

**MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS**

**REPUBLIQUE DU MALI**

**SECONDAIRE, SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Un Peuple – Un But – Une Foi**



\*\*\*\*\*



**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO – STOMATOLOGIE**

**ANNEE UNIVERSITAIRE : 2008-2009**

**N°...../**

**TITRE :**

## **Epidémiologie du paludisme dans un village de la plaine du pays dogon du Mali : Pongonon**



**Présentée et soutenue publiquement le**

**24 /01/2009**

**Devant le jury de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie**

**Par Mr. NIANGALY Hamidou**

**Pour obtenir le Grade de Docteur en Médecine**

**(DIPLOME D'ETAT)**



**PRESIDENT : Pr. Sidi Yaya SIMAGA**

**MEMBRE : Dr. Kassoum KAYENTAO**

**CO-DIRECTEUR DE THESE : Dr. Abdoulaye DJIMDE**

**DIRECTEUR DE THESE : Pr. Ogobara K. DOUMBO**

## **Dédicaces et remerciements**

### **A mon père Assivé Niangaly,**

Ton amour pour le travail bien fait, l'union, ton dégoût de la paresse et l'injustice ont fait de nous ce que nous sommes. Nous prions Dieu, le tout puissant qu'il te garde le plus longtemps possible au près de nous.

**A ma mère, Wélore Damé *In Memorium*** en souvenir de votre amour, tu as été une maman exemplaire, soucieuse de l'avenir de ses progénitures, hélas tu nous as quitté si tôt sans que nous puissions te rendre service tant mérité. Dort en paix.

### **A ma marâtre Yimborko Djimdé,**

Ton affection maternelle, ton souci constant de notre bonne éducation font de toi une mère irréprochable. Qu'Allah le tout puissant te garde longtemps au près de nous.

### **A la mémoire ma sœur Kadidia Niangaly,**

Tu nous as quitté si tôt pendant que tu avais toute la vie devant toi. C'est la volonté divine, nous t'oublierons jamais, dort en paix.

### **A mes frères et sœurs,**

Je ne saurais comment exprimer l'amour et le respect qui prévalent entre nous.

Restons unis, car les 'charbons brûlent unis'. Ce travail est le vôtre.

### **A mon grand frère Akouso Niangaly et épouse Aye Ongoïba,**

Vous avez été d'un apport immense pour la réussite de ce travail. Permettez moi de vous dire combien je suis comblé de réitérer l'accueil, l'hospitalité, l'amour que vous m'avez offert. Que Dieu vous rende vos bienfaits et vous garde longtemps en vie.

### **A tous mes oncles et à toutes mes tantes,**

Je suis très reconnaissant pour tout ce que vous avez fait pour moi. Il me manque de mot pour vous exprimer mon attachement pour vous.

### **A ma belle famille**

Sachez que je suis de cœur avec vous. Je reconnaîtrai toute ma vie tout ce que vous avez enduré pour moi.

Je sais que je pourrai toujours compter sur vous.

Qu'ALLAH exhausse vos vœux !

### **Au Dr DIALLO Abdoulbaki et famille**

Je garderai un souvenir merveilleux de vous. Merci pour votre l'hospitalité et vos conseils qui ont contribué considérablement à la réalisation de cet travail.

### **A tous mes cousins et à toutes mes cousines,**

Je vous considère plutôt comme des frères et sœurs. Sachez que je suis de cœur avec vous.

### **A tous mes neveux et à toutes mes nièces,**

Soyez unis.

Je vous souhaite longue vie et beaucoup de chance.

### **A Adama Ongoïba et Dr Agoumour Almouhloul,**

Vous aviez été comme des frères pour moi. Nous avons été ensemble tant bien que mal. Ce travail est le vôtre.

**A mes amis Dr Eloi dit Apérou Dara et Dr Aly Bamadio,**

C'est avec vous que j'ai connu la vraie amitié, car vous avez été toujours là pendant les moments difficiles, Je prie le bon Dieu de nous garder ensemble aussi longtemps que possible. Ce travail est le fruit de notre amitié.

**Au Dr Moussa DJIMDE**

Je ne te remercierai jamais assez pour ton immense apport pour la réalisation de ce travail.

**A Dr Dao Adama,**

Vous nous faites honneur d'un apport immense dans ce travail. La spontanéité avec laquelle vous avez accepté d'éclairer cette thèse, prouve votre souci pour la formation des étudiants. Retrouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

**A tous mes maîtres,**

Merci à vous tous qui m'avez enseigné depuis l'école fondamentale jusqu'à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS). Je n'oublierai guère ceux qui m'ont donné les premiers pas dans les classes primaires.

Je vous dois tout pour la qualité de l'enseignement que j'ai reçu de vous tous. Pendant l'enfance nous avons confondu la rigueur à la méchanceté. C'est grâce à cette rigueur que nous sommes là où nous sommes aujourd'hui. Ce travail est aussi le vôtre.

**Au Dr Abdoulaye Djimdé,**

Nous sommes honorés d'être parmi vos élèves. Vous nous avez appris, l'autonomie et la rigueur dans le travail ainsi que l'esprit d'équipe. Votre persévérance votre disponibilité, votre souci constant de la formation des jeunes et vos qualités humaines font de vous un maître exemplaire.

Recevez ici cher Maître notre profonde gratitude et notre attachement.

**Au Dr Kassoum Kayentao,**

Vous nous avez fait intégrer au sein du DEAP/MERTC. Nous avons beaucoup apprécié vos conseils, votre disponibilité, et vos qualités humaines.

Recevez ici mes sincères remerciements.

**Au Dr Ahmed Ouattara et à M. Mamadou Bah,**

Votre amour pour le travail bien fait a fait de vous des formateurs irréprochables. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

**A toute l'équipe du MEDRU,**

Dr Djimdé Abdoulaye, Dr Beavogui Abdoul Habib, Dr Wélé Mamadou, Dr Tékéké Mamadou, Dr Fofana Bakary, Dr Hamma Maïga, Dr Sidibé Bakary, Dr Cheick Papa Oumar Sangaré, Dr Touré Dinkorma Ouologuem, Dr Souleymane Dama, Dr Oumar Bila Traoré, Dr Oumar Yattara, Dr Koumaré Sekou, Mr Touré Sekou, Mlle Koné Aminatou, Mr Dembélé Demba, Mr Sanago Kassoum, Mr Traoré Zoumana Isaac, Mr Dara Antoine, Mr Togo Amadou, Mr Kodio Aly et Diallo Nouhoum.

J'ai intégré facilement l'équipe, cela grâce à votre sympathie et votre sincère collaboration. Merci pour vos enseignements.

**A tous les chercheurs du DEAP/MRTC,**

Nous garderons à l'esprit les enseignements, les conseils et les encouragements que nous avons reçus de vous. Retrouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

**A tous les collègues thésards du DEAP/MRTC,**

Entre nous se sont créées une amitié et une véritable complicité dans le cadre du travail. Que DIEU vous donne courage et succès.

**A l'équipe de Pongonon**

- **Au Dr Cheick Papa Oumar Sangaré :** Tu as été un grand frère pour moi plutôt qu'un chef d'équipe. Ta ponctualité, ta rigueur et tes conseils ont valu la réussite de ce travail. Grâce à toi l'équipe a été unie pendant toute la durée de l'étude.
  
- **A Mr Nouhoum DIALLO :** Tu as été pour moi un ami plutôt qu'un coéquipier. Ta rigueur dans le travail et ta persévérance font de toi un avenir meilleur dans la recherche. Je te souhaite courage et bonne chance.
  
- **A Mr Abraham Poudiogo et Mr Assiguè Poudiogo :** vous as été des bons facilitateurs. Votre dévouement pour le travail nous a permis de réussir ce travail. Ce travail est le fruit d'efforts et de sacrifices consentis ensemble. Rassurez-vous de ma sincère reconnaissance et de mon attachement. Bonheur et prospérité familiale à vous tous.

**A la population de Pongonon**

Merci pour votre collaboration et votre confiance.

A tous ceux qui ont participé à cette étude,

Nous vous souhaitons longue vie et bonne chance.

**A ma fiancée, Mlle Dama Abibatou,**

Les mots me manquent pour exprimer l'effort que tu as consenti pour me soutenir pendant tous ces moments de labeur. Ton amour, tes conseils, ton courage ont permis de réaliser ce travail.

Rassure-toi, mon bien aimé de ma fidèle reconnaissance et de mon amour pour toi. Qu'Allah nous prête longue vie et bonheur pour qu'on puisse réaliser nos vœux.

## Tableaux

TABLE I: CALENDRIER DE SUIVI DES PARTICIPANTS MALADES .....	47
TABLEAU II: MELANGE REACTIONNEL POUR UN VOLUME FINAL DE 25 µL (MSP1) .....	52
TABLEAU III: MELANGE REACTIONNEL POUR UN VOLUME FINAL DE 25 µL (MSP2).....	52
TABLEAU IV : MELANGE REACTIONNEL POUR UN VOLUME FINAL DE 25 µL (MSP1).....	53
TABLEAU V : MELANGE REACTIONNEL POUR UN VOLUME FINAL DE 25 µL (MSP2).....	55
TABLEAU VI : MSP1- PCR1 ET PCR2 .....	56
TABLEAU VII : MSP2-PCR1 .....	57
TABLEAU VIII : MSP2- PCR2 .....	58
TABLEAU IX : MELANGE REACTIONNEL POUR UN VOLUME FINAL DE 25 µL .....	59
TABLEAU X : PROGRAMME MICROSATELLITE PCR1 .....	60
TABLEAU XI : MELANGE REACTIONNEL POUR UN VOLUME FINAL DE 25 µL .....	60
TABLEAU XII : PROGRAMME MICROSATELLITE PCR1 .....	62
TABLEAU XIII : MELANGE REACTIONNEL POUR LA PREMIERE AMPLIFICATION POUR UN VOLUME FINAL DE 25ML PAR TUBE.....	63
TABLEAU XIV : MELANGE REACTIONNEL POUR LA DEUXIEME AMPLIFICATION POUR UN VOLUME FINAL DE 25ML PAR TUBE.....	64
TABLEAU XV : MELANGE REACTIONNEL POUR LA DIGESTION POUR UN VOLUME DE 15ML .....	65
TABLEAU XVI : PROGRAMME DE LA PREMIERE AMPLIFICATION.....	66
TABLEAU XVII : PROGRAMME DE LA DEUXIEME AMPLIFICATION .....	67
TABLEAU XVIII : PROGRAMME DE LA DIGESTION .....	67
TABLEAU XIX : INDICE PLASMODIQUE, INDICE GAMETOCYTIQUE ET INDICE SPLENIQUE .....	73
TABLEAU XX : INDICES PLASMODIQUE, GAMETOCYTIQUE ET SPLENIQUE PAR MOIS.....	74
TABLEAU XXI : INDICES PLASMODIQUES GAMETOCYTIQUES ET SPLENIQUES PAR GROUPE D'AGE	75
TABLEAU XXII : PREVALENCE DES ESPECES PLASMODIALES PAR PERIODE DE PASSAGE .....	76
TABLEAU XXIII : FREQUENCE DES VECTEURS DU PALUDISME A PONGONON .....	77
TABLEAU XXIV : DENSITE MOYENNE MENSUELLE PAR CASE D'AN. <i>GAMBIAE S.L.</i> ET D'AN. <i>FUNESTUS</i> A PONGONON APRES SPRAY CATCH PENDANT LES MOIS D'OCTOBRE 2005 ET JUIN 2006.....	78
TABLEAU XXV : AGRESSIVITE MOYENNE MENSUELLE D'AN. <i>GAMBIAE S.L.</i> ET D'AN. <i>FUNESTUS</i> A PONGONON APRES SPRAY CATCH PENDANT LES MOIS D'OCTOBRE 2005 ET JUIN 2006 .....	79
TABLEAU XXVI : TAUX D'ANTHROPOPHILIE POUR AN. <i>GAMBIAE S.L.</i> ET AN. <i>FUNESTUS</i> A PONGONON PENDANT LES MOIS D'OCTOBRE 2005 ET JUIN 2006.....	80
TABLEAU XXVII : TAUX D'INFECTION (IAS) A <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> POUR AN. <i>GAMBIAE S.L.</i> ET AN. <i>FUNESTUS</i> A PONGONON EN OCTOBRE 2005 ET JUIN 2006.....	81
TABLEAU XXVIII : TAUX D'INOCULATION ENTOMOLOGIQUE MENSUEL (TIE) A <i>PLASMODIUM</i> <i>FALCIPARUM</i> D'AN. <i>GAMBIAE S.L.</i> A PONGONON EN OCTOBRE 2005 ET JUIN 2006 .....	82
TABLEAU XXIX : REPNSES THERAPEUTIQUES IN VIVO SUR 14 JOURS DE SUIVI .....	85
TABLEAU XXX : REPNSES THERAPEUTIQUES IN VIVO A J28 PAR ANNEE .....	86
TABLEAU XXXI : REPARTITION DES REPNSES THERAPEUTIQUES PAR CLASSE D'AGE SUR 14 JOURS DE SUIVI : .....	87
TABLEAU XXXII : REPNSES THERAPEUTIQUES PAR CLASSE D'AGE SUR 28 JOURS DE SUIVI .....	88
TABLEAU XXXIII : REPNSES THERAPEUTIQUES APRES CORRECTION MOLECULAIRE PAR ANNEE A 28 JOURS DE SUIVI.....	89

TABLEAU XXXIV : REPONSES CLINIQUES ET PARASITOLOGIQUES ADEQUATES APRES CORRECTION MOLECULAIRE PAR GROUPE D'AGE A 28 JOURS DE SUIVI.....	90
TABLEAU XXXV FREQUENCE DU GENE <i>PFCRT</i> K76T PAR AN .....	91
TABLEAU XXXVI : TAUX D'ANEMIE PAR ANNEE .....	93
TABLEAU XXXVII : ANEMIES PAR JOURS DE SUIVI ET PAR CATEGORIE D'AGE.....	94

## FIGURES

FIGURE 1 : PROPAGATION DE LA CHLOROQUINO-RESISTANCE (TOM E. WELLWMS, NIH).....	3
FIGURE 2 : CARTE DE REPARTITION DU PALUDISME (SOURCE OMS 2002).....	9
FIGURE 3 : GAUCHE, <i>AN. GAMBIAE</i> ; DROIT, <i>AN. FUNESTUS</i> PHOTOS COURTESY OF J. GATHANY, CDC (SOURCE : BIOLOGY.BIOSADM.1@ND.EDU).....	12
FIGURE 4 : MORPHOLOGIE SCHEMATIQUE DE LA NYMPHE .....	13
FIGURE 5 : SCHEMA MONTRANT LES DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT D'UN MOUSTIQUE. SOURCE : J. BRUNHES ET COLL., LES ANOPHELES DE LA REGION AFRO-TROPICALE, LOGICIEL ORSTOM Ed., 1998).....	17
FIGURE 6 : CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE <i>P. FALCIPARUM</i> (SOURCE : <a href="http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/04vol130/30s1/page9_f.html">HTTP://WWW.PHAC-ASPC.GC.CA/PUBLICAT/CCDR-RMTC/04VOL130/30S1/PAGE9_F.HTML</a> ) .....	25
FIGURE 7 : SITE D'ETUDE (SOURCE : GIS/GPS MRTC)FIGURE 8 : SITE D'ETUDE (SOURCE: GIS/GPS MRTC) .....	39
FIGURE 8 : PLUVIOMETRIE DE 2005 A 2007 A PONGONON .....	40
FIGURE 9: PHOTO GEL MSP2 .....	69
FIGURE 10 : PHOTO D'UN GEL <i>PFCRT</i> .....	70
FIGURE 11 : HISTOGRAMME MONTRANT LA REPARTITION DE LA POPULATION PAR GROUPE D'AGE.....	72
FIGURE 12 : REPARTITION DE LA POPULATION SELON LE GROUPE D'AGE.....	83
FIGURE 13 : PROFILE DE L'ETUDE.....	84
FIGURE 14 : EVOLUTION DE LA GAMTETOCYTEMIE AU COURS DES DIFFERENTS JOURS DE SUIVI.....	92
FIGURE 15 : EVOLUTION DE LA FIEVRE AU COURS DES SUIVIS.....	95

<i>I. Introduction</i> .....	1
<i>II. Justification de l'étude</i> .....	4
<i>III. Objectifs</i> .....	6
<i>III.1.Objectif général</i> .....	6
<i>III.2.Objectifs spécifiques</i> .....	6
<i>IV. Généralités</i> .....	7
<i>IV.1.Historique</i> .....	7
<i>IV.2.Profil épidémiologique du paludisme</i> .....	7
<i>IV.2.1. Indices épidémiologiques du paludisme :</i> .....	9
<i>IV.2.1.1. Indices chez l'homme :</i> .....	10
<i>IV.2.1.1.1. Indice plasmodique (IP) :</i> .....	10
<i>IV.2.1.1.2. Indice splénique :</i> .....	10
<i>IV.2.1.1.3. Indice gamétocytaire :</i> .....	10
<i>IV.2.1.2. Indice chez l'anophèle :</i> .....	10
<i>IV.2.1.2.1. Indice sporozoïtique (IS) ou indice de l'antigène sporozoïtique (IAS)....</i>	10
<i>IV.2.1.2.2. Indice oocystique (IO).....</i>	10
<i>IV.2.1.2.3. Taux d'inoculation entomologique.....</i>	11
<i>IV.3.LE VECTEUR :</i> .....	11
<i>IV.3.1. Généralités sur les anophèles :</i> .....	11
<i>IV.3.2. Bio-écologie.....</i>	12
<i>a. Stades préimaginaux ou aquatiques.....</i>	12
<i>b. Imagos.....</i>	13
<i>IV.3.3. Gîtes larvaires.....</i>	14
<i>IV.3.4. Cycle biologique.....</i>	15

<i>IV.4. Le parasite</i> .....	18
<i>IV.4.1. Plasmodium falciparum:</i> .....	18
<i>IV.4.2. Plasmodium malariae :</i> .....	18
<i>IV.4.3. Plasmodium ovale :</i> .....	18
<i>IV.4.4. Plasmodium vivax :</i> .....	18
<i>IV.4.5. Cycle biologique de Plasmodium</i> .....	18
<i>IV.4.5.1. Cycle chez l'homme :</i> .....	19
<i>IV.4.5.2. Cycle chez le moustique :</i> .....	22
<i>IV.5. Rôle de l'immunité :</i> .....	26
<i>IV.6. Physiopathologie du paludisme :</i> .....	26
<i>IV.6.1. Physiopathologie du paludisme simple ou non compliqué :</i> .....	26
<i>IV.6.1.1. La fièvre :</i> .....	26
<i>IV.6.1.2. L'anémie :</i> .....	27
<i>IV.6.1.3. La splénomégalie :</i> .....	27
<i>IV.6.1.4. L'hépatomégalie :</i> .....	27
<i>IV.6.2. Physiopathologie du paludisme sévère :</i> .....	27
<i>IV.7. Manifestations cliniques des accès palustres à P. falciparum :</i> .....	27
<i>IV.7.1. Paludisme non compliqué ;</i> .....	27
<i>IV.7.2. Paludisme grave :</i> .....	28
<i>IV.8. Diagnostic :</i> .....	29
<i>IV.9. Lutte contre le paludisme :</i> .....	30
<i>IV.9.1. Lutte antivectorielle :</i> .....	30
<i>IV.9.2. Lutte antiparasitaire :</i> .....	30
<i>IV.10. Résistance à la chloroquine</i> .....	31
<i>IV.12. Diversité génétique de P. falciparum :</i> .....	37



<i>V. Méthodologies :</i> .....	38
<i>V.1. Lieu l'étude :</i> .....	38
<i>V.2. Etudes transversales</i> .....	40
<i>V.2.1. Passages parasito-cliniques</i> .....	40
<i>V.2.1.1. Echantillonnage</i> .....	40
<i>V.2.1.2. Type et période d'étude</i> .....	41
<i>V.2.1.3. Technique d'étude</i> .....	41
<i>V.2.2. Passages entomologiques</i> .....	41
<i>V.2.2.1. Echantillonnage</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<i>V.2.2.2. Capture sur appât humain :</i> .....	42
<i>V.2.2.3. Spray-catch (capture par pyrethine)</i> .....	42
<i>V.3. Etude longitudinale</i> .....	44
<i>V.3.1. Type d'étude :</i> .....	44
<i>V.3.2. Population d'étude :</i> .....	44
<i>V.3.3. Considérations éthiques et déontologiques :</i> .....	44
<i>V.3.4. Echantillonnage et taille de l'échantillon</i> .....	45
<i>V.3.5. Critères d'inclusions</i> .....	45
<i>V.3.6. Critères de non-inclusion</i> .....	45
<i>V.3.7. Méthodes de collecte des données</i> .....	45
<i>V.3.8. Données cliniques et traitements</i> .....	45
<i>V.3.9. Données biologiques</i> .....	46
<i>V.3.10. Déroulement de l'enquête</i> .....	46
<i>V.3.10.1. Suivi des participants :</i> .....	46
<i>V.3.10.2. Critères de jugement de l'efficacité du traitement :</i> .....	47
<i>V.3.11. Technique de laboratoire</i> .....	48

<i>V.3.11.1. Examens parasitologiques</i> .....	48
<i>V.3.11.2. Examen hématologique</i> .....	49
<i>V.3.11.3. Etude de biologie moléculaire :</i> .....	49
Première amplification :.....	51
<i>MSP1 :</i> .....	51
Etapes.....	56
Etapes.....	57
Etapes.....	58
<i>VII. Résultats :</i> .....	72
<i>VII.1. Résultats des passages transversaux :</i> .....	72
<i>VII.1.1. Passages parasito-cliniques</i> .....	72
<i>VII.1.1.1. Caractéristiques socio-démographiques</i> .....	72
<i>VII.1.1.2. Indicateurs paludométriques :</i> .....	73
<i>VII.1.2. Passages entomologiques</i> .....	77
<i>VII.2. Etude de sensibilité à la chloroquine :</i> .....	83
<i>VII.2.1. Résultat démographique :</i> .....	83
<i>VII.2.2. Caractéristiques parasito-cliniques par année :</i> .....	85
<i>VII.2.4. Etude moléculaire :</i> .....	89
<i>VII.2.5. Evolution de du taux de gamétocytes :</i> .....	92
<i>VII.2.6. Evolution du taux d'anémie :</i> .....	93
<i>VII.2.7. Clairance de la fièvre</i> .....	95
<i>VIII. Discussion</i> .....	96
<i>VIII.1. Méthodologie :</i> .....	96
<i>VIII.2. Résultats</i> .....	97
<i>VIII.2.1. Etudes transversales</i> .....	97

VIII.2.1.1.	<i>Etude parasito-clinique</i> .....	97
VIII.2.1.1.1.	<i>Indices paludométriques</i> .....	97
VIII.2.1.2.	<i>Etude entomologique</i> .....	98
VIII.2.1.2.1.	<i>Paramètres entomologiques</i> .....	98
VIII.2.2.	<i>Etude longitudinale :</i> .....	99
VIII.2.2.1.	<i>Caractéristiques socio-démographiques</i> .....	99
VIII.2.2.2.	<i>Caractéristiques cliniques :</i> .....	99
VIII.2.2.3.	<i>Caractéristiques parasito-cliniques :</i> .....	99
VIII.2.2.3.2.	<i>Analyses des données sur 28 jours de suivi.</i> .....	101
VIII.2.2.3.4.	<i>Prévalence de la mutation pfprt K76T</i> .....	101
VIII.2.2.4.	<i>Caractéristiques hématologiques</i> .....	102
VIII.2.2.4.1.	<i>Evolution de l'anémie au cours du suivi</i> .....	102
VIII.2.2.5.	<i>Evolution de la gamétocytémie au cours des suivis</i> .....	102
IX.	<i>Conclusion</i> .....	104
X.	<i>Recommandations</i> .....	105
XI.	<i>Références bibliographiques</i> .....	108

---

**%**

%  
Pourcentage · 7, 8, 9, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 101

---

•

°C

Dégré Celsius · 46, 57, 58, 59

---

**μ**

μ  
Micron · 23  
μl  
Microlitre · 52, 54, 56, 68  
μm  
Micromètre · 23

---

**A**

ADN  
Acide Désoxyribonucléique · 31, 51, 52, 53, 54, 60, 62, 64, 68, 69  
*An.*  
Anopheles · 1, 2, 11, 12, 14, 15, 43, 44, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 99  
ARN  
Acide Ribonucléique · 30  
**ATCD**  
Antécédant · 48

---

**C**

cm  
centimètre · 16  
CTA  
Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine · 48

---

**D**

DDT  
dichlorodiphényltrichloroéthane · 7  
dl  
décilitre · 29, 46

---

**E**

ECT  
Echec Clinique Thérapeutique · 46, 49, 101  
EDTA  
l'acide éthylène-diamine-tétraacétique · 47, 52, 68, 69  
EPT  
Echec Parasitologique Tardif · 46, 49, 101  
ETP  
Echec Thérapeutique Précoce · 46, 49, 101

---

**F**

FMPOS  
Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Ondonto-Stomatologie · 41, 105

---

**G**

g  
Gramme · 51, 69  
**GE**  
Goutte Epaisse · 48  
**GRI**  
Genotype-Resistance Index · 92

---

**H**

H  
Heure · 1, 47, 68, 102, 108  
Hb  
Hémoglobine · 29  
HCH,

HEXACHLOROCYCLOHEXANE · 30

Ht

Hématocrite · 29

---

## **I**

IAS

Indice d'Antigène Sporozoïque · 10, 82, 83

IO

Indice Oocystique · 11

IP

Indice Plasmodique · 10, 98, 99

IS

Indice Sporozoïque · 10, 98

---

## **J**

J1

Premier Jour · 28, 47, 48, 96, 100

J3

Troisième jour · 28, 47, 48

J4

Quatrième Jour · 28

J7

Septième Jour · 28, 47, 48, 96

---

## **K**

kg

Kilogramme · 29, 31

Km

Kilomètre · 39, 97

---

## **M**

mg

milligramme · 31

ml

millilitre · 29

mm

millimètre · 8, 12, 15, 16, 98

Millimètre · 16

mmHg

Millimètre de mercure · 29

mmol/L

millimole par litre · 29

MSP1

Merozoite surface Proteine 1 · 37, 38, 51, 53, 54, 69, 100

MSP2

Merozoite Surface Protein 2 · 38, 51, 53, 55, 69, 100

---

## **N**

nm

Nanomètre · 51

---

## **O**

OMS

Organisation Mondiale de la Santé · 2, 8, 22, 27, 29, 31, 32, 46, 49, 50, 97, 100, 101, 108

---

## **P**

*P. falciparum*

Plasmodium falciparum · 1

*P. malariae*

Plasmodium malariae · 1, 19, 21, 22, 28, 77, 99

*P. ovale*

Plasmodium ovale · 1, 18, 20, 21, 22, 28, 77, 99

*P. vivax*

Plasmodium vivax · 1

PCR

Polymérase Chain Reaction · 30, 37, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 60, 62, 100

**Pds**

Poids · 48

pfert

Plasmodium falciparum chloroquine  
résistance transporter · 6, 31, 32, 51, 102

PH

Potentiel d'Hydrogène · 13, 23

PNC

Paluisme Non Complicqué · 28

PNLP

Programme National de Lutte contre le  
Paludisme · 1, 31

**PVE**

Paludisme Viscérale vultive · 28

---

**R**

RCPA

Réponse Clinique et Parasitologique  
Adéquate · 46, 87

---

**T**

TAS

Tension Artérielle Systolique · 29

TIE

Taux d'Inoculation Entomologique · 11, 83,  
99

TNF

Tumor necrosis factor · 27

---

**W**

WHO

World Health Organisation · 1

## I. Introduction

Endémie majeure, le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante dû à la présence dans l'organisme humain d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis par la piqûre infestante d'un moustique hématophage : l'anophèle femelle. Cependant il existe d'autres voies de contamination telles que la voie sanguine (Transfusion sanguine) et fœto-maternelle<sup>1 2</sup>.

