

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

UNIVERSITE DE BAMAKO

REPUBLIQUE DU MALI

UN PEUPLE – UN BUT – UNE FOI

**FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE  
ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE**

Année Universitaire 2003-2004

Thèse N° .....

**TITRE :**

**Etude épidémio-clinique et moléculaire du  
Paludisme à *Plasmodium falciparum* par la MSP-1  
à Missira  
( Cercle de Kolokani )**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le ..... Juin 2004 devant la Faculté de  
Médecin, de pharmacie et d'Odonto-Stomatologie  
Par

**Houssein Youssouf DARAR**

Pour l'obtention du diplôme de **Docteur en Médecine ( Diplôme D'état )**

**Membres du Jury**

Président : Professeur Amadou Diallo  
Membres : Docteur Seydou Doumbia  
Co-directeur de thèse : Docteur Ousmane Koita  
Docteur Soukalo Dao  
Directeur de Thèse : Professeur Abdel Kader Traoré

Les travaux ont été effectués dans le Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée  
(Université de Bamako) avec le soutien du Tulane University et du NIAID/NIH.

# DEDICACES

## LOUANGE A VOUS SEIGNEUR, LE TOUT PUISSANT



### Sourate AL- FATIHA

- [1] Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.  
[2] Louange à Allah, Seigneur de l'univers.  
[3] Le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux,  
[4] Maître du Jour de la rétribution.  
[5] C'est Toi (Seul) que nous adorons, et c'est Toi (Seul) dont nous implorons secours.  
[6] Guide-nous dans le droit chemin,  
[7] le chemin de ceux que Tu as comblés de faveurs, non pas de ceux qui ont encouru Ta colère, ni des égarés.

Amin !!!

## **DEDICACES**

Je dédie ce travail :

**A ALLAH “ soubhanal ahou wa taalla ”**, le Tout Puissant, le Clément et le Tout Miséricordieux,

Qui m’a donné la vie et m’a accordé la chance de faire cette thèse.

Puis-je Seigneur jusqu’à la fin de ma vie Te servir, T’adorer, et n’effectuer que des œuvres positives et constrictives ?

**Au Prophète Mohamed,**

Que les bénédictions et la paix de Dieu soient sur Toi. Nous te témoignons notre respect et notre gratitude pour tout ce que Tu as fait pour le bien de l’humanité.

**A la mémoire de ma tante, MOUMINA DARAR ROBLEH,**

Vous nous avez été rappelé auprès du seigneur le Tout Puissant, certes « Tout âme goûtera la mort. Et c’est vers Nous que vous serez ramenés. (S29,V57) », et je prie le seigneur pour que la terre te soit légère. Le fruit de mon travail est le vôtre et j’espère en être digne de votre confiance. J’aurais aimé que vous soyez là en ce moment mémorable qui voit l’aboutissement et la réalisation de tous les travaux consentis.

**A la mémoire de mon frère, AHMED MOHAMED AHMED ALAWI,**

Merci à toi, pour toute ta confiance, ta générosité et tous les aides que tu m’as apportées. Ta disparition reste un souvenir amer. Dors en paix, frère et qu’Allah Le Clément t’accepte dans son paradis éternel. Amen .

**A ma grande mère, MARIAN MIGUIL EGUEH,**

**Macooyo**, je t’en serais toujours reconnaissant à tout jamais. Je me rappelle comme si c’était hier, le jour où tu me tenais par la main en m’amenant à l’école. Je pleurais car je voulais rester auprès des miens, certes vous avez déjà compris que c’était le chemin de la réussite. Ce travail est le vôtre. Merci mami.

**A mon père, YOUSOUF DARAR GUEDI,**

Vous êtes pour moi un exemple, par votre loyauté, votre rigueur, votre servitude, et votre humilité. Que de sacrifices n'avez vous pas consentis pour faire de vos enfants, des modèles. Merci **Aboo**, pour tout, je t'en serais toujours reconnaissant et défendrais avec honneur les valeurs que vous avez épousées.

**A ma mère, GASSIRA HASSAN ROBLEH,**

Mama, les mots me manquent pour exprimer ma gratitude. Tout ce que j'emploierais sera faible mais sache que pour nous tu a toujours agit en une mère exemplaire et tu nous as prodigué le respect, l'amour et la bonté. Tu t'es toujours privée de tous pour que tes enfants n'envient rien à personne. Merci.

Ce travail est le fruit, le labeur de l'assistance nécessaire que vous m'avez apporté.

**Hooyo**, qu'ALLAH puisse t'apporter santé, bonheur, longévité.

**A mes tantes paternelles et maternelles,**

**HAWA et BASRA HASSAN, AICHA KED, SAADA DARAR,**

Je vous remercie pour tous l'aide que vous m'avez apporté et ce travail est le vôtre.

**A mes sœurs, MARIAM DEKA et IBADO,**

Votre soutien moral, physique et fraternel ont contribué à la réalisation de ce travail.

Ce travail est le vôtre, soyez en fier et je vous aime de tout mon cœur. Qu'ALLAH prospère vos foyers.

**A mes cousins et cousines paternelles,**

**MOHAMED ALI, NADIRA ET OMAR DJAMA, ALI ET RACHID HASSAN**

Merci à vous pour l'aide que vous m'avez apportée et qu'ALLAH met la miséricorde et la bonté dans vos familles, qu'ALLAH vous accorde santé, longévité et une meilleur destinée dans l'au delà. AMEN.

**A mes cousins et cousines maternelles,**

**DAHABO, HABIBA et ROBLEH ELMI, SAIDA, DEKA, CHOUKRI et WARMOOG AHMED,**

Ce travail est le vôtre et qu'ALLAH vous accorde santé et succès sur cette terre.

**A mes neveux et nièces,**

**LIBAN ET BILAN MED et leur mère OUBAH ELMI,  
HASSAN, SOUMAYO, AFNAN et leur père ISMAEL,  
MOUNA, MAHADO, ARAFO, DEKA, BOUHO,... et ISMAEL,  
ADEN et ABOUBAKER.**

Puisse ce travail être une source d'inspiration.

**A Leila Mohamed,** ce travail est le tien.

Fidélité et sincérité éternelle.

**Aux victimes du paludisme,** aux enfants et aux femmes enceintes qui constituent sa population cible.

**Aux victimes du VIH,** je nourris d'espoir.

**Aux victimes du cancer,**

Que la terre vous soit légère. Amen.

**A tous les chercheurs,**

Votre cause est noble, Je nourris l'espoir qu'un jour nous parviendrons à un vaccin.

# REMERCIEMENTS

## REMERCIEMENTS

A ma chère patrie, le Djibouti

Puisse ce modeste travail contribuer à la construction nationale et faire de notre pays une référence internationale sur tous les plans.

A mon pays d'accueil, le Mali

Vous m'avez accueilli et m'avez permis d'asseoir ma soif de science. Ainsi, j'ai pu réaliser mon rêve et ma vocation. Merci.

**Au SCAC de Djibouti et de Bamako**, merci pour l'attribution de cette bourse qui m'a permis de réaliser le plus beau de mes rêves.

**A mes aînés,**

**les docteurs Abdillahi, Abdoukader, Abdi, Gamiyeh, Idriss, Ibrahim, Abdoulaye Diarra, Ahmed Ouattara, Abou Kampo, Bagayogo M.W , et Belco.**

Merci, pour tous les conseils précieux que vous m'avez apportés, votre gentillesse et votre rigueur pour le respect des bonnes règles de la société.

**Dr Hamadoum Aly Sangho**, C'est le lieu de vous réitérer toute ma reconnaissance et mon profond respect. Encore merci pour tous les services rendus et surtout vos soutiens et conseils permanents. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

**Dr Sory Diawara**, Je tiens à vous remercier pour l'aide inestimable que vous m'avez apportée lors de l'analyse de mes données. Vous avez toute ma reconnaissance et mon respect.

**A mes compatriotes de Bamako,**

**Mohamed Osman, Maoulid Abdillahi, Houda Mohamed, Issa Abdi, Fahd Ali et sa famille, Said Ali et sa famille, Gouled Houssein, Amir Mohamed, Moumin Waberi et sa famille , Mouna Mohamed, Aramis et Lieutenant Niazi.**

Nous avons partagé ensemble des beaux et des difficiles moments. J'ai été séduit par vos rigueurs, vos loyautés et vos respects pour votre prochain. C'est l'occasion

pour moi de manifester toute ma sympathie et ma fraternité envers vous. Je souhaite que notre collaboration puisse continuer jusqu'à la fin de temps.

**A mes petits frères et sœurs de Bamako,**

**Ahmed Mohamed, Yassin Mohamed, Souleiman Nour, Moustapha Abdi, Nima Ibrahim, Badr, Riyad, Bilan, Sitana, Soubaneh Osman, Samar Mohamed et Khanim.**

C'était un moment de joie que nous avons passé ensemble à Bamako. Et Incha Allah, c'est ne que le commencement d'une longue et belle amitié.

**A mes amis et amies,**

**Gouled, Picket, Liban, Keyseh, Houssein, Abdillahi, Mohamed, Arafo, Mahdi, Mahabe, Idriss, Zam-Zam, Zahra, Oubah, Fatou .**

A tous les amis et amies de **Rue de Zeila,**

A tous mes camarades du **Collège d'Ali-Sabieh,**

A tous mes camarades du **Lycée d'Etat.**

**A mes amis et amies de Bamako,**

**Idrissa, Bassirou, Madiassa, Gaoussou, Diakaridia, Modibo, Cheik, Armelle, Tatie, Sonia, Sandrine, Francine, Tchely, Berved, Joseph, Luc, Kader, Edmond, Rakia, Hadiza, Marie, Ramatou, Monique, Touti, Moctar, Diouf, Bous, Arabaha, Yous, Guy, Badra, Fall, Sidibe, Diabi, Seydou, Muriel, Dan, Adamou, Diakite, Youba, Garba, Sangaré, Babarou, Saley, Hamsatou, Tapily, Djeneba, Roumana Awa,**

**Au services de Maladies Infectieuses,**

**Dr SounKalo Dao,** merci à vous pour toute votre aide. Je ne peux jamais oublier la sympathie, la gentillesse, les conseils et la confiance que vous avez portés à moi. Recevez l'expression de mes vifs et sincères remerciements et de mon profond respect.

**Dr Sidibe Fofana Assetou,** Major **Coulibaly** et aux infirmiers **Hawa, Manson, Fatim**

Aux internes, **Idrissa, Drissa, Anderson, Lynda, Oumarou, Jean Paul, Sylvie, Maimouna, Omar et Moussa.** Et aux internes de sixième année.

Chers collègues, c'est ne point à travers des mots que je pourrais témoigner toute mon affection envers vous. Vous avez été présents pour moi dans les moments de joie de bonheur et de tristesse. Merci à vous.

**Aux personnels de Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de la FAST, Dr Ousmane KOITA**, merci pour l'aide que vous m'avez apporté durant toute la réalisation de cette thèse. Votre simplicité, votre dévotion, et votre amour pour la science m'a réellement séduit.

Aux Docteurs : **Bagayoko MW, Sissako A, Coulibaly A, Alzouma S, Tall M.**

Aux thésards : **Ibrah, Djeneba, Titi, Aba, Karim, Aissata, Cheick, Hadiza, Maiga, Moctar, Zibo, Penda.**

Aux étudiants de DEA : **Bintou, Rabi, Ousseiny, Mariam, Assa, Fanta.**

Aux maîtrisard : **Baco, Mangara, Benjamin, Dekoro,**

A la secrétaire : Mme **Kadiatou Bamba**, et l'informaticien : **Amadou**

Aux personnels de l'ADRAO : **Ipou, Cissoko** et la stagiaire : **Stéphanie**

Aux manœuvres et gardiens : **Amadou, Fofana, Thomas**

Chers amis et collègues, il n'y a point de mots pour manifester toute l'admiration que je porte pour vous. Vous m'avez été d'une aide inestimable. Ce travail est le vôtre. Je prie Dieu, le Tout puissant, pour qu'il nous réserve un meilleur avenir radieux dans l'amour et la paix. Et je souhaite une bonne finition pour les internes effectuant leur thèse. Merci à vous tous.

A la famille **Diarra et Koné**

A ce qui de près ou de loin m'ont apporté leurs contributions pour la réalisation de cette thèse, je vous en serais toujours gré.

## **AUX MEMBRES DU JURY**

### A nos maîtres et juges :

« L'homme qui veut s'instruire doit d'abord lire, et puis voyager pour rectifier ce qu'il a appris. Savoir mal est pire qu'ignorer, et Montaigne dit qu'il faut bien savoir » Et le plus simple serait de recourir aux bons offices d'un maître compétent.

*Mémoires, CASANOVA DE SEINGALT*

♥ A notre maître et président du jury :

*Professeur Amadou DIALLO*

***Ancien chef de DER des sciences fondamentales à la FMPOS***

***Professeur de Zoologie et de Biologie Cellulaire à la FMPOS***

Cher maître,

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Nous avons beaucoup apprécié vos qualités scientifiques, professionnelles et humaines. Vous avez avec promptitude accepté de juger ce travail.

Chaleureux, modeste et affectueux, vous faites l'admiration de tous.

Veillez accepter cher maître, l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

♥ A notre maître et juge :

**Docteur Seydou DOUMBIA**

*Docteur en Médecine, Ph.D en Epidémiologie*

*Assistant de Santé Publique, FMPOS*

*Chef de l'unité d'Epidémiologie et Système d'Information Géographique au  
Malaria Research and Training Center, FMPOS*

Cher maître,

Nous sommes très heureux de vous compter aujourd'hui parmi les membres de ce jury. Votre disponibilité constante, vos conseils et vos suggestions nous ont toujours permis d'améliorer la qualité de ce travail.

C'est le lieu pour nous de vous adresser nos sincères  
remerciements.

♥ A notre maître et co-directeur de thèse :

*Docteur Sounkalo DAO*

**Diplômé de Maladies Infectieuses et Tropicales**

*Assistant Chef de Clinique, Praticien hospitalier*

**Chargé de cours de Pathologie Infectieuse à la Faculté de Médecine  
de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Mali.**

Cher maître,

Vous m'avez fait honneur en m'acceptant dans votre service. Nous avons beaucoup admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques. Tout au long de ce travail, vous nous avez prodigué des conseils judicieux et contribué à l'amélioration de sa qualité. Votre simplicité, votre disponibilité et surtout votre souci constant pour notre formation, forcent l'admiration et font de vous un maître de référence.

Nous sommes très reconnaissants et nous exprimons toute notre gratitude.

♥ A notre maître et co-directeur de thèse :

Docteur Ousmane **KOITA**

Pharmacien biologiste D, PhD en Biologie Moléculaire

Responsable du Laboratoire de Biologie moléculaire Appliquée à la Faculté de Sciences et Techniques, Bamako, Mali

Directeur adjoint du programme de recherche NIAD (NIH)/FMPOS sur le SIDA et la Tuberculose

Chargé de cours de Biologie Moléculaire à la FAST, Bamako.

Cher maître,

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez faite en nous proposant ce travail. Vous avez initié, guidé et suivi ce travail malgré vos multiples occupations.

Nous avons apprécié vos qualités scientifiques, humaines, et surtout votre amour pour le travail bien fait. Ces qualités couplées à votre simplicité et votre générosité font de vous un maître respecté.

Votre façon particulière d'établir un rapport basé sur la confiance entre le professeur et son élève, faite et remplie d'affection, d'écoute, de rigueur et d'exigences scientifiques, a orienté tout notre dévouement vers le chemin de la science.

Recevez, cher maître toute notre gratitude et notre profonde considération.

♥ A notre maître et directeur de thèse :

**Professeur Abdel Kader TRAORE**

*Maître de conférence Agrégé de Médecine Interne*

***Chargé de cours de Sémiologie Médicale et de Pathologie Endocrinienne à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie du Mali.***

*Directeur du Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie.*

Cher maître,

Il me manque des mots pour vous remercier des efforts que vous avez déployés pour que ce travail puisse se concrétiser.

Votre modestie, vos qualités scientifiques et pédagogiques, votre rigueur et dynamisme font de vous un maître tant apprécié.

Vous constituez une référence pour la jeunesse de ce pays en quête de repère. Et nous sommes très honoré d'être parmi vos élèves.

Permettez-moi cher maître de vous adresser l'expression de ma vive reconnaissance et de mon profond respect.

*Chers maîtres, que Dieu par la vérité maintienne votre bannière dressée et vous accorde une récompense parfaite ici-bas et dans la dernière demeure, car Il est l'Omniscient et L'Omnipotent.*

*Amin !*

# SOMMAIRE

## SOMMAIRE

	Page
<b>1 Introduction</b>	<b>1</b>
<b>2 Objectifs</b>	<b>5</b>
<b>3 Généralités sur le paludisme</b>	<b>7</b>
3.1. Historique	8
3.2. Epidémiologie	9
3.2.1. les faciès épidémiologiques	9
3.2.1.1. En Afrique	9
3.2.1.2. Au Mali	11
3.2.2. Agents pathogènes	12
3.2.3. Les vecteurs	12
3.2.4. Cycle biologique	13
3.2.4.1 La schizogonie hépatique	14
3.2.4.2 La schizogonie intra-érythrocytaire	14
3.2.4.3 Formation des gamétocytes	16
3.2.5 L'anémie associée au paludisme	17
3.2.5.1 Ampleur de l'anémie en zone sub-saharienne	17
3.2.5.2. Physiopathologie	17
3.2.6 Splénomégalie et paludisme	18
3.2.6.1 Splénomégalie palustre	18
3.2.6.2 Splénomégalie tropicale idiopathique	19
3.2.6.3 Paludisme viscéral évolutif	20
3.3. Généralités sur le polymorphisme génomique de <i>P. falciparum</i>	21
3.3.1 Généralités sur l'antigène de surface du merozoite	22
3.3.1.1 Structure et organisation	22
3.3.1.2 Fonction	22
3.3.1.3 Expression	22

3.3.2. Méthodes utilisées pour la mise en évidence du polymorphisme chez <i>P. falciparum</i>	24
3.3.2.1 Méthodes immunologiques	24
3.3.2.2 Méthodes de la biologie Moléculaire	24
3.3.2.2.1 RFLP	24
3.3.2.2.2 PCR	25
3.4. Les antipaludiques	30
3.4.1 Classification	30
3.4.1.1 Selon leur activité	30
3.4.1.2 Selon la structure chimique	30
3.4.1.3 Les associations	31
3.2 Les stratégies nationales de prise en charge	32
<b>4 Méthodologie</b>	<b>35</b>
4.1 Cadre et lieu d'étude	36
4.1.1 Présentation de la zone d'étude	36
4.1.2 Hydrographie	38
4.1.3 Structure actuelle de la population	40
4.2. Type de l'étude	41
4.3 Période d'étude	41
4.4 Echantillonnage	41
4.5. Critères d'inclusion et de non inclusion	41
4.6. Variables mesurées	42
4.6.1 Technique de mesure et de collecte des variables	42
4.6.2 Variables mesurées	42
4.6.2.1 Variables sociodémographiques	42
4.6.2.2 Variables cliniques	42
4.6.2.2.1 Matériels	42
4.6.2.2.2 Paramètres cliniques	43
4.6.2.2.3 Evaluation de la courbe de température	43
4.6.2.2.4 Appréciation de la rate	43
4.6.3 Variables para cliniques	45
4.6.3.1 Paramètres parasitologiques	45
4.6.3.1.1 Goutte épaisse	46

4.6.3.1.2 Frottis mince	48
4.6.3.2 Paramètres hématologiques	49
4.6.3.2.1 Hémoglobine	49
4.6.3.3 Technique de Biologie Moléculaire	51
4.6.3.3.1 Polymerase Chain Réaction	51
Protocole d'extraction de l'ADN parasitaire de <i>P. falciparum</i> avec le Chelex-100	51
4.7. Définition des cas	59
4.8. Prise en charge des malades	60
4.8.1 Paludisme simple	60
4.8.2 Paludisme grave	61
4.9. Organisation du travail	62
4.9.1 Poste clinique	62
4.9.2 Poste biologique	63
4.10. Gestion et exploitation statistiques des données	63
4.11. Considération éthiques	64
<b>5 Résultats</b>	<b>66</b>
<b>5.1- Aspects descriptifs</b>	<b>66</b>
5.1.1 Données sociodémographiques	66
5.1.2 Etudes cliniques	67
5.1.3 Etude de la PCR	70
<b>5.2. Etudes analytiques</b>	<b>74</b>
5.2.1 Résultats paludométriques	74
5.2.2 Résultats cliniques	76
5.2.3 Résultats de la PCR selon dans les différents allotypes	79
<b>VII Discussion</b>	<b>92</b>
1. Méthodologie	93
2. Caractéristique de la population étudié	95
3. Prévalence de l'infection palustre	96
4. L'anémie	98
5. la splénomégalie	100

6.	La fièvre	100
7.	Résultats de la PCR	101
7.1	Sensibilité et spécificité de la PCR	102
7.2	Clonalité	102
<b>8</b>	<b>Conclusion</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>Recommandations</b>	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>109</b>

## **11 Annexes**

## **LISTE DES FIGURES**

	<b>Page</b>
1- Cycle évolutif du Plasmodium	16
2- Structure du gène de la MSP-1	23
3- Structure des trois allotypes du bloc 2 de la MSP-1 et de la forme hybride	23
5- Schéma de la dénaturation	27
6- Schéma de l'hybridation	28
7- Schéma de l'élongation	29
8- Limites géographiques de la Boucle de Baoulé	39
9- Classification des splénomégalies selon Hackett	44
10- Réalisation de la goutte épaisse et du frottis mince	47
11- Confetti en spot	55
12- Fréquence de la splénomégalie	70
13- Fréquence des allotypes en fonction des la clonalité	72
14- Fréquence des génotypes de MSP-1	73
15- Distribution des allotypes en fonction des amplicons	73

### **Photos**

1. Exemple de photo d'un gel après amplification et électrophorèse	59
--	----

## **LISTE DES TABLEAUX**

	<b>Page</b>
1. Séquence des amorces utilisées	54
2. Composition du mélange réactionnel 1	55
3. Composition du mélange réactionnel 2	56
4. Répartition de la population étudiée selon le sexe	66
5. Répartition par âge de la population d'étude	66
6. Prévalence de l'infection plasmodiale	67
7. Distribution des densités parasitaires	67
8. Les différentes espèces plasmodiales à Missira	68
9. Prévalence de l'anémie dans notre étude	68
10. Prévalence de l'anémie sévère	68
11. Distribution des cas de fièvre dans notre étude	69
12. Distribution de la taille de la rate dans notre étude	69
13. Répartition des échantillons en fonction des résultats de la PCR	70
14. Prévalence des l'allotype de MSP-1 dans notre population d'étude	71
15. Polymorphisme de taille au sein de notre population	71
16. Répartition en fonction du nombre et des types d'allotypes	72
17. Distribution de la fréquence de l'infection plasmodiale selon l'âge	74
18. Distribution des cas d'anémies selon la goutte épaisse	74
19. Relation entre les charges parasitaires et le paludisme clinique	75
20. Relation entre les charges parasitaires et l'âge	75
21. Relation entre l'âge et le syndrome palustre	76
22. Distribution des cas d'anémies selon l'âge	76
23. Distribution des cas d'anémies selon le sexe	77
24. Distribution des classes d'âges en fonction de la fièvre	77
25. Distribution de charges parasitaires selon la fièvre	78
26. Relation entre la fièvre et les espèces plasmodiales	78
27. Distribution de la splénomégalie en fonction de l'âge	79
28. Distribution de la splénomégalie en fonction du sexe	79
29. Relation entre la splénomégalie et les charges parasitaires	80

30.	Répartition de la goutte épaisse en fonction de la PCR	80
31.	Répartition de la goutte épaisse en fonction de la PCR	81
32.	Répartition de la PCR en fonction de l'âge	81
33.	Relation entre la PCR et les cas de syndromes palustres	82
34.	Répartition de l'anémie en fonction de la PCR	82
35.	Relation entre la PCR et les charges parasitaires	83
36.	Relation entre la PCR et les espèces plasmodiales	83
37.	Répartition des allotypes en fonction de l'âge	84
38.	Répartition des allotypes en fonction du sexe	84
39.	Relation entre la fièvre et les infections allotypiques de MSP-1	85
40.	Relation entre l'anémie et les infections allotypiques	85
41.	Relation entre la splénomégalie et les infections allotypiques	86
42.	Relation entre la splénomégalie et l'allotype MAD20	86
43.	Relation entre le syndrome palustre et les infections allotypiques de MSP-1	87
44.	Relation entre la positivité de la goutte épaisse et les infections allotypiques de MSP-1	87
45.	Relation entre les charges parasitaires et les infections allotypiques de MSP-1	88
46.	Relation entre la fièvre et les associations allotypiques	88
47.	Relation entre l'anémie et les associations allotypiques	89
48.	Relation entre la splénomégalie et les associations allotypiques	89
49.	Relation entre le syndrome palustre et les associations allotypiques	90
50.	Relation entre la positivité de la goutte épaisse et les associations allotypiques	90
51.	Relation entre les charges parasitaires et les infections allotypiques de MSP-1	91

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ARN	:	Acide Ribonucléique
CD36	:	Cellule de Différenciation antigénique
CHME	:	Centre Hospitalier Mère-Enfant du Luxembourg
CHU	:	Centre Hospitalier Universitaire
dNTP	:	dinucléotide triphosphate
FAST	:	Faculté des Sciences Techniques
FM	:	Frottis Mince
FMPOS	:	Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
GE	:	Goutte Epaisse
GPI	:	glycosylphosphatidyl inositol
HRP-2	:	Histidin-Rich Protein-2
IGM	:	Institut Géographique du Mali
IL1, IL6	:	Interleukine 1,6
INF $\gamma$	:	Interferon Gamma
LBMA	:	Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
MgCL <sub>2</sub>	:	Chlorure de magnésium
MSP-1	:	Merozoite Surface Protein -1
<b>MSP-2</b>	:	<b>Merozoite-Surface-Protéine -2</b>
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
RFLP	:	Polymorphisme de longueur de fragment de restriction
SIDA	:	Syndrome Immuno-Déficienc Acquis
TNF $\alpha$	:	Tumor Necrosis Factor Alpha

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire, une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due au développement et à la multiplication chez l'homme d'hématozoaires du genre *Plasmodium*. Ces parasites sont inoculés à l'homme par la piqûre d'un moustique, l'Anophèle femelle (1).

C'est une maladie tropicale qui sévit sur un mode endémo-épidémique et pose un problème majeur de santé publique dans les pays en voie de développement. Ses conséquences socio-économiques sont redoutables (2).

En 2001, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait que 2,7 milliards de personnes étaient exposées au paludisme et que 1,5 à 2,5 millions étaient victimes du paludisme (2). En progression constante, la maladie touche actuellement plus de 90 pays dans le monde et son incidence est chiffrée par l'OMS entre 300-500 millions de cas cliniques par an, avec un nombre de décès de 1,5 à 2,7 millions (3).

