

MINISTRE DE L'EDUCATION NATIONALE

REPUBLIQUE DU MALI  
Un Peuple - Un But - Une Foi

-----=0=-----

UNIVERSITE DE BAMAKO  
Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

ANNEE UNIVERSITAIRE 2004-2005

N°-----/

**Performances diagnostiques du test rapide OptiMAL-IT.  
Place de la biologie moléculaire dans l'évaluation du  
polymorphisme génétique de la lactate déshydrogénase  
(LDH) de *Plasmodium falciparum*.**

## **THESE**

*Présentée et soutenue publiquement le..... devant la Faculté de  
Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Mali  
par Madame AMOS Fatoumata ALZOUMA Younsa  
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (DIPLOME D'ETAT)*

### **Jury :**

**Président :** Professeur Ousmane DOUMBIA

**Membres :** Docteur Seydou DOUMBIA

Docteur Madama BOUARE

**Co-directeur de thèse :** Docteur Ousmane KOITA

**Directeur de thèse :** Professeur Amadou DIALLO

Les travaux ont été effectués au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée avec le soutien de Tulane University et le NIAID/NIH.

**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE**  
**ANNEE UNIVERSITAIRE 2004-2005**

**ADMINISTRATION**

<u>DOYEN</u> :	<b>MOUSSA TRAORE</b> – PROFESSEUR
<u>1<sup>er</sup> ASSESSEUR</u> :	<b>MASSA SANOGO</b> – MAÎTRE DE
CONFERENCES	
<u>2<sup>ème</sup> ASSESSEUR</u> :	<b>GANGALY DIALLO</b> – MAÎTRE DE
	CONFERECEES AGREGE
<u>SECRETAIRE PRINCIPAL</u> :	<b>YENIMEGUE ALBERT DEMBELE</b> – MAÎTRE D
	CONFERECEES AGREGE
<u>AGENT COMPTABLE</u> :	<b>MADAME COULIBALY FATOUMATA TALL-</b>
	CONTROLEUR DES FINANCES

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Mr Alou BA :	Ophtalmologie
Mr Bocar SALL :	Orthopédie Traumatologie -
Secourisme	
Mr Souleymane SANGARE :	Pneumo-phtisiologie
Mr Yaya FOFANA :	Hématologie
Mr Mamadou L. TRAORE :	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY :	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE :	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE:	Pharmacognosie
Mr Mohamed TOURE :	Pédiatrie

**Mr Ali Nouhoum DIALLO :**

**Médecine interne**

Mr Aly GUINDO :

Gastro-entérologie

## LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE

### D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

#### **1. PROFESSEURS**

Mr Abdel Karim KOUMARE :

Chirurgie Générale

Mr Sambou SOUMARE :

Chirurgie Générale

Mr Abdou Alassane TOURE :

Orthopédie – Traumatologie

**Chef de D.E.R.**

Mr Kalilou OUATTARA :

Urologie

Mr Amadou DOLO :

Gynéco Obstétrique

Mr Alhousseini Ag MOHAMED

ORL

#### **2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES**

Mr Abdoulaye DIALLO :

Ophtalmologie

Mr Djibril SANGARE :

Chirurgie Générale

Mr Abdel Kader TRAORE dit DIOP :

Chirurgie Générale

Mr Abdoulaye DIALLO :

Anesthésie – Réanimation

Mr Gangaly DIALLO :

Chirurgie Viscérale

#### **3. MAITRES DE CONFERENCES**

Mme SY Aïda SOW :

Gynéco-Obstétrique

Mr Salif DIAKITE : Gynéco-Obstétrique

#### 4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE : Gynéco-Obstétrique  
Mr Mamadou TRAORE : Gynéco-Obstétrique  
Mr Sadio YENA : Chirurgie Générale  
Mr Filifing SISSOKO : Chirurgie Générale  
Mr Issa DIARRA : Gynéco-Obstétrique  
Mr Youssouf COULIBALY : Anesthésie - Réanimation  
Mr Samba Karim TIMBO : O.R.L.  
Mme TOGOLA Fanta KONIPO : O.R.L.

#### 5. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mme Djénéba DOUMBIA : Anesthésie / Réanimation  
Mr Mamadou L. DIOMBANA : Stomatologie  
Mr Sékou SIDIBE : Orthopédie - Traumatologie  
Mr Abdoulaye DIALLO : Anesthésie - Réanimation  
Mr Tiéman COULIBALY : Orthopédie - Traumatologie  
Mme TRAORE J. THOMAS : Ophtalmologue  
Mr Nouhoum ONGOÏBA : Anatomie & Chirurgie Générale  
Mr Zanafon OUATTARA : Urologie  
Mr Zimogo Zié SANOGO : Chirurgie Générale  
Mr Adama SANGARE : Orthopédie - Traumatologie  
Mr Sanoussi BAMANI : Ophtalmologie  
Mr Doulaye SACKO : Ophtalmologie  
Mr Ibrahim ALWATA : Orthopédie - Traumatologie  
Mr Lamine TRAORE : Ophtalmologie  
Mr Mady MAKALOU : Orthopédie/ Traumatologie  
Mr Aly TEMBELY : Urologie

Mr Niani MOUNKORO	Gynécologie/ Obstétrique
Mr Tiémoko D. COULIBALY	Odontologie
Mr Souleymane TOGORA	Odontologie
Mr Mohamed KEITA	ORL

### D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

#### **1. PROFESSEURS**

Mr Daouda DIALLO :	Chimie Générale & Minérale
Mr Siné BAYO :	Anatomie-Pathologie-Histoembryologie
Mr Amadou DIALLO :	Biologie
Mr Moussa HARAMA :	Chimie Organique
Mr Ogobara DOUMBO :	Parasitologie – Mycologie

#### **2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES**

Mr Yénimégué Albert DEMBELE :	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA :	Immunologie- <b>Chef de D.E.R.</b>
Mr Amadou TOURE :	Histoembryologie
Mr Flabou BOUGOUDOGO :	Bactériologie – Virologie

#### **3. MAÎTRES DE CONFERENCES**

Mr Bakary M. CISSE :	Biochimie
Mr Abdrahamane S. MAÏGA :	Parasitologie
Mr Adama DIARRA :	Physiologie
Mr Mamadou KONE :	Physiologie
Mr Massa SANOGO :	Chimie Analytique

#### **4. MAÎTRES ASSISTANTS**

Mr Mahamadou CISSE :	Biologie
Mr Sékou F. M. TRAORE :	Entomologie médicale
Mr Abdoulaye DABO :	Malacologie – Biologie Animale
Mr Abdrahamane TOUNKARA :	Biochimie
Mr Ibrahim I. MAÏGA :	Bactériologie – Virologie
Mr Moussa Issa DIARRA :	Parasitologie
Mr Amagana DOLO :	Biophysique
Mr Kaourou DOUCOURE :	Biologie
Mr Bouréma KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane DIALLO	Bactériologie/ Virologie
Mr Cheick Bougadari TRAORE	Anatomie pathologie
Mr Lassana DOOUMBIA	Chimie Organique

## 5. ASSISTANTS

Mr Mounirou BABY :	Hématologie	
Mr Mahamadou A. THERA :	Parasitologie	
Mr Mangara M. BAGAYOKO	Entomologie	Moléculaire
Médicale		
Mr Guimogo DOLO	Entomologie	Moléculaire
Médicale		
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie	Moléculaire
Médicale		
Mr Djbril SANGARE	Entomologie	Moléculaire
Médicale		
Mr Mouctar DIALLO	Biologie/ Parasitologie	
Mr Boubacar TRAORE	Immunologie	
Mr Bokary SACKO	Biochimie	

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

**1. PROFESSEURS**

Mr Abdoulaye Ag RHALY :	Médecine Interne
Mr Mamadou K. TOURE :	Cardiologie
Mr Mahamane MAÏGA :	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE :	Psychiatrie – <b>Chef de D.E.R.</b>
Mr Moussa TRAORE:	Neurologie
Mr Issa TRAORE :	Radiologie
Mr Mamadou M. KEITA :	Pédiatrie
Mr Hamar A. TRAORE :	Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO :	Hématologie
Mr Moussa Y. MAIGA	Gastro-entérologie/ Hépatologie

