ; Israelsson E et al, 2009 ; Lokki AI et al. 2011). Sur le plan immunologique, les moyennes géométriques des taux d'IgG et d'IgE anti-plasmodiales étaient significativement plus élevées chez les Peulhs que chez les Dogons. Ces résultats suggéraient donc que les Peulhs étaient moins susceptibles au paludisme que les Dogons au centre du Mali (Arama C et al, 2011 ; Israelsson E et al, 2009 ; Lokki AI et al. 2011 ; Arama C et al, 2015).

Des études cas-témoins ont aussi été réalisées chez les Dogons du Mali pour tester l'association entre l'hémoglobine C (HbC) et la protection contre le paludisme. Ces études ont décrit 18% d'hémoglobine C chez les Dogon à Bandiagara (Agarwal A et al, 2000) avec un rôle protecteur contre le paludisme clinique chez les enfants (Travassos MA et al, 2015).

Ces résultats suggèrent que l'HbC protège contre les formes sévères de paludisme dans la population Dogon (Agarwal A, et al, 2000).

Les mêmes auteurs ont montré un effet protecteur de l'hémoglobine S contre les épisodes cliniques de paludisme chez les enfants de 0 à 6 ans (Travassos MA, et al, 2015).

Déjà en 2011, l'une de ces études avait abordé cette question de susceptibilité chez les Peulh et les Dogon par l'étude de la persistance du gène de la lactase chez ces populations qui ont des différences actuelles et ancestrales dans la consommation du lait (Lokki AI et al. 2011). Dans cette étude, des fréquences élevées de persistance du gène de la lactase ont été décrites chez les Peulh atteignant souvent des proportions supérieures à 50% comparées aux Dogon.

B/ Paludisme, alimentation, métabolisme, microbiote intestinal et susceptibilité

1. Le microbiote intestinal, l'alimentation et le paludisme

Le contact de l'homme avec son microbiote commence depuis la naissance après la rupture des poches fœtales. Le microbiote de l'homme est très diversifié, mais unique et propre à chaque individu. Le terme microbiote est beaucoup plus large et regroupe l'ensemble des bactéries qui cohabitent avec l'homme quel que soit la localisation. Le microbiote intestinal est celui qui est le plus étudié et qui a suscité le plus d'intérêt en pathologie infectieuse car c'est à ce niveau que la composition du microbiote est abondante et diversifié, mais aussi leur influence sur la physiologie de l'organisme est déterminante (Débré P, 2015). Chaque individu partage seulement 1/3 des espèces dominantes de son microbiote intestinal avec les autres alors que les 2/3 lui sont spécifiques (Qui Jet al., 2010). Il est aussi connu que la composition du microbiote intestinal est largement influencée par l'alimentation et l'environnement. Cela commence depuis la naissance ou l'allaitement maternel favoriserait la colonisation de

l'intestin par certaines bactéries (Cotillard A et al., 2013 ; Lagier JC et al., 2012). D'autres facteurs tels que l'hygiène et la consommation de produits antibactériens interviennent aussi dans la composition du microbiote. Avec la domestication des animaux et la pratique de l'élevage, la composition du microbiote intestinal de l'homme a beaucoup évolué grâce à la consommation des produits laitiers et dérivés. Il y a donc un lien étroit entre l'alimentation et la composition du microbiote intestinal.

Le rôle du microbiote intestinal est documenté dans la survenue d'un certain nombre de pathologies telle que l'obésité et les cancers (Angelakis E et al., 2012 ; Devaraj S et al., 2013).

Au cours de l'évolution et la sélection naturelle, la composition, l'abondance et l'interaction continue du microbiote intestinal avec le système immunitaire pourraient jouer un rôle déterminant dans la susceptibilité aux maladies infectieuses.

Le microbiote intestinal constitue de nos jours un sujet d'intérêt dans la susceptibilité au paludisme. Des preuves scientifiques récentes ont démontré que certains germes composant le microbiote intestinal sont capables d'induire des réactions immunitaires protectrices contre le paludisme. Des auteurs ont démontré que des glycanes *Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (α -gal)* qui sont exprimés par *Escherichia coli* O86:B7, une souche du microbiote intestinal humain, sont aussi exprimés par le *Plasmodium*. Les souches *E. coli* O86:B7 présentes dans l'intestin de l'homme sont capables d'induire la production d'anticorps anti α -gal qui confèreraient une protection contre la transmission du paludisme chez l'homme adulte (Yilmaz B, et al, 2014). Plusieurs bactéries du microbiote intestinal expriment ces glycanes. Récemment en 2016, dans un modèle expérimental murin, Villarino NF et al, ont décrit une réduction de la morbidité du paludisme après un traitement par *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Villarino et al.,

2016). La même association significative entre la composition du microbiote intestinal et le risque potentiel de l'infection à *P. falciparum* avait été aussi décrite dans une étude de cohorte d'enfants en 2015 au Mali. Cependant, ces auteurs n'ont pas mis en évidence une relation entre la composition du microbiote et le risque de développer un accès palustre fébrile après l'infection par *P. falciparum* (Yooseph S., et al., 2015).

L'organisme humain n'exprime pas α -gal, mais une proportion importante des anticorps naturels circulants chez les adultes est dirigée contre ces glycanes α -gal.

Les quantités d'anticorps circulants anti α -gal décrites chez les adultes en bonne santé seraient donc le résultat d'une interaction entre le système immunitaire et le microbiote (Macher and Galili, 2008). L'absence chez l'homme du gène UDP-galactose: β - galactoside- α 1-3-galactosyltransferase (α 1,3GT), qui code pour les glycanes α -gal serait dû à un processus évolutif de sélection naturelle pour permettre la production des anticorps anti α -gal (Bishop and Gagneux, 2007).

2. Les produits terminaux de glycation (AGE pour Advanced Glycation Endproducts en Anglais), l'alimentation, le métabolisme et le paludisme

2.1 La glycation des protéines et la formation des AGE :

Les Produits Terminaux de la Glycation (PTG), ou Advanced Glycation Endproducts (AGE) sont des substances pro-oxydatives et pro-inflammatoires, issues de la réaction de la glycosylation des protéines connue sous le nom de la réaction de Maillard (Louis Camille Maillard qui l'a décrite pour la première fois en 1918). Cette réaction peut se produire dans les aliments au moment de leur cuisson par la chaleur, mais aussi dans l'organisme. Elle consiste à la liaison d'un sucre réducteur à un groupement amine,

avec la formation des produits dits primaires, intermédiaires puis terminaux de la glycation (Fig. 2).

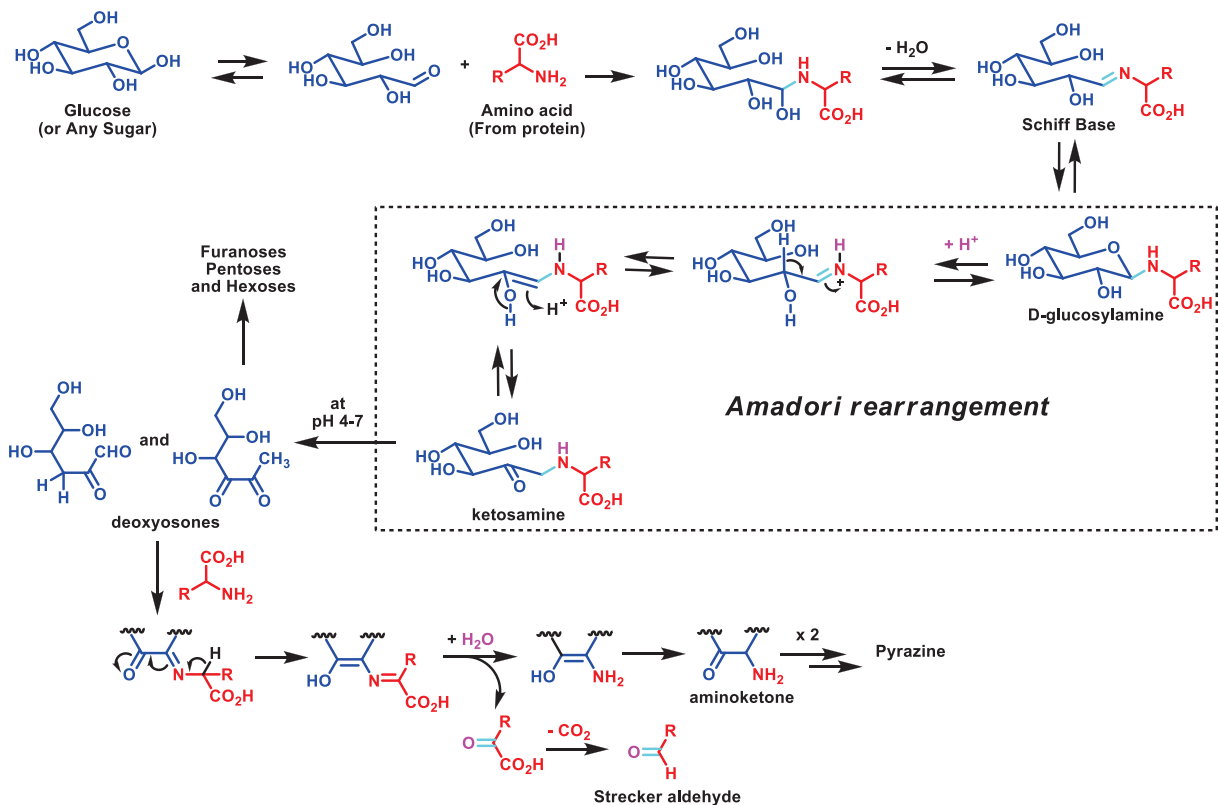


Figure 2: Produits majeurs issus de la réaction d'un aminoacide avec un sucre réducteur au cours de la réaction de Maillard (Traore K et al., 2016)

- Formation rapide et réversible d'une base de Schiff instable par combinaison de la fonction aldéhyde du glucose avec un résidu aminé de la protéine (Lysine, Arginine) ou avec la fonction amine N-terminale.
- Réarrangement d'Amadori pour aboutir aux produits de glycation dit précoce ou fructosamines qui sont des protéines intermédiaires.
- Accumulation lente et irréversible, par réarrangements, transferts d'hydrogène et oxydation, de produits avancés de glycation (AGE) ou produits de réaction de Maillard. Ces produits terminaux de glycation sont impliqués dans la formation de liaisons croisées entre protéines (Yang S et al, 2003).

Les deux premières étapes sont potentiellement réversibles mais la formation des produits avancés de glycation une fois faite est irréversible (Lyons TJ et al, 1985).

La formation des produits avancés de glycation est un phénomène courant au cours de nombreuses pathologies chroniques (Bordas-Fondrede M et al, 1990) mais aussi au cours du vieillissement (Kim CS et al, 2017).

Cette formation des AGE par la glycation des protéines circulantes est dite endogène. L'origine des AGE est soit endogène, soit alimentaire (exogène). Mais il est démontré que le rôle et la contribution des AGE d'origine alimentaire dans les quantités totales circulantes d'AGEs dans le sang est déterminant (Uribarri J, et al., 2010 ; Schlienger J-L et al, 2010). Une grande quantité d'AGEs provient de l'alimentation, et ces AGE réagissent dans l'organisme comme ceux formés par voie endogène (Uribarri J et al, 2005 ; Akirav EM et al, 2012). En effet, selon les habitudes culinaires et alimentaires, le niveau d'exposition journalière d'un individu ou groupe d'individu peut varier considérablement (Uribarri J, et al., 2010), (tableaux 1, 2 et 3).

Dans une étude de cohorte d'adulte à New York City, les quantités d'AGE consommées dans l'alimentation étaient estimées à 14700+/-680 AGE KU/jours. Le niveau d'exposition d'un adulte aux AGE est donc actuellement évalué en plus ou moins exposé selon que les quantités d'AGE consommés soient supérieures ou inférieurs à 15000 AGE KU/jour.

La température et le temps de cuisson sont des éléments déterminants dans la formation des AGE dans les aliments. En effet, la vitesse de formation des AGE est proportionnelle à la température et au temps de cuisson. Les tableaux 1, 2, et 3 donnent des teneurs en AGE de quelques aliments communément consommés par l'homme et préparé en divers procédés.

Les produits laitiers sont les plus pauvres en AGE à l'exception de quelques fromages. Parmi les céréales préparées, le couscous est l'aliment le plus pauvre en AGE (tableaux 1, 2, 3). Il contient pratiquement les mêmes quantités d'AGE que les fruits et

légumes qui en plus de ne pas contenir d'AGE contribuent même à leur élimination (Schlienger J-L et al, 2010).

Parmi les méthodes de préparation des aliments, la cuisson par la vapeur est la méthode de cuisson qui produit très peu d'AGE. Cela explique les faibles quantités d'AGE dans le couscous mais aussi dans les autres aliments préparés à la micro-onde. Par contre, les cuissons à des très hautes températures (comme dans les fastfoods) ou les cuissons prolongées (cuissons au feu de bois, etc...) produisent des quantités importantes d'AGE (Uribarri J, et al., 2010).

Tableau 1 : Apports en produits terminaux de la glycosylation (AGE) de quelques aliments d'origine animale exprimés en U/g ou U/ml ou KU/portion (Schlienger J-L et al, 2010), adapté.

		U/g ou ml	KU/portion	Portion
Viandes et équivalents				
Bœuf	Bouilli	22305	2220	100 g
	Grillé au four	59636	5960	100 g
Porc	Jambon fumé	23491	2110	90 g
	Côtelette panée	47526	4750	100 g
	Bacon grillé	90228	1200	15 g
Volaille	Poulet bouilli	11236	1120	100 g
	Grillé (15 minutes)	58280	5830	100 g
	Frit (8 minutes)	7390	896	100 g
Poisson	A l'eau	7600	760	100 g
	Saumon grillé	14973	1500	100 g
	Thon rôti	9189	920	100 g
	Conserve (à l'huile)	17396	1566	90 g
	Grillé	51133	5100	100 g
Produits laitiers et œufs				250 ml
Lait	Entier cru	48	12	250 ml
	Demi écrémé chauffé 1 min	5	1	250 ml
	Demi écrémé chauffé 2 min	21	5	250 ml
	Demi écrémé chauffé 3 min	78	19	250 ml
Yoghourt		40	5	250 ml
Fromage	Mozzarella	16777	500	30 g
	Emmenthal	44700	1240	30 g
	Brie	55979	1680	30 g
	Feta	84235	2530	30 g
Œuf	Jaune (dur)	12134	180	15 g
	Blanc (dur)	440	13	30 g
	Sur le plat avec margarine	27494	1400	50 g
Beure		264873	1320	5 g
Margarine		192	876	5 g

Tableau 2 : Apports en produits terminaux de la glycosylation (AGE) de quelques aliments préparés exprimés en U/g ou U/ml ou KU/portion (Schlienger J-L et al, 2010)

		U/g ou ml	KU/portion	Portion
Céréales	Pain blanc	730	22	30 g
	Pain Toasté	1394	36	30 g
	Céréales (flocons)	2320	70	30 g
	Pancake maison	9720	290	30 g
	Pankake Toasté	22618	680	30 g
	Spaghetti	2400	240	100 g
	Pâtes au fromage	27280	2730	100 g
	Pâtes au fromage gratin	40698	4070	100 g
	Pizza	68248	13000	250 g
	Couscous et légumes	36	9	250 g
Féculents	Pomme de terre			
	- Robe des champs	174	17	100 g
	- Rissolées 45 min à l'huile	2180	220	100 g
	- Frites maison	6939	700	100 g
	- Frites restaurant	15219	1520	100 g
	Chips	28818	860	30 g
	Maïs soufflé	330	10	30 g

Tableau 3 : Teneurs combinées en methylglyoxal (MG) et carboxyméthyllysine (CML) dans quelques aliments (Uribarri J, et al., 2010)

Food item	Advanced Glycation End Product Content	
	Total MG nmol/100 g	Total CML kU/100 g
Solid foods (per 100 g food)		
Bread, white	3,630	8.3
Bread, wheat	4,840	105
Cereal, Life (Quaker Oats, Chicago, IL)	9,000	1,452
Cheese, American	16,790	8,677
Cheese, Brie	5,670	5,598
Chicken, grilled	14,440	4,848
Chicken, microwaved (5 min)	8,350	1,524
Chicken, raw	4,170	769
Crackers, Pepperidge Farms Goldfish (Campbell Soup Co, Camden, NJ)	4,170	2,176
Egg, fried	13,670	2,749
French fries	13,130	843
Margarine, Smart Balance (CFA Brands, Heart Beat Foods, Paramus, NJ)	10,790	6,229
Salmon, broiled with olive oil	14,950	4,334
Salmon, broiled, plain	9,350	3,347
Salmon, pan fried in olive oil	9,090	3,083
Salmon, raw	6,820	527
Salmon, raw, previously frozen	6,190	517
Steak, broiled, plain	17,670	7,478
Steak, pan fried in olive oil	18,150	10,058
Steak, raw	5,860	800
Tuna, solid white packed in water	4,060	452
	Total MG nmol/100 mL	Total CML kU/100 mL
Liquids (per 100 mL food)		
Ice cream, vanilla	620	352
Milk, whole	620	4.9
Olive oil, fresh (Colavita, Linden, NJ)	7,700	5,852
Olive oil, heated at 100°C for 5 min (Colavita, Linden, NJ)	9,700	6,295
Olive oil, heated at 100°C for 5 min + butylated hydroxytoluene (Colavita, Linden, NJ)	8,200	6,682
Olive oil, heated at 100°C for 5 min + aminoguanidine (Colavita, Linden, NJ)	7,900	5,763
Pudding, chocolate	160	16
Pudding, vanilla	110	13
Yogurt, Dannon (White Plains, NY)	830	3
Coke, diet (Coca-Cola Co, Atlanta, GA)	334	4
Coke, Diet Plus (Coca-Cola Co, Atlanta, GA)	422	2
Coca Cola Classic (Coca-Cola Co, Atlanta, GA)	13	3
Pepsi, diet (PepsiCo, Purchase, NY)	33	3
Pepsi, regular (PepsiCo, Purchase, NY)	325	2
Pepsi, diet, caffeine free (PepsiCo, Purchase, NY)	201	2.6
Pepsi Max, diet (PepsiCo, Purchase, NY)	202	3.3
SoBe Adrenaline Rush (South Beach Beverage Co, Norwalk, CT)	821	0.4
SoBe NO FEAR Super Energy (South Beach Beverage Co, Norwalk, CT)	339	0.06

2.2. Interaction des AGEs avec leur environnement

La glycation des protéines induit un changement de leur conformation provoquant ainsi l'altération de l'activité biologique des protéines glyquées, mais aussi leur interaction avec les autres protéines (*crosslink*) entraînant des lésions tissulaires. Un exemple de glycation beaucoup utilisé en diagnostic actuellement est l'hémoglobine glyquée (HbA_{1c}) au cours du diabète. Les AGE agissent aussi dans l'organisme comme des ligands de certains récepteurs membranaires des cellules endothéliales. Ces récepteurs sont appelés Recepteur des AGE (RAGE) (figure 3). Le RAGE type est constitué d'un domaine variable (V) et deux domaines (C) terminal constant (figure 3). Le RAGE est codé par un gène (AGER) dont plusieurs variants d'épissage ont été décrit chez l'homme parmi lesquels la forme "endogenous secretory RAG ou esRAGE/RAGE_v1". Ce variant ne possède pas de domaines membranaires et intracellulaires (Figure 3) (González I et al, 2013). Les RAGE sont exprimés à des niveaux physiologiques relativement bas au niveau des cellules épithéliales, neuronales et inflammatoires. Leur expression peut s'augmenter en cas de stress ou de dommage au niveau des cellules. Il faut noter qu'en plus des AGE les RAGE peuvent se lier à d'autres ligands tels S100/calgranulines, High Mobility Group Box 1 (HMGB1) et β_2 -intégrine MAC-1. Les produits avancés d'oxydation des protéines (AOPP : Advanced oxidation protein products) qui sont la conséquence du stress oxydant ont été aussi décrits comme ligands des RAGE et pouvant même contribuer à la production des AGE (Yan SF et al., 2009 ; Yan SF et al., 2010). Ce phénomène contribue à maintenir un cercle vicieux de production d'AGE-activation des RAGE-stress oxydant et inflammation-auto amplification de l'expression des RAGE et production des AOPP/AGE.

La glycation affecte considérablement l'activité de certaines immunoglobulines telles que les IgG et les IgM. Ce phénomène serait impliqué dans la susceptibilité des diabétiques aux infections (Martinez PJ, et al, 2014 ; Cheta D, 1991). De même les fonctions de transport du cholestérol et d'élimination des triglycérides par les HDLs et VLDLs sont altérées lorsque ces lipoprotéines sont glycoxydées (Duell PB et al, 1991). La glycation touche également les cellules sanguines (thrombocytes ou les érythrocytes) pouvant induire une altération de l'élasticité de ces cellules ainsi que leur fluidité (Bryszewska M et al, 1988).

Toutes ces conséquences issues de l'activation des RAGE par les AGE/AOPP ont des implications sur le plan de la susceptibilité aux maladies infectieuses. Le cas spécifique des AOPP est déjà documenté au cours du paludisme par Zhang G et al., (Zhang G et al., 2014). Dans cette étude les niveaux élevés d'AOPP étaient des facteurs de risque du paludisme clinique chez les enfants de moins de 2 ans.

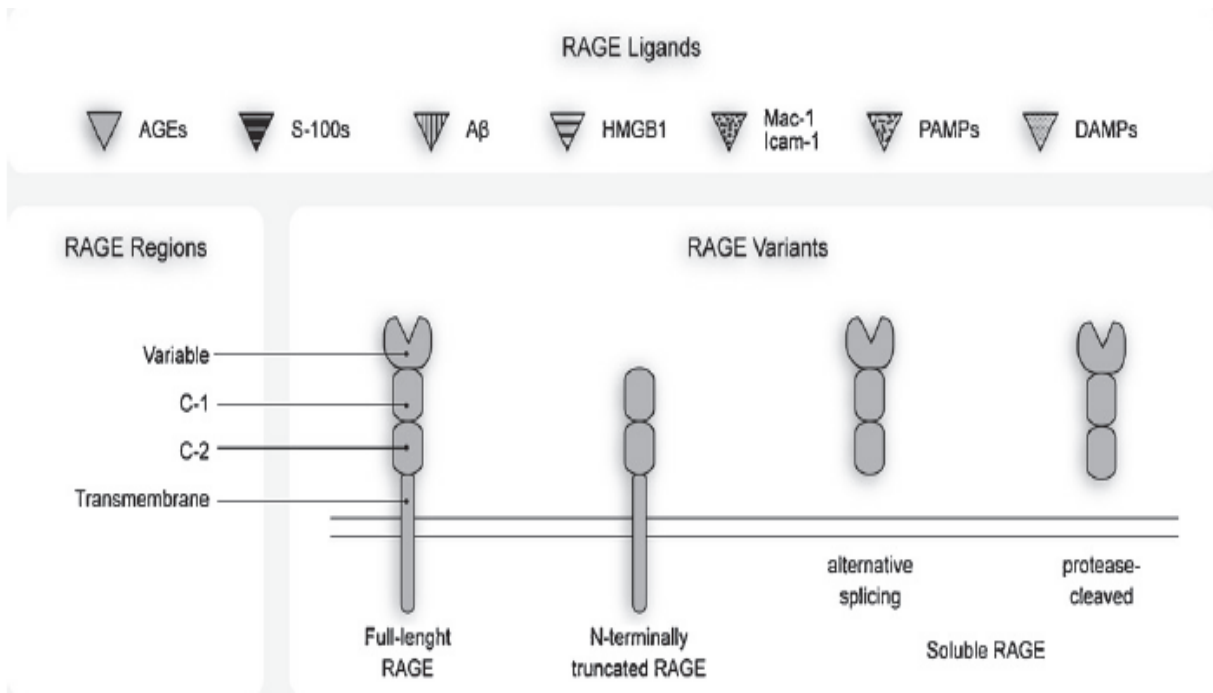


Figure. 3. Les domaines de structures et les isoformes RAGE les plus abondantes. Les ligands RAGE comprennent : des membres de la famille S100, HMGB1, des produits terminaux de glycation avancée, des molécules d'adhésion telles que MAC-1 et ICAM-1 et des DAMP et PAMP. L'isoforme soluble est formée soit par des mécanismes d'épissage alternatifs soit par un clivage protéolytique. Les isoformes solubles peuvent jouer le rôle de compétiteur pour les ligands et ainsi empêcher l'interaction des AGE avec le domaine membranaire de RAGE. Les domaines extracellulaires sont marqués comme V, C1 et C2. (González I. et al. 2013)

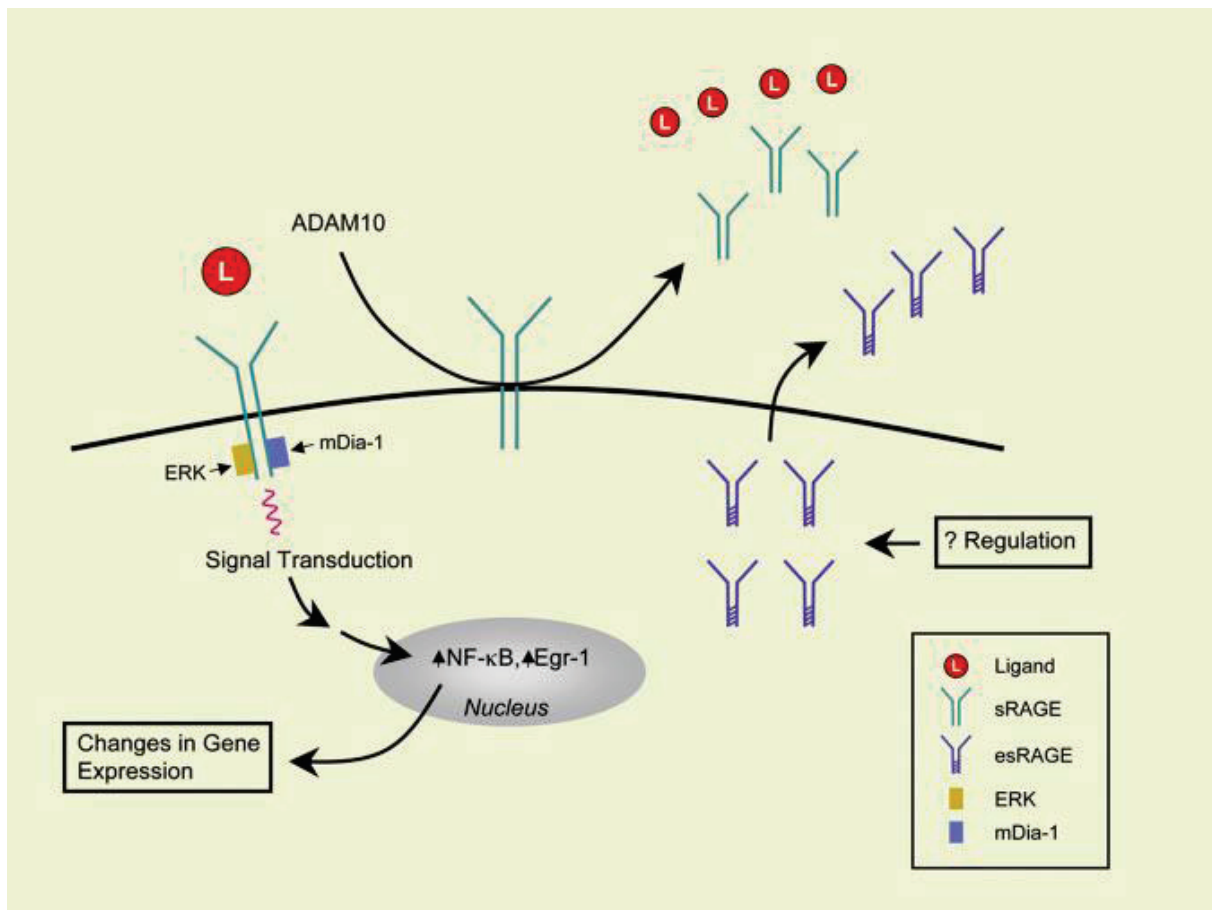


Figure 4. Rôle de RAGE dans la réponse inflammatoire.

La liaison ligand-RAGE a été signalée comme activant une gamme de voies de signalisation. Les événements clés de la signalisation ligand-RAGE comprennent l'interaction du domaine cytoplasmique de RAGE avec des candidats tels que ERK et / ou mDia-1. Une fois engagée, l'activation de RAGE peut modifier l'expression du gène et moduler le phénotype (Yan SF et al, 2009).

L'hypothèse sur la relation entre le rôle de l'alimentation dans la production des AGEs, le taux plasmatique des AGE et leur interaction avec le récepteur RAGE, l'immunité et la susceptibilité au paludisme a fait l'objet d'un article scientifique basée sur la revue de littérature et que nous avons publié dans le journal "PARASITE"

Article 1: Do advanced glycation end-products play a role in malaria susceptibility?

Karim Traore, Charles Arama, Maurice Medebielle, Ogobara K Doumbo, Stephane Picot. *Parasite* 2016, 23, 15.

Statut : publié dans *PARASITE* (page suivante)

Do advanced glycation end-products play a role in malaria susceptibility?

Karim Traoré^{1,2,*}, Charles Arama¹, Maurice Médebielle³, Ogobara Doumbo¹, and Stéphane Picot^{2,*}

¹ Malaria Research and Training Center MRT-C-DEAP-FMPOS-UMI 3189, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, BP 1805, Bamako, Mali

² Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut de Chimie, de Biologie Moléculaire et Supramoléculaire ICBMS-UMR5246, CNRS-INSA-CPE, Malaria Research Unit, – 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Lyon, France

³ Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut de Chimie, de Biologie Moléculaire et Supramoléculaire ICBMS-UMR5246, CNRS-INSA-CPE, – 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Lyon, France

Received 24 November 2015, Accepted 10 March 2016, Published online 24 March 2016

Abstract – There are growing data supporting the differences in susceptibility to malaria described between sympatric populations with different lifestyles. Evidence has also been growing for some time that nutritional status and the host's metabolism are part of the complex mechanisms underlying these differences. The role of dietary advanced glycation end-products (AGEs) in the modulation of immune responses (innate and adaptive responses) and chronic oxidative stress has been established. But less is known about AGE implication in naturally acquired immunity and susceptibility to malaria. Since inflammatory immune responses and oxidative events have been demonstrated as the hallmark of malaria infection, it seems crucial to investigate the role of AGE in susceptibility or resistance to malaria. This review provides new insight into the relationship between nutrition, metabolic disorders, and infections, and how this may influence the mechanisms of susceptibility or resistance to malaria in endemic areas.