Le paludisme est la maladie qui touche plus de personnes dans les pays en développement. De nos jours, sur l'ensemble des cas de décès dûs au paludisme dans le monde, environ 90% se produisent en Afrique au Sud du Sahara. Dans ce continent, on estime qu'un million d'individus meurent de paludisme chaque année, avec la plus grande proportion chez les enfants de moins de cinq ans (WHO, 2003).

Au Mali, selon des études faites dans les hôpitaux par le ministère de la santé, 35% des décès sont dûs au paludisme et il est la première cause (40%) des admissions (WHO, 2003). C'est la première cause de morbidité et de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans avec un taux de létalité hospitalière de 16 à 25%. Chez les femmes enceintes, le paludisme est à l'origine de la moitié des anémies (PNLP, 2003).

Quatre espèces sont inféodées à l'homme : *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*. Chez l'homme *P. falciparum* est le plus redoutable et le plus intensément implanté en Afrique<sup>3</sup>. Au Mali, (PNL, 2003) *P. falciparum* représente 90%, suivi de *P. malariae* (environ 10%), *P. ovale* (environ 1%) et de *P. vivax* décrit au Nord du Mali.

Dans le monde, la transmission du paludisme est assurée par plusieurs espèces d'anophèles. Au Mali, les principaux vecteurs sont *Anopheles gambiae s.l* (Giles, 1902) et *Anopheles funestus* (Giles, 1900) ;(Touré, 1979). Les études effectuées par Touré et al., en 1983 ont montré que le complexe *Anopheles gambiae.s.l* vecteur majeur du paludisme est composé d'*Anopheles arabiensis* et de trois formes chromosomiques d'*Anopheles gambiae s.s* dénommées : Bamako, savane, Mopti. Ces formes chromosomiques contribuent toutes à la transmission du paludisme.

Les cinq entités vectrices montrent des différences significatives de distributions géographiques et saisonnières de leurs fréquences relatives (Maiga H.M., 1985 ; Coulibaly A, 1985 ; Traoré S.F, 1989 ; Touré et al, 1994 et 1985). Ainsi *An. gambiae s.s* s'observe, dans les zones humides du Sud et au Nord, dans les zones

d'inondation du fleuve Niger ; alors qu'*An. Arabiensis* se rencontre dans les zones plus sèches et éloignées des terres inondées. Au sein d'*An. gambiae s.s.*, la forme Bamako se rencontre essentiellement dans les zones humides du Sud. La forme Mopti se rencontre plus fréquemment dans les zones inondées du centre et du Nord, mais coexiste également dans le Sud avec la forme Bamako. La forme Savane s'observe surtout dans les zones du Sud et du centre en dehors des terres inondées. Les formes Bamako et Savane s'observent plus en saison de pluies qu'en saison sèche. *An. funestus* est responsable de la transmission pendant la saison sèche froide entretenant ainsi un système de transmission par relais (Traoré S.F., 1989 ; Sangaré D., 1996 et 2000).

Tous les efforts de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour contrôler ce fléau étaient dirigés vers l'éradication du paludisme. L'efficacité et la bonne tolérance de la chloroquine permettaient de prévenir facilement la maladie ; complétées par la lutte antivectorielle en zone d'endémie, elles laissaient entrevoir la possible éradication du paludisme<sup>4</sup>.

Cependant à partir des années 60, l'avenir s'assombrit par la découverte des vecteurs résistants aux insecticides et des souches de *P.falciparum* aux amino-4-quinoléines (chloroquine)<sup>5</sup>.

La chimiorésistance des souches de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine est un problème ancien qui a évolué dans le temps et dans l'espace (**Figure 1**).

Les premiers cas de résistance à la chloroquine ont été notés en Colombie, par Young et Moore. En Afrique elle a été signalée pour la première fois en 1978<sup>6 7</sup>.

Au Mali, les premiers cas furent signalés chez des expatriés français y ayant séjournés en 1987. Plus tard, les premiers cas chez les autochtones ont été décrits en 1989<sup>8</sup>.

Cette chloroquino-résistance est variable selon les localités<sup>9</sup>. En effet, Coulibaly trouvait à Sotuba un taux de résistance de 9,7% en 1992 et 19,8% en 1994 lors d'une étude de suivi avec traitement systématique des cas fébriles<sup>10</sup>. A Kollé, (en zone soudano-sahélienne) Traoré observait en 1998 25,8% de résistance et 11,6% d'échec thérapeutique<sup>11</sup>.



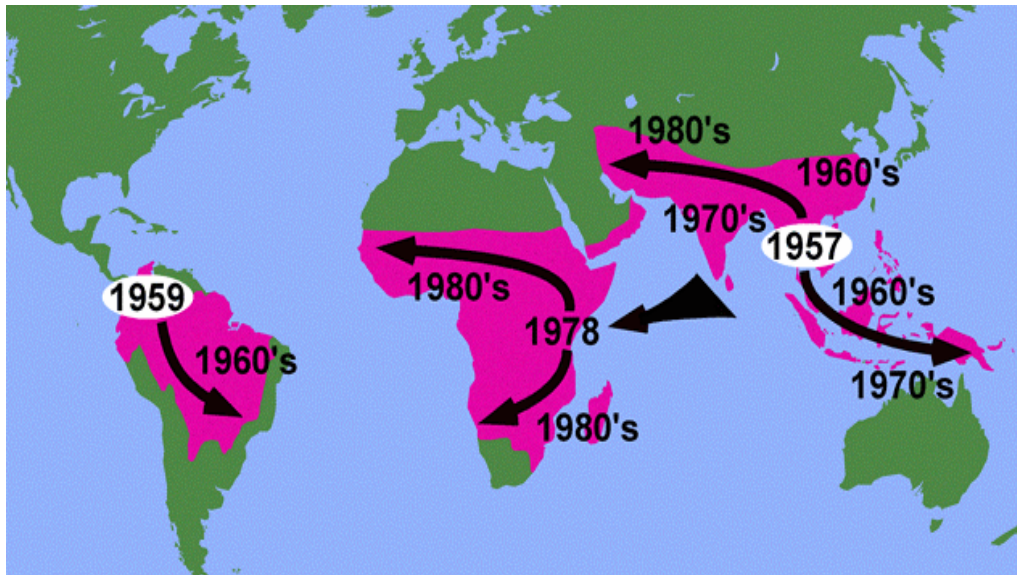


Figure 1 : Propagation de la chloroquino-résistance (Tom E. Wellems, NIH)

## **II. Justification de l'étude**

L'endémie palustre et l'efficacité des antipaludiques varient d'une zone à une autre dans un même pays. L'OMS recommande de mettre en place un système de surveillance d'efficacité des antipaludiques par des sites sentinelles.

Un système de sites sentinelles de surveillance d'efficacité des antipaludiques est un ensemble de régions géographiques d'un pays, habituellement au nombre de quatre à huit permettant de fournir des données factuelles afin d'éclairer l'élaboration des politiques de traitement du paludisme non compliqué. Ce système va permettre de collecter des données pertinentes de façon continue, et en temps voulu.

Le choix de ces régions doit tenir compte des différents faciès de la transmission du paludisme du pays.

Dans la pratique la plus part des pays ont élaboré et mis en œuvre une seule politique uniformément appliquée à l'ensemble du pays. Dans quelques-uns les directives de traitement sont étroitement adaptées à la situation locale. C'est ainsi qu'il peut y avoir deux ou plusieurs politiques différentes, applicables dans les différentes régions géographiques du pays.

Le Mali est composé de cinq faciès de transmission du paludisme. Le PNLPA a identifié 13 sites sentinelles représentatifs des différents faciès épidémiologiques du paludisme du pays :

- Faciès soudanien : Bougouni, Kadiolo et Kita
- Faciès sahélien : Djenné, Bandiagara ;
- Faciès saharien : Gao, Kidal, Diré, et Tombouctou ;
- Faciès inondé : Niono et Sélingué ;
- Faciès urbain : Commune IV de Bamako, et Kati.

Cinq sites sont opérationnels en 2008 : Kadiolo, Kita, Sélingué, commune IV de Bamako et Djenné grâce à l'appui du projet PMI (Président Malaria Initiative)

Le faciès sahélien est représenté par Djenné qui est situé dans une zone marécageuse inondée et par Bandiagara qui est situé sur le Plateau dogon à 400 – 500 m d'altitude. Aucun site ne représente les vastes plaines basses du Seno et du Gondo qui ont leurs particularités éco-climatiques.

Notre site étude, Pongonon se situe dans la bande sahélienne du Seno avec une période courte de pluie (Juillet -Septembre) qui est un facteur déterminant dans la transmission palustre.

Le but de ce travail est de caractériser le faciès épidémiologique du paludisme de cette zone en faisant des enquêtes transversales parasito-cliniques et

entomologiques et une étude longitudinale de sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques.

### III.Objectifs

#### III.1. Objectif général

Etudier les aspects épidémiologiques du paludisme à Pongonon et évaluer le niveau de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine.

#### III.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer les indices plasmodiques, gamécytoïques et spléniques,
- Décrire la composition de la population vectrice du paludisme dans la localité de Pongonon,
- Déterminer le taux d'infection des anophèles et le taux d'inoculation entomologique.
- Décrire les taux de réponses thérapeutiques et parasitologiques à la chloroquine,
- Mesurer la prévalence du gène *pfcr*, pour vérifier la validité du modèle "GRI" à Pongonon

## IV. Généralités

### IV.1. Historique

Le paludisme est l'une des plus vieilles maladies dont les manifestations cliniques sont décrites par les premières civilisations.

On distinguait avant 1630 parmi les fièvres intermittentes, la « fièvre des marécages ». En 1630, Don Francisco Lopez apprend des indiens du Pérou les vertus de l'écorce du quinquina, les fièvres sont groupées en deux entités nosographiques, selon leur sensibilité ou leur résistance à cette drogue. Pelletier et Caventou (1820) isolèrent l'alcaloïde actif, la quinine, que Maillot utilise au cours de la campagne d'Algérie (1830). L'agent pathogène est découvert en 1880 par Laveran à Constantine.

Marchiafava, Celli et Golgi, distinguent bientôt trois espèces parasites de l'homme : *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium malariae*. De 1895 à 1897 la transmission de cette affection par un moustique du genre *Anopheles* est soupçonnée par Ross et confirmée par Grassi en 1898<sup>12</sup>. Stephens isole en 1922 une quatrième espèce plasmodiale : *Plasmodium ovale*. En 1948 Shortt et Garnham mettent en évidence l'existence de formes exo-érythrocytaires tissulaires dans le foie de *P. vivax* expliquant ainsi la phase prépatente et la survenue des rechutes (accès de reviviscence schizogonique).

De 1820 à 1940, aucun progrès thérapeutique n'avait été réalisé. Peu avant la seconde guerre mondiale la chloroquine premier antipaludique de synthèse est préparée et ouvre à toute une série de dérivées. La guerre du Pacifique à partir de 1942, privant les américains des plantations indonésiennes de quinquina, active les recherches de nombreux antipaludiques. Contre les vecteurs, les insecticides de contact à effet rémanent tel le DDT, sont utilisés dès la fin de la guerre<sup>12</sup>.

### IV.2. Profil épidémiologique du paludisme

Le paludisme sévit actuellement dans la ceinture de pauvreté du monde, mais l'impact de la maladie en terme de santé publique (mortalité, morbidité et impact socio-économique) varie considérablement d'une région à une autre. Cette hétérogénéité du paludisme a très tôt imposé la nécessité d'une classification des zones où sévit la maladie en fonction du climat et de la végétation (Macdonald 1957) ou suivant la prévalence des splénomégalies chez les enfants de moins de 9 ans<sup>13</sup>; quatre niveaux d'endémicité furent ainsi déterminés :

- Hypo-endémicité, moins de 25 % de splénomégalie ;
- Méso-endémicité, de 25 à 50 % ;

- Hyper-endémicité, de 50 à 75 % ;
- Holo-endémicité avec plus de 75 % et disparition des splénomégalies chez l'adulte.

Cette classification fut adoptée par la conférence sur le paludisme de l'OMS en Afrique équatoriale en 1951 pour caractériser les diverses situations en Afrique tropicale.

Actuellement l'endémie palustre est déterminée par la prévalence de participants de 2 à 9 ans porteurs de formes asexuées de *Plasmodium* déterminant ainsi quatre niveaux d'endémicité :

- Hypo-endémicité, moins de 25 % ;
- Méso-endémicité, de 25 à 50 % ;
- Hyper-endémicité, de 50 à 75 % ;
- Holo-endémicité avec plus de 75 %

Mais cette stratification seule ne rend pas compte de l'impact du paludisme en terme de santé publique ni de ses caractéristiques épidémiologiques ; d'autres facteurs entraînent des modifications locales à l'intérieur des strates ; il s'agit de :

- La présence de rivière ou de lacs, des barrages et des périmètres irrigués qui allongent la période de transmission pendant la saison sèche.
- L'urbanisation qui diminue la superficie des aires propices aux gîtes d'anophèles et pollue les eaux de surface les rendant impropres au développement de ces moustiques ; l'intensité de la transmission décroît de la périphérie au centre des villes.

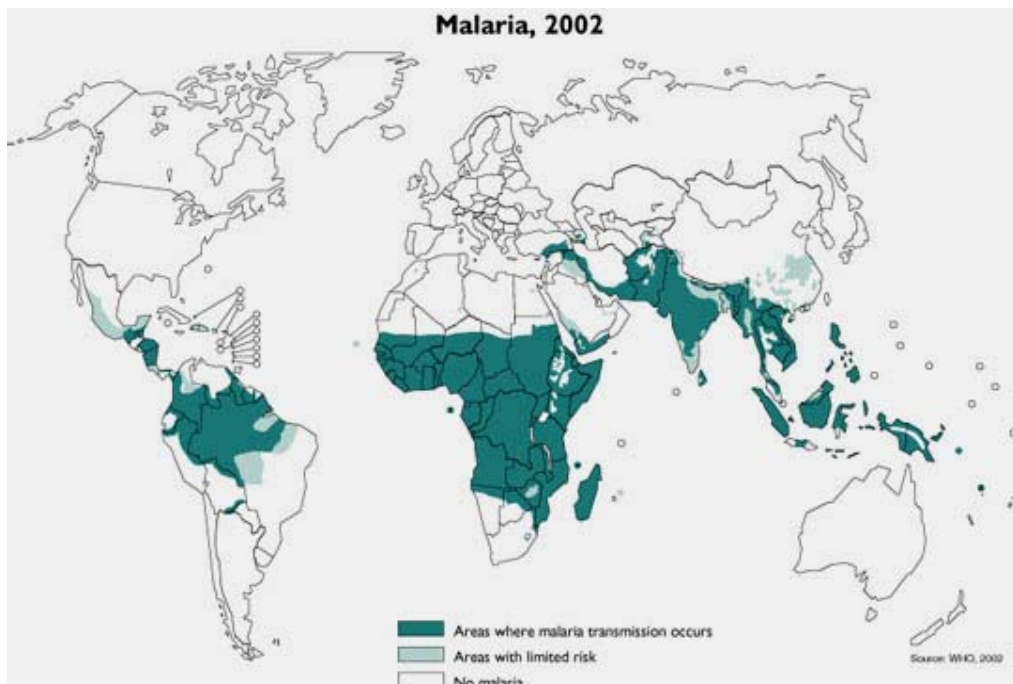
Au Mali Doumbo, et al., 1989 ; ont décrit cinq faciès de transmission du paludisme<sup>14</sup> :

- **Zone de transmission saisonnière longue** : (> 6 mois : Mai – Novembre avec 1500 mm d'eau par an ; avec un indice plasmodique à 80 – 85 % et une prémunition, l'anémie chez les femmes enceintes peut atteindre 41,2 %. C'est le domaine de la zone Soudano Guinéenne. Le paludisme y est holo-endémique).
- **Zone de transmission saisonnière courte** (3 mois : Sahel avec 200 – 800 mm d'eau par an atteignant surtout les enfants de moins de 6 mois à 9 ans). Le paludisme y est hyper-endémique avec un indice plasmodique variant entre 50 et 75 %.
- **Zone subsaharienne** (hypo-endémique) : avec 200 mm d'eau par an le paludisme peut se manifester de façon épidémique, l'indice plasmodique est inférieur à 5 %.

- **Zone urbaine** (pollution des gîtes, médicalisation) : hypo-endémique, l'indice plasmodique est inférieur à 10 %.
- **Zone de transmission bimodale ou plurimodale en début de pluie** : c'est le delta intérieur du Niger et les zones de retenues d'eau et de riziculture (barrages), l'indice plasmodique est inférieur à 40 %.

Il apparaît ainsi que l'épidémiologie du paludisme varie énormément d'une zone à l'autre et même dans des lieux géographiquement très proches ( J.Y.Munier, 1999).

Le paludisme touche une centaine de pays dans le monde, particulièrement les zones tropicales défavorisées d'Afrique, d'Asie et d'Amérique Latine **[figure2]**.



**Figure 2 : Carte de répartition du paludisme (source OMS 2002)**

#### **IV.2.1.Indices épidémiologiques du paludisme :**

Ils apprécient la fréquence et la distribution du paludisme au sein d'une population donnée. Ils permettent de définir différents niveaux de transmission et

d'endémicité permettant ainsi d'adapter les stratégies de lutte contre le paludisme par rapport au biotope considéré.

#### **IV.2.1.1. Indices chez l'homme :**

##### **IV.2.1.1.1. Indice plasmodique (IP) :**

C'est le pourcentage de participants d'un groupe d'âge donné (2 à 9 ans) porteurs de formes asexuées dans le sang périphérique. Il permet de déterminer le niveau d'endémie. Lorsque la maladie est connue dans la région et que le nombre de cas attendu compte tenu du lieu, du temps et de la population considérée, on distingue 4 niveaux (pourcentage de la population) : moins de 25% : hypo-endémie ; de 25 à 50% : méso-endémie ; de 50 à 75% : hyper-endémie ; plus de 75% : holo-endémie.

##### **IV.2.1.1.2. Indice splénique :**

C'est le pourcentage d'enfants entre 2 et 9 ans présentant une splénomégalie. Cet indice permet le classement en zones d'hypo-endémie (indice splénique de 0 à 10%), en zones de méso-endémie (indice splénique de 11 à 50%), en zones d'hyper-endémie (indice splénique de 50 à 75%) et en zones d'holo-endémie (indice splénique supérieur à 75%). Il n'est plus utilisé de nos jours.

##### **IV.2.1.1.3. Indice gamétoctyrique :**

Il représente le pourcentage de participants porteurs de gamétoctes sanguins. Il indique la capacité d'une population humaine à infester les vecteurs et donc le risque d'infectivité d'une population donnée.

#### **IV.2.1.2. Indice chez l'anophèle :**

Trois indices permettent d'évaluer l'importance du rôle des anophèles dans la transmission du paludisme.

##### **IV.2.1.2.1. Indice sporozoïtique (IS) ou indice de l'antigène sporozoïtique (IAS)**

L'IS est le pourcentage d'anophèles porteurs de sporozoïtes dans les glandes salivaires.

L'IAS est le pourcentage d'anophèles porteurs de protéines circumsporozoïtes exprimées à la surface des sporozoïtes dans la portion tête-thorax ; ou du sang de l'hôte vertébré ingéré par l'anophèle.

##### **IV.2.1.2.2. Indice oocystique (IO)**

C'est le pourcentage d'anophèles porteurs d'oocystes dans la paroi de leur estomac. Cet indice n'est pas très fiable car l'évolution sporogonique peut avorter après la formation d'oocystes.



#### IV.2.1.2.3. Taux d'inoculation entomologique

Le taux d'inoculation entomologique ou TIE représente le nombre de piqûres infestantes par homme et par unité de temps. Cette unité peut être exprimée en nuit, en mois ou en année selon les études entomologiques réalisées.

### IV.3. LE VECTEUR :

#### IV.3.1. Généralités sur les anophèles :

Dans le monde, la transmission du paludisme est assurée par plusieurs espèces d'anophèles.

Les moustiques responsables de la transmission du paludisme à l'homme, appartiennent à la famille des *Culicidae*, à la sous-famille des *Anophelinae* au genre *Anopheles*.

Parmi les espèces rencontrées en Afrique nous pouvons citer :

- *An. gambiae s.l* : présent dans la quasi-totalité de l'Afrique Subsaharienne non méridionale.
- *An. funestus* : répandu dans toute l'Afrique Subsaharienne mais, plus abondants dans les savanes ouvertes.
- *An. nili* : très largement répandu dans toutes l'Afrique et est localisé aux environs des cours d'eau permanents ou semi-permanents dans lesquels se développent ses larves.
- *An. pharoensis* : c'est un anophèle relativement grand, très abondant dans le Delta du Nil. Il est présent en Afrique tropicale, et le principal vecteur du paludisme en Egypte.
- *An. sergentii* : est le vecteur dans les zones irriguées de la Libye et de l'Egypte.

Au Mali, les principaux vecteurs sont *Anopheles gambiae s.l* (Giles, 1902) et *Anopheles funestus* (Giles, 1900); (Toure, 1979).

- ***An. gambiae* se reconnaît par :**

- sa taille moyenne,
- l'existence d'une bande pâle dans la troisième zone sombre de la costa, des palpes à trois bandes pâles.

- ***An. funestus* se caractérise par :**

- la présence de trois (parfois quatre) bandes pâles très étroites sur les pattes des femelles,
- quatre taches pâles dont le quart basal entièrement noir sur la costa, la base de la première nervure est pâle,
- Les fémurs et tibias antérieurs noirs, parfois avec une petite tache pâle à l'apex du tibia,
- Le tarse postérieur entièrement noir.



**Figure 3 : gauche, *An. gambiae* ; droit, *An. funestus* Photos courtesy of J. Gathany, CDC (Source : [biology.biosadm.1@nd.edu](mailto:biology.biosadm.1@nd.edu))**

### IV.3.2. Bio-écologie

Au cours de leur développement, les moustiques passent nécessairement par deux phases : une phase aquatique (stade préimaginaire : de l'œuf à la nymphe) et une phase aérienne (stade imago ou adulte).

#### a. Stades préimaginaires ou aquatiques

##### - Œufs

Ce sont des petits corps mesurant 1 mm ou plus, et sont déposés à la surface de l'eau. Chez les anophèles, la femelle dépose entre 160-300 œufs par ponte (Holstein, 1994). Ce sont des œufs plus ou moins ovoïdes, isolés et pourvus de flotteurs latéraux leur permettant de conserver une position horizontale à la surface de l'eau.

La durée d'incubation est de 24 à 36 heures en général mais est fonction de la température.

- **Larves**

Après éclosion, la larve subit trois mues successives qui la conduisent du stade I au stade IV. Une larve de moustique au stade IV comprend 3 parties : la tête, le thorax et l'abdomen.

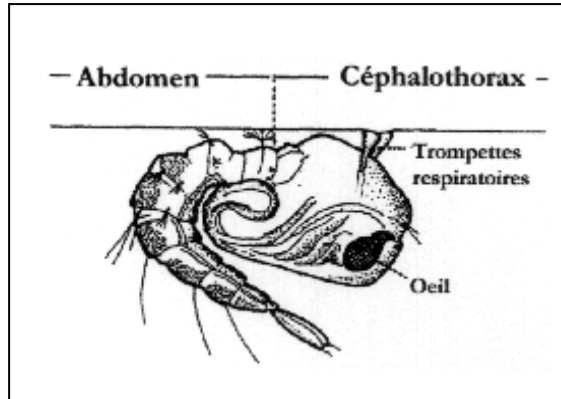
La durée du stade larvaire est très variable. Elle est fonction de l'espèce, de la température, de l'alimentation, du PH et de la quantité de la matière organique dissoute.

- **Nymphes**

La larve parvenue à son développement complet cesse de se nourrir. Elle subit alors sa quatrième mue pour donner une nymphe. La nymphe est une puppe mobile présentant la forme d'une virgule (Figure 4). Elle comprend deux parties : le céphalothorax et l'abdomen. Le céphalothorax est globuleux, porte des trompettes respiratoires. L'abdomen est terminé par deux palettes natatoires.

La durée de vie nymphale oscille entre un et six jours selon les espèces et les conditions climatiques du milieu.

La durée totale du cycle de l'œuf à l'imago est de 12 à 20 jours en moyenne. Elle peut être réduite ou allongée par les conditions défavorables.



**Figure 4 : Morphologie schématique de la nymphe**

**Source :** <http://www.eid.org/frmoustique/moustiquebiologie.htm>

### **b. Imagos**

De la nymphe émerge, un adulte mâle ou femelle. Le sex-ratio est généralement en faveur des mâles (45 femelles pour 55 mâles).

L'émergence dure quelques minutes et représente une phase délicate dans la vie de l'insecte en raison d'une forte mortalité par noyade.

Les moustiques venant d'éclore, n'ayant souvent aucun hôte à piquer près de leurs gîtes larvaires, sont obligés de chercher leur nourriture à une certaine distance. Chez la plus part des espèces, le moustique ne franchit pas de grandes distances au vol et le mâle vole beaucoup moins que la femelle.

Les moustiques se rencontrent dans toutes les zones géographiques du monde. Cette distribution varie en fonction de la température et de l'altitude. *An gambiae s.l* et *An. funsetus* se rencontrent sur toute l'étendue de la zone afro-tropicale.

Au repos, lorsqu'ils sont placés sur une surface plane, les moustiques ont une attitude caractéristique qui nous permet dans la plupart des cas de distinguer les différentes sous-familles de *Culicidae* les unes des autres. Ainsi par rapport au support, le corps des *Culicidinae* et celui des *Aedinae* sont parallèles, alors que le corps des *Anophelinae* est complètement oblique.

Les moustiques mâles et femelles se nourrissent du jus sucré, de nectars et d'autres exsudats végétaux. Les femelles pour le développement des œufs ont besoin de repas sanguin qui n'est pas indispensable pour leur survie. Les moustiques sont inféodés aux invertébrés. Cependant chaque espèce montre des préférences trophiques nettes pour un ou plusieurs animaux bien définis. Quant l'hôte préféré est l'homme, le moustique est qualifié d'anthropophile. S'il s'agit d'un animal, il est dit zoophile.