**2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES**

Mr Toumani SIDIBE :	Pédiatrie
Mr Bah KEITA :	Pneumo-Phtisiologie
Mr Boubacar DIALLO :	Cardiologie
Mr Somita KEITA :	Dermato-Léprologie
Mr Abdel Kader TRAORE :	Médecine Interne
Mr Siaka SIDIBE :	Radiologie

**3. MAÎTRES ASSISTANTS**

Mr Mamadou DEMBELE :	Médecine Interne
Mr Mamady KANE :	Radiologie
Mr Tatiana KEITA :	Pédiatrie
Mme TRAORE Mariam SYLLA :	Pédiatrie
Mr Adama D. KEITA :	Radiologie

Mme SIDIBE Assa TRAORE : Endocrinologie  
Mme Habibatou DIAWARA : Dermatologie

#### 4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Bou DIAKITE : Psychiatrie  
Mr Bougouzié SANOGO : Gastro-entérologie  
Mr Saharé FONGORO : Néphrologie  
Mr Bakoroba COULIBALY : Psychiatrie  
Mr Kassoum SANOGO : Cardiologie  
Mr Seydou DIAKITE : Cardiologie  
Mr Mahamadou B. CISSE : Pédiatrie  
Mr Arouna TOGORA : Psychiatrie  
Mme Diarra Assétou SOUCKO : Médecine interne  
Mr Boubacar TOGO : Pédiatrie  
Mr Mahamadou B. TOURE : Radiologie  
Mr Idrissa A. CISSE : Dermatologie  
Mr Mamadou B. DIARRA : Cardiologie  
Mr Anselme KONATE : Hépato-gastro-entérologie  
Mr Moussa T. DIARRA : Hépato-gastro-entérologie  
Mr Souleymane DIALLO : Pneumologie  
Mr Souleymane COULIBALY : Psychologie  
Mr Daouda MINTA : Maladies infectieuses  
Mr Soungalo DAO : Maladies infectieuses

#### 5. ASSISTANT

Mr Cheick Oumar GUINTO : Neurologie

D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

**1. PROFESSEUR**

Mr Boubacar Sidiki CISSE :	Toxicologie
Mr Gaoussou KANOUTE	Chimie Analytique. <b>Chef de D.E.R</b>

**3. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES**

Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique
--------------------	--------------------

**3. MAITRES DE CONFERENCES**

Mr Boulkassoum HAIDARA	Législation
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie

**4. MAÎTRES ASSISTANTS**

Mr Benoît KOUMARE	Chimie analytique
Mr Drissa DIALLO :	Matières Médicales
Mr Alou KEITA :	Galénique
Mr Ababacar I. MAÏGA :	Toxicologie
Mr Yaya KANE :	Galénique

**5. ASSISTANTS**

Mme Rokia SANOGO	Pharmacognosie
Mr Saibou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire

## **D.E.R. SANTE PUBLIQUE**

### **1. PROFESSEUR**

Mr Sidi Yaya SIMAGA : Santé Publique – **Chef de D.E.R.**

### **2. MAÎTRE DE CONFERENCES AGREGE**

Mr Moussa A. MAÏGA : Santé Publique

### **3. MAÎTRE DE CONFERENCES**

Mr Sanoussi KONATE : Santé Publique

### **4. MAÎTRES ASSISTANTS**

Mr Bocar G. TOURE : Santé Publique

Mr Adama DIAWARA : Santé Publique

Mr Hamadoun SANGHO : Santé Publique

Mr Massambou SACKO : Santé Publique

***Mr Moussa A. DICKO*** ***Santé Publique***

### **5. ASSISTANTS**

Mr Samba DIOP Anthropologie Médicale

Mr Seydou DOUMBIA Epidémiologie

Mr Oumar THIERO Biostatistique

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA :	Botanique
Mr Bouba DIARRA :	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO :	Physique
Mr Boubacar KANTE :	Galénique
Mr Souleymane GUINDO :	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA :	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA :	Nutrition
Mme MAÏGA Fatoumata SOKONA :	Hygiène du Milieu
Mr Mahamadou TRAORE :	Génétique
Mr Yaya COULIBALY :	Législation

**ENSEIGNANTS EN MISSION**

Pr. Doudou BA :	Bromatologie
Pr. Babacar FAYE :	Pharmacodynamie
Pr. Eric PICHARD :	Pathologie Infectieuse
Pr. Mounirou CISS :	Hydrologie
<i>Pr. Amadou Papa DIOP :</i>	<i>Biochimie</i>

## **DEDICACES**

Je dédie ce Travail:

A Allah, le tout puissant, le clément et le miséricordieux par ta bonté et ta grâce, tu m'as permis de mener à terme ce travail si long et pénible. J'implore la santé, la foi et la longévité pour pouvoir réaliser davantage mes vœux.

### **A la mémoire de mon père feu El hadj ALZOUMA Younsa.**

J'ai été touché par la confiance que tu m'as accordée dès les premiers pas de ma vie.

Tu aurais aimé vivre cet instant mémorable qui voit l'aboutissement de tous les sacrifices consentis. Tu n'as ménagé aucun effort pour mon éducation qui porte aujourd'hui son premier fruit.

Cher père repose en paix dans la grâce de Dieu pour le repos éternel car tu n'as pas vécu inutilement.

### **A ma mère Hadjia Halimatou Souleymane.**

En souvenir des moments passés à tes cotés et de ton souci de faire de nous des hommes préparés pour la vie. Tu as toujours été soucieuse de l'avenir de toute la famille. Ce travail est un modeste témoignage de tous les sacrifices que tu as consentis.

Que Dieu le tout puissant puisse te garder encore longtemps parmi nous.

### **A ma grande mère Hadjia Kadi Hamidou.**

Tu n'as ménagé aucun effort pour la réussite de tes petits fils. Trouve en ce travail le témoignage de ma reconnaissance.

### **En mémoire de mes grand parents Alzouma, Radi et Souleymane.**

Sur tous les fronts vous avez toujours assisté, soutenu, chéri, conseillé et encouragé. J'ai profondément ressenti votre disparition. Mes chers grands parents, dormez en paix dans la grâce de l'ETERNEL.

**A mon mari AMOS David Daouda.**

Tu as été toujours disponible pour moi sur tous les plans aux mauvais comme aux bons moments. Tu es le mari le plus merveilleux. Je remercie le tout puissant Allah de t'avoir mis sur mon chemin et je souhaite le poursuivre avec toi le plus longtemps possible.

**A mon fils AMOS Mohamed Nourdine.**

Tu es le plus beau, le plus adorable et gentil des enfants. Que Dieu te bénisse et t'accorde longue vie.

**A mes frères et sœur Amadou ALZOUMA, Abdoul Kader ALZOUMA, Mohamed Moctar ALZOUMA, Laila ALZOUMA, et Abdoul Rachid ALZOUMA.**

Sources perpétuelles d'émotion, d'affection, d'inspiration et d'espoir. Que le TOUT PUISSANT puisse raffermir chaque jour nos liens. Considérez ce modeste travail comme une esquisse de chemin que je voudrais vous montrer afin de susciter chez vous beaucoup de courage.

**A la mémoire de mon tuteur Elhadj Amadoun Assoumane CISSE.**

Sur tous les fronts tu m'as toujours assisté, soutenu, chéri, conseillé et encouragé. J'ai profondément ressenti votre disparition. Mon cher tonton, dort en paix dans la grâce de l'ETERNEL.

**A tous mes oncles paternels et maternels.**

Merci de vos efforts constants pour le renforcement des liens entre nos familles. Trouvez ici l'expression de mon profond attachement aux valeurs que vous cultivez.

Ce travail est le vôtre.

**A mes tantes : Haoua, Safia, Rakia, Ramatou, Hadjara, Biba, Hassia, Hamsa, Mariama**

Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi et toute la famille.  
Ce travail est le vôtre

**A mes cousins et cousines plus jeunes que moi,**

Considérez ce modeste travail comme une esquisse de chemin que je voudrais vous montrer afin de susciter chez vous beaucoup de courage.