Key words: malaria susceptibility, Nutrition, AGE, Fulani, Dogon, Mali.

Résumé – Les produits terminaux de glycation avancée jouent-ils un rôle dans la susceptibilité au paludisme ? De plus en plus de données étayent les différences de susceptibilité au paludisme décrites entre les populations sympatriques avec des modes de vie différents. Il existe également de plus en plus de preuves depuis un certain temps que l'état nutritionnel et les métabolismes de l'hôte font partie des mécanismes complexes qui sous-tendent ces différences. Le rôle des produits terminaux de glycation avancée d'origine alimentaire (AGE) dans la modulation des réponses immunitaires (réponses innée et adaptative) et le stress oxydatif chronique a été établi. Mais on connaît peu sur l'implication des AGE dans l'immunité naturellement acquise et la sensibilité au paludisme. Puisqu'il a été démontré que les réponses immunitaires de types inflammatoires et les événements oxydatifs sont caractéristiques de l'infection au paludisme, il semble primordial d'étudier le rôle des AGE dans la sensibilité de la résistance au paludisme. Cette synthèse fournit un nouvel aperçu sur la relation entre la nutrition, les maladies métaboliques et les infections, et comment cela peut influencer les mécanismes de susceptibilité ou de résistance au paludisme en zone d'endémie.

1. Introduction

Infectious diseases, such as malaria, are no longer considered as a random encounter between a microbe, particularly the eukaryotic parasite, and its vertebrate or human host. The outcome of this primary encounter is driven by many related factors. Virulence of the microbe, infectious burden, route of

inoculation, the host's immunity, susceptibility to infection, and previous drugs used, are among these well-documented factors. Compelling evidence has been growing for some time that the nutritional status of the host is part of this complex relationship. Parasitism has some specificity in terms of the host-pathogen relationship that confers selectivity for the host to the parasite (adaptation).

*Corresponding authors: karim@icermali.org and stephane.picot@univ-lyon1.fr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The nature, magnitude, and effectiveness of the immune response induced by the malaria parasite determines the clinical outcome of the current malaria episode, as well as the susceptibility to subsequent episodes [18, 41]. The complex interactions between environment, lifestyle, and the modulation of the host's immune responses constitute a new area of great interest in malaria research. The role of the gut microbiota is now established in the natural resistance to malaria [82]. But less is known about the role of host metabolism in this natural resistance/susceptibility to malaria. In this regard, investigating the host diet and metabolism could provide a better understanding of the mechanisms involved in hosts' natural defenses against pathogens.

Dietary advanced glycation end-products (AGEs) and their specific receptors (receptors of AGE: RAGE) constitute a link between the environment, lifestyle, and the immune system [1]. The role of AGEs has been investigated in the occurrence of chronic and inflammatory diseases [14, 61], as well as in susceptibility of patients to *Streptococcus* infection, peritonitis, and sepsis [17, 46]. Recently, the role of dietary AGE in both innate and adaptive immune response modulation was described. Despite the well-documented deleterious effects of AGE on immunity by shifting the Th1/Th2 balance toward an excessive Th1 response and perpetuating oxidative stress, no study has yet investigated their role in susceptibility or resistance to malaria.

The aim of this review is to present and discuss the potential role of diet intake advanced glycation end-products and their specific receptors in modulation of the immune response, and their implication in susceptibility to infection and clinical malaria.

1.1. Disease burden

Malaria remains one of the most challenging diseases in terms of mortality and drug resistance rates. The World Health Organization (WHO) recorded 198 million cases of malaria in 2013, with approximately 584,000 cases of death, of which 90% occurred in Africa [76]. Around 2,000 people (majority under age five) die per day from malaria. Malaria remains endemic in many tropical areas, particularly in Africa and Asia [74]. Despite many years of research on malaria vaccines, only one candidate reached phase III with an efficacy of ~50% [58], and resistance to antimalarial drugs is increasing. Mosquito resistance to insecticides and *Plasmodium* resistance to drugs, including the most recent artemisinin derivatives, are of great concern worldwide. The need to develop new strategies and explore new research avenues and hypotheses on biological factors of malaria susceptibility or resistances is becoming more and more relevant.

2. Advanced glycation end-products (AGEs) and their specific receptors (RAGE)

The AGEs are derived from a non-enzymatic reaction (Maillard reaction, described by Louis Camille Maillard in 1912) [81]. The Maillard reaction links protein amino groups with reducing glucose-derived carbonyl groups; leading to

the glycation of the protein, altering its structure and function (Fig. 1). The reaction occurs in several stages: an initial step involves the condensation of an amino acid (from a protein) and an opened form of a glucose-derived product (aldehyde-derived sugar), giving after loss of a water molecule, a Schiff base which is in equilibrium with its closed form, a *D*-glucosylamine. Upon protonation, this latter is then transformed, after ring opening, into a ketosamine. Such amines can be degraded at pH 4–7 to provide several carbonyl-derived sugars such as deoxyosones but also furanoses, pentoses, and hexoses; upon condensation with an amino acid, the very reactive deoxyosones will yield an aminoketone intermediate, after hydrolysis of an imine intermediate, which can either combine to provide pyrazine-derived products or after loss of carbon dioxide deliver a Strecker aldehyde, as an irreversible advanced end-product (Fig. 1) [54, 60].

Advanced glycation end-products are generated endogenously when the blood sugar level is chronically high (during diabetic) or oxidative stress, as well as exogenously during the cooking process of meals [25, 54, 61]. The quantity of AGEs generated in the food is positively correlated to the cooking temperature [54, 59]. Any difference in lifestyle and dietary habits could have a considerable impact on exposure to dietary AGE [29, 52–64]. Accumulation of AGEs in blood, tissues, and organs results in chronic toxicity and cell signaling engagement, with deleterious effects on innate and adaptive immune defense [1, 52, 75]. *In vivo*, AGEs act as damage-associated molecular patterns (DAMPs) with their specific receptors known as receptors for advanced glycation end-products (RAGE).

The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is a transmembrane protein on the cellular surface that recognizes tridimensional molecules, instead of amino-acid sequences. RAGE contains two constant (C-type) and a variable (V-type) immunoglobulin-like domains. Different variants of RAGE exist, including the soluble one (sRAGE). sRAGE only has the extracellular domain of the receptor. sRAGE acts as a decoy receptor for AGEs and may prevent inflammation [78–80]. Other AGE-sensitive receptors have been described, including the oligosaccharyl transferase complex protein 48 (OST-48 or AGE receptor-1 (AGER1) involved in anti-oxidant mechanisms), 80-KH protein (AGER2 – AGE receptor-2), galectin-3 (AGER3 – AGE receptor-3), and some scavenger receptors. But RAGE is the most investigated of these and seems to be the most important in cell signaling pathways [28]. RAGE is expressed at high levels in the lungs and at low levels in normal adult tissues and cells involved in the innate immune system, e.g. neutrophils, T and B lymphocytes, monocytes, macrophages, dendritic cells, and endothelial cells [9, 16, 50]. In addition to AGE, RAGE can interact with diverse ligands such as: high-mobility group box 1 protein (HMGB1 or amphoterin), the group of calcium-binding cellular factors S100 (calgranulin), amyloid beta peptides, and Mac-1, a beta-2 integrin (CD11b/CD18).

The activation of RAGE triggers a series of cellular signaling events, including the activation and translocation into the nucleus of transcription factor *NF-kappa B*, leading to the production of pro-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules, and oxidative stress. The recruitment of RAGE

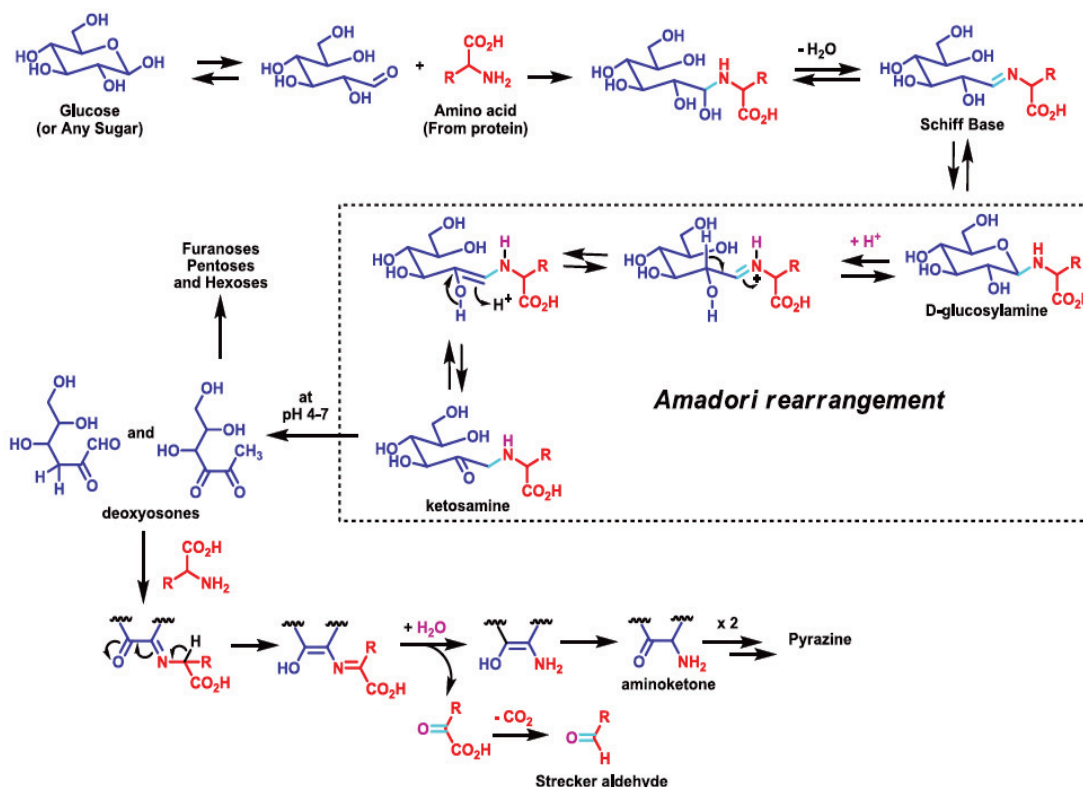


Figure 1. Major products resulting from the reaction of amino acids (from protein) and reducing sugars during the Maillard reaction.

by AGE also leads to endothelial cell activation [7]. Upon binding with its ligands, RAGE is overexpressed and becomes part of a positive feedback-loop mechanism that results in auto-amplification of RAGE expression, chronic cell signaling, and oxidative stress [6]. The expression of RAGE on cells is therefore highly regulated by dietary AGEs [54, 78–80].

3. RAGE polymorphism, natural selection pressure, and immune system regulation

Homo erectus domesticated fire and started cooking meat about 400,000 years ago [20]. During this permanent exposure to dietary glycation end-products, *Homo sapiens* could have co-evolved with AGEs by developing genetic polymorphisms on the RAGE gene. The gene encoding RAGE is located on the major histocompatibility complex region that comprises the HLA gene loci [78]. Since the potential involvement of HLA-DRB1*04 and -DQB1*02 alleles in enhanced immune reactivity is documented, as well as their high frequency in the Fulani ethnic group [44], it seems important to consider the relationship between RAGE gene polymorphism and susceptibility to malaria in endemic areas.

The involvement of some genetic polymorphisms (single nucleotide polymorphism: SNP) on RAGE promoters in the susceptibility or resistance to some metabolic infectious diseases suggests that RAGE is sensitive to natural selective

pressure. SNPs 374T/A and 429T/C in the RAGE promoter region are involved in the regulation of RAGE expression by acting on the nuclear protein-binding site [31]. This polymorphism may be involved in the modulation of immunity by hyper-expression of variants of anti-inflammatory genes of immunity [31]. A positive association between allele A of 374T/A polymorphism and longevity is described in the elderly population older than 90 years. Another SNP of the RAGE promoter (genotype 82SS) is associated with significantly elevated risk for cervical cancer (adjusted odds ratio = 1.98, $p < 0.001$); and significantly lower serum soluble RAGE (sRAGE) levels. In contrast, 82GS polymorphism is associated with higher serum sRAGE levels [77]. Higher levels of sRAGE are commonly described in healthy people. The role of sRAGE in host defense during severe infection is conflicting [47], but several experimental studies have reported a positive effect of sRAGE on the outcome of sepsis [10, 38].

The malaria parasite has co-evolved with human beings for about 100,000 years and the host has developed many protective strategies (HbS, HbC, HbE, G6PD, etc.) [39, 41]. While the human host has been perpetually under genetic and environmental selective pressure, the malaria parasite has also developed survival strategies to evade the host's immune system and to become more adapted [41, 57, 87]. Some human malaria parasite species (*P. vivax*, *ovale*, and *malariae*) are more adapted to certain human subpopulations in endemic areas by developing host immune tolerance [57, 87],

suggesting the interplay between environment, lifestyle, and immune responses [1]. Without treatment, *Homo sapiens* infection with *Plasmodium malariae* can stay lifelong in the host.

Differences in susceptibility to malaria are well established in sympatric populations with different lifestyles in sub-Saharan Africa [4, 13, 23]. Despite several investigations conducted in these populations, the biological and environmental factors involved in the mechanisms underlying this difference of susceptibility or resistance remain poorly understood [22, 23, 35–37, 45, 53]. One of the main differences between these populations is lifestyle. The nutritional status and metabolism of the host are determinants in the clinical outcome of malaria infection [8, 12, 19, 26, 32] by modulating the immune responses and oxidative stress [33, 34].

4. RAGE, AGE and infectious diseases

There is evidence that the interplay between some nutrient-derived metabolites (arylhydrocarbon, vitamins A and D) and their nuclear receptors plays a key role in maturation of the lymphoid organs and modulation of the immune system [66, 72]. The aryl hydrocarbon receptor (AhR), the retinoic acid receptor (RAR), and the vitamin D receptor (VDR) are expressed on immune system cells (TH17 and Treg cells, $\gamma\delta$ T cells expressing IL-17, CD4+ T cells, TH17-derived TH1, and Tr1 cells) [56, 72]. Available data support the idea that these nuclear receptors are directly influenced by the environment and especially by the diet, with a considerable impact on development and specialization of the types of immune responses [49, 73].

RAGE is a cellular receptor that interacts highly with nutrient-derived metabolites. Growing evidence supports the relevance of the RAGE signaling pathway in the pathogenesis of many diseases like diabetes and its associated complications, but also in certain clinical settings. RAGE, as a pattern-recognition receptor, seems to have a crucial role in early host defense against invading pathogens by activating innate immune response, which primes acquired immunity, particularly by driving induction of a Th1-type response [27]. Many studies have revealed the role of RAGE in inflammatory cell recruitment, extravasations of leukocytes across the endothelial barrier with further inflammatory events, and induction of apoptosis [24, 42, 71, 83, 85, 86]. Martinez et al., in 2014, reported that RAGE was involved in the susceptibility of diabetic patients to *Streptococcus pneumoniae* infections by impaired CD4⁺ and Th17 cell memory responses [46]. Experimental studies provided further insight into the role of RAGE and its ligands in host defense during clinically important infections, suggesting RAGE as a potential target for therapeutic strategies [51]. Inhibition of RAGE signaling reduces inflammatory responses in infectious models of diseases [70]. Blockade of interactions between RAGE and its ligands results in improved outcome from sepsis [69] and influenza A virus pneumonia [68]. However, some conflicting data indicate increased bacterial growth in experimental models as the result of inhibition of RAGE engagement [67]. The fact that the

effect of RAGE during infection could differ whether the pathogen is Gram positive (deleterious effect) or negative (beneficial effect), also suggests that RAGE could interact with ligands from the pathogen [71]. The apparent discrepancy between the effects of RAGE in experimental infection could result from this specific host-pathogen interaction.

The innate immune response induced by RAGE when activated by AGE is a sterile immune reaction. The sterile inflammatory immune response is similar to infection immune response, including the recruitment of neutrophils and macrophages, the production of inflammatory cytokines and chemokines, and the induction of T cell-mediated immune responses [15]. The magnitudes of innate as well as the type of adaptive immune responses are strongly influenced by the cellular expression of RAGE in immune effector cells [1]. *T helper 2 (Th2)* cytokine production, which is frequently downregulated in T cells expressing RAGE, is critical for host defense against blood stage malaria [55].

The role of RAGE-AGE in the susceptibility or resistance to malaria remains unknown and needs to be investigated. Increased susceptibility to clinical malaria has already been described in 2-year-old children with higher plasma levels of advanced oxidative protein products (AOPP), compared to those with lower plasma AOPP [84].

But no study has directly investigated the relationship between AGE-RAGE signaling and malaria susceptibility. During sepsis, high-mobility group box-1 (HMGB1), a DNA- and heparin-binding protein with pro-inflammatory activity, enhances and prolongs inflammatory processes. HMGB1 is one of the ligands of RAGE and shares part of the RAGE-AGE pathway. More than a decade ago, HMGB1 was shown to be increased in *falciparum* malaria and was suspected of being an amplification signal in disease pathogenesis, and thus illness [2]. Furthermore, HMGB1 has been suggested as an informative prognostic marker of disease severity in severe human malaria [3, 30]. A DNA-binding protein also described in *P. falciparum* (Pf-HMGB1/2), which has 98% similarity with human HMGB1, has been found to be able to activate RAGE and induce secretion of pro-inflammatory cytokines by human immune cells [40].

Malaria is endemic in some countries and sometimes leads to genetic diversity (blood group polymorphism) in endemic areas by positive selection. We hypothesize that in malaria endemic areas where populations are exposed to high levels of AGE in food, the chronic activation of RAGE by dietary AGE could lead to (Fig. 2):

- Chronic inflammatory immune response that results in immune tolerance (by upregulation of negative feedback control), cell dysfunction, tissue destruction, and exhaustive immune cells.
- Depletion of Th2 immune response and impairment of the Th1/Th2 immune response balance, with deleterious effects on the host-pathogen interaction.
- Chronic production of elevated HMGB1, which could recruit new RAGE and maintain a vicious circle of “RAGE overexpression → AGE/HMGB1 production → RAGE activation and overexpression”.

Role of AGE in susceptibility to infectious diseases

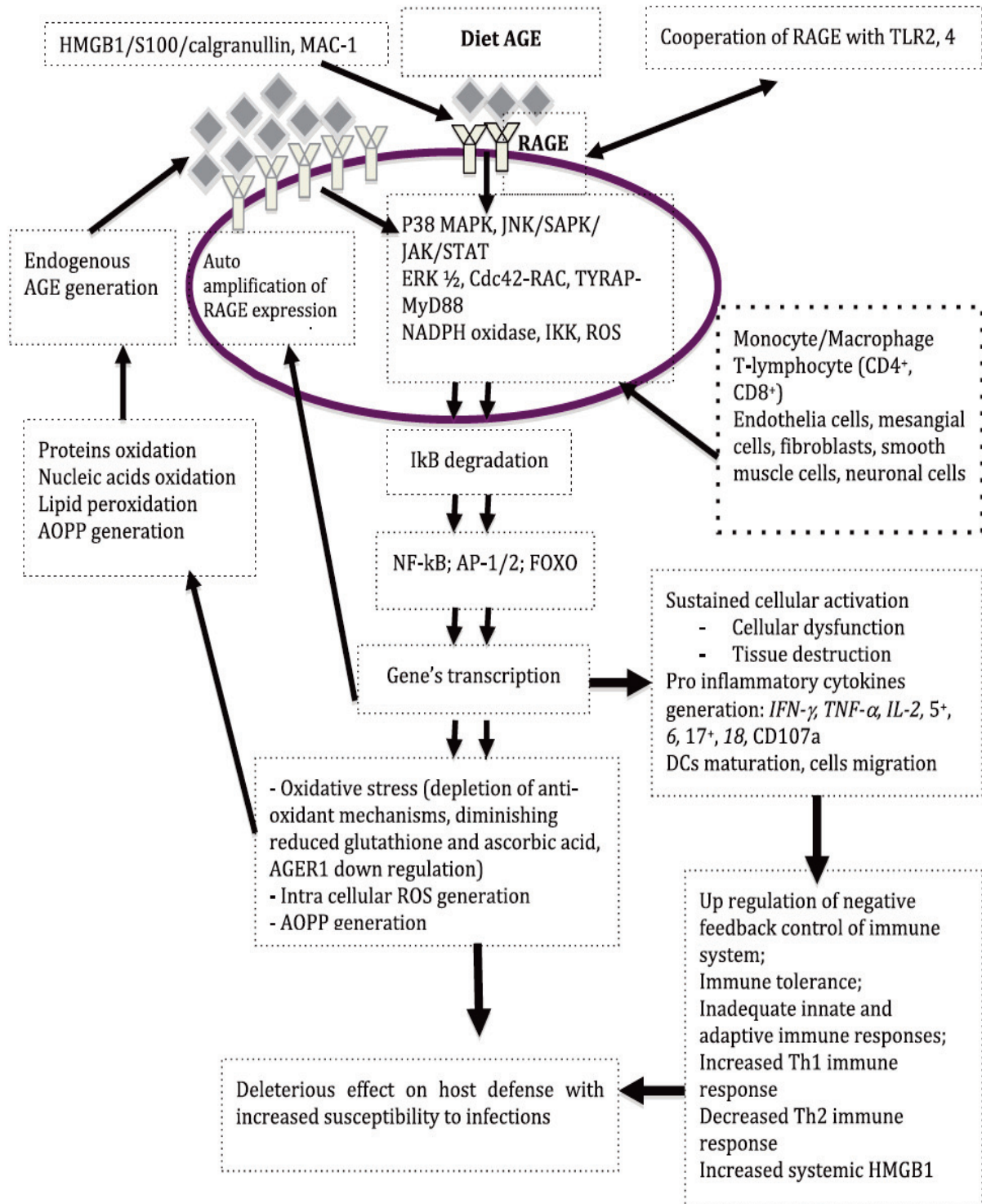


Figure 2. Role of diet AGE in perpetuating oxidant stress and pro inflammatory cytokines production with deleterious effect on immunity. *Abbreviation:* AGE: Advanced glycation endproducts; Cdc42-Rac: cell division control protein 42 homolog-Rac; ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2; FOXO: forkhead box protein O subclass; HMGB1: High mobility group box 1; iκB: Inhibitor of Nuclear factor B; IKK: Inhibitor of nuclear factor B kinase; JAK: Janus kinase; JNK: c-jun N-terminal kinase; MAC-1: macrophage-1 antigen; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NF κB: Nuclear factor kappa B; P38MAPK: Mitogen associated protein kinase P38; RAGE: receptor for Advanced glycation endproducts; ROS: reactive oxygen species; SAPK: stress-activated protein kinase; STAT: signal transducer and activator of transcription; TLR: Toll-Like Receptor.

- Chronic oxidative stress with generation of reactive oxygen species (ROS), oxidation and glycation of proteins, nucleic acids, and lipids; with auto-amplification of AGE and AOPP generation.
- Selection of SNPs on the gene coding for RAGE with protective effects against malaria.

5. Food intake differences between ethnic groups and malaria susceptibility in endemic areas

Natural resistance to malaria has been described among pastoral populations (Fulani) compared to their neighboring farmers (Dogon) in Mali, or Mossi in Burkina Faso [5, 64]. Fulani populations who have approximately 50% lactose tolerance (milk constitutes their main meal) live in sympatric conditions with Dogon populations in the same environment in Mali [11, 21, 65]. Fulani are less susceptible to clinical malaria and exhibited higher baseline levels of inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, IL-12p70, IFN- α , IFN- γ) as well as malaria-specific antibodies (IgG, IgG1-3, and IgM) compared to Dogon [5, 11, 21, 65]. Except for IFN- γ that significantly increased in infected Fulani children, the inflammatory response was not influenced by active malaria infection. In the same populations, Arama et al. described an inhibition of toll-like receptor (TLR) response and altered antigen-presenting cell activation (dendritic cells) in Dogon, in contrast with their neighbors Fulani who exhibited an activation of dendritic cells and no altered innate immune defense during *Plasmodium falciparum* infection [4].

These populations living in malaria endemic areas are exposed to the same risk of malaria infection and disease. The main difference between the two population groups is their dietary habits. While Fulani have milk and couscous as their main food, Dogon have at least three well-cooked meals a day. Cooked foods contain more AGEs than milk and couscous. Even though the protective role of diet against malaria in Fulani has not yet been thoroughly investigated [43], these observations suggest that nutrition and metabolism could play a key role in malaria susceptibility/resistance in endemic area. The modulation of the types of immune response (Th1/Th2) is sensitive to the host's diet. Deficiency of some nutrients can influence the balance of immune response [48].

It is well documented in the literature that reduction of dietary AGE consumption protects against loss of innate defense [75]. There is a correlation between low diet AGE intake and high cell expression of AGE receptor-1 (AGER1), which is an anti-oxidant receptor involved in AGE endocytosis and degradation, also contributing to protection against impairment of innate responses and oxidative stress [54].

More studies comparing the serum levels of AGE, sRAGE, RAGE expression, and RAGE polymorphism in these populations could provide new insight into the mechanism of malaria susceptibility or resistance.

6. Conclusion

In malaria endemic areas, people are exposed to multiple malaria infections. This exposure leads to the development

of innate and adaptive immune responses against malaria, and genetic polymorphism in the long term.

In populations with AGE-rich cooked foods as their main food source, chronic activation of RAGE by AGE may induce and maintain pro-inflammatory cytokine production, oxidative stress, reactive oxygen species (ROS), and AOPP production, and result in innate immune tolerance, inadequate adaptive immune response, cellular dysfunction, and depletion of anti-oxidative mechanisms. The disturbance of host defense systems may increase susceptibility to malaria in these populations.

Targeting the dietary AGE-RAGE signaling pathway as a new research perspective in populations with different lifestyles could contribute to understanding the mechanism of the differences of susceptibility to malaria observed in some African populations. Such new strategies could contribute to reducing morbidity and mortality related to malaria in endemic countries by acting on lifestyles of populations, as already implemented in the control of some chronic metabolic diseases like diabetes and hypertension. The determination of blood levels of AGE, sRAGE, and cell expression of RAGE and AGER1, as well as polymorphism of genes encoding for these receptors, will provide relevant information on malaria susceptibility.

Competing interests

The authors declare no competing interest.

Acknowledgements. KT and SP designed the study and carried out the literature search; KT, SP, OKD, CA, and MM wrote the manuscript.

References

1. Akirav EM, Preston-Hurlburt P, Garyu J, Henegariu O, Clynes R, Schmidt AM, Herold KC. 2012. RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. *PLoS ONE*, 7, e34698.
2. Alleva LM, Yang H, Tracey KJ, Clark IA. 2005. High mobility group box 1 (HMGB1) protein: possible amplification signal in the pathogenesis of falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99, 171–174.
3. Angeletti D, Kiuwuwa MS, Byarugaba J, Kironde F, Wahlgren M. 2013. Elevated levels of High-Mobility Group Box-1 (HMGB1) in patients with severe or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, 733–735.
4. Arama C, Giusti P, Boström S, Dara V, Traore B, Dolo A, Doumbo O, Varani S, Troye-Blomberg M. 2011. Interethnic differences in antigen-presenting cell activation and TLR Responses in Malian children during *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS ONE*, 6, e18319.
5. Arama C, Maiga B, Dolo A, Kouriba B, Traoré B, Crompton PD, Pierce SK, Troye-Blomberg M, Miller LH, Doumbo OK. 2015. Ethnic differences in susceptibility to malaria: What have we learned from immuno-epidemiological studies in West Africa? *Acta Tropica*, 146, 152–156.