Dans la nature l'accouplement a généralement lieu dans les 24 à 48 heures après la mue imaginale. Les mâles de certaines espèces forment un essaim qui se tient fréquemment à la verticale de points bien définis ou nettement contrastés comme par exemple le sommet d'un arbre ou l'angle d'un bâtiment. La formation de l'essaim se produit en général à l'aube ou au crépuscule. Les femelles qui pénètrent à l'intérieur de l'essaim sont happées au passage et le couple ainsi formé s'isole en se laissant tomber. Après l'insémination, les spermatozoïdes sont emmagasinés dans un organe appelé spermathèque d'où ils sont extraits progressivement pour féconder la totalité des œufs que la femelle produit (monogamie).

La durée de vie moyenne des moustiques est de 45 jours. Cette durée varie qu'il s'agisse d'un mâle ou d'une femelle. En général, la femelle vit plus longtemps que le mâle. Les facteurs climatiques jouent un rôle très important dans la survie des moustiques. Ainsi par exemple dans les pays tempérés, certaines espèces qui sont en état d'hibernation conditionnelle peuvent survivre de six à sept mois.

#### **IV.3.3. Gîtes larvaires**

Un gîte larvaire est une collection d'eau choisie par la femelle d'un moustique pour son oviposition (ponte des œufs) et où se développent les stades préimaginaux.

Les gîtes sont variés et le plus souvent conditionnés à l'eau de pluies. Les larves d'*Aedinae* se rencontrent dans les fonds des canaris, les boîtes de conserve, les culs de bouteilles, les récipients de cuisine abandonnés, les coques des noix de coco, les trous d'arbres...

Les gîtes larvaires des *Culicidae* sont très nombreux et variables selon les espèces. Selon Holstein (1949), on rencontre les larves de certaines espèces dans les grands marécages, les mares, les rizières, les fleuves, les ruisseaux. Les gîtes larvaires des *Culex* urbains dont surtout les eaux polluées.

On cherche les larves d'*Anophelinae* dans les gîtes qui peuvent être classés en deux catégories : naturels ou créés par l'homme. Les gîtes larvaires naturels peuvent être permanents ou temporaires.

Quant aux gîtes créés par l'homme, leur importance épidémiologique est souvent grande car ils entraînent un déséquilibre faunistique qui va brutalement favoriser une espèce. Or, on sait qu'un vecteur médiocre peut être redoutable lorsqu'il pullule.

Selon donc les espèces, les larves d'*Anophelinae* se rencontrent dans des creux de rochers sans végétation, remplis d'eau tiède, ensoleillés (*An. gambiae*), ou des flaques résiduelles de marigot ensoleillés, avec végétation et d'eau tiède (*An. funestus*).

En l'absence de ses gîtes préférés, une femelle poussée par le besoin impérieux de ponte, utilise d'autres catégories de gîtes pour son oviposition.

#### **IV.3.4. Cycle biologique**

Le développement de toutes les espèces de moustiques est caractérisé par la succession de deux phases : la première est aquatique et recouvre la vie pré-imaginale, c'est-à-dire l'œuf, les stades larvaires et la nymphe. La seconde est aérienne et concerne l'adulte, ou imago.

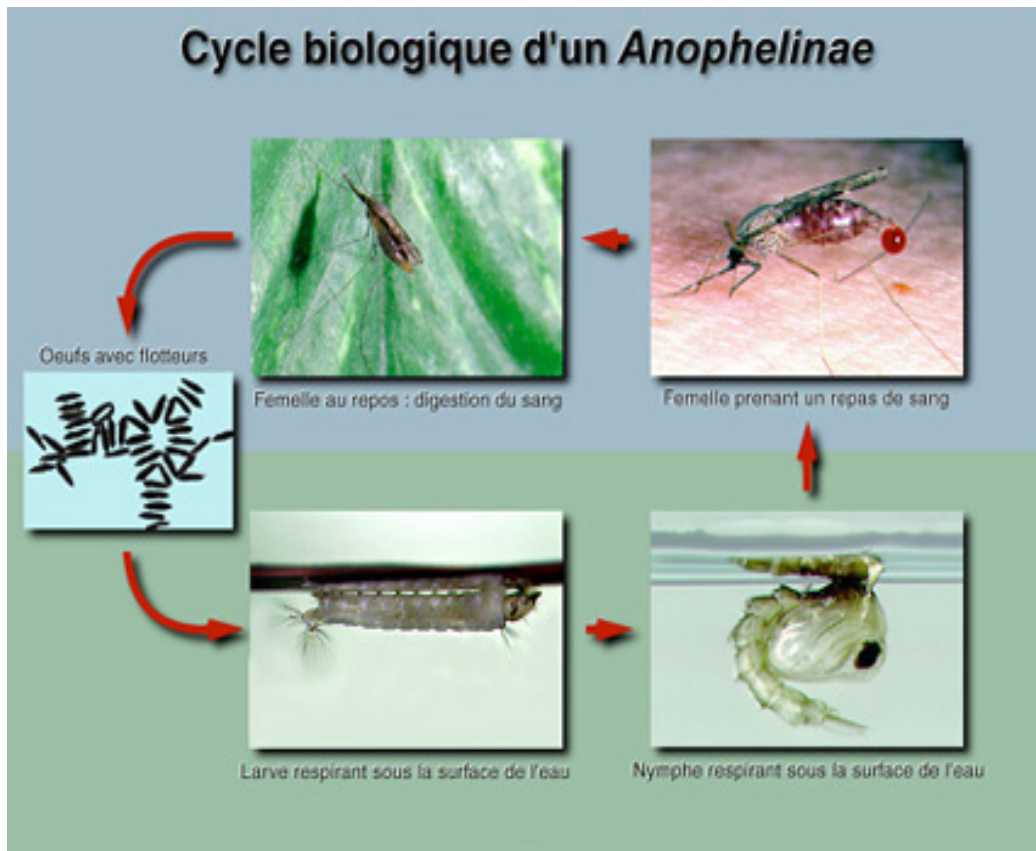
Les anophèles femelles pondent sur l'eau des œufs fécondés. Ces œufs mesurent moins d'1 mm. Ils sont pondus isolément, sont munis de flotteurs et restent en surface durant l'embryogénèse.

De chaque œuf éclot une seule larve d'environ 1 mm. La larve aquatique des anophèles se nourrit en filtrant les débris organiques et les micro-organismes de l'eau. Il y a quatre stades larvaires, séparés par trois mues larvaires. La larve de stade 4 mesure 5 mm à 1 cm.

La larve de quatrième stade effectue une mue particulière, la nymphose. Cette dernière libère une nymphe aquatique mobile, qui ne se nourrit pas. De profonds remaniements de la morphologie s'effectuent au cours du stade nymphal. Les organes propres au stade larvaire (appareil buccal filtreur-broyeur, système digestif de détritophage-filtreur) sont détruits ; les organes caractéristiques de l'adulte qui étaient présents à l'état d'ébauches dans la larve (ailes, pattes, appareil buccal piqueur-suceur, système digestif d'hématophage) apparaissent.

De la nymphe émerge un adulte, mâle ou femelle, qui s'envole rapidement (**Figure 5**). C'est au cours de la phase aérienne, le plus souvent dans un essaim de mâles réunis au crépuscule, que s'effectue l'insémination de la femelle néonate. Les spermatozoïdes sont introduits dans la bourse copulatrice de la femelle, puis ils migrent dans une spermathèque, sorte d'annexe du système sexuel femelle, dans laquelle ils conservent leur pouvoir fécondant pendant plusieurs semaines, jusqu'à la mort de la femelle.

La fécondation s'effectue dans le tractus génital de la femelle, lors de la ponte, des spermatozoïdes étant libérés à partir de la spermathèque.



**Figure 5 : Schéma montrant les différents stades de développement d'un moustique. Source : J. Brunhes et Coll., Les anophèles de la région afro-tropicale, logiciel ORSTOM Ed., 1998)**

#### IV.4. Le parasite

L'agent pathogène du paludisme est un hématozoaire du genre *Plasmodium*, appartenant à l'embranchement des Sporozoa et à l'ordre des *Haemosporidae*. Cent vingt trois espèces du genre *Plasmodium* ont été répertoriées et possèdent des cycles biologiques similaires. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires des vertébrés transmis par la piqûre des moustiques femelles. Il existe quatre espèces plasmodiales humaines :

##### IV.4.1. *Plasmodium falciparum*:

C'est le plus redoutable agent de la fièvre maligne (accès pernicieux, anémie grave). Il envahit les érythrocytes qu'ils soient jeunes ou âgés. *P. falciparum* est le plus répandu autour de l'équateur où le paludisme sévit de façon endémique à cause de l'humidité et de la température qui entretiennent de façon permanentes les conditions favorables au développement du cycle chez les moustiques.

##### IV.4.2. *Plasmodium malariae* :

Il est l'agent de la fièvre quarte. Ses mérozoïtes parasitent de préférence les hématies âgées. Cette prédilection joue à l'avantage du parasite puisque dans une certaine mesure elle empêche la mort de l'hôte. Il peut être responsable de syndromes néphrotiques graves. Il est essentiellement présent en Afrique et en Asie, beaucoup plus rare en Amérique tropicale.

##### IV.4.3. *Plasmodium ovale* :

C'est l'agent de la fièvre tierce bénigne. Ses mérozoïtes parasitent de préférences les hématies jeunes. Il est présent exclusivement en Afrique entre les tropiques du Cancer et du Capricorne. C'est-à-dire là où *P. vivax* est rare ou absent.

##### IV.4.4. *Plasmodium vivax* :

Il est aussi responsable d'une fièvre tierce bénigne. Ses mérozoïtes ont comme pour *P. ovale* une préférence pour les globules rouges immatures. Miller et al (1975, 1977) ont démontré que l'antigène du groupe sanguin Duffy intervient dans la pénétration des mérozoïtes de *P. vivax* dans les hématies. En effet *P. vivax* n'envahit que les érythrocytes qui possèdent l'antigène du groupe sanguin Duffy (Duffy +). Cet antigène est très rare dans la race noire (Duffy-). C'est ce qui explique sa localisation géographique actuelle. Il est exceptionnellement rencontré en Afrique du nord mais très répandu en Afrique de l'est en Asie et en Amérique, entre le 16<sup>ème</sup> et les 21<sup>ème</sup> degrés de latitude.

##### IV.4.5. Cycle biologique de *Plasmodium*

Les plasmodies sont des homococcidies (ou hémospodidies) appartenant au phylum des Apicomplexa. Ce sont des parasites dixènes puisque leur cycle comporte un hôte invertébré (anophèle) et un hôte vertébré homéotherme (figure7).



#### IV.4.5.1. Cycle chez l'homme :

L'anophèle femelle infecté, au cours de son repas sanguin injecte dans un vaisseau avec sa salive les sporozoïtes localisés dans ses glandes.

Ces sporozoïtes transportés par le courant sanguin circulent dans tout l'organisme pendant un temps relativement court, sans subir de transformation.

Seuls survivent ceux ayant gagné le foie et ayant probablement franchi le barrage des cellules phagocytaires du foie (cellules de Kupffer).

##### a. Phase hépatique

Appelée phase pré-érythrocytaire ou phase exo-érythrocytaire, c'est une phase silencieuse et fut découverte par Shortt et Garhnam en 1948. Les sporozoïtes traversent le revêtement endothélial des capillaires sinusoides avant de pénétrer dans l'hépatocyte. D'après Meis et al., (1983), ce mécanisme fait intervenir probablement des expansions dendritiques des cellules phagocytaires de Kupffer qui traversent l'endothélium et un récepteur (Hollindale, 1983) dont la nature n'est pas encore connue. Selon Kretti et al. (2000) il existe chez les *Plasmodium* 3 stades d'invasion du parasite : l'invasion par les ookinètes de l'épithélium stomacal, l'invasion des glandes salivaires et des hépatocytes par les sporozoïtes et l'invasion des globules par des mérozoïtes. Le mécanisme par lequel les sporozoïtes traversent la peau n'est pas connu. Mota et al., en 2001 ont démontré par des études in vitro que les sporozoïtes traversent la lumière épithéliale, un mécanisme qui pourrait permettre le passage des sporozoïtes à travers les vaisseaux cutanés. Après ce passage les sporozoïtes entrent dans la circulation sanguine et vont se localiser dans le foie, puis envahissent les hépatocytes. Une fois dans l'hépatocyte, le parasite s'arrondit et se transforme en une grosse cellule uninuclée, le trophozoïte. L'évolution du trophozoïte hépatique dépend de l'espèce plasmodiale.

Chez les espèces *P. falciparum* et *P. malariae*, le noyau du trophozoïte âgé se divise un grand nombre, puis chaque noyau s'entoure d'un peu de cytoplasme pour former un syncidium qui à son tour s'entoure d'une membrane. Il se forme ainsi en 6 jours chez *P. falciparum* et en 15 jours chez *P. malariae* un schizonte hépatique mature appelé "corps bleu" qui contient quelques milliers de noyaux. C'est la schizogonie hépatique. Ce schizonte à maturité, éclate avec l'hépatocyte et libère des mérozoïtes hépatiques dans le courant sanguin qui vont pénétrer dans les globules rouges et initier ainsi la phase érythrocytaire.

La schizogonie exo-érythrocytaire chez *P. ovale* et chez *P. vivax* dure respectivement 9 et 8 jours. Il faut noter que certains schizontes peuvent

rester en dormance sous forme uninuclée dans les hépatocytes. Ils sont appelés des hypnozoïtes. Ces hypnozoïtes peuvent donner naissance à des schizogonies hépatiques. Elles sont à l'origine de rechutes et de reviviscence schizogoniques (Danis et Mouchet, 1991).

## **b. Phase sanguine**

### • **Le mérozoïte**

La pénétration dans l'érythrocyte se fait en trois temps :

- La phase de fixation initiale ou de contact entre le manteau du mérozoïte et la surface de l'hématie qui peut se faire en n'importe quel point de la surface de l'un ou l'autre.
- La phase de réorientation pendant laquelle la région apicale du mérozoïte (perforatorium) se dirige vers la membrane érythrocytaire. Cette région apicale qui contient des rhoptries et des micronèmes est caractéristique des formes invasives du parasite d'où le nom d'*Apicomplexa*.
- La phase d'endocytose pendant laquelle la membrane de l'hématie s'invagine, puis les rhoptries et les micronèmes se déchargent dans la vacuole parasitophore.

Au cours de cette pénétration active la membrane érythrocytaire se déplace progressivement vers l'arrière du parasite sous forme d'un anneau. Le manteau glycoprotéique du parasite se détache et le mérozoïte se retrouve isolé dans la vacuole parasitophore, tandis que le manteau reste exposé à la surface du globule.

### • **Le trophozoïte :**

Le mérozoïte se transforme en une forme plus ou moins sphérique qui caractérise le trophozoïte, après sa pénétration dans l'hématie. Le trophozoïte est le siège d'importantes activités métaboliques et une volumineuse vacuole nutritive refoulant le noyau à la périphérie du cytoplasme. Cette vacuole nutritive se remplit progressivement du produit de dégradation de l'hémoglobine, le pigment malarique ou hemozöine (Danis et Mouchet, 1991). Des saccules se détachent de cette vacuole et migrent vers la membrane érythrocytaire avec laquelle ils fusionnent. Ces organites (granulation de Schüffner chez *P. ovale* et *P. vivax* ou taches de Mäurer chez *P. falciparum*) assurent le transport du matériel parasitaire dans le cytoplasme des hématies. Dans le cas de *P. falciparum*, ce matériel parasitaire semble entrer dans la composition des "Knobs" qui sont des protubérances observées sur les hématies parasitées et qui pourraient

déterminer l'adhérence aux cellules endothéliales des vaisseaux du cerveau et la genèse de l'accès pernicieux (Danis et mouchet 1991).

- **Le schizonte :**

Il provient de la multiplication du noyau du trophozoïte en plusieurs petits dont chacun s'entoure de cytoplasme (pour donner de future mérozoïtes érythrocytaires), c'est la schizogonie endon-érythrocytaire. Le schizonte mûr s'appelle le "corps de rosace". A maturité le schizonte éclate avec l'hématie pour libérer des mérozoïtes. Ainsi libérés dans le plasma, les mérozoïtes vont envahir de nouvelles hématies. De nombreux cycles sont ainsi initiés.

Lors de l'éclatement, l'hemozoïne et les débris membranaires sont libérés dans la circulation et sont phagocytés par les polynucléaires neutrophiles, les monocytes ainsi que les macrophages du foie de la rate et de la moelle hématopoïétique.

La lyse des hématies parasitées par les schizontes mûrs est synchronisée et contemporaine des accès fébriles.

La phase a une durée de 7 à 15 jours pour *P. falciparum* et de 3 semaines pour *P. malariae*. Cette durée est difficile à déterminer chez les deux autres espèces (*P. ovale* et *P. vivax*) à cause des réviviscences schizogoniques.

La schizogonie endon-érythrocytaire suit un cycle relativement régulier, caractéristique de chacune des espèces plasmodiales avec un nombre déterminé de mérozoïtes par schizonte. La durée est en général un multiple de 12 heures. Elle est de 36-48 heures pour *P. falciparum*, 48 heures pour *P. ovale* et *P. vivax* et de 72 heures pour *P. malariae*. Un schizonte de *P. falciparum* à 16 à 32 mérozoïtes, 6 à 24 pour *P. malariae*, 8 à 16 pour *P. ovale* et de 16 à 20 pour *P. vivax*.

- **La gamétocytogénèse**

La gamétocytogénèse correspond à l'amorce du cycle sexué ou gamogonie. Après plusieurs cycles schizogoniques asexués, certains se différencient en éléments uninucléés potentiellement sexués qui vont permettre la poursuite du cycle chez le moustique, ce sont des gamétocytes.

Le mécanisme d'induction ou le déclenchement ainsi que le processus de la gamétocytogénèse ne sont encore bien élucidés.

Néanmoins on retient le fait que l'induction de la gamétocytogénèse est liée à une modulation environnementale ou à la souffrance du parasite. Par exemple la production des gamétocytes est accrue lorsqu'on ne renouvelle pas les érythrocytes dans les cultures continues (Carter et Miller, 1979). Quant à la modulation environnementale on fait allusion à l'état immunitaire de l'hôte. En

1981, Smalley et Brown ont constaté que les sérums d'enfants gambiens n'exerçaient aucun type de stimulation à tout seul, Mia pouvait indirectement stimuler les lymphocytes qui à leur tour induisaient la production des gamétocytes. En 1981, Ade-Serrano et al., ont mis en cause une fraction C3b de complément dans cette induction.

La pression médicamenteuse exercée par des doses inférieures aux doses curatives serait à l'origine d'une augmentation d'une gamétocytemie. Il a été constaté que la production des gamétocytes augmentait avec l'administration de la pyriméthamine chez des participants malades du paludisme à *P. falciparum* (OMS, 1973 ; Schute et Maryon, 1954). Aussi avec l'administration de la chloroquine, certaines contraintes métaboliques sont parmi les meilleurs facteurs de modifications environnementales et contribuent à induire la production des gamétocytes (Mons, 1985).

Selon l'OMS (1987), lors des premières manifestations cliniques du paludisme à *P. malariae*, à *P. vivax* et à *P. ovale* il existe déjà dans le sang, des gamétocytes fonctionnels, tel n'est pas le cas au cours du paludisme à *P. falciparum*.

La gamétocytogénèse dure plus longtemps chez *P. falciparum* que chez les autres espèces. Selon Smalley, (1976) *in vivo*, les gamétocytes apparaissent dans le sang périphérique 10 jours environ après la sortie des premiers mérozoïtes hépatiques et un peu plus *in vitro* (12 à 14 jours).

A l'observation microscopique d'un frottis sanguin coloré au May-Grunwald Giemsa, les microgamétocytes de *P. falciparum* sont légèrement arqués, ils ont un noyau presque diffus, un cytoplasme rouge violacé contenant des pigments dispersés. Par contre, les microgamètes sont plus arqués en forme de banane, ils ont un noyau sphérique rouge bien différencié, un cytoplasme bleuté contenant des pigments concentrés autour du noyau.

#### IV.4.5.2. Cycle chez le moustique :

- **La gamogonie :**

La transformation des gamétocytes en gamètes dans les conditions naturelles est subordonnée à leur ingestion par le moustique lors d'un repas sanguin. Le microgamétocyte donne naissance à 8 gamètes mobiles ayant chacun une longévité de quelques minutes. Le microgamétocyte se transforme en un macrogamète unique. Les gamétocytes présents dans le sang infectant ne sont tous capables de **gamétogénèse**.

L'aptitude d'un gamétocyte à se développer en gamète n'est acquise qu'au terme d'un phénomène de "**capacitation**". Plusieurs facteurs jouent un rôle important dans l'induction de la gamétogénèse : abaissement de la température (température optimale entre 28° et 36°Celsius) l'augmentation du PH (entre 7,7 et

8,4) due à l'action du CO<sub>2</sub> sur les réactions faisant intervenir le bicarbonate, les produits pharmacologiques en particulier les inhibiteurs des phosphodiésterases comme la caféine (Carter et Graves, 1988) et probablement d'autres éléments non encore identifiés que Nijhout (1979) a appelé "facteur moustique".

### Gamétogenèse et fécondation

Sur un participant infesté, le moustique absorbe avec des cellules sanguines parasitées, les différents stades du parasite, pendant son repas de sang. Les formes asexuées (mérozoïtes, trophozoïtes et schizontes) sont digérées. Seuls les gamétocytes sont capables de poursuivre leur développement. Quelques minutes après le repas sanguin, des cellules sanguines parasitées ainsi que celles des vacuoles parasitophores se rompent.

Pendant ce temps, les gamétocytes perdent leurs formes allongées et arquées en banane pour devenir plus ou moins sphériques, c'est l'**activation**. Les gamétocytes femelles ne subissent pas de modification profonde lors de leur transformation en macrogamète. Ils font simplement une modification de forme et l'expulsion des corpuscules chromatiniens. La transformation du microgamète en macrogamète est par contre lente et fait intervenir 3 mitoses sur une environ 10 à 12 minutes, la première étant réductionnelle. Les 8 microgamètes sont ensuite expulsés du microgamétocyte sous forme de fin filament, c'est l'exflagellation. Le gamète mesure environ 20-25µ et est flagellé, très mobile et va à la rencontre du gamète femelle.

Lors de la fécondation des macrogamètes par les microgamètes qui a lieu 20 minutes à 2 heures de temps après le repas sanguin, les membranes cellulaires des gamètes mâles et femelles fusionnent, l'axonème et le noyau du microgamète sont refoulés dans le cytoplasme du gamète femelle. Le noyau mâle condensé au début devient moins dense et fusionne avec le noyau femelle, d'où la formation d'un zygote à 2n chromosomes.

Le zygote est avant tout une cellule globulaire circulaire immobile d'environ 8µm de diamètre. Le zygote émet alors un pseudopode et prend la forme cornue. L'évolution continue par allongement du pseudopode et le zygote désormais mobile prend un aspect fusiforme de 18 à 24 µm, c'est l'ookinette qui s'observe 18 à 24 heures après l'infection. Ce dernier migre vers l'épithélium du mésentéron qu'il traverse pour se loger et s'enkyster sous l'assise basale dans une dépression de la paroi stomacale.

Le développement se poursuit entre la paroi du mésentéron et son assise basale. L'ookinète s'enkyste en s'entourant d'une capsule amorphe et devient l'**oocyste**. Ce dernier est d'abord dans une dépression de la paroi cellulaire, par la suite la capsule s'amincit au fur à mesure que l'oocyste se développe et augmente de

volume. Simultanément, l'assise basale se déforme et finit par se rompre. Dès lors l'oocyste de forme sphérique fait saillie à la face externe de l'estomac du moustique.

Sous la capsule, apparaît des vacuoles dans le cytoplasme de l'oocyste. Ces vacuoles grandissent et fusionnent par coalescence, formant de grandes fissures qui subdivisent le cytoplasme de l'oocyste en plusieurs **sporoblastes** de structure fine. Les zones recouvertes par des segments de membrane interne font saillie vers l'extérieur et l'on voit les **sporozoïtes** sortir des sporoblastes par un processus de bourgeonnement. Environ 20% des sporozoïtes qui sont mobiles migrent pour se concentrer dans la glande salivaire du moustique.

Ces sporozoïtes sont alors infestants et peuvent transmettre le paludisme à un individu réceptif.

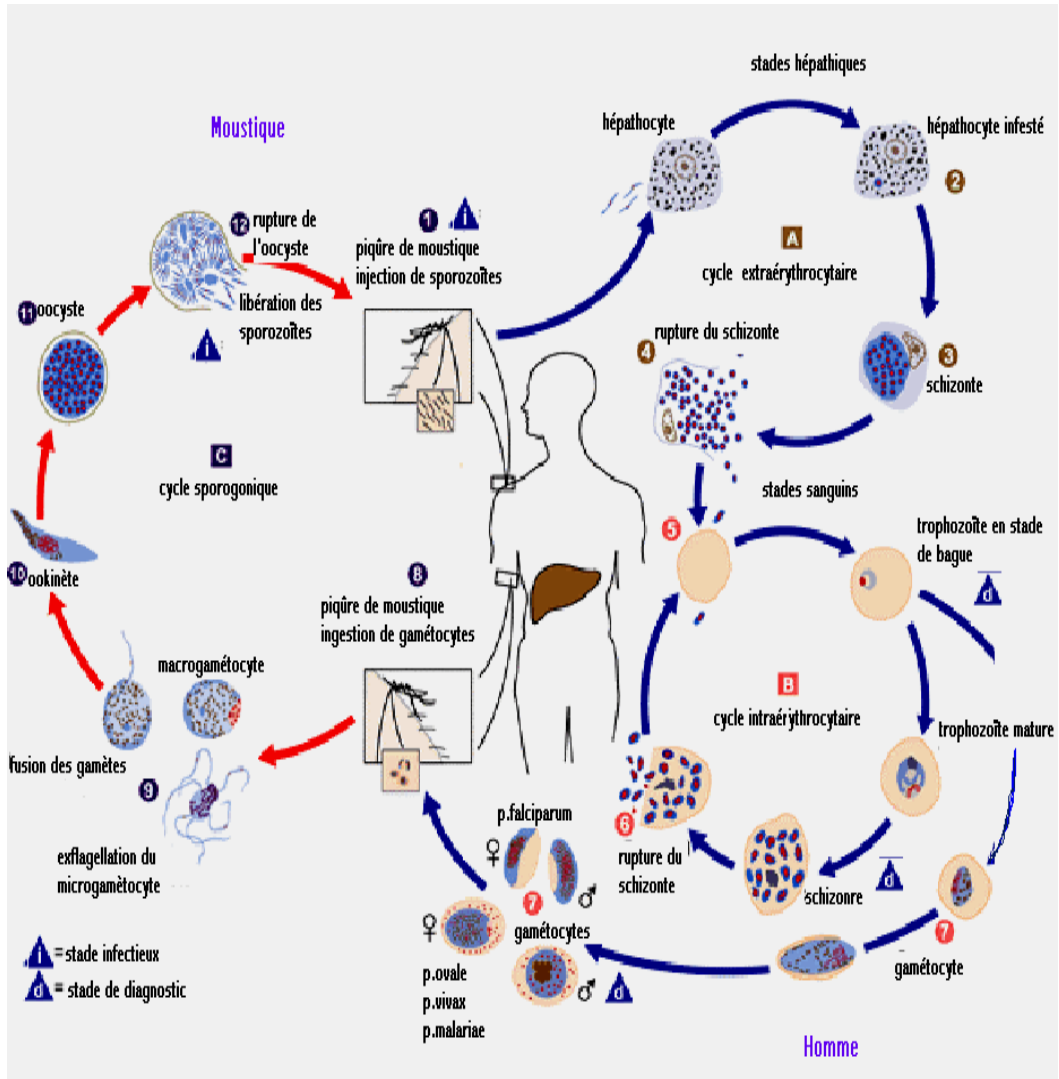


Figure 6 : Cycle de développement de *P. falciparum* (Source : [http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/04vol130/30s1/page9\\_f.html](http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/04vol130/30s1/page9_f.html))

#### **IV.5. Rôle de l'immunité :**

L'immunité est acquise et place à la longue l'hôte et le parasite dans une situation de << paix armée >>. Le développement de cette prémunition est démontré en particulier par l'arrivée, en zone impaludée, d'individus neufs chez qui le paludisme fait des ravages et au contraire par la disparition progressive du paludisme clinique chez les autochtones, en fonction de l'âge, et ce d'autant plus vite que la transmission est intense et continue. Transplantés en zone tempérée, ces participants ne sont plus soumis à l'infestation. Leur immunité s'affaiblit et disparaît en un à deux ans. A leur retour en région tropicale, ils se présentent alors comme des participants neufs et sont exposés à un paludisme grave. Ainsi, l'immunité palustre est précaire et instable ; elle s'acquiert lentement et dépend du facteur temps et du facteur densité parasitaire. Elle doit être entretenue pour durer ; c'est ce que l'on appelle un état de prémunition et que l'on désigne plutôt actuellement du nom d'immunité concomitante. Cette immunité est transmise par la mère à son enfant qui est ainsi protégé pendant les 4 à 5 premiers mois de la vie.