**Au Dr Ousmane KOITA,** Vous m'avez initié à cette nouvelle technique de biologie moléculaire avec une disponibilité totale, un amour profond pour le travail bien fait. Vos conseils et surtout votre patience ont contribué à améliorer la qualité technique de ce travail. Mes remerciements pour l'enseignement reçu.

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent:

A mon oncle Tinni Tahirou, mes reconnaissances sincères pour la confiance que tu m'as accordée. Ce travail est le tien.

A toute la famille Bidiga au Burkina Faso, Vous avez contribué de près ou de loin à ma réussite, veuillez trouver ici l'expression de profond amour et de mon sincère attachement. Merci de l'effort consenti pour les liens familiaux.

A la famille OUATTARA à Bamako, toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

A la famille Barké au Niger, toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

A toute la famille Cissé à Bamako et à Goundam, toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

A la famille Harouna Soumaïla à Bamako, mes sincères remerciements.

A toute la promotion 1997–2002 de la FMPOS.

Mes sincères remerciements en souvenir de la solidarité et le courage dont nous avons fait preuve durant ces quelques années.

A mon amie Nafissa Hassane Kouka, toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

A mes amis Kader et sa femme, toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

A mes compatriotes de promotion, trouvez ici l'expression de mon profond attachement. Que DIEU le tout puissant fasse que nous continuions dans la voie que nous nous sommes tracée.

A toute la colonie estudiantine Nigérienne à Bamako, merci pour votre assistance.

A ma camarade de promotion du LBMA: Djènéba Comba Dabitaou, merci pour ta bonne collaboration.

A mes cadets du LBMA: Ousmane Cissé, Moussa Cissé, Ousmane Maïga, Penda Tcham, Hadiza Gao, Salimatou Samaké, Issoufou, Aïssata Cissé, Ousmane Touré, Maïga, Ibrahima Zan Doumbia, Mahamadou Sangaré, Benjamin Coulibaly, Cheick, Zibo, Karim, Salif Mangara, Mahamoudou Dicko. Merci pour votre collaboration, bon courage et plein succès et surtout de la patience.

A tous mes aînés D<sup>R</sup> Aliou Sissako, D<sup>R</sup> Aliou Coulibaly, Mahamadou Ibrah, D<sup>R</sup> Bagayoko Mamadou, D<sup>R</sup> Salamatou Alzouma, D<sup>R</sup> Mariam N'Diaye, D<sup>R</sup> Lansana Sangaré, D<sup>R</sup> Mamadou Mounkoro, Mariam N'Diaye, C'est le lieu de vous réitérer toute ma reconnaissance et mon profond respect. Encore merci pour tous les services rendus et surtout de vos soutiens et conseils permanents. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

Aux étudiants de DEA: Bintou, Rabi, Ousseini, Assan, Fanta. Merci pour votre bonne collaboration.

A la secrétaire Kadiatou Bamba et les informaticiens Amadou et Ayouba. Merci pour votre bonne collaboration.

A toute la population de Missira.

Performances diagnostiques du test rapide OptiMAL-IT

Merci pour votre bonne collaboration.

Aux manœuvres et gardiens de LBMA: Madou, Fofana, Sidi, René.

## AUX MEMBRES DU JURY

A notre président de jury.

### **Monsieur le Professeur Ousmane Doumbia**

- ❖ **Maître de conférences agrégés**
- ❖ **Professeur en Pharmacie chimique à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.**

Cher maître, vous nous faites l'honneur de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Vos qualités humaines, sociales, et scientifiques font de vous un maître respectable et admiré. Nous avons très tôt compris l'intérêt que vous portez à ce travail. Nous vous prions cher maître d'accepter nos remerciements.

A notre maître et juge:

### **Monsieur le Docteur Seydou Doumbia,**

- ❖ **D<sup>R</sup> en Médecine, *Ph.D* en Epidémiologie**
- ❖ **Assistant de Santé Publique, FMPOS.**
- ❖ **Chef de l'unité d'Epidémiologie et système d'information Géographique au Malaria Research and Training Center, FMPOS.**

Nous sommes très honorés par votre présence dans ce jury de thèse. Vos qualités humaines et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail ont beaucoup attiré notre attention. Vous avez apporté un concours appréciable à la réalisation de ce travail. Veuillez recevoir nos vifs remerciements.

A notre maître et juge:

**Monsieur le Docteur Madama Bouaré**

- ❖ **Entomologiste**
- ❖ **Chargé de cours de Biologie cellulaires et d'entomologie à la Faculté des sciences et techniques.**

Nous avons toujours admiré votre courtoisie et votre disponibilité au cours de notre formation. Vos conseils et suggestions ont amélioré la qualité de ce travail. Veuillez croire cher maître l'expression de notre respectueuse considération.

A notre maître et co-directeur de thèse.

**Monsieur le Docteur Ousmane Koita**

- ❖ **Pharmacien biologiste, PhD en Biologie Moléculaire.**
- ❖ **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée à la faculté de Science et Techniques, Bamako, Mali.**
- ❖ **Directeur adjoint du programme de recherche NIAD (NIH) FMPOS sur le SIDA et la tuberculose.**
- ❖ **Chargé de cours de biologie Moléculaire à la FAST, Bamako.**
- ❖ **Chargé de cours de biologie animale à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.**

Cher maître, nous vous remercions de la confiance que vous nous avez faite en nous proposant ce travail. Nous avons vite apprécié vos qualités scientifiques, humaines et surtout votre amour pour le travail bien fait. Ces qualités couplées à votre simplicité et votre générosité font de vous un maître exemplaire. Homme de terrain, vous avez cultivé en nous l'esprit

d'équipe, le dévouement, l'endurance et la persévérance; des qualités sans doute indispensables à la réalisation d'un travail scientifique et qui nous aideront dans les combats futurs. Nous sommes très honorés d'être parmi vos élèves. Soyez assuré cher maître de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.

A notre maître et directeur de thèse

**Monsieur le Professeur Amadou Diallo**

- ❖ **Professeur agrégé de Zoologie à la FMPOS**
- ❖ **Professeur chargé de cours de Biologie animale et de Zoologie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.**
- ❖ **Vice recteur de l'université de Bamako, Mali.**

Nous avons beaucoup admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques.

Tout au long de ce travail vous nous avez prodigué des conseils judicieux et contribué à l'amélioration de sa qualité. Votre simplicité, votre disponibilité et surtout votre souci constant pour notre formation, forcent l'admiration et font de vous un maître de référence. Nous sommes honorés par votre présence dans ce jury. Nous vous sommes très reconnaissants et vous exprimons toute notre gratitude.

## Sommaire

	Page
<b>I Introduction</b>	1
<b>II Objectifs</b>	5
1- Objectif général	5
2- Objectifs spécifiques	5
<b>III Généralités</b>	
1- Définition	6
2- Cycle biologique de <i>Plasmodium falciparum</i>	7
3- Epidémiologie du paludisme	9
4- Physiologie et Physiopathologie	10
4-1 Physiologie	10
4-2 Physiopathologie	13
5- Techniques de diagnostic biologique du Plasmodium	16
5-1 Techniques d'identification morphologique: Goutte Epaisse, Frottis mince	16
5-2 Techniques d'identification morphologique	19
5-3 Techniques de diagnostic immunologique	20
5-4 Techniques de diagnostic immunoenzymatique	20
5-5 L'amplification <i>in vitro</i> de l'ADN ou «Polymerase Chain Reaction» (PCR)	22
6- LDH	23
<b>IV Méthodologie</b>	
1 Cadre et lieu de l'étude	27
2 Hydrographie	28
3 Structure actuelle de la population	28
4 Type de l'étude	31
5 Période de l'étude	31
M <sup>me</sup> AMOS Fatoumata ALZOUMA Younsa LBMA/ FMPOS	21