L'Afrique sub-saharienne est la plus touchée avec plus de 90 % des cas par an. Cette endémie est responsable de 1,2 millions de décès chez les enfants de moins de 5 ans et de 17% de l'ensemble des hospitalisations (4).

Dans la zone subtropicale et au Mali, deux principaux vecteurs sont incriminés dans la transmission du paludisme : *Anopheles gambiae s.l.* et *Anopheles funestus* (5). Les données parasitologiques obtenues lors de différents travaux au Mali, montrent que quatre espèces plasmodiales sont rencontrées : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, et *P. vivax*. *Plasmodium falciparum* est la plus répandue et la seule meurtrière surtout en saison de transmission (6).

Au Mali, le paludisme sévit sur tout le territoire. Les statistiques nationales estiment que le paludisme est la première cause de mortalité (13 %) et de morbidité (15,6 %) dans la population générale (7).

Il constitue en outre la première cause de consultation dans les services de santé maternelle et infantile et dans les services de pédiatrie à l'Hôpital Gabriel Touré soit 49,7% (8). Il occupe la deuxième place dans les étiologies des syndromes fébriles en médecine interne à l'Hôpital du point G soit 12,8% (9). La mortalité spécifique liée à cette érythrocytopathie dans la population des enfants de moins de 5 ans est estimée entre 25 et 35% de la mortalité infanto-juvénile globale (10). Ces décès sont imputables à deux complications principales : le neuropaludisme et l'anémie.

Des nombreuses études ont établi que le paludisme peut se compliquer dans ses formes simples et sévères par une atteinte des lignées sanguines provoquant notamment des anémies aiguës, parfois sévères et mortelles. D'autres auteurs laissent penser que d'autres lignées telles que les plaquettes et les polynucléaires pourraient être également affectées (11).

Durant la saison des pluies, 50% des anémies chez la femme enceinte sont imputables au paludisme (12). La fréquence d'association de l'anémie sévère avec les autres formes de paludisme graves et compliquées a été estimée à 13 % avec les formes neurologiques, 9,8% avec l'hypoglycémie, 38% avec la détresse respiratoire et 3,6% avec les hyperparasitemies supérieures ou égales à 50.000 trophozoites par microlitre ( $\mu$ l) de sang. Dans 13,2 % des cas, l'anémie sévère était isolée. La mortalité associée à l'anémie a été observée dans le cadre des seules formes cliniques de paludisme graves et compliquées. Cette mortalité est estimée à 4,7% en cas d'anémie modérée et à 6,2% en cas d'anémie sévère (13,14).

Certains résidents des régions d'endémie palustre d'Afrique tropicale et d'Asie ont une réponse immunologique anormale aux infections répétées et se caractérisent par une splénomégalie massive (15).

Selon Gentilini, les parasitoses avec le paludisme au premier rang sont les causes les plus fréquentes de la splénomégalie tropicale (2). Cette splénomégalie palustre traduit la phagocytose des hématies parasitées et du pigment palustre. Elle a été l'objet de beaucoup d'études en Afrique, notamment en 1992, au CHU de Cocody en Côte d'Ivoire où l'incidence pédiatrique hospitalière de la splénomégalie était de 1,6 % (16).

Au Mali, une première étude faite en 1977 montre que les splénomégalies représentent 4,5% des hospitalisations à l'hôpital du Point G dont 9,6% des splénomégalies tropicales idiopathiques (17). En milieu rural, la prévalence de la splénomégalie est de 17% (18).

En effet, les études ont montré que la prévalence de la splénomégalie est plus élevée en milieu rural qu'en milieu urbain (19,20).

L'utilisation récente des techniques immunologiques et de biologie moléculaire ont ouvert une nouvelle dimension de la complexité de l'épidémiologie du paludisme. Ces techniques ont démontré que les souches de *P. falciparum* peuvent se différencier par leur profil antigénique (21) et par leur sensibilité ou résistance aux antimalariques (22).

Ces dernières années, des marqueurs polymorphiques obtenus à partir du génome ont permis d'identifier par la technique de Polymerase Chain Reaction (PCR) des micro-organismes appartenant à la même espèce mais avec des profils génétiques différents. En plus, il a été observé que ces micro-organismes génétiquement différents peuvent co-exister dans le sang lors d'une infection. Nous pensons que chaque micro-organisme avec un répertoire antigénique

différent présente un potentiel pathogénique spécifique due à sa propre dynamique d'induire ou de créer des manifestations morbides spécifiques.

En effet, le séquençage du gène de la protéine majeure de la surface du mérozoite (MSP-1) des isolats de *P. falciparum* provenant de différentes zones géographiques a montré un grand polymorphisme génétique, surtout au niveau du Bloc 2 (23). Au niveau de ce bloc, trois allotypes ont été identifiés. L'allotype K-1 a été mis en évidence en Thaïlande dans le village de Karnjanaburi (24), le MAD20 à Madang en Papouasie Nouvelle Guinée (25) et le RO33 au Ghana (26). Une forme hybride entre le MAD20 et le RO33 a été mise en évidence au Mali (27). Ces 4 formes du gène de MSP-1 peuvent exister simultanément au cours d'une infection de paludisme à *Plasmodium falciparum* (28). Ainsi, des études récentes ont identifié des infections de plus de 6 allotypes (parasites) chez les enfants de 0 à 9 ans au moment du prélèvement sanguin (24) d'où la notion d'infection polyclonale. La signification de cette infection polyclonale n'est pas encore élucidée, il est probable que chaque allotype puisse être associé ou est à l'origine des symptômes palustres spécifiques observés au cours de la maladie.

Ainsi, il nous est apparu opportun d'initier cette étude en milieu rural afin d'étudier l'épidémiologie moléculaire naturelle à *P. falciparum* et l'interaction entre l'anémie, la splénomégalie et les différents variants génétiques de la MSP-1 dans le village de Missira, dans le cercle de Kolokani.

# OBJECTIFS

## OBJECTIFS

### **OBJECTIF GENERAL**

1. Estimer la prévalence de l'infection à *Plasmodium falciparum* dans le village de Missira en zone de savane Nord Soudanienne du Mali.

### **OBJECTIFS SPECIFIQUES**

1. Estimer la prévalence de l'infection à *P. falciparum* à Missira,
2. Estimer la prévalence de l'anémie dans la population de Missira,
3. Estimer la prévalence de la splénomégalie dans la population de Missira,
4. Identifier les génotypes de la Merozoite Surface Protein 1 (MSP- 1) dans la population de *P. falciparum* à Missira,
5. Examiner les relations entre la prévalence des génotypes MSP-1 et celle de la splénomégalie et de l'anémie.

# GENERALITES

### 3. GENERALITES SUR LE PALUDISME

#### 3.1. Historique

Le paludisme (*palus*=marais) ou *malaria* est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* et transmise par des moustiques femelles du genre *Anophèles*. Il entraîne une maladie fébrile, hémolysante, qui constitue un fléau mondial et un problème de santé publique. On estime à plus de 2 milliards le nombre de décès par an.

Le paludisme a sans doute accompagné l'homme au cours de son expansion à la surface de la planète, de l'équateur au cercle polaire arctique. Ces manifestations cliniques sont décrites avec précision depuis des millénaires avant Jésus Christ par des praticiens chinois. Ainsi les principaux signes ont été attribués à trois « démons » :

- le premier tient un marteau (céphalée) ;
- le deuxième tient un four chaud (fièvre) ;
- le troisième tient un seau (sueur froide) .

La première date importante est sans doute, l'an 1630, lorsqu'un aristocrate espagnol fut guéri par l'absorption d'une décoction de l'écorce de *Quinquina*. L'isolement de l'alcaloïde actif, en 1820, par Pelletier et Caventou, va représenter un nouveau progrès (2).

La première espèce de plasmodie, *Plasmodium falciparum* fut découverte par Alphonse Laveran en 1880 et la plus récente *Plasmodium ovale* par Stephen en 1922.

Le rôle du genre *Anopheles* dans la transmission du paludisme fut démontré par Ronald Ross et Golgi en 1898 (29).

### **3.2. Epidémiologie**

L'épidémiologie du paludisme comporte l'étude de quatre éléments dont la réunion simultanée est indispensable au développement de la maladie :

- la présence des hommes porteurs des gamétocytes du *Plasmodium* dans leur sang périphérique,
- l'existence d'une population d'anophèles vectrices,
- la présence d'hommes réceptifs au *Plasmodium*,
- des conditions écologiques favorables (30).

#### **3.2.1. Les différents faciès épidémiologiques du paludisme**

##### **3.2.2.1. En Afrique**

L'Afrique est un continent qui présente sur le plan géographique plusieurs faciès épidémiologiques hétérogènes et dynamiques. De nombreux facteurs tels que les facteurs naturels, anthropologiques et biologiques interviennent dans la définition d'un faciès épidémiologique.

L'épidémiologie du paludisme est conditionnée par l'environnement. En plus des modifications naturelles et artificielles, il est à noter que le comportement et le polymorphisme des anophèles vectrices jouent un rôle important. Le degré de réceptivité de la population à l'infection palustre varie d'un individu à un autre. Tous ces facteurs sont fonction :

- du lieu d'habitat (urbain, rural, côtière, fluvial ou lagunaire) ;
- du type d'habitat (banco, tôle ou paille) ;

-du mode de vie (degré de prémuniton, activités, prise ou non d'antipaludiques et observations de mesures de protection contre les vecteurs).

Tous ces vecteurs sont sous l'influence du phénomène d'urbanisation. Cette urbanisation qui augmente de 6% par an dans les pays en voie de développement constitue un phénomène social majeur et s'effectue le plus souvent de façon anarchique (31).

L'Afrique compte 5 faciès épidémiologiques (32) :

- La strate équatoriale constituée par les zones de forêt et de savanes humides post forestières avec des précipitations supérieures à 1500 mm/an. La morbidité s'étale sur toute l'année. La prémuniton apparaît vers l'âge de 5 ans. Elle est caractérisée par une bonne répartition des précipitations permettant une transmission pérenne. Elle est intense et le taux de piqûres infectantes pourrait atteindre mille par habitant et par année (33). Le paludisme sévit sur un mode endémique stable à transmission permanente,

- La strate tropicale regroupe les savanes humides et semi-humides de l'Afrique de l'Ouest et de l'Est où les précipitations vont de 800 à 1500 mm. Elles s'effectuent en une seule saison de 4 à 8 mois pendant laquelle se produit l'essentiel de la transmission. Cette dernière est moins intense et le taux de piqûres infectantes varie de 100 à 400 par habitant et par année). La prémuniton apparaît vers l'âge de 10 ans. Le paludisme sévit sur un mode endémique stable à recrudescence saisonnière,

- La strate désertique et semi-désertique encore appelée strate sahélienne ou sahélo-saharienne. La pluviométrie est inférieure ou égale à 700 mm d'eau par année. Il s'agit du Nord africain (Niger, Mali,.) et du désert du Kalahari. La prémunition est beaucoup plus longue à apparaître, avec la possibilité de faire un paludisme grave chez l'adulte. Le paludisme sévit sur un mode instable à transmission épisodique,
- La strate montagnarde touche surtout l'Afrique de l'Ouest (Niger, Sénégal). C'est la zone des vallées et des hautes terres, située au-dessus de 1000 m d'altitude. La période de transmission est très courte et il peut y avoir des années sans transmission. Faute de ne pouvoir acquérir une prémunition, la quasi-totalité de la population peut être touchée lors d'une épidémie,
- La strate australe appelée aussi strate lagunaire touche les plateaux d'altitude situés au sud du bloc forestier Centrafricain.

Les îles des Comores et de Madagascar réunissent sur leur territoire la plupart des différents faciès africains.

Tous ces faciès peuvent se modifier au gré des modifications naturelles du biotope (fleuves, rivières, lacs) ou anthropiques (barrages, riziculture, déforestation, désertification, urbanisation) (34).

#### 3.2.2.2. Au Mali

Au Mali, il existe cinq faciès épidémiologiques de transmission du paludisme (35) :

- La zone de transmission saisonnière longue de six mois allant de Mai à Novembre avec 1250 mm d'eau/an. Chez les enfants de moins de 5 ans, le portage parasitaire présente un indice plasmodique à 80-85% et une

prémunition. C'est la région soudano-guinéenne. Le paludisme sévit sur un mode holoendémique,

- La zone de transmission saisonnière courte varie de trois à quatre mois dans les régions de savane Nord soudanienne et le Sahel. Le paludisme y est hyperendémique en saison des pluies avec 200-800 mm d'eau/an avec un indice plasmodique variant entre 50 et 75%,
- La zone de transmission sporadique située dans la zone sub-saharienne au nord connaît une précipitation de 200 mm/an et on observe des épidémies avec un indice plasmodique inférieur à 50%,
- La zone de transmission bimodale ou plurimodale en début : elle regroupe la zone du delta intérieur du fleuve du Niger, les zones de retenues d'eau et de riziculture (barrage), les périodes de décrue et de mise eau des casiers rizicoles. Le paludisme est de type mesoendémique avec un indice plasmodique inférieur à 40%,
- La zone urbaine : c'est le milieu urbain de villes où la pollution des gîtes et la médication rendent le milieu impropre à l'impaludation. Le paludisme y est de type hypoendémique avec un indice plasmodique inférieur ou égal à 10%.

Ce milieu peut être scindé en 2 : le centre ville et le milieu péri-urbain. Le milieu péri-urbain est généralement caractérisé par une prolifération de quartiers spontanés, bidonvilles où la transmission est mesoendémique (35).

### **3.2.2. Agents pathogènes**

Quatre espèces plasmodiales sont inféodées à l'homme. Il s'agit de :

- *Plasmodium falciparum* qui est la plus redoutable et la plus intensément répandue. Elle est responsable de la quasi-totalité des décès dus au paludisme. Elle représente 85-90% de la formule parasitaire au Mali ;
- *Plasmodium malariae* représente 10 à 14% ;
- *Plasmodium ovale* présente moins de 1% ;
- *Plasmodium vivax* : sa présence a été confirmée au nord du Mali dans nos populations leucodermes en 1988 sous les formes des foyers autochtones (36).

Le *Plasmodium* est un sporozoaire ayant deux types de multiplication :

- une multiplication sexuée (sporogonie) chez le moustique ;
- une multiplication asexuée (schizogonie) chez l'homme.

### **3.2.3. Le vecteur**

Le vecteur est un moustique culicidé du genre *Anopheles*. Les espèces vectrices sont nombreuses et d'autant plus redoutables qu'elles ont une affinité pour l'homme (espèces anthropophiles). Elles se nourrissent et se reposent dans les maisons (espèces endophiles ou domiciliaires). Seule la femelle hématophage assure la transmission.

Au Mali, ce sont les membres du complexe *Anophèles gambiae sl* et *Anophèles funestus* qui transmettent le paludisme entre 18H et 6H . Leur durée de vie moyenne est d'un mois (2).

### **3.2.4. Cycle biologique des *Plasmodium* humains**

Le cycle évolutif comprend schématiquement trois étapes dont deux se déroulent chez l'homme (schizogonie) alors que le troisième commence dans l'organisme humain mais ne peut se poursuivre que chez l'anophèle femelle (sporogonie), vectrice et hôte définitif (2).

#### **3.2.4.1. La schizogonie hépatique (extra-érythrocytaire)**

Lors de la piqûre, l'anophèle femelle infestée injecte sa salive *anesthésique* dans la plaie qu'elle a forée. Cette salive contient également les sporozoïtes, formes infectantes contenues dans les glandes salivaires qui sont injectées dans le courant circulatoire de l'homme.

Selon l'abondance de ces sporozoïtes, ceux-ci peuvent être soit immédiatement phagocytés soit atteindre en 30 à 60 minutes le parenchyme hépatique où ils vont subir une maturation ou rester quiescents. Cette maturation hépatique aboutit en un temps variable et selon les espèces plasmodiales au développement et à la multiplication des sporozoïtes. Ces derniers repoussent en périphérie le noyau de la cellule et finit par constituer une masse multinucléée appelé schizonte ou corps bleu. La cellule éclate libérant ainsi de nombreux mérozoïtes. La forme quiescente a été décrite sous le nom d'hypnozoïte pour *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*. La présence des hypnozoïtes hépatiques explique les rechutes.

#### 3.2.4.2. La schizogonie intra-érythrocytaire

Après une schizogonie intra-hépatique qui dure 7-21 jours en fonction des espèces plasmodiales, les mérozoïtes libérés gagnent la circulation sanguine. Ils pénètrent par endocytose dans une hématie et deviennent chacun un trophozoïte. Celui-ci se développe, grossit et son noyau se divise par un processus de mitose (schizogonie) en 48-72 heures.

Il en résulte un schizonte qui se charge progressivement d'un pigment spécifique d'origine parasitaire, l'hémozoïne ou pigment malarique. La multiplication des noyaux forme dans l'hématie un corps en rosace. Mûri, dilaté, il s'éclate. Cet éclatement est contemporain de l'accès thermique clinique. L'hémozoïne libérée est phagocytée par les leucocytes qui deviennent mélanifères.

Les mérozoïtes libérés vont parasiter une hématie saine et poursuivre le cycle intra-érythrocytaire. Chaque cycle schizogonique dure 48 heures (fièvre tierce)

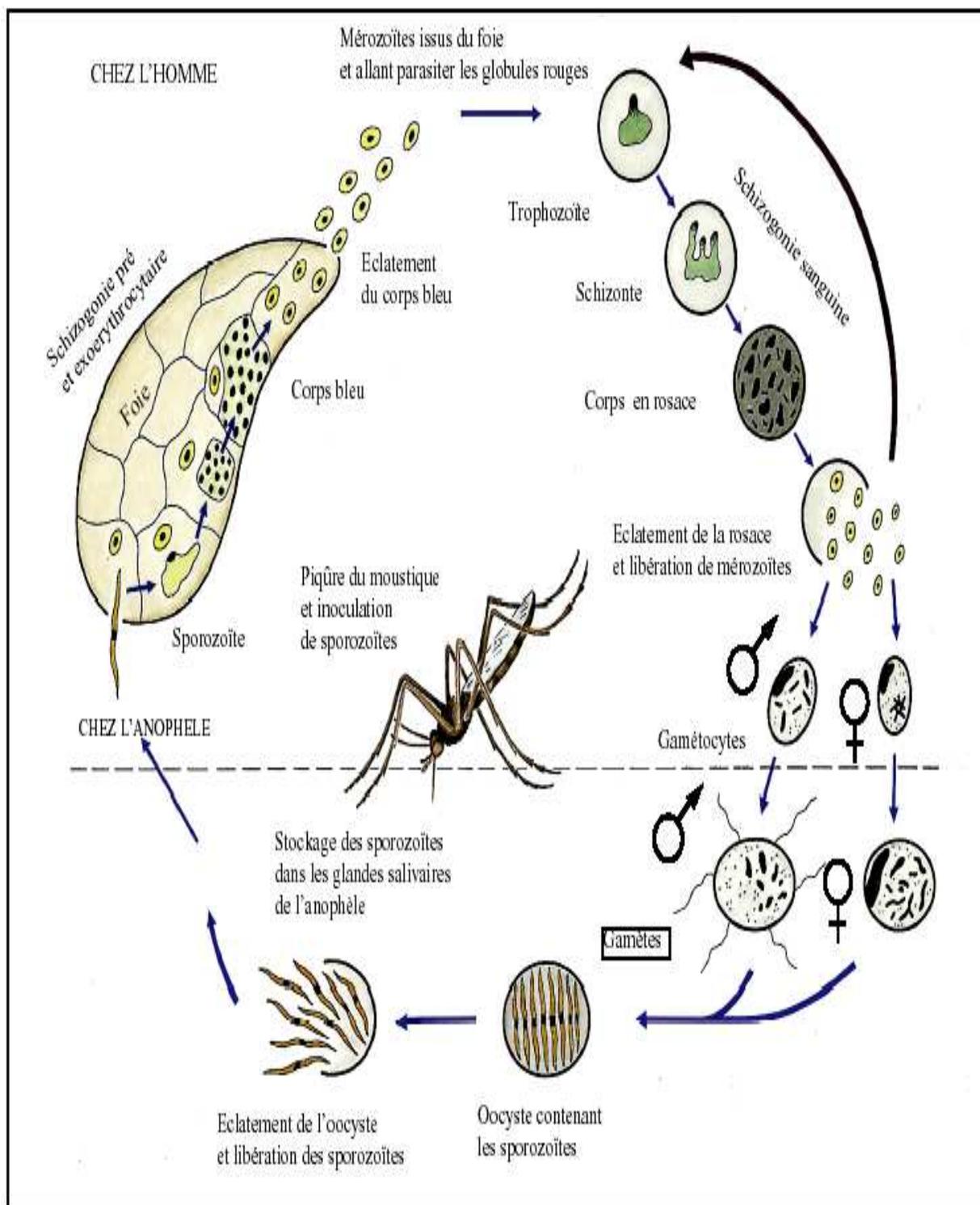
ou 72 heures (fièvre quarte). Après plusieurs schizogonies apparaissent dans les hématies des éléments à potentiel sexué, les gamétocytes, qui ne poursuivront leur cycle que s'ils sont absorbés par l'anophèle femelle.

Ainsi, chez l'homme, on distingue deux cycles : l'un exo-érythrocytaire intra-hépatique, l'autre intra-érythrocytaire. Ces deux cycles sont **asexués** ou schizogoniques.

#### 3.2.4.3. Formation des gamétocytes : cycle **sexué** ou sporogonie

Lorsqu'un anophèle femelle absorbe le sang d'un sujet paludéen, il peut ingérer des gamétocytes et le cycle se poursuit. A potentiel sexuel mâle ou femelle, les gamétocytes parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'exflagellation après lequel les zygotes femelles sont fécondées (gamogonie). Il en résulte un œuf encore appelé ookinète. Cette forme mobile s'implante sous la paroi de l'estomac du moustique en formant l'ookyste, dans lequel, par division, les sporozoïtes s'individualisent. Après éclatement, ils gagnent préférentiellement les glandes salivaires où ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infestante.

Chez le moustique, l'ensemble du cycle se déroule en 10 à 40 jours selon la température extérieure et l'espèce en cause (29).



1 Cycle évolutif des plasmodiums. (d'après Parasitologie tropicale, M. Larivière, ed. Foucher, Paris 1978).

Figure 1 : Cycle évolutif des plasmodiums

### **3.2.5. L'anémie associée au paludisme**

#### **3.2.5.1. Ampleur de l'anémie en zone sub-saharienne et au Mali**

Le concept d'anémie palustre est difficile à définir en zone sub-saharienne où l'on reconnaît à l'anémie souvent des étiologies multifactorielles. Mais elle atteint avec prédilection les nourrissons, les enfants et les femmes enceintes notamment les primigestes (37,38).

Selon Niangaly, le taux de prévalence de l'anémie de la femme enceinte en zone péri-urbaine est estimé à 23,45% à l'inclusion (39). Dembélé trouve un taux de 41,2% observé en saison de pluies en milieu péri-urbain de Sikasso au Mali (12), mais ce taux est supérieur à celui des femmes enceintes (15,4%) de trois quartiers péri-urbain de Bamako (41). Selon une étude conduite en zone rurale sikassoise en 1992, la part de l'anémie attribuable au paludisme chez la femme enceinte varierait entre 8,7% et 41,2% selon qu'on est en saison sèche ou en saison pluvieuse (13).

L'anémie associée au paludisme est un facteur pronostic de la maladie palustre. Considérée initialement comme la conséquence de la lyse des globules rouges parasités, les résultats de l'enquête sur le terrain et des travaux fondamentaux récents suggèrent que la pathogénie et la physiopathologie de l'anémie palustre sont encore mal comprises (41).

#### **3.2.5.2. Physiopathologie**

Les acquisitions récentes mettent l'accent sur une participation des globules rouges parasités, mais également des globules rouges non parasités. La lyse des globules rouges non parasités serait secondaire aux modifications survenant à la surface de ces cellules au cours de l'infection palustre notamment la sur-expression des IgG et du CD36 (42). On ne connaît pas chez l'homme

l'importance relative de cette hémolyse concernant les globules rouges non parasités. Par contre, l'hémolyse secondaire à l'introduction du sporozoïte des Plasmodies dans l'organisme était la plus connue pour expliquer l'anémie observée au cours d'une infection palustre. Plus récemment, l'accent a été mis sur le rôle d'un déficit de production par la moelle hématopoïétique à cause d'un phénomène de dysérythropoïèse. Dans cette inhibition interviennent les facteurs parasitaires, les médiateurs solubles libérés par les lymphocytes T ou les macrophages, un dysfonctionnement des macrophages. Mais il est primordial de savoir que le plus souvent, l'anémie survient en zone sub-saharienne sur des terrains déficitaires nécessaires à l'érythropoïèse notamment le fer . Elle peut être associée à d'autres affections virales et bactériennes responsables d'un état inflammatoire pouvant entraîner un déficit de production érythrocytaire par trouble de l'utilisation du fer par les érythroblastes (43,44).

Les mécanismes de l'anémie associée au paludisme sont encore incomplètement élucidés mais la conjonction de ces deux mécanismes constitue un facteur d'aggravation et de mauvaise tolérance à l'anémie.

### **3.2.6. Splénomégalie et paludisme**

La rate est un organe mou, rouge bleuté, situé entre la 9<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> côte en dessous du diaphragme. Elle pèse entre 150 à 200g et est richement irriguée. De la taille d'un poing, c'est le plus gros des organes lymphatiques. Elle est un site de prolifération des lymphocytes et un site d'élaboration de la réaction immunitaire. De plus, elle a pour fonction de purifier le sang (45).

#### **3.2.6.1. Splénomégalie palustre**

La rate, organe essentiel, agit comme moyen de défense par la séquestration d'hématies parasitées et sans doute

d'hématies saines sensibilisées par des antigènes plasmodiaux. Elle participe également aux déclenchements des mécanismes cellulaires et humoraux.

L'hypertrophie de la rate est la conséquence de l'hyperactivité du système monocytes-macrophages chargé de débarrasser l'organisme aussi bien du pigment malarique que des débris érythrocytaires.

Chez l'enfant entre 4 mois et 10 ans, la fréquence des splénomégalies est considérée comme un bon indice de la morbidité palustre. Dans les zones d'endémie palustre stable, elle disparaît progressivement entre 10 et 15 ans, témoignant de l'acquisition de l'immunité. Quelques adolescents gardent cependant une splénomégalie modérée, dure, sans retentissement, qui persistera indéfiniment (46).

### **3.2.6.2. Splénomégalie tropicale idiopathique (STI)**

Elle est caractérisée par une importante augmentation du volume de la rate associée à un taux très élevé d'Immunoglobuline de types M (IgM). On pense qu'elle serait provoquée par des immuns-complexes macro-moléculaires (agglutinines froides, anti-corps antiplasmodiaux,..) qui sont ensuite captés par le système monocytes-macrophages et provoquent la splénomégalie. L'existence dans certaines familles d'une fréquence particulière de splénomégalie tropicale suggère que le point de départ est un désordre génétique de la synthèse des IgM.