#### **IV.6. Physiopathologie du paludisme :**

Les manifestations cliniques du paludisme-maladie sont observées au cours du cycle endo-érythrocytaire et la physiopathologie de l'accès palustre simple est différente de celle de l'accès sévère ou compliqué dû à *P. falciparum*, seul responsable de la mortalité liée au paludisme.

##### **IV.6.1. Physiopathologie du paludisme simple ou non compliqué :**

Les quatre espèces plasmodiales peuvent être responsables de cet accès et quatre manifestations cliniques sont décrites :

- Fièvre
- Anémie
- Hépatomégalie
- Splénomégalie

##### **IV.6.1.1. La fièvre :**

Elle est le maître-symptôme du paludisme. Elle est liée à la production de cytokines (interleukines 1 et 6) et de prostaglandines ainsi que de *Tumor Necrosis Factor* (TNF). Elle rythme l'éclatement synchrone des schizontes mûrs. La fièvre, par l'intermédiaire d'un « *killing factor* » plasmatique, jouerait un rôle protecteur par inhibition de la multiplication parasitaire.



#### **IV.6.1.2. L'anémie :**

L'anémie est due pour une part à des facteurs mécaniques : éclatement des hématies parasitées, mécanisme le plus important et d'autre part, à d'autres mécanismes dont la fixation sur les hématies non parasitées d'auto-anticorps et d'antigènes parasite responsables d'immunohémolyse qui majorent encore l'anémie parasitaire.

#### **IV.6.1.3. La splénomégalie :**

Elle est la conséquence de l'hyperactivité du système monocyte-macrophage stimulé par l'infection palustre : phagocytose des hématies parasitées et des débris érythrocytaires.

La splénomégalie de l'enfant en région d'endémie est le signe de réinfestations successives.

#### **IV.6.1.4. L'hépatomégalie :**

Elle n'est pas toujours présente et peut s'expliquer par la phagocytose des cellules de Küppfer.

#### **IV.6.2. Physiopathologie du paludisme sévère :**

La complication la plus fréquente et la mieux décrite est le neuropaludisme ou paludisme cérébral dû à *P. falciparum*. Sa pathogénie est encore mal connue malgré de nombreuses données obtenues expérimentalement chez l'animal et les études effectuées chez l'homme.

#### **IV.7. Manifestations cliniques des accès palustres à *P. falciparum* :**

On distingue :

- le paludisme simple ou non compliqué
- le paludisme grave

##### **IV.7.1. Paludisme non compliqué ;**

Il est caractérisé par l'absence de critère de paludisme grave (OMS, 2000). L'enfant est capable de tolérer une médication antipaludique par voie orale et peut ainsi être traité en ambulatoire. Bien traité, le décès est exceptionnel et résulte alors du passage à la forme sévère.

En fonction de la symptomatologie, les différentes formes cliniques du PNC sont :

**-Formes communes :** La symptomatologie correspond à une fièvre non spécifique d'allure isolée.

- La fièvre débute brutalement, souvent élevée mais de degré variable, avec frissons, sueurs, céphalées et courbatures, associée souvent à des petits troubles digestifs de type « d'embarras gastrique » (nausée, vomissements) et /ou diarrhée. L'examen clinique peut être normal au début. Les signes traduisant l'hémolyse apparaissent souvent de façon différée : pâleur, sub-ictère, hépatosplénomégalie.

**-Accès de reviviscence précoce ou tardive :** Ces accès s'observent avec l'acquisition d'un certain degré d'immunité et correspondent aux accès schizogoniques toutes les 48 heures (*P. falciparum*, *P. ovale* ou *P. vivax*) ou 72 heures (*P. malariae*). Chaque accès se succède toutes les 48 heures (fièvre tierce : J1-J3-J5...) ou 72 heures (fièvre quarte : J1-J4-J7) selon le parasite. La périodicité peut manquer en raison d'un polyparasitisme. Seule la fièvre tierce à *P. falciparum* est susceptible d'évoluer vers un paludisme grave.

**-Paludisme viscéral évolutif (PVE) :** Le PVE concerne plutôt l'enfant qui peine, au cours des années, à acquérir sa prémunition.

La splénomégalie en est le signe majeur associé à une hépatomégalie.

Les signes généraux (fébricule intermittente, asthénie, amaigrissement etc.) et d'hémolyse (pâleur, ictère) sont très variables, allant d'une forme quasi symptomatique à une forme pouvant en imposer pour une leucémie. La densité parasitaire est en règle faible nécessitant de répéter les gouttes épaisses.

Le PVE peut être différencié de la splénomégalie palustre hyperréactive, classique « splénomégalie tropicale idiopathique » qui se voit après une longue période d'exposition palustre, donc chez l'adolescent et l'adulte. Trois critères majeurs sont requis : splénomégalie majeure (type III, IV), très forte élévation des IgM et disparition progressive (en plusieurs mois) de tous les signes après traitement antipaludique. La parasitémie est en règle négative, mais la sérologie est fortement positive.

Toute splénomégalie, quand elle est volumineuse, expose au risque de rupture.

#### **IV.7.2.Paludisme grave :**

Il est fréquent chez l'enfant de moins de 5 ans et le sujet non-immun dans les zones de transmission stable et dans toutes les classes d'âge dans les zones de paludisme instable et intermédiaire. Le paludisme sévère nécessite une hospitalisation avec une prise en charge rapide et un traitement par voie parentérale.

L'OMS a établi des critères qui, isolés ou associés, font poser le diagnostic de paludisme sévère et permettent une meilleure prise en charge (critères OMS 2000).

- Neuropaludisme BCS $\leq$ 2 score de Glasgow  $\leq$ 9
  - Troubles de la conscience : BCS $<$ 5 et  $>$ 2 ou score de Glasgow  $<$ 15 ou  $>$ 9
  - Convulsions répétées  $>$ 1 /24 heures
  - Prostration : extrême faiblesse
  - Vomissements itératifs
  - Syndrome de détresse respiratoire
  - Ictère clinique
  - Acidose métabolique, bicarbonates plasmatiques  $<$ 15mmol/L
  - Lactatémie  $\geq$ 5 mmol/L
  - Anémie grave (Hb $<$  5g/dl, Ht  $<$ 15%)
  - Hyperparasitémie  $\geq$ 4% chez le sujet non immun, ou  $\geq$ 20% chez le sujet immun
  - Hypoglycémie (glycémie  $<$  2,2 mmol/L)
  - Hémoglobinurie macroscopique
  - Insuffisance rénale diurèse  $<$ 400ml/ 24h ou créatinémie  $>$ 265 $\mu$ mol chez l'adulte / diurèse  $<$ 12 ml/ kg/ 24h ou créatinémie élevée pour l'âge chez l'enfant
  - Collapsus circulatoire : TAS  $<$ 50 mmHg avant 5 ans, TAS  $<$ 80 mmHg après 5 ans.
  - Hémorragie anormale
  - Œdème pulmonaire (radiologique)
- \*BCS=Blantyre Score Coma.

#### IV.8. Diagnostic :

- Chez le moustique la mise en évidence du *Plasmodium* se fait principalement de deux manières :
  - de façon directe (microscopie) par la dissection pour la recherche des oocystes au niveau de l'estomac ou des sporozoïtes au niveau des glandes salivaires,
  - de façon indirecte en utilisant les méthodes enzymatiques comme type antigène-anticorps ou par la méthode de biologie moléculaire basée sur l'amplification et la mise évidence de l'Acide Ribonucléique(ARN) du parasite.

- Chez l'homme, la détection du parasite du paludisme est d'urgence. Relativement simple et très rapide à mettre en œuvre, le diagnostic s'effectue par la réalisation d'un frottis sanguin, après prélèvement d'une goutte de sang au bout du doigt. La goutte du sang est étalée sur une lame, et après coloration au Giemsa, le parasite est révélé au microscope dans les globules rouges. L'examen est réalisé dans l'heure qui suit.

La microscopie demeure la méthode de référence en zone d'endémie palustre. Mais elle nécessite de posséder un bon microscope et implique un microscopiste qualifié. D'autres techniques de diagnostic indirect ont été mises au point : la détection des anticorps spécifiques dans le sang et celle d'acides nucléiques par la méthode de biologie moléculaire (PCR).

#### **IV.9. Lutte contre le paludisme :**

Les stratégies de lutte antipaludique jusqu'ici utilisées ont été confrontées à de nombreuses difficultés telles la résistance des vecteurs aux insecticides et surtout la résistance des parasites aux antipaludiques. Ces résistances s'intensifient de plus en plus et réduisent considérablement l'efficacité de la lutte antivectorielle et de celle antiplasmodiale.

##### **IV.9.1. Lutte antivectorielle :**

Cette lutte est essentiellement basée sur la demoustification qui consiste à mener une action contre les formes adultes et les formes larvaires.

La pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticide à effet rémanent constitue l'activité principale de lutte contre les adultes. Les produits chimiques utilisés sont les organochlorés (DDT, HCH, l'Endosulfan et la Dieldrine), les organophosphorés (le Malathion, le Finithrothion ...), les carbamates (Propoxur) et les pyréthrinoides de synthèse (Delthamethrine et Permethrine). Cette méthode peut être efficace pour réduire la durée de vie des moustiques sensibles au produit utilisé.

La lutte antilarvaire se fait par la gestion environnementale. Elle nécessite des moyens physico-chimiques et ceux biologiques. Elle est peu efficace pour réduire et très coûteuse et les larvicides chimiques très polluants.

L'utilisation des supports imprégnés d'insecticide (rideaux, moustiquaires, couvertures...), de produits répulsifs (serpentins, les crèmes pour la peau) et de grillages sur les portes et les fenêtres, sont un autre moyen de lutte contre les vecteurs.

##### **IV.9.2. Lutte antiparasitaire :**

Cette lutte est basée sur l'utilisation de médicaments qui ont une action sur les différentes formes du cycle parasitaire chez l'homme (schizontocides,

gamétocytocides). Ceci revient au traitement du paludisme dont le choix dépend avant tout de la gravité clinique de la maladie, d'où l'importance d'un diagnostic précoce et précis.

Ainsi pour le cas du paludisme simple, au Mali les combinaisons Arthemether-Luméfántrine (Coartem) et Artesunate + Amodiquine qui sont recommandées (PNLP, 2003).

Dans le cas du paludisme grave, la quinine intraveineuse demeure l'antipaludique d'urgence : 25mg/kg/j de quinine base comme dose recommandée par l'OMS tant bien chez l'adulte que chez l'enfant.

#### IV.10. Résistance à la chloroquine

Découverte par les chercheurs allemands en 1934 (Resorchin<sup>®</sup>) puis développée en 1944 aux Etats-unis (Aralen<sup>®</sup>)<sup>15 16</sup>.

- Mécanisme d'action de la chloroquine : La chloroquine est une base capable de traverser la membrane de l'érythrocyte parasité. Elle s'accumule dans la vacuole digestive du parasite en suivant le gradient de pH. A l'intérieur de cette vacuole, l'hémoglobine est dégradée par les protéases pour fournir une alimentation en acides aminés au parasite. Cette dégradation produit des groupements d'hème toxiques (hématine). Le parasite détoxifie l'hème en polymérisant le dérivé en hémozoïne. La chloroquine exerce son activité antimalarique en formant un complexe avec l'hème toxique pour le parasite, lequel inhibe sa séquestration en hémozoïne. L'hème libre est lytique pour la cellule. En tant que base faible, elle agit en bloquant l'activité des lysosomes. La chloroquine inhibe également l'ADN polymérase des hématozoaires, et les protéases acides parasitaires<sup>17 18</sup>.

La chloroquine est un des médicaments les plus utiles jamais développés. Les souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum* sont fréquentes dans certains sites, entraînant des échecs thérapeutiques. Au cours des dix dernières années, de nombreux génotypes associés à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine ont été identifiés. Actuellement, c'est à partir de deux gènes qu'on tente d'expliquer la chloroquino-résistance : Le *pfmdr* et le *pfcr* qui est la dernière découverte.

Plusieurs mutations ont été identifiées au niveau de ce gène. Cependant, FIDOCK *et al* ont trouvé que la mutation en position 76 du gène *pfcr*, présent sur le chromosome 7 de *Plasmodium falciparum*, peut conférer la résistance à la chloroquine<sup>19</sup>.

Une étude réalisée au Mali, adoptant le protocole modifié de l'OMS 1996 a montré que les patients présentant une infection palustre après traitement à la

chloroquine présentait ce gène<sup>20</sup>. Ce résultat a été confirmé par une autre étude réalisée au Mali en 1999<sup>21</sup>.

#### **IV.11. Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance :**

L'évaluation de la chimiorésistance a été standardisée par l'OMS pour l'espèce. Il s'agit des épreuves d'évaluation *in vitro* et *in vivo*.

##### **IV.11.1. Test *in vitro* :**

Ils consistent à évaluer la présence des marqueurs génétiques ou à mesurer l'inhibition de la maturation en schizontes des parasites isolés chez un sujet, en présence de doses croissantes d'un antipaludique donné.

Après le macrotest mis au point par l'OMS et vite abandonné, ce sont les microtests qui sont actuellement utilisés. On distingue :

##### **IV.11.1.1. Tests optiques :**

C'est le microtest OMS<sup>22</sup> et le semi-microtest de Le Bras<sup>23</sup> ont été mis au point à la fin des années 70: Ils sont basés sur la capacité des doses croissantes d'antipaludiques testés à empêcher la maturation des trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* en schizontes, lorsque le prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI (Rostwell Park Memorial Institute) et incubé à 37°C, en présence de CO<sub>2</sub> et de O<sub>2</sub>, pendant 24 à 48 heures. Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI), pour le microtest OMS, et en concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) ou 90% (CI<sub>90</sub>), pour le semi-microtest.

##### **IV.11.1.2. Tests isotopiques :**

Ce sont le microtest isotopique de Desjardins<sup>24</sup> et le semi-microtest isotopique de Le Bras et Deloron<sup>25</sup>. Ce sont des modifications, respectivement, du microtest OMS et du semi-microtest optique. Après 18 heures d'incubations, on ajoute à chaque cupule un radio-isotope, l'hypoxanthine tritiée. L'incubation des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites. La mesure de la radioactivité se fait dans un compteur à scintillation. Les résultats sont donnés en coups par minute et l'activité du médicament est exprimée en CI50 ou en CI90.

##### **IV.11.1.3. Nouveaux tests :**

Les tests récemment mis au point sont ceux de :

##### **IV.11.1.3.1. Tests rapide de Krogstad<sup>26</sup>**

Ce test est fondé sur la capacité d'un inhibiteur calcique, la vérapamil, à bloquer l'excrétion et l'exocytose de la chloroquine de la vacuole parasitophore des souches chloroquinorésistantes de *Plasmodium falciparum*. Les résultats s'obtiennent en deux heures et sont exprimés en résistance de type "RI et RIII" selon la classification de l'auteur.

#### **IV.11.1.3.2. Microtest de Markii :**

C'est une modification du macrotest par les mêmes auteurs qui se sont inspirés de la technique de la culture continue de TRAGER et JENSEN. Il consiste à mettre en culture pendant 24 à 48 heures à 37°C sur des plaques de titration traitées avec différents antipaludiques à doses croissantes. Les kits sont fournis par l'OMS et donnent des doses critiques de sensibilité pour chaque médicament.

#### **IV.11.1.3.3. Test de Makler<sup>27</sup> :**

C'est un test enzymatique fondé sur la capacité de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) de *Plasmodium falciparum* à utiliser rapidement la 3-acétylpyridine adénine dinucléotide dans la réaction aboutissant à la formation de pyruvate à partir du L-lactate. Le test vise à détecter et à quantifier, par une technique enzymatique, la LDH produite par *Plasmodium falciparum* en présence de l'antipaludique étudié. Il existe une corrélation entre la densité parasitaire et l'activité de la LDH plasmodiale.

#### **IV.11.1.4. La biologie moléculaire : PCR**

Elle est fondée sur l'amplification exponentielle *in vitro* de l'ADN plasmodial en présence d'amorces spécifiques de nucléotides, de Taq polymérase de buffer. La révélation se fait par électrophorèse de l'ADN amplifié sur gel d'agarose à 2%.

##### **IV.11.1.4.1. Principe :**

Elle est fondée sur l'amplification exponentielle *in vitro* de l'ADN plasmodial en présence des amorces spécifiques de nucléotides, de Taq polymérase et d'un milieu tampon. La révélation se fait par électrophorèse de l'ADN amplifié sur un gel d'agarose à 2%.

##### **IV.11.1.4.2. Technique :**

Cette technique décrite en 1985 par K. Mullis et al., permet une amplification enzymatique *in vitro* de la quantité de l'ADN initial.

Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent le segment à amplifier. Connaissant ces deux séquences on synthétisera deux oligonucléotides complémentaires. Ces oligonucléotides auront deux fonctions :

- La reconnaissance de la partie de l'ADN à amplifier
- Ils serviront d'amorces à l'ADN polymérase

Des cycles successifs sont entrepris, chaque cycle comprend :

- Dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins de l'ADN.
- Hybridation avec les deux amorces spécifiques. Leur fixation est rendue possible grâce à un abaissement de la température. Un des oligonucléotides se fixe sur un brin de l'ADN, le deuxième sur l'autre brin.
- Extension des amorces avec une DNA polymérase

Cette technique a eu de l'ampleur avec la découverte en 1988 d'un ADN polymérase non inactivé par la chaleur. Il s'agit de la Taq polymérase (isolée d'une bactérie thermophile adapté à la vie d'eau chaude "*Thermus aquaticus*"). Avec la Taq on peut effectuer un nouveau cycle (dissociation, hybridation des amorces de l'ADN) sans avoir à ajouter chaque de l'enzyme. Il est maintenant possible d'automatiser ces réactions grâce à des thermocycleurs programmables en températures et en temps.

### **Nested PCR**

C'est une double PCR successive. Une deuxième PCR se fait sur le produit de la première PCR. Cette technique permet d'obtenir une plus grande sensibilité en PCR. Dans ce cas deux couples d'amorces sont utilisés.

Un couple externe : ce couple d'amorces permet tout d'abord d'obtenir un fragment de l'ADN amplifié, comme en PCR classique. Les amorces sont donc spécifiques des deux séquences bornant l'ADN à amplifier. Les fragments de l'ADN obtenus (par exemple 537 pdb pour crt K76T) servent alors de matrice pour une seconde PCR.

Couple d'amorces internes : Ce couple d'amorces borne une région située à l'intérieur du fragment nucléotidique obtenu avec le premier couple d'amorces (et donnera, dans l'exemple du crt K76T, des fragments ayant 134 bdb). D'où le terme de "nested PCR", car ces amorces sont nichées, emboîtées, dans les premières.

#### **IV.11.1.5. Avantages et inconvénients :**

##### **Avantages :**

- La possibilité de tester plusieurs antipaludiques sur les mêmes souches plasmodiales à la fois.



- La possibilité de faire un diagnostic plus précoce de la résistance.
- Pas de problème de biodisponibilité ni de trouble du métabolisme des médicaments.
- Pas de problème de disponibilité des patients

**Inconvénients :**

- Coût très élevé.
- Nécessité d'un matériel lourd et d'un personnel qualifié.
- Conditions rigoureuses de prélèvement et de culture des parasites très difficiles sur le terrain (risque de contamination)
- Difficulté de cultiver certaines souches sauvages.
- Incapacité de déterminer les échecs thérapeutiques.

**IV.11.2. Test *in vivo* :**

Elle consiste à administrer, à un sujet porteur de *Plasmodium falciparum*, la dose ordinairement recommandée de l'antipaludique à tester, et à contrôler la disparition des parasites du sang au bout d'un temps donné. L'évaluation de l'efficacité des schémas thérapeutiques se fait directement avec ces tests. Le test *in vivo* comporte : le test prolongé de 28 jours, le test pratique standard de 7 jours, le test standard de 14 jours, et le test simplifié du C.R.C.P/O.C.C.G.E.

Test standard de l'O.M.S. de 28 jours :

Il consiste à administrer une dose de 25 mg de chloroquine base/kg poids corporel répartie en 3 jours chez un patient présentant une infection monospécifique à *Plasmodium falciparum* avec contrôle de la parasitémie chaque jours durant sept jours, puis à J<sub>14</sub>, à J<sub>21</sub>, et à J<sub>28</sub>. Le suivi se faisait pendant 28 jours

Test standard simplifié de l'O.M.S. de 7 jours :

C'est le même que celui du test de 28 jours sauf que la période du suivi est de 7 jours avec un contrôle de la parasitémie soit au J<sub>7</sub> seulement, soit au J<sub>3</sub> et J<sub>7</sub>.

Test simplifié du C.R.C.P/O.C.C.G.E. :

Il consiste à administrer chez un patient présentant une infection monospécifique à *Plasmodium falciparum*, une dose de 10 mg de

chloroquine base/kg de poids corporel en une seule prise avec un seul contrôle parasitologique à J<sub>7</sub>.

Test standard de l'O.M.S. de 14 jours :

**Principe :** Il consiste à administrer chez un patient une dose de 25 mg de chloroquine base par kilogramme de poids corporel répartie en 3 jours, soit 10 mg par kilogramme le premier jour, 10 mg le deuxième jour, et 5 mg le troisième jour avec contrôle de la parasitémie à J<sub>3</sub>, J<sub>7</sub>, et J<sub>14</sub>. Le test se réalise pendant une période de 14 jours

. Avantages et inconvénients des tests *in vivo* :

**Avantages :**

- Adhésion facile de la population car elle y trouve un intérêt médical immédiat.
- Réalisation beaucoup plus simple et aisée (même par un agent de santé de base).
- Détermination du niveau de la résistance afin d'adopter un schéma thérapeutique adéquat.
- Matériel utilisable simple.
- Ils peuvent fournir des éléments de pharmacovigilance de l'antipaludique utilisé.

**Inconvénients :**

- Fausse résistance liées aux troubles du métabolisme du médicament, au niveau immunitaire du malade, et aux troubles d'absorption du médicament.
- Duré longue pour le diagnostic de la résistance.
- Difficultés de mettre les participants hors d'état de réinfection en zone d'endémie surtout pendant la saison de transmission (épreuve de 28 jours).
- Critères d'inclusion souvent difficiles à mettre en pratique entre autre l'absence de la prise antérieure d'antipaludiques.
- Temps de réalisation assez long (minimum 7 jours).

- Insuffisance liée à la technique microscopique, en particulier la sensibilité, la spécificité, qui sont fonction de la compétence du microscopiste.
- Difficulté pour le test *in vivo* de 7 jours de faire la différence entre le niveau de résistance RI et la sensibilité.

#### IV.11.3. Genotype Resistance Indice (GRI)<sup>28</sup>

C'est une nouvelle méthode qui consiste à déterminer le taux de résistance parasitologique et d'échec thérapeutique à partir du taux de résistance génotypique. Pour cela les auteurs ont mesuré la prévalence parasitologique, d'échec thérapeutique et de celle du *pfcr* K76T de quelques sites du Mali (Mopti, Bandiagara, Kollé) pour calculer le GRI. Ils trouvèrent des GRI stables entre ces sites différents sur le plan épidémiologique et caractéristiques de transmission. Les résultats obtenus seront standardisés pour estimer les taux de résistance parasitologique et d'échec thérapeutique à partir du taux de résistance moléculaire. Le GRI est calculé en divisant la prévalence génotypique (*pfcr* K76T) par la prévalence de la résistance parasitologique.

C'est une méthode qui pourra permettre de déterminer rapidement la prévalence de la résistance parasitologique et d'échec thérapeutique.

Le GRI corrigé est le rapport de la prévalence du génotype (*pfcr*) sur la résistance parasitologique après correction moléculaire sur 28 jours de suivi.

#### IV.12. Diversité génétique 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<sup>29</sup>

La diversité antigénique de *P. falciparum* est le reflet d'un polymorphisme allélique important. Plusieurs études et techniques ont permis de mettre en évidence le polymorphisme allélique, que ce soit par RFLP ou par typage génétique d'isolats des zones d'endémie palustre par PCR ainsi que le séquençage de plusieurs allèles de certains gènes comme MSP1. Chez *P. falciparum*, de nombreux antigènes codés par des gènes en copie unique possèdent un très grand nombre d'allèles, pouvant, parfois, être regroupés en familles alléliques de séquence primaire très différentes (comme MSP1 et MSP2...).