6 Critères d'inclusion et de non inclusion	31
6-1 Critères d'inclusion	31
6-2 Critères de non inclusion	31
7 Echantillonnage	31
8 Gestions et exploitations statistiques des données	31
9 Considérations éthiques	32
10 Techniques d'analyse	32
10-1 Variables cliniques	32
10-2 Variables sociodémographiques	34
10-3 Variables biologiques	34
10-3-1 Goutte épaisse et frottis mince	34
10-3-1 Réalisation de la goutte épaisse	34
10-3-1-3 Préparation du giemsa	34
10-3-2 Dosage de l'hémoglobine par le test de l'hémocue	36
10-3-2-1 Matériels et réactifs	36
10-3-2-2 Protocole	37
10-3-3 Le test optimal	37
10-3-3-1 Matériels et réactifs	37
10-3-3-2 Protocole	38
10-3-3-3 Interprétation des résultats	39
10-3-4 Techniques de PCR	39
10-3-4-1 Confection des confettis	39
10-3-4-2 Extraction de l'ADN plasmodial	40
10-3-4-3 Préparation des mélanges réactionnels	41
10-3-4-4 Protocole opératoire	43
10-3-4-5 Séquence de LDH	46
10-3-4-6 Préparation du gel à 2%	47
10-3-4-7 Révélation des produits amplifiés	47
10-3-4-8 Interprétation des résultats	47
10-3-5 séquençage de gène	48
10-3-5-1 Purification des amplicons	48

10-3-5-2 Cycle de séquençage	48
10-3-5-3 Préparation de plaques de Séphadex	49
10-3-5-4 Purification des produits de séquençage	49
<b>V Résultats</b>	<b>50</b>
<b>VI Commentaire et Discussions</b>	<b>66</b>
1 Méthodologie	66
2 Caractères sociodémographiques de la population	67
3 Prévalence de l'infection palustre chez les enfants	68
4 Distribution de la densité parasitaire	69
5 Etude comparative de la goutte épaisse et de l'Optimal-IT	70
6 Etude comparative de la goutte épaisse du test Optimal et de la PCR	72
7 Etude du polymorphisme nucléotidique du LDH	72
<b>VII Conclusion</b>	<b>74</b>
<b>VIII Recommandations</b>	<b>75</b>
<b>IX Références bibliographiques</b>	<b>77</b>
<b>X Annexe</b>	<b>85</b>

## Liste des figures

	<b>Page</b>
1- Cycle biologique du Plasmodium	7
2- Cycle glycolytique d'Embden Meyerhoff	12
3- Pathogenèse du Paludisme grave	14
4- Réalisation de la goutte épaisse et frottis mince	19
5- Cycle de Krebs	24
6- Test Optimal	26
7- Cartographie de la région de Missira	30
8- Classification des splénomégalies selon Hackett	33
9- Confettis en spot	40
10- PCR nichée	45
11- Séquence du gène de PfLDH (AF 251291)	46
12- Résultat de la PCR à laquelle l'échantillon 3216 a été positif aux amorces EBA-175.	58
13- Résultat de la PCR à laquelle l'échantillon 3162 a été positif aux amorces RO33.	59
14- Résultat de la PCR à laquelle l'échantillon 3113 a été positif aux amorces RO33.	60
15- Résultat de la PCR à laquelle les échantillons 412, 3162, 3216 ont été positifs aux amorces RTLDH.	61
16- Alignement de la séquence nucléotidique de l'échantillon 3162 avec la séquence PfLDH (AF251291).	62
17- Alignement de la séquence nucléotidique de l'échantillon 3216 avec la séquence PfLDH (AF251291).	64

## Liste des Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
APAD	Adénine pyridine Acétyl Dinucléotide
CHME	Centre Hospitalier Mère Enfant, le Luxembourg
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
DDT	Dichloro Diphényle Trichloracétique
°C	Degré Celsius
dNTP	Dinucléotide Triphosphate
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAST	Faculté des Sciences Techniques
FM	Frottis mince
FMPOS	Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odontostomatologie
GE:	Goutte épaisse
GPI:	Glycosyl phosphatidyl inositol
HP/ $\mu$ l	Hématie parasitée par microlitre
HRP-2	Histidine-Rich Protein-2
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFI	Immunofluorescence Indirect
IGM	Institut Géographique du Mali
IL-1, IL-6:	Interleukine 1, 6
IL-1 $\alpha$ :	Interleukine Alpha
kDa	Kilo Dalton
LBMA	Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
LDH	Lactate Déshydrogénase
ml	millilitre
mM	milli Mole
$\mu$ l	microlitre
mn	minute
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de Magnésium

MSP-1	Mérozoïte Surface Protein-1
MSP-2	Mérozoïte Surface Protein-2
NAD	N-Acétyl Dinucléotide
nm	nanomètre
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffered Saline
PfEMP1	<i>P. falciparum</i> Erythrocyte Membrane Proteine 1.
Récepteurs potentiels pour le <i>P. falciparum</i> dans les phénomènes de cytoadhérence.	
pLDH	<i>Plasmodium</i> Lactate déshydrogénase
PfLDH	<i>Plasmodium falciparum</i> Lactate Déshydrogénase
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne).
QBC	Quantity Buffy Coat
TBE	Tris Borate E DTA
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor Alpha
INF- $\gamma$	Interféron Gamma
UNICEF	The United Nations Children's Fund
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VPN	Valeur Prédicative Négative
VPP	Valeur Prédicative Positive

## Liste des tableaux

	<b>Page</b>
<b>Tableau I:</b> répartition de l'échantillon en fonction du sexe et de l'âge .....	50
<b>Tableau II:</b> taux de prévalence estimé par les deux tests (la goutte épaisse et le test OptiMAL-IT). .....	50
<b>Tableau III:</b> comparaison des résultats du test OptiMAL-IT par rapport à la goutte épaisse. .....	51
<b>Tableau IV:</b> résultats du test OptiMAL-IT en fonction des différentes classes de la parasitémie. .....	52
<b>Tableau V :</b> résultats de la parasitémie en fonction de l'âge .....	53
<b>Tableau VI :</b> étude comparative des résultats du test OptiMAL-IT et de la goutte épaisse en fonction des espèces de plasmodies. .....	53
<b>Tableau VII:</b> sensibilité du test OptiMAL-IT sur les différents stades parasitaires de <i>Plasmodium falciparum</i> . .....	54
<b>Tableau VIII:</b> répartition de l'indice plasmodique (goutte épaisse, test OptiMAL-IT) en fonction de l'âge. .....	55
<b>Tableau IX :</b> relation entre la positivité à la goutte épaisse, au test OptiMAL-IT et l'état fébrile des patients. .....	56
<b>Tableau X:</b> relation entre la positivité de la goutte épaisse et le taux d'hémoglobine .....	56

**Tableau XI** : les échantillons concordants et discordants par la goutte épaisse et le test OptiMAL-IT.

..... 57

**Tableau XII**: répartition des échantillons traités par la technique de la PCR nichée de MSP-1.

..... 57

**Tableau XIII** : étude comparative du test OptiMAL-IT par rapport à la PCR de MSP-1..... 58

**Tableau XIV**: prévalence des allotypes de la MSP-1 des échantillons discordants positifs à la PCR.

..... 59

## I. INTRODUCTION

En ce début de 3<sup>ème</sup> millénaire le paludisme reste encore l'endémie la plus grave dans le monde et particulièrement dans les pays tropicaux (Molyneux, 1998).

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante dû à la présence dans l'organisme d'un hématozoaire de genre *Plasmodium*. Il est transmis par les piqûres des femelles infestées de moustiques appartenant au genre *Anophèles*. Il existe quatre espèces de plasmodies inféodées à l'homme: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*. Le *plasmodium falciparum* est l'espèce la plus répandue et la plus redoutable. On lui attribue 85 à 95% de la formule parasitaire au Mali. Elle est responsable de 13% de mortalité et 15,6% de morbidité chez les enfants au Mali (Diani, 1985). Ces taux de mortalité et morbidité élevées ont un impact considérable sur le développement socio-économique des populations en zone d'endémie.

En Afrique, les régions au sud du Sahara sont les plus touchées. Dans cette zone chaque enfant fait au moins un accès palustre par saison de transmission qui coïncide généralement avec la période des travaux champêtres.