Son diagnostic repose sur quatre critères à savoir une splénomégalie volumineuse, un environnement tropical, l'âge adulte et l'absence d'étiologie démontrée.

Ce tableau s'observe dans les régions de paludisme hyper ou holo-endémique chez environ 2 % des adultes. Le signe essentiel est une grosse rate, ferme et indolore atteignant ou dépassant l'ombilic.

L'évolution, lente est parfois défavorable.

Un traitement antipaludique prolongé entraîne une diminution lente dans les trois quarts des cas, de la splénomégalie et des anomalies biologiques.

La STI apparaît comme la conséquence d'une réaction hyper-immune inappropriée au cours du paludisme et devrait être appelée « splénomégalie palustre avec hyper IgM ». Elle est différente de la splénomégalie du PVE mais il existe de formes de passages (47).

### **3.2.6.3. Paludisme viscéral évolutif (PVE)**

Il survient en zone d'endémie chez les sujets soumis à des infestations palustres massives, répétées, ne se soumettant pas à une prophylaxie ou à un traitement efficace et qui se situe au début de la période d'acquisition de l'immunité.

Ce sont donc des enfants des régions rurales d'endémie, entre 2 et 5 ans, parfois plus âgés dans les zones de savane à transmission saisonnière.

Depuis 1985-1986 en Afrique sub-saharienne, on observe également des équivalents du PVE chez des adultes originaires des pays du nord, expatriés depuis des années et se soumettant à une prophylaxie ou à un traitement alors qu'ils étaient auparavant indemnes.

La symptomatologie est sub-aiguë ou chronique. Elle associe une anémie avec pâleur, asthénie, parfois dyspnée, œdèmes des membres. La splénomégalie, constante chez l'enfant est volumineuse et sensible. Ce tableau d'évolution prolongée entraîne un retard staturo-pondéral chez l'enfant. Chez l'adulte, l'anorexie est très marquée avec nausées, vomissements, diarrhées et détermine

un amaigrissement rapide. La splénomégalie est souvent moins importante que chez l'enfant ou peu marquée.

Le diagnostic, hors du contexte de l'enfant en zone tropicale, peut être difficile et s'égarer vers une maladie hématologique. L'hémogramme confirme l'importance de l'anémie et révèle une leuconéutropénie, une thrombopénie et une vitesse de sédimentation augmentée. Il existe une hypergammaglobulinémie avec élévation des IgM et surtout des IgG.

L'évolution non traitée est variable selon l'espèce plasmodiale. On note la survenue des complications, poussées aiguës ou lente. Mais tous ces troubles disparaissent lorsque l'immunité devient efficace, laissant persister chez certains sujets une splénomégalie modérée séquellaire.

Sous traitement antipaludique, la guérison est lente mais spectaculaire (48).

### **3.3. Généralités sur le polymorphisme génomique de *P. falciparum***

L'étude des chromosomes de plusieurs espèces de *P. falciparum* a montré qu'il existe un polymorphisme. Plusieurs mécanismes en seraient à l'origine. La taille des chromosomes facilite la délétion et l'insertion des séquences nucléotides durant la méiose. De plus, on note une instabilité au niveau de la partie télomérique du chromosome pendant la mitose responsable des pertes de gènes (49).

#### **3.3.1. L'antigène de surface du mérozoite**

Le mérozoite est la forme invasive de la phase asexuée des espèces de *Plasmodium*. Chez *P. falciparum*, le gène codant pour la mérozoite surface protein number 1 (MSP-1) est une copie unique située sur le chromosome 9. La MSP-1 est une glycoprotéine de 185 à 205 kDa qui est synthétisée au cours de la schizogonie. Plusieurs fragments de cette protéine ont été identifiés. Ces

fragments seraient probablement issus d'une protéolyse par deux protéases. Ces enzymes semblent agir sur la protéine avant l'invasion des globules rouges. La fragmentation conduit à des peptides de 19, 33, 42 et 83 kDa (27). Le fragment de 19 kDa reste ancré à la membrane et constitue l'un des meilleurs candidats au vaccin.

La MSP-1 est de nature polymorphe et plusieurs spécificités ont été mises en évidence au sein d'un même isolat (25).

#### 3.3.1.2. Structure et organisation

La MSP-1 ne possède pas d'intron mais présente une partie N-terminale variable qui contient la séquence du signal d'exportation de la protéine sur la surface de la membrane et l'autre partie, C-terminale est relativement conservée. Cette dernière est liée à la membrane plasmique par une molécule d'ancrage, le glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). En 1987, l'étude de séquences nucléotidiques a permis à TANABE de diviser le gène en 17 blocs ou domaines variables semi-conservés ou conservés (50).

Une des caractéristiques du gène est la présence de répétitions en tandem de certains nucléotides. Elles sont variables en taille et sont ainsi utilisées pour le typage des souches. Du bloc 5 au 6, le gène présente un dimorphisme alors que les blocs 1 et 17 sont relativement conservés. Le bloc 3 a été décrit comme l'un des points de cassure du gène au moment des croisements entre les chromosomes. Ainsi, le bloc 2 présente un polymorphisme et 3 allotypes ont pu être identifiés. Ce sont les allèles K-1, MAD20 et RO33. Les allèles K-1 et MAD20 possèdent au niveau des protéines des tripeptides répétitifs alors que RO33 se caractérise par leurs pertes. Un nouveau allotype a été identifié qui est un hybride des allotypes MAD20 et RO33 (36).

#### 3.3.1.2. Fonction

La fonction de MSP-1 n'est pas encore clairement élucidée. Mais, Blackmann et al., ont suggéré en 1991 qu'elle serait impliquée dans le processus d'invasion du globule rouge par le parasite (51).

### 3.3.1.3. Expression

Le gène a une seule copie et ne possède pas d'intron. Son expression a lieu cours de la schizogonie érythrocytaire.

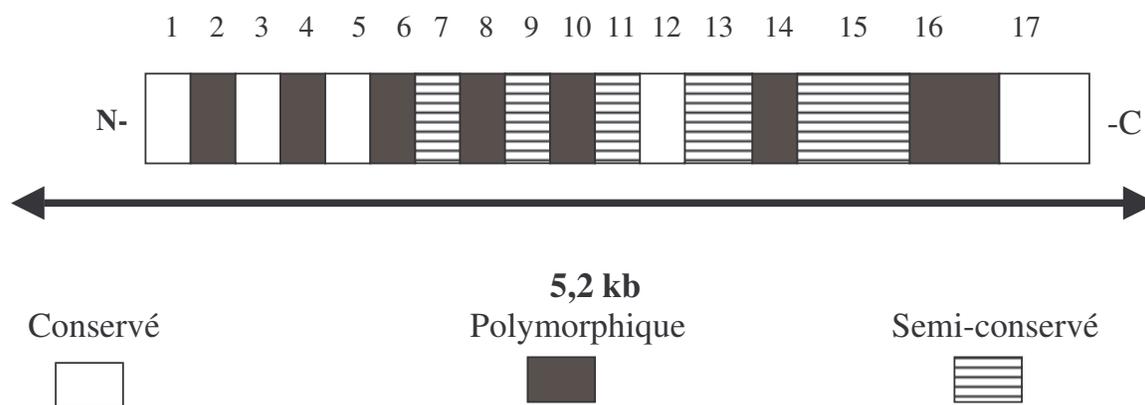


Figure 2: Structure du gène de la MSP-1

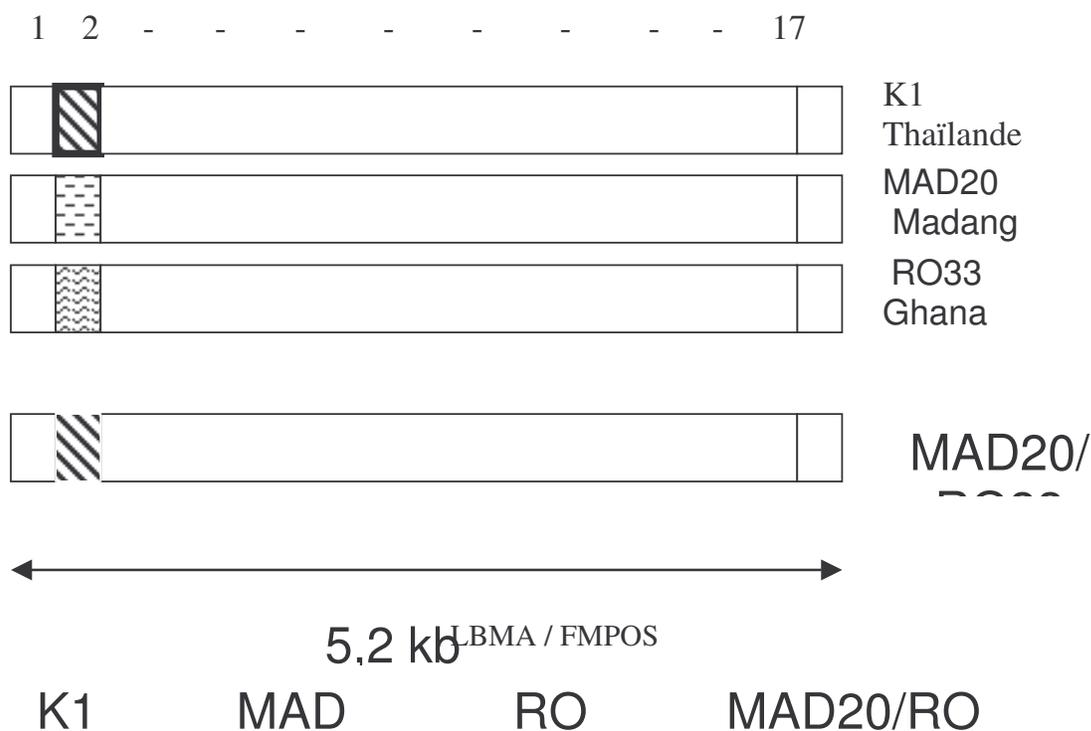


Figure 3 : Structure des trois allotypes du bloc 2 de la MSP-1 plus l'hybride MAD20/RO33



### 3.3.2. Méthodes utilisées pour la mise en évidence du polymorphisme chez *P. falciparum*

#### 3.3.2.1. Méthodes immunologiques

Elles permettent d'étudier la diversité antigénique. Grâce à la sérologie, des anticorps monoclonaux spécifiques des stades érythrocytaires de *P. falciparum* ont été produits par immunisation de sérum de souris. Ils ont été utilisés pour typer les parasites d'isolats par les techniques d'immunofluorescence ou de Western Blotting (52).

#### 3.3.2.2. Méthode de la biologie moléculaire

Elle porte uniquement sur le génome du parasite. On dénombre plusieurs techniques permettant de déceler la variabilité génétique au sein d'une même espèce mais leur choix dépend de l'objectif de l'étude.

##### 3.3.2.2.1. « Restriction Fragment Length Polymorphism » (RFLP) ou Polymorphisme de Longueur de Fragment de Restriction

Le polymorphisme de restriction a été décelé pour la première fois en 1978 par Kan et *al.*, et en 1979 par Jeffreys dans les gènes de la globine humaine. Il est basé sur la présence ou l'absence de site de restriction d'une enzyme donnée. Ces enzymes sont d'origine bactérienne et elles ont la capacité de découper l'ADN en différents points précis. Ces sites sont spécifiques à chaque enzyme et leur emplacement varie selon l'individu (52).

Pour mettre en évidence ce type de polymorphisme, l'ADN est découpé en plusieurs fragments par les enzymes de restriction. Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Ensuite, ils sont transférés sur une feuille de nitrocellulose où ils peuvent être révélés à l'aide d'une sonde radioactive complémentaire au brin d'ADN du gène étudié. Cette technique s'appelle le Southern Blotting. Egalement, cette technique ci-dessus décrite peut être appliquée à l'ARN et se nomme le Northern Blotting.

#### 3.3.2.2.1. La « Polymerase Chain Reaction » (PCR) ou Réaction de Polymérisation en Chaîne

La PCR a permis une meilleure connaissance du génome humain et celui des micro-organismes et a été inventée en 1985 par Kary Mullis. Cette technique est actuellement utilisée pour étudier et génotyper les souches des pathogénies et pour isoler des fragments d'ADN en vue de leur clonage. Elle est également utilisée dans le diagnostic des maladies.

##### a- Définition de la PCR

La PCR ou amplification génique est une technique qui utilise les propriétés que possède l'ADN. Celui-ci est composé de deux brins complémentaires d'orientation inverse et appariés deux à deux. Elle consiste à repérer le fragment d'ADN ou de gène, d'intérêt et l'amplifier d'une manière exponentielle.

##### b- Les réactifs utilisés

- Les amorces

Les amorces de la PCR sont des oligonucléotides long de 18 à 30 nucléotides qui peuvent s'apparier aux séquences complémentaires des matrices d'ADN. Elles s'apparient sur les brins opposés de la séquence cible de sorte qu'ils puissent être allongés les uns vers les autres par l'addition de nucléotides leur

extrémité-3' (réaction de polymérisation). La confection des amorces doit satisfaire à certaines conditions :

1. une absence de complémentarité entre la paire des amorces,
2. une absence de complémentarité au sein de l'amorce,
3. les amorces doivent avoir les mêmes températures de fusion.

Plus cette température de fusion est forte et plus la spécificité des amorces augmente. Les séquences des amorces contenant les liaisons CG présentent des températures de fusion élevées. Une forte concentration peut occasionner des hybridations non spécifiques et la formation des dimères.

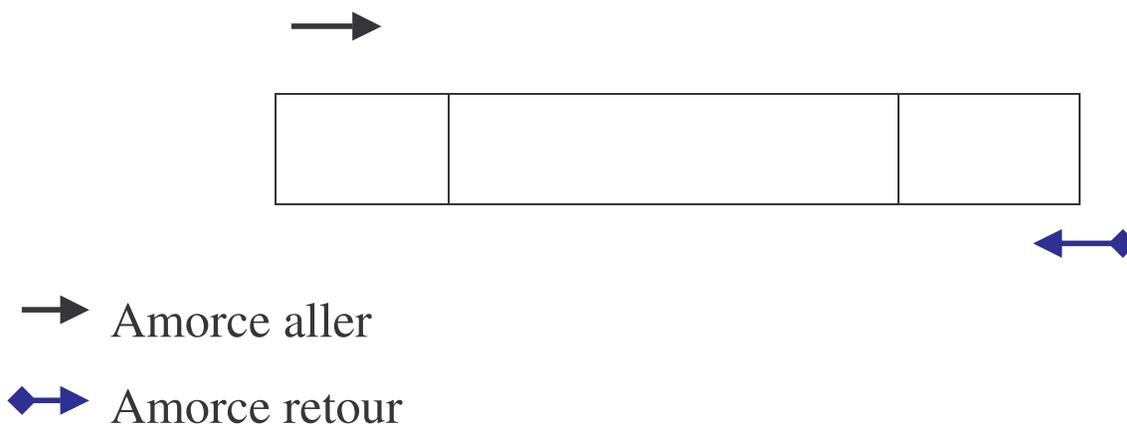


Figure 4 : Représentation des sens des amorces

- L'enzyme

L'importante avancée technologique est venue de la découverte d'une bactérie vivant dans les eaux chaudes et ayant une ADN polymérase. Cet enzyme est efficace à des hautes températures. L'espèce *Thermus aquaticus* vit dans l'eau à une température de 72°C. Son ADN polymérase appelé *Taq polymérase* a une température optimale de 72°C et est raisonnablement stable à 94°C. Deux formes de *Taq* sont disponibles, une native et l'autre obtenue par génie génétique. Les 2 formes de la polymérase portent une activité 5'-3' de

polymérisation exonucléasique dépendante mais elles ne disposent pas d'une activité 3'-5' exonucléasique. Un excès d'enzyme peut conduire à une amplification non spécifique.

- Les nucléotides

Ils constituent les briques qui forment le brin d'ADN. Leur concentration varie de 20 à 200mM. Ce sont des dinucléotides triphosphate (dNTPs) qui constituent les bases puriques et pyrimidiques. C'est l'addition un à un de ces nucléotides par le *Taq polymerase* qui aboutit à la copie du fragment d'ADN. Ils doivent être mis en excès dans la réaction de PCR. Ces dinucléotides sont utilisés à une forte concentration 200 µM pour chacune dNTP.

- Le tampon

Le tampon est essentiel pour la réaction de PCR surtout sa neutralité. Le tampon standard pour la PCR contient 50 mM de KCL, 10 mM de Tris.Cl (pH à 8,3). Durant l'incubation, le pH de la réaction descend d'une unité produisant une solution tampon dont le pH est de 7,2.

- MgCl<sub>2</sub> comme cofacteur enzymatique

La présence de cations divalents est critique. Ces ions sont des catalyseurs de la réaction enzymatique. Les ions magnésium (Mg<sup>2+</sup>) sont supérieurs aux ions manganèse et calcium qui sont inefficaces. La concentration de magnésium commence à partir de 1,5 mM mais elle doit être optimisée.

c- Les étapes de la PCR

Une réaction de PCR correspond à une multiplication exponentielle (2<sup>n</sup> cycles) comprenant 3 étapes à savoir la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. Tous les réactifs nécessaires à la réalisation sont regroupés dans un tube selon

l'objectif de notre étude. Ensuite, ils sont soumis aux différentes températures correspondant chacune à une étape.

- La dénaturation :

Elle permet de séparer les liaisons d'hydrogènes liant les bases A-T et C-G sous l'action de la chaleur 94°C.

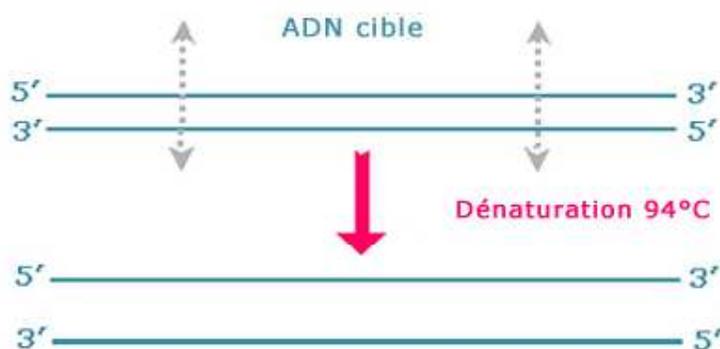


Figure 5 : schéma de la dénaturation

- L'hybridation :

Après la séparation de deux brins d'ADN, il est possible de synthétiser chimiquement de petites molécules simples ou amorces qui vont pouvoir s'hybrider de façon spécifique avec une région homologe et ainsi initier *in vitro* une réplication de l'ADN. la durée d'appariement est courte d'environ 30 secondes et la température d'hybridation ( $T_h$ ) est fonction de la concentration en sel ( $MgCl_2$ ), de la composition en nucléotides et de la longueur des séquences. Elle est obtenue à partir de la température de fontes ( $T_m$ ) suivant la formule :

$$T_h = T_m - 25\%T_m$$

$$T_m = 16,6 \text{ Log } \{ [Na] + 0,41(\%G-C) + 81,5[Na] \}$$

$$\%G-C = \% \text{ en dGTP et en dCTP}$$

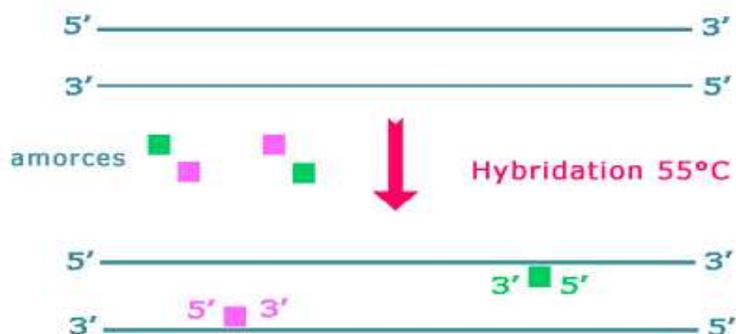


Figure 6 : schéma de l'hybridation

- L'extension

Elle permet la synthèse de la nouvelle copie qui est complémentaire à la séquence de la matrice. Elle débute par l'amorce déjà appariée et est conduite par l'enzyme Taq polymérase (thermostable) qui insère les nucléotides G, A, T et C selon l'ordre dans la séquence cible (matrice). A la température de 72°C, la Taq permet d'ajouter les nucléotides aux amorces hybrides dans le sens 5' vers 3'.)

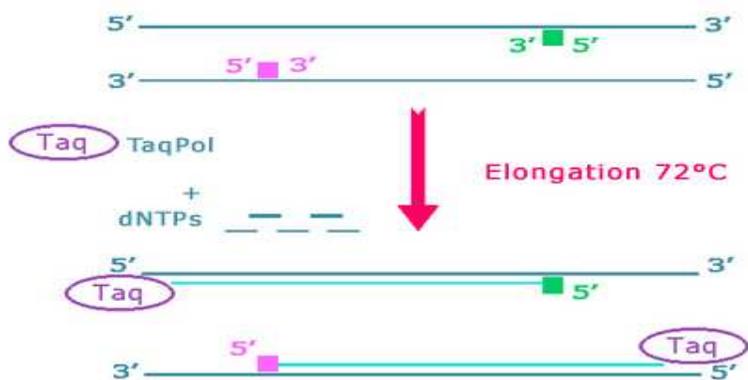


Figure 7 : schéma de l'élongation (l'extension)

d. L'électrophorèse

Cette méthode est utilisée pour déterminer la taille et la concentration de l'ADN amplifiée ou de visualiser le génome. Les fragments amplifiés ou les gènes

migrent en fonction de leur poids moléculaires et sont soumis à un courant électrique.

#### e. La technique de Séquençage

La limite de la PCR est qu'elle ne peut différencier les fragments ayant le même poids moléculaires, c'est ainsi que la technique de séquençage est sollicité pour examiner l'ordre des bases dans la séquence d'un fragment donné.

La technique de séquençage utilise des amorces ou des desoxynucléosidiques triphosphates marqué à fluorochromes. Elle peut s'effectuer manuellement selon la méthode de Sanger ou par l'intermédiaire des appareils automatisés. Concernant ce dernier, la lecture du gel se fait par un balayage automatique qui permet de discriminer grâce à des fluorochromes différents les quatre bases A, T, C et G. l'utilisation des logiciels informatiques permet de fournir un tracé électrophorétique avec des couleurs différentes pour chaque base élémentaire.

### **3.4. Les antipaludiques**

Un antipaludique est un produit naturel ou de synthèse, qui est administré par voie orale, parentérale ou rectale à dose respectable permet de détruire le parasite du paludisme ou bloquer sa croissance dans le but de guérir ou de prévenir la maladie parasitaire (34,53).

#### **3.4.1. Classification**

##### 3.4.1.1. Selon leur activité

- Les schizontocides, sont actifs sur les formes endo-érythrocytaires. On peut distinguer d'après leur mode d'action :
  1. les schizontocides sanguines électifs qui tuent le parasite dans l'hématie ou plasmocides ( la chloroquine, l'amodiaquine, la quinine,

la méfloquine, l'halofantrine, le sulfadoxine-pyriméthamine et le proguanil, le quinghaosu et dérivés),

2. les antimétabolites d'action lente qui inhibent la croissance du parasite en bloquant la division de son noyau et qui sont des plasmodostatiques.
- Les gamétocytocides, qui sont actifs à la fois sur les gamétocytes et sur les parasites intrahépatiques (formes exo-érythrocytaires). Elles ne sont plus utilisées pour obtenir la cure radicale des infections à *Plasmodium vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. Il existe : la primaquine, la plamachine et la rhodoquine (54).

#### 3.4.1.2. Selon la structure chimique

Nous avons différentes classes selon leur structure chimique :

- les amino-4-quinoléines ont au commun un noyau quinoléine, une chaîne latérale aminée en 4 et un radical. Ils sont composés de la Chloroquine, l'Hydroxychloroquine, l'Amodiaquine, l'Amopyrine, la Cycloquine .. ;
- les méthanol quinoléines comporte un cycle quinoléine et un radical méthanol (carbinol) en position 4. Nous avons la Quinine, la Méfloquine et l'Halofantrine ;
- les amino-8-quinoléines sont composés de la Primaquine, la Pamaquine, la Pentaquine et la Plascoquine ;
- parmi les biguanides, nous avons le Proguanil ;
- les diaminopyrimidines sont composés de la Pyriméthamine et la Triméthoprime ;
- les sulfamides sont composés de la Sulfadoxine et la Sulfaméthopyridazine ;
- les molécules dérivés de qinghasou sont l'Arthémeter, l'Artémésinine et l'Artésinate ;
- parmi les antibiotiques, nous avons la Doxycycline, la Clindamycine et l'Erythromycine (55).

### 3.4.1.3. Les associations

Ils sont administrés simultanément afin de prévenir l'apparition des souches chimiorésistantes en utilisant des dérivés à action synergique et ayant des mécanismes d'actions différentes ou complémentaires

Nous avons les associations suivants :

- Proguanil (200 mg) + Chloroquine (100 mg) ;
- Sulfadoxine (500 mg) + Pyriméthamine (25 mg) : en formes comprimé ;
- Sulfadoxine (500 mg) + Pyriméthamine (25 mg) : Fansidar\*, pour la forme injectable ;
- Sulfadoxine (500 mg) + Pyriméthamine (25 mg) + méfloquine (25 mg);
- Dapsone (100 mg) + Pyriméthamine (12,5 mg) .

### 3.4.2. Les stratégies nationales de prise en charge des cas de paludisme

En 1998, à l'initiative des pays africains, des programmes coordonnés de lutte contre le paludisme ont été établis au niveau de l'OMS avec pour objectif principal de réduire la morbidité et la létalité palustres (56).

Les programmes de lutte contre le paludisme en Afrique subsaharienne (Roll Back Malaria Project) portent sur :

- Un objectif principal

Réduire la morbidité et la létalité palustre,

- Trois axes stratégiques

- Prise en charge des cas de paludisme maladie de façon précoce et efficace, elle représente la meilleure prophylaxie de la létalité.

- Protection personnelle et collective : protection de la femme enceinte par la chimioprophylaxie (chloroquine : 300 mg/semaine pendant toute la grossesse) ; lutte antivectorielle en utilisant des matériaux (moustiquaires de lit, écrans, rideaux..) imprégnés d'insecticides rémanents (pyréthrinoides) ; aspersions intra domiciliaires d'insecticides.
- Prévention contre les épidémies : aspersions intradomiciliaires d'insecticides.