La MSP-1 est de nature polymorphe et plusieurs spécificités ont été mises en évidence au sein d'un même isolat<sup>30</sup>

## **V.Méthodologie :**

### **V.1. Lieu l'étude :**

Pongonon, est un village de 1388 habitants, situé à 785Km au Nord-est du Mali dans le cercle de Koro en 5<sup>ème</sup> Région (figure 7). Le paludisme y est endémique avec une saison de transmission allant de Juillet à Octobre. Le village n'a pas d'électricité pas de système d'adduction d'eau, ni d'infrastructure sanitaire. La population de Pongonon est entièrement Dogon et l'activité principale est l'agriculture. Les habitants vivent dans des maisons en banco à toit rectangulaire ou conique. Le village cohabite avec un hameau Peulh et un hameau Bella situés dans un rayon de 2Km (ces trois entités seront désignées dans le reste de ce document par « Pongonon »).

#### **a. Climat :**

Il est du type sahélien, marqué par deux saisons :

- Une saison pluvieuse qui s'étend de Juin en Août avec un maximum en Juillet. Les pluies sont irrégulières et insuffisantes. La pluviométrie est de 300 – 600mm/ an.
- Une saison sèche qui se subdivise en saison sèche froide (Décembre à Janvier) et chaude (Mars à Mai).



**Figure 7 : Site d'étude (Source : GIS/GPS MRTC) Figure 8 : Site d'étude (Source : GIS/GPS MRTC)**

**b. Hydrographie :**

Le village n'est arrosé que par des marres temporaires qui tarissent pendant la saison sèche. On dénombre environ 5 marres, dont 2 dans le village et les autres y sont à un Km environ.

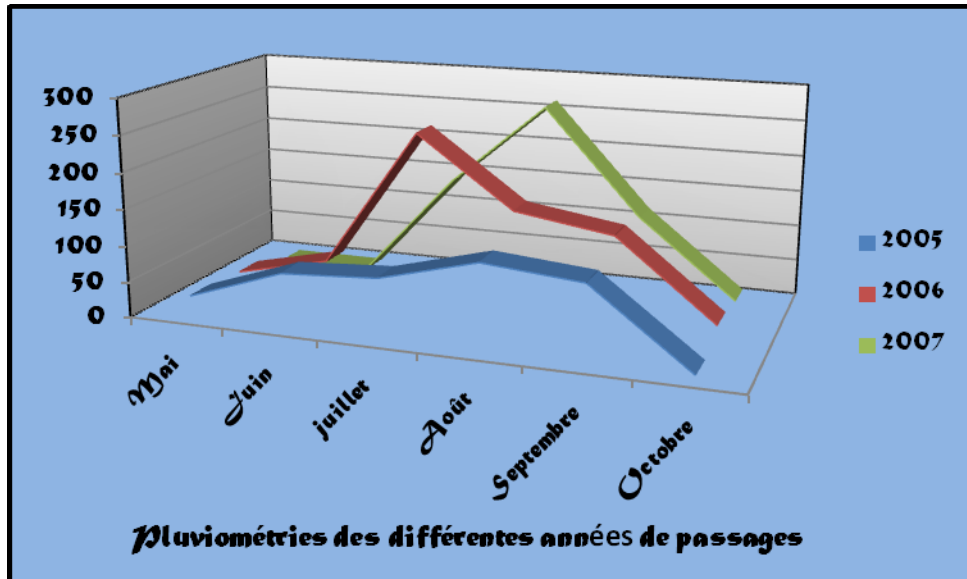


Figure 8 : Pluviométrie de 2005 à 2007 à Pongonon

**c. Végétation**

Le village de Pongonon est peu boisé. La végétation est celle de transition entre la zone sahélienne et la zone soudanienne.

Les forêts sont de type savanes arbustives et forets claires arborescentes.

**V.2. Etudes transversales**

**V.2.1. Passages parasito-cliniques**

**V.2.1.1. Echantillonnage**

La réalisation a nécessité le consentement éclairé des villageois, en procédant à une réunion avec le chef du village assisté de ses conseillers et des chefs de famille. L'étude a porté sur un échantillon formé de tous les enfants âgés de 1 à 16 ans sur les quels la goutte épaisse a été faite. La taille de l'échantillon variait d'un passage à un autre :

Octobre 2005 : 382 enfants

Juin 2006 : 378 enfants

Octobre 2006 : 408 enfants

Juillet 2007 : 409 enfants

### **V.2.1.2. Type et période d'étude**

Nous avons mené des passages transversaux pour évaluer les indices malariologiques chez l'homme pendant les mois suivant : Octobre 2005, Juin 2006, Octobre 2006 et Juillet 2007.

### **V.2.1.3. Technique d'étude**

Le travail s'est déroulé sur le terrain comme suit :

L'équipe était divisée en trois postes ;

**Poste 1** : appelé d'identification qui était composé d'un clinicien et d'un guide du village.

Les numéros d'identification, les filiations (mères, chefs de familles, âges, sexe,) ont été portés sur une carte. Ensuite l'enfant est dirigé vers le poste 2.

**Poste 2** : ou poste clinique

Les variables mesurées étaient la température, le poids, et la rate par un médecin.

L'enfant était ensuite dirigé vers le poste 3.

**Poste 3** : ou poste de prélèvements biologiques

Ce poste était composé de pharmaciens et de biologistes. Après identification, un prélèvement de sang capillaire à la pulpe du troisième ou du quatrième doigt à l'aide d'un vaccinostyle stérile à usage unique a été effectué pour confectionner une goutte épaisse. Les gouttes épaisses étaient colorées après leur séchage à la température ambiante puis classées par ordre croissant dans les paquets et acheminées au Département d'épidémiologie des affections Parasitaires (DEAP) pour la lecture.

## **V.2.2. Passages entomologiques**

### **V.2.2.1. Types de capture**

Deux types de capture ont été organisés : le Spray-catch et la capture sur appât humain.

### V.2.2.2. Capture sur appât humain :

Trois (3) séances de captures nocturnes ont été organisées avec 2 postes de capture par séance. A chaque poste un captureur opérait à l'intérieur et un autre à l'extérieur, de 18h à 00h et de 00h à 6h.

### V.2.2.3. Spray-catch (capture par pyrethrine)

Le Spray-catch a été réalisé une fois par passage dans les habitations humaines, les après-midi entre 14 heures 30mn et 17 heures 30mn. Ceci dans le but d'obtenir le maximum de femelles semi-gravides d'*An. gambiae s.l.*. Toutes les issues étaient bloquées avant l'aspersion de l'insecticide, les objets pouvant être contaminés sont débarrassés. Des draps blancs sont étalés sur le plancher de la chambre avant la pulvérisation. La porte maintenue fermée est reouverte après 10 minutes environ. Les anophèles morts ou moribonds tombés sur les draps sont collectés et mis dans des cryotubes contenant du fixateur de Carnoy (mélange d'1 partie d'acide acétique CH<sub>3</sub>COOH et de 3 parties d'éthanol absolu C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH). Sur chaque cryotube est porté le numéro de la chambre et la date de capture.

Les moustiques du spray-cath sont triés morphologiquement par espèces (*An. funestus* et *An. gambiae s.l.*), puis une répartition suivant leur état de réplétion : jeun, gorgé, semi-gravide et gravide.

Après le tri, un numéro individuel est attribué à chaque moustique à travers une étiquette portant le numéro de la case dans la quelle il a été capturé et son numéro d'identification par rapport à l'ensemble des moustiques récoltés dans la même case.

Quatre (4) séances de Spray-catch ont été organisées en raison de 30 cases prospectées par séance, soit un total de 120 par passage.

Après une répartition selon leur état de réplétion ; les moustiques sont traités comme suit :

#### \* Pour *An. gambiae s.l.*

Les semi-gravides sont disséqués en trois parties : tête-thorax, ovaires et reste de l'abdomen contenant le repas de sang. Chacune de ces parties est conservée dans des microtubes de 250µl contenant du fixateur de carnoy et une étiquette portant le numéro d'identification du moustique entier.

Les têtes-thorax et le repas de sang sont traités à l'E.L.I.S.A. pour estimer respectivement l'indice d'antigène sporozoïtique et les taux d'anthropophile.

Les autres stades (à jeun, gorgés, et gravides) sont disséqués en deux parties : tête-thorax et abdomen.



Les têtes-thorax sont traités à l'E.L.I.S.A. comme pour les semi-gravides, et les abdomens à la P.C.R. pour l'identification d'espèces A (*An. gambiae s.s.*) et B (*An. arabiensis*).

**\* Tous les *An. funestus* sont traités à l'E.L.I.S.A. :**

L'ensemble tête-thorax pour la recherche de l'antigène sporozoïtique ;

Les abdomens des semi-gravides et des gorgés pour l'identification des repas de sang.

**Les paramètres mesurés sont :**

- La fréquence des espèces vectrices rencontrées,
- La densité par case des Anophèles,
- L'agressivité,
- Les taux d'infection,
- Les taux d'anthropophile,
- Les taux de parité,
- Les taux d'inoculation entomologique

### **V.3. Etude longitudinale**

#### **V.3.1. Type d'étude :**

Nous avons réalisé une étude longitudinale prospective du mois d'Octobre 2006 au mois de Janvier 2007 et du mois de Septembre 2007 au mois de Janvier 2008 à Pongonon.

#### **V.3.2. Population d'étude :**

L'étude a concerné les participants atteints de paludisme simple monospécifique à *P. falciparum*, ayant consulté pendant la période d'étude et résidant à Pongonon. Les participants étaient âgés de 6 mois et plus.

#### **V.3.3. Considérations éthiques et déontologiques :**

Les protocoles de recherche des études ont été soumis au comité d'éthique institutionnel de la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Ondoto-stomatologie. La phase clinique a commencé après l'abrobation de ce comité. Sur le terrain, la communauté (autorités administratives, coutumières, les malades ou personnes responsables des malades) a été informée de tous les aspects de l'étude. La participation à l'étude était entièrement volontaire. Aucun participant déclinant de participer à l'étude n'a été inclus. Les participants lettrés ont signé la fiche de consentement volontaire (voir Annexe) et ceux qui sont illettrés y ont apposé leur empreinte digitale. Pour les enfants mineurs, les parents ou les tuteurs ont signé à leur place. Pour les participants incapables de lire la langue française, une traduction du contenu de la fiche du consentement ou de l'assentiment a été faite dans langue de la localité.

### V.3.4. Echantillonnage et taille de l'échantillon

Les résultats préliminaires à Pongonon indiquent un taux de sensibilité de 28% de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine *in vivo* à 28 jours de suivi. Avec une précision de 5% et l'intervalle de confiance à 95% ( $\alpha=5\%$ ). Il nous faut 310 participants pour cette étude. Compte tenu des perdus de vue nous augmentons notre population à 10%, donc un total de 340 participants seront inclus dans notre étude.

### V.3.5. Critères d'inclusion

- Etre résidant à Pongonon depuis au moins 6 mois,
- Résider dans le village de Pongonon durant toute la durée du suivi,
- Etre âgé d'au moins 6 mois,
- Etre capable de recevoir un traitement par voie orale, sans contre indication à la chloroquine,
- Avoir une température axillaire non corrigée comprise entre 37,5°C et 39°C,
- Avoir une goutte épaisse positive monospécifique à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 2000 à 200000 formes asexuées par millimètre cube de sang.
- Avoir le paludisme simple,
- Obtenir le consentement éclairé de chaque participant ou, l'assentiment des parents ou des tuteurs légaux pour les enfants.

### V.3.6. Critères de non-inclusion

N'ont pas été inclus dans notre étude, tous les participants qui ne répondaient pas aux critères d'inclusion ci-dessus mentionnés. Ainsi que les femmes présentant une grossesse patente, malades qui souffrent du paludisme grave et compliqué (neuropaludisme, hypoglycémie, détresse respiratoire, choc hémorragique), les cas d'anémie sévère avec un taux d'hémoglobine  $\leq 5\text{g/dl}$  et les malades présentant une pathologie concomitante sévère.

### V.3.7. Méthodes de collecte des données

Les données ont été collectées au moyen d'un questionnaire individuel standardisé conforme aux objectifs de l'étude (cf. Annexe).

Le test *in vivo* standard de 28 jours de l'OMS 2003 a été utilisé pour évaluer l'efficacité du traitement avec la chloroquine (RCPA, ETP, ECT et EPT).

### V.3.8. Données cliniques et traitements

Tous les participants ont bénéficié d'un examen clinique complet.

L'examen clinique initial a comporté : L'accueil, l'interrogatoire, la palpation et l'auscultation, une pesée, une prise de la température axillaire non corrigée, la tension artérielle chez les adultes la coloration des conjonctives, ainsi que la recherche d'une splénomégalie chez les enfants selon la classification de Hackett...

Tous les traitements ont été administrés par l'équipe de recherche.

Tous les participants inclus ont été traités par la chloroquine à une dose standard de 25mg/Kg de poids corporel répartie sur trois jours (10mg/Kg les 1<sup>er</sup> et les 2<sup>ème</sup> jours et 5mg/Kg le 3<sup>ème</sup> jour).

Après administration du médicament, tous les participants ont été observés pendant au moins 30 minutes pour s'assurer qu'ils ne font pas de réactions indésirables et aussi pour vérifier qu'ils ne vomissent pas le médicament.

Les participants qui ont vomis pendant le temps d'observation ont bénéficié du renouvellement de la même dose du médicament. La fièvre a été traitée avec un antipyrétique.

#### **- Gestions des effets secondaires**

Les participants ont été suivis pendant 28 jours pour détecter un éventuel développement d'effets indésirables. Tous les effets indésirables ont été rapportés sur un formulaire approprié.

#### **V.3.9. Données biologiques**

Elles ont été collectées au poste de biologie à partir de prélèvements directs de sang capillaires et de sang veineux sur EDTA par un biologiste. Ces prélèvements ont servi à la confection de :

- Frottis épais
- Confettis
- Obtention du culot globulaire et sérum
- Mesure du taux d'hémoglobine.

#### **V.3.10. Déroulement de l'enquête**

##### **V.3.10.1. Suivi des participants :**

Le premier jour du suivi étant le J0, les participants ont été activement suivis aux jours J1, J2, J3, J7, J14, J21, J28 [voir **tableau I**]. En outre, de part la présence permanente des cliniciens dans le village, les participants ont bénéficiés d'un suivi passif 24H/jour. Au cours des suivis actifs, une goutte épaisse a été faite, des confettis ont été collectés ainsi qu'un examen

physique pour détecter d'éventuels symptômes persistants ou nouveaux. Au J0, J14, J28 quelques millilitres de sang ont été collectés sur anticoagulant.

Les cas de parasitémies persistantes ont été promptement évalués par le médecin et soumis à un traitement avec les CTA (Combinaison Thérapeutique à base des dérivés d'Artemisinine). Les participants qui ont développé un paludisme sévère ont été admis au Centre de santé Référence (CSRF) de Koro et pris en charge par l'équipe.

Les prélèvements sont acheminés quotidiennement sur notre laboratoire de terrain de Bandiagara où la cryopreservation des parasites et la séparation des lymphocytes ont été faites. Les échantillons sont transférés Bamako deux fois par mois.

**Tableau I: calendrier de suivi des participants malades**

Jours d'étude	J0	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28
ATCD	X							
Age/Pds/Taille/Sexe	X							
Examen clinique	X	X	X	X	X	X	X	X
Examen parasitologique (GE)	X		X	X	X	X	X	X
Prélèvements veineux	X					X		X
Hémoglobine	X					X		X
Confection des confettis	X			X	X	X	X	X

#### V.3.10.2. Critères de jugement de l'efficacité du traitement :

L'efficacité thérapeutique de la chloroquine sur le *P.falciparum* a été appréciée selon la classification de l'OMS de 28 jours<sup>33</sup>.

- ❖ **Echec thérapeutique précoce (ETP)** : Le malade présente l'un des signes suivants :
  1. Apparition des signes de danger ou de paludisme grave les jours 1, 2 ou 3, en présence d'une parasitémie.
  2. parasitémie au jour 2 supérieure à celle de jour 0 quelque soit la température axillaire.
  3. Parasitémie au jour 3 et température axillaire supérieure ou égale 37,5°C.
  4. Présence d'une Parasitémie au jour 3 en l'absence de fièvre dépassant d'au moins 25% celle du jour 0.

- ❖ **Echec clinique tardif (ECT)** :

Le malade présente l'un des signes suivants :

1. Apparition de signe de danger ou du paludisme grave après le jour 3, en présence d'une parasitémie, en l'absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique Précoce.
  2. Présence d'une parasitémie et température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C un jour quelconque entre le jour 4 et le jour 28, en l'absence de tout critère Préalable d'échec thérapeutique précoce.
- ❖ **Echec parasitologique tardif (EPT)** : Présence d'une parasitémie Entre le jour 7 et le jour 28 et la température axillaire < 37,5°C en l'absence de tout Critère préalable d'échec thérapeutique précoce ou d'échec clinique tardif.
  - ❖ **Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (ECPA)** : Absence de parasitémie au jour 28 quelque soit la température axillaire, en l'absence de tout critère d'échec thérapeutique précoce ou d'échec clinique tardif.

### V.3.11. Technique de laboratoire

#### V.3.11.1. Examens parasitologiques

La recherche de plasmodies a été effectuée par un prélèvement de sang capillaire à la pulpe du doigt à l'aide d'un vaccinostyle stérile à usage unique pour confectionner un frottis épais et confettis (OMS 1994).

Les lames de frottis épais ont été traitées selon les méthodes décrites dans « Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme, partie 1,» [OMS, 1994]. La lecture des lames a été faite à l'aide d'un microscope optique binoculaire à la lumière électrique par l'équipe de recherche sur place.

La parasitémie a été évaluée à J0 et pour le suivi selon la formule suivant :

Parasitémie par microlitre de sang = (nombre de parasites asexués / 300 leucocytes) X 7500.

Une lame a été classée négative lorsque l'examen de 100 champs microscopiques du frottis épais n'a révélé aucune forme asexuée de *P. falciparum*. La gamtétocytémie à compter sur 1000 leucocytes de *P. falciparum* indépendamment a été notée.

**Contrôle de qualité :** dix pour cent des lames ont été systématiquement réexaminées pour le contrôle de qualité des données parasitologiques par un microscopiste expérimenté de notre département, non impliqué dans l'étude.

### V.3.11.2. Examen hématologique

L'examen hématologique a consisté à mesurer le taux d'hémoglobine à l'aide de l'Hemocue<sup>R</sup>. Le sang total est placé dans une microcuvette et un photomètre portable détermine le taux de l'hémoglobine.

Les microcuvettes à usage unique contiennent trois réactifs sous forme déshydratées qui convertissent l'hémoglobine en méthémoglobinazide (HiN3) :

1. Le désoxycholate de sodium hémolyse les cellules sanguines,
2. Le nitrite de sodium convertit l'hémoglobine (fer ferreux) en méthémoglobine (fer ferrique),
3. L'azide de sodium convertit la méthémoglobine en méthémoglobinazide (HiN3).

Le sang total est placé dans la microcuvette par action capillaire et insérée dans le photomètre de l'Hemocue. La lumière passe à travers l'échantillon et l'absorption de la méthémoglobinazide est mesurée à deux longueurs d'ondes (570 nm et 880 nm) pour compenser de façon automatique la turbidité (due à la lipidémie et la leucocytose). Les résultats sont fournis après 45 à 60 secondes en g/l sur la fenêtre numérique.

### V.3.11.3. Etude de biologie moléculaire :

Les études moléculaires ont été faites dans les locaux de l'unité d'épidémiologie de résistance aux antipaludiques (MEDRU) du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP). Il s'agissait d'identifier le gène de résistance à la chloroquine (*pfcr*t K76T) et les gènes polymorphes (MSP1, MSP2 et le microsatellite CA1) chez les parasites.

Le matériel biologique qui a servi à faire l'analyse moléculaire est l'ADN extrait à partir des confettis de J<sub>0</sub> pour le gène *pfcr*. Pour déterminer les gènes polymorphes nous avons extrait les ADN des confettis de J<sub>0</sub> et ceux des jours d'échec parasitologique tardif du même participant.

Le principe de la technique était d'utiliser de manière répétitive l'une des propriétés de l'ADN polymérase, celle de pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'une amorce.

Les réactifs de la PCR sont essentiellement l'ADN plasmodial, deux amorces sens et anti-sens, une enzyme (la Taq polymérase) et les 4 nucléotides (dGTP, dTTP, dTCP, dTAP). Il s'agit d'une réaction successive d'un certain nombre de cycles comportant chacun trois étapes : une dénaturation, une hybridation et une élongation.

### **Mode opératoire :**

#### **a. Extraction de l'ADN plasmodial :**

##### **Matériel et réactif :**

Blouse, paire de gants, paire de ciseaux, papier hygiénique, confettis, marqueur indélébile, racks, tubes eppendorfs, Becher, poubelle, pipette (100, 200, 1000), embout (100, 200, 1000), méthanol, hotte, eau de ionisée, plaque chauffante, thermomètre, agitateur, congélateur.

##### **Mode opératoire :**

L'ADN plasmodial a été extrait à l'aide du méthanol et de l'eau, à 95°C. Cette extraction a consisté à découper approximativement 3mm<sup>2</sup> de confettis imprégnés de sang, le transférer dans un micro tube, puis ajouter 50-100µl de méthanol dans le tube. Laisser incubé à la température ambiante pendant 15 mn. Le papier est complètement immergé dans le méthanol. Jeter le méthanol, sécher les morceaux de confettis sous vide ou à l'air libre.

Après séchage, ajouter dans chaque tube 50-75µl d'eau distillée, puis chauffer pendant 15mn entre 95-100°C. Agiter toutes les 5mn au cours du chauffage pour faciliter l'extraction de l'ADN plasmodial. Le produit obtenu était utilisé directement pour la PCR ou gardé à -20°C.

#### **b. Amplification de l'ADN plasmodial :**

##### **- Matériels :**

Blouses, gants, marqueur indélébile, tubes de 200 ou de 500 µl, tubes de 1500 µl, pipettes (2, 10, 20, 100, 200, et 1000 µl), embout (2, 10, 20, 100, 200 et 1000 µl), racks, portoirs pour pipette, thermocycleur, poubelle.



**- Réactifs et leur préparation :**

**PCR Buffer :** C'est une solution tampon, concentrée à 10X fournie par les compagnies commerciales avec ou sans magnésium (Mg<sup>2++</sup>)

**dNTP :** (désoxi Nucléotide Tri Phosphate)

La concentration finale était de 200µM par réaction.

Une solution de travail équimolaire des quatre dNTPs à 2mM soit 10X de la solution finale était préparée à partir d'un stock de 100mM.

**Amorce :**

Les amorces viennent sous forme de poudre lyophilisée. Le stock de travail de 100µM était préparé à partir de cette poudre par une résuspension dans du tris EDTA (TE) après la détermination de la densité optique

**-Technique :**

**Première amplification :**

- Identifier les tubes de 200 ou 500 µl conformément aux numéros des confettis à traiter
- Préparer le Master MIX dans un tube de 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon les tableaux 1, 2 et 3
- Repartir dans chaque tube identifié 24µl de Master MIX
- Ajouter 1 µl d'ADN extrait au méthanol dans chaque tube correspondant
- Centrifuger brièvement les tubes
- Placer les tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié (Tableaux 4, 5 et 6)
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose (1,5% pour msp1 et 1,8% pour msp2) avant de passer à la deuxième amplification (cf. MON gel d'agarose).
- Faire la photo du gel
- Interpréter la photo (présence d'une ou de plusieurs bandes).

Amorces de la 1ere amplification :

**MSP1 :**

O1 : CACATGAAAGTTATCAAGAACTTGTC

O2 : GTACGTCTAATTCATTTGCACG

**MSP2 :**

S2 : GAAGGTAATTAACATTGTC

S3: GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG

**Tableau II: Mélange réactionnel pour un volume final de 25  $\mu$ L (MSP1)**

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume ( $\mu$ L)
Buffer/MgCl <sub>2</sub>	5X/7,5 mM	1X/1,5 mM	5
dNTPs	10X/2 mM	1X/200 $\mu$ M	2.5
Amorces (O1 et O2)	100X/10 $\mu$ M	1X/100 nM	0.25
Taq Polymérase	5U/ $\mu$ L	0.025U	0.125
Eau pour PCR	-	-	16.125
<b>Total</b>			<b>24</b>

Ajouter dans chaque tube 1  $\mu$ L de l'ADN extrait au méthanol

**Tableau III: Mélange réactionnel pour un volume final de 25  $\mu$ L (MSP2)**

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume ( $\mu$ L)
Buffer/MgCl <sub>2</sub>	5X/7,5 mM	1X/1,5 mM	5
dNTPs	10X/2 mM	1X/200 $\mu$ M	2.5
Amorces (S2 et S3)	100X/10 $\mu$ M	1X/100nM	0.25
Taq Polymérase	5U/ $\mu$ L	0.025U	0.125
Eau pour PCR			16.125

---

---

Total	24
-------	----

---

---

**Ajouter dans chaque tube 1  $\mu$ L de l'ADN extrait au méthanol**

## **DEUXIEME AMPLIFICATION**

- Identifier les tubes de 200 ou 500  $\mu$ l conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter
- Préparer le Master MIX dans un tube 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon les tableaux
- Repartir dans chaque tube identifié 24 $\mu$ l de Master MIX
- Ajouter un volume du produit de la 1<sup>ère</sup> amplification dans chaque tube correspondant en fonction de la présence de bande (0,5 $\mu$ l) ou des traînées (0,1 $\mu$ l)
- Centrifuger brièvement les tubes, fermer et placer les dans le thermocycleur pour l'amplification selon le programme approprié
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose : 1,5% pour msp1 et 1,8% pour msp2 (cf. MON gel d'agarose).
- Faire la photo du gel
- Interpréter la photo

### **Amorces de la 2ème amplification**

#### **MSP1 : [500 pb]**

N1 : GCAGTATTGACAGGTTATGG

N2 : GATTGAAAGGTATTTGAC

#### **MSP2 : [500 pb]**

S1 : GAGTATAAGGAGAAGTATG

S4 : CTAGAACCATGCATATGTCC

### **Tableau IV : Mélange réactionnel pour un volume final de 25 $\mu$ L (MSP1)**

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (μL)
Buffer/MgCl <sub>2</sub>	5X/17,5 mM	1X/3,5 mM	5
dNTPs	2 mM	200μM	2.5
Couple d'amorces N1N2	10 μM	100nM	0.25
Taq Polymerase	5U/μL	0.05U	0.125
Eau pour PCR			16.625
Total			24.5

Ajouter 0.5 μL du produit PCR de la 1<sup>ère</sup> amplification

**Tableau V : Mélange réactionnel pour un volume final de 25 µl (MSP2)**

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL)
Buffer/MgCl <sub>2</sub>	5X/17,5 mM	1X/3,5 mM	5
dNTPs	2 mM	200µM	2.5
Couple d'amorces S1S4	10 µM	100nM	0.25
Taq Polymerase	5U/µL	0.05U	0.125
Eau pour PCR			16.625
<b>Total</b>			<b>24.5</b>

Ajouter 0.5 µl du produit PCR de la première amplification

➤ Différentes programmes d'amplification :

**Tableau VI : MSP1- PCR1 et PCR2**

<i>Etapas</i>	<b>Température</b>	<b>Temps</b>
Dénaturation initiale	94 °C	3 min
Dénaturation	94 °C	25s
Hybridation	50 °C	35 s
Elongation	68 °C	2 min 30 s
30 cycles à partir de la 2 <sup>ème</sup> étape		
Elongation finale	72 °C	3 min
Conservation	4 °C	∞

**Tableau VII : MSP2-PCR1**

<i>Étapes</i>	<b>Température</b>	<b>Temps</b>
Dénaturation initiale	94 °C	3 min
Dénaturation	94 °C	25 s
Hybridation	42 °C	60 s
Elongation	65 °C	2 min
30 cycles à partir de la 2eme étape		
Elongation finale	72 °C	3 min
Conservation	4 °C	∞

**Tableau VIII : MSP2- PCR2**

<i>Étapes</i>	<b>Température</b>	<b>Temps</b>
Dénaturation initiale	94 °C	3 min
Dénaturation	94 °C	25 s
Hybridation	50 °C	60 s
Elongation	70 °C	2 min
30 cycles à partir de la 2eme étape		
Elongation finale	72 °C	3 min
Conservation	4 °C	∞

**Microsatellites :**

Première amplification :

Amorces

Microsatellite Ca1 :

- ca1-1L : GCTGTAAAACGTGAACAACAAA
- Ca1-1R : CAATTCTGCTTCAGTTGGATT



**Tableau IX : Mélange réactionnel pour un volume final de 25  $\mu$ L**

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume ( $\mu$ L)
Buffer/MgCl <sub>2</sub>	5X/17,5 mM	1X/3,5 mM	5
dNTPs	2 mM	200 $\mu$ M	2.5
Couple d'amorces Ca1-1R Ca1-1L	10 $\mu$ M	100nM	0.25
Taq Polymerase	5U/ $\mu$ L	0.05U	0.125
Eau pour PCR			16.625
<b>Total</b>			<b>24</b>

Ajouter 1  $\mu$ L de l'extrait d'ADN par tube.