Selon les estimations de l'OMS les coûts directs et indirects en Afrique subsaharienne dépasseraient les 2 milliards de dollars par an (OMS, 1998). Les femmes enceintes et les enfants constituent la première cible de cette maladie. En effet, au Mali 16 à 28% des enfants de 0 à 5 ans en meurent chaque année et 42% des femmes enceintes présentent des signes d'anémies (DEAP, 1993). Elles sont quelque fois exposées à des avortements spontanés, d'hypotrophie fœtale (OMS, 2001). Vu l'impact de cette maladie sur l'économie, le Mali depuis 1993 dispose d'un programme national de lutte contre le paludisme (PNLP). Dans le monde, la transmission du paludisme est assurée par plusieurs espèces d'*Anophèles*. Les principaux sont: *Anopheles gambiae* S.l. (Gilles, 1902) et *Anopheles funestus* (Giles, 1900). Les études effectuées par Touré et al. en 1979, 1983, 1984 ont montré que le complexe *An. gambiae* et *An. funestus* sont les principaux vecteurs rencontrés au Mali. En plus, les études cytogénétiques

effectuées à Banambani et à Sélinkényi ont montré que le complexe *A. gambiae* est composé d'*A. arabiensis* et de trois formes chromosomiques d'*A. gambiae* s.s dénommées: Bamako, Savane, et Mopti. Ces formes chromosomiques contribuent toutes à la transmission du paludisme et la filariose de Bancroft (Touré, 1989).

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme glycolytique soluble exprimée à concentration élevée au cours de la phase asexuée des parasites de paludisme (Piper ,1999). Elle utilise le 3-acétyl pyridine adénine dinucléotide NAD (APAD) comme coenzyme dans la principale réaction de formation de la pyruvate à partir de la lactate (Makler and David J. Hinrihs, 1989, 1993). Cette enzyme possède des orthologues chez les vertébrés et sont prédominants dans plusieurs organes comme le muscle squelettique, les tissus aérobie, le sperme des mammifères, des oiseaux et chez les poissons. L'activité de la LDH du parasite (pLDH) est en corrélation avec la densité de parasites en culture *in vitro* de *Plasmodium* et aussi dans le plasma des patients infectés déterminés par microscopie (Makler, 1993; Makler & Hinrichs, 1993; Moody, 2000; Piper, 1996). Hormis les techniques morpho parasitaires classiques qui sont la goutte épaisse et le frottis mince, de nouveaux tests de diagnostic rapides sont actuellement disponibles. Il s'agit notamment des tests immunochromatographiques telles que l'OptiMAL-IT dont le principe est basé sur la détection de la pLDH et le Parasight-F® qui permet la détection de l'Histidine Rich Protein II. Outre l'espèce *P. falciparum*, le test OptiMAL-IT permet de distinguer le gène LDH des autres espèces de *Plasmodium* (*malariae*, *ovale* et *vivax*). Cette capacité de mise en évidence de toutes les espèces est particulièrement importante dans les pays où les différentes espèces de *Plasmodium* coexistent (Ferro, 2002, Koita et al., 2004). Ce test utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre les métabolites enzymatiques intracellulaires du pLDH présents et libérés par les érythrocytes infectés (Ricci et al, 2000). La prise en charge des patients ayant le paludisme passe par un diagnostic rapide et précis.

Plusieurs études (Jamshaid Iqbal et al, 2002; Moody, 2002) de part le monde ont validé les paramètres diagnostics du test OptiMAL-IT par rapport à la goutte

épaisse, ces études ont mis en évidence des faux négatifs, c'est-à-dire des échantillons positifs à la goutte épaisse et négatifs au tests Parasight-F<sup>®</sup> et OptiMAL-IT (Limangeni Mankhambo et al, 2001). Le polymorphisme du gène codant pour la pLDH n'a cependant pas été exploré dans les conditions de terrain.

Le diagnostic du paludisme repose actuellement sur la mise en évidence du parasite par la microscopie. Ainsi les techniques basées sur les éléments morphologiques du parasite nécessitent un personnel qualifié, un microscope et les colorants. Cela constitue un handicap dans les pays en voie de développement où il y a peu de microscopistes qualifiés. L'arrivée sur le marché des tests de diagnostic rapide a permis d'envisager l'utilisation de ces méthodes de diagnostic rapide dans les centres de santé périphériques. La prise en charge des cas de paludisme nécessite un diagnostic rapide. Ces tests d'immunocapture tels que l'OptiMAL-IT, le Parasight-F<sup>®</sup> sont les tests indiqués à cet effet. Ces tests sont basés sur des antigènes plasmodiaux dont les séquences codantes sont connues. La grande diversité génomique de l'espèce *P. falciparum* mérite que ces tests de diagnostic rapides fassent une étude approfondie afin d'évaluer *in vitro* le polymorphisme du gène de l'espèce plasmodiale utilisée dans le test. Une telle étude faite sur le gène HRP-II de *P. falciparum* a montré que 2,5% des espèces plasmodiales présentes au Mali n'ont pas le gène HRP-II utilisé dans le test Parasight-F<sup>®</sup> (Koïta, 2000). Ceci se traduit par un test à base d'HRP-II négatif alors que la goutte épaisse était positive. Plusieurs mécanismes interviennent dans le polymorphisme génétique: le gène HPR-II situé sur la partie subtélomérique du chromosome du parasite (Wellems et al., 1987) se perd lors de la culture *in vitro*. Dans le cas de PfLDH, il semblerait que des mutations ponctuelles peuvent se produire le long de ce gène. La question à laquelle nous tentons de répondre est de savoir si des mutations ponctuelles au niveau du gène de PfLDH entraîneraient une altération antigénique empêchant le test OptiMAL-IT de détecter la présence du parasite. Ainsi nous voulons vérifier cette hypothèse en testant les performances diagnostiques du test rapide OptiMAL-IT et voire la place de la biologie

moléculaire dans l'évaluation du polymorphisme génétique de la lactate déshydrogénase (LDH) de *Plasmodium falciparum*.

## II. OBJECTIFS

### 1-Objectif général.

Evaluer les paramètres diagnostiques du test OptiMAL-IT par rapport à la goutte épaisse et évaluer le polymorphisme du gène codant pour la lactate déshydrogénase (LDH) de *Plasmodium falciparum* dans le village de Missira.

### 2-Objectifs spécifiques.

- Estimer la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* dans la zone d'étude par la détermination de la séquence nucléotidique du gène PfLDH.
- Estimer la spécificité et la sensibilité du test OptiMAL-IT par rapport à la goutte épaisse, au frottis mince et à la PCR.
- Déterminer la valeur prédictive négative (VPN), la valeur prédictive positive (VPP) et la concordance Kappa du test OptiMAL-IT par rapport à la goutte épaisse et à la PCR.