- La stratégie doit tenir compte du faciès épidémiologique

En zone de paludisme stable, il faut donner la priorité à la prise en charge correcte des cas de paludisme maladie (paludisme confirmé, fièvres inexplicables) et aux mesures de protection personnelle. Alors qu'en zone de paludisme instable, le risque est épidémique avec priorité à la lutte antivectorielle par aspersions intradomiciliaires d'insecticides. En cas d'épidémie, il faut renforcer les activités des prises en charge des cas.

Parmi les moyens de prévention collective et individuelle, l'utilisation de supports imprégnés de perméthrine et de deltaméthrine (rideaux et moustiquaires) a révolutionné la lutte antipaludique. A cela, il faut ajouter certaines mesures :

- l'assèchement des ponts d'eaux inutilisés, élimination des petites gîtes larvaires : boîtes de conserves, noix de coco, vieux pneus, etc. ;
- la destruction des larves par des méthodes biologiques et physiques par l'assainissement du milieu ;
- l'application des insecticides dans les habitations (serpentins, spray), la pulvérisation (vapeur ou aérosol) sur les murs intérieurs et les plafonds ;
- munir les murs et fenêtres de grillage fin ;

- parquer le bétail entre les gîtes et les habitations pour dévier les anophèles (57,58).

Les objectifs du Programme National de Lutte contre le Paludisme au Mali portent sur ( 7):

- Objectifs Généraux

- Réduire la mortalité et la morbidité dues au paludisme,
- Renforcer la lutte dans le cadre des soins de santé primaire,
- Surveiller l'évolution de l'épidémiologie de la maladie et la chimiosensibilité des souches de *Plasmodium falciparum*,
- Evaluer l'impact socioéconomique de la maladie chez les adultes.

- Objectifs spécifiques

- Réduire de 50% les cas sévères et les complications du paludisme dans les formations sanitaires,
- Instaurer la chimioprophylaxie chez 80% des femmes enceintes,
- Réduire de 75% le taux de létalité hospitalière,
- Rendre possible le diagnostic ou la reconnaissance au niveau le plus périphérique,
- Réduire le contact homme-vecteur par des mesures de protection individuelle et collective,
- Déterminer la part réelle du paludisme dans l'absentéisme des adultes.

# METHODOLOGIE

## 4. METHODOLOGIE

### 4.1. Cadre et lieu de l'étude

#### 4.1.1. Présentation de la zone d'étude

L'aire dans laquelle l'essentiel de nos observations ont été réalisées (zone de Missira) fait partie de Sous-Préfet du Préfet de Kolokani.

Elle se situe sur la rive droite de la rivière Baoulé qui marque la limite entre les préfectures de Kolokani et de Kita (fig. n°8). En fait, la zone de Missira est comprise dans l'entité géographique nommée "Boucle du Baoulé".

#### Situation géographique

La Boucle du Baoulé comprend les parties Ouest du cercle de Kolokani, Est du cercle de Kita, sud du cercle de Diéma et Nord-Ouest du cercle de Kati. Elle se situe entre les méridiens ( 8° latitudes 20° longitudes W et 9° latitudes 40° longitudes W ) et les parallèles ( 13° latitudes 20° longitudes N et 14° latitudes 39° longitudes N).

La zone de Missira est contiguë au Parc National et à la forêt classée de Fina desquels elle n'est séparée que par le cours du Baoulé.

## Climat, végétation et faune

Le climat est de type soudanien avec une nette tendance sahélienne vers le nord. Les deux saisons principales sont composées de la saison des pluies en relation avec des vents soufflant du Sud-ouest (mousson) et la saison sèche durant laquelle l'harmattan (vent chaud et sec venant du Nord-est) est prédominant.

- la saison sèche s'étale de Novembre à Mai et comprend une saison sèche fraîche et une saison sèche chaude :

- la saison sèche fraîche (Novembre – Février) comporte des températures mensuelles de 23 à 29°C , des humidités relatives moyennes de 22 à 51% et une évaporation moyenne mensuelle variant de 76 à 317 mm.
- la saison sèche chaude enregistre des températures moyennes mensuelles variant de 29 à 35°C et des humidités relatives moyennes de 27 à 69 %. L'évaporation atmosphérique en moyenne de 304 à 422 mm/mois est également très intense.

- la saison de pluies couvre la période de Juin à Octobre et la valeur annuelle des précipitations diminue progressivement du Sud vers le Nord. Des moyennes établies sur une période de 40 ans notent un maximum de 1150,9 mm et un minimum de 630,4 mm.

La végétation est de type savane arborée avec un tapis herbacé. L'arbre le plus fréquent est le karité (*Vitellaria paradoxa*).

Le paysage typique de la zone consiste en une surface d'érosion plane ancienne (pédiment) où s'élèvent des reliefs gréseux aux pentes abruptes entourés d'éboulis et protégés dans leur partie supérieure par un couvert de grès résistant ou une cuirasse latéritique.

La faune invertébrée est constituée par des nombreux insectes d'importance médicale dont le groupe des *Culicidae* (les Anophèles, *Culex* et

*Aedes*). Parmi les vertébrés, on rencontre plusieurs espèces d'oiseaux, de reptiles et de mammifères.

### **4.1.2. Hydrographie**

Le réseau hydrographique de la Boucle du Baoulé est formé par le Baoulé et ses affluents.

Le Baoulé (842 km) prend sa source dans les Monts Mandingues, à 700 m d'altitude avec la confluence des rivières Simanko et Kéniébaoulé. Il se jette dans le Bakoy au Nord de Toukoto. Les plus importants des affluents du Baoulé de la source vers l'embouchure sont : le Bafing (rive gauche), le kénié (rive gauche), le Dla (rive droite), le kéniébako (rive gauche) et le Bading-ko (rive gauche).

Le Dla (rive droite) qui marque la limite sud de la zone de Missira représente le déversoir du lac Wénia. Ce cours d'eau constitue des gîtes larvaires pour les simulies vectrices de l'*Onchocerca volvulus* et des gîtes permanents pour le développement des anophèles pendant une bonne partie de l'année.

Ce village a fait l'objet d'une thèse de doctorat sur l'onchocercose (59). Il n'y a aucun poste de santé dans le village. Le centre le plus proche est à 8 kilomètres. C'est le Centre de Santé Communautaire de Sébékoro vers lequel sont acheminés les malades. La prévalence du paludisme dans le village de Missira est de 52% dans la population générale (60).



Figure 8 : Cartographie de la région de Missira ( Sources IGM)

#### 4.1.3. Structure actuelle de la population

La population de Missira est estimée à 1000 personnes. Elle se compose de sédentaires et de nomades et comprend différentes ethnies. Les sédentaires sont représentés par les Malinkés et les khassonkés à l'Ouest et au Sud, les Sarakolés, les bambaras et les Kakoloh au Nord et à l'Est. Les nomades sont les peuls et les Maures. Les premiers conduisent généralement d'importants troupeaux de bovins et les seconds sont plutôt spécialisés dans l'élevage des ovins et des caprins.

Les caractéristiques du peuplement humain auxquelles nous allons faire allusion dans la suite de ce paragraphe concernent essentiellement la population de la zone de Missira. Ce village est composé en majorité des Kakoloh qui sont en majorité cultivateurs. Leur habitat, le modèle le plus répandu est la case en terrasse entièrement construite en banco (« biliso »). Le village est dirigé par un chef ( dougoutigi ) assisté de quelques conseillers ( dougoutigi-séré ). Le rôle du chef du village se ramène essentiellement à servir d'intermédiaire entre les autorités administratives et la population villageoise. Le village se compose d'un certain nombre de familles, les membres d'une même famille exploitent en général un champ collectif et possèdent souvent un bétail en commun.

L'activité économique majeure des sédentaires de la zone de Missira est l'agriculture. La principale culture commerciale est l'arachide dont la commercialisation est assurée par l' O D I P A C. Le mil ( *Pennisetum typhoides* =sagnon ) et le sorgho ( *Sorghum sp.*) sont les principales cultures vivrières, le haricot ( *Phaseolus lunatus* = cho ) et le maïs ( *Zea mais* = kaba ) viennent en second plan. La noix de karité ( *Vitellaria paradoxa* ) et les fruits de néré ( *Parkia biglobosa* ) constituent les produits de cueillette les plus communs.

La pratique religieuse la plus répandue reste l'animisme. On note actuellement une influence croissante de l'Islam. Les chrétiens sont peu nombreux.

#### **4.2. Type de l'étude**

Il s'agit d'une étude transversale à un passage qui s'est déroulée pendant 3 jours, du 02 Octobre au 04 Octobre 2001.

#### **4.3. Période de l'étude**

Notre étude s'est déroulée au mois d' Octobre 2001, période de recrudescence du paludisme à la fin de l'hivernage.

C'est également une période de pénurie alimentaire.

#### **4.4. Echantillonnage**

Notre échantillon était de 194 sujets. Le recensement nous a permis d'estimer la population du village de Missira à 1000 habitants.

Le calcul de la population minimale sur Epi Info était de 171 (prévalence 51,5 %, effet de grappe à 1, précision voulue à 7,5 %, risque  $\alpha$  à 0,5%). Ainsi, on déduit que notre échantillon est représentative de la population générale de Missira.

La population d'étude était constituée par une population d'enfants, d'adolescents et d'adultes de tout sexe qui se sont présentés pendant la période de l'étude au sein de notre unité.

#### **4.5. Critères d'inclusion et de non-inclusion**

##### **4.5.1. Critères d'inclusion**

Tout sujet malade de paludisme simple qui réside depuis 6 mois à Missira et qui est consentant à l'étude. Ils devaient avoir :

- absence de symptômes de paludisme grave et compliqué.
- une obtention d'un consentement éclairé du sujet qui a un âge supérieur ou égal à 15 ans et l'assentiment des parents ou du tuteur en charge de l'enfant malade à participer à l'étude.

##### **4.5.2. Critères de non-inclusion**

- refus volontaire de participer à l'étude

## **4.6. Variables mesurées**

### **4.6.1. Technique de mesure et de collecte des variables**

Nous avons inclus tout sujet se présentant au poste d'identification. Chaque sujet a été identifié par un numéro qui reflète l'ordre dans lequel il s'est présenté au poste d'identification.

Les données sociodémographiques et cliniques étaient collectées au moyen d'une fiche d'observation individuelle et standardisée, et élaborées suivant les objectifs de l'étude. Elles sont issues de l'anamnèse et de l'examen clinique et sont consignées sur une fiche d'enquête. Nous avons mesuré les paramètres parasitologiques, hématologiques et biochimiques.

### **4.6.2. Variables mesurées**

#### **4.6.2.1. Variables sociodémographiques**

- âge,
- sexe,
- résidence,
- la classification ethnique sur la base du nom de famille du malade.

#### **4.6.2.2. Variables cliniques**

##### **4.6.2.2.1. Matériels**

- Thermomètres électroniques,
- stéthoscope, tensiomètre, pèse-personne,
- alcool à 70°C,

- coton hydrophile,
- abaisses langues,
- seringues (5 ml et 10 ml),
- un stock de médicaments (antipaludiques surtout, antipyrétiques, antiémétiques..).

#### 4.6.2.2.2. Paramètres cliniques

L'étude clinique a consisté en :

- une prise de la température tympanique, la tension artérielle et le pouls,
- une prise du poids corporel. Le poids a été exprimé en kilogrammes
- une appréciation de la présence d'une pâleur conjonctivale ou d'un ictère, de nausée, de vomissement, de diarrhée ou de céphalées,
- une palpation de la rate (la classification de Hackett a utilisé pour apprécier la taille de la rate),
- une prise en charge médicale des cas de paludisme,
- une prise en charge des autres affections parasitaires (parasitoses intestinales, bilharziose, onchocercose,..).

#### 4.6.2.2.3. L'évaluation de la température

Les températures étaient prises à l'aide de thermomètre électronique placé dans le tympan. L'audition d'un signal émis par le thermomètre signe la fin de la prise de température. La fièvre a été définie par une température axillaire supérieure ou égale à 37, 5 °C.

#### 4.6.2.2.4. Appréciation de la rate

La taille de la rate a été déterminée selon la classification de Hackett :

- 0 = Rate non palpable même en inspiration profonde
- 1 = Rate palpable en inspiration profonde
- 2 = Rate palpable en respiration normale sur la ligne mamelonnaire gauche ne dépassant pas la ligne horizontale passant à égale distance entre le rebord costal gauche et l'ombilic
- 3 = Rate descendant en dessous de cette ligne, sans dépasser la ligne horizontale passant par l'ombilic
- 4 = Rate dépassant cette dernière ligne mais ne franchissant pas l'horizontal passant à égale distance entre l'ombilic et la symphyse pubienne
- 5 = Rate descendant en dessous de cette ligne.

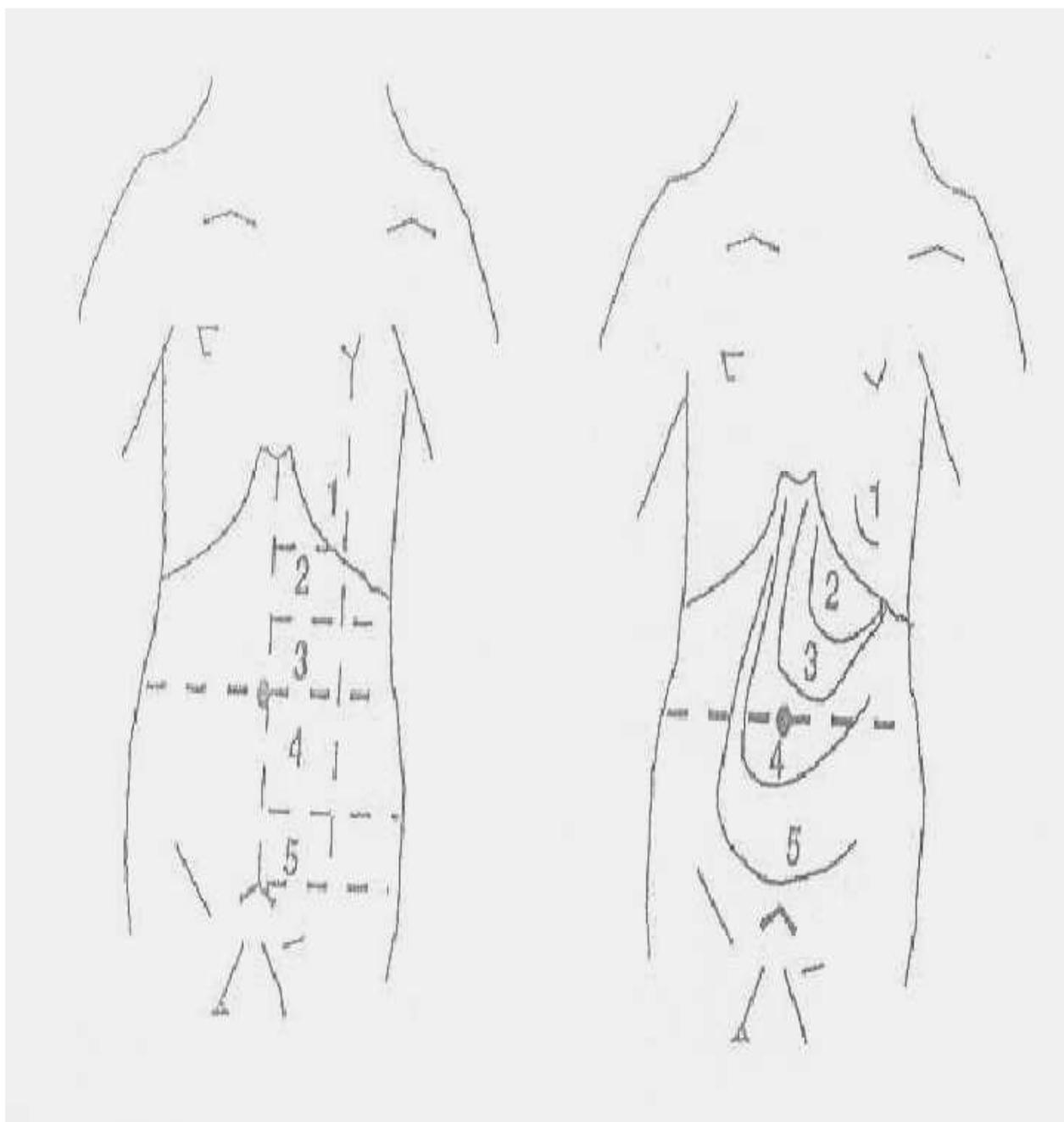


Figure 9 : Classification des splénomégalies selon la méthode de Hackett.

#### 4.6.3. Variables para cliniques

##### 4.6.3.1. Paramètres parasitologiques

La parasitémie et la densité parasitaire ont été estimées à partir de la goutte épaisse et du frottis mince (61).

##### 4.6.3.1.1. Goutte épaisse

Elle consistait à la détermination de l'espèce plasmodiale, du stade de développement du parasite et de la charge parasitaire.

- Matériel et réactif

**Ils comprennent :**

- lames portes objets,
- vaccino-styles (lancettes) stériles,
- alcool à 90°,
- gants stériles en polyvinyle,
- coton hydrophile,
- bac de coloration,
- marqueurs indélébiles,
- boîtes OMS de conservation de lames,
- solution de Giemsa à 3%,
- eau distillée tamponnée (pH=7,2),
- éprouvette graduée (100cc, 500cc. 1 litre),
- râteliers,
- chronomètre,

- huile de bougie,
  - crayon de papier,
  - microscope optique,
  - comprimés tampons (un comprimé tampon pour un litre d'eau)
- 
- Mode opératoire

Le troisième ou le quatrième doigt de la main gauche est désinfecté avec un tampon d'alcool. Le côté du doigt qui est moins sensible que le bout est choisi. A l'aide d'un vaccinostyle stérile, on fait une ponction capillaire d'un coup sec. De la main droite, nous avons pris une lame porte objet en la tenant par les bords. De la main gauche, nous avons pressé le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang.

La première goutte est éliminée à l'aide d'un coton sec, ensuite une goutte de sang est déposée au centre d'une lame étiquetée (portant la date, le numéro et le jour). A l'aide de l'extrémité d'une autre lame, décrire des mouvements circulaires et centrifuges jusqu'à atteindre environ 1cm de diamètre.

Le numéro du malade a été inscrit au crayon au bout de la lame. Les lames ont été séchées à l'air libre et/ou à l'aide d'un séchoir électrique à l'abri de la poussière et des mouches.

- Coloration

Nous avons utilisé la technique de coloration au Giemsa diluée à 3% dans de l'eau tamponnée pH=7,2 en un seul temps de 45 minutes. Cette technique permet en même temps la deshémoglobination et la coloration des éléments figurés du sang.

Les lames sont rangées dans la cuve de coloration selon un plan horizontal stable et immergées. Nous avons préparé suffisamment de colorant pour remplir la cuve. Le colorant a été ensuite versé lentement dans la cuve contenant les lames. Nous avons attendu 45 minutes. Puis, nous avons versé

doucement de l'eau propre dans la cuve pour enlever l'écume de la surface du colorant. La cuve a été séchée. Puis, les lames ont été lavées délicatement dans un pot rempli d'eau du robinet pour ne pas décoller la goutte épaisse colorée. Les lames sont séchées sur un râtelier.

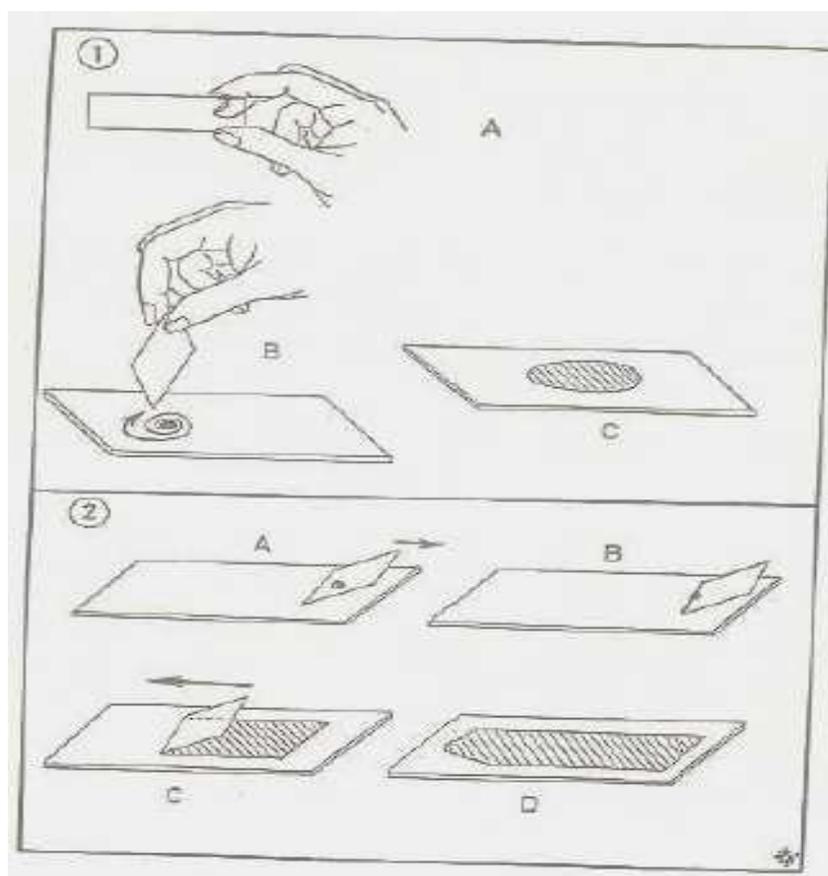


Figure 10 : Réalisation de la goutte épaisse et du frottis mince

- Examen microscopique

**Les gouttes épaisses étaient lues au microscope optique binoculaire au grossissement 1000 à l'immersion (objectif 100 oculaire 10).**

La méthode quantitative a été utilisée pour la détermination de la parasitémie sur la goutte épaisse. La densité parasitaire a été déterminée sur 300 leucocytes et rapportée à 7500 leucocytes pour avoir la parasitémie par mm<sup>3</sup> de sang. Nous avons pris 7500 leucocytes comme la moyenne leucocytaire par mm<sup>3</sup> de sang chez l'africain.

Les lectures ont été faites au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliqué (LBMA) à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST).

- Calcul de la parasitémie

La parasitémie a été calculée suivant la formule suivante :

$$X = \frac{Y \times Z}{1000}$$

X= parasitémie par mm<sup>3</sup> de sang

Y= nombre moyen de leucocytes par mm<sup>3</sup> de sang (7500)

Z= nombre de formes asexuées de plasmodium comptée pour 300 leucocytes.

Nous avons compté le nombre de parasite en même temps que le nombre de leucocytes à 300 leucocytes, on arrête le compte. Selon le nombre moyen de leucocytes chez l'africain qui est de 7500/mm<sup>3</sup>, la parasitémie a été calculée.

La positivité de la goutte épaisse était liée à la présence au moins d'un parasite, soit 25 parasites par mm<sup>3</sup> de sang (48).

#### 4.6.3.1.2. Frottis mince

Les frottis ont été effectués uniquement pour les cas d'hyperthermie où la température était supérieure à 39 °C dans un but de dépistage rapide.

- Confection

On recueille une goutte de sang de 10 µl environ en la mettant délicatement en contact avec une extrémité de la lame d'étalement. On tient la lame d'une main et de l'autre il faut poser le bord parfaitement lisse d'une

autre lame (lame rodée) juste en avant de la goutte de sang.

On fait glisser la lame rodée jusqu'à ce qu'elle touche la goutte de sang. On la laisse s'étaler tout le long du bord de la lame rodée. Puis, on pousse la lame rodée jusqu'au bout de la lame d'étalement d'un mouvement doux et régulier. Les frottis ont été séchés rapidement à l'aide d'un séchoir puis gardés à l'abri des mouches et de la poussière.

- Coloration

Nous avons utilisé la technique de coloration rapide (1 mm) de Leukostat Stain. Nous avons procédé comme suit :

- Tremper la lame 3 fois dans la solution A (méthanol) ;
- Egoutter l'excédent de la solution A et laisser sécher ;
- Plonger 3 fois de suite dans la solution B (éosine) ;
- Egoutter et rincer à l'eau du robinet ;
- Plonger 6 fois dans la solution C (bleu de méthylène) ;
- Rincer à l'eau du robinet ;
- Sécher les frottis sur un râtelier.

Les frottis ont été lus immédiatement au microscope au grossissement 1000 à l'immersion (l'objectif 100 et oculaire 10).

#### 4.6.3.2. Paramètres hématologiques

##### 4.6.3.2.1. Hémoglobine :

Le taux d'hémoglobine a été déterminé par la méthode spectrophotométrique en utilisant l'appareil portable HemoCue\* (Hemocue AB, Ängelholm, Suède n°651450) fonctionnant sur pile.

##### • Principe de détermination du taux d'hémoglobine à l'Hemocue\*

Il est basé sur la transformation de l'hémoglobine en azide méthémoglobine dont l'absorption est mesurée aux longueurs d'ondes de 750 et 880 nm.

##### • Matériels et réactifs nécessaire pour le dosage avec l'HemoCue\*

- Micro-cuvette réactive contenant : la méthémoglobine désoxycholate de sodium qui hémolyse les hématies, le nitrite de sodium qui transforme l'hémoglobine en méthémoglobine et l'azide de sodium qui en ses liant à la méthémoglobine formera avec celle-ci de l'azide,
- Piles de 1,5 volts,
- Coton,

- Alcool à 70°C,
- Gants en polyvinyle stériles,
- Vaccinostyle.

• Echantillon pour le dosage à l'HemoCue\*

Sang capillaire : 1 microlitre.

• Mode opératoire pour le dosage à l'HemoCue\*

- Allumer l'HemoCue\* en position "power on",
- Tirer le porte cuvette en position d'insertion. Vous entendrez un déclic d'arrêt que vous ne devez pas dépasser,
- Attendre l'affichage de READY dans l'écran de lecture,
- Tester l'HemoCue avec la cuvette contrôle,
- Noter le résultat affiché et vérifier qu'il ne diffère pas du résultat attendu donné par le fabricant sur la notice d'accompagnement,
- Doser les échantillons de la façon suivante :
- Remplir la micro-cuvette dans la position de lecture
- Noter enfin le résultat sur le cadran de lecture.

• Expression des résultats

Les résultats sont directement affichés sur l'écran de lecture du photomètre en g/dl. Les résultats seront portés sur la feuille de paillasse.

4.6.3.3. Techniques de Biologie moléculaire

#### 4.6.3.3.1. Polymerase Chain Reaction

- Matériels et réactifs

- Eau distillée et stérile,
- Saponine à 1 %,
- Générateur de courant,
- Micropipette de 50 microlitre tube pour microdispenseur,
- Applicateur,
- Plaque d'alignement,
- Méthanol,
- Acide acétique dilué à 5%,
- Cuves à électrophorèse,
- Intégrateur (SCAN) pour densitométrie,
- Plaque d'acétate de cellulose,
- Papiers pour ponts électriques,
- Papiers buvards pour éliminer l'excès de tampon,
- Papier confetti S&S (Schleider & Schuell, keene, NH, USA)
- Bacs plastiques pour coloration et décoloration,
- Tampon 1XPBS (Sigma, St Louis, Mo),
- Amplificateur Applied Biosystem,
- Solution de chelex (chélateur des ions polyvalents, Biorad, Hercules, CA)
- Râtelier.