**Tableau X : Programme Microsatellite PCR1**

Etapes	Températures	Temps
Dénaturation initiale	95°C	5 min
Dénaturation	92°C	30 s
Hybridation	45°C	30 s
Elongation	65°C	30 s
45 cycles		
Elongation finale	65°C	5 min
Conservation	4°C	∞

**Deuxième amplification :**

. Amorces :

Microsatellite Ca1 (264pb) :

- Ca1- L : ATTATGAACAATTCAGAC
- Ca1- R : GTTGTTATAGCTAATGAG

**Tableau XI : Mélange réactionnel pour un volume final de 25 µL**

**Tableau XI** : Mélange réactionnel pour un volume final de 25  $\mu$ L

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume ( $\mu$ L)
Buffer/MgCl <sub>2</sub>	5X/17,5 mM	1X/3,5 mM	5
dNTPs	2 mM	200 $\mu$ M	2.5
Couple d'amorces Ca1-R Ca1-L	10 $\mu$ M	100nM	0.25
Taq Polymerase	5U/ $\mu$ L	0.05U	0.125
Eau pour PCR			16.625
Total			24.5

Ajouter 0.5  $\mu$ L de l'extrait d'ADN par tube.

**Tableau XII : Programme Microsatellite PCR1**

Dénaturation initiale	95°C	5 min
Dénaturation	92°C	30 s
Hybridation	45°C	30 s
Elongation	65°C	30 s
45 cycles		
Elongation finale	65°C	5min
Conservation	4°C	∞

**Gène Pfert K76T :**

**Amorces de la première amplification**

P1 : CCGTTAATAATAAATACACGCAG

P2 : CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACC

**Amorces de la deuxième amplification**

D1 : TGTGCTCATGTGTTTAAACTT

D2 : CAAAACCTATAGTTACCATTTTG

**Tableau XIII : Mélange réactionnel pour la première amplification pour un volume final de 25µl par tube**

<b>Réactifs</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Volume (µL)</b>
H <sub>2</sub> O		12,125
5XPCRbuffer 2,5Mm	1X	5
10XdNTP'S 0,2mM	1X	2,5
100X Amorces P1+ P2	0,1X	0.25
Taq polymérase	0.05	0.125
<b>Total</b>		20

Ajouter 5µl de l'ADN plasmodial dans chaque tube contenant déjà 20µl du mélange réactionnel.

**Tableau XIV : Mélange réactionnel pour la deuxième amplification pour un volume final de 25µl par tube**

<b>Réactifs</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Volume (µL)</b>
H <sub>2</sub> O		16,125
5XPCRbuffer 2,5Mm	1X	5
10XdNTP'S 0,5mM	1X	2,5
100X Amorces D1+ D2	0,1X	0.25
Taq polymérase	0.05	0.125
<b>Total</b>		24

Ajouter 1µl du produit de la première amplification dans chaque tube contenant 24µl du mélange réactionnel.

**Tableau XV : Mélange réactionnel pour la digestion pour un volume de 15 $\mu$ l**

<b>Réactifs</b>	<b>Volumes réactionnels (<math>\mu</math>l)</b>
5X BUFFER N°4	2
BSA	0,2
ENZYME (Apo1)	0,25
H2O	12,55
TOTAL	15

**Tableau XVI : Programme de la première amplification**

Etapes	Températures	Temps
Dénaturation initiale	94°C	30mn
Dénaturation	94° C	30s
Hybridation	60°C	30s
Extension	50° C	1mn
45 cycles		
Extension finale	60°C	3mn
Conservation	4°C	∞



**Tableau XVII : Programme de la deuxième amplification**

Etapes	Températures	Temps
Dénaturation initiale	95°C	5 mn
Dénaturation	92°C	30 s
Hybridation	48°C	30 s
Extension	65°C	1 mn
25-30 cycles		
Extension finale	65°C	3 mn
Conserver	4°C	∞

**Tableau XVIII : Programme de la digestion**

Etapes	Températures	Temps
Digestion	50°C	6 H
Conserver	4°C	∞

**Révélation de l'ADN à la photographie :**

**Matériels :** blouse, paire de gant, balance analytique (peser des produits), herlmeiller, la spatule, le four à microonde, pipette 20 µl, embout 20 µl, le moule, le scotch, le peigne, le back de migration, le générateur, film de laboratoire (para film® M), la chambre à UV (ultra violet), l'ordinateur, l'imprimante.

**Réactifs et leur préparation pour la révélation de l'ADN :**

**TBE (Tris Borate d'EDTA) :**

Ce sont des poudres à dissoudre dans de l'eau dé ionisée. Nous dissolvons le TBE (Tris ase (89mM) = 108 g, Acide borique (89Mm) = 55 g, EDTA (2mM) = 0,74 g) dans 1l d'eau dé ionisée pour obtenir un stock de travail. Cette solution est à 10 X. La solution finale utilisée est de 0,5X.

❖ **Solution de migration :**

Elle était constituée du TBE à une concentration 0,5X.

**Les colorants de migration :** appelés ' dye'. Le bleu de bromophénol (BB) et le xylène (xc) : ce sont des colorants qui permettent de suivre la migration sur le gel et de maintenir le produit de migration, assez longtemps dans les puits en augmentant les poids

**Le bleu de bromophénol (BB) :** constitué du glycérol 35ml, d'eau dé ionisée 15ml et du bleu de bromophénol 0,125 g.

**Le xylène :** est constitué du glycérol 35ml, d'eau dé ionisée 15ml et du xylène 0,125g.

**Marqueur de poids moléculaire (PM) :**

Il constitue la solution de référence et sa dilution était faite dans du dye et de l'eau dé ionisée. A un volume de marqueur étaient ajouté un volume de dye et 9 volumes d'eau dé ionisée et la solution prête pour l'usage. Il joue essentiellement deux rôles ; celui de chromophore et celui de témoin. En effet, le dye augmente d'une part le poids de l'ADN (dérivatisation) et d'autre part permet de suivre l'évolution l'électrophorèse.

❖ **Gel de migration :**

Il est fait à partir de 2 grammes de poudre d'agarose dissoute dans 100ml de TBE à 0,5X. La solution est ensuite chauffée dans un four à microonde pendant 3 mn,

Permettant ainsi la dissolution complète de l'agarose. Après le chauffage, on y ajoute du bromure d'éthidium 3µl, puis le gel est coulé dans un back de migration contenant les peignes. Au bout de 30 à 60mn, le gel est prêt à être utilisé pour la migration.

**Le bromure d'éthidium :** c'est un produit qui va s'intercaler entre les brins d'ADN et les rend fluorescent à la lumière ultra violet.

❖ **Interprétation des résultats MSP1, MSP2 et CA 1**

L'interprétation de la photographie du gel tient compte des conditions suivantes :

- 1- Conformité de la taille du produit de la deuxième amplification par rapport à celle attendue
- 2- Taille du produit de la deuxième amplification : (400 et 600pb pour msp1)
- 3- Taille du produit de la deuxième amplification : (400 et 700pb pour msp2)
- 5- L'absence de bandes au niveau des contrôles négatifs.
- 6- Les échantillons présentant des bandes de même taille sont considérées comme identiques
- 7- Les échantillons présentant des bandes de taille différentes sont non identiques
- 8- Les échantillons présentant plusieurs bandes sont considérés comme mixtes

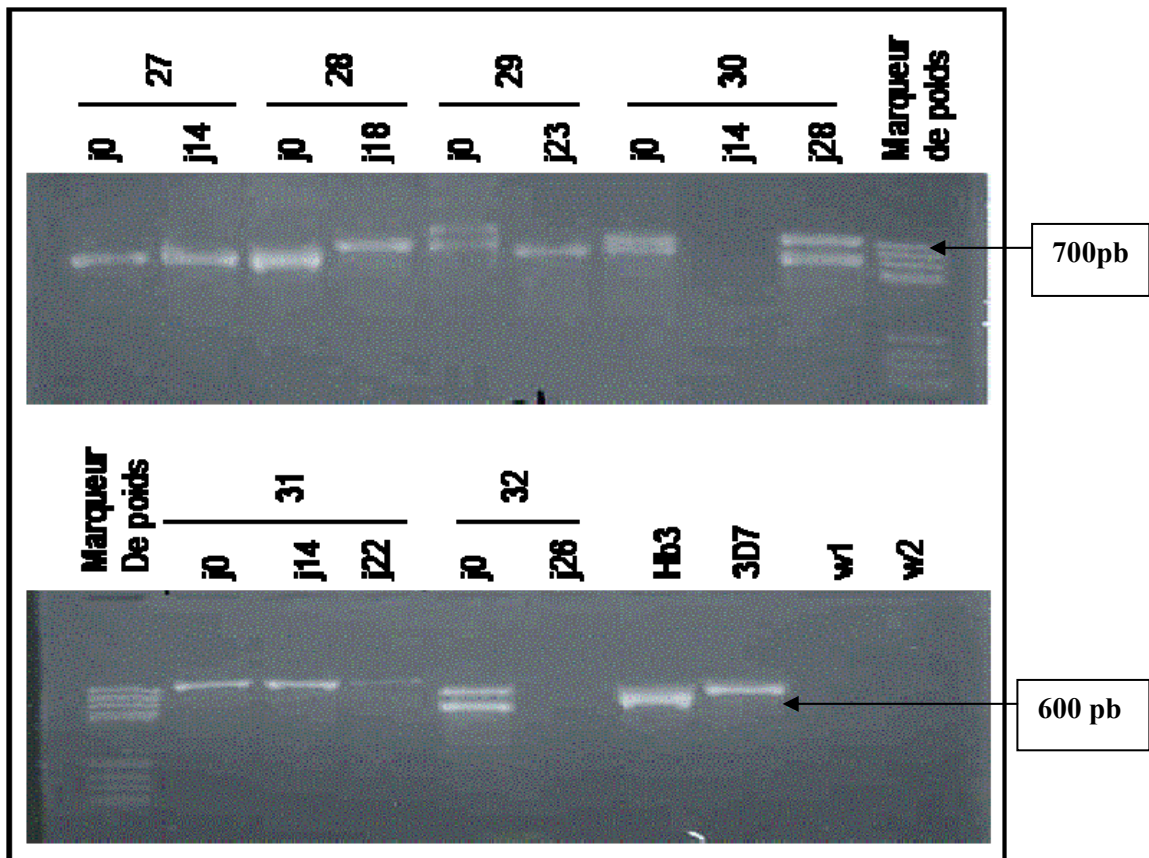


Figure 9: Photo gel MSP2

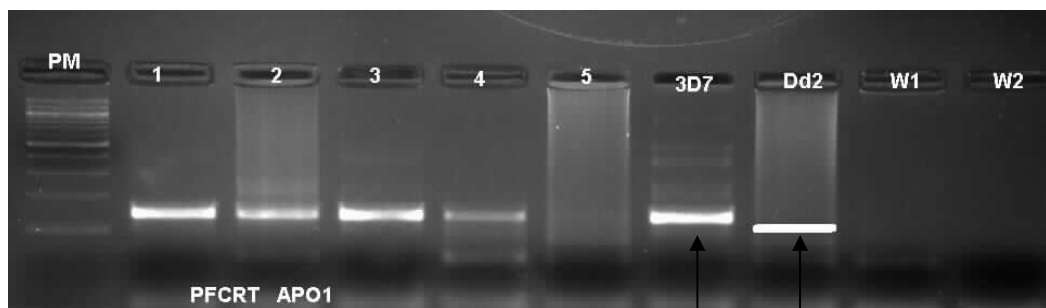
❖ **Interprétation des résultats de *pfert*- K76T**

Témoin sensible : 100 pdb

Témoin résistant : 134 pdb

Les bandes qui auront la même taille que le témoin sensible correspondent aux souches de *P. falciparum* sensibles à la chloroquine. En revanche celles qui auront la même taille que le témoin résistant correspondent aux souches résistantes à la chloroquine.

Les bandes qui apparaissent à la fois au niveau des deux témoins correspondent aux souches mixtes.



**Figure 10 : Photo d'un gel *pfert***

**Report des résultats**

Labeller et reporter scrupuleusement les résultats dans un registre

**Limites de la procédure :**

Cette technique ne permet pas de faire la distinction entre deux bandes ayant quelques paires de bases de différence.

## **VI. Analyse des données :**

Les données ont été saisies dans une base de données Excel<sup>®</sup> et analysées à l'aide du logiciel SPSS 11.0. Le test de  $\chi^2$  avec la correction de continuité de Yates a été utilisé pour comparer deux proportions, dans les cas de petits échantillons par le test exact de Fisher.

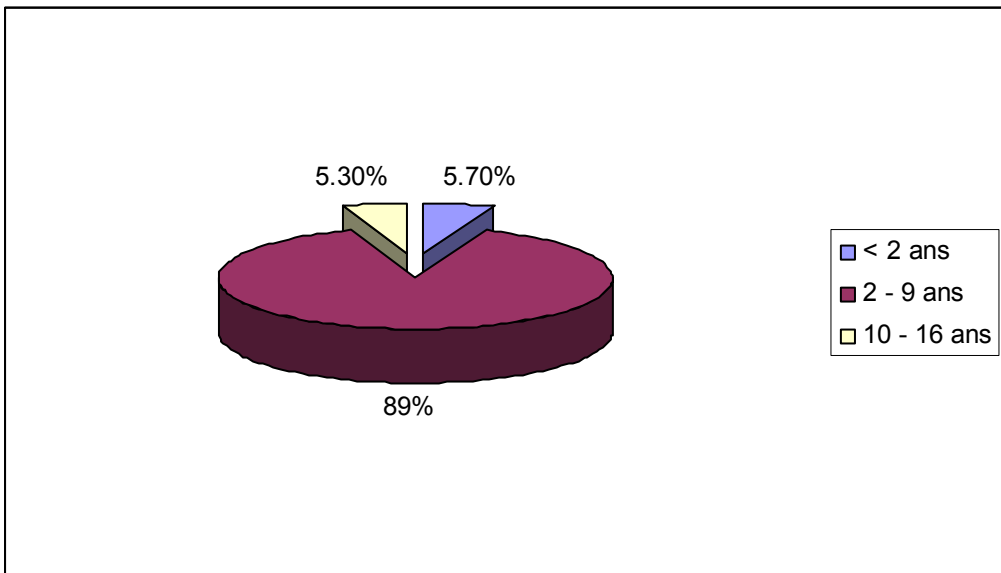
## VII.Résultats :

### VII.1. Résultats des passages transversaux :

#### VII.1.1. Passages parasito-cliniques

##### VII.1.1.1. Caractéristiques socio-démographiques

Les enfants de 2 à 9 ans étaient les plus représentés sur cette figure avec 89%. Les enfants de moins de 2 ans et ceux de 10 à 16 ans étaient comparables avec respectivement 5,3% et 5,7%.



**Figure 11 : Diagramme montrant la répartition de la population par groupe d'âge**

### VII.1.1.2. Indicateurs paludométriques :

**Tableau XIX : Indice plasmodique, indice gamétocytaire et indice splénique**

L'indice plasmodique moyen était de 52,1%. Les indices spléniques et gamétocytaires étaient de 7,4% et 11,2% respectivement.

<b>Indices</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>Plasmodique</b>	802	52,1%
<b>Splénique</b>	114	7,4%
<b>Gamétocytaire</b>	172	11,2%

**Tableau XX : Indices plasmodique, gamétocytaire et splénique par passage**

Les indices plasmodiques étaient plus élevés pendant les mois d'Octobre 2005 et 2006 avec respectivement 58,5% et 80,3%. La différence statistique était hautement significative entre ces deux mois ( $P < 0,01$ ). L'indice plasmodique n'était pas statistiquement différent entre Juin 2006 et juillet 2007 ( $P > 0,05$ ).

L'indice gamétocytaire le plus élevé (13%) a été observé en Octobre 2006, le plus faible (3,2%) en Juin 2006.

Les indices spléniques étaient plus élevés dans les mois d'Octobre 2005 et 2006 avec respectivement 16,5% et 21%.

Indices Période	Plasmodique		Gamétocytaire		Splénique		Effectifs (+)
	N	n1(%)	N	n2( %)	N	n3(%)	
Octobre 2005	367	214(58,3)	383	28(7,3)	370	61(16,5)	303
Juin 2006	442	138(31,2)	375	12(3,2)	375	18 (4,8)	168
Octobre 2006	391	314(80,3)	408	53(13)	395	83(21)	450
Juillet 2007	404	156(38,6)	404	21(5,2)	400	10(2,5)	187



**Tableau XXI : Indices plasmodiques gamétocytiques et spléniques par groupe d'âge**

L'indice plasmodique n'était pas statistiquement différent entre les groupes d'âges ( $p > 0,05$ ).

L'indice gamétocytique diminuait au fur et à mesure que l'âge augmentait (10,%, 7,6% et 2,3% respectivement < 2 ans, 2-9 ans et 10-16 ans, sans différence statistiquement significative entre les groupes d'âges ( $p > 0,05$ ).

L'indice splénique était statistiquement différent entre le groupe de 2 – 9 ans et celui de 10 – 16 ans ( $p < 0,05$ ).

Indices \ Groupe d'âge	< 2 ans		2-9 ans		10-16 ans	
	N	n1(%)	N	n2(%)	N	n3(%)
<b>Plasmodique</b>	77	41(52,6)	1373	714(50,9)	86	46(51,7)
<b>Gamétocytique</b>	78	8(10,3)	1370	104(7,6)	86	2 (2,3)
<b>Splénique</b>	76	41(5,3)	1373	164(11,9)	85	4(4,7)

**Tableau XXII : Prévalence des espèces plasmodiales par période de passage**

*P. falciparum* et *P. malariae* étaient retrouvés pendant les différents passages Octobre 2005 (96,7%, 2,8%), Juin 2005 (98,3%, 1,7%), Octobre 2006 (95,2, 4,8%) et Juillet 2007 (93,6%, 1,9%). Alors que *P. ovale* n'a été retrouvé qu'en Octobre 2005 et Juillet 2007.

*P. falciparum* était l'espèce prévalente avec un taux moyen de 96%.

Espèces Période	P.F		P.M		P.O	
	n1	%	n2	%	n3	%
<b>oct-05</b>	207	96,7	6	2,8	1	0,5
<b>juin-06</b>	116	98,3	2	1,7	0	0
<b>oct-06</b>	299	95,2	15	4,8	0	0
<b>juil-07</b>	146	93,6	3	1,9	7	4,5
<b>Moyenne</b>	192	96	7	3	2	1

**P.F** : *Plasmodium falciparum* **PM** : *Plasmodium malariae* **PO** : *Plasmodium ovale*

**VII.1.2. Passages entomologiques**

**Tableau XXIII : Fréquence des vecteurs du paludisme à Pongonon**

*An. gambiae.s.l* et *An. funestus* étaient les vecteurs du Paludisme capturés à Pongonon. La prédominance d'*An. gambiae.s.l* (96 % ; n=271/282) par rapport à *An. funestus* (4% ; n=11/282) à été constatée pour l'ensemble des deux périodes d'enquête.

Espèces Périodes	<i>An. gambiae s.l</i>		<i>An. funestus</i>		Total
	N	%	N	%	
<b>Oct-2005</b>	<b>267</b>	<b>96</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>278</b>
<b>Juin2006</b>	<b>4</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>	<b>4</b>
<b>Total</b>	<b>271</b>	<b>96</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>282</b>

**Tableau XXIV : Densité moyenne mensuelle par case d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus* à Pongonon après spray catch pendant les mois d'octobre 2005 et juin 2006**

La densité moyenne des anophèles était plus élevée en Octobre qu'en Juin pour *An. gambiae s.l* et *An. funestus*, respectivement (2,23 ; 0,03) et (0,1 ; 0,05) moustiques par cases et par nuit.

Espèces	<i>An. gambiae</i>			<i>An. funestus</i>		
	n1	NCV	Densité	n2	NCV	Densité
oct-05	267	120	2,23	11	120	0,1
juin-06	4	120	0,03	0	120	0

n : nombre de moustique ; NCV : nombre de cases visitées ;

**Tableau XXV : Agressivité moyenne mensuelle d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus* à Pongonon après spray catch pendant les mois d'octobre 2005 et juin 2006**

A Pongonon l'agressivité par mois a été de 8,6 piqûres pour *An. gambiae s.l* et nulle pour *An. funestus* au mois d'Octobre. L'agressivité a été nulle au mois de Juin et pour *An. gambiae* et pour *An.funestus*

Mois	<i>An gambiae s.l</i>			<i>An. funestus</i>		
	N. Dorm	Gor +s-gr	m.a	N. Dorm	Gor + s-gr	m.a
oct-05	515	147	8,6	515	6	0,3 0
juin-06	509	0	0	509	0	

N.Dorm : nombre de dormeur ; Gor + S-gr : gorgés + semigravide; m.a: agressivité

**Tableau XXVI : Taux d'anthropophilie pour *An. gambiae s.l.* et *An. funestus* à Pongonon pendant les mois d'octobre 2005 et juin 2006**

*An. gambiae s.l.* avait une forte préférence pour l'homme (90%). Le seul moustique d'*An. funestus* traité était également anthropophile.

Mois	<i>An. gambiae s.l.</i>			<i>An. funestus</i>	
	Traité	Positif	Anthropophilie (%)	Traité	Positif
oct-05	103	93	90	1	1
juin-06	0	0	0	0	0
Total	103	93	90	1	1

**Oct-05 :** Octobre 2005

**Tableau XXVII : Taux d'Infection (IAS) à *Plasmodium falciparum* pour *An. gambiae s.l.* et *An. funestus* à Pongonon en octobre 2005 et juin 2006**

Le taux d'infection chez *An. gambiae s.l.* était de 8,6% en Octobre, nul en Juin et 11 spécimens d'*An. funestus* étaient négatifs.

Mois	<i>An. gambiae s. l</i>			<i>An. funestus</i>		
	Traité	Positif	IAS en %	Traité	Positif	IAS en %
oct-05	292	25	8,6	11	0	0
juin-06	4	0	0	0	0	0
Total	296	25	8,5	11	0	0

**Tableau XXVIII : Taux d'Inoculation Entomologique mensuel (TIE) à *Plasmodium falciparum* d'*An. gambiae s.l.* à Pongonon en octobre 2005 et juin 2006**

Le taux d'inoculation entomologique pour *An. gambiae s.l.* était d'1 piqûre infectante par homme et par mois à Pongonon en Octobre 2005.

Mois	<i>An gambiae s.l</i>		
	m.a mensuelle	IAS	TIE
Octobre 2005	8,6	0,086	1,0
Juin 2006	0	0,000	0,0



## VII.2. Etude de sensibilité à la chloroquine :

### VII.2.1. Résultat démographique :

Au total 293 participants étaient inclus : 130(44,4%) en 2006 et 163 (55,6%) en 2007.

Les participants de moins de 6 ans étaient majoritaires pendant les deux ans soit 75,4% en 2006 et 51,9% en 2007. Ceux de plus de 11 ans étaient les moins nombreux avec 23,1% et 36,4%.