6. Basta G. 2008. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*, 196, 9–21.
7. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. 2004. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular Research*, 63, 582–592.
8. Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. 2004. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International Journal for Parasitology*, 34, 163–189.
9. Bierhaus A, Stern DM, Nawroth PP. 2006. RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Current Opinion in Investigational Drugs*, 7, 985–991.
10. Bopp C, Bierhaus A, Hofer S, Bouchon A, Nawroth PP, Martin E, Weigand MA. 2008. Bench-to bedside review: the inflammation-perpetuating pattern-recognition receptor RAGE as a therapeutic target in sepsis. *Critical Care*, 12, 201.
11. Bostrom S, Giusti P, Arama C, Persson JO, Dara V, Traore B, Dolo A, Doumbo O, Troye-Blomberg M. 2012. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to *Plasmodium falciparum* infection in children living in sympatry in Mali. *Malaria Journal*, 11, 109.
12. Carter LM, Kafack BFC, Llinas M, Mideo N, Pollitt LC, Reece SE. 2013. Stress and sex in malaria parasites: Why does commitment vary? *Evolution Medicine and Public Health*, 2013, 135–147.
13. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. 2006. Bench-to bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Critical Care*, 10, 233.
14. Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. 1988. Role of advanced glycosylation products in complications of diabetes. *Diabetes Care*, 11, Suppl, 1, 73–79.
15. Chen GY, Nuñez G. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Review Immunology*, 10, 826–837.
16. Chen Y, Yan SS, Colgan J, Zhang HP, Luban J, Schmidt AM, Stern D, Herold KC. 2004. Blockade of late stages of autoimmune diabetes by inhibition of the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Immunology*, 173, 1399–1405.
17. Christaki E, Lazaridis N, Opal SM. 2012. Receptor for advanced glycation end products in bacterial infection: is there a role for immune modulation of receptor for advanced glycation end products in the treatment of sepsis? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25, 304–311.
18. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. 2006. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria Journal*, 5, 85.
19. Cornet S, Bichet C, Larcombe S, Faivre B, Sorci G. 2014. Impact of host nutritional status on infection dynamics and parasite virulence in a bird-malaria system. *Journal of Animal Ecology*, 83, 256–265.
20. De Lumley H. 2006. Il y a 400 000 ans : la domestication du feu, un formidable moteur d'hominisation. *Comptes Rendus Palevol*, 5, 149–154.
21. Dolo A, Modiano D, Maiga B, Daou M, Dolo G, Guindo H, Ba M, Maiga H, Coulibaly D, Perlman H, Blomberg MT, Touré YT, Coluzzi M, Doumbo O. 2005. Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 243–248.
22. Dolo A, Coulibaly M, Maiga B, Daou M, Arama C, Troye-Blomberg M, Doumbo O. 2012. Réponse humorale anti-*Plasmodium falciparum* AMA1 et MSP1 dans deux groupes ethniques vivant en sympatry au Mali. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 105, 364–369.
23. Farouk SE, Dolo A, Bereczky S, Kouriba B, Maiga B, Färnert A, Perlmann H, Hayano M, Montgomery SM, Doumbo OK, Troye-Blomberg M. 2005. Different antibody and cytokine-mediated responses to *Plasmodium falciparum* parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. *Microbes and Infection*, 7, 110–117.
24. Gangaiti MV, Cortizo AM, Arnol V, Felice JI, McCarthy AD. 2008. Opposing effects of bisphosphonates and advanced glycation endproducts on osteoblastic cells. *European Journal of Pharmacology*, 600, 140–147.
25. Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H. 2004. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of American Dietetic Association*, 104, 1287–1291.
26. Golenser J, Chevion M. 1989. Oxidant stress and malaria: host-parasite interrelationships in normal and abnormal erythrocytes. *Seminars in Hematology*, 26, 313–325.
27. González I, Romero J, Rodríguez BL, Pérez-Castro R, Rojas A. 2013. The immunobiology of the receptor of advanced glycation endproducts: trends and challenges. *Immunobiology*, 218, 790–797.
28. Han SH, Kim YH, Mook-Jung I. 2011. RAGE: the beneficial and deleterious effects by diverse mechanisms of actions. *Molecules and Cells*, 31, 91–97.
29. Henle T. 2003. AGEs in foods: do they play a role in uremia? *Kidney International Supplement*, S145–147.
30. Higgins SJ, Xing K, Kim H, Kain DC, Wang F, Dhabangi A, Musoke C, Cserti-Gazdewich CM, Tracey KJ, Kain KC, Liles WW. 2013. Systemic release of high mobility group box 1 (HMGB1) protein is associated with severe and fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria Journal*, 12, 105.
31. Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. 2001. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes*, 50, 1505–1511.
32. Hunt NH, Stocker R. 1990. Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells*, 16, 499–526.
33. Ibrahim MA, Isah MB, Okafor AI, Bashir M, Bisalla M, Umar IA. 2012. Effects of combined administration of vitamins C and E on some *Plasmodium berghei*-induced pathological changes and oxidative stress in mice. *Comparative Clinical Pathology*, 21, 1677–1682.
34. Isah MB, Ibrahim MA. 2014. The role of antioxidants treatment on the pathogenesis of malarial infections: a review. *Parasitology Research*, 113, 801–809.
35. Israelsson E, Vafa M, Maiga B, Lysén A, Iriemenam NC, Dolo A, Doumbo OK, Troye-Blomberg M, Berzins K. 2008. Differences in Fc gamma receptor IIa genotypes and IgG subclass pattern of anti-malarial antibodies between sympatric ethnic groups in Mali. *Malaria Journal*, 7, 175.
36. Israelsson E, Ekström M, Nasr A, Dolo A, Kearsley S, Arambepola G, Homann MV, Maiga B, Doumbo OK, Elghazali G, Giha HA, Troye-Blomberg M, Berzins K, Tornvall P. 2009. Marked differences in CRP genotype frequencies between the Fulani and sympatric ethnic groups in Africa. *Malaria Journal*, 8, 136.

37. Israelsson E, Maiga B, Kearsley S, Dolo A, Homann MV, Doumbo OK, Troye-Blomberg M, Tornvall P, Berzins K. 2011. Cytokine gene haplotypes with a potential effect on susceptibility to malaria in sympatric ethnic groups in Mali. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 1608–1615.
38. Jeong SJ, Lim BJ, Park S, Choi D, Kim HW, Ku NS, Han SH, Kim CO, Choi JY, Song YG, Kim JM. 2012. The effect of sRAGE-Fc fusion protein attenuates inflammation and decreases mortality in a murine cecal ligation and puncture model. *Inflammation Research*, 61, 1211–1218.
39. Karlsson EK, Kwiatkowski DP, Sabeti PC. 2014. Natural selection and infectious disease in human populations. *Nature Review Genetics*, 15, 379–393.
40. Kumar K, Singal A, Rizvi MMA, Chauhan VS. 2008. High mobility group box (HMGB) proteins of *Plasmodium falciparum*: DNA binding proteins with pro-inflammatory activity. *Parasitology International*, 57, 150–157.
41. Kwiatkowski DP. 2005. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *American Journal of Human Genetics*, 77, 171–192.
42. Lien SC, Chang SF, Lee PL, Wei SY, Chang MDT, Chang JY, Chiu JJ. 2013. Mechanical regulation of cancer cell apoptosis and autophagy: roles of bone morphogenetic protein receptor, Smad1/5, and p38 MAPK. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833, 3124–3133.
43. Lokki AI, Järvelä I, Israelsson E, Maiga B, Troye-Blomberg M, Dolo A, Doumbo OK, Meri S, Holmberg V. 2011. Lactase persistence genotypes and malaria susceptibility in Fulani of Mali. *Malaria Journal*, 10, 9.
44. Lulli P, Mangano VD, Onori A, Batini C, Luoni G, Sirima BS, Nebie I, Chessa L, Petrarca V, Modiano D. 2009. HLA-DRB1 and -DQB1 loci in three West African ethnic groups: genetic relationship with sub-Saharan African and European populations. *Human Immunology*, 70, 903–909.
45. Maiga B, Dolo A, Touré O, Dara V, Tapily A, Campino S, Sepulveda N, Corran P, Rockett K, Clark TG, Blomberg MT, Doumbo OK. 2014. Fc gamma receptor IIA-H131R polymorphism and malaria susceptibility in sympatric ethnic groups, Fulani and Dogon of Mali. *Scandinavian Journal of Immunology*, 79, 43–50.
46. Martinez PJ, Mathews C, Actor JK, Hwang SA, Brown EL, De Santiago HK, Fisher Hoch SP, McCormick JB, Mirza S. 2014. Impaired CD4+ and T-helper 17 cell memory response to *Streptococcus pneumoniae* is associated with elevated glucose and percent glycated hemoglobin A1c in Mexican Americans with type 2 diabetes mellitus. *Translational Research*, 163, 53–63.
47. Matsumoto H, Matsumoto N, Ogura H, Shimazaki J, Yamakawa K, Yamamoto K, Shimazu T. 2015. The clinical significance of circulating soluble RAGE in patients with severe sepsis. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 78, 1086–1093.
48. Mbugi EV, Meijerink M, Veenemans J, Jeurink PV, McCall M, Olomi RM, Shao JF, Chilongola JO, Verhoef H, Savelkoul HF. 2010. Effect of nutrient deficiencies on in vitro Th1 and Th2 cytokine response of peripheral blood mononuclear cells to *Plasmodium falciparum* infection. *Malaria Journal*, 9, 162.
49. Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, Sica G, Sileri P, Biancone L, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. 2011. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 141, 237–248.
50. Moser B, Desai DD, Downie MP, Chen Y, Yan SF, Herold K, Schmidt AM, Clynes R. 2007. Receptor for advanced glycation end products expression on T cells contributes to antigen-specific cellular expansion in vivo. *Journal of Immunology*, 179, 8051–8058.
51. Mosquera JA. 2010. Role of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in inflammation. *Investigacion Clinica*, 51, 257–268.
52. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. 2014. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*, 2, 411–429.
53. Perdijk O, Arama C, Giusti P, Maiga B, Troye-Blomberg M, Dolo A, Doumbo O, Persson JO, Boström S. 2013. Haptoglobin phenotype prevalence and cytokine profiles during *Plasmodium falciparum* infection in Dogon and Fulani ethnic groups living in Mali. *Malaria Journal*, 12, 432.
54. Poulsen MW, Hedegaard RV, Andersen JM, de Courten B, Bügel S, Nielsen J, Skibsted LH, Dragsted LO. 2013. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 10–37.
55. Pradhan V, Ghosh K. 2012. Immunological disturbances associated with malarial infection. *Journal of Parasitic Diseases*, 37, 11–15.
56. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL. 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 453, 65–71.
57. Rowe JA, Opi DH, Williams TN. 2009. Blood groups and malaria: fresh insights into pathogenesis and identification of targets for intervention. *Current Opinion in Hematology*, 16, 480–487.
58. RTS, S Clinical Trials Partnership. 2014. Efficacy and safety of the RTS, S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Medicine*, 11, e1001685.
59. Schlienger JL, Gautier M, Gutmann A, Kremer F. 2010. Produits terminaux de la glycation (AGE) alimentaires et pathologie métabolique. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 4, 653–659.
60. Sell DR. 1997. Ageing promotes the increase of early glycation Amadori product as assessed by epsilon-N-(2-furoylmethyl)-L-lysine (furosine) levels in rodent skin collagen. The relationship to dietary restriction and glycooxidation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 95, 81–99.
61. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44, 129–146.
62. Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppia M, Goldberg T, Vlassara H. 2005. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043, 461–466.
63. Uribarri J, Cai W, Peppia M, Goodman S, Ferrucci L, Striker G, Vlassara H. 2007. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *Journal of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 62, 427–433.
64. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H. 2010. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of American Dietetic Association*, 110(911–916), e12.

65. Vafa M, Maiga B, Israelsson E, Dolo A, Doumbo OK, Troye-Blomberg M. 2009. Impact of the IL-4 -590 C/T transition on the levels of *Plasmodium falciparum* specific IgE, IgG, IgG subclasses and total IgE in two sympatric ethnic groups living in Mali. *Microbes and Infection*, 11, 779–784.
66. Van de Pavert SA, Ferreira M, Domingues RG, Ribeiro H, Molenaar R, Moreira-Santos L, Almeida FF, Ibiza S, Barbosa I, Goverse G, Labão-Almeida C, Godinho-Silva C, Konijn T, Schooneman D, O’Toole T, Mizze MR, Habani Y, Haak E, Santori FR, Littman DR, Schulte-Merker S, Dzierzak E, Simas JP, Mebius RE, Veiga-Fernandes H. 2014. Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. *Nature*, 508, 123–127.
67. Van Zoelen MAD, Schmidt AM, Florquin S, Meijers JC, de Beer R, de Vos AF, Nawroth PP, Bierhaus A, van der Poll T. 2009. Receptor for advanced glycation end products facilitates host defense during *Escherichia coli*-induced abdominal sepsis in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 200, 765–773.
68. Van Zoelen MAD, van der Sluijs KF, Achouiti A, Florquin S, Braun-Pater JM, Yang H, Nawroth PP, Tracey KJ, Bierhaus A, van der Poll T. 2009. Receptor for advanced glycation end products is detrimental during influenza A virus pneumonia. *Virology*, 391, 265–273.
69. Van Zoelen MAD, Achouiti A, Schmidt AM, Yang H, Florquin S, Tracey KJ, van der Poll T. 2010. Ligands of the receptor for advanced glycation end products, including high-mobility group box 1, limit bacterial dissemination during *Escherichia coli* peritonitis. *Critical Care Medicine*, 38, 1414–1422.
70. Van Zoelen MAD, Achouiti A, van der Poll T. 2011. RAGE during infectious diseases. *Frontiers in Bioscience. Scholar Edition*, 3, 1119–1132.
71. Van Zoelen MAD, Achouiti A, van der Poll T. 2011. The role of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in infection. *Critical Care*, 15, 208.
72. Veldhoen M, Ferreira C. 2015. Influence of nutrient-derived metabolites on lymphocyte immunity. *Nature Medicine*, 21, 709–718.
73. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, Stockinger B. 2008. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, 453, 106–109.
74. Verma R, Khanna P, Chawla S. 2013. Malaria vaccine can prevent millions of deaths in the world. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 9, 1268–1271.
75. Vlassara H, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Yong A, Chen X, Zhu L, Neade T, Beeri M, Silverman JM, Ferrucci L, Tansman L, Striker GE, Uribarri J. 2009. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94, 4483–4491.
76. World Health Organization, Global Malaria Programme, World Health Organization. 2014. *World Malaria Report 2014*.
77. Xu Q, Xue F, Yuan B, Zhang L, Li J, He Z. 2012. The interaction between RAGE gene polymorphisms and HPV infection in determining the susceptibility of cervical cancer in a Chinese population. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 11, 147–153.
78. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. 2009. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands—cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *Journal of Molecular Medicine*, 87, 235–247.
79. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. 2010. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochemical Pharmacology*, 79, 1379–1386.
80. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. 2010. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circulation Research*, 106, 842–853.
81. Yildiz F. 2009. *Advances in Food Biochemistry*. CRC Press, Boca Raton.
82. Yilmaz B, Portugal S, Tran TM, Gozzelino R, Ramos S, Gomes J, Regalado A, Cowan PJ, d’Apice AJF, Chong AS, Doumbo OK, Traore B, Crompton PD, Silveira H, Soares MP. 2014. Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. *Cell*, 159, 1277–1289.
83. Yin Y, Liu W, Ji G, Dai Y. 2013. The essential role of p38 MAPK in mediating the interplay of oxLDL and IL-10 in regulating endothelial cell apoptosis. *European Journal of Cell Biology*, 92, 150–159.
84. Zhang G, Skorokhod OA, Khoo SK, Aguilar R, Wiertsema S, Nhabomba AJ, Marrocco T, McNamara-Smith M, Manaca M, Barbosa A, Quintó L, Hayden CM, Goldblatt J, Guinovart C, Alonso PL, Dobaño C, Schwarzer E, LeSouëf PN. 2014. Plasma advanced oxidative protein products are associated with anti-oxidative stress pathway genes and malaria in a longitudinal cohort. *Malaria Journal*, 13, 134.
85. Zhang W, Lan Y, Huang Q, Hua Z. 2013. Galangin induces B16F10 melanoma cell apoptosis via mitochondrial pathway and sustained activation of p38 MAPK. *Cytotechnology*, 65, 447–455.
86. Zheng F, Tang Q, Wu J, Zhao S, Liang Z, Li L, Wu W, Hann S. 2014. p38 α MAPK-mediated induction and interaction of FOXO3a and p53 contribute to the inhibited-growth and induced-apoptosis of human lung adenocarcinoma cells by berberine. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research: CR*, 33, 36.
87. Zimmerman PA, Ferreira MU, Howes RE, Mercereau-Puijalon O. 2013. Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. *Advances in Parasitology*, 81, 27–76.

Cite this article as: Traoré K, Arama C, Médebielle M, Doumbo O & Picot S: Do advanced glycation end-products play a role in malaria susceptibility? Parasite, 2016, 23, 15.

PARASITE

An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.

All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

Parasite (open-access) continues Parasite (print and online editions, 1994-2012) and Annales de Parasitologie Humaine et Comparée (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at
<http://parasite.edmgr.com/>

IV. Etude expérimentale

A. Matériels et méthodes.

Au total 231 participants ont été prélevés dans six villages au centre du Mali. Ces six villages sont habités essentiellement par les Dogon et les Peulhs. La population était composée de volontaires ages de 3 à 88 ans, avec un rapport Homme/Femme égal à 1,22. La participation était volontaire et les participants étaient inclus par ordre d'arrivée. Le protocole d'étude a été approuvé par le comité d'éthique de la faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie du Mali, lettre N° 2011-59-/FMPOS. Les préalables administratifs et coutumiers ont consisté à rendre d'abord des vistes de courtoisie aux autorités administratives, communales et traditionnelles des différentes localités d'étude. Au niveau de chacune de ces autorités, l'étude a été expliquée en détail par l'équipe des investigateurs chargés de collecter les données. Une assemblée générale a été ensuite organisée avec la population pour présenter l'étude et répondre aux questions. A la suite de cette assemblée, la permission de la communauté à travers ses représentants administratifs et coutumiers, a été obtenue. Les volontaires ont été ensuite invités à se présenter au centre de santé pour la procédure de consentement éclairé individuel. Les procédures de l'étude sur le volontaire n'ont débuté qu'après sa signature du formulaire de consentement éclairé. Les données sociodémographiques et anthropologiques étaient recueillies sur des questionnaires. Le sang total a été collecté sur les tubes ETDA.

CHAPITRE I : Etude des systèmes érythrocytaires dans les deux populations

Ici, nous avons étudié les polymorphismes érythrocytaires dans les deux populations vivant en sympatrique. Des études antérieures ont décrit des différences de susceptibilité au paludisme entre ces deux populations. D'autres études ont aussi

décrit le rôle que pouvait avoir les facteurs génétiques dans la susceptibilité de ces populations vis-à-vis du paludisme. La connaissance de la distribution des phénotypes érythrocytaires dans ces populations pourrait donc contribuer à considérer le rôle confondant que ces facteurs génétiques peuvent avoir dans l'étude d'autres facteurs tel que l'alimentation et le métabolisme énergétique. Cela pourrait aussi aider dans l'interprétation des données sur l'efficacité des vaccins, des stratégies de prévention et autres essais thérapeutiques.

Un tube de sang de 6 ml sur EDTA était prélevé par participant. La technique manuelle sur gel de filtration (Ortho BioVue System, Ortho Clinical Diagnostics, Inc) était utilisée pour le phénotypage des systèmes sanguins selon le mode opératoire normalisé qu'on avait élaboré à cet effet.

La technique consistait : après ouverture des supports de filtration, on ajoutait successivement dans chaque étui une goutte de sérum physiologique, une goutte de chacun des réactifs par étui (Anti globulines humaines polyvalentes) puis une goutte du sang dilué au sérum physiologique, centrifugation pendant 5 minutes, suivie d'une incubation pendant de 45 minutes puis une centrifugation pendant de 5 minutes. Pour le système ABO la goutte de sang diluée était directement déposée dans l'étui du gel de filtration qui contenait déjà les immunoglobulines anti A et B. La lecture était faite immédiatement. Le résultat était dit positif ou négatif selon la présence d'agglutination ou pas. Les fréquences des allèles ont été calculées en utilisant la formule de Bernstein pour les systèmes ABO, Kidd, Duffy, MNSs and Kell, et le programme GENE[RATE] pour le système RH

CHAPITRE II : Etude de la prévalence moléculaire des especes plasmodiales

dans les deux groupes ethniques (Peulh et Dogon)

Nous avons étudié la distribution des différentes espèces de Plasmodium par la PCR quantitative (qPCR) en utilisant le Light Cycler. C'est une technique de PCR en temps réel. Le produit biologique utilisé était l'ADN génomique extrait à partir du sang total en utilisant les kits Qiagen. Des amorces spécifiques ont été utilisées pour amplifier chaque espèce. Les couples d'amorces utilisés par espèce étaient les suivants :

5'AGTGTGTATCAATCGAGTTTTTC3' (forward)

5'AGTTCCCCTAGAATAGTTACA3' (revers) pour *P. falciparum* ;

5'ATCTCTTTTGCTATTTTTTTAGTATTGGAGA3' (forward)

5'CCAAAGACTTTGATTTCTCAT3' (revers) pour *P. ovale* ;

5'ATAACATAGTTGT-ACGTTAAGAATAACCGC3' (forward)

5'AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA3' (revers) pour *P. malariae* ;

5'CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC3' (forward) et

5'ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA 3' (revers) pour *P. vivax*.

Le protocole d'amplification (température, nombres de cycles) était fonction des espèces étudiées. Le protocole complet d'amplification est en annexe dans ce le document.

CHAPITRE III : Etude du rôle des dérivées métabolites des aliments et leurs récepteurs (AGE, RAGE) dans les deux populations

Dans cette partie, nous avons fait le dosage des AGEs et des sRAGEs dans le plasma collecté chez les volontaires.

1. Dosage des AGEs par ELISA

Le kit ELISA compétitif OxiSelect™ Advanced Product (AGE) (STA-817-5) a été utilisé selon les instructions du fabricant. En bref, la plaque a été revêtue de 100 µl des

AGE conjugués dans chaque puits et a été incubée pendant une nuit à 4° C. La plaque est ensuite lavée deux fois avec le PBS 1X et bloquée avec 200 µl du diluant de dosage dans chaque puits et stockée à 4° jusqu'à utilisation. Une gamme de concentrations standardisées est préparée avec des dilutions en série d'AGE-BSA. Après avoir lavé la plaque avec un tampon 1X, 50 µl du standard ou de l'échantillon sont ajoutés aux puits en double et la plaque est ensuite incubée à température ambiante pendant 10 minutes sur un agitateur orbital de microplaque. Après incubation, 50 µl d'anticorps anti-AGE dilué ont été ajoutés dans chaque puits et incubés à température ambiante pendant 1 heure sur agitateur orbital, puis lavé avec 250 µl de tampon de lavage à 1X. Après lavage de la plaque avec 250 µl de tampon de lavage 1X, 100 µl du conjugué anticorps secondaire-HRP dilué a été ajouté dans chaque puits puis incubé pendant 1 heure à température ambiante sur agitateur orbitaire. Après le dernier lavage, la solution de substrat a été ajoutée à la quantité de 100 µl dans chaque puits. La réaction a été arrêtée entre 2-20 mns en ajoutant 100 µl de la solution d'arrêt dès que la coloration dans les puits change. L'absorbance a été lue avec le lecteur de microplaque à 450 nm comme longueur d'onde primaire et 620 nm comme référence. Les concentrations d'AGE dans les échantillons ont été calculées avec l'équation de la courbe du standard. Le test a été validé si le coefficient R^2 était > 0.98

2. Dosage des sRAGE par ELISA

La quantification des sRAGE dans le plasma a été réalisée à l'aide du kit ELISA (RD191116200R, sRAGE Human, BioVendor). Le standard, le témoin ou l'échantillon ont été ajoutés à des quantités de 100 µl par puits et incubés pendant 2 heures à température ambiante sur un agitateur orbital de microplaque. Après la période d'incubation de 2 heures, la plaque a été ensuite lavée 5 fois avec 350 µl de solution

de lavage. La solution d'anticorps marquée par la biotine a été ajoutée à raison de 100 µl dans chaque puits et incubés pendant 1 heure à température ambiante sur un agitateur orbital de microplaque. Après un deuxième lavage de la plaque, on a ajouté 100 µl de Streptavidine-HRP conjugué dans chaque puits puis on a incubé pendant 30 minutes à température ambiante sur un agitateur orbital de microplaque. Après le dernier lavage, la solution de substrat a été ajoutée à raison de 100 µl dans chaque puits et la réaction a été arrêtée entre 2-20 minutes après avec 100 µl de la solution d'arrêt. L'absorbance a été immédiatement lue avec le lecteur de microplaques à 450 nm en tant que longueur d'onde primaire. Les contrôles de qualité 'élevés' et 'bas' ont été inclus dans chaque réaction pour la validation de la réaction. Les concentrations de sRAGE dans les échantillons ont été calculées avec l'équation de la courbe du standard. Le test a été validé si le coefficient R^2 était > 0.98

CHAPITRE IV : Etude de l'expression et du polymorphisme de gène codant les récepteurs de métabolisme (RAGE)

1. Etude de l'expression du gène codant pour les récepteurs RAGE

1.1. Extraction de l'ARN total et transcription inverse

L'ARN total a été extrait à partir de lymphocytes humains congelés dans de l'azote en utilisant le kit d'isolement de miRNA MirVana™ (Ref. AM1560, Ambiom). En bref, après une décongélation rapide des lymphocytes, on a ajouté 300 à 600 µl de la solution de lyse pour lyser les cellules. Le lysat cellulaire a été mélangée par pipétage ou par agitation rigoureuse jusqu'à l'obtention d'un lysat homogène. L'extraction organique consistait à ajouter la solution d'homogénéisation de miRNA au rapport de volume 1:10 du lysat cellulaire, et de bien mélanger par vortex puis laisser le mélange

sur de la glace pendant 10 min. L'acide-Phénol:Chloroforme a ensuite été ajouté au mélange et mis au vortex pendant 1 minute puis centrifugé pendant 5 minutes à 10 000 x g à température ambiante pour séparer les phases aqueuse et organique. La phase aqueuse (supérieure) a été transférée dans un nouveau tube. L'éthanol à 100% a été ajouté à 1,25 volume à la phase aqueuse et 700 µl du mélange ont été transférés dans chaque collone à filtre. La centrifugation a été effectuée pendant 15 secondes à 10 000 x g pour passer le mélange à travers le filtre. Le filtre a été lavé une fois avec 700 µL de solution de lavage 1, puis deux fois avec 500 µL de solution de lavage 2/3. L'ARN a été collecté dans des tubes sans nucléase après avoir ajouté 100 µl de solution d'élution préchauffée à 95 ° C et stockés à -20 ° C. La quantité et la qualité de l'ARN ont été déterminées par le spectrophotomètre NanoDrop 1000 à 260/280 et 260/230.

L'ARN total a été retranscrit en ADNc (ADN complémentaire) par transcription inverse en utilisant le kit "*High-Capacity cDNA Archive Kit (Ref. 4374966, Life Technologies)*" conformément aux instructions du fabricant. La réaction a été effectuée dans le thermocycleur avec 50 µl de 2X RT master mixte (contenant 10X de Buffer de Transcription Reverse, 25X de dNTP, 10X d'amorces non spécifiques, la Transcriptase Reverse MultiScribe™, l'eau pure sans Nucléase) et 50 µL d'échantillon d'ARN dans chaque puits. Les conditions de réaction étaient de 25 ° C pendant 10 minutes, 37 ° C pendant 120 minutes, puis les échantillons sont stockés à -20 ° C jusqu'à utilisation.

1.2. La PCR quantitative en temps réel pour évaluer l'expression du RAGE

Les amorces utilisées pour la PCR étaient :

Forward : - 5'CAGGACCCTGGAAGGAAGCAGG3 '

et Revers -5'CTGGTTGTAGAAGAAAGCTTGGC3'. Le gène HSPCB (pour sa stabilité d'expression même en cas de maladie chronique comme les cancers) a été utilisé comme gène de référence pour normaliser la PCR. Les conditions de PCR étaient les suivantes : pré-incubation à 95 ° C pendant 10 minutes suivie de 40 cycles de 95 ° C pendant 15 s, 55 ° C pendant 20 s, 72 ° C pendant 30 s et se terminant par 72 ° C pendant 10 minutes. La PCR a été effectuée avec le Light Cycler. La méthode $\Delta\Delta CT$ a été utilisée pour calculer l'expression relative du gène.

2. Étude du polymorphisme du gène codant pour RAGE

La mutation -374 / AT, -429T / C et la délétion/insertion -69pb suppression ont été étudiées par RFLP (polymorphisme de restriction de longueur de fragment). Un fragment de 503 pb a été amplifié par PCR en temps réel. Les amorces utilisées étaient AGER_F 5'- GGG GCA GTT CTC TCC TCA-3 'et AGER_R 5'-TCG TGT TGT CAC AGG GAA TG-3' comme décrit précédemment dans la littérature (Peng et al., 2009). Les conditions de PCR étaient de 95 ° C pendant 10 mn, suivie de 35 cycles de 95 ° C pendant 30 s, de 55 ° C pendant 20 s, de 72 ° C pendant 30 s et d'une élongation terminale de 72 ° C pendant 10 mns. Les produits de PCR (503 pb) ont ensuite été digérés avec MnlI (MfeI) et AluI (10 µl de produit de PCR + 1 µl d'enzyme + 2 µl de tampon et 18 µl d'eau) à 37 ° C pendant 15 heures dans un thermocycleur. Le produit digéré (7 µl + 3 µl de tampon de chargement) a été chargé sur un gel d'agarose à 1% et a migré pendant 1 heure à 100 volts. La digestion avec MfeI a révélé des fragments 214 et 288 pb pour l'allèle 374A et 503 pb pour l'allèle muté 374T (Figure 5).

B. Resultats

CHAPITRE I : Résultats sur les systèmes érythrocytaires.

Les résultats sur ce chapitre sont présentés dans l'article suivant (en préparation).

Article 2: Erythrocyte polymorphisms in different ethnic groups in malaria endemic areas of Mali.

Karim Traore^{1,4}, Salimata Konate¹, Amadou Niangaly¹, Alhassane Ba², Alassane Niare¹, Julie Di Cristofaro³, Mounirou Baby², Mahamadou A. Thera^{1,5}, Stephane Picot⁴, Jacques Chiaroni³, Gilles Boetsch⁵, Ogobara K. Doumbo^{1,5}

Statut : en préparation pour soumission

Resumé

La connaissance de la structure génétique des populations est capitale dans la recherche et la lutte contre certaines maladies comme le paludisme. L'objectif de cette étude était de déterminer les polymorphismes érythrocytaires dans deux droupes ethniques ayant des différences de susceptibilité connues au paludisme. Nous avons fait une étude transversale incluant différentes populations ayant des modes de vie différents. Les phénotypes des systèmes ABO, Rh, Kell, MNS, Kidd, Duffy ont été déterminés par la technique de filtration sur gel et des enquêtes anthropologiques ont été menées. Chez 231 participants inclus dans six villages, les phénotypes O (40,7%) et A (31,2%) étaient les plus fréquents avec des fréquences alléliques respectives de 0,65 et 0,21. Les phénotypes Dce (52,4%), DCce (20,3%) et DCEE (11,7%) et les haplotypes *R0* (0,55) et *r* (0,18) étaient les plus fréquents dans le système Rh. Le phénotype O et l'haplotype *R1* étaient prédominants chez les Peulh. Des cas de

déficite en glycophorines B ont aussi été décrits dans notre population d'étude. Environ 7% des participants étaient Duffy positif, ils étaient tous Kell négatif. Certains facteurs génétiques érythrocytaires décrits dans cette population (groupe O et déficite en glycophorine B) pourraient conférer des résistances naturelles au paludisme. Leur rôle devrait être pris en compte dans l'interprétation des études sur la susceptibilité au paludisme, ainsi que dans les essais cliniques. La connaissance de la distribution de ces facteurs dans la population en zone endémique du paludisme devrait un donc être un préalable à toute étude sur la susceptibilité au paludisme afin de permettre une évaluation objective du rôle de tout nouveau paramètre étudié dans le cadre de la susceptibilité au paludisme. Ces données supportent aussi le fait que ces populations ont été soumises à des pressions de sélection exercées par l'environnement, ce qui pourrait expliquer ces adaptations de résistance suite à la sélection positive de ces facteurs génétiques. La susceptibilité au paludisme devrait donc être étudiée de façon plus inclusive.

Erythrocyte polymorphisms in different ethnic groups in malaria endemic areas of Mali

Karim Traore^{1,4}, Salimata Konate¹, Amadou Niangaly¹, Alhassane Ba², Alassane Niare¹, Julie Di Cristofaro³, Mounirou Baby², Mahamadou A. Thera^{1,5}, Stephane Picot⁴, Jacques Chiaroni³, Gilles Boetsch⁵, Ogobara K. Doumbo^{1,5}

Author's affiliation

¹ Malaria Research and Training Center, DEAP/FMPOS, UMI3189, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, BP 1805, Bamako. Tel/fax: 00223 20228109, Mali.

² Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS), Bamako, Mali, BP-E: 344.

³ UMR 7268 ADES, Aix-Marseille Université/EFS/CNRS; 149 boulevard baille, 13392, Marseille, cedex 5. Tel: 0491189500.

⁴ Malaria Research Unit, SMITH, ICBMS, UMR 5246 CNRS-INSA-CPE-University Claude Bernard Lyon1, 8 Avenue Rockefeller, 69373, Lyon, Cedex 08, France.

⁵ Unité Mixte International UMI 3189 – Environnement - Santé - Sociétés, (CNRS/USTTB, CNRST/UGB/UCAD) Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD) - BP 5005, Dakar, Sénégal – Téléphone: (00 221) 33 824 87 95

Authors e-mail address

Karim Traore: karim@icermali.org

Salimata Konate: sakonate@icermali.org

Amadou Niangaly: niangaly@icermali.org

Alhassane BA: balhassane@hotmail.fr

Alassane Niare: flanyalass@yahoo.fr

Julie Di Cristofaro: julie.dicristofaro@efs.sante.fr

Mounirou Baby: baby@icermali.org

Mahamadou A. Thera: mthera@icermali.org

Stéphane Picot: stephane.picot@univ-lyon1.fr

Jacques Chiaroni: jacques.chiaroni@efs.sante.fr

Gilles Boetsch : gilles.boetsch@gmail.com

Ogobara K. Doumbo: okd@icermali.org

Corresponding authors:

Karim Traore: karim@icermali.org

Ogobara K. Doumbo: okd@icermali.org

Abstract.

Background: African populations exhibit high degree of genetic diversity. Description of this population's genetic diversity is critical for understanding markers of risk/protection and disease management and control strategies. Since genetic diversity could be associated with difference of susceptibility to some diseases like malaria, it is important to consider its impact when interpreting results of clinical trials in malaria endemic areas. This study aimed to determine the erythrocyte polymorphism in different populations of malaria endemic area in Mali.

Methods: The cross-sectional surveys were carried out in different ethnic groups living in malaria endemic areas in Mali. Six milliliters of whole blood were collected in EDTA vials from each participant after informed consent has been obtained. The ABO, RH, Kell, MNSs, Kidd, Duffy systems phenotypes were determined by the technique of gel filtration.

Results and discussions: A total of 231 subjects were included from six villages. The blood groups phenotypes O (40.7%) and A (31.2%) were more frequent with respective allele frequencies of 0.65 and 0.21. In the RH system, phenotypes Dccee (52.4%),

DCcee (20.3%) and DccEe (11.7%) were the most frequent; while the haplotypes *R0* (0.55), *r* (0.20) and *R1* (0.13) were the most frequent. Seven percent (7%) of Duffy positive and 4% of Glycophorin B deficiency (S-s-) were observed in our participants. All participants were Kell negative.

Conclusion: ABO and RH systems were polymorphic in these ethnic groups in Mali. Their implication in susceptibility to malaria should be considered in clinical trials interpretation, and for prevention of blood transfusion risks.

Keywords: erythrocyte systems, polymorphism, ethnicity, environment, malaria, Mali.

1. Background.

Africa is a continent where higher population genetic diversity and the role of evolutionary processes that contributed to this diversity has been described [1,2]. It is also characterized by a lower degree of linkage disequilibrium[1,3], supporting the hypothesis of African origin of human. African genetic diversity is associated with significant demographic and cultural diversity, making the continent a relevant place to study factors contributing to the definition of gene pool of contemporary populations.

The Sahel-Saharan regions have a strong cultural diversity, with contrasting climatic areas in terms of rainfall, defining different environments and lifestyles. The populations living in these environments are constantly affected by numerous infectious diseases, leading to a strong pressure of natural selection[1,2]. This selection pressure results into a genetic diversity in populations, which may have diverse medical implications like susceptibility to disease.

Mali is a country with different eco-climatic areas and an important ethnic diversity. Some genetic diversities associated with differences in susceptibility to malaria have already been described in sympatric Malian populations[4,5,6,7,8]

Many clinical trials including therapeutic and vaccine studies are being conducted in such areas and blood transfusion is common due to severe malaria and sickle cell disease. Studying the genetic structure of these populations (including erythrocyte systems) is crucial in interpreting the finding of clinical trials. In addition, the knowledge of genetic polymorphism map across the countries could have advantages in the prevention of risks related to blood transfusion in countries with limited resources where the technical platform cannot efficiently determine some erythrocyte phenotypes.

This study aimed to study the erythrocyte polymorphism in populations living in different environmental and socio cultural conditions in Mali.

2. Methods.

Study areas.

The study has been conducted in six villages with different eco-climatic and sociocultural conditions in the northeast of Mali.

Bandiagara: a city located at 700 km from the capital city in the northeast of Mali has 15,000 inhabitants. The population consists mostly of Dogon (64%) who live with Fulani and Tukolor (12%), and other ethnic groups. They practice ethnic exogamy and the caste endogamy. The languages are Niger-Congo-Atlantic, Niger-Congo-Mande and Afro-Asiatic-Berber.

Manteourou : a village with 1156 inhabitants (according to the census conducted in 2011) is divided into two districts (Dogon, Fulani) separated by a distance of approximately one kilometer.

Madougou: with 3128 inhabitants, is located at 12 kilometers from Manteourou and these two villages have the same configuration and characteristics (Madougou Dogon district and Fulani district).

Binedama: is a Fulani's village with only 510 inhabitants (2011 census).

In these villages, the two ethnic groups (Dogon and Fulani) live in sympatric and practice ethnic endogamy. The language is Niger-Congo-Atlantic.

Petaka and N'Gono are located at around 150 km in the northeast from previous villages. Dogon constitutes the predominant ethnic group of the population. Family is mainly based on ethnic endogamy, patrilocality, and the language is Niger-Congo-Atlantic.

The structure of these societies is patrilineal and patrilocal.

Data collection and laboratory assay:

Data were collected in cross-sectional surveys from July to September 2011. A total of 231 participants from permanent resident populations were included in our study. Participants were included in order of arrival to the study center after they signed consent forms. As main inclusion criterias participant should be at least 3 years old, with no clinically chronic disease, no immune deficiency or history of blood transfusion in the last three months. A blood sample (6 ml in EDTA tube) was collected from each participant by venipuncture. Interviewing participants also collected the socio demographic data of each participant.

The manual technique of gel filtration (Ortho Bio Vue System, Ortho Clinical Diagnostics, Illkirch, France) was used for phenotyping of the blood groups systems according to the standardized operating procedure. Briefly, after opening filtration support, we added successively in each well one drop of saline solution, one drop of each reagent (Polyvalent human anti-globulins) and one drop of diluted blood with saline. A centrifugation was done for 5 minutes (Ortho BioVue System centrifuge), followed by 20 minutes incubation at 37° C, and then centrifugation for 5 minutes. For ABO system, diluted blood was directly added into the well of filtration support, which already contained the immunoglobulins anti-A and anti-B (+ anti-AB). The result was positive if there was agglutination or negative if there was no agglutination.

Statistical methods:

Data were entered and analyzed in SPSS software version 16. Alleles frequencies were calculated using the Bernstein formula for ABO, Kidd, Duffy, MNSs and Kell systems, and the GENE[RATE] program for RH system. The phenotype frequencies were calculated for all the study participants while allele frequencies were determined only in unrelated participants.

3. Ethical clearance:

The study protocol was approved by the ethics committee of the faculty of medicine, pharmacy and dentistry of Mali prior the study. Each participant signed two copies of informed consent form. The illiterate participants unable to sign used their fingerprint and were assisted by literate witness. All the study procedures were discussed in the participant's desirable language in the presence of a witness. Parents or legal

guardians signed the assent forms for the minors after having their consent. Each participant was given a signed copy of informed consent. To warrant the confidentiality, each participant was assigned a code, which has been used instead of the name on samples.

4. Results.

Socio demographic characteristics of study participants:

A total of 231 participants, composed in majority of Dogon (66,7%) and Fulani (29,4%) were included. Other ethnic groups (Tamashek and Bambara) constituted 3.9% of the sample. The sex ratio was 1.22 (males/females) and the median age was 38 years with respectively 3 and 88 years as minimal and maximal age. Binedama and Ngonon villages had the lowest participant's number with respectively 5.2 and 8.6% of participants (Table 1). Population structure is patrilocal and patrilineal.

Erythrocytes polymorphism results:

The phenotype O was the most frequent (40.7%), followed by A (31.2%), B (21.6%) and AB (6.5%) (Table 2). The allele O (0.65) had the highest frequencies, followed by A (0.20) and B (0.14) for the ABO system (Table 2). In the RH system, the predominant phenotypes were Dccee (52.4%), DCcee (20.3%) and DccEe (11.7%) The haplotype *R0* (0.55) was the most frequent, followed by *r* (0.18) and *R1* (0.13) (Table 3). Most of the study participants were Duffy negative with 93.5% of Fy(a-b-), and 6.5% of Duffy positive. The alleles frequencies were 0.99 for *FY*O*, 0.0065 for *FY*A* and *FY*B* (Table 2). In the Kidd system, the phenotypes frequencies were 56.3 ; 34.6 ; 8.7 and 0.4% respectively for Jk(a+b-), Jk(a+b+), Jk(a-b+) and Jk(a-b-) (Table 2), with respective

alleles frequencies of 0.75 and 0.25 for JK^*A and JK^*B (Table 2). Phenotypes frequencies in MNSs system were 74.5 for S-s+, 17.8 for S+s+ and 3.9% for S+s- and 3.9 for S-s- (Table 4). All participants were Kell negative (Table 2).

5. Discussion

The study involved populations from six villages with different eco-climatic conditions and lifestyles. The lower numbers of participants from Binedama and N'gono are due to small total population size of these villages. Most of the study sites were Dogon and/or Fulani villages, leading to a high representation of these two ethnic groups in our sample. Except children under 3 years old, all the age groups (3-88 years) were represented in our sample, allowing the determination of erythrocytes polymorphisms distribution at all ages. Children less than 3 years old were excluded from the study to avoid confounder factors related to blood group systems immaturity.

ABO system phenotypes and alleles distribution

High frequencies of blood group O phenotypes in Sub-Saharan Africa are already reported in literature [9,10]. In Mali, a recent survey in the national blood transfusion centre reported 42% of O phenotypes [8]. Another study which included five ethnic groups in malaria endemic area in Ivory Coast in 2009 reported 50-60% of O phenotype [6]. The predominance of this phenotype in Sub-Saharan Africa has been suggested to be related to the natural selection pressure by some endemic diseases like malaria [4,7,12,13,14]. The rosetting mechanism has been described as one of the factors that contributed to the positive selection of O allele carriers by conferring to them relative resistance to malaria [4]. However, demographic phenomena including populations'

migration, genetics drift and the founder effect could also have considerable role in the distribution of erythrocyte phenotypes. The Mitochondrial DNA and Y-chromosome analysis could contribute to determine the role of these demographic phenomena in the actual distribution of erythrocytes polymorphism [10].

The highest frequencies of O phenotype in our sample were observed in Fulani ethnic group with 48.6% (table 4). Reduced susceptibility to malaria has been described in Fulani populations, compared to their neighbors' sympatric Dogon and Mossi populations[5,6,8]. Antigen presenting cells such as dendritic cells and Toll-Like Receptors activation pathways, or polymorphism of gene coding for some cytokines have been described to be involved in this difference of susceptibility to malaria [5,6,8].

The RH system phenotypes and haplotypes distribution

The RH system was polymorphic with 10 different phenotypes determined in the study sample. Phenotype Dccee and the haplotype *R0* had the higher frequencies. Previous studies have described the high frequencies of Dccee and *R0* in Sub-Saharan populations [15-17]. This may be consistent with the fact with that Rh haplotype is the ancestral one and as it is seen with other haploidic systems (mDNA and Y chromosome), the most ancient is found in Africa considered as cradle of modern human [16,17].

The prevalence of HbS allele which is another genetic polymorphism conferring resistance to malaria [18,19], may determine the distribution of Dccee and *R0*. Carriers of this allele have enhanced expression of antigens D, c et e, leading to high frequencies of haplotype *R0* in high sickle cell prevalence area [15,16]. Dogon people, who are known to have a much lower frequency of the HbS allele, have in contrast a

high frequency of the HbC allele [18]. All these genetic markers polymorphisms are the result of natural selection and co-evolution of human and malaria parasite [19].

Higher frequency of haplotype *R1* was described in this study, compared to previous data published [17]. This haplotype was present exclusively in Fulani population. The Fulani population practice ethnic endogamy, which establishes a genetic distance between them and other ethnic groups. These data could also support the back migration «back to Africa» hypothesis reported in literature [20-23].

Duffy system phenotypes and alleles distribution

As already described in non-Caucasian populations[7,9,17,19], we found higher frequencies (93.5%) of Fy(a-b-) phenotype and *FY*O* allele (0.99) in our sample. However, 6.5% of our participants were Duffy positive. Menard *et al.* described 8.8% of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in Duffy negative people of Madagascar where 28% of the population are Duffy positive [24]. The low frequencies of Duffy positive in African populations could be a factor that maintains a silent transmission of *P. vivax*. Malaria control programs should incorporate more sensitive tools for the diagnosis and surveillance of *P. vivax* in these areas.

MNSs system phenotypes distribution

The phenotype S-s+ (74%) was the most frequent in our study participants. Higher frequency of Glycophorin B deficiency (S-s-) was observed in Fulani (7.4%), compared to their neighbor Dogon (2.6%). The Glycophorin B deficiency is described as natural resistance factor to malaria infection invasion [24]. The presence of this phenotype in malaria endemic areas could be a result of natural selection pressure from malaria. However, these phenotypes need to be confirmed by molecular assay.

6. Conclusion

Polymorphisms among the different populations were mainly observed in the ABO and RH systems. The ethnicity and the environment of residence were the factors involved in polymorphism distribution; highlighting the role of environmental natural selection in the genetic diversity. The study of erythrocytes polymorphisms is a significant contribution in understanding the differences in susceptibility to malaria. The natural selection pressure can involve several genetic markers (including erythrocytes systems thought to be sensitive to natural selection). And a natural resistance to disease could be the sum of polymorphisms of several genetic markers. Since some polymorphisms in erythrocyte systems have been described to be associated with susceptibility or resistance to diseases, their distribution and their impact should be considered in epidemiological studies of malaria. For an accurate interpretation of studies on malaria susceptibility, clinical trials data for efficacy of drugs or vaccine in malaria endemic areas, any ethnic group difference in the distribution of erythrocytes phenotypes should be considered. The knowledge of erythrocytes polymorphism countrywide could also contribute to reduce risks related to blood transfusion

Acknowledgements: We thank the community leaders, health and administrative authorities and all the populations of the different villages who participated in this study.

Competing interest: authors have declared no competing interest

Authors' contribution: design of the study: OD, JC, GB, KT, SK, JD; Collect of data: KT, SK, AN, AB, AN, MB; Analyze of data: KT, JD; writing the manuscript: KT, OD, SP, MAT.

Funding: This study was funded by the Etablissements Français du Sang (EFS) Alpes Méditerranée, Marseille, France, and grants from Foundation MERIEUX and UMI3189 at the Malaria Research and Training Center, DEAP, FMPOS, USTTB, Bamako, Mali.

7. References

1. Campbell MC, Tishkoff SA. African genetic diversity: implications for human demographic history, modern human origins, and complex disease mapping. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008;9:403–33.
2. Tishkoff SA, Reed FA, Friedlaender FR, Ehret C, Ranciaro A, Froment A, et al. The genetic structure and history of Africans and African Americans. *Science* 2009;324:1035–44.
3. Campbell MC, Tishkoff SA. The evolution of human genetic and phenotypic variation in Africa. *Curr Biol CB* 2010;20:R166–173.
4. Rowe JA, Handel IG, Thera MA, Deans A-M, Lyke KE, Koné A, et al. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17471–6.
5. Lokki AI, Järvelä I, Israelsson E, Maiga B, Troye-Blomberg M, Dolo A, et al. Lactase persistence genotypes and malaria susceptibility in Fulani of Mali. *Malar J* 2011;10:9.
6. Santovito A, Burgarello C, Cervella P, Ouattara M, Caravatti GA, Salvarani B, et al. Erythrocyte polymorphisms in five ethnic groups of Northern Côte d'Ivoire. *Int J Immunogenet* 2009;36:189–91.

7. Mellal PDB. Etude du polymorphisme des groupes sanguins, (ABO, Ss, Rhésus et Duffy). *Leban Sci J* 2008;9:17.
8. Diarra AB, Guindo A, Kouriba B, Dorie A, Diabaté DT, Diawara SI, et al. Sécurité transfusionnelle et drépanocytose à Bamako, Mali. Séroprévalence des infections à VIH, VHB, VHC et allo-immunisation anti-Rh et Kell chez les drépanocytaires. *Transfus Clin Biol* 2013;20:476–81.
9. Rowe JA, Opi DH, Williams TN. Blood groups and malaria: fresh insights into pathogenesis and identification of targets for intervention: *Curr Opin Hematol* 2009;16:480–7.
10. Crubezy E, Braga J, Larrouy G. *Anthropobiologie*. 07/2008 (2ème édition). MASSON; 2008.
11. Ferwerda B, McCall MBB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, et al. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:16645–50.
12. Arama C, Giusti P, Boström S, Dara V, Traore B, Dolo A, et al. Interethnic Differences in Antigen-Presenting Cell Activation and TLR Responses in Malian Children during *Plasmodium falciparum* Malaria. *PLoS ONE* 2011;6:e18319.
13. Israelsson E, Ekström M, Nasr A, Dolo A, Kearsley S, Arambepola G, et al. Marked differences in CRP genotype frequencies between the Fulani and sympatric ethnic groups in Africa. *Malar J* 2009;8:136.
14. Wagner FF, Flegel WA. RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. *Blood* 2002;99:2272–3.
15. Noizat-Pirenne F, Tournamille C. Relevance of RH variants in transfusion of sickle cell patients. *Transfus Clin Biol J Société Fr Transfus Sang* 2011;18:527–35.
16. Henn BM, Gignoux CR, Jobin M, Granka JM, Macpherson JM, Kidd JM, et al.

Hunter-gatherer genomic diversity suggests a southern African origin for modern humans. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:5154–62.

17. Chiaroni J., Ferrera V., Dettori I., Roubinet F. Groupes sanguins érythrocytaires. EMC (Elsevier SAS, Paris), Hématologie, 13-000-R-50, 2005.

18. Agarwal A, Guindo A, Cissoko Y, Taylor JG, Coulibaly D, Koné A, et al. Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood* 2000;96:2358–63.

19. Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* 2005;77:171–92.

20. Cruciani F, Santolamazza P, Shen P, Macaulay V, Moral P, Olckers A, et al. A back migration from Asia to sub-Saharan Africa is supported by high-resolution analysis of human Y-chromosome haplotypes. *Am J Hum Genet* 2002;70:1197–214.

21. Chiaroni J, Underhill PA, Cavalli-Sforza LL. Y chromosome diversity, human expansion, drift, and cultural evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:20174–9.

22. Henn BM, Botigué LR, Gravel S, Wang W, Brisbin A, Byrnes JK, et al. Genomic Ancestry of North Africans Supports Back-to-Africa Migrations. *PLoS Genet* 2012;8:e1002397.

23. Hodgson JA, Mulligan CJ, Al-Meerri A, Raaum RL. Early back-to-Africa migration into the Horn of Africa. *PLoS Genet* 2014;10:e1004393.

24. Pasvol G, Jungery M. Glycophorins and red cell invasion by *Plasmodium falciparum*. *Ciba Found Symp* 1983;94:174–95.

Tableau 1. Baseline socio demographic characteristics of the study sample

Village	Bandiagara	Madougou	Manterou	Petaka	N'Gono	Binedama	Total
Dogon	41	29	35	32	17	0	154
Fulani	13	25	17	0	1	12	68
Others	7	0	0	0	2	0	9
Total	61	54	52	32	20	12	231
%	26.4	23.4	22.5	13.9	8.6	5.2	100

Median of age	38 years
Maximal	88 years
Minimal	3 years
Sex ratio (M/F)	1.22

Tableau 2. Distribution of phenotypes and alleles frequencies of ABO, Kidd, Duffy and Kell systems in unrelated participants.

Erythrocyte system	Phenotype	Frequencies (n)	Alleles frequencies
ABO N=153	A	30,1 (46)	A= 0.2037
	B	20,9 (32)	B= 0.1482
	AB	6,5 (10)	
	O	42,5 (65)	O= 0.6517
Kidd N=153	JK(a ⁺ b ⁻)	59,5 (91)	JK*A= 0.7484
	JK(a ⁺ b ⁺)	30,7 (47)	
	JK(a ⁻ b ⁺)	9,8 (15)	JK*B= 0.2516
Duffy N=153	Fy(a ⁻ b ⁻)	98.0 (150)	FY*O= 0.99
	Fy(a ⁺ b ⁻)	0.7 (1)	FY*A=0.0065
	Fy(a ⁺ b ⁺)	0.7 (1)	
	Fy(a ⁻ b ⁺)	0.7 (1)	FY*B= 0.0065
Kell N=153	K-(kk)	153	1

Tableau 3. Distribution of RH system haplotypes by ethnic group in unrelated participants

Haplotypes	Fischer	<i>R0</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>r'</i>	<i>r''</i>	<i>Rz</i>	<i>r</i>
	CDE	<i>Dce</i>	<i>DCe</i>	<i>DcE</i>	<i>dCe</i>	<i>dcE</i>	<i>DCE</i>	<i>dce</i>
Dogon (n= 109)		0.621	0	0.092	0.072	0	0.019	0.195
Fulani (n= 44)		0.403	0.362	0	0	0.019	0.025	0.189
All (n=153)		0.552	0.134	0.069	0.032	0.016	0.011	0.20

Table 4. Ethnic distribution of MNSs, Kidd, Dufy and ABO systems phenotypes

Phenotype	Ethnic group			P
	Fulani	Dogon	Others	
S ⁻ s ⁻	7.4% (5)	2.6% (4)	0	0.15
S ⁺ s ⁻	0	5.8% (9)	0	
S ⁺ s ⁺	19.1%(13)	18.2% (28)	0	
S ⁻ s ⁺	73.5% (50)	73.4% (113)	100%(9)	
JK(a ⁻ b ⁻)	0	0.6% (1)	0	0.15
JK(a ⁺ b ⁻)	47.1% (32)	61.7% (95)	33.3% (3)	
JK(a ⁺ b ⁺)	36.8% (25)	31.8% (49)	66.7% (6)	
JK(a ⁻ b ⁺)	16.2% (11)	5.8% (9)	0	
Fy(a ⁻ b ⁻)	98.5% (67)	92.9% (143)	40% (4)	<10 ⁻³
Fy(a ⁺ b ⁻)	0	0	40% (4)	
Fy(a ⁺ b ⁺)	1.5% (1)	7.1% (11)	0	
Fy(a ⁻ b ⁺)	0	0	20% (2)	
A	27.9% (19)	32.5% (50)	33.3% (3)	<10 ⁻³
B	17.6% (12)	24% (37)	11.1% (1)	
AB	5.9% (4)	6.5% (10)	11.1% (1)	
O	48.6% (33)	37% (57)	44.4% (4)	
Total	68	154	9	

Table 5. Distribution of Rh and ABO phenotypes by study villages

System	Phenotypes	Village					
		Madougou	Manteourou	Binedama	Bgara	Petaka	N'Gono
		%	%	%	%	%	%
RH N=231	dCcee	0	0	0	0	9,4	5
	dccee	0	0	8,3	4.9	0	25
	dccEe	0	0	0	0	0	5
	DCcee	24.1	21.2	33.3	23	9.3	10
	DCcEe	3.7	7.7	25	1.6	0	0
	Dccee	55.6	46.2	25	50.8	81.3	35
	DccEE	1.9	0	0	0	0	0
	DCCee	5.6	11.5	8.3	0	0	0
	DccEe	9.3	11.5	0	19.7	0	20
	DCCEe	0	1.9	0	0	0	0
ABO N=231	A	35.2	26.9	25	26.2	50	20
	B	24.1	23.1	25	21.3	12.5	25
	AB	9.3	5.8	0	9.8	0	5
	O	31.5	44.2	50	42.6	37.5	50
Total		54	52	12	61	32	20
N=231							

CHAPITRES II, III et IV: Résultats sur les AGE, sRAGE, l'expression et le polymorphisme de RAGE.

Les résultats des chapitres II, III et IV sont présentés dans un article scientifique publié à PLOS ONE.

Article 3: Interaction between environment, nutrient-derived metabolites and immunity: A possible role in malaria susceptibility/resistance in Fulani and Dogon of Mali

*Karim Traore**, Mahamadou A. Thera, Anne-Lise Bienvenu, Charles Arama, Guillaume Bonnot, Adeline Lavoignat, Ogobara K. Doumbo, Stephane Picot. *PLoS ONE* 12(12): e0189724.

Statut : publié dans *PLOS ONE*

Résumé

Les produits terminaux glycation avancée (AGE), qui sont des métabolites dérivés des aliments, résultent de la liaison entre le sucre réducteur et le groupe amine des protéines, des lipides ou des acides nucléiques connue sous le nom de la réaction de Maillard. Le niveau d'exposition aux AGE varie selon le type de régime alimentaire car leurs quantités dans les aliments sont fonction du mode de cuisson. Cela se traduit par le fait que certains groupes ethniques pourraient être plus exposés que d'autres aux AGE d'origine alimentaire lorsqu'ils ont des habitudes socioculturelles différentes.

Notre objectif était donc d'étudier le rôle que ces AGE et leurs récepteurs, ainsi que les polymorphismes au niveau du gène codant pour ces récepteurs pourraient jouer dans les différences de susceptibilité au paludisme décrites chez les Peulh et Dogon sympatriques au Mali avec comme différence fondamentale le mode de vie.

Nous avons d'abord déterminé la prévalence de l'infection par *Plasmodium* dans les deux groupes ethniques par la qPCR. Nous avons ensuite mesuré par ELISA les taux plasmatiques d'AGE et leurs récepteurs solubles (sRAGE) chez 68 Peulh et 154 Dogon. Nous avons également déterminé par qPCR l'expression du RAGE, et recherché les polymorphismes -374 T/A, -429 T/C et la délétion/insertion de 63 bp par la technique du polymorphisme par restriction de longueur de fragment (FLRP).

A la suite de ces travaux, nous avons trouvé que le taux de prévalence de *Plasmodium falciparum* chez les Peulh était de 42,64% contre 51,30% chez les Dogon. Les prévalences des autres espèces étaient respectivement chez les Peulh et les Dogon de 5,88% contre 6,5% pour *P. malariae*, 0% contre 2,6% pour *P. ovale*. La moyenne des taux AGE plasmatique était de 10,21µg/ml, IC 95% [8,02-10,92] chez les Peulh contre 16,88 µg/ml, IC 95% [13,92-17,96] chez les Dogon ($p < 0,001$). Quant à la moyenne des taux de sRAGE, elle était de 563,07pg/ml, IC 95% [547,81-580,13] chez les Peulh contre 465,68 pg/ml, IC 95% [331,19-467,51] chez les Dogon ($p < 0,001$).

Le récepteur RAGE était deux fois plus exprimé chez les Dogon que chez les Peulh (0,08 vs 0,04), ($P = 0,08$) et la mutation -374A était plus fréquente chez les Peulh (32%) que chez les Dogon (20%).

Les Peulh qui sont supposés être moins exposés aux AGE d'origine alimentaires (du fait de leur régime essentiellement à base de couscous et de lait) avaient effectivement de faibles taux sanguin d'AGE, comparés aux Dogon qui ont en principe un régime riche en AGE (plats bien cuits). Les Peulh avaient aussi des taux sanguins élevés de sRAGE qui jouent souvent un rôle compétitif avec les AGE et contribuent à leur élimination du sang. Le récepteur était aussi plus exprimé chez les Dogon, cela peut s'expliquer par les quantités d'AGE dans le sang qui induisent des réactions en

cascade avec une auto amplification de l'expression du RAGE. Finalement, des fréquences élevées de l'allèle mutée -374/T ont été observées chez les Peulh comparés aux Dogon ($P < 0,01$). Cette mutation jouerait un rôle important dans l'expression des variantes du RAGE, mais aussi d'autres gènes de l'immunité.

Vu le rôle délétère de l'activation permanente de l'axe AGE-RAGE sur l'immunité, ainsi que le rôle de la mutation -374/T dans la régulation des gènes du métabolisme et de l'immunité, nous pensons les habitudes alimentaires actuelles ou ancestrales d'un groupe ethnique pourraient jouer un rôle dans la susceptibilité actuelle au paludisme. Mais des recherches supplémentaires dans ce domaine en incluant aussi le microbiote intestinal pourraient contribuer à mieux élucider cette hypothèse.

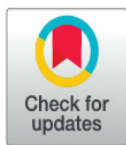
RESEARCH ARTICLE

Interaction between environment, nutrient-derived metabolites and immunity: A possible role in malaria susceptibility/resistance in Fulani and Dogon of Mali

Karim Traore^{1,2*}, Mahamadou A. Thera¹, Anne-Lise Bienvenu^{2,3}, Charles Arama¹, Guillaume Bonnot², Adeline Lavoignat², Ogobara K. Doumbo¹, Stephane Picot^{2,3}

1 Malaria Research and Training Centre, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, MRTC/USTTB, Bamako, Mali, **2** Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire, UMR-5246 CNRS-INSA-CPE, Malaria Research Unit, Lyon, France, **3** Institut de Parasitologie et Mycologie Médicale, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

* karim@icermali.org



OPEN ACCESS

Citation: Traore K, Thera MA, Bienvenu A-L, Arama C, Bonnot G, Lavoignat A, et al. (2017) Interaction between environment, nutrient-derived metabolites and immunity: A possible role in malaria susceptibility/resistance in Fulani and Dogon of Mali. PLoS ONE 12(12): e0189724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189724>

Editor: Karin Jandeleit-Dahm, Baker IDI Heart and Diabetes Institute, AUSTRALIA

Received: July 27, 2017

Accepted: November 30, 2017

Published: December 20, 2017

Copyright: © 2017 Traore et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information file.