### III. GENERALITES

#### 1- Définition

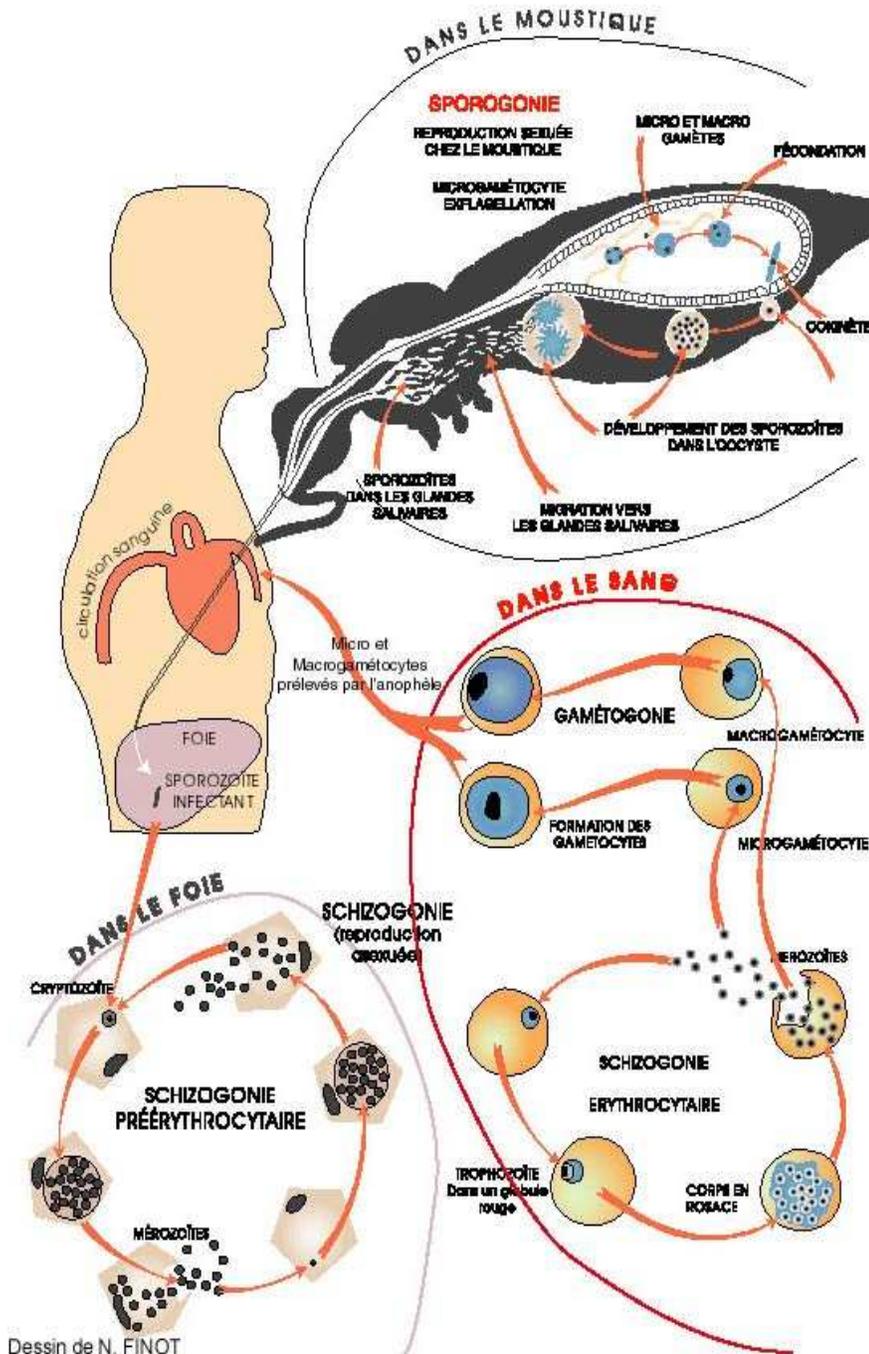
Le paludisme est une protozoose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par un moustique, l'anophèle femelle. Le paludisme est très répandu dans le monde, et est la première endémie mondiale: 2 milliards de personnes sont exposées et 300 millions infectées (OMS, 2001). Il s'agit de la première cause de mortalité infantile dans les pays en voie de développement. Il y a 4 espèces qui sont inféodées à l'homme. La létalité est due à l'espèce *Plasmodium falciparum*.

Selon l'UNICEF, le paludisme tue un enfant africain toutes les 30 secondes et demeure l'une des plus graves menaces pour les femmes enceintes et leurs nouveau-nés. Le paludisme est responsable de la mortalité périnatale, de faible poids de naissance et d'anémie maternelle (OMS, 2001).

Quatre vingt-dix pour cent (90%) de décès dus au paludisme surviennent en Afrique, au Sud du Sahara, principalement chez les enfants de 0 à 5 ans. De nombreux enfants qui survivent à un accès du paludisme grave peuvent présenter des séquelles qui ont un impact sur leur capacité cognitive (OMS, 2003).

## 2- Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*.

Le cycle de développement du parasite est assez complexe. Il comporte une phase sexuée (sporogonie) qui se passe chez le moustique et une phase asexuée (schizogonie) qui se déroule chez l'homme.



**Figure 1:** Schéma du cycle biologique du *Plasmodium*.

### Chez l'homme.

Le cycle se caractérise par une phase tissulaire hépatique ou pré-érythrocytaire et une phase intra-érythrocytaire.

- Schizogonie intra hépatique: Les sporozoïtes inoculés dans les capillaires de l'homme par l'anophèle au cours du repas sanguin pénètrent les hépatocytes. Ils se multiplient rapidement et leurs noyaux se divisent pour donner les schizontes hépatocytaires ou corps bleus. L'hépatocyte éclate et libère les mérozoïtes de première génération qui passent dans la circulation sanguine. Cette phase est asymptomatique elle dure en moyenne de 7-9 jours chez *Plasmodium falciparum*. Des formes dormantes appelées hypnozoïtes ont été observées chez *P. ovale* et *P. vivax*.

- Schizogonie intra-érythrocytaire:

Après l'éclatement de l'hépatocyte, les mérozoïtes pénètrent rapidement dans l'érythrocyte. Celui-ci augmente de taille et donne naissance au trophozoïte jeune qui se nourrit de l'hémoglobine, se divise et donne le schizonte multi nucléé. Le développement ultime du schizonte se termine par l'éclatement du globule rouge et la libération des mérozoïtes de deuxième génération. Toutes les 36-48 heures les mérozoïtes vont réinfecter de nouvelles hématies. Ce cycle intra-érythrocytaire est responsable de la pathologie liée au paludisme. Les tests du ParaSight-F® et de l'OptiMAL-IT s'intéressent à cette partie du cycle biologique du parasite lorsque les antigènes plasmodiaux sont libérés dans la circulation sanguine.

Au bout de plusieurs cycles schizogoniques intra érythrocytaires apparaissent dans le sang des gamétocytes. Ces derniers seront ingérés par l'anophèle femelle lors d'un nouveau repas sanguin et amorceront la phase sexuée sporogonique du cycle.

### Chez l'anophèle femelle.

Le gamétocyte mâle se différencie en plusieurs gamètes mâles et le gamétocyte femelle donne un seul gamète femelle.

La fusion d'un gamète mâle et femelle a lieu dans l'intestin moyen du moustique (ou estomac). Il en résulte un oeuf mobile (ookinète) qui traverse la paroi

gastrique et devient l'oocyste qui est la forme immobile. La division de l'oocyste aboutit à la formation d'un grand nombre de sporozoïtes mobiles qui gagnent activement les glandes salivaires du moustique pour être inoculés à l'homme lors d'une piqûre.

### 3- Epidémiologie du paludisme.

Le paludisme pose un problème majeur de santé publique. Plus de 112 millions de cas annuels de paludisme sont observés dans le monde dont 85% en Afrique (OMS, 1992).

En Afrique 1 à 2 millions de décès par an sont attribués au paludisme (OMS, 1992). Le paludisme est une infection parasitaire qui sévit surtout dans les régions tropicales: Sud-est de l'Asie, Moyen Orient, Amérique Latine et Afrique au Sud du Sahara. La maladie est causée par 4 espèces de parasite qui sont *P. falciparum* et *P. malariae* (observées sur tous les continents), *P. ovale* (Afrique, est moins fréquente ailleurs) et *P. vivax* (Asie, Afrique et moins fréquente ailleurs). L'indice du paludisme est fonction de l'intensité de la transmission. Le programme de contrôle du paludisme de l'OMS entamé en 1993 a été une réussite dans certaines zones. Cependant certains pays connaissent des difficultés dans la lutte contre la maladie, surtout en Afrique. Ces difficultés sont liées à l'apparition des parasites résistants à la chloroquine et à l'émergence des moustiques résistants aux insecticides DDT. Ainsi des stratégies de contrôle ont été préconisées par l'OMS. Elles sont basées sur:

- la prise en charge des cas de paludisme au niveau communautaire par le traitement systématique de toute fièvre par un antipaludique (la chloroquine);
- la chimioprophylaxie chez les femmes enceintes et les sujets <<neufs>> (les expatriés, sujets vivants en zone non impaludée);
- la réduction du contact homme vecteur par l'utilisation des supports imprégnés d'insecticides (rideaux et moustiquaires);
- la surveillance épidémiologique et la prévention d'épidémie de paludisme;
- l'amélioration des capacités de recherches opérationnelles dans les pays d'endémie.

Malgré les mesures de protection individuelle et collective et le traitement systématique des cas préconisés par le programme national de lutte contre le paludisme (PNLP), le paludisme reste une maladie endémique, et est la cause de 16% de mortalité, 13% de morbidité (Doumbo et al., 1989). Les espèces plasmodiales les plus répandues au Mali sont *P. falciparum* (80-90%), *P. malariae* (10-15%). Les moins répandues sont *P. ovale* (1%) et *P. vivax*, un cas retrouvé au Nord, (Koita, 1989). Ainsi le Mali est l'un des rares pays où se trouvent les quatre espèces. *Anophèle gambiae s.l* et *Anophèles funestus* sont les vecteurs majeurs de la transmission du paludisme (Touré et al, 1979).