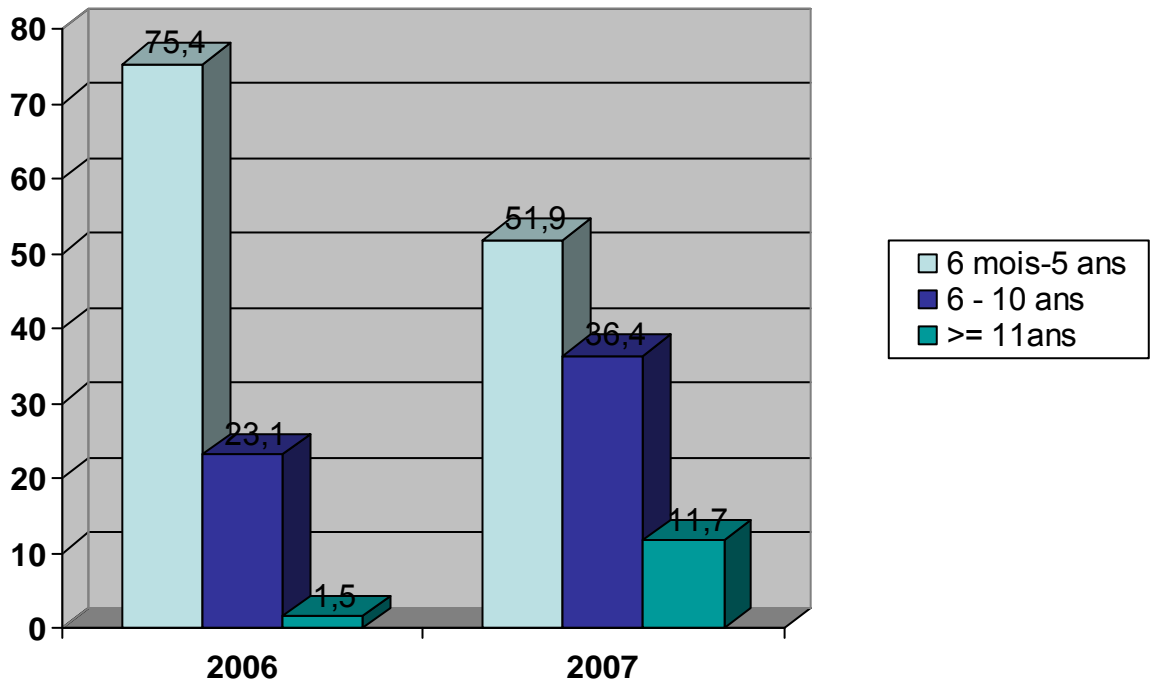


Figure 12 : répartition de la population selon le groupe d'âge

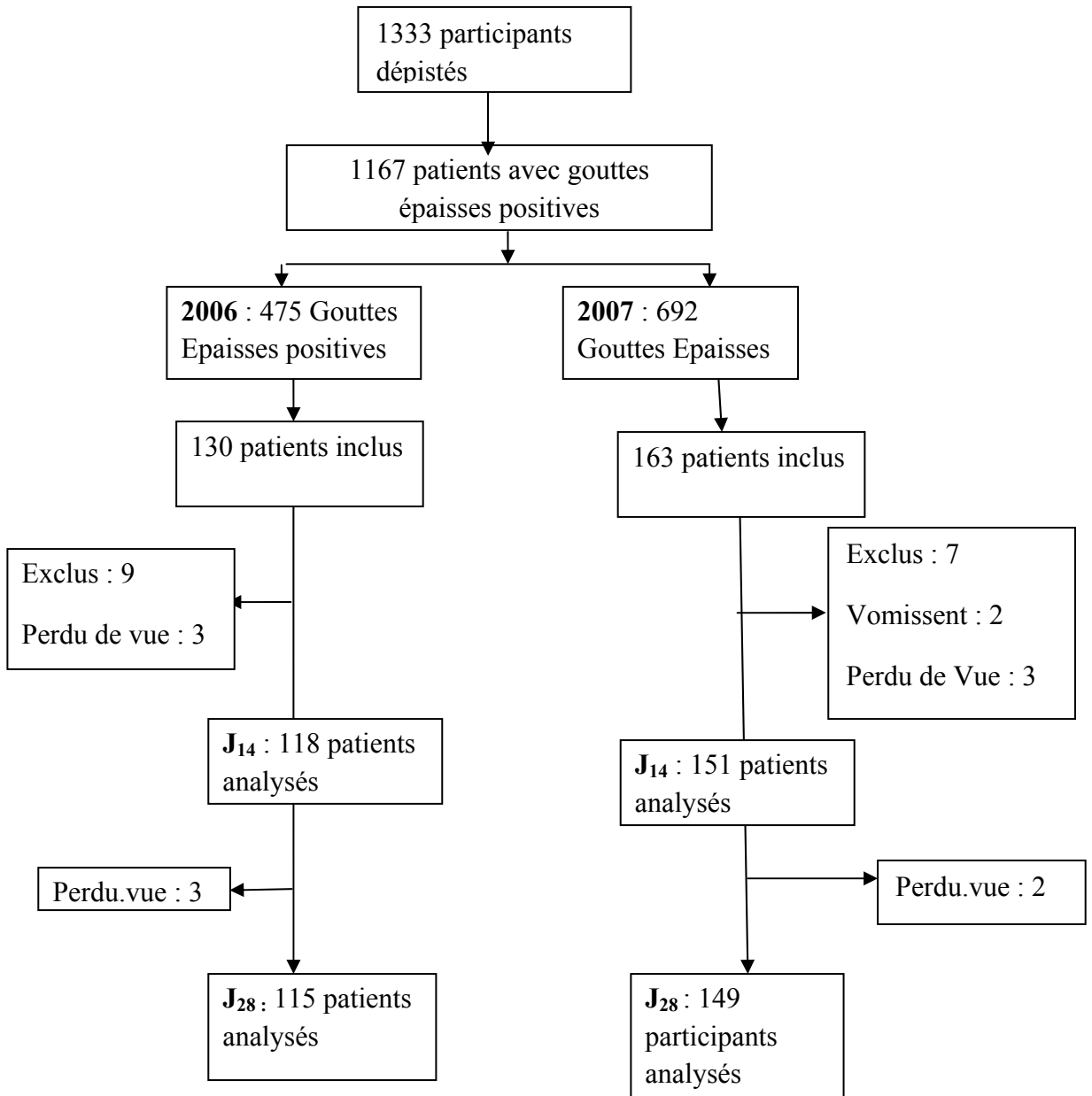


Figure 13 : Profile de l'étude

**VII.2.2. Caractéristiques parasito-cliniques par année :**

**Tableau XXIX : Réponses thérapeutiques *in vivo* sur 14 jours de suivi**

Seul les ECT étaient statistiquement entre les 2 années ( $p < 0,05$ ).

Réponse thérapeutique	ETP	ECT	EPT	RCPA	Total
Année	n1 (%)	n2 (%)	n3 (%)	n4(%)	N (%)
<b>2006</b>	4 (3,4)	9 (7,6)	11 (9,3)	94 (79,7)	118 (100)
<b>2007</b>	4 (2,6)	3 (2)	21 (13,9)	123(81,5)	151 (100)
<b>Probabilité</b>	p = 1	p = 0,6	p = 0,9	p = 0,2	

**ETP** : Echec Thérapeutique Précoce, **ECT** : Echec Clinique Tardif, **EPT** : Echec Parasitologique Tardif,  
**RCPA** : Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate

**Tableau XXX : Réponses thérapeutiques *in vivo* à J28 par année**

Les taux de réponse thérapeutique (ECT, EPT et RCPA) n'était statistiquement différent entre les deux années ( $p > 0,05$ )

Réponse thérapeutique	ETP	ECT	EPT	RCPA	Total
Année	N (%)	n2 (%)	n3 (%)	n4 (%)	N (%)
<b>2006</b>	4(3,5)	15(13,3)	41(37,2)	52(46)	113(100)
<b>2007</b>	5(3,4)	16 (10,7)	69(46,3)	59(39,6)	149(100)
<b>Probabilité</b>	p = 0,5	p = 0,9	p = 0,3	p = 0,4	

**EPT** : Echec Thérapeutique Précoce, **ECT** : Echec Clinique Tardif, **EPT** : Echec Parasitologique Tardif, **RCPA** : Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate

**VII.3. Caractéristiques parasito-cliniques par classe d'âge :**

**Tableau XXXI : Répartition des réponses thérapeutiques par classe d'âge sur 14 jours de suivi :**

Les taux d'échecs thérapeutiques (ETP, ECT, EPT) n'étaient pas statistiquement différents ( $p > 0,05$ ) entre les groupes d'âge. Le taux de RCPA chez les plus de 11 ans était de 100%. La différence statistique était significative entre les 3 groupes ( $p < 0,05$ ).

Réponse thérapeutique	ETP	ECT	EPT	RCPA	Total
Groupe-âge	n1(%)	n2(%)	n3 (%)	n4 (%)	N(%)
6 mois-5 ans	8(4,7)	10(5,9)	17(10,1)	134(79,3)	169(100)
6 – 10 ans	1(1,2)	2 (2,4)	4(4,8)	77(91,6)	84(100)
>= 11 ans	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	16(100)	16(100)

**ETP** : Echec Thérapeutique Précoce, **ECT** : Echec Clinique Tardif, **EPT** : Echec Parasitologique Tardif,  
**RCPA** : Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate

**Tableau XXXII : Réponses thérapeutiques par classe d'âge sur 28 jours de suivi**

A 28 jours de suivi les taux d'ECT et d'EPT ont été plus élevés chez les moins de 6 ans 4,9% et 17,4% respectivement. La différence des taux d'EPT était statistiquement significative entre les 3 groupes d'âge ( $P < 0,05$ ). Le taux de RCPA était de 100% chez les participants de plus de 10 ans. Statistiquement la différence était significative entre les 3 groupes d'âge ( $P < 0,05$ ).

Réponses thérapeutique	<b>ETP</b>	<b>ECT</b>	<b>EPT</b>	<b>RCPA</b>	<b>Total</b>
Groupe-âge	n1(%)	n2 (%)	n3(%)	n4%	N(%)
<b>6 mois-5 ans</b>	8 (4,9)	25(17,4)	72 (43,9)	59(36)	164(100)
<b>6 – 10 ans</b>	1(1,2)	6(7,4)	36(43,4)	40(48,4)	83(100)
<b>&gt;= 11 ans</b>	0(0,0)	0(0,0)	3(20)	12(80)	15(100)

**ETP** : Echec Thérapeutique Précoce, **ECT** : Echec Clinique Tardif, **EPT** : Echec Parasitologique Tardif,  
**RCPA** : Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate

**VII.3.1. Etude moléculaire :**

**Tableau XXXIII : Réponses thérapeutiques après correction moléculaire par année à 28 jours de suivi**

Les taux de réponses cliniques et parasitologiques adéquates corrigés n'étaient pas statistiquement différents entre les deux années ( $P > 0,05$ ), de même pour les échecs.

Réponses thérapeutiques	Echecs	RCPAc	Total
Années	n1 (%)	n2 (%)	N (%)
<b>2006</b>	31(27,4)	82 (72,6)	113(100)
<b>2007</b>	53(38,4)	101(67,8)	149(100)

**RCPAc** : Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate corrigée

**Tableau XXXIV : Réponses cliniques et parasitologiques adéquates après correction moléculaire par groupe d'âge à 28 jours de suivi**

Après correction moléculaire le taux de RCPA a été plus élevé chez les plus de 10 ans (100%). Statistiquement la différence du taux de RCPA entre les trois groupes était significative ( $p < 0,05$ ). L'échec thérapeutique était nul dans le groupe de plus de 10 ans, la différence statistique n'était pas significative entre les participants de 6 mois-5 ans et de 6-5 ans ( $p > 0,05$ ).

Groupe d'âge	<b>6 mois-5 ans</b>	<b>6 – 10 ans</b>	<b>&gt;= 11 ans</b>
Réponse thérapeutique	n1(%)	n2 (%)	n3 (%)
<b>Echecs</b>	57(34,8)	22(26,5)	0(0,0)
<b>RCPAc</b>	107(65.2)	61(73,5)	15(100)

RCPAc : Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate corrigée



**Tableau XXXV Fréquence du gène *pfprt* K76T par an**

Les taux de génotypes mutants étaient de 32% en 2006 et 32% en 2007, la différence statistique n'a pas été significative entre les deux années ( $P > 0,05$ ). L'indice de résistance génotypique était de 1,6 et 1,7 respectivement en 2006 et 2007. L'indice de génotype- résistance corrigé était de 1,2 en 2006 et 1 en 2007.

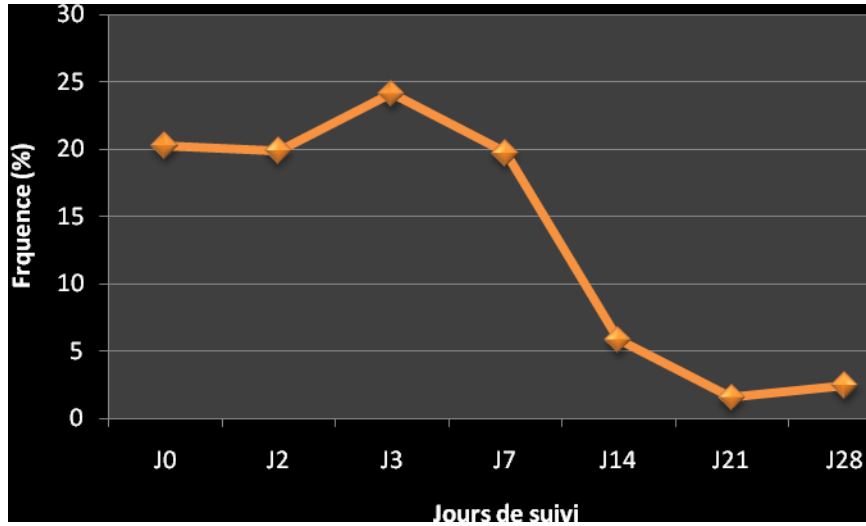
Années	Génotypes Sauvages	Mutants	GRI	GRIc
	n1 (%)	n2 (%)		
<b>2006</b>	79(64,8)	43(32,4)	1,6	1,2
<b>2007</b>	100(68)	47(32)	1,7	1
<b>Moyenne</b>	90 (66,4)	45(32,2)	1,65	1,1

**GRI** : Génotype-Resistance Indices

**GRIc** : Genoype-Resistance Indices corrigé

**VII.3.2. Evolution de du taux de gamétoocytes :**

La figure 10 montre un pic de la gamétocytémie au troisième jour (24,12%) de suivi. Cette gamétocytémie décroît progressivement jusqu'à J28 (1,54%).



**Figure 14 : Evolution de la gamtétocytémie au cours des différents jours de suivi**

**VII.3.3. Evolution du taux d'anémie :**

**Tableau XXXVI : Taux d'anémie par année**

Entre 2006 et 2007 à J0 (86, 61,4) et J28 (57,8, 34,6) les taux d'anémies étaient statistiquement différents. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre 2006 et 2007 à J14.

Années d'études	J0		J14		J28		Total
	n1	%	n2	%	n3	%	
<b>2006</b>	111	86	55	57,3	37	57,8	203
<b>2007</b>	97	61,4	81	55,9	37	34,6	215
	p< 0,01		p > 0,05		P<0,05		

**Tableau XXXVII : Anémie pendant les deux années par jour de suivi et par catégorie d'âge**

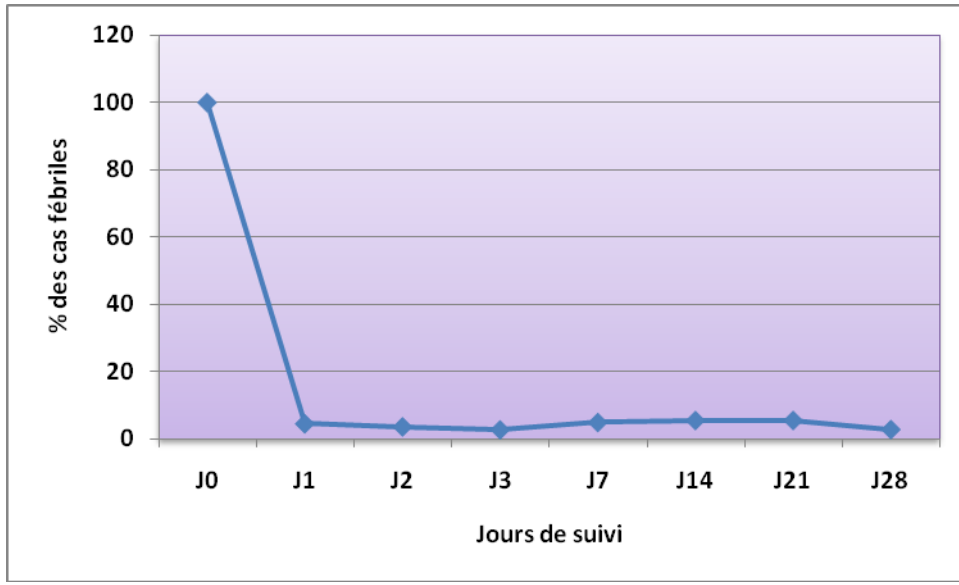
Nous observons dans ce tableau que les taux d'anémie ont diminué au cours des suivis et au fur à mesure que l'âge augmentait.

A J0 les taux d'anémie étaient plus élevés chez les participants de 6 mois à 5 ans que chez ceux de 6 à 10 ans avec une différence statistique hautement significative ( $P < 0,001$ ).

Jours de suivi	J0	J14		J28	
	n1 (%)	n2	%	n3	%
<b>Groupe-âge</b>					
<b>6 mois-5 ans</b>	161 (90,4)	103	72	52	57,8
<b>6 – 10 ans</b>	44 (50)	31	37,8	21	30,9
<b>&gt;= 11 ans</b>	2 (10,5)	2	12,5	1	7,7
<b>Total</b>	<b>207</b>	<b>136</b>		<b>74</b>	

### VII.3.4. Clairance de la fièvre

Sur cette figure nous constatons qu'à J0, 100% des participants étaient fébriles. Cette fréquence chute brusquement à 4,5% au premier jour de suivi (J1). Du J7 à J21 seulement 5% des participants avaient de la fièvre.



**Figure 15 : Evolution de la fièvre au cours du suivi des données cumulées 2006 et en 2007**

## VIII. Discussion

### VIII.1. Méthodologie :

Notre étude s'est déroulée à Pongonon, village situé à 789 Km au Nord-est de Bamako. Il est accessible à tout moment de l'année. L'adhésion de la population à l'étude antérieure du DEAP, l'accessibilité et la caractérisation des faciès épidémiologiques d'un site sentinelle à transmission palustre courte sont les principales raisons du choix de ce village.

Nous y avons effectué deux types d'étude :

- Une étude transversale parasito-clinique et entomologique à passage répété :

Il s'agissait des enquêtes rapides basées sur l'indice splénique, la prévalence du parasite et l'indice gamécytocique à différente période de l'année, pour caractériser l'épidémiologie et les modalités de transmission du paludisme à Pongonon.

L'indice splénique a été déterminé par la mesure de la taille de la rate selon la classification de Hackett<sup>31</sup>, qui varie d'un examinateur à l'autre et en fonction de l'âge.

Actuellement, on l'endémicité palustre est évaluée par la prévalence parasitaire<sup>32</sup>

L'indice plasmodique a été évalué après lecture microscopique des gouttes épaisses. Bien que la détection optique manque de sensibilité, c'est la méthode la plus utilisée.

Coulibaly D (1998) et Kayentao K (1997) respectivement à Bandiagara et à Donégouébougou avaient appliqué la même méthode<sup>44 34</sup>.

L'indice d'antigène sporozoïtique et le taux d'inoculation entomologique étaient déterminés pour mesurer le risque de transmission.

- Une étude longitudinale pour évaluer la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine. Cette étude s'inscrivait dans le cadre d'une étude multinationale des facteurs immuno-génétiques impliqués dans l'élimination des parasites chloroquino-résistants.

Le suivi a été effectué de façon passive et active, chez des participants malades du paludisme simple à *P. falciparum*. L'efficacité thérapeutique de la chloroquine sur le *P. falciparum* a été appréciée selon la classification de l'OMS de 28 jours de suivi<sup>33</sup>.

Les papiers buvards (confettis) imbibés du sang des patients ont servi à la recherche de la mutation 76T du gène *pfcr1*. Ces confettis ont l'avantage d'utiliser du sang prélevé à la pulpe du doigt. Ils sont conservables à la température ambiante.

## VIII.2. Résultats

### VIII.2.1. Etudes transversales

#### VIII.2.1.1. Etude parasito-clinique

##### VIII.2.1.1.1. Indices paludométriques

###### ❖ Indice plasmodique (IP)

L'indice plasmodique moyen était de 52,1%, variant au cours des différents passages ; 58,3%, 31,2%, 80,3% et 38,6% respectivement en Octobre 2005, Juin 2006, Octobre 2006 et Juillet 2007. Cet indice a été plus élevé pendant les deux mois d'Octobre, avec une différence statistique hautement significative entre ces derniers ( $P < 0,001$ ). La différence de l'IP entre Octobre 2005 et Octobre 2006 pourrait être due à la pluviométrie plus élevée en 2006 qu'en 2005 ; 605 mm et 391 mm respectivement. Par contre nous n'avons pas observé de différence statistique entre Juin 2006 et Juillet 2007 ( $P > 0,05$ ). Cette saisonnalité de l'IP a été trouvée par Coulibaly D à Bandiagara en 1998 qui observe un pic en Octobre (42,5%)<sup>44</sup>. Les indices plasmodiques en Octobre étaient significativement plus élevés à Pongonon qu'à Bandiagara ( $p < 0,05$ ). Ce qui démontre que, Pongonon doit figurer parmi les sites sentinelles du PNLP pour représenter le Seno. Notre indice a été comparable à celui de Kayentao en 1994 à Donéguébougou avec 59,6%, alors qu'il y a eu 79,3% en 1995<sup>34</sup>. Par contre en 1999 Sogoba M a eu un faible taux (38,6%) à Donéguébougou<sup>35</sup>. Maïga B à Mantérou (2000) a aussi observé la variabilité saisonnière de l'IP 9,6% 36,5% et 29,7% respectivement en Juillet 1998 et Novembre 1998 et Novembre 1999<sup>36</sup>. Donc l'IP varie en fonction de la saison dans une même localité.

L'IP n'était pas statistiquement différent entre les groupes d'âges ( $p > 0,05$ ). Ceci pourrait s'expliquer la différence de taille existant entre ces groupes. Coulibaly S à Bandiagara en 1997 a aussi observé un phénomène contraire<sup>44</sup>.

###### ❖ Indice splénique (IS) :

L'IS moyen était paradoxalement bas (11,2%) par rapport à l'IP (52,1%). Il variait d'un groupe d'âges à un autre ainsi qu'au cours des différents passages différence statistiquement significative entre les groupes d'âges ( $p > 0,05$ ). La différence était significative entre Juin 2006 et Juillet 2007 ( $p < 0,05$ ). Le pic était chez les moins de deux ans (5,3%) et en Octobre 2006 (21%). Coulibaly D à Bandiagara a observé un pic en Septembre<sup>44</sup>.

###### ❖ Indice Gamétocytaire (IG)

L'IG était de 7,4%, avec une variation saisonnière et selon l'âge. Il était plus élevé chez le groupe de moins deux ans (10,3%) avec une différence statistiquement significative entre ce dernier et de celui de 2 – 9 ans. Coulibaly D

a observé aussi la variation saisonnière de cet indice à Bandiagara en 1997 mais, avec un indice plus élevé chez les enfants de 3 – 5 ans<sup>44</sup>.

#### ❖ **Prévalence de l'espèce plasmodiale**

L'espèce *falciparum* était la plus prévalente avec une fréquence moyenne de 96% par rapport à *P. malariae* (6,5%) et *P. ovale* (1,75%). O Doumbo et al., ont trouvé aussi une prédominance de *P. falciparum* dans 9 localités du Mali en 1988<sup>37</sup>, ainsi que Maïga B à Mantérou en 1999<sup>36</sup>.

### VIII.2.1.2. Etude entomologique

#### VIII.2.1.2.1. Paramètres entomologiques

##### ❖ **Fréquence des vecteurs**

Parmi les deux espèces anophéliennes trouvées à Pongonon, *An. gambiae.s.l* a prédominé par rapport à *An. funestus* respectivement 96% et 4%. Cette faible fréquence d'*An. funestus* par rapport à *An. gambiae s.l* s'expliquerait par le fait que *An. funestus* a une préférence pour des flaques résiduelles de marigots ensoleillés, avec végétation et d'eau tiède. Alors que les marigots de Pongonon sont pour la plus part sans végétation. Dans un village sahélien (Bandiagara, Octobre 1999) les mêmes espèces étaient capturées avec aussi une prédominance d'*An. gambiae s.l* par rapport *An. funestus* 99,8% contre 0,2%<sup>38</sup>.

##### ❖ **Taux d'anthropophilie :**

Les anophèles ont besoin d'un repas de sang répétitif en fonction de leur cycle gonotrophique qui varie de 48 à 72 heures en moyenne. Le taux d'anthropophilie était élevé pour *An. gambiae s.l* (90%) qui est une alerte démontrant le degré d'exposition des populations de cette localité à l'infection palustre. Le seul *An. funestus* gorgé était anthropophile.

##### ❖ **Taux ISA (Indice d'Antigène sporozoïtique)**

Seul *An. gambiae.s.l* était infecté qu'en Octobre, avec un ISA de 8,6%. Ceci corrobore avec l'élévation de l'IP pendant ce mois indiqué plus haut. L'ISA a été nul en Juin, qui ne justifie pas forcément une interruption systématique de la transmission mais plutôt une illustration du caractère très faible de celle-ci en cette période de l'année. A Bandiagara en Octobre le taux d'infection était de 13,6% pour *An. gambiae s.l*<sup>38</sup>. Au Sénégal dans une zone sahélienne (Niakhar) Robert et al., ont trouvé 3,4% d'infection de cette espèce<sup>39</sup>

##### ❖ **Taux d'inoculation entomologique (TIE)**

Pendant le mois d'Octobre chaque habitant de ce village pouvait recevoir environ une inoculation du *Plasmodium falciparum* par *An. gambiae s.l*. Donc chaque villageois était exposé à un risque certain d'être en contact avec le parasite sauf en cas de protection contre les moustiques. Force était de constater que la population de Pongonon de façon générale n'entreprenait aucune mesure de lutte anti-vectorielle hormis l'utilisation des moustiquaires par quelques habitants les plus avertis. Le TIE à Bandiagara était de 4,70 en Octobre 1999<sup>38</sup> pour *An. gambiae. s.l*, quatre fois plus élevé que celui de Pongonon. Ce qui



justifie la nécessité d'intégrer ce dernier parmi les sites sentinelles du PNLP. En 1995 au Sénégal le TIE était de 2 par mois<sup>39</sup>

## **VIII.2.2. Etude longitudinale :**

### **VIII.2.2.1. Caractéristiques socio-démographiques**

Au total nous avons inclus 293 participants.

Les participants de 6 mois à 5 ans étaient les plus représentés en 2006 et en 2007 (75,4% et 51,9%). Ceci pourrait s'expliquer par l'incidence élevée du paludisme dans ce groupe d'âge, du fait de leur faible état de prémunition contre cette maladie. Les enfants de moins de 5 ans constituent le groupe d'âge vulnérable, confirment ainsi certains résultats antérieurs<sup>40 41</sup>.

Les participants de sexe masculin étaient les plus représentés que ceux du sexe féminin 56,7% contre 43,3% sans différence statistique entre les deux groupes ( $P > 0,05$ ).

### **VIII.2.2.2. Caractéristiques cliniques :**

A J0, tous les participants inclus étaient fébriles (température axillaire non corrigée supérieure ou égale à 37,5°C), comme décrit dans le protocole de l'OMS 2003<sup>33</sup>. Déjà à J1, 4,5% seulement des participants étaient fébriles. De J1 à J28, la proportion des participants fébriles était inférieure à 6%. Cette clairance rapide et continue de la fièvre pourrait à priori, expliquer l'effet positif de la chloroquine sur le paludisme simple dans cette localité. Coulibaly D à Bandiagara a observé aussi une diminution progressive du taux de la fièvre en 1998<sup>44</sup>. Le taux de prurit été de 5,5%. Coulibaly D à Bandiagara en 1998 20,7%<sup>44</sup>.

### **VIII.2.2.3. Caractéristiques parasito-cliniques :**

Le taux d'échec est sous-estimé quand le suivi est de 14 jours. La durée de suivi la mieux adaptée est de 28 jours pour la chloroquine<sup>33</sup>. L'analyse des données sur 28 jours avec correction moléculaire a l'avantage de distinguer entre réinfection et recrudescences. A cet effet, une correction moléculaire a été effectuée pour différencier les cas de résistances vrais et de cas de ré-infection de *P. falciparum* en utilisant les marqueurs moléculaires (MSP1, MSP2 et CA1).