### • **Confection des Confettis**

Les papiers confettis S&S (Schleider & Schuell, keene, NH, USA) présentent 5 cercles de 12 mm de diamètre. Plusieurs gouttes de sang sont nécessaires pour réaliser 3 à 4 spots sur le papier filtre pour chaque individu. Ce

papier sera conservé dans un carton durant le séchage afin de le protéger contre la poussière et les mouches.

Il faut noter que chaque confetti est étiqueté en mentionnant le nom et le prénom de l'individu, son numéro d'identification et la date du prélèvement. Séché, le papier sera conservé dans une enveloppe dans un milieu contenant du silicagel à la température ambiante. L'extraction de l'ADN pour le génotypage de *P. falciparum* est effectuée à partir de ces papiers confettis ou "paper blots".

The diagram shows a rectangular card with a white background and a black border. At the top, there are seven empty circles arranged horizontally. Below the circles is a horizontal line. Underneath the line, there are four fields for text, each with a label on the left and a horizontal line for writing on the right. The labels are: 'N°:', 'Date', 'Prénom', and 'Nom'.

Figure 11: Confetti en spot

• Extraction de l'ADN

Le papier confetti de chaque patient a été incubé dans 1% de saponine (Sigma, St Louis, Mo) pour permettre la lyse des membranes des globules rouges et du parasite pendant une nuit à 4 °C. Après centrifugation, le culot a été lavé après le tampon 1XPBS (Sigma, St Louis, Mo) 3 fois afin d'inhiber l'hémoglobine dans un facteur d'inhibition de la réaction d'amplification enzymatique.

Ensuite, le culot a été résuspendu dans 200 microlitre de Chelex (chélateur des ions polyvalents, Biorad, Hercules, CA), après incubation à 56 °C

pendant 15 minutes. La suspension a été portée en ébullition pendant 8 minutes à 100 °C. Le chauffage entraîne le détachement de l'ADN qui reste en suspension et le complexe chelex-ion bivalent se déposant au fond du tube après centrifugation à 12 000 g pendant 3 minutes.

Le surnageant contenant l'ADN est récupéré dans un nouveau tube stérile et placé dans le congélateur à moins de 20 °C jusqu'à son utilisation.

Le mode opératoire est le suivant :

1. Couper le morceau de papier filtre séché qui est imbibé de sang et le placer dans un tube de 1,5 ml.
2. Ajouter 1 ml de saponine 1 % et laisser incuber à 4°C pendant la nuit (au minimum 12 heures d'incubation). La saponine permet la lyse des membranes érythrocytaires et parasitaires avec la libération de l'hémoglobine et des enzymes, telles que la DNase dans le tube de 1,5 ml, qui sont inactivées à 4°C.
3. Centrifuger à 12000 g pendant 3 mn puis rejeter le surnageant.
4. Laver le papier filtre imbibé de sang avec la solution de PBS 1X à pH 7,2 trois fois. Ce lavage permet d'enlever l'hémoglobine qui est un inhibiteur de la réaction PCR.
5. Ajouter 200 microlitres 5% chelex-100 en utilisant un embout à bout élargi.
6. Chauffer à 56°C pendant 15 mn et triturer le papier filtre avec le bout de l'embout jusqu'à ce que le papier devienne mou.
7. Bouillir à 100°C pendant 8 mn.
8. Presser le papier filtre contre la paroi du tube pour extraire toute la suspension de chelex-100 et rejeter le papier.
9. Centrifuger à 12000 x g pendant 3 mn.
10. Transférer le surnageant qui contient l'ADN dans un autre tube.

Conserver à -20° C la suspension d'ADN jusqu'à son utilisation.

- Amorces utilisées

Nous avons utilisé la technique de « Nested PCR » ou PCR nichée afin d’optimiser la réaction surtout dans les situations de faibles parasitémies (62).

Deux groupes d’amorces ont été utilisés dans cette étude (51). Le premier groupe est constitué d’une paire d’amorces identifiées à partir des séquences de nucléotides conservées au niveau des blocs 1 et 3. Ces amorces peuvent ainsi amplifier le fragment du gène de la protéine de la membrane de surface –1 (MSP-1) entre les blocs 1 et 3. Cette amplification initiale permet l’obtention des fragments de 200 à 500 pb qui seront ensuite utilisés pour la seconde amplification avec les amorces spécifiques K1, MAD20 et RO33 (19).

Ce produit amplifié appelé amplicon est ensuite ré-amplifié par 3 paires d’amorces qui sont K1, MAD20 et RO33. Ces amorces amplifient d’une manière spécifique les parasites de *P. falciparum* présentant les allèles K1, MAD20 et RO33 au niveau du bloc 2.

**TABLEAU I : SEQUENCE DES AMORCES UTILISES**

Amorces	Séquences
---------	-----------

MSP1-3-5'	5'-ACTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTA-3'
MSP1-3-3'	5'-AGTACGTCTAATTCATTTGCACGAA-3'
K1-5'	5'-CTTAAATGAAGAAGAAATTACAAAAGGTGC-3'
K1-3'	5'-GAGGGCTTGCACCAGATGAAGT-3'
MAD20-5'	5'-GTATTAATGAAGGAACAAGTGGAACAG-3'
MAD20-3'	5'-TATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATT-3'
RO33-5'	5'-AATAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGT-3'
RO33-3'	5'-TCTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGA-3'

### • Réactions d'amplification pour la première PCR

Nous avons utilisé la paire d'amorces MSP-1 pour effectuer la première réaction. Les tableaux ci-dessous montrent la composition des différents mélanges réactionnels (60).

### Le mélange réactionnel I ou Mix 1

**TABLEAU II : COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL 1**

Concentration des réactifs	Volume	
Concentration finale		
10X Tampon PCR	6 µl	1X
50 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl	2 mM
10 mM DNTPs	8 µl	0,2 mM
50 µM Amorces 5'	2 µl	1 µM
50 µM Amorce 3'	2µl	1 µM
Eau stérile	40 µl	.....
<b>TOTAL</b>	<b>61 µl</b>	

Le volume de ce mélange est de 61 µl dans chaque tube, auquel sera ajouté une petite quantité de bougie. Ce morceau de bougie a pour rôle d'empêcher les

amplifications non spécifiques et aussi d'éviter l'évaporation au cours de l'amplification.

## Le mélange réactionnel II ou Mix 2

**TABLEAU III : COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL 2**

<u>Concentration des réactifs</u>	<u>Volume</u>	<u>Concentration finale</u>
10X Tampon PCR	4 µl	1X
5U Taq polymérase	1 µl	0,05 unités/
Eau stérile	34 µl	-----
<b>TOTAL</b>	<b>39 µl</b>	

Le volume réactionnel final est composé des 61 µl du mix 1 et 39 µl du mix 2 auxquels seront ajoutés 10 µl d'extrait d'ADN soit un volume final de 100 µl. Ensuite l'amplification enzymatique s'effectuera dans un thermocycleur de type Applied Biosystem en fonction du programme suivant :

- une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C suivie de 35 cycles de,
- une dénaturation pendant 30 secondes à 94°C,
- un appariement pendant 30 secondes à 55°C,
- une extension pendant 1 minute à 72°C.

Après les 35 cycles, l'extension continue pendant 5 mn à 72°C. La conservation se fait à 4°C.

### • Réactions d'amplification pour la deuxième PCR

Elle consiste à amplifier le produit de la première amplification par les paires amorces spécifiques de K1, MAD20 et RO33 (voir tableau I). Le produit amplifié est utilisé comme matrice. Le volume réactionnel est composé de 30,5 µl de mix 1 et de 17,5µl de mix 2 auxquels seront ajoutés 2 µl d'extrait de l'amplifié soit un volume final de 100 µl.

Ensuite l'amplification enzymatique s'effectuera dans un thermocycleur de type Applied Biosystem en fonction du programme suivant :

- une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C suivie de 35 cycles de:
- dénaturation pendant 30 secondes à 94°C,
- appariements pendant 30 secondes à 57°C,
- extension pendant 1 minute à 72°C.

Après les 35 cycles, l'extension continue pendant 10 mn à 72°C.

Les produits amplifiés seront conservés à 4 °C

### • Technique d'électrophorèse

Les produits obtenus après la deuxième amplification qui utilisaient les amorces spécifiques de K1, MAD20 et RO33 étaient chargés individuellement dans les puits d'agarose à 2% (ultrapure, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY).

L'électrophorèse était effectuée avec un courant de 100 volts fourni par un générateur Pharmacia pendant 1h 30 minutes en présence des marqueurs moléculaires VI de Boehringer-Mannheim (Indiana, IN). Les gels étaient

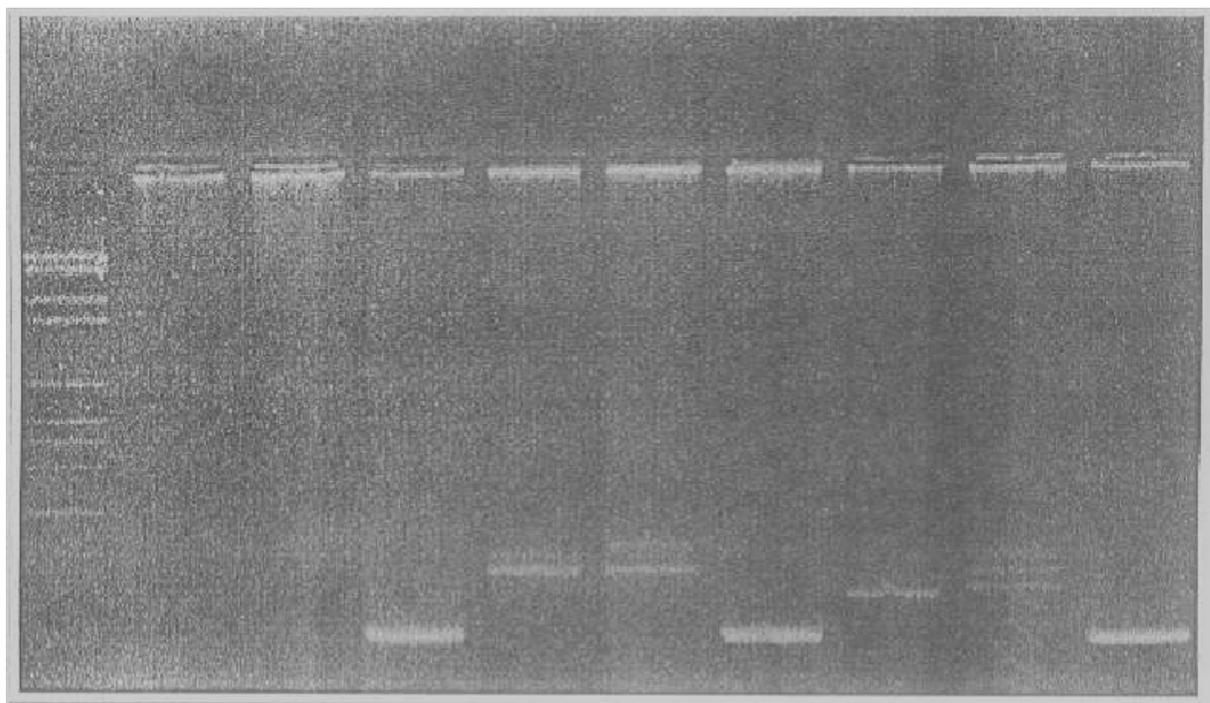
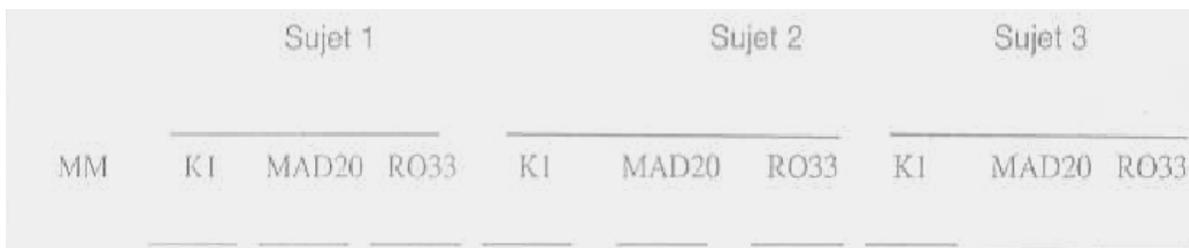
rendus fluorescents par l'utilisation de bromure d'éthidium à la concentration de 0,3 microlitre par millilitre de tampon de migration (0,5X TBE, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY) et d'agarose à la même concentration que celle du tampon de migration. Ensuite, le gel est photographié avec une caméra montée dans une chambre noire (Fisher Biotech, Pittsburg, PA).

- Visualisation des bandes amplifiées

Les bandes rendues fluorescentes étaient photographiées sous la lumière Ultra-Violette (Transilluminateur, Fisher) avec la caméra.

La présence d'une bande sur le gel d'agarose traduit la présence d'un allotype de *P. falciparum*. La présence de plus d'une bande pour un même échantillon signifie que la personne est infectée par plus d'un parasite. Ensuite, les bandes identifiées pour chaque paire des amorces étaient ensuite enregistrées dans le tableur Excel sur Windows 2000.

Le programme Kodack nous permet d'estimer la taille de chacun des fragments amplifiés afin de mettre en évidence aussi bien le polymorphisme de taille que celui de séquence au niveau des différents allotypes utilisés.



(sources Bagayoko MW, CHME)

**Photo 1** : Gel d'agarose visualisé après coloration au bromure d'ethidium

### Interprétation :

L'échantillon 1 présente un allotype R033.

L'échantillon 2 présente 5 allotypes dont deux allotypes K-1, 2 allotypes MAD20 et un allotype R033.

L'échantillon 3 présente 5 allotypes soit un allotype K-1, 3 allotype MAD20 et un allotype R033.

#### **4.7. Définition des cas**

Un état fébrile est défini par une température axillaire supérieure ou égale 37,5 °C.

Un porteur sain se définit par le portage asymptomatique d'hématozoaires, cela voudrait dire que le patient a une goutte épaisse positive et ne présente pas une symptomatologie palustre. En zone d'endémie stable, la seule présence de parasites dans le sang d'un sujet n'est pas suffisante pour évoquer le diagnostic d'un accès palustre.

La suspicion de paludisme simple se définit par un tableau clinique d'embarras gastrique fébrile, accompagné de vomissement, de céphalée, parfois de diarrhée et une fièvre élevée qui est souvent en plateau (40-41°C). en l'absence de thérapeutique, les accès peuvent se reproduire à plusieurs reprises selon le rythme tierce ou quarte. Correctement traités, ils disparaissent en quelques heures voire quelques jours (63).

La suspicion du paludisme grave exclusivement dû au *P. falciparum* se définit par l'installation d'une fièvre accompagné des symptômes précédemment décrits dans le paludisme simple.

Chez l'enfant, nous avons recherché une hyperthermie supérieure à 40°C, des convulsions, une prostration ou faiblesse extrême et une parasitémie supérieure à 5 % .

Chez l'adulte, nous avons recherché une hyperthermie supérieure 40°C, l'apparition d'un coma sans étiologies apparentes ou des troubles neurologiques, un syndrome de détresse respiratoire, une anémie sévère (Hb < 5 g/dl) et des hémorragies diffuses.

En l'absence de traitement, le malade se présente alors souvent dans un tableau d'encéphalite aiguë fébrile, avec un discret syndrome méningé et une obnubilation vers l'état mal convulsif. Les défaillances viscérales sont composés d'une insuffisance rénale, d'un œdème pulmonaire, d'un collapsus circulatoire et l'installations des hémorragies diffuses.

L'évolution se fait vers le coma calme avec des crises d'hypertonie paroxystique et la mort en quelques heures (64, 65).

L'anémie est définie selon les critères de l'OMS par un taux d'hémoglobine inférieur à 11 g/dl de moins de 6 ans et un taux d'hémoglobine inférieur à 12 g/dl chez les sujets âgés de 6 ans et plus (66).

Dans notre étude, tous les sujets ayant un taux d'hémoglobine inférieur à 10 g/dl ont été considérés comme anémiques quelque soit leur âge.

L'anémie sévère est définie par un taux d'hémoglobine inférieur à 5 g/dl.

#### 4.8. Prise en charge des malades

##### 4.8.1. Paludisme simple

Les antipaludiques oraux sont indiqués en premier lieu :

4.8.1.1. La Chloroquine, commercialisée sous formes des comprimés de 100 mg.

Posologie : 25 mg/kg par traitement repartit en 3 jours :

- A. 10 mg/kg le premier jour,
- B. 10 mg/kg le deuxième jour,
- C. 5 mg/kg le troisième jour.

Le malade était gardé 30 minutes après l'administration du médicament en vue d'observer la survenue de vomissement.

En dehors de la chloroquine, les patients recevaient un traitement adjuvant tel que les antipyrétiques et les antiémétiques.

Les cas d'échecs thérapeutiques étaient gérés avec l'association sulfadoxine-pyriméthamine ou les sels de quinine.

4.8.1.2. Sulfadoxine-Pyriméthamine,

Posologie : 3 comprimés (en une seule prise) soit un comprimé pour 20 kg. L'adjonction d'acide folique au traitement est parfois nécessaire (présence de la pyriméthamine).

4.8.1.3. Quinine

Posologie : 25 mg/kg/jour en trois prises par voie orale durant 7 jours.

En cas d'accès avec vomissements, on peut s'aider du **Sulfadoxine-Pyriméthamine injectable** en raison de 2 ampoules en une injection en association avec l'acide folique (66).

4.8.2. En cas d'accès grave

4.8.2.1. La Quinine est le chef de file, commercialisée sous le nom de **sels de quinine**.

Posologie : 25 mg/kg/j pendant 5-7 jours.

Elle doit être utilisée dans un sérum glucosé hypertonique 10% pour corriger l'hypoglycémie (souvent associé au paludisme) par voie intraveineuse et en perfusion lente tous les 8 heures.

#### **A J0**

- Administration d'une dose de charge de 10 mg/kg de sels de quinine dans 250 ou 500 ml de sérum glucosé à 5 ou 10 voire 30% en fonction de la glycémie sur une durée de 3 heures ; ou une injection intramusculaire de sulfadoxine-pyriméthamine en raison d'une demi ampoule pour 10 kg de poids corporel est faite pendant les premières heures de la prise en charge,
- 8 heures après, administration de 8 mg/kg de sels de quinine en perfusion dans 250 ou 500 ml de sérum glucose à 5% sur une durée de 3 heures,
- 8 heures après, administration dans 250 ou 500 ml de sérum glucose à 5%.

**A J1 et J2, une dose de 8 mg/kg de sels de quinine en perfusion dans 250 ou 500 ml de sérum glucosé à 5% sur une durée de 3 heures était administrée toutes les 8 heures.**

Au besoin, les patients recevaient un traitement adjuvant comportant un anticonvulsivant, un sédatif, un antiémétique et un antipyrétique avec ou sans enveloppement humide.

Le recours à la voie orale était réalisé dès que possible. Dans tous les cas où l'abord veineux était impossible, les produits ont été injectés en intramusculaire (IM).

#### **4.9. Organisation du travail**

Deux postes de travail avaient été créés.

##### 4.9.1. Un poste clinique

Il était composé d'un médecin et d'un étudiant en année de thèse.

Leur tâche consistait à faire un examen clinique général, complet de tous les sujets. L'examen se résume à la prise de la température, du poids corporel, d'évaluer l'état clinique du patient et surtout leur donner des traitements supervisés en cas de besoin. Après le poste clinique, les sujets étaient référés au poste biologique.

##### 4.9.2. Un poste biologique

Composé d'un médecin biologiste, d'un étudiant en pharmacie en année de thèse et de deux techniciens de laboratoire médicale. Ce poste avait pour mission la réalisation des prélèvements veineux des gouttes épaisses, des confettis et de la détermination des paramètres biologiques (la parasitémie, le taux d'hémoglobine, les prélèvements pour le dosage de la PCR et la cryoconservation des échantillons biologiques).

#### **4.10. Gestions et exploitations statistiques des données**

Les formulaires d'enquête étaient vérifiés systématiquement sur le terrain à la fin de la journée. Ils ont été stockés dans des cantines métalliques et transportés vers le Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (L.B.M.A) où ils ont été l'objet d'une révérification rigoureuse. Toutes les lames de goutte

épaisse ont été relues au L.B.M.A par des lecteurs expérimentés, les confettis ont eux aussi été emballés, classés et gardés.

Les données ont été saisies sur le logiciel Excel 2000. Elles ont ensuite été converties sur Epi-Info version 6.04 et également sur SPSS version 11.0 pour l'analyse. Les tests statistiques qui ont été utilisés sont : le chi carré qui recherche le lien statistiquement significative entre les variables qualitatives et le test de probabilité exact de Fisher lorsque les conditions d'applications du chi carré n'étaient pas remplies. L'obtention d'une probabilité p inférieure ou égale à 0,05 était en faveur de l'existence d'un lien statistique entre les variables comparées. Pour la rédaction de la thèse, le Logiciel Word 2000 a été utilisé.

#### 4.11. Considérations éthiques

Le protocole de recherche a été examiné et validé par le comité éthique médicale (IRB) de la Faculté des Sciences et des Technologies du Mali (FAST).

Après cette approbation, nous avons pris contact avec le médecin-chef et le préfet de Kolakani. Il s'agissait au cours de ces rencontres de leur expliquer les objectifs de l'étude, mais également de recueillir leur point de vue et d'appréhender leur niveau d'adhésion.

Puis, nous avons rencontré le maire de la commune rurale de Sébékoro dont fait partie le village de Missira et les responsables du village de Missira. Après l'accord du chef du village, du conseil du village et du maire de la commune rurale de Sébékoro, un formulaire de consentement fut élaboré en détaillant toutes les modalités de la participation à l'étude. La participation à l'étude était volontaire.

Les prélèvements ont été faits par ponction capillaire au niveau de la pulpe du doigt après l'obtention du consentement du volontaire âgé de plus de 15 ans où l'assentiment des parents ou de tuteurs des volontaires de moins de 15

ans. Les quantités de sang prélevé étaient environ de 250 µL dans les ponctions capillaires. Toutes les précautions étaient prises pour éviter la contamination aux cours des prélèvements et des manipulations (ports de gants stériles, utilisation de vaccinostyles individuelles et stériles).

Durant toute la période de l'étude, toute la population (participant à l'étude ou non participant) a bénéficié de nos prestations (prises en charges des affections courantes, références sur des structures de santé compétentes et/ou hospitalisation sur place).

# RESULTATS

## 5. RESULTATS

### 5.1. Aspects descriptifs

#### 5.1.1. Données sociodémographiques

Nous avons réalisé une étude transversale du 2 au 4 d'octobre 2001 dans le village de Missira et avons inclus 194 sujets qui se sont présentés durant notre séjour.

TABLEAU IV : REPARTITION DE LA POPULATION ETUDIEE SELON LE SEXE

<i>SEXE</i>	<i>Effectifs</i>	<i>Fréquence %</i>
F	74	38,1
M	120	61,9
Total	194	100,0

61,9 % des sujets ayant participé à l'étude étaient de sexe masculin contre 38,1 % de sexe féminin. Le sex-ratio était de 1,62 en faveur du sexe masculin.

**TABLEAU V: REPARTITION PAR AGE DE LA POPULATION**

<i>AGE</i>	<i>Effectifs</i>	<i>Fréquence %</i>
0-5 ans	32	16,5
6 - 9 ans	37	19,1
10-14 ans	43	22,2
14-19 ans	18	9,3
20 et +	<b>64</b>	<b>33,0</b>
Total	194	100,0

33,0 % (64/194) des sujets enquêtés avaient plus de 20 ans. Les sujets de 14 à 19 ans constituaient 9,30% (18/194).

**5.1.2. Etudes cliniques**

▪ **L'infection plasmodiale**

**TABLEAU VI : PREVALENCE DE L'INFECTION PLASMODIALE**

<i>PALUDISME</i>	<i>Effectifs</i>	<i>Fréquence %</i>
GE -	94	48,50
GE +	<b>100</b>	<b>51,50</b>
Total	<b>194</b>	<b>100,00</b>

La prévalence de l'infection plasmodiale dans notre population était de 51,50 %.

**TABLEAU VII : DISTRIBUTION DES DENSITES PARASITAIRES**

<i>Densités parasitaires</i>	<i>Effectifs</i>	<i>Fréquence %</i>
0	94	48,50
1- 5000	<b>48</b>	<b>24,70</b>
5001- 10000	17	8,80
10001-99999	33	17,00
100000 et +	2	1,00
Total	194	100

24,70 % (48/194) de sujets avaient une parasitémie entre 1 et 5000 parasites/mm<sup>3</sup>, 17,00 % (33/194) une parasitémie entre 10001 et 99999 et enfin 8,80 % (17/194) une parasitémie entre 5001 et 10000.

2 sujets avaient une parasitémie supérieure à 100 000 parasites/mm<sup>3</sup>.

La densité moyenne parasitaire positive dans notre étude est 7923,71 +/- 18902,3.

**TABLEAU VIII : LES DIFFERENTES ESPECES PLASMODIALES A MISSIRA**

<i>Espèce plasmodiale</i>	<i>Effectif</i>	<i>Fréquence %</i>
<i>P. falciparum</i>	94	94
<i>P. malariae</i>	5	5
<i>P. ovale</i>	1	1
<i>P. falciparum-P. ovale</i>	1	1
<i>P. falciparum- P. malariae</i>	4	4
Total	100	100

94 % d'infections à *P. falciparum*, 5 % à *P. malariae*, 1 % à *P. ovale* avaient été répertoriés chez les sujets chez qui la goutte épaisse étaient positive.

4 cas de co-infection entre *P. falciparum* et *P. malariae* et 1 cas de co-infection entre *P. falciparum* et *P. ovale* ont été enregistrés.

Le nombre de porteurs de gamétocyte était de 13 et tous portaient des gamétocytes de *P. falciparum*.

▪ **L'anémie**

Dans notre étude, les sujets âgés de moins de 15 ans et les femmes enceintes ont bénéficié du test d'hémoglobine.

**TABLEAU IX : PREVALENCE DE L'ANEMIE DANS NOTRE ETUDE**

<i>Anémie</i>	<i>Effectif</i>	<i>Fréquence %</i>
Présence	<b>57</b>	<b>29,4</b>
Absence	41	21,1
Non bénéficié	96	49,5
<b>Total</b>	194	100

**98 sujets ont bénéficié du test d'hémoglobine alors que les 96 restants soit 49,5 % (96/194) n'ont pas bénéficié.**

**La prévalence de l'anémie dans notre population d'étude ayant bénéficié d'un prélèvement était de 58,20 % (57/98) .**

**TABLEAU X : PREVALENCE DE L'ANEMIE SEVERE**

<i>Anémie</i>	<i>Effectif</i>	<i>Fréquence %</i>
Présence	<b>6</b>	<b>5,8</b>
Absence	92	47,4
Non bénéficié	96	49,5
<b>Total</b>	194	100

L'anémie sévère était définie dans notre étude par un taux d'hémoglobine inférieur à 5 g/dl.