Funding: Part of this research has been funded by: Etablissements Français du Sang (EFS-Marseille); Malaria Research and Training Center (MRTC-UMI 3381, Mali); Malaria Research Unit (UCBL, Lyon, France). No funding bodies had any role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

The role of some nutrient-derived metabolites on the innate and adaptive immune responses is now established. Global research approach investigating the interplay between environment, lifestyle and the host's immune responses is crucial in the understanding of malaria susceptibility. Advanced Glycation end products (AGE), which are food-derived metabolites result from the link between reducing sugar and amino group of proteins, lipids or nucleic acids. The level of exposure to AGEs varies depending on the type of diet. The dysfunction of the immune system induced by AGE and the cellular receptors for AGEs (RAGE) in susceptibility to bacterial infection has been described. But no study has yet explored their role in susceptibility to malaria. Therefore, we aimed to evaluate systemic AGE and RAGE gene polymorphism in two sympatric populations with previously described difference of susceptibility to malaria. We measured by ELISA the plasma levels of AGEs, and their soluble receptors (sRAGE) from 170 volunteers (68 Fulani and 102 Dogon). We also determined by real-time quantitative PCR the expression of RAGE, and the -374 T/A, -429 T/C polymorphisms and 63 bp deletion by fragment length restriction polymorphism. The prevalence rate of *Plasmodium* in Fulani and Dogon were respectively 42.64% and 51.30% for *P. falciparum*, 5.88% and 6.5% for *P. malariae*, 0% and 2.6% for *P. ovale*. The average AGE was 12.65 µg/ml, and 496.48pg/ml for sRAGE. Highest levels of sRAGE were observed in Fulani (563,07pg/ml, 95% CI [547.81–580.13] vs 465.68pg/ml, 95% CI [331.19–467.51]) for Dogon, $p = 0.00001$. Fulani had the lowest mean of AGE (10.21µg/ml, 95% CI [8.02–10.92]) compared to Dogon (16.88µg/ml, 95% CI [13.92–17.96]); $p = 0.00001$. RAGE was more expressed in Dogon than Fulani (0.08 vs 0.04), $P = 0.08$. The -374A polymorphism was more frequent in Fulani (32%) compared to Dogon (20%). The chronic exposure to dietary AGE could lead to immune responses impairment and polymorphism with implications in malaria susceptibility. More studies are necessary to better investigate this hypothesis.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

1. Background

The role of diet-derived metabolites on the innate immune system as well as on the adaptive immune response has been established [1,2]. Recent papers published have documented the evident role of diet-derived metabolites in the development of lymphoid organs and the modulation of immune system [3], highlighting the interplay between the immune system and the external environment, specifically the diet. The presence of receptors for the nutrients-derivatives on the immune cells support strongly this interplay between the environment and immune system modulation [1,3,4].

The clinical outcome of the current episode and the susceptibility to the subsequent episodes are determined by the modulation of the immune response induced by the current malaria episode [5,6]. One of the new research areas of great interest on malaria could be the global approach combining both the environmental factors, host lifestyle, gut microbiota and immune system modulation. Investigating the interaction between these environmental, anthropological and biological factors could contribute in the understanding of malaria susceptibility. There are several data supporting the role of the gut microbiota and some nutrient-derived metabolites in the development and the modulation of immune system, and the susceptibility to malaria [3,7]. But there are lack of data on the role of metabolism in the susceptibility to malaria.

Several studies conducted in sympatric Fulani and Dogon from Mali and Fulani and Mossi from Burkina Faso have described differences of susceptibility to malaria [8–10]. Data available from these populations do not provide sufficient information to well elucidate the role of biological and environmental factors in the mechanisms underlying this difference of susceptibility [11–17]. These two ethnic groups live in the same malaria endemic areas. One of the main differences between these populations is the life style. There is evidence that the nutritional status and the metabolism of the host are critical in the clinical outcome of malaria infection [18–22] due to the modulation of the immune responses and oxidative stress [23,24].

Data published have documented the implication of diet-derived advanced glycation endproducts (AGEs) in the pathogenesis of chronic and inflammatory diseases [25,26] and the susceptibility to bacterial infections [27,28]. Recent studies have described the role of dietary AGE in the modulation of innate and adaptive immune responses as consequences of the interaction of AGEs with their specific cell receptors (Receptors for AGE: RAGE). The RAGEs are present on the immune cells and constitute a direct interplay between diet and immune system cells [1]. Despite the documented implication of AGE-RAGE axis signaling way in the modulation of immune responses types Th1/Th2 balance leading to chronic Th1 response and oxidative stress, there are lack of data on the role of AGE in malaria susceptibility.

Dietary AGEs are the AGEs present in food. The quantity of AGEs in food depends on the cooking method and it increases proportionally with the temperature and the time of cooking. Populations who have well-cooked food as main feeding lifestyle (most of African population) are more exposed to AGE than those who have less or none cooked food (Fulani ethnic group in west Africa have milk and cuscus as main food). A possible role of AGE-RAGE interaction and RAGE gene polymorphism has been hypothesized in the difference of susceptibility to malaria between Fulani and Dogon [29].

This study aimed to evaluate the relation between malaria, AGE, RAGE expression and RAGE gene polymorphism in two sympatric populations with known difference of susceptibility to malaria in Mali.

2. Methods

2.1. Data collection

Data were collected from healthy participants during two cross-sectional surveys in July and September 2011. These data included PBMC, plasma and sociodemographic data. Individuals of all age groups were included after obtaining their informed consent. Participant were selected from two ethnic groups based on voluntarism. The selection of these two ethnic groups as study population is based on previous data published describing differences of susceptibility to malaria in these ethnic groups [8–10]. As this was a pilot study to determine baseline data on AGE and RAGE in this population, a minimal sample size was not calculated.

2.1. Ethical clearance and subjects

The study protocol was approved by the ethic committee of Mali “Comte d’éthique de la FMPOS, approval letter reference: No 2011-59-/FMPOS”. All the participants have signed informed consent forms, for the minors, the parent of legal tutor signed the consent after their assent have been obtained. Samples were collected by cross-sectional surveys in the Fulani and Dogon ethnic groups of Mali from July to September 2011. In total 222 individuals (68 Fulani and 154 Dogon) were included in this study.

2.2. Determination of molecular prevalence of Plasmodium species by qPCR

Prevalence of *Plasmodium falciparum*, *malariae*, *ovale* and *vivax* was determined by quantitative real time PCR using the following specific primers: 5' AGTGTGTATCAATCGAGTTTT C3' (forward), 5' AGTCCCCTAGAAATAGTTACA3' (revers) for *P. falciparum*, 5' ATCTCTT TTGCTATTTTTTAGTATTGGAGA3' (forward), 5' CCAAAGACTTTGATTTCTCAT3' (revers) for *P. ovale*, 5' ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC3' (forward), 5' AAAATTCCC ATGCATAAAAAATTATACAAA3' (revers) for *P. malariae*; 5' CGCTTCTAGCTTAATCCACA TAACTGATAC3' (forward), 5' ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCTTA 3' (revers) for *P. vivax*.

2.3. Determination of plasma AGE by ELISA

OxiSelect™ Advanced Glycation End Product (AGE) Competitive ELISA Kit (STA-817-5) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, the Plate was coated with 100 µl of AGE conjugate in each well and incubated overnight at 4°C. The plate is then washed twice with the 1X PBS and blocked with 200 µl of the assay diluent in each well and stored at 4°C until use. A standard is prepared with serial dilutions of AGE-BSA. After washing the plate with 1X buffer, 50 µl of the standard or the sample are added to wells in duplicate and incubated at room temperature for 10 minutes on orbital microplate shaker. After incubation, 50 µl of diluted anti-AGE antibody were added in each well and incubated at room temperature for 1 hour on orbital shaker. The plate was washed three times with 250 µl per well of 1X wash buffer and the diluted secondary antibody-HRP conjugate was added at the quantity of 100 µl per well then incubated for 1 hour at room temperature on orbital shaker. After the last washing, the substrate solution was added at the quantity of 100 µl in each well and the reaction was stopped 2–20 mins after with 100 µl of the stop solution. The absorbance was read with the microplate reader at 450 nm as primary wave length and 620 as reference. Concentrations of AGE in samples were calculated with the equation of the standard curve. The test was validated if the coefficient R^2 was > 0.98 .

2.4. Determination of plasma sRAGE by ELISA

The quantification of plasma sRAGE was made using the ELISA kit (*RD191116200R, sRAGE Human, BioVendor*). The standard, control or sample were added at the quantity of 100 µl per well and incubate for 2 hours at room temperature on orbital microplate shaker. The plate was washed 5 times with 350ml of wash solution, 100 µl of biotin labelled antibody solution were added into each well and incubate for 1 hour at room temperature on orbital microplate shaker. After a second wash of the plate, 100 µl of Streptavidin-HRP conjugate were added into each well then incubated for 30 minutes at room temperature on orbital microplate shaker. After the last washing, the substrate solution was added at the quantity of 100 µl in each well and the reaction was stopped 2–20 minutes after with 100 µl of the stop solution. Absorbance was immediately read with the microplate reader at 450 nm as primary wave length. The quality controls high and low were included in each reaction. Concentrations of AGE in samples were calculated with the equation of the standard curve. The test was validated if the coefficient R² was > 0.98.

2.5. RAGE expression assay by RT-qPCR

Total RNA extraction and reverse transcription. The total RNA was extracted from human lymphocytes frozen in nitrogen using *mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ref. AM1560, Ambion)*. Briefly, after rapid thaw of lymphocytes 300–600 µl of the Lysis/Binding Solution were added to disrupt the cells. The cells lysate was vortexed until a homogenous lysate was obtained. The organic extraction consisted to add miRNA Homogenate Additive at 1:10 volume of to the cell lysate, and mixed well by vortexing then left the mixture on ice for 10 min. Acid-Phenol:Chloroform was added to the mixture and vortexed for 1 minute then centrifuged for 5 min at 10,000 x g at room temperature to separate the aqueous and organic phases. The aqueous (upper) phase was transferred into a fresh tube. The 100% ethanol was added at 1.25 volumes to the aqueous phase and 700 µl of the mixture were transferred on to the Filter Cartridge. Centrifugation was made for 15 seconds at 10,000 X g to pass the mixture through the filter. The filter was washed once with 700 µL miRNA Wash Solution 1, then twice with 500 µL of Wash Solution 2/3. RNA was eluted with 100 µl of Elution Solution preheated at 95°C in Nuclease-free tubes and stored at -20°C. The quantity and the quality of RNA at 260/280 and 260/230 were determined by the spectrophotometer *NanoDrop 1000*.

Total RNA was reverse transcribed in to cDNA using the *High-Capacity cDNA Archive Kit (Ref. 4374966, Life Technologies)* according to the manufacturer's instructions. Reaction was done with 50 µl of 2X RT master mix (containing 10X Reverse Transcription Buffer, 25X dNTPs, 10X random primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase, Nuclease-free H₂O) and 50 µL of RNA sample into each wells. Reaction conditions were 25°C for 10 minutes, 37°C for 120 minutes, then stored at -20°C until use.

Real-time quantitative PCR assay. The primers used for the PCR were:

Forward—5' CAGGACCCTGGAAGGAAGCAGG3' and Reverse -5' CTGGTTGTAGAAGAAA GCTTGCC3'. HSPCB was used as reference gene to normalize the PCR. The PCR conditions were as follows: pre-incubation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 55°C for 20 s, 72°C for 30, and ending by 72°C for 10 min. PCR was performed with the Light Cycler. The Δ CT method was used to calculate the gene expression.

2.6. RAGE gene polymorphism assay

The mutation -374/AT, -429T/C and -69pb deletion/insertion were assessed by RFLP. A fragment of 503pb was amplified by real-time PCR. The primers used were AGERF 5' - GGG GCA GTT CTC TCC TCA-3' and AGERR: 5' -TCG TCT TGT CAC AGG GAA TG-3'

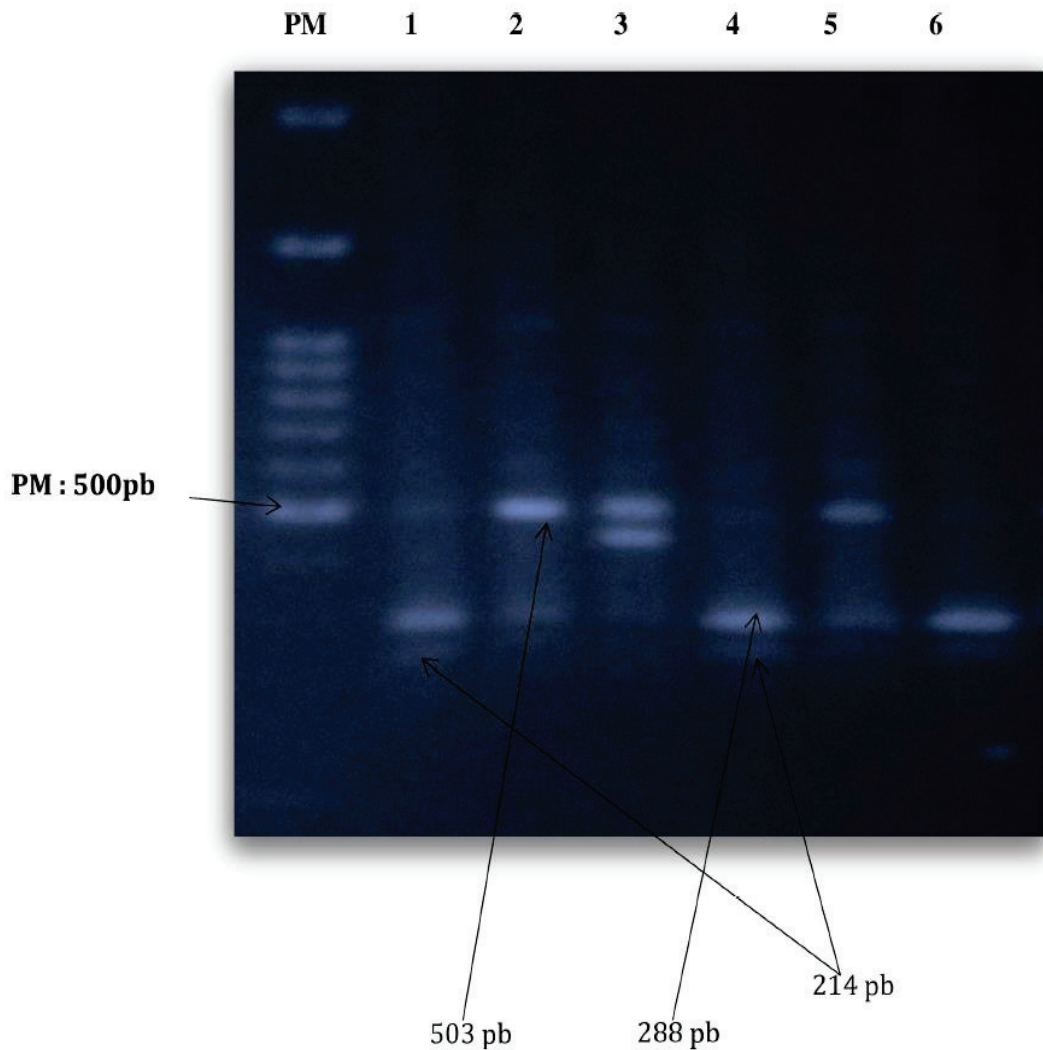


Fig 1. Digestion of PCR product with MfeI showing -374T mutation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189724.g001>

as previously described in literature [30]. PCR conditions were 95°C for 10 mn, followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 20 s, 72°C for 30 s and a final elongation of 72°C for 10 mns. The PCR products (503 pb) were then digested with MunI (MfeI) and AluI (10µl of PCR product + 1 µl of enzyme + 2 µl of buffer and 18 µl of water) at 37°C for 15 hours in a thermocycler. Digested product (7 µl + 3 µl of loading buffer) were loaded on 1% agar's gel and migrated for 1 h at 100 volts. Digestion with MfeI revealed fragments 214 and 288 bp for the allele 374A and 503 bp for the mutated allele 374T (Fig 1).

2.7. Statistical analysis

Data were analyzed on SPSS, the t-test, ANOVAs (in normal distribution cases), the test for equality of variances (F) and Bonferrony were used for comparison at significance of 0.05. The first step was to determine the prevalence of Plasmodium infection in Fulani and Dogon. We determined the difference of exposure to AGE of Fulani and Dogon by measuring plasma

Table 1. Molecular prevalence of *Plasmodium* species in Fulani and Dogon.

<i>Plasmodium</i> species	Ethnic group		Total
	Fulani	Dogon	
<i>P. falciparum</i>	29/68 (42.64%)	79/154 (51.30%)	108/222 (48.6%)
<i>P. malariae</i>	4/68 (5.88%)	10/154 (6.5%)	14/222 (6.3%)
<i>P. ovale</i>	0	4/154 (2.6%)	4/222 (1.8%)
Total	33/68 (48.53%)	93/154 (60.39%)	126/222 (54.95%)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189724.t001>

levels of AGE, sRAGE. We then determined the expression of the receptor for AGE (RAGE) and finally we evaluated the relationship between RAGE gene polymorphism and RAGE expression.

3. Results

In total 222 volunteers were included in this study. The mean age was 34 years with 3 and 88 years respectively as minimum and maximum. The gender balance was 119/103 (M/F).

The prevalence rate of *Plasmodium* in the Fulani and Dogon were respectively 42.64% and 51.30% for *P. falciparum* ($P > 0.05$), 5.88% and 6.5% for *P. malariae* ($P > 0.05$), 0% and 2.6% for *P. ovale* (Table 1), with 6.1% of mixed infection by Pf+Pm (4.76%), Pf+Po (0.87%) and Pm+Po (0.47%) (Fig 2). No case of *P. vivax* was formally detected in the study population.

The average AGE in the study population was 12.65 µg / ml, and 496.48 pg / ml for sRAGE. In Fulani, the mean of AGE was 10.21 µg / µl (95% CI [8.02–10.92]) (Fig 3). The mean of sRAGE receptor was 563,07pg/µl, (95% CI [547.81–580.13]). In Dogon, the mean of AGE was

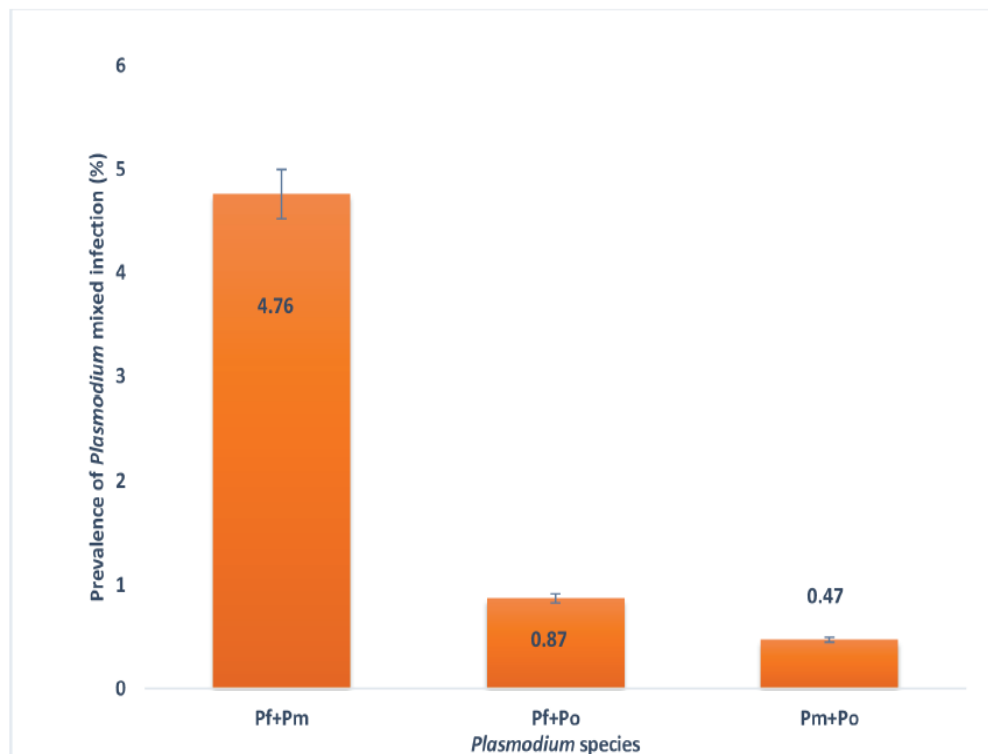


Fig 2. Distribution of mixed infection of Plasmodium in study population.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189724.g002>

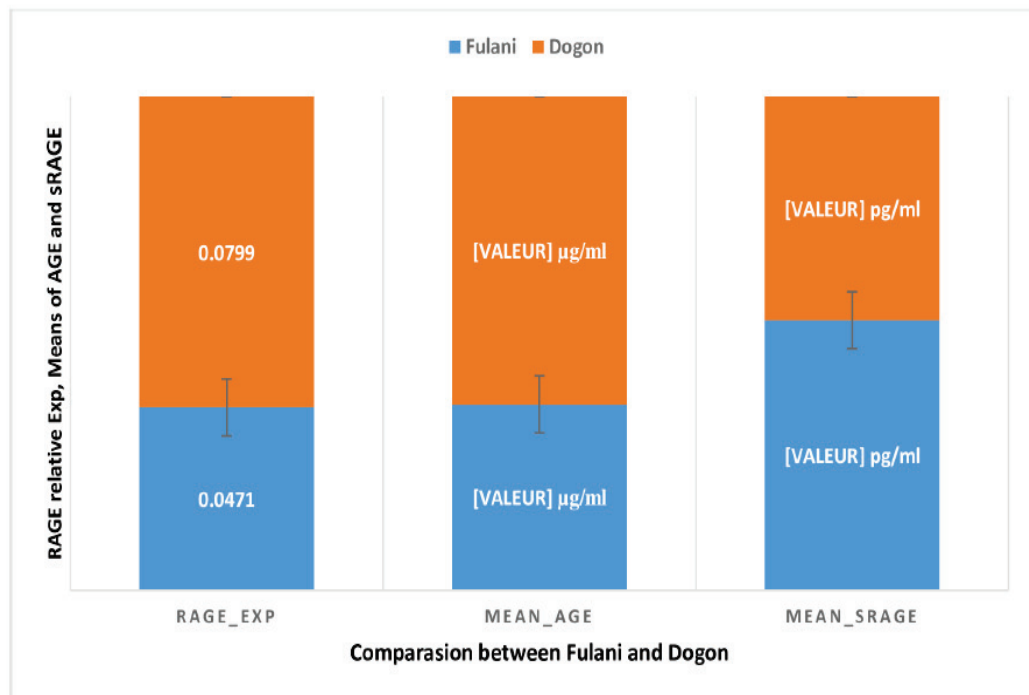


Fig 3. RAGE gene expression, means of AGE and sRAGE in Fulani and Dogon.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189724.g003>

16.88 µg/µl, (95% CI [13.92 to 17.96]) (Fig 3). The mean of sRAGE was 465.68 pg/µl, (95% CI [331.19 to 467.51]).

The Fulani ethnic group had the lowest plasma levels of AGE compared to Dogon (10.21 µg/ml +/- 7.81 vs 16.88 µg/ml +/- 11.85, $p < 0.001$) (Fig 3) and the highest levels of sRAGE (563.07 pg/ml vs 465.68 pg/ml, $p < 0.001$) (Fig 3). RAGE was more expressed at two fold in Dogon, compared to Fulani (0.0799 vs 0.0471) but not statistically significant ($p = 0.08$) (Fig 3).

Considering the age group of participant, RAGE was more expressed in children at 6–10 years old (Fig 4).

The mean of AGE was decreasing in Dogon children until the age group of 10 years then remained stable in adults, while in Fulani it decreased until the age group of 15 years then was increasing in adults (Fig 5).

The mean of sRAGE was increasing proportionally with age until 10 years and remained stable in adults of Dogon ethnic group while in Fulani it decreased in children until the age group of 15 years and then increased with age (Fig 6).

High frequencies of the mutated allele -374T were observed in the population (44.28%) with 52.5% in Fulani and 33.3% in Dogon; $P < 0.01$ (Table 2). The -374T mutation was more prevalent in female (58.1%) compared to male (33.3%) (Table 2) and the prevalence of *P. falciparum* infection was high in population without mutation (70% vs 30%) (Table 2). The means of AGE and sRAGE were slightly high in the group without the -374 mutation (Table 2), but not statistically significant.

4. Discussions

Samples used in this study have been collected from clinically healthy participants living in malaria endemic area. Samples were collected during the malaria transmission period (from

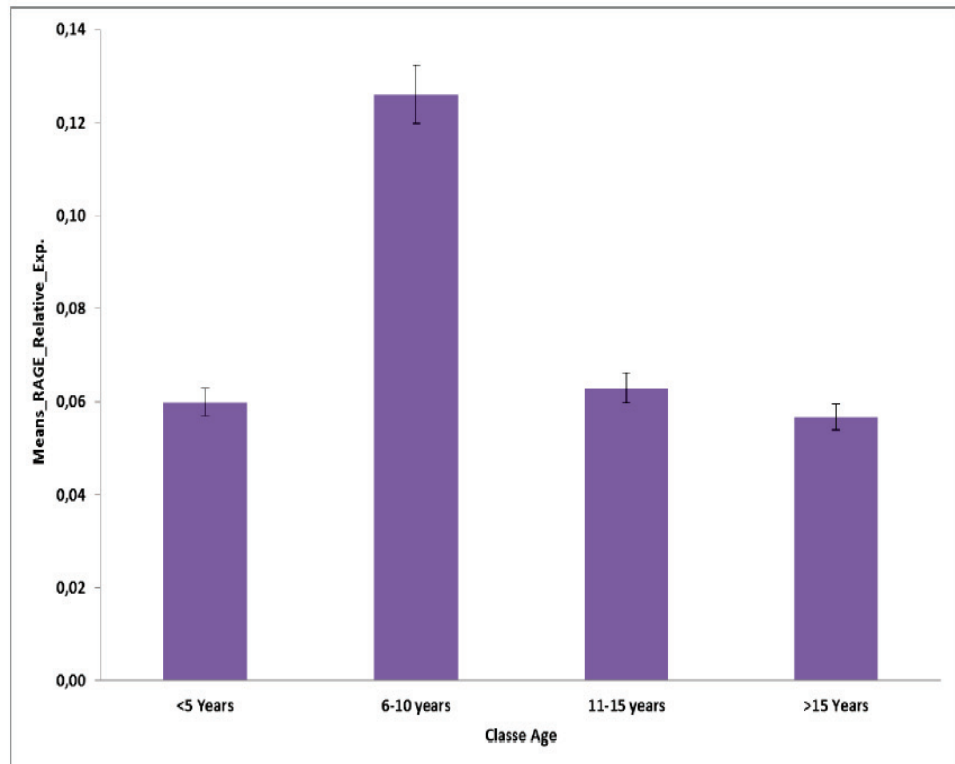


Fig 4. RAGE relative expression by age groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189724.g004>

July to September) in cross-sectional surveys. This was a pilot study because none study had yet investigated advanced glycation endproducts in African populations. In this study, we did not assay the other metabolic disorders like diabetes, obesity, as well as the systemic cholesterol and triglyceride levels. This could be a potential limitation of this study.

Two ethno linguistic groups (Fulani and Dogon) living in sympatric have participated to the study. These populations are naturally exposed to the same environmental factors but exhibit different susceptibility to clinical malaria [8,9]. However, the molecular based prevalence of malaria infection determined in our study did not found statistical significant difference between Fulani and Dogon.

The lowest rate of AGE were described in Fulani populations compared to their neighbours Dogon ($p < 0.001$). Fulani and Dogon have different lifestyles, mainly in the diet habits. Fulani are pastoral populations with milk and couscous as main food. Milk and couscous contain very low concentration of AGE [31]. The persistence of the lactase in these populations (>50%) [32] could suggest that they continuously consume milk during their life. The contribution of AGE consumed in food is important in the systemic total AGE [31,33–37]. Exposure to low AGE diet could hence lead to a reduced level of AGE in plasma. The highest plasma levels of AGE were described in Dogon populations. With a diet based mainly on cooked food (at least 3 cooked meals /day), they are more exposed to diet AGE compared to Fulani. The opposite was observed in systemic levels of sRAGE. While Fulani had the higher levels of sRAGE, Dogon exhibited the lowest levels ($p < 0.001$). Several authors have described this soluble form of RAGE as a receptor that plays a decoy role on systemic AGE [38,39]. Our data suggest that the low plasma levels of AGE described in Fulani are due to exposure to a low diet AGE, but

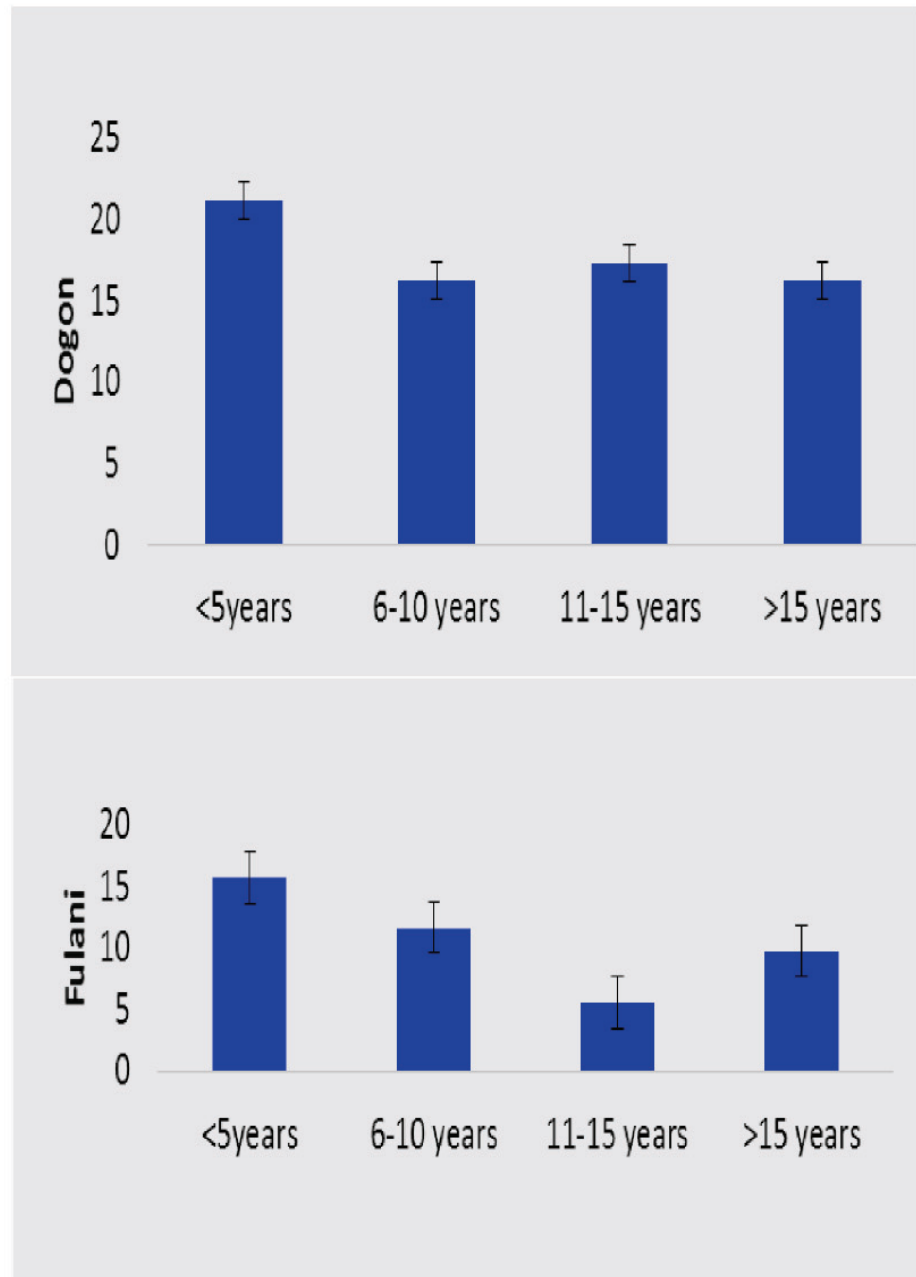


Fig 5. Distribution of the mean of AGE by age groups in Fulani and Dogon.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189724.g005>

also to their capacity to eliminate AGE. However, we did not investigate any functional role of sRAGE in this study.