La méthode de double Réaction de Polymérase en chaîne (PCR) a été utilisée pour déterminer la prévalence du marqueur de résistance à la chloroquine. La révélation des types d'allèles (mutant ou sensible) sur le gène *Pfcr* en son point de mutation K76T a été effectuée par la restriction enzymatique. Elle est qualitative cette méthode en permettant de déterminer la présence ou non d'une mutation.

### VIII.2.2.3.1. Analyses des données sur 14 jours de suivi

Les taux d'échecs thérapeutiques précoces étaient identiques en 2006 et 2007 (3,4% et 2,6%) et ceux d'échecs cliniques tardifs étaient de 7,6% et 2% respectivement pendant ces deux années. Ces taux faibles d'échec thérapeutique (11% en 2006 et 4,6% en 2007) suggèrent que la chloroquine gardait une efficacité clinique dans la prise en charge du paludisme simple dans notre site. Dans la même localité Kayentao et al., en 2005 ont eu un taux de 6% (**données non publiées**). En zone sahélienne TEKETE à Kollé en 2001 a eu 7,2%<sup>21</sup>, Bankoumana KATILE (2001) a obtenu un taux plus élevé (13,8%)<sup>42</sup>.

Au Sénégal, GAYE et al., (1999) ont trouvé des taux plus élevés 13,2%<sup>43</sup>.

Les taux d'échecs parasitologiques tardifs étaient de 9,3 et 13,9% respectivement en 2006 et 2007 sans différence statistique ( $P > 0,05$ ).

Au Mali, Kayentao et al., en 2005 sur le même site ont eu 10% (**Données non publiées**) et 12,9% par COULIBALY D en 1998 à Bandiagara<sup>44</sup>. Par contre TEKETE en 1999 et DAMA en 2004 à Kollé ont obtenu des taux de résistance parasitologique plus élevés que le notre soit respectivement 26%<sup>21</sup> et 35,2%<sup>45</sup>.

Le taux global d'échec thérapeutique (ETP + ECT + EPT) étaient de 20,3% en 2006 et de 18,5% en 2007 sans différence statistique ( $P > 0,05$ ). Ces taux étaient inférieurs à celui de DAMA en 2004 à Kollé 47,7% et supérieurs à celui de Traoré en 1998 à Kollé (12,1%)<sup>11</sup>.

Ces faibles taux de résistance *in vivo* à 14 jours de suivi portent à croire que le *P. falciparum* a un niveau de sensibilité acceptable à la chloroquine dans cette localité. Ces taux pourraient également conforter l'hypothèse selon laquelle les résultats de J14 sous-estimeraient le niveau de résistance.

Nos taux d'échecs thérapeutiques étaient comparables au seuil critique de 25% de l'OMS<sup>46</sup>.

Hors du Mali, au Mozambique en 2004 Abacassamo F et al., ont eu un taux nettement supérieur aux nôtres 52,9 %<sup>47</sup>; ainsi que Elisa S et al., (93,9 %) la même année au Soudan<sup>48</sup>.

#### VIII.2.2.3.2. Analyses des données sur 28 jours de suivi.

Avant correction moléculaire les taux d'échecs cliniques tardifs et parasitologiques tardifs n'ont pas été statistiquement différents entre 2006 et 2007 ( $P > 0,05$ ). De même pour les réponses cliniques et parasitologiques satisfaisantes.

Les taux globaux d'échecs thérapeutiques (ETP + ECT + EPT) étaient comparables entre 2006 et 2007 54% et 60,4% respectivement. Alors qu'en 2005 sur le même site Kayentao et al., avaient trouvé un taux plus élevé (72%) (**Données publiées**). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la population de l'étude de 2005 était composée uniquement des participants de 6-59 mois donc plus vulnérables au paludisme, que celles de 2006 et de 2007 qui en plus de ces derniers étaient composées des participants adultes.

Dans une zone de savane (Kollé, 2005), DAMA S a aussi trouvé un taux plus élevé (86,2%) que nous. En plus du jeune âge de sa population d'étude (6-59 mois), 'l'automédication élevée à la chloroquine' dans cette localité pourrait expliquer cette différence<sup>45</sup>.

Par ailleurs au Soudan en 2004, Elisa et al., ont eu un taux nettement supérieur aux nôtres (93,9%)<sup>48</sup>, de même que Tagbor H et al., en 2007 Ghana ont eu, 58,5%<sup>49</sup>.

#### VIII.2.2.3.3. Réponses thérapeutiques après correction avec les marqueurs moléculaires

Les taux de RCPA corrigée étaient de 72,6% et de 67,8% en 2006 et 2007 respectivement sans différence statistiquement significative ( $p > 0,05$ ). Cette baisse de sensibilité du *P. falciparum* à la chloroquine de 2006 à 2007, pourrait s'expliquer par le maintien de la médication de la population avec ce médicament. DAMA S a observé un phénomène contraire à Kollé de 2002 à 2003 52,3% et 62,7% respectivement<sup>45</sup>.

Les taux de réinfection étaient de 31,3% en 2006 contre 36,9% en 2007 sans différence statistique significative ( $P > 0,05$ ). Ces taux de réinfection restent inférieurs à ceux de Dama S de 2002 et de 2003 à Kollé respectivement 38% et 54%<sup>45</sup>. Le taux de réinfection a été plus élevé chez les participants de 6 mois à 5 ans 35,8% contre 33,9% et 20% respectivement chez les participants de 6 à 10 ans et de 11 ans et plus.

#### VIII.2.2.3.4. Prévalence de la mutation *pfprt* K76T

Les Taux du gène *pfprt* n'ont pas été statistiquement différents entre 2006 et 2007 ( $P > 0,05$ ). En 2005 sur le même site Kayentao et al., ont trouvé un taux inférieur que nous soit 25,6% (**données non publiées**). L'augmentation de la prévalence de cette mutation s'expliquerait par la sélection des souches mutantes

de *P. falciparum* due au maintien de la médication de la population avec la chloroquine.

TEKETE M et DAMA S à Kollé ont observé le même phénomène avec des taux plus élevés que nous 67,2% et 74% respectivement en 1999 et 2002<sup>21 45</sup>. Djimdé et al., ont trouvé un taux supérieur au notre soit 41% au Mali<sup>20</sup>.

En dehors du Mali, au Niger Ibrahim. MM et al., ont eu un taux aussi plus élevé que nous (50,1%) le long de la vallée du fleuve Niger en 2008<sup>50</sup>. Une fréquence très élevée (79%) a été trouvée par Ehrhardt S et al., en 2007 au Ghana<sup>51</sup>.

L'Indice résistance-génotypique était de 1,6 et de 1,7 respectivement en 2006 et 2007. Dans le même site Kayentao et al., ont 1,6 de GRI (**données non publiées**). Djimdé et al., ont trouvé en 1997 à Mopti et Bandiagara, 2,7 et 1,6 respectivement, puis à Kollé en 1998 et 1999 2,5 et 1,6 **respectivement**<sup>28</sup>.

#### VIII.2.2.4. Caractéristiques hématologiques

##### VIII.2.2.4.1. Evolution de l'anémie au cours du suivi

A J0 et à J28 il y a eu une différence statistiquement significative du taux d'anémie entre 2006 et 2007 respectivement 86% et 61,4% ( $P < 0,01$ ). Cette différence pourrait s'expliquer par la présence plus élevée des participants adultes dans la population de 2007 que 2006. Car les adultes sembleraient moins anémiés que les participants jeunes. Ainsi nous avons observé une diminution progressive du taux d'anémie au fur à mesure que l'âge augmentait par exemple à J0 : 90,4%, 50% et 10,5% respectivement pour les participants de 6 mois à 5 ans, de 6 à 10 ans et de 11 ans et plus.

Le taux d'anémie a diminué progressivement au cours du suivi ; 72,5%, 65,4% et 43% respectivement à J0, J14 et J28. La différence était statistiquement significative ( $P < 0,001$ ). Cette diminution progressive pourrait s'expliquer par la clairance parasitaire due à la chloroquino-thérapie. Dama. S a observé le même phénomène en 2003 à Kollé<sup>45</sup>.

##### VIII.2.2.5. Evolution de la gamétocytémie au cours des suivis

Nous avons observé un pic de porteurs de gamétocytes aux troisièmes jours du suivi. Coulibaly D a observé à Bandiagara en 1997 une fréquence élevée de porteurs de gamétocytes au 3<sup>ème</sup> et au 14<sup>ème</sup> jour de suivi<sup>44</sup>.

Ces résultats permettent d'établir le niveau d'endémie palustre de cette zone, bien que la transmission n'ait été évaluée qu'en certaines périodes de l'année. Ils confirment la baisse de sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine, énumérée par les études antérieures au Mali. Cependant d'autres facteurs peuvent être étudiés tels que, l'incidence du paludisme grave, l'efficacité comparative des combinaisons thérapeutiques à bases d'artémisinine, l'efficacité des

pulvérisations intra-domiciliaires (IRS) *versus* l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) etc.

## IX. Conclusion

Au terme de notre étude nous constatons que les indicateurs paludométriques étaient variables d'une période à une autre à Pongonon avec, un indice plasmodique moyen de 52,1%, un indice splénique de 7,4% et un indice gamétocytaire moyen de 11,2%. *An. funestus* et *An. gambiae. s.l* étaient les deux espèces vectrices du paludisme trouvées avec une prédominance de ce dernier 96% et 100% respectivement en Octobre 2005 et Juin 2006. L'infection du vecteur était perceptible qu'en Octobre 2005. *An. gambiae. s.l* était la seule espèce infectée avec un taux IAS de 8,6% et un TIE d'une inoculation du *P. falciparum* par personne et par mois.

Le taux d'inoculation entomologique dans cette zone de plaine du Pays Dogon est inférieur à celui du Plateau Dogon. Par contre l'indice plasmodique en saison de transmission y est plus élevé que sur le Plateau. Ces spécificités de l'épidémiologie du paludisme dans la plaine plaident pour une représentation de cette aire géographique parmi les sites sentinelles du PNLP.

A 28 jours de suivi *in vivo* la sensibilité du *P. falciparum* à la chloroquine était faible. Les taux de RCPA non corrigés par PCR étaient de 56% et 39,6% respectivement en 2006 et 2007. Après correction moléculaire les taux de RCPAc étaient de 72,6% et de 67,8% respectivement en 2006 et 2007.

Les prévalences du génotype mutant du gène *pfcr* étaient de 32,4% en 2006 et de 32% en 2007. Le modèle GRI demeurait valide à Pongonon avec 1,6 en 2006 et 1,7 en 2007.

Le GRI à J28 après correction moléculaire semble mieux prédire la résistance *in vivo* à la chloroquine que le modèle GRI actuel qui est basé sur les résultats à J14.

## **X.Recommandations**

Au regard de ces résultats nous formulons les recommandations suivantes :

### **1- Au Programme National de Lutte contre le Paludisme**

- Représenter Pongonon parmi les sites sentinelles du Mali
- Rendre fonctionnels les autres sites sentinelles pour obtenir des données pertinentes par rapport à l'efficacité des antipaludiques utilisés au Mali.

### **2-Aux chercheurs du DEAP/MRTC/FMPOS**

- Etendre les passages parasito-cliniques à tous les mois de l'année pour mieux stratifier l'endémie palustre à Pongonon.
- Faire une étude entomologique longitudinale pendant au moins un an pour bien cerner les modalités de transmission palustre à Pongonon.

**Nom** : Niangaly

**Prénom** : Hamidou

**Nationalité** : Malienne

**Année de soutenance** : 2009

**Ville de soutenance** : Bamako

**Lieu de dépôt** : Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Ondonto-stomatologie

**Secteur d'intérêt** : Epidémiologie, microbiologie, Parasitologie, Biologie moléculaire

**Titre** : **Epidémiologie du paludisme dans un village de la plaine du Pays Dogon du Mali: Pongonon**

Nous avons effectué entre Octobre 2005 et Juillet 2007 quatre passages parasitocliniques chez les participants âgés de 1 à 16 ans à Pongonon et deux passages entomologiques pour étudier la population anophélienne et le risque de transmission du paludisme.

D'Octobre 2006 à Décembre 2007 nous y avons aussi mené une étude longitudinale prospective de sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine chez les participants d'au moins 6 mois.

La chloroquine a été administrée par voie orale à la dose de 10mg/kg les deux premiers jours et 5mg/kg le troisième jour.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Les indices plasmodiques, gamétocytiques et spléniques étaient respectivement 52,1%, 7,4% et 11,2%.

Parmi les deux espèces trouvées (*An. gambiae s.l* et *An. funestus*) seule *An. gambiae s.l* était infectée avec un IAS de 8,6% et un TIE d'une piqûre infectante par personne et par mois en Octobre.

Après correction moléculaire, nous avons obtenu 72,6% et 67,8% de RCPA respectivement en 2006 et 2007.

La prévalence des génotypes mutants était de 32,4% et 32% en 2006 et 2007 respectivement. Les GRI étaient de 1.6 et 1.7 respectivement en 2006 et 2007.

**Conclusion** : Nos résultats suggèrent que le paludisme en plaine du Pays Dogon est différent de celui du Plateau Dogon. Ces résultats valident le modèle GRI dans cette zone. En plus nous proposons un indice GRI plus précis et plus conforme aux normes actuelles de l'OMS.

**Mots clés** : Pongonon, *pfprt* K76T, PCR, ETP, ECT, EPT, RCPA, *P. falciparum*



**Name:** Niangaly

**Surname:** Hamidou

**Nationality:** Malian

**Year of defense:** 2009

**Town of defense:** Bamako

**Field:** Epidemiology, Parasitology, drug resistance and molecular biology

**Title:** Malaria epidemiology in a village in the plain of the Dogon Country of Mali: Pongonon

We conducted four cross sectional parasitological and clinical studies in children between 1 and 16 years of age and two cross sectional entomological studies on anopheles population and malaria transmission from October 2005 to July 2007. Pongonon, a Malian village located in the plain of the Dogon Country was our study site.

Between October 2006 and December 2007, we also conducted a longitudinal *in vivo* study of *P. falciparum* sensitivity to chloroquine in patients 6 months and older.

The plasmodic, gametocytic and spleen indices were 52.1%, 7.4% and 11.2%, respectively.

Two species were found (*An. gambiae.s.l* and *An. funestus*) but only *An. gambiae s.l* was infected with 8.6% IAS and an Entomology Inoculation Rate of one infected bite per person per month in October.

Chloroquine was administered *per os* at the dose of 10mg/kg during the two first days and 5mg/kg on the third day.

After molecular correction, ACPR were 72.6% and 67.8% respectively in 2006 and 2007. The prevalence of *pfprt* 76T was 32.4% and 32% in 2006 and 2007 respectively. GRI were 1.6 and 1.7 respectively in 2006 and 2007.

**Conclusion:** Our results suggest that malaria in the plain may be different from Malaria on the Dogon escarpment. We confirm the validity of the current GRI model and propose a novel GRI that is more accurate and better in line with current WHO norms.

**Keys words:** Pongonon, *pfprt* K76T, PCR, ETF, LTF, LPF, ACPR, *P. falciparum*

### XI. Références bibliographiques

- 
- <sup>1</sup> **Carme B, Kenmorgne D, Copin N, Mbityi A.** Indices plasmodiques et charges parasitaires chez des donneurs de sang à Brazaville CONGO. Ann.Soc.Belge Med Trop 1993; 73: 179-87.
  - <sup>2</sup> **Durie H, Haba M.** Paludisme congénital. Med Trop 1992; 52: 175-8.
  - <sup>3</sup> **Bruce-chwatt LJ.** The Manson oration, May 1979. Man against malaria: conquest or defeat. Trans.R.Soc.Trop. Med. Hyg. 1979; 73: 605-17.
  - <sup>4</sup> **OMS.** Comité d'experts du Paludisme. Série de Rapports techniques N-123, 957.
  - <sup>5</sup> **Young MD, Moore DV.** Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg. 1961 May; 10: 317-20.
  - <sup>6</sup> **Danis M, Gentilini M.** [Malaria, a worldwide scourge] Le paludisme fléau mondial. Rev. Part. 1998; 483: 254-7.
  - <sup>7</sup> **World malaria situation in 1994.** Part I. Population at risk. Wkly. Epidemiol.rec. 1997; 7236: 269-
  - <sup>8</sup> **Camara F.** Evolution de la chimiorésistance des souches maliennes de *P. falciparum* aux amino-4-quinoléines de 1985 à 99. Thèse Médecine ; ENMP, 1991 N-41.
  - <sup>9</sup> **Koita.O.** Contribution à l'étude épidémiologique du paludisme le long du tronçon de la route transsaharienne au Mali. Thèse de Pharmacie, Bamako 2002 : 02-M-7.

- 
- <sup>10</sup> **Coulibaly.Y.** Epidémiologie du paludisme en milieu péri-urbain de Bamako et essai d'une stratégie de lutte basse sur l'utilisation de perméthrine et le traitement systématique des accès fébriles. Thèse de Médecine, Bamako, 1996 ; 96-M-51.
- <sup>11</sup> **Traoré. O.** Evaluation du niveau de la réponse clinique, parasitologique *in vivo* et des mutations du *pfprt* de *P. falciparum* à Kollé(Mali). Thèse de Pharmacie, Bamako 2000, N<sup>o</sup> 00-P-3
- <sup>12</sup> **Gentililin M, Caumes Eric, Danis M, Mouchet J, Duflot B, Lagadère D, Lenoble R D, Grucker G.** Médecine Tropicale 1993. Flammarion 928 : 92-97.
- <sup>13</sup> **Martin Danis et Jean Mouchet (1991):** Paludisme Paris; Ellipses; 1991; 240P Collection: AUPELF UREF.
- <sup>14</sup> **Doumbo O., Ouattara N. I., Koita O., Maharaux A., Touré Y. T., Traoré S.F., Quilici M., (1989)** – approche éco-géographique du paludisme en milieu urbain. La ville de Bamako au Mali. *Ecol Hum.*, 8 (2, 3): 15
- <sup>15</sup> **Thompson PE, Werbel LM.** Antimalarial agents: chemistry and pharmacology. In : DeStevens G, ed. Medicinal chemistry, Vol. 12. New York : Academic Press, 1972
- <sup>16</sup> **Coatney GR. Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine.** Am J Trop Med Hyg 1963. 12 :121-8.
- <sup>17</sup> **Yayon A, Cabantcick ZI, Ginsberg H Identification of the acidic compartment of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine.** EMBO J. 1984 Nov;3(11):2695-700.
- <sup>18</sup> **Fitch CD.** 1972 Proc. Helminth. Soc. Washington 39, 265-27.
- <sup>19</sup> **Fidock DA, Nomura T, Talley AK et al.** Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembranaire protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine résistance. **Mol cell. 2000; 6: 861-71.**

- 
- <sup>20</sup> **Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y et al. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria.** N.Engl.J.Med. 2001; 344: 257-63.
- <sup>21</sup> **Tekete MM.** Sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine dans deux villages de la savane malienne : Kollé et Bancoumana. Thèse Pharmacie FMPOS 2001 n°96.
- <sup>22</sup> **Payned D.** Aspects pratiques de l'utilisation des systèmes standard OMS d'épreuve *in vitro* ( macro et microtest) pour la détermination de la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine, la méfloquine, l'amodiaquine, et la quinine. *WHO/MAL* 1984 ;84 :2-21.
- <sup>23</sup> **LE BRAS J, DELORON P.** *in vitro* study of drug sensitivity of *P. falciparum* :evaluation of new micro-test. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32:44-53
- <sup>24</sup> **DESJARDIN RE, CANFIELDS CJ, HAYNES JP, CHNULAY JD.** Quantitative assessment of antimalaria activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;16:710-8
- <sup>25</sup> **Le Bras J, Andrieu B, Hantin I, Savel J, Coulaud JP.** *Plasmodium falciparum* : interprétation du semi-microtest de chimiosensibilité *in vitro* par incorporation de 3-hypoxanthine. *Path Bio* 1984 ;32 :463-6
- <sup>26</sup> **Krogstad DJ, Schesinger OH.** The basis antimalarial action : non-weak base effects of chloroquine on acid vesicle pH. *Am J trop Med Hyg* 1987;32:213-20
- <sup>27</sup> **Makler MT, Hinrichs DJ.** Measurement of the lactate dehydrogenase : stage-specific lactate production in synchronized culture. *Exp Parasitol* 1993;54:391-6
- <sup>28</sup> **Djimde A; Doumbo O. K., Steketee R.W., Plowe CV.** Application of molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant falciparum malaria *Lancet*.2001;358:89-96
- <sup>29</sup> **JEFFEYS AJ.** DNA sequence variants in the G<sub>γ</sub>, A<sub>γ</sub>,  $\delta$ - and  $\epsilon$ -globin gene of man. *Cell*. 1979 ; 18 : 1-10.
- <sup>30</sup> **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.
- <sup>31</sup> **Hackett L W,** Spleen measurement in malaria. *J. Natl. Soc* 1994. 3:121-134
- <sup>32</sup> **Jean Moucet, Pierre Carnevale, Marc Coosemans, Jean Julvez, sylvie Manguin, Dominique Richard-Lenoble, Jacques Sironcoulon.** Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbey Euotext, Paris ; 2004 ; 428 : 29-30.

- <sup>33</sup> **Organisation Mondiale de la Santé.** Evaluation et surveillance de l'efficacité des antipaludiques pour le traitement du paludisme à *plasmodium falciparum* non compliqué  
WHO/HTM/RBM/2003.50, Genève : Organisation mondiale de la Santé, 68P.
- <sup>34</sup> **KAYENTAO K.** Epidémiologie du paludisme et évaluation du traitement de l'accès palustre simple à la chloroquine dans le village de Donéguébougou. Thèse Médecine. Bamako, FMPOS, 1997. N° : 97-M-37.
- <sup>35</sup> **SOGOBA M.** Paludisme, épidémiologie, chloroquinorésistance et étude de la réinfection après traitement au Fansidar® dans deux zones d'endémicités différentes au Mali. Thèse Méd. Bamako, FMPOS, 1999. N : 99-M-67
- <sup>36</sup> **MAIGA M,** Susceptibilité au paludisme et groupes ethniques sympatriques dans le cercle de Koro (Mopti). Thèse de Médecine 00-M-105.
- <sup>37</sup> **O. DOUMBO\*, O. KOITA\*, S.F. TRAORE\*, O. SANGARE\*, A. COULIBALY, V. ROBERT\*\*, G. SOULA\*, M. QUILICI\*\*\*, Y.T. TOURE\*.** Les aspects parasitologiques de l'épidémiologie du paludisme dans le sahara malien. *Médecine d'Afrique Noire* : 1991, 38 (2).
- <sup>38</sup> **TRAORE. SF, YARO. AS, FOFANA. A, FOFANA. M, DAO. A, BOUARE M, SACKO. A, TOURE. YT.** Study of re-infection rates in semi-immune young adults and older children living under different endemicities (entomologic inoculation rates). Bandiagara Entomological report (July 1999 – March 2000)
- <sup>39</sup> **Robert, V.<sup>1</sup>; Dieng, H.<sup>2</sup>; Lochouart, L.<sup>1</sup>; Traore, S.F.<sup>3</sup>; Trape, J.F.<sup>1</sup>; Simondon, F.<sup>1</sup>; Fontenille, D.<sup>1</sup>** La transmission du paludisme dans la zone de Niakhar, Senegal. *Tropical Medicine & International Health*, Volume 3, Number 8, 1 August 1998, pp. 667-677(11)
- <sup>40</sup> **Thompson P E, Werbel L M.** Ant malarial agents: Chemistry and pharmacology. In: Destevens G, Ed medical chemistry, vol 12, New York: Academic Press, 1972.
- <sup>41</sup> **Coatney. G. R.,** Pitfalls in discovery, the chronicle of chloroquine.  
*Am J Trop, Med, Hyg, 1963; 12: 121-8.*
- <sup>42</sup> **KATILE. A,** dynamique de l'efficacité thérapeutique de la chloroquine dans un village à transmission saisonnière intense Bancoumana (Mali) thèse de médecine 2001. 03-M-90

- 
- <sup>43</sup> GAYE O, SOUMARE M, DANSOKO E F, FAYE O, SAMBOU B, DIALLO S Surveillance de l'efficacité des antipaludiques au Sénégal. *Burkina Médical*, 1999, (numéro spécial) : 21-22.
- <sup>44</sup> **Coulibaly. D**, Epidémiologie clinique du paludisme dans la ville de Bandiara et niveau de sensibilité de *P.falciparum* à la chloroquine Thèse de médecine FMPOS 1998 98-M-54, N° 54.
- <sup>45</sup> **DAMA. S**, Identification d'un melleur antipaludique candidat pour l'association à l'artésunate en vue de la mise e œuvre de la politiuque des combinaisons thérapeutiques au Mali. Thèse de Pharmacie FMPOS 2005 06-P-7
- <sup>46</sup> . **OMS**. Stratégies d'utilisation des antipaludiques *WHO/MAL* 1994 ; 94 1070 : 71.
- <sup>47</sup> **Abacassomo F, Enosse S, Aponte JJ, Gomez-olive FX, Quinto L, Manbuda S, Magnussen P, Ronn AM, Thompo R, Alonso PL**. Efficacy of chloroquine, amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine and combinaison therapy with artesunate in Mozambique children with no-complicated malaria. *Trop Med Health*. 2004 feb ; 9(2) : 2008-8.
- <sup>48</sup> **Elisa Stivanello, Philippe Cavailler, Fransesco Cassano, Sabah Amed Oumar, Daniel Kariuki, Jonathan Mwangi, Patrice Piola and Jean – Paul Guthman**. Efficacy of chloroquine sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Kajo country, Soudan. *Trop Med int Health*. Sep 2004 ;9(9) : 975.
- <sup>49</sup> **Tagbor H, Bruce J, Ord R, Randall A, Browne E, Greenwood B, Chandramohan D**. Comparison of the therapeutic efficacy of chloroquine and sulphadoxine-pyremethamine in children and pregnant women. **Trop Med Int Health**. 2007 Nov;12(11):1288-97. Epub 2007 Oct 22.
- <sup>50</sup> **Ibrahim ML, Hassane H, Konate L, Adamou S, Ousmane I, Adehossi E, Jeanne I, Duchemin JB**. *Plasmodium falciparum* chloroquine and pyrimethamine resistance monitoring network with molecular tools in the Niger River valley, Republic of Niger, **Bull Soc Pathol Exot**. 2008 Feb;101(1):47-9.

<sup>51</sup> Ehrhardt S, Eggelte TA, Kaiser S, Adjei L, Burchard GD, Anemana SD, Bienze U, Mockenhaupt FP. Large-scale surveillance of Plasmodium falciparum crt(K76T) in northern Ghana. **Antimicrob Agents Chemother.** 2007 Sep;51(9):3407-9. Epub 2007 Jun 11.

---

**SERMENT D'HYPPOCRATE**

En présence des maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et 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 les soins gratuits à l'indigent et ne n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail, je ne participerai jamais à aucun partage clandestin d'honoraires

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

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

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès sa 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 reçu 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 de mes confrères si j'y manque

Je le jure