**49,5 % des sujets n'ont pas bénéficié du test d'hémoglobine contre 98 qui en ont bénéficié.**

La fréquence de l'anémie sévère dans la population prélevée était de **6,1 % (6/98)**.

▪ **La fièvre**

**TABLEAU XI : DISTRIBUTION DES CAS DE FIEVRE**

<i>Fièvre</i>	<i>Effectif</i>	<i>Fréquence %</i>
Absence	180	92,8
Présence	<b>14</b>	<b>7,2</b>
Total	194	100

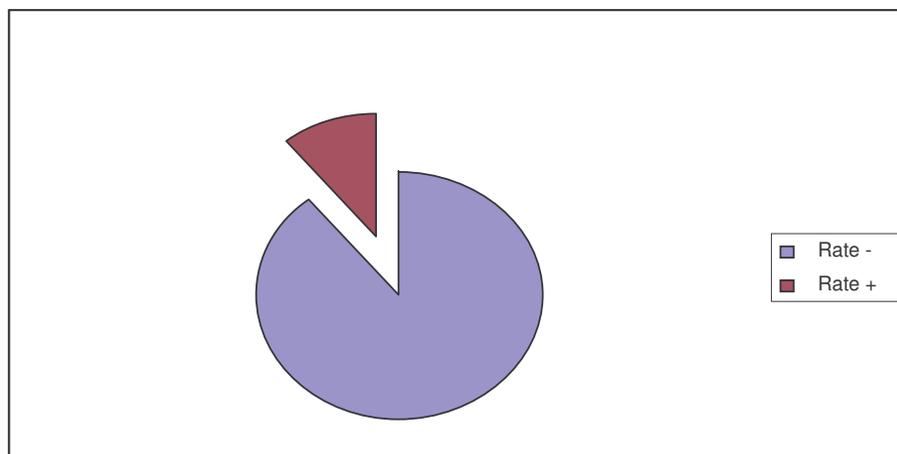
La prévalence de la fièvre était de **7,2 %** (14/194) dans notre population d'étude.

▪ **La splénomégalie**

**TABLEAU XII : DISTRIBUTION DE LA TAILLE DE RATE**

<i>Rate</i>	<i>Effectifs</i>	<i>Fréquence %</i>
0	173	89,2
1	13	6,7
2	7	3,6
3	1	0,5
Total	194	100

6,7 % des cas présentaient une splénomégalie de stade 1, 3,6 % de cas de stade 2 et enfin 0,5 % de cas de stade 3.



**Figure 12** : Fréquence de la splénomégalie dans la population d'étude

La prévalence de la splénomégalie dans la population d'étude était de **10,8 %** (21/194).

### **5.1.3. Etudes de la PCR**

Nous avons effectué la PCR pour 183 sujets.

**TABLEAU XIII : REPARTITION DES ECHANTILLONS EN FONCTION DE LA PCR**

<i>PCR</i>	<i>Effectif</i>	<i>Fréquence %</i>
PCR -	50	27,3
PCR +	<b>133</b>	<b>72,7</b>
Total	183	100

La fréquence des examens de PCR positifs retrouvée dans notre population d'étude était de **72,7 %**.

**TABLEAU XIV : PREVALENCE DES ALLOTYPES DE MSP-1 DANS NOTRE POPULATION D'ETUDE**

<i>Allotypes</i>	<i>Effectifs positifs</i>	<i>Pourcentage</i>	<i>Effectifs totaux</i>
K1	70	38,3	183
MAD20	38	20,8	183
RO33	105	57,4	183

38,3 % des patients avaient l'allotype K1, 20,8 % l'allotype MAD20 et 57,4 % l'allotype RO33.

**TABLEAU XV : POLYMORPHISME DE TAILLE AU SEIN DE NOTRE POPULATION**

<i>Allotypes</i>	<i>Monospécificité</i>	<i>Polymorphisme</i>	<i>Total</i>
K1	45	25	70
MAD20	30	8	38
RO33	105	0	105

L'allotype K-1 était polymorphique avec un taux de 35,70 % ( 25/70), suivi de l'allotype MAD20 avec 26,70 % ( 8/38).

L'allotype RO33 était essentiellement monoclonale à 100 % dans notre étude.

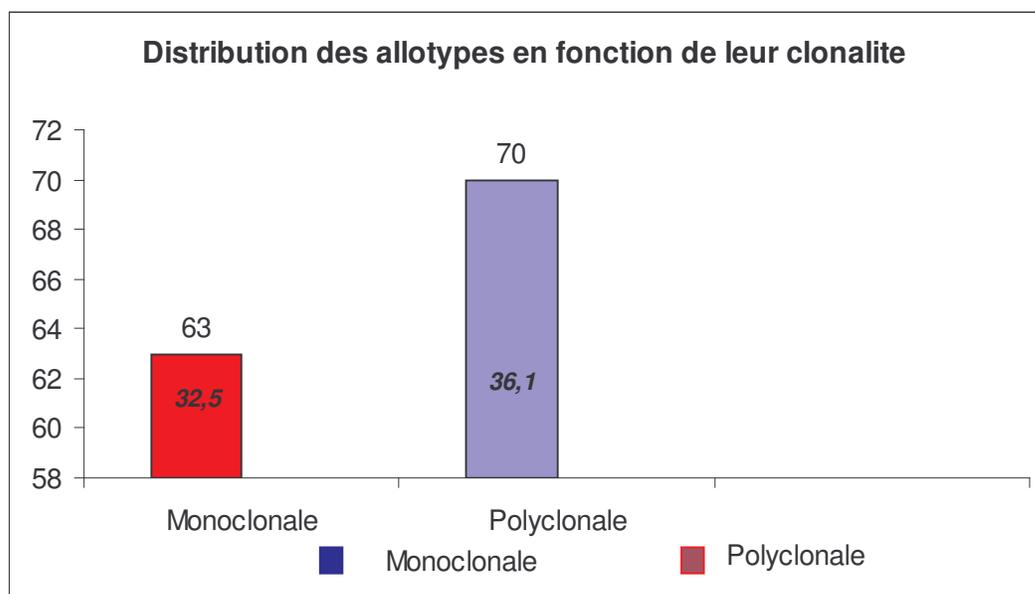


Figure 13 : Fréquence des allotypes en fonction de leur clonalité

Les porteurs d'un seul allotype représentaient 32,5 % (63/183) de notre échantillon alors que ceux de plus d'un allotype étaient de 36,1 % (70/183).

**TABLEAU XVI** : REPARTITION EN FONCTION DU NOMBRE ET DES ALLOTYPES

Types d'allotypes Nombres Allotypes	<i>K1</i>		<i>MAD20</i>		<i>RO33</i>	
	N	%	N	%	N	%
1	45	24,6	30	16,4	105	57,4
2	17	9,3	6	3,1	0	0
3	8	4,4	2	1,1	0	0
Total	183	100	183	100	183	100

24,6 % des sujets portaient un seul allotype de K1, 9,3 % deux allotypes et 4,4 % trois allotypes.

Pour l'allotype MAD20, 16,4 % des sujets portaient un seul allotype, 3,1 % deux allotypes et 1,1 % trois allotypes.

L'allotype RO33 n'a pas enregistré d'infection polyclonale.

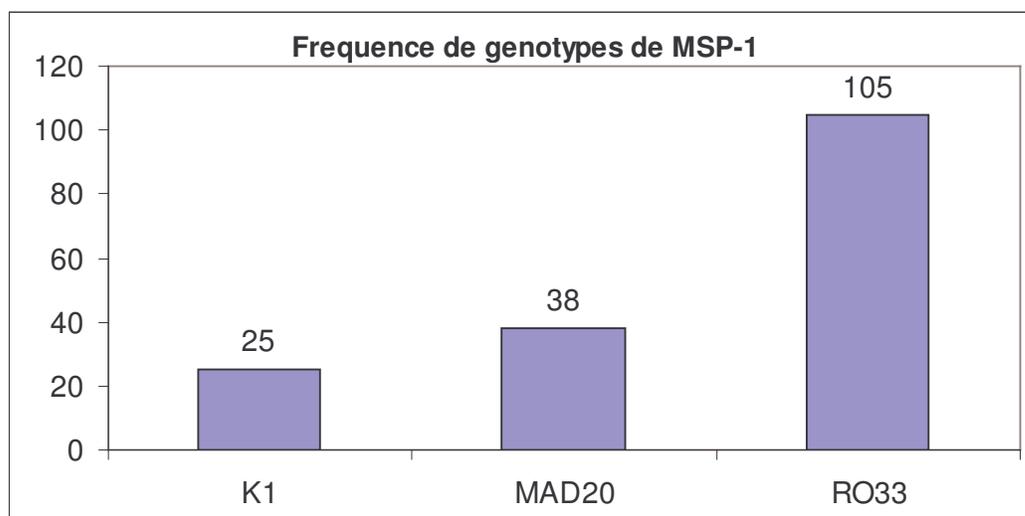


Figure 14 : fréquence des allotypes de MSP-1 dans notre étude

14,90 % (25/168) des sujets avaient une infection allotypique à K1, 22,60 % (38/168) une infection allotypique à MAD20 et 62,50 % (105/168) une infection allotypique à RO33.

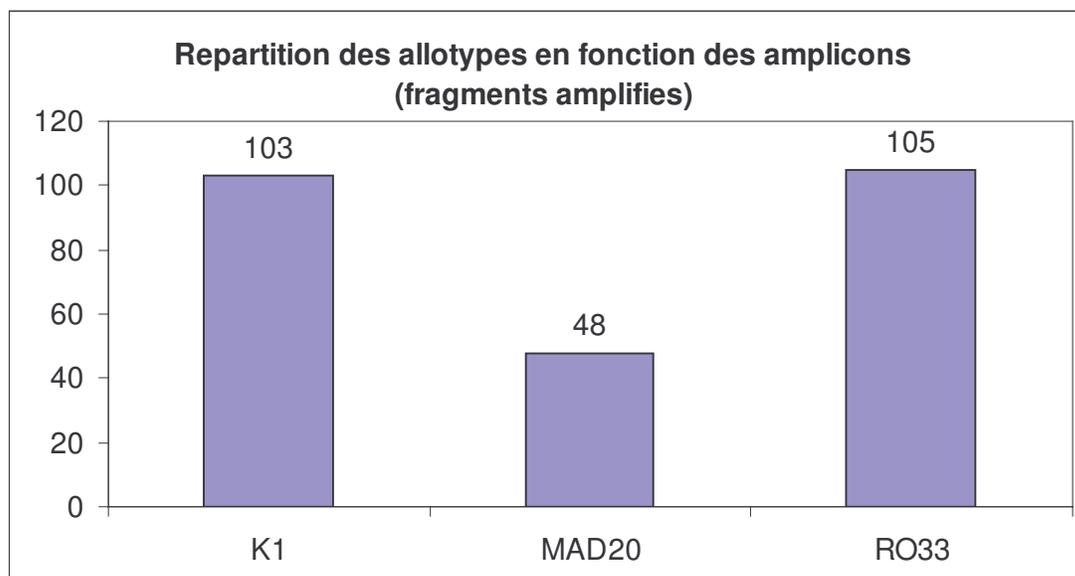


Figure 15 : Distribution des allotypes en fonction des amplicons

105 allotypes étaient enregistrés pour RO33, 103 allotypes pour K1 et 48 allotypes pour MAD20.

## 5.2. Résultats analytiques

### 5.2.1. Résultats paludométriques

**TABLEAU XVII : DISTRIBUTION DE LA FREQUENCE DE L'INFECTION PLASMODIALE SELON L'AGE**

<i>CLASSE AGE</i>	<i>Goutte épaisse positive</i>		<i>Effectifs totaux</i>
	<i>Effectifs</i>	<i>Pourcentage</i>	
0-5 ans	22	68,7	32
6-9 ans	29	78,4	37
10-14 ans	22	51,2	43
15-19 ans	11	61,1	18
20 et +	16	25	64
Total	100	51,5	194

La classe entre 6 et 9 ans a enregistré le taux le plus élevé soit 78,4 % (29/37) alors que celle de plus de 20 ans a noté le plus bas taux soit 25 % (16/64). (Chi-2 = 33,18 ; p < 0,001)

**TABLEAU XVIII : DISTRIBUTION DES CAS D'ANEMIES SELON LA GOUTTE EPAISSE**

<i>Goutte Epaisse</i>	<i>Anémie positive</i>		<i>Effectifs Totaux</i>
	<i>Effectifs</i>	<i>Pourcentage</i>	
Positive	38	58,5	65
Négative	19	57,6	33
Total	57	58,2	98

58,5% des sujets anémiés avaient une goutte épaisse positive.

Nous n'avons pas trouvé de relations entre la positivité de la goutte épaisse et l'anémie. (p = 0,93)

▪ **Les charges parasitaires**

**TABLEAU XIX : RELATION ENTRE LES CHARGES PARASITAIRES ET LE PALUDISME CLINIQUE**

<i>Charges parasitaires</i>	<i>Syndrome palustre</i>		<i>Effectifs Totaux</i>
	<i>Effectifs</i>	<i>Pourcentage</i>	
1– 5000	13	27,1	48
5001- 10000	8	47,1	17
10001-99999	32	96,9	33
100000 et +	2	100	2
Total	55	55	100

Parmi les 100 sujets ayant une goutte épaisse positive, seuls 55 personnes présentaient un syndrome palustre.

Plus la parasitémie est élevée et plus la possibilité de présenter un tableau palustre est élevée. (Chi-2 = 93,6 ; p < 0,001)

**TABLEAU XX : RELATION ENTRE LES CHARGES PARASITAIRES ET L'AGE**

<i>Classe Age</i>	<i>1-5000</i>	<i>5001-10000</i>	<i>100001-99999</i>	<i>100000 et +</i>	<i>Total</i>
0-9 ans	21 (41,2)	6 (11,8)	22 (43,1)	2 (3,9)	51
10-19 ans	16 (48,5)	8 (24,2)	9 (27,3)	0 (0)	33
20 et +	11 (73,7)	3 (20)	2 (1,3)	0 (0)	15
Total	48	17	33	2	100

La classe ayant une parasitémie entre 1 et 5000 parasites/mm<sup>3</sup> avait noté les taux les plus élevés soit 41,2 % , 48,5 % et 73,7 % pour tous les classes d'âges.

(Chi-2 = 41,5 ; p < 0,0001)

### **5.2.2. Résultats cliniques**

**TABLEAU XXI : RELATION ENTRE L'AGE ET LE SYNDROME PALUSTRE**

<i>Ages</i>	<i>Syndrome palustre</i>		<i>Effectifs totaux</i>
	<i>Effectifs</i>	<i>%</i>	
0-5 ans	17	53,1	32
6-9 ans	20	54,1	37
10-14 ans	13	30,2	43
15-19 ans	6	33,3	18
20 et +	7	10,9	64
Total	63	131	194

Le risque de syndrome palustre était plus pour la classe de 20 ans comparé à la classe de moins de 5 ans. ( Chi-2 = 18,06 ; p < 0,001) [OR : 0,11 (0,03-0,34)]  
La comparaison entre les autres classes d'âges n'était pas significative.

#### ▪ **L'anémie**

**TABLEAU XXII : DISTRIBUTION DES CAS D'ANEMIES SELON L'AGE**

<i>CLASSE AGES</i>	<i>Anémie positive</i>		<i>Effectifs totaux</i>
	<i>Effectifs</i>	<i>Pourcentage</i>	
0-5 ans	6	18,75	32
6-9 ans	24	72,7	33
10 et +	27	82,1	33
Total	57	58,2	98

La classe d'âge supérieure à 10 ans était la plus touchée avec 82,1 % alors celle de 0-5 ans avec 18,75 % était la moins touchée.

Nous avons noté une variation des sujets selon les classes d'âges (Chi-2 = 30,11 ; p < 0,001).

**TABLEAU XXIII : DISTRIBUTION DES CAS D'ANEMIES SELON LE SEXE**

<i>SEXE</i>	<i>Anémie positive</i>		<i>Effectifs totaux</i>
	Effectifs	<i>Pourcentage</i>	
Féminin	19	61,3	31
Masculin	38	56,7	67
Total	57	58,2	98

61,3 % (19/31) des sujets anémiés étaient de sexe féminin contre 56,7 % (38/67) de sujets masculin.

Il n'existe pas une relation statistiquement significative entre l'anémie et les sexe. (p > 0,05)

▪ **La fièvre**

**TABLEAU XXIV : DISTRIBUTION DES CLASSES D'AGES EN FONCTION DE LA FIEVRE**

<i>CLASSE AGES</i>	<i>Fièvre présence</i>		<i>Effectifs totaux</i>
	Effectifs	<i>Pourcentage</i>	
0-5 ans	5	15,6	32
6-9 ans	6	18,7	37
10 et +	3	2,4	125
Total	14	7,2	194

Le taux le plus élevé était enregistré par la classe entre 6-9 ans soit 18,7 % (6/37) et le plus bas par celui supérieure à 10 ans avec 2,4 % (3/125).

(Chi-2 = 12,18 ; p = 0,002).

**TABLEAU XXV : DISTRIBUTION DE CHARGES PARASITAIRES SELON LA FIEVRE**

<i>Classe parasitaire</i>	<i>Fièvre présence</i>		<i>Effectifs totaux</i>
	Effectifs	Pourcentage	
1– 5000	3	6,2	48
5001- 10000	1	5,9	17
10001-99999	5	15,1	33
100000 et +	2	100	2
Total	11	1,4	100

Le taux le plus élevé était enregistré par la classe parasitaire entre 10001et 99999 soit 15,1 % (5/33) et celle du plus bas par la classe parasitaires entre 5001 et 10000 soit 5,9 % (1/17). (Chi-2= 31,20 ; p < 0,001).

Les 2 cas de parasitémie supérieure à 100000 parasites par/mm<sup>3</sup> sont fébriles.

**TABLEAU XXVI : RELATION ENTRE LA FIEVRE ET LES ESPECES PLASMODIALES**

<i>P. falciparum</i>	<i>Fièvre</i>		<i>Effectifs totaux</i>
	Effectifs	Pourcentage	
Présence	<b>11</b>	<b>11,1</b>	99

Absence	3	31,6	95
Total	14	7,2	194

11,1 % (11/99) des sujets infectés par *Plasmodium falciparum* étaient fébriles. (p de Fisher < 0,05)

Les 5 cas de sujets qui sont infectées de *P. malariae* et le seul cas de *P. ovale* n'étaient pas fébriles. (p > 0,05)

▪ **La splénomégalie**

**TABLEAU XXVII : DISTRIBUTION DE LA SPLENOMEGALIE EN FONCTION DE L'AGE**

<i>CLASSE AGES</i>	<i>Splénomégalie</i>		<i>Effectifs totaux</i>
	Effectifs	Pourcentage	
0-5 ans	5	15,6	32
6-9 ans	5	13,5	37
10-14 ans	11	8,8	125
Total	21	10,8	194

15,6 % ( 5/32) de cas de splénomégalie appartenait à la classe 0-5 ans et 8,8 % (11/125) à celle supérieure à 10 ans.

Aucune relation statistiquement significative n'est noté entre la splénomégalie et les classes d'âges. (p < 0,45)

**TABLEAU XXIII : DISTRIBUTION DE LA SPLENOMEGALIE EN FONCTION DU SEXE**

<i>SEXE</i>	<i>Splénomégalie</i>		<i>Effectifs totaux</i>
	Effectifs	Pourcentage	

Féminin	8	10,81	74
Masculin	13	10,83	120
Total	21	10,82	194

10,81 % (8/7421) de sujets masculins présentaient une splénomégalie contre 10,83 % (13/120) chez le sexe féminin.

Les patients de notre étude sont sujets à la splénomégalie de façon identique.

(p > 0,99)

**TABLEAU XXIX : REPARTITION DE LA SPLENOMEGALIE EN FONCTION DES CHARGES PARASITAIRES**

<i>Charges parasitaires</i>	<i>Splénomégalie</i>		<i>Effectifs totaux</i>
	Effectifs	Pourcentage	
1- 5000	6	12,5	48
5001- 10000	1	5,9	17
10001-99999	4	12,1	33
100000 et +	1	50	2
Total	12	12	100

12,5% (6/48) des cas de splénomégalie avaient une parasitémie inférieure à 5000 parasites/mm<sup>3</sup> et 5,9% (1/17) entre 5001-10000 parasites/mm<sup>3</sup>.

1 seul portait une splénomégalie parmi ceux ayant une parasitémie supérieure à 100000 parasites/mm<sup>3</sup>.

Il n'existe aucune relation significative entre la présence d'une splénomégalie et les densités parasitaires. (p de Fisher = 0,64)

**TABLEAU XXX : REPARTITION DE LA SPLENOMEGALIE EN FONCTION DE LA GOUTTE EPAISSE**

<i>Goutte épaisse</i>	<i>Splénomégalie</i>	<i>Effectifs totaux</i>
-----------------------	----------------------	-------------------------

	Effectifs	%	
Positive	12	12	100
Négative	9	9,6	94
Total	21	10,8	194

12 % (12/100) des cas de splénomégalies ont une goutte épaisse positive.

Il n'existe pas une relation entre la splénomégalie et la positivité de la goutte épaisse. ( $p = 0,58$ )

### 5.2.3. Résultat du P.C.R selon les différents allotypes

- Sensibilité et spécificité de la PCR

**TABLEAU XXXI : REPARTITION DE LA GOUTTE EPAISSE EN FONCTION DE LA PCR**

<i>PCR</i>	<i>GE +</i>	<i>GE -</i>	<i>Total</i>
PCR +	74	59	133
PCR -	17	33	50
Total	91	92	183

La sensibilité de la PCR était de 81,32 % (74/91) et sa spécificité de 35,87 % (33/92).

- Résultats analytiques de la PCR classique

**TABLEAU XXXII : REPARTITION DE LA PCR EN FONCTION DE L'AGE**

<i>CLASSE AGES</i>	<i>PCR positive</i>	<i>Effectifs totaux</i>
	Effectifs	Pourcentage
0-5 ans	25	86,2
		29

6-9 ans	25	75,7	33
10-14 ans	33	80,5	41
15-19 ans	15	88,2	17
20 et +	35	44,4	63
Total	133	72,7	183

Le taux d'infection à la PCR le plus élevé soit 86,2 % (25/29) était enregistré par la classe d'âges de 15-19 ans et le plus bas par celle de plus de 20 ans avec 11,3 % (35/183).

Nous avons une relation entre la PCR et l'âge. ( Chi-2=15,5 ; p < 0,004 )

**TABLEAU XXXIII : RELATION ENTRE LA PCR ET LES CAS DE SYNDROMES PALUSTRES**

<i>PCR</i>	<i>Syndrome palustre</i>		Effectifs totaux
	Effectifs	Pourcentage	
Présence	46	34,6	133
Absence	10	20	50
Total	56	30,6	183

34,6 % (46/133) de cas qui présentaient un syndrome palustre avaient une PCR positive. ( p = 0,056 )

**TABLEAU XXXIV : REPARTITION DE L'ANEMIE EN FONCTION DE LA PCR**

<i>PCR</i>	<i>Anémie +</i>	<i>Anémie -</i>	<i>Total</i>
------------	-----------------	-----------------	--------------

Positive	<b>45</b>	32	77
Négative	7	6	13
Total	52	38	90

58,4 % (45/77) de sujets anémies avaient une PCR positive contre 53,8 % (7/13) qui sont anémiés avec une PCR négative.

Il n'existe pas une différence statistiquement significative. ( p = 0,75)

**TABLEAU XXXV:** RELATION ENTRE LA PCR ET LES CHARGES PARASITAIRES

<i>Charges parasitaires</i>	<i>PCR positive</i>		
	Effectifs	Pourcentage	Effectifs totaux
1– 5000	34	75,5	45
5001- 10000	10	71,4	14
10001et plus	29	90,6	32
Total	73	80,2	91

90,6 % (29/32) cas de PCR positive avaient une classe parasitaire supérieure à 10001 parasites/mm<sup>3</sup> alors que 71,5 % de cas de PCR positive entre 1- 5000 parasites/mm<sup>3</sup>. (p = 0,003)

**TABLEAU XXXVI :** RELATION ENTRE LA PCR ET LES ESPECES PLASMODIALES

<b>PCR</b>	<b><i>P. falciparum</i></b>		<b>Total</b>
	Effectifs	Pourcentage	Effectifs totaux
Positive	16	32	50
Négative	74	55,6	133
Total	93	50,8	183

32 % (16/50) des patients infectés à *P. falciparum* avaient une PCR positive.

( Chi-2=8,1 ; p = 0,004 ).

1 seul cas de co-infection entre *P. falciparum* et *P. malariae* avaient eu une PCR positive.

▪ **Etude des allotypes en fonction des données démographiques**

**TABLEAU XXXVII : REPARTITION DES ALLOTYPES EN FONCTION DE L'AGE**

<b>Classes Ages</b>	<b>K1</b>	<b>MAD20</b>	<b>RO33</b>
0-9 ans	26	19	43
10-19 ans	29	12	35
20 et +	15	7	27
Total	70	38	105

Nous avons une relation statistiquement significative entre les classe d'âge et les allotypes K1 ( Chi-2=7,25 ; p=0,03 ), les allotypes MAD20 ( Chi-2=9,28 ; p=0,01 ) et enfin les allotypes RO33 ( Chi-2 = 9,4 ; p = 0,01 ).

**TABLEAU XXXVIII : REPARTITION DES ALLOTYPES EN FONCTION DU SEXE**

<i>Sexe</i>	<i>K1</i>	<i>MAD20</i>	<i>RO33</i>
Masculin	41	23	63
Féminin	29	15	42
Total	70	38	105

Il n'existe pas de prédominance significative d'un allotype par rapport à un autre en fonction du sexe (  $p = 0,64$ ).

L'allotype RO33 était le plus fréquent chez les deux sexes.