The overall levels of sRAGE in the study participants were lower compared to these described in non-African populations by other authors [40]. In contrast, the AGE levels were significantly high in Africans. The differences in diet habits could explain these contrasting data. However, the role of other environmental factors related to pollution, infectious diseases should be taken into account.

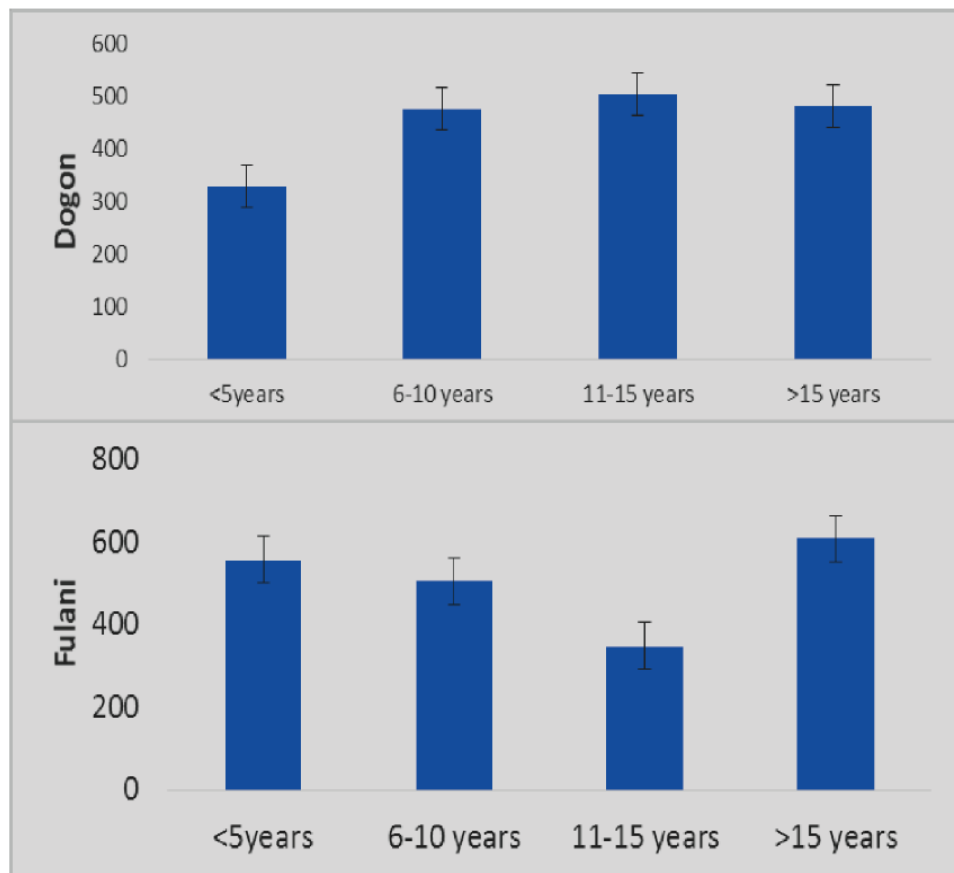


Fig 6. Distribution of the mean of sRAGE by age groups in Fulani and Dogon.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189724.g006>

None differences were observed between age groups or gender for AGE and sRAGE. The influence of dietary AGE on the expression of RAGE on the immune cells has been described [1]. We investigated the expression of RAGE on lymphocytes in these two populations. RAGE was two-fold more expressed in Dogon compared to Fulani, but there was no

Table 2. Prevalence of -374T mutation by ethnic group, sex and *P. falciparum* infection in the study population.

		-374T Mutation		Total
		+	-	
Ethnic group	Fulani	52.5% (21)	47.5% (19)	40
	Dogon	33.3% (10)	66.7% (20)	30
Sex	Male	33.3% (13)	66.7% (26)	39
	Female	58.1% (18)	41.9% (13)	31
<i>P. falciparum</i>	+	30% (9)	70% (21)	30
	-	55% (22)	45% (18)	40
Mean RAGE expression		0.053 (95% CI [0.029–0.077])	0.064 (95% CI [0.007–0.122])	0.059
Mean AGE		9.538	11.587	10.680
Mean sRAGE		536.50	567.12	553.57
Total		44.3% (31)	55.7% (39)	100% (70)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189724.t002>

statistical difference between the two ethnic groups ($p = 0,08$). The lack of power of the study could explain the no statistical difference. This study was conducted in non-symptomatic participant. Performing such analysis in patients with clinical malaria could provide better understanding of the expression of RAGE in these populations. More studies with large sample sizes may be necessary to better investigate the relation between RAGE expression and susceptibility to malaria. However, we did not explore the variants of the RAGE expressed in these populations.

Recruitment of RAGE by AGE leads to a positive feedback loop with auto amplification of RAGE and endogenous generation of AGE, reactive oxygen species (ROS) and advanced oxidation protein end products (AOPP) [2]. This vicious circle leads to chronic oxidative stress and inflammation with impaired innate and adaptive immune responses. The role of diet intake AGE on the innate immunity [1,2] as well as on the adaptive immune response has been established [2]. The presence of RAGE on the immune cells constitutes a link between the environment and immune modulation [1]. Martinez et al., Zoelen et al. have described a positive association between impairment of CD4 T cell response, high plasma levels of AGE and susceptibility of diabetic patients to bacterial infections [27,41]. In experimental animal studies, administration of sRAGE improved survival from sepsis by reducing inflammation and organs injury [39,42]. A positive correlation between plasma level of advanced oxidative proteins products and malaria susceptibility has been also described in children under 2 years [43]. Some polymorphisms of the RAGE promoter gene (374 T/A) are thought to be associated with susceptibility to Human Papilloma virus infection [44], as well as with longevity in elder population. These polymorphisms could be involved in immunity genes expression [4,45].

There are many data supporting ethnic differences in susceptibility to malaria between Fulani and Dogon in Mali [8,9,46]. Enhanced pro inflammatory response has been described in Fulani while in Dogon there was altered innate immune response during malaria infection [9]. The biological factors and mechanisms underlying this difference of immune responses remain not understood. The role of diet in the susceptibility to malaria could be an alternative approach to elucidate the mechanism. Recent papers published have documented the evident role of nutrient-derived metabolites in the development lymphoid organs and the modulation of immune system [3], highlighting the interplay between the immune system and the external environment and specifically the diet. A chronic exposure to diet AGE induces a chronic inflammatory immune response. Repeated stimulation by the same ligand could result in to deregulation of the feedback control [47] and/or exhausted immune cells. Therefore, the inadequate innate immune response observed during malaria infection in Dogon could be a consequence of immune tolerance or degraded immune effectors. The difference of susceptibility to malaria could also be a result of evolutionary process by selecting some mutated allele (374 T) involved in susceptibility/resistance to malaria in these populations. In our study, the mutated allele 374/T of RAGE gene was more frequent in Fulani (52.5%) compared to Dogon (33.3%), ($P < 0.001$). The prevalence of *P. falciparum* infection was higher in wild type population compared to the mutated allele population (70% vs 30%, $P < 0.001$).

This mutation has been described as involved in RAGE expression regulation, and could be also involved in the expression of other gene of immunity [48]. In this study, we described a difference but no statistically significant in RAGE expression between wild type and mutated -374T allele population (Table 2). We did not assess the direct implication of these polymorphisms in the natural resistance to malaria observed in this population, but we suggest more studies in these populations to more investigate a possible association of -374T mutation and malaria susceptibility.

The previous described differences of susceptibility in these populations were related to clinical malaria and spleen enlargement. We did not evaluate the clinical incidence of malaria

in this study due to the initial design. But the differences observed in AGE/sRAGE rates and RAGE expression could constitute a good background to design a study to determine the relation between AGE/RAGE and susceptibility to clinical malaria.

The role of PCSK9 mutation (a human cholesterol regulation mutation) has been described in malaria susceptibility. Investigating the role of polymorphism on metabolism regulatory genes could provide valuable information on malaria susceptibility. Multifactor approaches including genetics, immunology, diet, metabolism, and microbiota are also crucial for studies on susceptibility or resistance to malaria in endemic areas.

5. Conclusion

Environment factors like diet could play a crucial role in the evolutionary processes leading to the difference of susceptibility/resistance to infectious disease in general and to malaria in particular. A multifactor approach including diet and others environmental and biological factors could provide new insights in our understanding of susceptibility or resistance to malaria in endemic areas. This study is a pilot study that investigated the relation between diet and susceptibility to malaria. There are some limitations for this study due to the none-exploration of other metabolic factors (cholesterol, triglycerides, and diabetes status) and the immune response of PBMCs. In next studies involving malaria clinical cases, these factors could be included to better investigate the relation between AGE-RAGE-immunity and susceptibility to malaria.

Supporting information

S1 File. Data_Base_KT.sav.
(SAV)

Author Contributions

Conceptualization: Karim Traore, Ogobara K. Doumbo, Stephane Picot.

Data curation: Karim Traore.

Formal analysis: Karim Traore, Charles Arama.

Funding acquisition: Mahamadou A. Thera, Ogobara K. Doumbo, Stephane Picot.

Investigation: Karim Traore, Guillaume Bonnot, Adeline Lavoignat.

Methodology: Karim Traore, Guillaume Bonnot, Adeline Lavoignat, Ogobara K. Doumbo, Stephane Picot.

Project administration: Ogobara K. Doumbo, Stephane Picot.

Supervision: Mahamadou A. Thera, Ogobara K. Doumbo.

Validation: Ogobara K. Doumbo, Stephane Picot.

Writing – original draft: Karim Traore, Charles Arama.

Writing – review & editing: Karim Traore, Mahamadou A. Thera, Anne-Lise Bienvenu, Charles Arama, Ogobara K. Doumbo, Stephane Picot.

References

1. Akirav EM, Preston-Hurlburt P, Garyu J, Henegariu O, Clynes R, Schmidt AM, et al. RAGE Expression in Human T Cells: A Link between Environmental Factors and Adaptive Immune Responses. *PLoS ONE*. 2012; 7: e34698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034698> PMID: 22509345

2. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2014; 2: 411–429. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.016> PMID: 24624331
3. Veldhoen M, Ferreira C. Influence of nutrient-derived metabolites on lymphocyte immunity. *Nat Med.* 2015; 21: 709–718. <https://doi.org/10.1038/nm.3894> PMID: 26121194
4. González I, Romero J, Rodríguez BL, Pérez-Castro R, Rojas A. The immunobiology of the receptor of advanced glycation end-products: trends and challenges. *Immunobiology.* 2013; 218: 790–797. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.09.005> PMID: 23182709
5. Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 171–192. <https://doi.org/10.1086/432519> PMID: 16001361
6. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J.* 2006; 5: 85. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-85> PMID: 17029647
7. Yilmaz B, Portugal S, Tran TM, Gozzelino R, Ramos S, Gomes J, et al. Gut Microbiota Elicits a Protective Immune Response against Malaria Transmission. *Cell.* 2014; 159: 1277–1289. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.053> PMID: 25480293
8. Dolo A, Modiano D, Maiga B, Daou M, Dolo G, Guindo H, et al. Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 72: 243–248. PMID: 15772314
9. Arama C, Maiga B, Dolo A, Kouriba B, Traoré B, Crompton PD, et al. Ethnic differences in susceptibility to malaria: What have we learned from immuno-epidemiological studies in West Africa? *Acta Trop.* 2015; 146: 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.023> PMID: 25820030
10. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M. Bench-to bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care Lond Engl.* 2006; 10: 233.
11. Israelsson E, Maiga B, Kearsley S, Dolo A, Homann MV, Doumbo OK, et al. Cytokine gene haplotypes with a potential effect on susceptibility to malaria in sympatric ethnic groups in Mali. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2011; 11: 1608–1615.
12. Israelsson E, Vafa M, Maiga B, Lysén A, Iriemenam NC, Dolo A, et al. Differences in Fcγ receptor IIa genotypes and IgG subclass pattern of anti-malarial antibodies between sympatric ethnic groups in Mali. *Malar J.* 2008; 7: 175. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-175> PMID: 18793404
13. Israelsson E, Ekström M, Nasr A, Dolo A, Kearsley S, Arambepola G, et al. Marked differences in CRP genotype frequencies between the Fulani and sympatric ethnic groups in Africa. *Malar J.* 2009; 8: 136. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-136> PMID: 19545442
14. Farouk SE, Dolo A, Bereczky S, Kouriba B, Maiga B, Fämert A, et al. Different antibody- and cytokine-mediated responses to *Plasmodium falciparum* parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. *Microbes Infect.* 2005; 7: 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.09.012> PMID: 15716067
15. Perdijk O, Arama C, Giusti P, Maiga B, Troye-Blomberg M, Dolo A, et al. Haptoglobin phenotype prevalence and cytokine profiles during *Plasmodium falciparum* infection in Dogon and Fulani ethnic groups living in Mali. *Malar J.* 2013; 12: 432. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-432> PMID: 24274254
16. Maiga B, Dolo A, Touré O, Dara V, Tapily A, Campino S, et al. Fc gamma receptor IIa-H131R polymorphism and malaria susceptibility in sympatric ethnic groups, Fulani and Dogon of Mali. *Scand J Immunol.* 2014; 79: 43–50. <https://doi.org/10.1111/sji.12122> PMID: 24117665
17. Dolo A, Coulibaly M, Maiga B, Daou M, Arama C, Troye-Blomberg M, et al. [Humoral immune anti-*Plasmodium falciparum* AMA1 and MSP1 response in two ethnic groups living in sympatry in Mali]. *Bull Société Pathol Exot* 1990. 2012; 105: 364–369.
18. Cornet S, Bichet C, Lacombe S, Faivre B, Sorci G. Impact of host nutritional status on infection dynamics and parasite virulence in a bird-malaria system. *J Anim Ecol.* 2014; 83: 256–265. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12113> PMID: 23926945
19. Carter LM, Kafsack BFC, Llinas M, Mideo N, Pollitt LC, Reece SE. Stress and sex in malaria parasites: Why does commitment vary? *Evol Med Public Health.* 2013; 2013: 135–147. <https://doi.org/10.1093/emph/eot111> PMID: 24481194
20. Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 163–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.09.011> PMID: 15037104
21. Golenser J, Chevion M. Oxidant stress and malaria: host-parasite interrelationships in normal and abnormal erythrocytes. *Semin Hematol.* 1989; 26: 313–325. PMID: 2683100
22. Hunt NH, Stocker R. Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells.* 1990; 16: 499–526; discussion 527–530. PMID: 2257324

23. Isah MB, Ibrahim MA. The role of antioxidants treatment on the pathogenesis of malarial infections: a review. *Parasitol Res.* 2014; 113: 801–809. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3804-1> PMID: [24525759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24525759/)
24. Ibrahim MA, Isah MB, Okafor AI, Bashir M, Bisalla M, Umar IA. Effects of combined administration of vitamins C and E on some Plasmodium berghei-induced pathological changes and oxidative stress in mice. *Comp Clin Pathol.* 2012; 21: 1677–1682.
25. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.* 2001; 44: 129–146. <https://doi.org/10.1007/s001250051591> PMID: [11270668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11270668/)
26. Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Role of advanced glycosylation products in complications of diabetes. *Diabetes Care.* 1988; 11 Suppl 1: 73–79.
27. Martinez PJ, Mathews C, Actor JK, Hwang S- A, Brown EL, De Santiago HK, et al. Impaired CD4+ and T-helper 17 cell memory response to Streptococcus pneumoniae is associated with elevated glucose and percent glycated hemoglobin A1c in Mexican Americans with type 2 diabetes mellitus. *Transl Res.* 2014; 163: 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.07.005> PMID: [23927943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23927943/)
28. Christaki E, Lazaridis N, Opal SM. Receptor for advanced glycation end products in bacterial infection: is there a role for immune modulation of receptor for advanced glycation end products in the treatment of sepsis? *Curr Opin Infect Dis.* 2012; 25: 304–311. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283519b82> PMID: [22327468](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22327468/)
29. Traoré K, Arama C, Médebielle M, Doumbo O, Picot S. Do advanced glycation end-products play a role in malaria susceptibility? *Parasite.* 2016; 23: 15. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016015> PMID: [27012162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27012162/)
30. Peng WH, Lu L, Wang LJ, Yan XX, Chen QJ, Zhang Q, et al. RAGE gene polymorphisms are associated with circulating levels of endogenous secretory RAGE but not with coronary artery disease in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res.* 2009; 40: 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2009.06.008> PMID: [19766904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19766904/)
31. Schlienger J-L, Gautier M, Gutmann A, Kremer F. Produits terminaux de la glycation (AGE) alimentaires et pathologie métabolique. *Médecine Mal Métaboliques.* 2010; 4: 653–659.
32. Lokki AI, Järvelä I, Israelsson E, Maiga B, Troye-Blomberg M, Dolo A, et al. Lactase persistence genotypes and malaria susceptibility in Fulani of Mali. *Malar J.* 2011; 10: 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-9> PMID: [21235777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21235777/)
33. Goldberg T, Cai W, Peppia M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.* 2004; 104: 1287–1291. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2004.05.214> PMID: [15281050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15281050/)
34. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *J Am Diet Assoc.* 2010; 110: 911–916. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.03.018> PMID: [20497781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20497781/)
35. Uribarri J, Cai W, Peppia M, Goodman S, Ferrucci L, Striker G, et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007; 62: 427–433. PMID: [17452738](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17452738/)
36. Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppia M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1043: 461–466. <https://doi.org/10.1196/annals.1333.052> PMID: [16037267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16037267/)
37. Koschinsky T, He C- J, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buening C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94: 6474–6479. PMID: [9177242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9177242/)
38. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: Therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79: 1379–1386. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.01.013> PMID: [20096667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20096667/)
39. Van Zoelen MAD, Achouiti A, van der Poll T. RAGE during infectious diseases. *Front Biosci Sch Ed.* 2011; 3: 1119–1132.
40. Hudson BI, Dong C, Gardener H, Elkind MSV, Wright CB, Goldberg R, et al. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end-products and metabolic syndrome: The Northern Manhattan Study. *Metabolism.* 2014; 63: 1125–1130. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.05.011> PMID: [25012910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25012910/)
41. Van Zoelen MAD, Schouten M, de Vos AF, Florquin S, Meijers JCM, Nawroth PP, et al. The receptor for advanced glycation end products impairs host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2009; 182: 4349–4356.

42. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response—the evidence mounts. *J Leukoc Biol.* 2009; 86: 505–512. <https://doi.org/10.1189/jlb.0409230> PMID: 19477910
43. Zhang G, Skorokhod OA, Khoo S-K, Aguilar R, Wiertsema S, Nhabomba AJ, et al. Plasma advanced oxidative protein products are associated with anti-oxidative stress pathway genes and malaria in a longitudinal cohort. *Malar J.* 2014; 13: 134. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-134> PMID: 24693973
44. Xu Q, Xue F, Yuan B, Zhang L, Li J, He Z. The interaction between RAGE gene polymorphisms and HPV infection in determining the susceptibility of cervical cancer in a Chinese population. *Cancer Biomark Sect Dis Markers.* 2012; 11: 147–153.
45. Falcone C, Bozzini S, Colonna A, Matrone B, Paganini EM, Falcone R, et al. Possible role of -374T/A polymorphism of RAGE gene in longevity. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 23203–23211. <https://doi.org/10.3390/ijms141123203> PMID: 24284407
46. Arama C, Giusti P, Boström S, Dara V, Traore B, Dolo A, et al. Interethnic Differences in Antigen-Presenting Cell Activation and TLR Responses in Malian Children during *Plasmodium falciparum* Malaria. Dieli F, editor. *PLoS ONE.* 2011; 6: e18319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018319> PMID: 21483827
47. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 826–837. <https://doi.org/10.1038/nri2873> PMID: 21088683
48. Yang L, Wu Q, Li Y, Fan X, Hao Y, Sun H, et al. Association of the Receptor for Advanced Glycation End Products Gene Polymorphisms and Circulating RAGE Levels with Diabetic Retinopathy in the Chinese Population. *J Diabetes Res.* 2013; 2013: 1–8.

V. DISCUSSION GENERALE

Dans ce travail, nous avons fait une approche plus globale de la susceptibilité au paludisme en tentant d'expliquer les traits biologiques par les faits culturels et anthropologiques et vice versa (approche athropobiologique).

1. Sur le plan socio anthropologique :

L'étude a concerné au total 231 individus, inclus dans 6 localités différentes avec les conditions éco climatiques et les modes de vies différentes.

L'âge médian dans notre échantillon était de 38 ans avec les extrêmes de 88 ans et 3 ans.

L'échantillon était constitué majoritairement de Dogons et de Peulh, avec quelques Tamashek et Bambara. Cependant, l'analyse a surtout été concentrée sur les différences entre Peulh et Dogon.

L'activité principale des Dogon est l'agropastoralisme, les femmes sont des ménagères. Ils pratiquent l'endogamie/exogamie ethnique. La société est patriarcale, patrilinéaire et patrilocale.

Les Peulh aussi pratiquent l'agropastoralisme mais à prédominance pastorale. Ils pratiquent la monogamie et l'endogamie ethnique. La transmission du nom est patrilinéaire mais celle des biens est mixte. La société est patriarcale et patrilocale.

Ces deux groupes ethniques vivent de façon sympatrique dans le même environnement éco-climatique. Les différences d'activité de subsistances entraînent aussi des différences sur le plan des habitudes alimentaires pouvant avoir des répercussions biologiques.

Nous n'avons pas fait de calcul de taille minimale d'échantillon pour ce travail car notre étude est la première étude qui porte sur ce sujet dans cette population. Donc

elle contribuera à produire des données sous forme d'étude pilote qui pourront servir de base de calcul de taille d'échantillon pour des futures études.

2. Etude des facteurs génétiques érythrocytaires chez les Peulh et les Dogon

Dans le système ABO, la prédominance du phénotype ainsi que les fréquences alléliques O observées dans cette étude confirment les données de la littérature dans laquelle la prédominance du O est déjà largement rapportée en Afrique subsaharienne. La relation entre la résistance naturelle au paludisme et la prédominance du groupe O a été largement décrite au Mali (Rowe JA, et al., 2007).

Les fréquences les plus élevées du phénotype O ont été observées chez les Peulh, dépassant parfois les 70%. Ces Peulh du Mali ont déjà fait l'objet de plusieurs études sur leur faible susceptibilité au paludisme, comparés aux Dogon avec lesquels ils vivent de façon sympatrique. En plus des facteurs érythrocytaires, d'autres mécanismes immunologiques, portant sur les cellules présentatrices d'antigène, les polymorphismes au niveau du gène codant pour certaines cytokines, la persistance de la Lactase ont été aussi évoqué comme étant impliqués dans cette différence de susceptibilité (Arama C et al, 2011 ; Israelsson E et al, 2009 ; Lokki A I et al, 2011).

Dans le système Rh, parmi les phénotypes différents décrits dans notre échantillon, les plus fréquents étaient Dce suivi du DCce. Des fréquences élevées du Dce (phénotype considéré comme rare) sont déjà décrites dans la littérature en Afrique subsaharienne (Chiaroni J, 2003), argumentant ainsi le rôle de la pression de sélection exercée sur cette région par les nombreuses maladies infectieuses. Les Peulh et les Dogon ont montré ici aussi une différence nette dans la distribution de ces phénotypes. Pendant que le phénotype Dce (fréquemment rencontré en Afrique subsaharienne) était le plus fréquent chez les Dogon (62%), c'est le DCce qui était le plus fréquent

chez les Peulh (39,7%), ($P < 10^{-3}$). Sur le plan alléliques, l'haplotype *R0* était le plus dominant aussi bien chez les Dogon que chez les Peulh. Cependant l'haplotype *R1* était observé exclusivement chez les Peulh (0,362). Cet écart des Peulh vis à vis des autres populations sur le plan génétique est déjà décrite (Le Pennec PY, 1989) et pourrait s'expliquer en partie par leur mode d'alliance (l'endogamie ethnique), mais aussi par le phénomène de migration retour (back to Africa) des Peulh. Cependant, cette différence pourrait aussi s'expliquer par un biais de sélection dû à des tailles disproportionnées d'échantillons des deux ethnies ou à la taille de l'échantillon.

Dans le système MNSs, des fréquences élevées de déficit en Glycophorines B (S-s-) ont été observées chez les Peulh (7.4%). Les déficits en Glycophorine B sont décrits comme étant des facteurs de résistance naturelle au paludisme (Pasvol G, et al 1983, Malaria Genomic Epidemiology Network). La présence de ces traits génétiques dans les zones d'endémie palustre pourrait être le résultat d'une pression de sélection naturelle exercée par le paludisme (Malaria Genomic Epidemiology Network). Cependant, ces cas de déficit de Glycophorine B nécessitent une confirmation par techniques moléculaire.

Par rapport au système Duffy, Si les fréquences élevées de Duffy négatif (phénotype *Fy(a-b-)* et l'allèle *FY*O*) observées dans ces populations ne font que confirmer les données existantes sur ce marqueur de résistance naturelle au paludisme à *Plasmodium vivax*, les quelques cas de Duffy positifs observés bien que faibles pourraient constituer un facteur de maintien des endémies palustres à *Plasmodium vivax* dans ces populations comme l'a déjà souligné Menard D et collaborateurs à Madagascar et récemment au Mali par Niangaly A et al. Les Peulh et les Dogon n'ont montré aucune différence dans ce système Duffy.

3. Prévalence des espèces de *Plasmodium* dans la population d'étude

Au cours de notre travail nous avons tout d'abord déterminé la prévalence moléculaire des différentes espèces de *Plasmodium* par la PCR quantitative (qPCR) en utilisant le Light Cycler. La prévalence moléculaire du paludisme infection était de 50,22% avec 48,05% de *P. falciparum* ; 6,49% de *P. malariae* et 1,73% de *P. ovale*. Aucun cas de *P. vivax* n'a été formellement diagnostiqué dans cette étude. Le taux d'infection mixte était de 6,06% (4,76% de *P. falciparum* + *P. malariae*, 0,87% de *P. falciparum* + *P. ovale*, 0,47% de *P. malariae* et *P. ovale*). L'absence de *P. vivax* dans notre population pourrait s'expliquer soit par la prévalence élevée de Duffy négatif dans ces populations, soit par un manque de sensibilité de la méthode utilisée pour cette espèce. Les Dogon avaient les prévalences les plus élevées (60.39%) comparés aux Peulh (48.53%). Les cas de *P. ovale* ont été décrits exclusivement chez les Dogons. Des études antérieures basées sur la microscopie avaient déjà décrit que l'indice plasmodique (IP) et la densité parasitaire étaient significativement plus faibles chez les Peulhs (IP= 15,9%) que chez les Dogons (IP= 20,7%) ; $p < 0,001$. Mais la différence fondamentale entre Peulh et Dogon se situait surtout au niveau des manifestations cliniques du paludisme (Arama C et al, 2011 ; Dolo A et al, 2012). Nous n'avons pas fait une évaluation de la différence interethnique sur le plan du paludisme clinique. Des études supplémentaires combinant les facteurs métaboliques, immunitaires et les présentations cliniques du paludisme permettront de mieux étudier le rôle des dérivés métaboliques alimentaires dans la susceptibilité inter ethnique au paludisme.

4. Etude des produits terminaux de glycation et leurs récepteurs (AGE et RAGE).

Nous avons trouvé des taux plasmatiques élevés d'AGEs chez les Dogon, comparés aux Peulh alors que les taux des sRAGE, supposés jouer un rôle dans l'élimination

des AGEs par effet de compétition étaient plus élevés chez les Peulh. La contribution significative des AGE alimentaires dans les quantités systémiques d'AGE est démontrée. En effet, selon le type de régime alimentaire, le niveau d'exposition aux AGEs peut beaucoup varier (Akirav et al., 2012 ; Goldberg T et al, 2004 ; Koschinsky T et al, 1997 ; Schlienger JL et al, 2010 ; Uribarri J et al, 2007, Uribarri et al, 2005). Les aliments longuement cuits sont pourvoyeurs d'AGEs, alors que les aliments peu ou pas cuits n'en contiennent que très peu ou même pas. Les Peulh qui ont un régime alimentaire basé essentiellement sur le lait cru de vache et le couscous seraient moins exposés que les autres populations qui consomment au moins trois repas longuement cuits par jour. Ces différences sur le plan d'exposition aux AGEs alimentaires pourraient entraîner des différences biologiques avec des répercussions sur la susceptibilité à certaines maladies infectieuses comme le paludisme. En effet ces AGEs alimentaires et leurs récepteurs cellulaires (RAGE) constituent un lien entre l'environnement (habitudes alimentaires) et les systèmes de défense immunitaires (Akirav EM et al, 2012). Le rôle prépondérant de certaines dérivées nutritives a été récemment décrit dans le développement et la maturation de certains organes lymphoïdes et la régulation du système (Veldhoen et al, 2015). Il est récemment démontré aussi que les AGEs d'origine alimentaire influence considérablement la composition du microbiote intestinal (Qu W, et al, 2017). Des études récentes ont également décrit le rôle important du microbiote intestinal dans la modulation de la réponse immunitaire anti palustre (Yilmaz B, et, 2014). Ces résultats suggèrent donc que tout facteur susceptible de modifier de façon permanente la composition du microbiote pourrait jouer un rôle dans la susceptibilité au paludisme. De même que toute différence d'exposition aux AGEs alimentaires pourrait entraîner une différence de susceptibilité au paludisme.