#### 4- Physiologie et Physiopathologie.

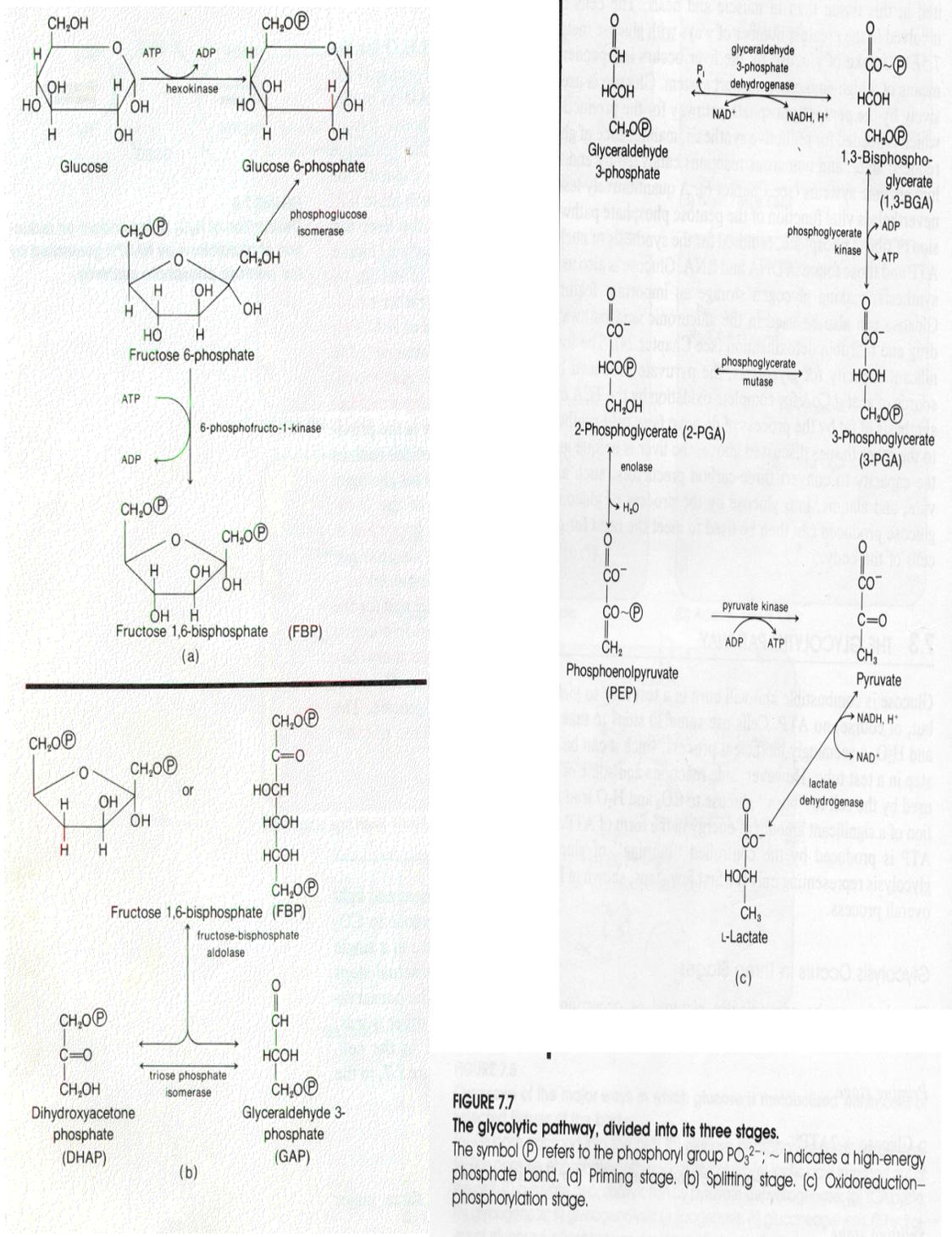
##### 4-1 Physiologie.

###### Métabolisme du *Plasmodium*:

Les plasmodies ont besoin de beaucoup d'énergie pour assurer leur développement au cours du cycle asexué intra érythrocytaire. Chez les plasmodies aussi bien que chez les érythrocytes matures la glycolyse constitue une source majeure d'énergie. La consommation de glucose par les érythrocytes infectés de *Plasmodium falciparum* est de 25 à 50 fois supérieure à celle des globules rouges non infectés (Tanabé., 1990). Le glucose est utilisé par la voie d'Embden-Meyerhoff qui fait intervenir des enzymes parasitaires spécifiques à la glycolyse (Roth et al., 1988). La lactate déshydrogénase joue un rôle important dans ce métabolisme. Le stade ultime de cette voie est marqué par la transformation du pyruvate en acide lactique par la LDH. Ce métabolisme régénère le N-Acétyl Dinucléotide (NAD) qui est nécessaire à la production d'Adénosine Triphosphate (ATP). L'acide lactique produit final du métabolisme du glucose des espèces plasmodiales de mammifères est rapidement excrété par les parasites vers le compartiment extracellulaire (Kanaani, 1991).

Les LDH de procaryotes et eucaryotes particulièrement celle du *P. falciparum* et de l'homme ont sensiblement la même masse moléculaire de 35kDa (Vander & Jagt, 1981; Simmons, 1985; Bzik, 1993). Cependant la séquence génomique de la LDH plasmodiale présente des différences avec la LDH d'autres organismes.

Au plan fonctionnel, la LDH plasmodiale est capable d'utiliser 3 fois plus de



molécules de NAD que ne peut utiliser la LDH humaine (Makler, 1993).

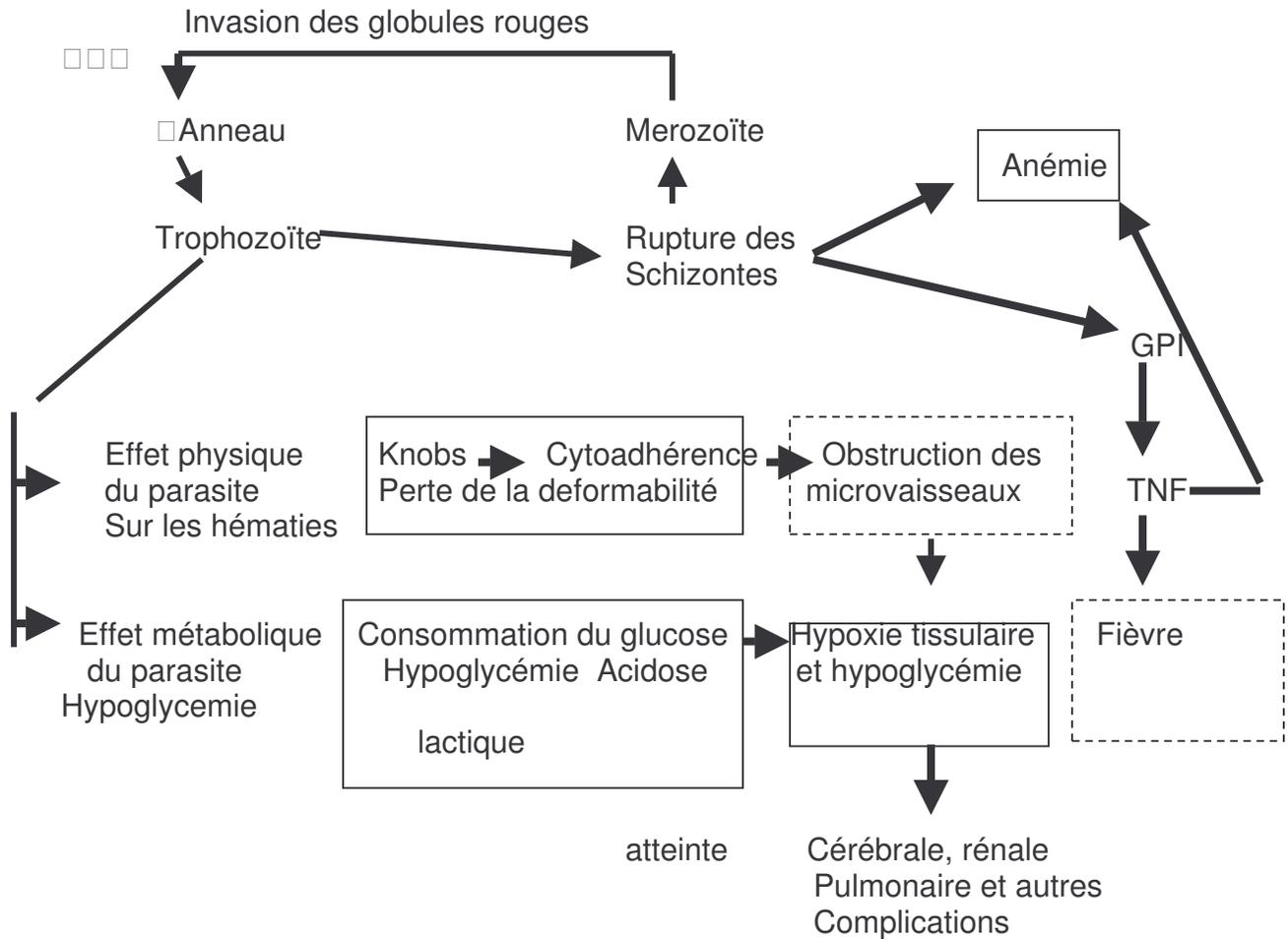
**Figure2:** cycle glycolytique: d'Emden Meyerhoff, stade a: stade primordial, stade b: stade de division, stade c, stade d'oxydoreduction-phosphorylation.