▪ **Clonalité**

**TABLEAU XXXIX : RELATION ENTRE LA FIEVRE ET LES INFECTIONS ALLOTYPIQUES DE MSP-1**

<i>Allotypes</i>	<i>Fièvre présence</i>	<i>%</i>	<i>Effectifs totaux</i>	<i>p</i>
K1	Présence	7	10	0,03
	Absence	3	55,7	
MAD20	Présence	4	10,5	0,1
	Absence	6	4,1	
RO33	Présence	6	5,7	0,8
	Absence	4	5,1	
Total		10	5,4	183

10 % (7/70) des patients infectés par l'allotype K1 présentaient une fièvre. ( $p=0,03$ )

**TABLEAU XXXX : RELATION ENTRE L'ANEMIE ET LES INFECTIONS ALLOTYPIQUES**

<i>Allotypes</i>	<i>Anémie positive</i>	<i>%</i>	<i>Effectifs totaux</i>	<i>P</i>
K1	Présence	24	55,8	0,71
	Absence	28	59,6	

MAD20	Présence	16	57,1	28	0,93
	Absence	36	58,1	62	
RO33	Présence	37	59,6	62	0,58
	Absence	15	53,5	28	
Total		52	57,7	90	

55,8 % (24/43) des patients anémiés portaient l'allotype K1, 57,1 % (16/28) l'allotype MAD20 et 59,6 % (37/62) l'allotype RO33.

Nous n'avons pas observé une relation statistiquement significative dans ce tableau. ( $p > 0,05$ )

**TABLEAU XXXXI : RELATION ENTRE LA SPLENOMEGALIE ET LES INFECTIONS ALLOTYPQUES**

<i>Allotypes</i>		<i>Splénomégalie</i>	<i>%</i>	<i>Effectifs totaux</i>	<i>p</i>
K1	Présence	8	11,4	70	0,71
	Absence	11	9,7	113	
MAD20	Présence	8	21,1	38	0,01
	Absence	11	7,6	145	
RO33	Présence	7	8,9	78	0,59
	Absence	12	11,4	105	
Total		19	10,4	183	

21,1 % (8/38) d'infections allotypiques à MAD20 présentaient une splénomégalie. (  $\text{Chi-2}=5,86$  ;  $p=0,01$  )

**TABLEAU XXXXII : RELATION ENTRE LA SPLENOMEGALIE ET L'ALLOTYP MAD20**

<i>Allotype MAD20</i>  Splénomégalie			$\frac{A}{bs}$ $\frac{e}{n}$ $\frac{ce}{M}$ $\frac{A}{D}$ $\frac{2}{0}$
	<i>Présence MAD20</i>		<i>Total</i>
Splénomégalie palustre	<b>5</b>	5	<b>10</b>
Splénomégalie non palustre	<b>3</b>	6	9
Absence de splénomégalie	30	134	164
<b>Total</b>	<b>38</b>	145	183

5 cas de splénomégalie palustre portaient l'allotype MAD20 contre 3 cas de splénomégalie non palustre qui portaient également l'allotype MAD20.

( Chi-2 = 6,67 ; p = 0,036 )

**- Relations entre le paludisme et les infections allotypes de MSP-1**

**TABLEAU XXXXII : RELATION ENTRE LE SYNDROME PALUSTRE ET LES INFECTIONS ALLOTYPHIQUES DE MSP-1**

<i>Allotypes</i>	<i>Syndrome palustre</i>	<i>%</i>	<i>Effectifs totaux</i>	<i>p</i>
<b>K1</b>	Présence	27	38,6	70 0,07
	Absence	29	25,7	

MAD20	Présence	<b>21</b>	<b>55,3</b>	38	<i>0,0001</i>
	Absence	35	24,1	145	
RO33	Présence	37	47,4	78	<i>0,14</i>
	Absence	19	18,1	105	
Total		56	30,6	183	

55,3 % (21/38) infectés par la souche MAD20 présentaient un syndrome palustre. (  $p < 0,0001$  )

**TABLEAU XXXIV : RELATION ENTRE LA POSITIVITE DE LA GOUTTE EPAISSE ET LES INFECTIONS ALLOTYPIQUES DE MSP-1**

<i>Allotypes</i>	<i>Goutte épaisse positive</i>	<i>%</i>	<i>Effectifs totaux</i>	<i>p</i>	
<b>K1</b>	Présence	43	61,4	70	<i>0,013</i>
	Absence	48	42,5	113	
MAD20	Présence	25	65,8	38	<i>0,026</i>
	Absence	66	45,5	145	
RO33	Présence	59	75,6	78	<i>0,042</i>
	Absence	32	30,5	105	
Total		91	49,7	183	

61,4 % (43/70) des patients positive à la goutte épaisse portaient l'allotype K1, 65,8 % (25/38) l'allotype MAD20 et 75,6 % (59/78) l'allotype RO33.

Les allotypes K1, MAD20 et RO33 ont une relation statistiquement significative. (  $p < 0,05$  )

**TABLEAU XXXV : RELATION ENTRE LES CHARGES PARASITAIRES ET LES INFECTIONS ALLOTYPIQUES DE MSP-1**

<i>Charges parasitaires</i>	<i>K1</i>			<i>MAD20</i>			<i>RO33</i>		
	Effectifs	%	Effectifs totaux	Effectifs	%	Effectifs totaux	Effectifs	%	Effectifs totaux
1- 5000	17	37,8	45	6	13,3	45	28	62,2	45
5001- 10000	<b>8</b>	<b>57,1</b>	14	5	35,7	14	7	50	14

10001-99999	17	56,7	30	13	43,3	30	23	76,7	30
100000 et +	2	100	2	1	50	2	1	50	2
TOTAL	44	48,3	91	25	20,8	91	59	64,8	91
<i>p</i>	0,001			0,003			0,11		

57,1 % (8/14) de cas infectés par l'allotype K1 avaient une classe parasitaire entre 5001 et 10000 parasites /mm<sup>3</sup>. (  $p < 0,001$  )

43,3 % (13/30) de cas infectés par l'allotype MAD20 avaient une classe parasitaire entre 10000 et 99999 parasites/mm<sup>3</sup>. (  $p < 0,003$  )

▪ **Résultats des associations allotypiques**

**TABLEAU XXXXVI: RELATION ENTRE LA FIEVRE ET LES ASSOCIATIONS ALLOTYPHIQUES**

<i>Allotypes</i>	<i>Fièvre</i>		<i>%</i>	<i>Effectifs totaux</i>	<i>p</i>
<b>K1-MAD20</b>	Présence	3	14,3	21	0,09
	Absence	7	43,2	162	
MAD20-RO33	Présence	3	10	30	0,21
	Absence	7	4,5	153	
K1-RO33	Présence	5	10,9	46	0,12
	Absence	5	36,5	137	
Total		10	54,6	183	

14,3 % (3/21) de patients fébriles portaient l'association K1-MAD20, 10,9 % (5/46) l'association K1-RO33 et enfin 10 % (3/30) l'association K1-MAD20.

Aucune relation statistiquement significative n'est noté dans ce tableau. (  $p > 0,05$  )

**TABLEAU XXXXVII: RELATION ENTRE L'ANEMIE ET LES ASSOCIATIONS ALLOTYPHIQUES**

<i>Allotypes</i>	<i>Anémie</i>		<i>%</i>	<i>Effectifs totaux</i>	<i>p</i>
<b>K1-MAD20</b>	Présence	12	66,7	18	0,43
	Absence	40	55,6	72	

MAD20-RO33	Présence	12	52,2	23	0,62
	Absence	40	59,7	67	
K1-RO33	Présence	18	60	30	0,82
	Absence	34	56,7	60	
Total		52	57,8	90	

66,7 % (12/18) des sujets anémiés portaient l'association K1-MAD20, 60 % (18/30) l'association K1-RO33, et 52,2 % (12/23) l'association MAD20-RO33. Nous n'avons aucune relation statistiquement significative dans ce tableau. ( $p > 0,05$ )

**TABLEAU XXXXVIII : RELATION ENTRE LA SPLENOMEGALIE ET LES ASSOCIATIONS ALLOTYPHIQUES**

<i>Allotypes</i>		<i>Splénomégalie</i>	<i>%</i>	<i>Effectifs totaux</i>	<i>p</i>
K1-MAD20	Présence	4	19,1	21	0,24
	Absence	14	8,6	162	
MAD20-RO33	Présence	6	20	30	0,09
	Absence	13	8,5	153	
K1-RO33	Présence	6	13,1	46	0,57
	Absence	13	9,5	137	
Total		18	12,6	183	

20 % (6/30) des cas de splénomégalie portaient l'association MAD20-RO33, 19,1 % (4/21) l'association K1-MAD20 et 13,1 % (6/46) l'association K1-RO33.

Aucune relation statistiquement significative n'est notée dans ce tableau. ( $p > 0,05$ )

**- Relations entre le paludisme et les associations allotypes de MSP-1**

**TABLEAU XXXXIX : RELATION ENTRE LE SYNDROME PALUSTRE ET LES ASSOCIATIONS ALLOTYPHIQUES DE MSP-1**

<i>Allotypes</i>		<i>Syndrome palustre</i>	<i>%</i>	<i>Effectifs totaux</i>	<i>p</i>
------------------	--	--------------------------	----------	-------------------------	----------

<b>K1-MAD20</b>	Présence	12	57,1	21	0,005
	Absence	44	27,2	162	
MAD20-RO33	Présence	16	53,3	30	0,03
	Absence	40	26,1	153	
K1-RO33	Présence	21	45,6	46	0,01
	Absence	35	25,5	137	
Total		56	30,6	183	

57,1 % ( 12/21) des cas étaient infectés par l'association K1-MAD20, ensuite 53,3 % (16/30) par l'association MAD20-RO33 et enfin 45,6 % avec l'association K1-RO33.

Nous avons une relation statistiquement significative entre les associations allotypiques et le syndrome palustre. ( p = 0,001)

**TABLEAU L : RELATION ENTRE LA POSITIVITE DE LA GOUTTE EPAISSE ET LES ASSOCIATIONS ALLOTYPIQUES**

<i>Allotypes</i>	<i>Goutte Épaisse positive</i>		<i>%</i>	<i>Effectifs totaux</i>	<i>p</i>
<b>K1-MAD20</b>	Présence	14	66,7	21	0,11
	Absence	77	47,5	162	
MAD20-RO33	Présence	19	63,3	30	0,11
	Absence	72	47,5	153	
K1-RO33	Présence	32	69,6	46	0,002
	Absence	59	43,1	137	
Total		91	49,7	183	

69,6 % (59/137) des cas ayant une goutte épaisse positive portaient l'association K1-RO33. ( Chi-2 = 9,6 ; p = 0,002)

**TABLEAU LI : RELATION ENTRE LES CHARGES PARASITAIRES ET LES ASSOCIATIONS ALLOTYPIQUES**

<i>Charges parasitaires</i>	<i>K1-MAD20</i>		<i>MAD20-RO33</i>		<i>K1-RO33</i>		Effectifs totaux
	Effectifs	%	Effectifs	%	Effectifs	%	

1– 5000	1	2,2	45	3	6,7	45	12	26,7	45
5001- 10000	<b>14</b>	<b>100</b>	14	5	35,7	14	5	35,7	14
10001-99999	8	26,7	30	<b>11</b>	<b>36,7</b>	30	<b>14</b>	<b>46,7</b>	30
100000 et +	1	50	2	0	0	2	1	50	2
TOTAL	24	26,4	26,4	19	20,9	91	32	35,2	91

La classe parasitaire comprise entre 50001 et 10000 parasites/mm<sup>3</sup> étaient infectés par l'association K1-MAD20.

36,7 % ( 11/30) des sujets infectés par l'association MAD20-RO33 avaient une classe parasitaire comprise entre 10001-99999.

La classe parasitaire comprise entre 10001-99999 infectés par l'association K1-RO33 a enregistré 46,7 % (14/30).

Il existe une relation statistiquement significative entre la charges parasitaires et les associations allotypiques. ( p = 0,001)

# COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

## 7. COMMENTAIRE ET DISCUSSION

### 7.1. Méthodologie

Au cours de cette étude, nous avons étudié l'épidémiologie de l'infection palustre au niveau moléculaire et identifié les différents génotypes de *P. falciparum* dans le village de Missira (Cercle de Kolokani) à la fin de l'hivernage (saison de transmission du paludisme). Nous avons utilisé la technique de PCR avec le gène de MSP-1 comme marqueur moléculaire. Le choix de MSP-1 a l'avantage d'assimiler la présence d'un fragment amplifié d'ADN à un parasite. Le gène de MSP-1 est un gène à copie unique présent au niveau du génome haploïde de *P. falciparum*.

Le choix du village de Missira se justifie par son accessibilité en toute saison car il est situé à 50 km à l'Est de Kolokani. En plus, il est localisé dans une zone d'endémie palustre et a servi de cadre d'étude à l'essai clinique de l'ivermectine contre l'onchocercose (60).

Pour le besoin de l'étude, nous avons érigé une cellule de santé dans le village de Missira et mené une étude transversale du 02 au 04 octobre (fin hivernage) sur les habitants de ce village. Nous avons inclus tout sujet se présentant au poste d'identification après avoir lu et obtenu un consentement éclairé et l'identifié par un numéro qui reflétait l'ordre dans lequel il s'est présenté. Les données sociodémographiques et cliniques étaient collectées au moyen d'une fiche d'observation individuelle et standardisée, et élaborées suivant les objectifs de l'étude. Elles sont issues de l'anamnèse et de l'examen clinique et sont consignées sur une fiche d'enquête. L'examen clinique consistait en une appréciation de la température et de la taille de la rate. Nous avons exploré les paramètres parasitologiques, hématologiques et moléculaires. Puis, selon leur tableau clinique, nous avons effectué un traitement adéquat.

Pour évaluer l'anémie, le taux d'hémoglobine a été déterminé par la méthode spectrophotométrique en utilisant

l'appareil portable HemoCue\* (Hemocue AB, Ängelholm, Suède n°651450) fonctionnant sur pile au lieu de l'utilisation du taux d'hématocrite qui nécessite la présence d'une source électrique.

Concernant la PCR classique, nous avons utilisé la technique du sang séché sur un papier buvard qui a permis de collecter deux gouttes de sang qui étaient séchées et gardées à la température ambiante pour plusieurs mois voire plusieurs années. Elle est plus pratique que le prélèvement du sang total qui doit être gardé à 4°C car elle permet aussi d'éviter l'utilisation des anticoagulants qui pourraient inhiber une amplification ultérieure de l'ADN. Pour minimiser les risques de contamination pendant les manipulations, les confettis ont été réalisés selon la technique de spots.

Nous avons préféré la technique d'extraction de Chelex-100 par rapport aux autres techniques car celles ci demandent l'utilisation des produits chimiques dont la manipulation nécessite une hotte aspirante.

La technique d'amplification génique et les amorces que nous avons utilisé nous ont permis d'effectuer un typage de *P. falciparum* en trois allotypes (K1, MAD20, RO33) déjà décrit de nos jours (25,24,26). Nous avons utilisé comme amorces les séquences nucléotidiques du gène s'hybridant au niveau des régions conservées du bloc 1 et du bloc 3 pour amplifier la région variable du bloc 2 (23). Pour augmenter la sensibilité de la technique de la PCR, nous avons effectué une PCR "nichée" ou nested - PCR.

La non disponibilité d'un bilan étiologique exhaustif des cas d'anémies et des splénomégalies observés constitue une

limite pour porter un jugement sur la place réelle des étiologies possibles. En dépit de ces insuffisances, les résultats générés par ce travail nous permet de situer l'ampleur du problème de l'anémie associé à l'infection palustre en période de forte transmission de la maladie selon les critères de l'OMS

## **7.2. Caractéristiques de la population étudiée**

Notre étude était ouverte à tous les âges de la vie. Notre échantillon était de 194 sujets. Le recensement nous a permis d'estimer la population du village de Missira à 1000 habitants. Le calcul de la population minimale sur Epi Info était de 171 (prévalence 51,5 %, effet de grappe à 1, précision voulue à 7,5 %, risque  $\alpha$  à 0,5%).

L'analyse de la distribution de notre population d'étude selon l'âge a montré une prédominance des enfants et des adolescents soit 67 % (T5). Nous avons observé une nette prédominance du sexe masculin avec 61,90 % contre 38,10 % de sexe féminin avec un sexe ratio de 1,623 (T4).

Nous n'avons pas observé une relation entre la répartition des allotypes en fonction du sexe mais les hommes étaient plus infectés à 61,36 % par les allotypes contre 38,64 % pour les femmes (T37).

La fréquence d'infection des hommes par les allotypes K1, MAD20 et RO33 était respectivement de 58,60% ; 60,50 % ; 60 % contre 41,40 % ; 39,50 % et

40 % pour les femmes (T37). Nous remarquons une prédominance chez nos sujets de sexe masculin.

Cette infectuosité des hommes par le parasite pourrait s'expliquer par le fait qu'ils sont plus exposés aux piqûres de l'anophèle (plus noctambules que les femmes, club de causerie).

### **7.3. la prévalence de l'infection palustre**

La fréquence du paludisme dans notre population d'étude est de 51,50 % (T6). Cette fréquence est supérieur à celle trouvée dans la zone sahélo saharienne c'est à dire entre Douentza et Tessalit où la prévalence la plus élevé était de 44,6% à Douentza et la plus faible était de 0,5 % à Tessalit juste à la bordure du Sahara malien (36). Ce taux est inférieur à celui trouvé par Ouattara à Bancoumana (67) soit 70,2% et également à celui retrouvé à Donéguébougou qui était de 82,3 % (10). Mais notre taux est supérieur à celui retrouvé par Coulibaly à Bandiagara soit 39,2 % (68).

Cela montre qu'il existe un gradient de transmission du paludisme qui va du Sud au Nord du Mali. Ainsi, Missira se trouverait à un niveau intermédiaire assurant la transmission entre la zone sahélienne et la zone nord soudanienne.

Ces variations de la prévalence de l'infection à *Plasmodium falciparum* d'une zone à une autre et d'année en année de façon régressive dans une même zone parfois pourrait s'expliquer d'une part par les variations de la pluviométrie

responsables d'un décalage de la saison de transmission du paludisme et d'autre part par l'augmentation de la couverture socio-sanitaire et la sensibilisation pour les mesures préventives. L'âge de la population d'étude pourrait également jouer un rôle dans ces variations.

L'analyse de la distribution de l'âge en fonction de la positivité de la goutte épaisse nous montre que c'est surtout la classe 0-9 ans avec 51 % constitue le groupe le plus infecté. Ceci nous a permis de classer le village de Missira comme une zone hyper-endémique (60).

Au cours de notre étude, nous avons eu que 2 cas de neuropaludisme avec une parasitémie supérieure  $100000$  parasites/mm<sup>3</sup> et leurs âges étaient inférieurs à 9 ans. La parasitémie moyenne de notre population d'étude a été de  $7924$  parasites/mm<sup>3</sup> (T7).

La formule parasitaire retrouvée à Missira reste la même que celle observée au Sud comme à Bancoumana (67) et à Donéguébougou (10). Ainsi, nous avons remarqué que la population d'âge inférieure à 9 ans enregistrait le taux le plus élevé pour les différentes classes parasitaires (T21).

Cela s'explique que par le fait que jusqu'à cette période, l'immunité contre le paludisme n'est pas encore acquise.

Les fortes parasitémies sont associées aux allotypes K1 et MAD20 (T45). Donc ce qui signifierait que les allotypes K1 et MAD20 posséderaient la possibilité d'être sélectionnées par le biais de la sélection naturelle. Ceci est pourrait être due à la capacité multiplicative des allotypes K1 et MAD20 au détriment de RO33.

Ainsi, il y a la possibilité que l'immunité acquise était seulement spécifique à RO33, et par conséquent les sujets infectés par les allotypes K1 et MAD20 ne pouvaient pas se prémunir contre des fortes parasitémies. Cette hypothèse avait été énoncée par Fruh et al., (22) qui ont montré que l'immunité contre l'infection était spécifique de souche et de courte durée.

La répartition des allotypes en fonction des charges parasitaires nous montre que c'est surtout lorsque la charge parasitaire dépasse 10000 parasites/mm<sup>3</sup> qu'on enregistre un taux élevé d'infection monoclonale. Ainsi, on peut en déduire plus la charge parasitaire est élevée et plus on a des souches monoclonales.

Cette observation similaire a été faite par Koita qui a remarqué un faible polymorphisme des allèles chez les sujets ayant une forte parasitémie (24). Cela peut être due à un manque de compétition génotypique. Il est possible que des sujets neufs ont été exposés à des multiples infections une étude doit être menée pour comprendre ce phénomène.

L'amplification génique à l'aide de nos amorces nous ont permis d'identifier les trois allotypes de MSP-1 déjà décrits ailleurs ( Bancoumana, Bamako et Dakar ). Sur les 183 échantillons, nous avons identifié 256 allotypes avec une moyenne de 1,40 infection allotypique par individu. Dans notre étude, l'allotype le plus fréquent est la souche RO33 avec une fréquence de 41,05 %, suivit de l'allotype K1 avec 40,20 % et enfin MAD20 avec 18,75 %. L'allotype K1 est le plus polymorphique (T15).

A Bancoumana, en milieu d'endémicité palustre, Ouattara a trouvé en Octobre 96 une fréquence respective de 37,5 % pour l'allotype RO33, une fréquence de 37,7 % pour l'allotype K1 et enfin une fréquence de 24,8 % pour l'allotype MAD20 (67).

Au CHME, Bagayoko a trouvé une fréquence de 35,27 % pour l'allotype K1, suivit de 24,03 % pour l'allotype MAD20 et 33,33 % pour RO33 (69).

Tous les allotypes retrouvés au cours de l'étude sont polymorphiques sauf le RO33 qui est monospécifique ainsi il conserve le même profil génétique.

Nous avons trouvé que 10,9 % des patients étaient infectés simultanément par les trois allotypes. Bagayoko a trouvé une infection aux trois allotypes estimée à 8,59 % au CHME (69). A Bancoumana, Ouattara a chiffré à 67 % les infections simultanées aux trois allotypes (67). Cette différence avec Bancoumana peut être expliquée par la différence dans la taille des échantillons (194 contre 1449) de l'étude de Missira par rapport à celle de Bancoumana.

#### **7.4. L'anémie**

Nous avons estimé le taux d'hémoglobine chez les sujets ayant un âge inférieur à 15 ans et chez les femmes enceintes. Il était difficile pour nous de couvrir toute la population car nous n'avons pas en ce moment la quantité des réactifs nécessaires à effectuer les prélèvements de notre population d'étude.

La prévalence de l'anémie dans notre population d'étude était de 58,20 % (T9). Ce qui était peu élevé par rapport au taux d'anémie modérée sur le plan national qui est de 53 % (70).

Les sujets ayant un taux d'hémoglobine inférieur à 5 g/dl représentait 6,1 % (T10), ce taux est inférieur au taux national qui est de 11 % (69). Le rôle du paludisme dans la survenue de l'anémie a été estimé dans notre étude, le paludisme était associé dans 50 % des cas de l'anémie (T20). Les 50 % restants pourraient être dues à des parasitoses intestinales et à la schistosomiase urinaire. Des études parasitologiques des selles et des urines doivent être faites pour déterminer leur contribution dans la survenue de l'anémie. Quant à l'anémie sévère, les 6 cas étaient associés au paludisme (T20).

La prévalence de l'anémie chez la classe d'âge de 0-9 ans étaient estimés à 30,6%. Un résultat similaire a été retrouvé à Bancouamana avec 20,2 % (67) et à Donéguébougou avec 32,8 % (10). Alors que Dembélé a trouvé un taux de 41,2 % observé en saison de pluies en milieu péri-urbain de Sikasso au Mali, mais ce taux est supérieur à celui des femmes

enceintes (15,4%) de trois quartiers péri-urbains de Bamako (12).

La mortalité spécifique liée à cette érythrocytopathie dans la population des enfants de moins de 5 ans est estimée entre 25 et 35% de la mortalité infanto-juvénile globale (55).

La PCR nous a permis de retrouver un taux élevé de 59,6 % de l'allotype RO33 chez les cas d'anémie palustre par rapport aux autres allotypes K1 et MAD20. Cette association n'était pas significative ( T40).

#### **7.5. La splénomégalie**

La splénomégalie a été retrouvée chez 21 sujets parmi les 194 cas dont la rate a été palpée soit 10,8 % (F12). L'indice splénique dans la classe d'âge de 0-9 ans était estimé à 47,6 %.

Yalcouyé a trouvé 20,3 % à Donéguébougou (10) alors que Bagayoko a trouvé 1,8 % en milieu urbain lors d'une étude au Centre Hospitalier Mère-Enfant (68). Ouattara a trouvé un indice splénique à 39,2 % lors de son étude à Bancoumana (67).

Cette étude vient de confirmer qu'en milieu urbain, la splénomégalie est rare chez les patients admis à l'hôpital alors qu'elle peut atteindre 39,2 % et 42,6 % en milieu rural (67), témoin de la chronicité de l'infestation plasmodiale. Cette grande rate palpable témoigne l'état d'hyperactivité qui est la résultante des destructions des formes plasmodiale. Aussi, la chronicité de l'infection plasmodiale en milieu rural (

sans accès aux structures de santé) fait que la rate est constamment sollicitée pour l'élimination des globules rouges parasités en l'absence d'une clairance parasitaire thérapeutique.

La PCR nous a permis d'associer la splénomégalie à l'allotype MAD20 (T41). Plus spécifiquement, l'allotype MAD20 est associé à la splénomégalie palustre. Nous avons 5 cas de splénomégalie palustre qui porte l'allotype MAD20 ( $p=0,036$ ) (T42).

Ceci pourrait s'expliquer par l'expression antigénique importante de l'allotype MAD20 sur la surface des globules rouges et qui provoquerait leur destruction massive au niveau de la rate.

Dans notre population d'étude, nous avons remarqué que 12 cas de splénomégalie étaient liés au paludisme dont 11 cas liés à *P. falciparum* et 1 cas à l'association entre *P. falciparum* et *P. ovale*.

## **7.6. La fièvre**

Les sujets présentant une fièvre durant notre passage n'étaient pas nombreux. La fièvre est un symptôme transient lié la schizogonie intra-érythrocytaire dont la périodicité est connue depuis fort longtemps. Elle apparaît lors de l'éclatement des globules rouges infectés. Nous avons identifié 14 sujets avec une température supérieure 38°C soit 7,2 % de l'échantillon (T11). Parmi ces 14 cas, 11 cas étaient associés à la présence de *P. falciparum* ( $p < 0,05$ ). (T26)

La fréquence de la fièvre dans notre population d'étude est de 7,2 %. Ce taux est plus élevé que celui trouvé par

Yalcouye à Sotuba (4,9 %) mais inférieur à celle de Donéguébougou (8,2 %) (10). De plus, Ouattara a trouvé 12,2 % à Bancoumana (67).

Nous avons remarqué que la fièvre augmentait avec la charge parasitaire à l'exception de celles comprises entre 5001-10000 parasites /mm<sup>3</sup> dans notre étude (T20). A Sikasso en 1997, une relation a été établie entre la fièvre et les fortes parasitémiées parasitaires (supérieure 15000 trophozoites/mm<sup>3</sup>) en saison de pluie et 2000 trophozoites/mm<sup>3</sup> (11).