L'expression deux fois plus des récepteurs RAGE sur les lymphocytes observés chez les Dogon comparés aux Peulh illustre bien leur différence sur ce plan. L'absence de différence statistiquement significative pourrait être liée à la taille moins importante de l'échantillon.

Nous avons également décrit une fréquence élevée de l'allèle muté -374T chez les Peulh. Cette mutation est connue non seulement pour son rôle régulateur de l'expression du RAGE, mais elle pourrait aussi jouer un rôle important dans l'expression d'autres gènes de l'immunité (*Yang et al. 2013 J. Diab Res*). L'interaction AGE-RAGE et le polymorphisme de RAGE pourraient constituer un axe majeur de recherche sur la susceptibilité aux maladies infectieuses en général et au paludisme en particulier. De telles interactions sont d'ailleurs déjà décrites chez les Peulh et les Dogon. Lokki A et al, 2011 a décrit la persistance du gène de la lactase chez les Peulh (>50%) lié probablement à leurs habitudes alimentaires actuelles et ancestrales (Lokki A et al, 2011). Cette persistance est due à une mutation au niveau du promoteur du gène de la lactase qui lui permet de s'exprimer chez ces populations (Ranciaro A, et al., 2014 ; Macholdt, E., et al 2015) et serait un facteur protecteur contre le syndrome métabolique (Friedrich D. C et al, 2014). Le RAGE étant aussi un récepteur de métabolisme de base, il pourrait avoir évolué selon les habitudes alimentaires des populations. Et la mutation -374T pourrait être l'un des résultats de cette évolution dont le rôle fonctionnel mérite d'être étudié en profondeur.

Dans cette étude, nous n'avons pas étudié la relation entre ces paramètres biologiques et la susceptibilité au paludisme clinique. Étant donné que la plupart des études ayant décrit les différences de susceptibilité au paludisme chez les Peulh et les Dogon ont porté sur les manifestations cliniques du paludisme, des études conçues à cet effet

pourront aider à bien élucider le rôle des dérivées alimentaires et leur récepteurs dans la régulation du système immunitaire et la susceptibilité au paludisme

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La susceptibilité ethnique au paludisme est une question complexe, multifactorielle. La compréhension des mécanismes de différence de susceptibilité interethnique aux maladies en général et au paludisme en particulier nécessite des approches novatrices prenant en compte des composantes multiples. L'étude du rôle de l'alimentation et les dérivées métaboliques alimentaires dans la susceptibilité au paludisme est un exemple de cette approche novatrice de recherche utilisant des composantes environnementale, biologique et socioculturelle. Nos résultats démontrent que des différences au niveau des habitudes alimentaires et culinaires pourraient se traduire par des différences au niveau biologique avec des implications dans la susceptibilité au paludisme. Ils ont aussi démontré que les Peulh avaient des fréquences élevées de facteurs génétiques érythrocytaires capables de conférer des résistances naturelles au paludisme, comparés aux Dogon.

Notre démarche sur le rôle de l'alimentation et le métabolisme dans la susceptibilité au paludisme mérite d'être approfondie par des études de cohortes comparatives de groupes ethniques, et en intégrant les composantes de paludisme clinique. L'élargissement de l'étude à d'autres paramètres métaboliques tels que le cholestérol, les triglycérides, la glycémie, la protéine PCSK9, permettrait de mieux comprendre le rôle des dérivées métaboliques alimentaire dans la susceptibilité aux maladies infectieuses en général et au paludisme en particulier.

Le rôle du microbiote intestinal étant aussi déjà démontré dans la susceptibilité au paludisme, et compte tenu du rôle important aussi de l'alimentation dans la composition du microbiote intestinal et le métabolisme (notamment les dérivées métaboliques alimentaires), il semble important d'explorer en profondeur l'interaction entre ces trois facteurs et leur impact sur la susceptibilité au paludisme dans les populations ayant des pratiques socioculturelles différentes.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. World Malaria Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* 2005;77:171–92
3. RTS,S Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med* 2014; 11: e1001685
4. Sissoko MS, Healy SA, Katile A, Omaswa F, Zaidi I, Gabriel EE, et al. Safety and efficacy of PfSPZ Vaccine against *Plasmodium falciparum* via direct venous inoculation in healthy malaria-exposed adults in Mali: a randomised, double-blind phase 1 trial. *Lancet Infect Dis.* 2017 May;17(5):498-509
5. Mordmuller B, Supan C, Sim KL et al. Direct venous inoculation of *Plasmodium falciparum* sporozoites for controlled human malaria infection: a dose-finding trial in two centres. *Malar J* 2015;14:117.
6. Roestenberg M, McCall M, Hopman J et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. *N Engl J Med* 2009;361:468-477.

7. Roestenberg M, Teirlinck AC, McCall MB et al. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. *Lancet* 2011.
8. Campbell MC and Tishkoff SA. African genetic diversity: implications for human demographic history, modern human origins, and complex disease mapping. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008;9:403–33
9. Tishkoff SA, Reed FA, Friedlaender FR, Ehret C, Ranciaro A, Froment A, et al. The genetic structure and history of Africans and African Americans. *Science* 2009;324:1035–44.
10. González AM, Cabrera VM, Larruga JM, Tounkara A, Noumsi G, Thomas BN, Moulds JM. Mitochondrial DNA variation in Mauritania and Mali and their genetic relationship to other Western Africa populations., 2006,
11. PEREIRA, L., GUSMÃO, L., ALVES, C., AMORIM, A., & PRATA, M. (2002). Bantu and European Y-lineages in Sub-Saharan Africa. *Annals of Human Genetics*, 66(5-6), 369-378. doi:10.1017/S0003480002001306
12. De Lumley H. 2006. Il y a 400 000 ans : la domestication du feu, un formidable moteur d'hominisation. *Comptes Rendus Palevol*, 5, 149–154.
13. Veldhoen M and Ferreira C. Influence of nutrient-derived metabolites on lymphocyte immunity. *Nat Med*. 2015;21: 709–718.
14. Lokki AI, Järvelä I, Israelsson E, Maiga B, Troye-Blomberg M, Dolo A, et al. Lactase persistence genotypes and malaria susceptibility in Fulani of Mali. *Malar J* 2011;10:9
15. Arama C, Giusti P, Boström S, Dara V, Traore B, Dolo A, et al. Interethnic Differences in Antigen-Presenting Cell Activation and TLR Responses in Malian Children during *Plasmodium falciparum* Malaria. *PLoS ONE* 2011;6:e18319

16. Arama C, Maiga B, Dolo A, Kouriba B, Traoré B, Crompton PD, et al. Ethnic differences in susceptibility to malaria: What have we learned from immunological studies in West Africa? *Acta Trop*. 2015;146: 152–156.
17. Dolo A, Coulibaly M, Maïga B, Daou M, Arama C, Troye-Blomberg M, Doumbo O. 2012. [Humoral immune anti-*Plasmodium falciparum* AMA1 and MSP1 response in two ethnic groups living in sympatry in Mali]. *Bulletin De La Société De Pathologie Exotique*, 105, 364–369.
18. Maiga B, Dolo A, Touré O, Dara V, Tapily A, Campino S, Sepulveda N, Corran P, Rockett K, Clark TG, Blomberg MT, Doumbo OK. 2014. Fc gamma receptor IIa-H131R polymorphism and malaria susceptibility in sympatric ethnic groups, Fulani and Dogon of Mali. *Scand J. Immunol*, 79, 43–50.
19. Poulsen MW, Hedegaard RV, Andersen JM, de Courten B, Bügel S, Nielsen J, et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem Toxicol* 2013; 60: 10–37.
20. Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 2004; 104: 1287–91.
21. Schlienger J-L, Gautier M, Gutmann A, Kremer F. Produits terminaux de la glycation (AGE) alimentaires et pathologie métabolique *Med Mal Métabol*, 2010, 4, 653-659
22. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *J Am Diet Assoc* 2010; 110: 911–916.

23. Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppas M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1043: 461–6.
24. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46:172–3
25. Oguike, M. C., Betson, M., Burke, M., Nolder, D., Stothard, J. R., Kleinschmidt, I., et al.. *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. *Int J Parasitol.* 2011 May; 41(6-10): 677–683.
26. Alan F. Cowman AF, Healer J, Marapana D, and Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*, 2016 ;167:610-624.
27. Klinkenberg E, McCall PJ, Wilson MD, Akoto AO, Amerasinghe FP, Bates I, et al: Urban malaria and anaemia in children: a cross-sectional survey in two cities of Ghana. *Trop Med Int Health* 2006, 11:578-588.
28. Gay-Andrieu F, Adehossi E, Lacroix V, Gagara M, Ibrahim ML, Kourna H, Boureima H: Epidemiological, clinical and biological features of malaria among children in Niamey, Niger. *Malar J* 2005, 4:10.
29. Sachs G: Economic analyses indicates that the burden of malaria is great. Report of the African Summit on Roll Back Malaria, Abuja. World Health Organization; 2000.
30. Meremikwu MM, Asindi AA, Ezedinachi E: The pattern of neurological sequelae of childhood cerebral malaria among survivors in Calabar, Nigeria. *Cent Afr J Med* 1997, 43:231-234.
31. Boivin MJ: Effects of early cerebral malaria on cognitive ability in Senegalese children. *J Dev Behav Pediatr* 2002, 23:353-364.

32. Boivin MJ, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM, John CC: Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics* 2007, 119:e360-366.
33. Holding PA, Stevenson J, Peshu N, Marsh K: Cognitive sequelae of severe malaria with impaired consciousness. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999, 93:529-534.
34. Carter JA, Mung'ala-Odera V, Neville BG, Murira G, Mturi N, Musumba C, Newton CR: Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005, 76:476-481
35. Kihara M, Carter JA, Newton CR: The effect of Plasmodium falciparum on cognition: a systematic review. *Trop Med Int Health* 2006, 11:386-397.
36. Vitor-Silva, S., Reyes-Lecca, R. C., Pinheiro, T. R., & Lacerda, M. V. Malaria is associated with poor school performance in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Malar J*, 8, 230.
37. Fernando SD, Gunawardena DM, Bandara MR, De Silva D, Carter R, Mendis KN, et al. The impact of repeated malaria attacks on the school performance of children. *Am J Trop Med Hyg* 2003, 69:582-588
38. Thuilliez, J ; Sissoko MS, Toure OB, Kamate P, Berthélemy JC, Doumbo OK. Malaria and primary education in Mali: A longitudinal study in the village of Donéguébougou *Social Science & Medicine* 71(2010) 324-334
39. Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for (Plasmodium knowlesi) malaria: Duffy blood group determinants. *Science*. 1975 Aug 15;189(4202):561-3.
40. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*. 1976 Aug 5;295(6):302-4.

41. Welch SG, Mc Gregor IA, Williams. The Duffy blood group and malaria prevalence in Gambian West Africans. *Trans R Soc trop Med Hyg*, 1977;71, 295-6.
42. Menard D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, Ratsimbaoa A, et al. Plasmodium vivax clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Mar 30;107(13):5967–71.
43. Niangaly A, Gunalan K, Ouattara A, Coulibaly D, Sa JM, Adams M et al. Plasmodium vivax Infection over 3 years in Duffy Blood Group Negative Malians in Bandiagara, Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 97(3), 2017, pp. 744-752
44. Miller LH. Hypothesis on the mechanism of erythrocyte invasion by malaria merozoites. *Bulletin of the World Health Organization*. 1977;55(2-3):157-162.
45. Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, Miller LH. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by Plasmodium falciparum. *Science*. 1994 Jun 24;264(5167):1941-4.
46. Facer, C A, and G Agiostratidou. "High Levels of Anti-Phospholipid Antibodies in Uncomplicated and Severe Plasmodium Falciparum and in P. Vivax Malaria." *Clinical and Experimental Immunology* 95.2 (1994): 304–309. Print.
47. Hadley T.J., Klotz F.W., Pasvol G., Haynes J.D., McGinnis M.H., Okubo Y., Miller L.H. Falciparum malaria parasites invade erythrocytes that lack glycoporphin A and B (MkMk). *J. Clin. Invest*, 1987, 8 : 1190-1193.
48. Kathan RH, Winzler RJ, Johnson CA. PREPARATION OF AN INHIBITOR OF VIRAL HEMAGGLUTINATION FROM HUMAN ERYTHROCYTES. *The Journal of Experimental Medicine*. 1961;113(1):37-45.
49. Rowe JA, Opi DH and Williams TN. Blood groups and malaria: fresh insights into pathogenesis and identification of targets for intervention: *Current Opinion in Hematology*, 2009;16, 480–487

50. Rowe JA, Handel IG, Thera MA, Deans A-M, Lyke KE, Koné A, et al. Blood group O protects against severe Plasmodium falciparum malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17471–6.
51. Crubezy E, Braga J, Larrouy G. *Anthropobiologie*. 07/2008 (2ème édition). MASSON; 2008)
52. Diarra AB, Guindo A, Kouriba B, Dorie A, Diabaté DT, Diawara SI, et al. Sécurité transfusionnelle et drépanocytose à Bamako, Mali. Séroprévalence des infections à VIH, VHB, VHC et allo-immunisation anti-Rh et Kell chez les drépanocytaires. *Transfus Clin Biol* 2013;20:476–81
53. Santovito A, Burgarello C, Cervella P, Ouattara M, Caravatti GA, Salvarani B, et al. Erythrocyte polymorphisms in five ethnic groups of Northern Côte d'Ivoire. *Int J Immunogenet* 2009;36:189–91
54. Mellal PDB. Etude du polymorphisme des groupes sanguins, (ABO, Ss, Rhésus et Duffy). *Leban Sci J* 2008;9:17.
55. Wagner FF, Flegel WA. RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. *Blood* 2002;99:2272–3.
56. LABIE D, RICHIN C, PAGNIER J, GENTILINI M, NAGEL R L. Hemoglobins S and C in upper Volta. *Trans Roy soc Trop Med hyg.* 1984; 78: 242-245.
57. Chaventre A et al. Genetic counseling for sickle cell anemia and hemoglobin C disease in populations where preferential marriage occurs. *J Genet Hum.* 1980 Jun;28(2):91-5.
58. Guindo A, Traore K, Diakite S, Wellems TE, Doumbo OK, Diallo DA. An evaluation of concurrent G6PD (A2) deficiency and sickle cell trait in Malian populations of children with severe or uncomplicated *P. falciparum* malaria. *Am J Hematol.* 2011 Sep;86(9):795-6

59. Travassos MA, Coulibaly D, Laurens MB, Dembélé A, Tolo Y, Koné AK, et al. Hemoglobin C Trait Provides Protection From Clinical Falciparum Malaria in Malian Children. *JID* 2015:212
60. Agarwal A, Guindo A, Cissoko Y, Taylor JG, Coulibaly D, Koné A, et al. Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood* 2000;96:2358–63.
61. Israelsson E, Ekström M, Nasr A, Dolo A, Kearsley S, Arambepola G, Homann MV, Maiga B, Doumbo OK, Elghazali G, Giha HA, Troye-Blomberg M, Berzins K, Tornvall P. 2009. Marked differences in CRP genotype frequencies between the Fulani and sympatric ethnic groups in Africa. *Malaria Journal*, 8, 136
62. Débré P. *L'homme microbiotique*. 2015, Odile Jacob, P. 279.
63. Qui J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KF, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010, 464 :59-65.
64. Cotillard A, Kennedy SP, Chun Kong L, Prifti E, Pons N, Le Chatellier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, 2013, 500, P. 585-588.
65. Lagier JC, Million M, Hugon P, Armougon F, Raoult D. Human gut microbiota : repertoire and variations. *Frontiers in cellular and infection. Microbiology*, 2012, 2, P. 1-19.
66. Angelakis E, Armougon F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in human. *Future microbiol*, 2012, 7, P.91-109.
67. Devaraj S, Hermaradjata P, Versalovic J. Human gut microbiome and body metabolism: implication for obesity and diabetes. *Clin Chem*, 2013, 59, P.617-628.

68. Yilmaz B, Portugal S, Tran TM, Gozzelino R, Ramos S, Gomes J, et al. Gut Microbiota Elicits a Protective Immune Response against Malaria Transmission. *Cell*. 2014 Dec;159(6):1277–89.
69. Villarino NF, LeCleir GR, Denny JE, Dearth SP, Harding CL, Sloan SS, et al. ... Schmidt, N. W. Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria. *Proc Nat Acad Sciences USA*, 2016;113(8), 2235–2240.
70. Yooseph S, Kirkness EF, Tran TM, Harkins DM, Jones MB, Torralba MG, et al. Stool microbiota composition is associated with the prospective risk of Plasmodium falciparum infection. *BMC Genomics* 2015 Aug 22;16:631.
71. Macher, B.A., and Galili, U. The Galalpha1,3Galbeta1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2008;1780, 75–88.
72. Bishop, J.R., and Gagneux, P. Evolution of carbohydrate antigens—microbial forces shaping host glycomes? *Glycobiology*, 2007; 17, 23R–34R.
73. Traoré K, Arama C, Médebielle M, Doumbo O, Picot S. Do advanced glycation end-products play a role in malaria susceptibility? *Parasite*. 2016;23: 15.
74. Yang, S., Litchfield, J.E., and Baynes, J.W., AGE-breakers cleave model compounds, but do not break Maillard crosslinks in skin and tail collagen from diabetic rats. *Arch Biochem Biophys*, 2003. vol.412(1): p. 42-6.
75. Lyons TJ. and Kennedy L. Non-enzymatic glycosylation of skin collagen in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and limited joint mobility. *Diabetologia*, 1985. vol.28(1): p. 2-5.
76. Bordas-Fondrede M, Sauser E, Jardel C, Jaudon MC, Thervet F, Rottembourg J, et al. Glycosylated plasma proteins in chronic renal failure. *Ann Biol Clin (Paris)*, 1990. vol.48(10): p. 717-21.

77. Kim CS, Park S and Kim J. The role of glycation in the pathogenesis of aging and its prevention through herbal products and physical exercise. *J Exerc Nutrition Biochem.* 2017 Sep 30;21(3):55-61.
78. Akirav EM, Preston-Hurlburt P, Garyu J, Henegariu O, Clynes R, Schmidt AM, Herold KC. 2012. RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. *PLoS ONE*, 7, e34698.
79. González I, Romero J, Rodríguez BL, Pérez-Castro R, Rojas A. 2013. The immunobiology of the receptor of advanced glycation endproducts: trends and challenges. *immunobiology*, 218, 790–797.
80. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands—cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *J. Mol Med*, 2009, 87, 235–247.
81. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol*, 2010; 79, 1379–1386
82. Martinez PJ, Mathews C, Actor JK, Hwang SA, Brown EL, De Santiago HK, et al. Impaired CD4+ and T-helper 17 cell memory response to *Streptococcus pneumoniae* is associated with elevated glucose and percent glycated hemoglobin A_{1c} in Mexican Americans with type 2 diabetes mellitus. *Trans Research*, 2014, 163, 53–63.
83. Cheța D, Manciulea M, Sântu E, Georgescu M, Perciun R, Sulica A, Mincu I. Not only quantitative but also qualitative changes of serum immunoglobulins in diabetes mellitus. *Rom J Intern Med.* 1991 Jul-Dec;29(3-4):181-7.
84. Duell, P.B., Oram, J.F., and Bierman, E.L., Nonenzymatic glycosylation of HDL and impaired HDL-receptor-mediated cholesterol efflux. *Diabetes*, 1991. vol.40(3): p. 377-84.

85. Bryszewska M and Szosland K Association between the glycation of erythrocytemembrane proteins and membrane fluidity. *Clin Biochem*, 1988, 21(1): p. 49-51.
86. Zhang G, Skorokhod OA, Khoo SK, Aguilar R, Wiertsema S, Nhabomba AJ, et al. Plasma advanced oxidative protein products are associated with anti-oxidative stress pathway genes and malaria in a longitudinal cohort. *Malar J.*, 2014, 13, 134.
87. Peng WH, Lu L, Wang LJ, Yan X, Chen QJ, Zhang Q et al., RAGE Gene Polymorphisms Are Associated with Circulating Levels of Endogenous Secretory RAGE but Not with Coronary Artery Disease in Chinese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Archives of Medical Research* 40; 2009 ; 393e398
88. Chiaroni J. Etude anthropogénétique de la population Comoienne de Marseilles. *Thèse Doct, Marseilles, 2003*
89. Le Pennec PY, Rouger P, Klein MT and Salmon C. The erythrocyte phenotype Rh: 32,-46: transfusional and obstetric importance. *Rev Fr Transfus Hemobiol.* 1989 Sep;32(4):291-7.
90. Pasvol G, Jungery M. Glycophorins and red cell invasion by *Plasmodium falciparum*. *Ciba Found Symp* 1983;94:174–95.
91. Malaria Genomic Epidemiology Network. A novel locus of resistance to severe malaria in a region of ancient balancing selection. *Nature.* 2015;526(7572):253-257. doi:10.1038/nature15390.
92. Koschinsky T, He C-J, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94: 6474–6479.
93. Uribarri J, Cai W, Peppas M, Goodman S, Ferrucci L, Striker G, Vlassara H. 2007. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to

inflammatory response, oxidative stress, and aging. *Journal of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 62, 427–433.

94. Qu W, Yuan X, Zhao J, Zhang Y, Hu J, Wang J, Li J Dietary advanced glycation end products modify gut microbial composition and partially increase colon permeability in rats. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Oct ;61(10).

95. Yang L, Wu Q, Li Y, Fan X, Hao Y, Sun H, et al. Association of the Receptor for Advanced Glycation End Products Gene Polymorphisms and Circulating RAGE Levels with Diabetic Retinopathy in the Chinese Population. *J Diabetes Res*. 2013;2013: 1–8.

96. Ranciaro A., Campbell M. C., Hirbo J. B., Ko W.-Y., Froment, A., Anagnostou P., Tishkoff, S. A. Genetic Origins of Lactase Persistence and the Spread of Pastoralism in Africa. *American Journal of Human Genetics*, 2014 ; 94(4), 496–510.

97. Macholdt E., Slatkin M., Pakendorf B., & Stoneking M. New insights into the history of the C-14010 lactase persistence variant in Eastern and Southern Africa. *American Journal of Physical Anthropology*, 2015 ;156(4), 661–664.

98. Friedrich D. C., de Andrade F. M., Fiegenbaum M., de Almeida S., Mattevi V. S., Callegari-Jacques S. M. et al. The lactase persistence genotype is a protective factor for the metabolic syndrome. *Genetics and Molecular Biology*, 2014 ; 37(4), 611–615.

ANNEXES

Annexe 1: Protocole de séparation des lymphocytes

<i>Titre : Isolement lymphocytaire et congélation cellulaire</i>			
Responsable :	Vérificateur :	Approbateur :	Date d'effet : Mai 2011
			Nombre de pages : 5 Nombre d'annexes : 0

1. REACTIFS UTILISES

- RPMI sans Glutamine 500 ml conservé Frigo (50 ml / patient)
- Milieu de séparation pour lymphocytes ou Ficoll conservé Frigo (5 ml / patient)
- Diméthylsulfoxyde DMSO conservé à température ambiante (100µl / patient)
- Sérum de veau fœtal conservé congelé aliquoté (200µl / patient)
- Bleu Trypan conservé à température ambiante puis au frigo après ouverture

Solution pouvant remplacer RPMI pour dilution du sang et lavages: PBS/EDTA 2mM

Toujours congeler en RPMI

2. CONSOMMABLES ET MATERIELS

- Tubes 15 ml à vis (3 / patient)
- Microtubes pour comptage
- Pipettes 10 ml + pro-pipette
- Pipette 1 ml
- Microtubes de congélation à vis 1.5 ml (1 / patient)

- Centrifugeuse à rotor libre avec portoir 15 ml
- Cellules de comptage (Cellule de Malassez ou cellules à usage unique)
- Microscope optique
- Bassine glace

3. PRELEVEMENTS

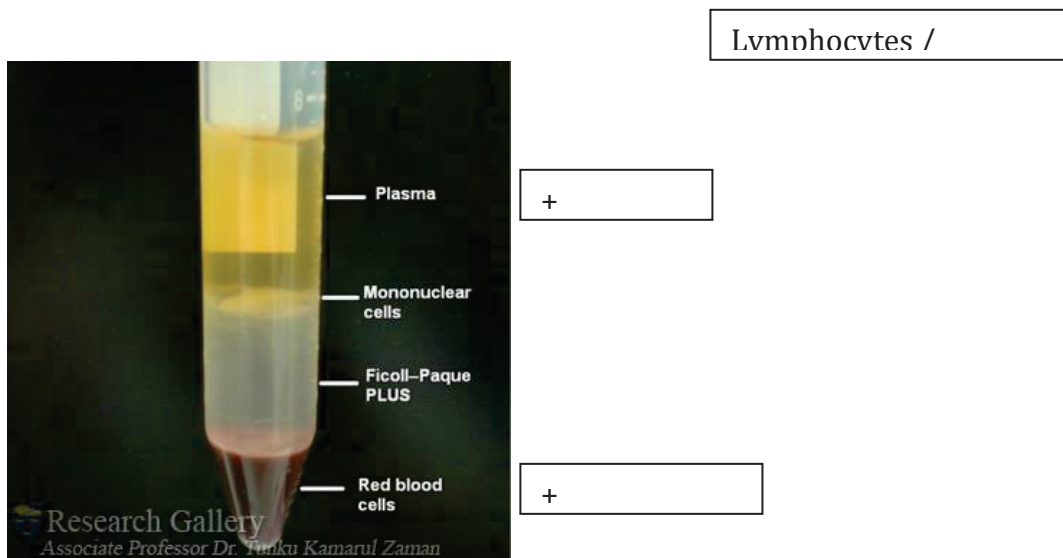
- Sang prélevé sur tubes EDTA 6 ml depuis moins de 48h

4. ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES TOTAUX A PARTIR DU SANG

TECHNIQUE DE MACROMETHODE

- Identifier 3 tubes de 15 ml par patient
- Sortir du frigo le RPMI et Milieu de séparation de lymphocytes pour une utilisation à T° ambiante (20°C), même température que les tubes de sang
- Dans 1 tube de 15 ml diluer le sang QSP 8 ml de volume final en RPMI
- Dans 1 autre tube de 15 ml déposer 4 ml de Milieu de séparation de lymphocytes (rapport 1/3 Ficoll pour 2/3 de sang dilué)
- Déposer délicatement les 8 ml du sang dilué sans rupture de phase (incliner le tube puis le redresser)
- Centrifuger les tubes à 2000 trs/min (500g) pendant 15 min SANS FREIN à 20°C (protocole peut être adapté pour une durée de 30-40min)
- Eliminer un large excès de plasma (+plaquettes) puis récupérer l'interface contenant les lymphocytes (éviter de prendre quantité importante de Ficoll) et la déposer dans 1 autre tube de 15 ml identifié
- Ajouter RPMI qsp 12 ml, homogénéiser, vortexer
- Centrifuger à 1900 trs/min (450g) pendant 10 min frein à 9 à 20°C (premier lavage)

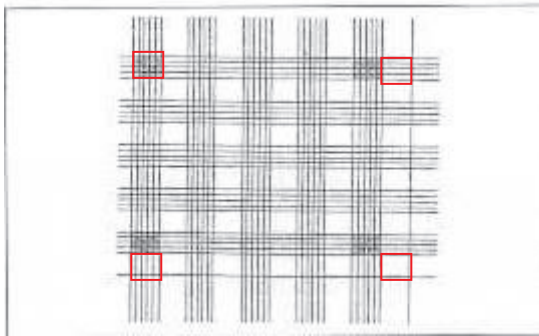
- Eliminer le surnageant et laisser environ 2 ml dans le tube
- Casser le culot cellulaire et ajouter du RPMI jusqu'à environ 12 ml, homogénéiser, vortexer
- Centrifuger à 1600 trs/min (300g) pendant 10 min frein à 9 à 20°C (deuxième lavage)
- Eliminer le maximum de surnageant, ajouter 1 ml de RPMI et casser le culot par aspiration refoulement
- Faire un comptage cellulaire
- Ajouter du RPMI jusqu'à environ 12 ml, homogénéiser, vortexer
- Centrifuger à 1300 trs/min (200g) pendant 10 min frein à 9 à 20°C (troisième lavage)



5. NUMERATION DES CELLULES

Numération des cellules

1. **Diluer** les cellules isolées au $\frac{1}{2}$ avec du bleu trypan (volume $10\mu\text{l}+10\mu\text{l}$)
2. **Monter** la cellule de Malassez (volume 1mm^3 ou $1\mu\text{l}$) et **déposer** la suspension diluée
3. **Compter** : les 4 rectangles des coins de la cellule, calculer la moyenne de cellules obtenues par rectangle (cellules nucléées réfringentes, hormis celles colorées bleu)
4. **Calculer** la quantité totale de cellules obtenues :
 $N = 1 \text{ rectangle moyen} \times 100 \text{ (nbre rectangles)} \times 2 \text{ (dil)} \times \text{vol. resuspension en } \mu\text{l}$



6. CONGELATION DES CELLULES

- Identifier 1 cryotube par patient et placer dans une boîte de congélation à -80°C
- Préparer extemporanément la solution de congélation :
 - o 10% DMSO
 - o 20% SVF
 - o 70% RPMI

Exemple : préparation pour 10 patients (1ml/ ampoule/ patient)

- 1ml DMSO
- 2ml SVF
- 7ml RPMI

Attention : tenir compte d'un volume mort à évaluer en fonction de la taille des séries
(compter 1 patient de plus / 10)

- Placer le cryotube, milieu de congélation et culot cellulaire après dernier lavage dans la glace
- Pour chaque patient resuspendre rapidement le culot sec avec 1 ml de milieu de congélation, homogénéiser par aspiration refoulement, transférer dans le cryotube correspondant et visser le bouchon
- Placer rapidement les cryotubes dans la boîte de congélation à -80°C recouverte de ouate ou coton

Annexe 2 : protocole de détermination des phénotypes érythrocytaires

<i>Titre : Phénotypage étendu des participants et recherche de l'antigène Diffu</i>			
Responsable :	Vérificateur :	Approbateur :	Date d'effet : Mai 2011
			Nombre de pages : 2 Nombre d'annexes : 0

Champ d'application :

Ce mode opératoire décrit les modalités d'exécution du phénotypage étendu des patients et la recherche d'antigène Diffu à distance d'épisode transfusionnel.