L'allotype K1 était le plus fréquemment associé à l'état fébrile soit 10 % (T38). Ce résultat était contraire à celui retrouvé par Robert à Dakar (71) qui avait identifié RO33 dans le syndrome fébrile. Notre explication serait que dans les 2 communautés les allotypes RO33 et K1 ont cette capacité de se développer, se diviser plus rapidement et entraîner l'éclatement des rosaces par rapport autres allotypes. Nous notons également une relation avec l'association MAD20-RO33 et la fièvre (T46) dont la fréquence est de 10 % .

## **7.7. Résultats de la PCR**

### **7.7.1. Sensibilité et spécificité de la PCR par rapport à la goutte épaisse**

Tout d'abord, nous avons pu réalisé la PCR que pour 183 échantillons alors que notre population d'étude était

de 194 cas. Ceci s'explique par l'impossibilité d'effectuer une extraction d'ADN sur ces 11 cas à partir des confettis.

Nous avons eu 17 cas où la goutte épaisse était positive et la PCR négative contre 59 cas de goutte épaisse négative et de PCR positive. (T31) Cette discordance s'expliquerait par le fait que nos amorces n'ont pas pu s'apparier comme elles se doivent sur les régions de Blocs 1 et 3 ou les régions flanquant du Blocs 2, ou peut être par la présence de l'hémoglobine qui reconnue comme un élément inhibiteur de PCR.

La sensibilité de la PCR est de 81,32 % et sa spécificité de 53,87 %. (T31)

### **7.7.2. Clonalité**

L'étude de la clonalité à cette période de transmission montre qu'il y a une distribution proportionnelle entre les porteurs d'un seul allotype soit 36,1% et ceux de plus d'un allotype soit 32,5 % (F13) . Cela a été observé à Donéguébougou (10) et à Bancoumana (24). Par

contre durant la saison sèche, la polyclonalité dépasse le portage d'un seul allotype.

# CONCLUSION

## CONCLUSION

Au terme de cette étude, nous avons obtenu une prévalence de l'infection palustre de 51,5 % avec un

indice plasmodique de 51 %. La fréquence de la splénomégalie était de 10,8 % et celle de l'anémie de 58,2 %.

Les trois allotypes décrits par Tanabe et *al.*, (50) ont été retrouvés à Missira. La prévalence moléculaire c'est à dire le nombre moyen d'allotype par personne était de 1,40.

La fréquence des allotypes K1, MAD20 et RO33 étaient élevés chez les enfants de 0-5 ans et de 15 à 19 ans soit 86,2 % et 88,2 % ( $p < 0,05$ ) mais ne variaient pas en fonction du sexe ( $p=0,64$ ).

La fièvre était plus fréquente chez les sujets porteurs de l'allotype K1 soit 10 % ( $p=0,03$ ) ; la splénomégalie quant à elle, a été corollée à l'allotype MAD20 soit 21,1 % ( $p=0,01$ ). L'anémie n'avait pas une relation significative avec les infections allotypiques.

Le syndrome palustre était plus fréquent chez les sujets portant l'allotype MAD20 et les associations K1-MAD20, K1-RO33, MAD20-RO33 , soit respectivement 55,3 % - 57,1 % - 45,6 % - 53,3 % ( $p=0,001$ ).

Cliniquement, il semblerait que les allotypes MAD20 étaient corollés avec les manifestations cliniques du paludisme au cours de notre étude.

La positivité de la goutte épaisse variait avec l'allotype K1 soit 61,4 % ( $p=0,013$ ), l'allotype MAD20 avec 65,8 % ( $p=0,026$ ), l'allotype RO33 avec 75,6 % ( $p=0,042$ ) et l'association K1-RO33 avec 69,6 % ( $p=0,002$ ).

Les fortes parasitémies étaient plus fréquentes chez les sujets portant l'allotype K1 ( $p=0,001$ ), l'allotype MAD20 ( $p=0,003$ ) et les associations K1-MAD20, K1-RO33 et MAD20-RO33 ( $p=0,001$ ).

Nous avons remarqué que les allotypes K1 et les allotypes MAD20 étaient associés aux fortes parasitémies.

Au total, nous avons observé au cours de notre étude :

- une relation entre la fièvre et l'allotype K1,
- une relation entre la présence d'une splénomégalie et l'allotype K1,
- une relation entre la positivité de la goutte épaisse et les allotypes K1, MAD20, RO33, l'association K1-RO33,
- une relation entre la parasitémie avec l'allotype K1, MAD20, et les associations K1-MAD20, MAD20-RO33 et K1-RO33.

# RECOMMANDATIONS

## RECOMMANDATIONS

A Missira, la prévalence du paludisme est élevée (51,5 %) et celle de l'anémie aussi (58,20 %). Les complications qui en découlent sont nombreuses. Le paludisme ainsi que les pathologies associées constituent un obstacle au développement socioéconomique.

Nous proposons ainsi au vu de nos résultats les recommandations suivantes :

**- Aux autorités nationales sanitaires :**

- D'élaborer une stratégie de lutte contre la paludisme adaptée aux situations locales,
- Permettre l'accessibilité aux antimalariques surtout dans les régions les plus éloignées,
- Renforcer les capacités nutritionnelles,
- D'appuyer les études de recherches éventuelles sur le paludisme.

**- Aux autorités sanitaires locales (Kolokani) et le CSCOM de Toumanibougou :**

- Education, prévention et sensibilisation de la population de Missira,
- Mettre à la disposition de la population d'un laboratoire d'analyse et d'une pharmacie communautaire,
- Former le personnel en mettant en place une infrastructure adaptée à leurs besoins.

- Effectuer un dépistage rapide et une prise en charge précoce de cas de paludisme simple et grave.

**- Aux équipes de recherche sur la zone :**

- Identifier et corriger les autres facteurs pouvant contribuer à l'installation et à l'aggravation de l'anémie,
- De réaliser une étude avec un échantillonnage assez élevé,
- Utiliser d'autres marqueurs en vue d'une meilleure connaissance de la diversité génomique de *P. falciparum*.

**- A la population de Missira :**

- La lutte contre les vecteurs comporte l'élimination des gîtes larvaires naturelles, artificielles et des anophèles adultes par les insecticides,
- De mettre à la disposition de la population des moustiquaires imprégnés,
- Fermer les portes et fenêtres dès le crépuscule jusqu'à l'aube, porter des vêtements longs et éviter les promenades nocturnes.

# BIBLIOGRAPHIES

## **BIBLIOGRAPHIES**

1. **BRUCE-CHWATT L.J.** Epidemiology of malaria. IN "Essential malarialogy". Second Edition : William Heinemann Medical Books, London. 1985.
2. **GENTILLINI M.** Médecine Tropicale. 4<sup>ème</sup> Edition : Flammarion, Paris ; 1986.
3. **MOLYNEUX M.E.** The clinical manifestation and diagnostic of malaria. Baillere's Clin. Inf. Dis. 1996 ; 2 : 271-292.
4. **GOLVAN Y.J.** Parasitologie médicale. 4<sup>ème</sup> édition. Flammarion, Paris. 1983.
5. **KEAN B. REILLY H.P.** Malaria the nine recent lessons from the group of civilian travelers. Am J Med. 1976 ; 61 : 159.
6. **OMS.** Grands lignes du plan d'action de l' OMS pour la lutte contre le paludisme. 1993 - 2000. Conférence ministérielle sur le paludisme. Amsterdam. 27 octobre 1992.
7. **DOUMBIA O.** Paludisme au Mali, passé, présent et avenir. These, Med, 1997 .
8. **DIAWARA S.** hémoglobinopathie C et paludisme chez les enfants dans les services de Pédiatrie du CHU de Gabriel Touré de Bamako. Thèse, Med, Bamako, 1997.
9. **H Aidara A Y.** Place du paludisme dans les syndromes fébriles. Médecine interne de l'Hôpital du point G. Thèse, Med, Bamako, 1989.
10. **KAYENTAO K.** Epidémiologie du paludisme et évaluation du traitement de l'accès palustre simple a la chloroquine dans le village de Donéguebougou. These, Med, Bamako, 1997.
11. **BERNARD J. et al.** Abrégés d'hématologie. 8eme Edition. Masson Paris. 1996.
12. **DEMBELE H.** Paludisme et grossesse, saisonnalité et relation avec petits poids de naissance à Bougoula Hammeau ( Sikasso, Mali ). Thèse, Med, Bamako, 1995.

13. **DICKO A.A.** épidémiologie du paludisme dans la région de Mopti en vue de l'élaboration d'un programme régional de lutte. Thèse, Med, Bamako, 1992 .
14. **DICKO M.** Anémie par carence en fer, en vitamine B12 et en folates : Aspects diagnostiques et thérapeutiques en médecine interne. Thèse, Med, Bamako, 1997 ..
15. **HULSEBOS CV, LEEMANS R, HALMA C, DE VRIES T W.** splenic epithelial cysts and splenomegaly : Diagnostic and management. Netherland Journal of Medecine, 1998 ; 53 : 80-84.
16. **TIMITE KONAN M, KOUAME K-J, KONAN A, AMOMLAMOF L, OULAI S, ANDOLF J, TOURE M, ASSI-ADAOU J.** Etiologies de splénomégalies de l'enfant. Abidjan (Cocody). Ann Pediatric, journal of Pediatric. 1992 ; 134 : 245-247.
17. **NIAMBELE I.** Splénomégalie chronique de l'adulte. Thèse, Med, Bamako, 1977.
18. **MAYENTAO B M.** La splénomégalie en zone rural à Sélingué. Thèse, Med, Bamako, 1980.
19. **TRAORE M A.** Analyse de la situation du paludisme au mali et les stratégies des formes graves et compliqués dans le service de Pédiatrie de l'Hôpital de Gabriel Touré. Thèse, Med, Bamako, 2001.
20. **WEATHERALL D J, ABDULLA S.** The anemia of *Plasmodium Falciparum* malaria. British medical Bulletin, 1982 ; 38, 147-158.
21. **WANG P, LEE CS, BAYOUMI R, DJIMDE A, DOUMBO O, SWEDBERG G, DAO LD, MSHINDA H, TANNER M, WATKINS WM, SIMS PF, HYDE JE.** Resistance to antifolates in Plasmodium falciparum monitored and dihydrofolate reductase alleles in a large of fields samples of diverse origins. Mol Biochem Parasitol. 1997. Nov ; 89 : 161-77.

22. **FRUH K, DOUMBO O, MULLER HM, KOITA O, McBRIDGE, CRISANTI A, TOURE Y, BUGAND H.** Human Antibody responses to the major merozoite surface antigen of Plasmodium in Strain specific and short lived. *Infect Immun.* 1991. April ; 59 :1319-24.
23. **MILLER LH, ROBERT T, SHAHABUDDIN M, Mc CUTCHAN TF.** Analysis of sequence diversity in the *P. falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem. Parasitol.* 1993 ; 59 : 1-14.
24. **KOITA O, GERONE JL, OUARTARA A, DIAKITE M, POUDIOUGOU B, DIALLO M, DOUMBO O, KROGSTAD DJ.** PCR amplification assay to study the diversity of wild-type *P. falciparum* in a cohort of 80 children. *Med Trop.* 2000, Mars ; 60 : 351-55.
25. **STUNNENBERG H, BUJARD H.** Polymorphism of the precursor for the surface antigens of *P. falciparum* merozoites. Study at the genetic level. *EMBO J.* 1985 ; 4 : 3823-3829.
26. **COECORAN LM, THOMPSON JK, WALLIKER D, KEMP DJ.** Homologous recombination within subtelomeric repeat sequences generates chromosome size polymorphisms in *P. falciparum*. *Cell.* 1988; 53 : 807-813.
27. **CERTA U, ROTAMANN D, MATILE H, REBER-LISKE R.** A naturally gene encoding the major surface antigen precursor P190 of *P. falciparum*. Lacks tripeptides repeats. *EMBO J.* 1987; 6 : 1556-1563.
28. **KOITA O.** Molecular studies on clonality, severe disease and transmission in Malaria. Tulane University, these Dissertation for a PhD. July ; 2000.
29. **ANN O'FEL.** Parasitologie Mycologie. 1<sup>er</sup> Edition. Format Utile ; Paris. 96-97 .
30. **GILLES H.M, LAWSON J.B, SBELAS M, VOLLER M.** Malaria, anaemia and pregnancy. *Ann Trop Med Parasitol* 1969 ; 63 : 245-263.

31. **CARME B.** facteurs de gravité du paludisme en Afrique sub-saharienne. Aspects épidémiologiques. Méd Afr Noire, 1995 ; 41 : 729-735.
32. **BOUVIER P, DOUMBO O, BRESLOW C F, DELLE Y, MARIS A, PICQUET M, KOURIBA B, DEMBELE H K, ROUGEMENT A.** seasonality, malaria and impact of prophylaxis in a West African Village: does high parasite density predict fever incidence. Am J Trop Med. 1997 b ; 145 : 850-857.
33. **MOUCHE J, CARNEVALE P, COOSEMANS M et coll.** Typologie du paludisme en Afrique. Cahiers de santé, 1993 ; 3 : 220-238.
34. **BRINKMAN U, BRINKMAN A.** Malaria and health in Africa: the present situation and epidemiological trends. Trop Med Parasitol. 2003,Oct ; 42 : 204-219.
35. **DOUMBO O.** Epidémiologie du paludisme au Mali, étude de la chloroquinorésistance. Essai de stratégie de contrôle basée sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associée au traitement systématique des accès fébriles. Thèse de doctorat de Sciences biologiques Montpellier 2, 1992.
36. **KOITA O.** Contribution à l'étude épidémiologique du paludisme le long trocon de la route trans-saharienne au Mali de Plasmodium Falciparum par l'utilisation de l'hydrogène tritié (3T) le verapamil . thèse, Pharm, Bamako, 1988.
37. **BOUREE P.** Paludisme et grossesse. Malaria, 1995 ; 3 : 9-12.
38. **DIALLO D, YVART J, ARCHAMBEAUD M.P, DICCOT B, KALITKA F, DIAKITE S. et al.** Incidence de la carence martiale chez la femme enceinte au Mali. Répercussion sur le nouveau-né. Med Afr Noir. 1991 ; 38 : 408-412.
39. **NIANGALY F.** Efficacité de la chloroquine et de la sulfadoxine pyriméthamine au cours de la grossesse en zone peri-urbaine de Bamako (Mali). These. Pharm . 2001.

40. **YALCOUYE D.** Anémie associée à l'infection palustre dans une population de 0 à 20 ans en zone péri-urbain et rurale au Mali. Thèse, Pharm, 2000.
41. **EKVALL H.** malaria and anemia. *Curr Opin Hematol.* 2003 Mar ; 10 : 108-114.
42. **GREENBERG A.G .** Pathophysiology of malaria. *Am J Med,* 1996 ; 101: 7-11.
43. **PONGPONRAT E, RIGANTI M, PUNPOOWONG B, AIKAWA M.** microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. *Am J Trop Med Hyg,* 1991 ; 44 : 168-175.
44. **PHILLIPS R.E, and PASVOL G.** Anemia of Plasmodium Falciparum malaria .*Baillere's clin. hematology.* 1992 ; 5 : 315-30.
45. **DANIS M, MOUCHET J.** Paludisme. Edition Ellipses/Aupelf. Paris ; 1991.
46. **WHITE NJ.** The pathophysiology of malaria. *Adv parasitol,* 1992 ; 31: 83-173.
47. **GUY C.** Physiopathologie du paludisme à Plasmodium Falciparum. *Cahier de santé,* 1991, 1 : 117-123.
48. **THOMAS P, CARNAVAL P, FELIX A, MOUCHET J, (1984).** Le paludisme, Encyclopédie médicochirurgicale, Paris, Maladies Infectieuses, 80-89 A (10) et A (30).
49. **JEFFEYS AJ.** DNA sequence variants in the G $\gamma$ -, A $\gamma$ ,  $\delta$ - and  $\beta$ -globin gene of man. *Cell.* 1979 ; 18 : 1-10.
50. **TANABE K, MACKAY M, GOMAN M, SCAIFE J.** Allelic in a surface gene of plasmodium falciparum. *J. Mol. Biol.* 1987; 195: 273-287.
51. **BLACKMANN MJ, WHITTLE H, HOLDER AA.** Processing of the *P. falciparum* major merozoite surface protein-1: identification of a 33

- kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. *Molecular and biochemical parasitology*. 1991 ; 49 : 35-44.
- 52. KAN YW, DOZY AM.** Polymorphism of AND sequence adjacent to human  $\beta$ -globin structural gene; Relationship to sickle mutation. *Proc natl ac Sci*. 1978 ; 75 : 5631-5635.
- 53. DOWMTABE D.M.** Efficacité comparée de 3 schémas chimioprophylaxie antipaludiques sur les paramètres biologiques chez les primaires et secondaires au Mali. Thèse, Pharm, Bamako, 2002.
- 54. BASCO L.K, ROGUERI C, LE BRAS J.** Molécules antipaludiques : mécanismes d'actions, mécanismes de résistances, relations structure-activité des schizontocides sanguins. Editions Masson ; Paris. 1992.
- 55. GODEAU P, HERSON S, PIETTE J C.** Le paludisme. Traité de médecine. 3ème Edition. Flammarion. Med-sciences, Paris. 1996 ; 1663-1668.
- 56. BUTCHER G A.** Antimalarial drugs and the mosquito transmission of plasmodium. *International Journal for Parasitology*, 1997 ; 27: 975-987.
- 57. BELEC L, BOUREE P, TESTA J et al.** Extension of multiple drug resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Africa case. *Biomed Pharmacoter* , 1989 ; 43 : 699-702.
- 58. WHITE N.J, KRISHNA S.** Treatment of Malaria : some considerations and limitations of current method of assessment. *Trans R Soc Med Hyg* . 1989 ; 83 : 767-777.
- 59. BISSAN Y.** Bio-écologie de *Simulium damnosum* S.L. (Diptéria – Simuliidae) en zone de savane soudano-sahélienne, région de la Boucle de Baoulé (Missira – cercle de Kolokani). Incidence sur la transmission de l'onchocercose. Thèse , 3<sup>ème</sup> cycles en Biologies Animales - Ecologie, Bamako, 1985.

60. **KOITA O, DAO S, BAGAYOKO M W, KALOGA M, KEITA M, DIALLO I O, KROSTAD D J.** Utilisation des Marqueurs Polymorphiques de MSP-1 dans la Description Epidémiologique du Paludisme en Zone de Savane du Nord du Mali, Missira, Kolokani. Am J Trop Hyg. 2001, Oct ; 55: 424-29.
61. **PAUGAM A, BOUREE P.** diagnostic biologiques du paludisme : techniques classique et nouvelles. Tech Biol, 1994 ; 117 : 62-68.
62. **CONWAY DJ, ROSARIO V, ODUOLA AMJ, SALAKO LA, GREENWOOD BM, McBRIDE JS.** *P. falciparum* intragenic recombination and non random associations between polymorphic domains of the precursor of the major merozoite surface antigens. Exp Parasitology. 1992; 73 : 468-480.
63. **AMBROISE P.T, PINEL C, PELLOUX H, PICO T.** Le diagnostiques du paludisme : actualités et perspectives. Cahiers de santé, 1992 ; 3 : 280-284.
64. **SAISSY J M.** Paludisme grave et compliqué. .: Arnette Groupe Liaisons S.A ; Paris 2001.
65. **WHO.** Severe and complicated malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1990 ; 84 : 1-65.
66. **OMS.** Principes directeurs pour le diagnostic et le traitement du paludisme en afrique. Cahiers techniques Afro. 1992 ; 22 : 18.
67. **OUATTARA A.** Diversité allotypiques et morbidité palustre à *plasmodium falciparum* a Bancoumana. These, Pharm, Bamako, 1998.
68. **COULIBALY S.M.** Relations entre l'anémie et le paludisme dans une zone d'endemie palustre (Bandiagara) .Thèse , Pharm , Bamako, 2001.
69. **BAGAYOKO MW.** Paludisme sévère en milieu hospitalier de Bamako (Centre Hospitalier Mère – Enfant : le « Luxembourg ») : Diversité et Masse allotypique de Merozoite Surface Protein-1 de *Plasmodium Falciparum*. Thèse, Pharm, Bamako, 2003.

70. **BALLO B.M. et al.**, Ministère de la santé. Enquête Démographique de santé. EDM III. ORC Macro, Calverton, Maryland, USA ; Juin 2002.
71. **ROBERT F, NTOUMI F, ANGEL G, CANDITO D, ROGIER C, FANDEUR T, SARTHOU JL, MERCEAU PUIJALON O.** Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. *Tran Roc Soc. Trop Med Hyg.* 1996 ; 90 : 709-711.

# RESUME

**Nom** : Youssouf DARAR  
**Prénom** : Houssein  
**Date de soutenance** : Juin 2004  
**Ville de soutenance** : Bamako  
**Pays d'origine** : Mali

**Titre de la thèse** : Aspects épidémiologiques et moléculaires du Paludisme à *P. falciparum* à Missira ( Cercle de Kolokani )

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

**Secteur d'intérêt** : Biologie moléculaire, parasitologie (paludisme)

## RESUME

Nous avons mené une étude du 02 au 04 octobre 2001 dans une zone d'hyper-endémie à *P. falciparum* (Missira) afin d'étudier l'épidémiologie de l'infection palustre au niveau moléculaire, identifier les différents génotypes de *P. falciparum* et de déterminer les relations entre les clones (K1, MAD20 et RO33) et les paramètres cliniques.

Notre population d'étude était constituée de 194 sujets et nous avons recensé 100 cas de paludisme.

La prévalence de l'infection palustre était de 51,5 % avec un indice plasmodique à 51 %. La fréquence de la splénomégalie était de 10,8 % et celle de l'anémie de 58,2 %. Nous avons remarqué que 6,1 % de nos patients présentaient une anémie sévère et étaient associés au paludisme. Néanmoins, 7,2 % de nos patients étaient fébriles.

L'utilisation des amorces du bloc 2 de MSP-1 nous a permis de mettre en évidence après amplification et électrophorèse sur gel d'agarose un polymorphisme de taille et un polymorphisme allélique chez les plasmodies. La souche K1 est la plus polymorphique avec 35,7 % alors que la souche RO33 est monoclonale. Mais nous notons une égalité proportionnelle entre les porteurs d'un seul allotype (36,1 %) et ceux portant plus d'un allotype (32,5 %).

Les allotypes identifiés variaient en fonction de l'âge ( $p < 0,05$ ) mais pas en fonction du sexe ( $p = 0,64$ ).

La fièvre, l'anémie, la splénomégalie, la positivité de la goutte épaisse et l'accès palustre étaient corrélés avec les allotypes ou les associations allotypiques.

A cet effet, la fièvre était plus fréquente chez les sujets porteurs de l'allotype K1 ( $p = 0,03$ ), la splénomégalie avec l'allotype MAD20 ( $p = 0,01$ ), la positivité de la goutte épaisse avec l'allotype K1 ( $p = 0,013$ ), l'allotype MAD20 ( $p = 0,026$ ), l'allotype RO33 ( $p = 0,042$ ) et l'association K1-RO33 ( $p = 0,002$ ), les fortes parasitémies avec l'allotype K1 ( $p = 0,001$ ), l'allotype MAD20 ( $p = 0,003$ ) et les associations K1-MAD20, K1-RO33 et MAD20-RO33 ( $p = 0,001$ ) et enfin l'accès palustre avec l'allotype MAD20 ( $p = 0,0001$ ) et les associations K1-MAD20, K1-RO33 et MAD20-RO33 ( $p = 0,001$ ).

L'anémie se caractérisait par un faible polymorphisme.

**Mots clés** : *Plasmodium falciparum*, diversité allotypique, paludisme en zone rurale, anémie, splénomégalie

**Name** : Youssouf DARAR  
**Surname** : Houssein  
**Defence date** : June 2003  
**Defence country** : Mali

**Title** : Molecular, clinical and epidemiology aspect of malaria to *P. falciparum* in Missira (Kolokani cercal)

**In reserve at** : Medical, Pharmacial and dentistry faculty of Mali  
**Subject interest** : Molecular biology, malaria.

### **ABSTRACT**

We studied from 02 to 04 October 2001 in the hyper endemic village of Missira the allotypic diversity of *P. falciparum* and their association with malaria.

The population was composed of 194 individuals with 100 positive thick smears. The malariae infection was 51,5 % with 51 % of plasmodic indices. We had 10,8 % of splenomegaly and the anaemia frequency was 58,2 % with 6,1 % severe anaemia who associated with malaria.

The polymorphic bloc 2 region of MSP-1 was amplified using allotypes specific primers for K1, MAD20 and RO33 parasites followed by agarose gel electrophoresis to estimate the size of amplified fragments and the frequency of polyclonal infection.

K1 parasites were the most polymorphic with 35,7 % when the RO33 were less polymorphic. We had the equality between the individuals who got one allotype (36,1 %) and who had more than one (35,2 %).

There was an association between allotype and age ( $p < 0,95$ ) but not with sex.

The fever, anaemia, splenomegaly, positive thick smear and malaria were correlated with allotypes and the combination allotype of allotype.

In fact, fever was associated white the allotype K1 ( $p = 0,03$ ) and the positive thick smear, the splenomegaly with allotype MAD20 ( $p = 0,01$ ), the positive thick smear with allotype K1 ( $p = 0,013$ ), allotype RO33 ( $p = 0,042$ ) et combination K1-RO33 ( $p = 0,002$ ), high parasitemia with allotype K1 ( $p = 0,001$ ), allotype MAD20 ( $p = 0,003$ ) and combination K1-MAD20, K1-RO33 et MAD20-RO33 ( $p = 0,001$ ).

The malariae cases was associated with allotype ( $p = 0,0001$ ) and combination allotypes K1-MAD20, K1-RO33 et MAD20-RO33 ( $p = 0,001$ ).

The anaemia was found out associated with less polymorphic parasites.

**Key word** : *P. falciparum*, allotypic diversity, malariae in area rural, anaemia, splenomegaly

# ANNEXES

## QUESTIONNAIRE

Date :

Numéro d'identification :

### Données sociodémographiques :

Nom :

Prénom :

Age :                      Sexe :                      :

Profession :

Nom et prénom du père :

Nom et prénom de la mère :

### Examen Généraux :

Température :

Tension artérielle :

Poids :

### Symptômes cliniques :

Asthénie- Anorexie :

Céphalées :

Douleurs abdominales :

Douleurs thoraciques :

Fièvre :

Hématurie :

Nausées - Vomissements :

Pâleurs conjonctivales :

Prurit :

Autres :

### Examen physique :

Rate :

### Bilan biologique :

Parasitémie :

Hémoglobine :

Glycémie :

### Hypothèse diagnostique :

### Traitement :

**SERMMENT  
D'HIPPOCRATE**

SERMENT D'HIPPOCRATE

\* \* \* \* \*

En présence des Maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'être Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraire.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui se passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas les considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses !

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé des mes confrères si j'y manque !

**JE LE JURE !**