La détermination du phénotype comporte :

- Dans les conditions d'automatisation et d'information, une réalisation exécutée à l'aide d'un lot de réactifs et par un technicien.
- Dans tous les autres cas, une détermination repose sur 2 échantillons exécutés par deux techniciens différents.
- La saisie manuelle des résultats doit aussi passer par une double saisie effectuée par deux techniciens différents.

Matériels :

- Tubes hémolyse
- Incubateur – Etuve 37°C
- Pipette Pasteur 3 ml
- Centrifugeuse

Réactifs :

- Solution saline (Sérum physiologique)

- Témoin réactifs : soit fourni par le fabricant de réactif, soit sérum AB (SAB) si réactif polyclonal ou solution saline 0,9% si réactif monoclonal
- Sérum test
- Antiglobulines humaines polyvalentes
- Support filtration BVC (Conservation 1 heure après ouverture)

Mode opératoire

- Diluer le sang du participant :
 - 2 ml de sérum physiologique + 1 ml de sang dans un tube en verre ou en plastique
- Identifier les supports de filtration en mettant le numéro du participant et l'ordre selon lequel les réactifs seront utilisés (Ex : Fya, Fyb, Jka, Jkb, S, s).
- Ouvrir les supports de filtration
- Mettre une goutte de sérum physiologique dans chaque étui du support à l'aide de la pipette Pasteur
- Ajouter d'abord une goutte de chacun des réactifs par étui et ensuite une goutte du sang dilué ;
- Centrifuger pendant 5 minutes
- Mettre en incubation pendant 45 minutes
- Centrifuger pendant 5 minutes
- Lire le résultat qui est positif si agglutination et négatif si absence d'agglutination
- Editer le résultat sur la feuille de paillasse
- Garder les supports dans un carton bien fermé.

NB : - Les réactifs doivent être toujours dilués avec du sérum physiologique

- Ne pas se tromper de l'ordre d'utilisation des réactifs

Annexe 3 : protocole d'extraction de l'ADN génomique à partir du sang total

Titre : Extraction d'ADN à partir de sang total (tube EDTA)			
Référence :			
Responsable:	Vérificateur :	Approbateur :	Date d'effet : Avril 2011
			Nombre de pages : 3 Nombre d'annexes : 0

PRINCIPE

Les membranes cellulaires et nucléaires sont lysées par action de la protéinase K et du tampon de lyse. L'ADN se lie par adsorption à la membrane de la colonne, les protéines et sels sont éliminés par les lavages successifs. L'ADN ainsi purifié est ensuite élué de la colonne. Ces différentes étapes se font selon les conditions ajustées par différents tampons. La concentration et la qualité de l'ADN sont estimées par spectrophotométrie.

Pour l'extraction d'ADN à partir d'autres prélèvements biologiques, se référer à la notice du kit. Page 128 sur 148

REACTIFS ET MATERIELS CRITIQUES

Réactifs critiques

Nom	Fournisseur	Référence
QIAamp DNA Blood Kit*	Qiagen	réf. 51106, 250 extractions
Nucleospin Blood*	Macherey-Nagel	740951.250, 250 extractions
Eau DEPC	Invitrogen	75-0024
Tube 1.5 ml	Eppendorf	033508

*utiliser l'un ou l'autre kit

Equipements critiques

Centrifugeuse tubes 1.5 ml

Bain marie

ENREGISTREMENT DES ECHANTILLONS

1. Enregistrer les échantillons dans le registre de biologie moléculaire (code région/code ethnie/numéro de trio/participant) et la date du prélèvement.
2. Inscrire le numéro du prélèvement sur les tubes de biologie moléculaire.
3. Noter la date d'extraction d'ADN dans le registre

PROTOCOLE D'EXTRACTION

1. Veiller à ce que les tampons des kits soient correctement préparés

Pour le kit Nucleospin Blood

- Verser le contenu de B1 dans le flacon de B2, bien mélanger et coller l'étiquette B3
- Ajouter le volume indiqué d'éthanol (96-100%) dans le flacon de B5 et marquer "éthanol ajouté"
- Ajouter le volume correspondant indiqué de solution dans chaque flacon de protéinase K; aliquoter 500 µl dans les tubes eppendorf et conserver à -20° C

Pour QIAamp DNA Blood Kit

- Ajouter le volume indiqué de solvant dans le flacon de protéase, aliquoter 500 µl dans les tubes eppendorf et conserver à -20° C,
 - Ajouter les volumes indiqués d'éthanol (96-100%) dans les flacons de tampons AW1 et AW2, conserver à la température ambiante,
 - Bien mélanger le tampon AL par agitation avant de l'utiliser
2. Inclure dans la série un blanc d'extraction (échantillon remplacé par de l'eau)

3. inscrire le numéro d'identification du participant (code région/code ethnie/numéro de trio/participant) sur les tubes Eppendorf 1.5ml
4. Noter sur le dessus des colonnes le même numéro d'identification du participant.

5.

QIAamp DNA Blood Kit	Nucleospin Blood
<p>5. Mélanger dans le tube 1.5ml préparé à l'étape 3</p> <p>20µl de protéinase K (4.5mg/ml) 200µl de tampon de lyse (AL) 200µl de fluide biologique (bien agiter les échantillons au préalable)</p> <p>6. Agiter au vortex 10 à 20 secondes et faire un pulse de centrifugation, incubé 10 minutes à 56°C</p> <p>7. Ajouter 200µl d'éthanol absolu (96-100%)</p> <p>8. Agiter au vortex 10 à 20 secondes et faire un pulse de centrifugation</p> <p>9. Déposer la totalité du mix dans une colonne associée à un collecteur</p> <p>10. Centrifuger 1 min à 6000 g (8000 rpm), changer de collecteur</p> <p>11. Ajouter 500 µl du tampon de lavage n°1 (AW1)</p> <p>12. Centrifuger 1 min à 6000 g (8000 rpm), changer de collecteur</p> <p>13. Ajouter 500 µl du tampon de lavage n°2 (AW2)</p> <p>14. Centrifuger 3 min à 20000 g (14000 rpm), vider le collecteur</p> <p>15. Centrifuger 1 min à 20000 g (14000 rpm)</p> <p>16. Coller une étiquette UAG sur le tube Eppendorf 1.5ml qui recevra l'ADN purifié</p> <p>17. Placer la colonne dans ce tube</p> <p>18. Déposer 100 µl d'eau DEPC, incubé 1 à 5 minutes</p> <p>19. Centrifuger 1 min 6000 g (8000 rpm)</p>	<p>6. Mélanger dans le tube 1.5ml préparé à l'étape 3</p> <p>25µl de protéinase K (4.5mg/ml) 200µl de tampon B3 200µl de fluide biologique (bien agiter les échantillons au préalable)</p> <p>7. Agiter au vortex 10 à 20 secondes et faire un pulse de centrifugation, incubé 10 minutes à 70°C</p> <p>8. Ajouter 210µl d'éthanol absolu (96-100%)</p> <p>9. Agiter au vortex 10 à 20 secondes et faire un pulse de centrifugation</p> <p>10. Déposer la totalité du mix dans une colonne associée à un collecteur</p> <p>11. Centrifuger 1 min à 11000 g (11000 rpm), changer de collecteur</p> <p>12. Ajouter 500 µl du tampon BW</p> <p>13. Centrifuger 1 min à 11000 g (11000 rpm), changer de collecteur</p> <p>14. Ajouter 600 µl du tampon B5</p> <p>15. Centrifuger 1 min à 11000 g (11000 rpm), vider le collecteur</p> <p>16. Centrifuger 1 min à 11000 g (11000 rpm)</p> <p>17. Coller une étiquette UAG sur le tube Eppendorf 1.5ml qui recevra l'ADN purifié</p> <p>18. Placer la colonne dans ce tube</p> <p>19. Déposer 100 µl d'eau DEPC, incubé 1 à 5 minutes</p> <p>20. Centrifuger 1 min 11000 g (11000 rpm)</p>

21. Doser la quantité et estimer la qualité des ADN par absorbance de la densité optique à 260 et 280 nm de 10µl d'ADN, l'appareil doit être étalonné par l'eau utilisée lors de l'extraction

Annexe 4 : protocole de dosage des AGE par ELISA

Title: Standard Operating Procedure for ELISA of AGE in human plasma		Date: 22-Apr-2014
Prepared by	Approved by	Version: 001
Karim TRAORE	Pr Stéphane PICOT	

Objective: This procedure is designed for rapid detection and quantification of advanced glycation end products in human plasma samples.

A/ Reagents and materials

1. Reagents:

- Anti-AGE Antibody 1000X
- Secondary Antibody, HRP Conjugate 1000X
- Assay Diluent
- 10X Wash Buffer
- Substrate Solution
- Stop Solution
- AGE-BSA Standard 1 mg/mL AGE-BSA in PBS
- AGE Conjugate at 1.0 mg/mL in PBS
- 100X Conjugate diluent
- 1X PBS
- Deionized water
- Human plasma sample (samples to be tested)

2. Materials

- 96-well Protein Binding Plate
- Single channel micropipette 1000 µl
- Multi channel micropipette 50 - 300 µl adjustable

- Microplate reader at 450 nm (620 nm as optional reference wave length)
- 15 ml conic tubes
- 1000, 200, 10 μ l tips

B/ Reagents preparation:

1. Reagents for AGE Conjugate Coated plate preparation:

a) Prepare 1X conjugate diluent: add 50 μ l of 100X conjugate diluent to 4.95 ml of 1X PBS, final volume = 5 ml.

b) Prepare 10 μ g/ml of AGE conjugate: add 25 μ l of 1mg/ml of AGE conjugate to 2.975 ml of 1X PBS, final volume = 3 ml. For one plate, prepare 6 ml of 10 μ g/ml of AGE conjugate (50 μ l of 1mg/ml of AGE conjugate + 5.95 ml of 1X PBS, final volume = 6 ml)

c) Mix 1X conjugate diluent (point a) and 10 μ g/ml of AGE conjugate (point b) at a ratio of 1:1 (add 5 ml of 1X conjugate diluent to 5 ml of 10 μ g/ml of AGE conjugate and mix).

- Add 100 μ l of the mixture (1X conjugate diluent and 10 μ g/ml of AGE conjugate) to each well of the plate and incubate over night at 4°C.
- Remove the solution and wash twice the plate with the 1X PBS. Blot plate on paper towels to remove all excess fluid.
- Add 200 μ l of Assay diluent to each well to block the plate; incubate at room temperature for 1 hour, then transfer the plate at 4°C until the use.

2. 1X Wash Buffer preparation: add 2 ml of 10X wash buffer concentrate to 18 ml of deionized water, final volume = 20 ml of 1X wash buffer.

3. Anti-AGE Anti body dilution: dilute the Anti-AGE antibody at 1:1000 with Assay diluent (add 5 μ l of anti-AGE antibody to 4.995 ml of Assay diluent to

obtain a final volume = 5 ml). The diluted solution should be used immediately after dilution.

4. **Secondary Antibody dilution:** dilute the Secondary antibody at 1:1000 with Assay diluent (add 10 µl of secondary antibody to 9.990 ml of Assay diluent to obtain a final volume = 10 ml). The diluted solution should be used immediately after dilution.

C/ Preparation of the serial dilution of the AGE-BSA standard for standard curve

- Prepare a 1:10 dilution D1 of AGE-BSA standard: in a 1.5 ml tube, add 40 µl of AGE-BSA standard and 360 µl of assay diluent, final volume = 400 µl,
- Transfert 200 µl of D1 in 2 wells A of a 96 wells plate (in duplicate),
- Add 100 µl of assay diluent in wells from B to H (in duplicate),
- Make a 1:2 serial dilution from A to G by transferring 100 µl of well A to B, 100 µl of B to C, 100 µl of C to D, 100 µl of D to E, 100 µl of E to F, 100 µl of F to G, leave the well H blank. Make sure to homogenize before to transfer the solution from a well to another.

D/ Assaay Protocle:

- Prepare and mix all reagents thoroughly before use,
- Assay each sample and the standard in duplicate,
- Take the AGE conjugate coated plate from 4°C,
- Remove the 200 µl Assay diluent from the wells of the plate,
- Wash once with the 1X wash buffer,
- Transfer 50 µl of the serial dilution of AGE-BSA in the respective well of the 2 first columns of AGE conjugate coated plate,
- Add 50 µl of each sample in duplicate in the rest of wells

- Incubate at room temperature for 10 minutes on orbital microplate shaker,
- Add 50 µl of diluted anti-AGE antibody and incubate at room temperature for 1 hour on orbital shaker,
- Wash three times with 250 µl of 1X wash buffer and tap on paper towel,
- Add 100 µl of diluted secondary antibody-HRP conjugate, incubate 1 hour at room temperature on orbital shaker, and then wash three times with 1X wash buffer.
- Add 100 µl of a pre-warmed substrate solution at room temperature; incubate for 2-20 mins on orbital shaker. Watch plate carefully the plate, the reaction should be stopped when the color changes.
- Add 100 µl of stop solution to stop reaction, and read immediately,
- Read absorbance of each well on microplate reader using 450 nm as primary wave length (620 as reference).

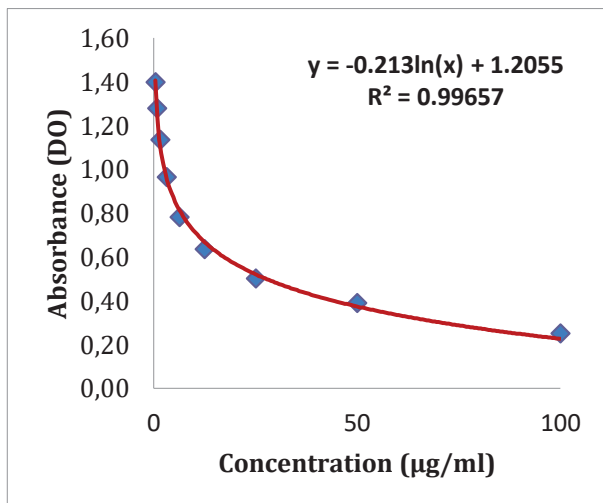


Figure 1. Courbe de tendance du standard avec l'équation de calcul des concentrations. R^2 est sensiblement égal à 1 (0,996).

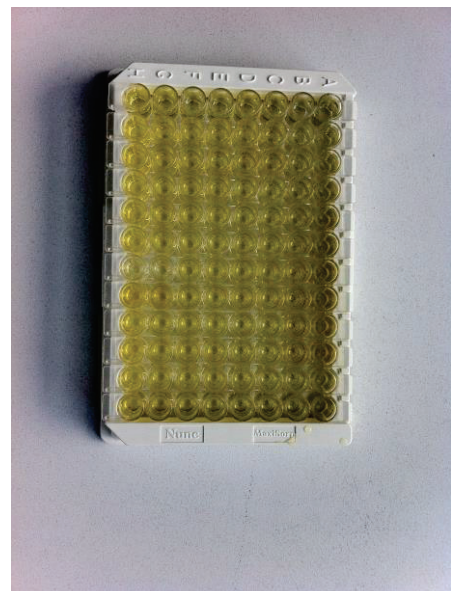


Figure 2. Plaque d'ELISA de RAGE Prête pour la lecture au fluoromètre

Annexe 5 : protocole de dosage des sRAGE par ELISA

Title: Standard Operating Procedure for ELISA of sRAGE in human plasma		Date: 26-May-2014
Prepared by	Approved by	<i>Version: 001</i>
Karim TRAORE	Pr Stéphane PICOT	<i>Kit Ref.: RD191116200R</i> <i>By BioVendor</i>

Objective: This procedure describes the detection and quantification of the soluble Receptor for Advanced glycation End Product Specific (RAGE) enzyme immunoassay for in human plasma.

1. Reagents and materials

- One Antibody coated ready to use 96-well strip plate;
- 100X biotin labeled antibody: 1 vial of 0.13ml;
- Streptavidin-HRP Conjugate: vial of 13ml;
- Master standard lyophilized: 1 vial;
- Quality Control High lyophilized: 2 vials;
- Quality Control Low lyophilized: 2 vials;
- Biotin-Ab Diluent: 1 vial of 13ml;
- Dilution Buffer: 20ml;
- 10X Wash Solution: 100ml;
- Substrate Solution: 1 vial of 13ml;
- Stop Solution: 1 vial of 13ml;
- Microplate reader at 450 [±] 10nm filter (620nm as reference);
- Precision single and/or multi-channel pipettes and disposable tips

- Tubes for dilution
- Deionized or distilled water
- Absorbance paper for blotting the micropaltes
- Container for wash solution;
- Vortex mixer and orbital shaker (300 rpm).

2. Reagents preparation:

Master Standard: reconstitute 3200pg/ml standard by adding 0.90ml of dilution buffer into the standard vial, let it dissolve for at least 15 mn with occasional gentle shaking. The reconstituted standard should be used immediately or aliquoted and frozen at -20°C.

Quality Control High: add 0.70ml of dilution buffer to the vial and let it dissolve for at least 15 mn with occasional gentle shaking.

Quality Control Low: add 0.70ml of dilution buffer to the vial and let it dissolve for at least 15 mn with occasional gentle shaking.

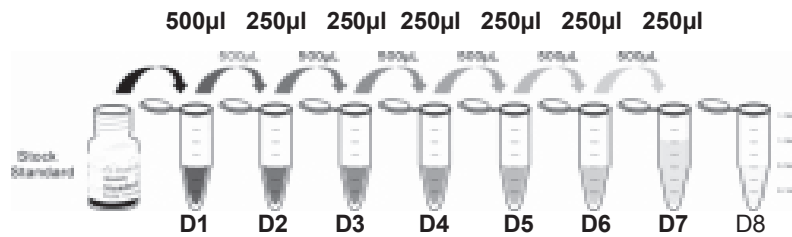
100X biotin labeled antibody: prepare 1:100 diluted work solution: for one 96 wells plate, add 130µl of 100X biotin labeled antibody to 12.870 ml of Biotin-Ab diluent, final volum = 13ml.

10X Wash solution: prepare ten-fold dilution to have 1X work wash solution: for one 96 wells plate, add 100ml of 10X wash solution in 990ml of deionized or distilled water, final volume = 1L. diluted wash solution is stable one month at 2-8°C.

Preparation of the standard dilutions:

- Prepare 3200pg/ml **D1** in a 1.5ml ependorf tube by pipetting 500 µl from the stock solution (stock solution concentration is 3200 pg/ml)
- In 7 ependorf tube containing 250 µl of dilution buffer, prepare a serial 2 fold

dilutions from D2-D7 by transferring 250 µl of **D1** into 250 µl of dilution buffer in **D2**,..... **D7**. Leave D8 blank (it contains only 250 µl of dilution buffer).



The final concentrations of the standard are respectively 3200pg/mL, 1600pg/mL, 800pg/mL, 400pg/mL, 200pg/mL, 100pg/mL, 50pg/mL and 0ng/ml.

3. Assay Procedure

1. Prepare all reagents, samples, controls and standards. Samples can be diluted at 1:3 fold and tested preferably in duplicate.
2. Add 100µL of standard, control or sample to each well and incubate for 2 hours at room temperature on orbital microplate shaker.
3. Wash 5 times with 350µl of wash solution; invert the plate and blot it strongly against paper towel.
4. Add 100µL of biotin labeled antibody solution into each well and incubate for 1 hour at room temperature on orbital microplate shaker.
5. Wash the wells 5 times according to step 3.
6. Add 100µL of Streptavidin-HRP conjugate into each well; incubate for 30 minutes at room temperature on orbital microplate shaker.
7. Wash the wells according to step 3.
8. Add 100ml of substrate solution into each well; avoid expose the microplate to direct sunlight. Covering the plate with aluminum foil is recommended. Incubate

for 10 minutes at room temperature (**up to 20 minutes is the room temperature is below 20°C**). **Do not shake the plate during incubation.**

9. Add 100µL of Stop Solution.

10. Read the absorbent at 450nm within the 5 minutes following step 9 with a microplate reader.

Annexe 6: protocole d'extraction de l'ARN total à partir des lymphocytes

Protocol for total RNA isolation from human lymphocytes using *mirVana*[™]

miRNA Isolation Kit #AM1560

I/ Reagents and materials

1. Reagents provided with the kit

- miRNA Wash Solution 1(30 ml); Add 21 mL of 100% ethanol before use
- Wash Solution 2/3 (50 ml); Add 40 mL 100% ethanol before use
- Collection Tubes (80)
- Filter Cartridges (40)
- Lysis/Binding Buffer (100 ml)
- miRNA Homogenate Additive (10 ml)
- Acid-Phenol:Chloroform (100 ml)
- Gel Loading Buffer II (1.4 ml)
- Elution Solution (5 ml)

2. Other materials needed, not provided with the kit

- RNase-free 1.5 mL or 0.5 mL polypropylene microfuge tubes
- adjustable pipettors and RNase-free tips
- ACS grade 100% ethanol
- Microcentrifuge capable of at least 10,000 x g
- RNaseZap® Solution (for RNase decontamination)
- Water bath

II/ Reagents preparation:

1. Preparation of wash solution # 1: Add 21 mL of 100% ethanol to the bottle labeled miRNA Wash Soln 1. Mix well. Place a check mark in the empty box on the label to indicate that the ethanol has been added.

Once ethanol has been added, cap the Wash Solution bottles tightly to prevent evaporation

2. Preparation of wash solution # 2/3

Add 40 mL of 100% ethanol to the bottle labeled Wash Solution 2/3. Mix well. Place a check mark in the empty box on the label to indicate that the ethanol has been added. *A precipitate may form in the Wash Solution 2/3 bottle over the next several days as excess EDTA falls out of solution. Simply leave these crystals in the bottle when removing Wash Solution for use.*

III/ Total RNA isolation procedure

1. Cells lysis

- Pre-heat a water bath at 37° C
- Remove cells from nitrogen and unfreeze rapidly by placing them into the water bath preheated at 37°C
- Resuspend the cells in the culture medium then transfer the cells in 15 ml tubes
- Gently add 1 ml of cold PBS and pelleting the cells at low speed, discard the PBS and place the washed cells on ice.
- Add 30-600 µl of the Lysis/Binding Solution (according to the number of cells in the pellet) to disrupt the cells. Use the low end of the range (~300 µL) for small numbers of cells (hundreds), and use closer to 600 µL when isolating RNA from larger numbers of cells (thousands–millions).
- Vortex or pipet vigorously to completely lyse the cells and to obtain a homogenous lysate. Cell cultures typically do not require mechanical homogenization; however, it will not damage the RNA. Large frozen cell pellets (i.e. more than about 10⁷ cells) may need to be ground to a powder as described for frozen tissue samples to isolate high quality RNA.

2. Organic extraction

- Add 1:10 volume of miRNA Homogenate Additive to the cell lysate, and mix well by vortexing or inverting the tube several times. For example, if the lysate volume is 300 μ L, add 30 μ L miRNA Homogenate Additive.
- Leave the mixture on ice for 10 min.
- Add a volume of Acid-Phenol:Chloroform that is equal to the lysate volume before addition of the miRNA Homogenate Additive. For example, if the original lysate volume was 300 μ L, add 300 μ L Acid-Phenol:Chloroform.

NB: *Be sure to withdraw from the bottom phase in the bottle of Acid-Phenol:Chloroform, because the upper phase consists of an aqueous buffer.*

- Vortex for 30–60 sec to mix.
- Centrifuge for 5 min at maximum speed (10,000 x g) at room temperature to separate the aqueous and organic phases. After centrifugation, the interphase should be compact; if it is not, repeat the centrifugation (Fig. 1.).
- Carefully remove the aqueous (upper) phase without disturbing the lower phase, and transfer it to a fresh tube. Note the volume removed. At the end of this procedure, RNA can be eluted in either nuclease-free water or in the Elution Solution provided with the kit. Elution Solution is nuclease-free 0.1 mM DTA, if this could interfere with your application, elute in nuclease-free water instead.
- Preheat Elution Solution or nuclease-free water to 95°C for use in eluting the RNA from the filter at the end of the procedure.
- Warm the 100% ethanol to room temperature (if it is stored cold) before starting the Final RNA Isolation.

- Add 1.25 volumes of room temperature 100% ethanol to the aqueous phase (e.g. if 300 μ L was recovered in step 2.6, add 375 μ L ethanol) and mix thoroughly.
- Pipet the lysate/ethanol mixture (from the previous step) onto the Filter Cartridge. Up to 700 μ L can be applied to a Filter Cartridge at a time, for samples larger than this, apply the mixture in successive applications to the same filter.
- Centrifuge for ~15 sec at RCF 10,000 x g (typically 10,000 rpm) to pass the mixture through the filter. Spinning harder than this may damage the filters. Alternatively, vacuum pressure may be used to pass samples through the filter.
- Discard the flow-through, and repeat until all of the lysate/ethanol mixture is through the filter. Reuse the Collection Tube for the washing steps.
- Wash the filter with 700 μ L miRNA Wash Solution 1: apply 700 μ L miRNA Wash Solution 1 (working solution mixed with ethanol) to the Filter Cartridge and centrifuge for ~5–10 sec or use a vacuum to pull the solution through the filter. Discard the flow-through from the Collection Tube, and replace the Filter Cartridge into the same collection Tube.
- Wash the filter twice with 500 μ L Wash Solution 2/3: apply 500 μ L Wash Solution 2/3 (working solution mixed with ethanol) and draw it through the Filter Cartridge as in the previous step. Repeat with a second 500 μ L aliquot of Wash Solution 2/3.
- After discarding the flow-through from the last wash, replace the Filter Cartridge in the same Collection Tube and spin the assembly for 1 min to remove residual fluid from the filter.
- Elute RNA with 100 μ L 95°C Elution Solution or Nuclease-free Water: Transfer the Filter Cartridge into a fresh Collection Tube (provided with the kit). Apply

100 μ L of pre-heated (95°C) Elution Solution or nuclease-free water to the center of the filter, and close the cap. Spin for ~20–30 sec at maximum speed to recover the RNA.

- Collect the eluate (which contains the RNA) and store it at -20°C or below.



Figure 1. Separation of 2 phases using Acid-phenol:Chloroform method to extract total RNA

Annexe 7 : protocole de retranscription de l'ARN en cDNA

Protocol for Quantitative conversion of total RNA to cDNA

I/ Reagents and materials

1. The kit content

Component	Quantity
• 10X RT Buffer, 1.0 mL	2 tubes
• 10X RT Random Primers, 1.0 mL	2 tubes
• 25X dNTPs, 1.0 mL	1 tube
• MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/μL, 1.0 mL	1 tube

2. Equipments not supplied with the kit

- GeneAmp® PCR System 9700 or 9600 thermal cycler
- Centrifuge with 96-well adapter
- Microcentrifuge
- Vortexer
- Bulkpack MicroAmp® Caps, 12 Caps/Strip
- Bulkpack MicroAmp® Caps, 8 Caps/Strip
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates and Optical Caps
- MicroAmp® Optical Caps, 8 Caps/Strip
- Reagent Tubes with Caps, 10-mL
- RNase Inhibitor

- Nuclease-free H₂O
- Pipette tips, aerosol-resistant
- Pipettors, positive-displacement

III/ Prepare 2X RT master mix using the kit components

- Allow the kit components to thaw on ice.
- Calculate the volume of components needed to prepare the cDNA archive reaction plate, using the table below. Include additional reactions in the calculations to provide excess volume for the loss that occurs during reagent transfers.
- Pipette the required volumes of components into a 10-mL polypropylene tube.
- Place the 2X RT master mix on ice until you prepare the cDNA archive reaction plate.

Component	Volume (µL) / Reaction
10X Reverse Transcription Buffer	10
25X dNTPs	4
10X random primers	10
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL	5
Nuclease-free H ₂ O	21
Total per Reaction	50

III/ Prepare the cDNA archive reaction plate:

- Pipette 50 μ L of 2X RT master mix into each well of a 96-well reaction plate.
- Pipette 50 μ L of RNA sample into wells, pipetting up and down two times to mix.
- Cover the plate with caps.
- Briefly centrifuge the plate to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.
- Place the plate on ice until you are ready to load the thermal cycler.

IV/ Perform reverse transcription:

- Program the thermal cycler conditions using GeneAmp® PCR System 9700 or 9600 thermal cycler. These conditions are optimized for use with the High-Capacity cDNA Archive Kit.

	Step 1	Step 2
Temperature	25 °C	37 °C
Time	10 min	120 min

- Set the reaction volume to 100 μ L.
- Load the reaction plate into the thermal cycler.
- Start the reverse transcription run.
- Store cDNA archive plates at 2 to 6 °C for short-term storage (up to 24 hours before use) or at –15 to –25 °C for long-term storage. For prolonged storage at 2 to 6 °C, add EDTA to a final concentration of 1mM to chelate cations and to prevent nucleic acid degradation.

Annexe 8 : protocole d'amplification du gène AGER1 (qui code pour le recepteur RAGE) au LightCycler (qPCR).

PROTOCOLE D'AMPLIFICATION DU GENE HUMAIN AGER : PROGRAMME PCR LightCycler

Etape-1 : Pré-incubation

Caractéristique du Programme	Valeur
Cycles	1
Mode d'analyse	None
Température (°C)	95
Temps d'incubation	10mn
Taux de transition (°C/S)	20
Mode d'acquisition	None

Etape-2 : Amplification

Caractéristique du Programme	Valeur		
Cycles	40		
Mode d'analyse	Quantification		
	Segment -1	Segment-2	Segment-3
Température (°C)	95°	55°	72°
Temps d'incubation	15s	20s	30s
Taux de transition (°C/S)	20	20	1
Mode d'acquisition	None	None	Single

Etape-3 : Elongation Terminale

Caractéristique du Programme	Valeur
Cycles	1
Mode d'analyse	None
Température (°C)	72
Temps d'incubation	10mn
Taux de transition (°C/S)	20
Mode d'acquisition	None

Etape-4 : Refroidissement

Caractéristique du Programme	Valeur
Cycles	1
Mode d'analyse	None
Température (°C)	35
Temps d'incubation	30
Taux de transition (°C/S)	20
Mode d'acquisition	None