#### 4-2 Physiopathologie.

L'infection palustre produit toute une série de symptômes cliniques différents en fonction de la nature et du stade parasitaire et de facteurs liés à l'hôte. En effet, l'expression clinique peut aller de la forme simple (surtout en zone d'endémie) à des formes sévères, graves pouvant être mortelles. Au niveau du parasite il semblerait que certaines souches de *P. falciparum* sont plus virulentes que d'autres.

#### Rôles des cytokines.

L'éclatement des hématies parasitées entraîne la production par les macrophages de cytokines telles le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 responsable de la fièvre et des frissons observés en phase d'état (Schofield et al, 1993; Kwiatkowski et al, 1993). Le GPI serait l'un des facteurs parasitaires responsable de cette stimulation. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 seraient également responsables de l'anémie palustre par le dysfonctionnement de l'érythropoïèse (Burgmann et al, 1996; Selvam et al, 1996/). La cytoadhérence des hématies parasitées via les vargènes (PfEMP1) ferait intervenir plusieurs cytokines qui sont : TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$ , INF- $\gamma$  et l'IL-6 et des récepteurs endothéliaux (ICAM-1, VCAM, etc) cérébraux et au niveau des autres organes profonds où se passe la schizogonie lors de l'infection à *P. falciparum*.



Selon Krogstad D J, 1995

**Figure 3:** Pathogenèse du paludisme grave.

L'accès simple.

Les signes qui conduisent au diagnostic de l'accès palustre simple ne sont pas spécifiques. C'est pourquoi en zone d'endémie palustre, il faut devant tout patient, quelque soit son âge, penser à un accès palustre simple s'il présente depuis moins d'une semaine, l'un ou plusieurs des signes suivants: fièvre, frisson, sueur, céphalées, troubles digestifs, asthénie, splénomégalie,

hépatomégalie et anémie, plus une parasitémie sanguine. Lorsque le diagnostic n'est pas fait précocement ou si le traitement n'est pas fait ou incorrectement fait, l'accès simple peut évoluer vers un paludisme grave.

### Le paludisme grave

Le paludisme grave est une urgence diagnostique et thérapeutique, car menaçant le pronostic vital du patient. Selon l'OMS (2000), il existe 15 critères majeurs qui, lorsqu'ils sont associés à la forme asexuée du *P. falciparum* permettent de définir le paludisme grave. Dans cette définition il n'est point besoin de réunir tous les critères. La présence d'au moins deux critères suffisent. Ci-dessous les 15 critères majeurs de l'OMS.

- 1- prostration,
- 2- troubles de conscience (score de Glasgow < 10)
- 3- détresse respiratoire,
- 4- convulsions répétées,
- 5- état de choc (pression artérielle systolique < 80 mmHg en présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire),
  
- 6- Œdème pulmonaire (radiologique), anomalies radiologiques précisées chez l'enfant,
  
- 7- Saignement anormal,
  
- 8- Ictère Clinique ou bilirubine > 50 µmol/L,
  
- 9- Hémoglobinurie (Urines rouges foncées ou noires, hémoglobinurie ou myoglobinurie à la bandelette, absence d'hématurie microscopique),
  
- 10- Anémie profonde (Hématocrite < 15% ou hémoglobine < 5g/dL, en présence d'une parasitémie de plus de 10 000/µL. Si l'anémie est microcytaire, exclure une carence martiale ou une hémoglobinopathie),
  
- 11- Hypoglycémie (Glycémie < 2.2 mmol/L (< 40 mg/dL)),
  
- 12- Acidose (PH < 7.35 ou bicarbonates < 15 mmol/L)

13- Hyperlactatémie (Lactates plasmatiques > 5 mmol/L),

14- Hyperparasitémie (Parasitémie > 4% chez le non immun),

15- Insuffisance rénale (Débit urinaire < 400mL /24 h (adulte) ou < 12mL/24 h (enfant) ne s'améliorant pas après réhydratation et une créatininémie supérieure à 265µmol/L (>3.0 mg/dL).

### Paludisme viscéral évolutif.

L'apparition de la chloroquinorésistance, l'inobservance fréquente de la prophylaxie et l'automédication en zone d'endémie sont responsables de l'apparition du paludisme viscéral évolutif. Les signes cliniques sont généralement frustrés et la gravité tient au retard diagnostique. Les symptômes sont limités à une anémie, une asthénie et une splénomégalie inexplicée. Pour les cas où le diagnostic est rapide, le traitement permet une sédation des symptômes et une normalisation des paramètres biologiques sans séquelles. Rarement, le paludisme viscéral évolutif peut être responsable d'une situation clinique plus précaire où la notion de terrain préalablement débilité revêt une importance toute particulière.

### 5- Techniques de diagnostic biologique du *Plasmodium*.

#### 5-1 Techniques d'identification morphologique: Goutte Epaisse et Frottis mince.

##### Principe

Les étalements sanguins colorés et observés au microscope permettent de distinguer sur le plan morphologique les différentes espèces de *Plasmodium* et leur stade d'évolution chez l'hôte humain.

La technique de la goutte épaisse : elle est effectuée pour la mise en évidence morphologique du parasite. Une ou 2 gouttes de sang sont disposées au milieu d'une lame-porte objet, ces gouttes sont défibrinées par des mouvements circulaires du bout d'une autre lame. L'étalement est ainsi séché et ensuite coloré par le colorant Giemsa pour la lecture au microscope.

Avantages: la goutte épaisse, plus sensible, est l'examen de référence. Elle permet de détecter une très faible parasitémie (50 parasites/correspondant à 0,001% parasites). C'est la raison pour laquelle, la goutte épaisse est mieux indiquée dans les enquêtes épidémiologiques.

Inconvénient: L'inconvénient majeur de la goutte épaisse est la destruction des hématies au moment de la coloration rendant l'identification des espèces difficile.

La technique de frottis mince.

Une goutte de sang est étalée sur une lame porte-objet soigneusement dégraissée. Placer le petit côté de la 2<sup>ème</sup> lame, bien tenue entre le pouce et l'index au contact de la goutte de sang au centre de la première lame. Attendre que le sang fuse sur le bord. Incliner cette 2<sup>ème</sup> lame à 45°C par rapport à la 1<sup>ère</sup> et la pousser vers le bord libre avec un geste rapide, sans discontinuité jusqu'à épuisement de sang pour avoir un étalement très fin.

Une fois séché, cet étalement est fixé au méthanol absolu, puis coloré par une solution de Giemsa. Le temps de réalisation est de 30 à 40 min, la qualité du frottis et celle de la coloration sont deux éléments essentiels pour permettre une lecture correcte au microscope. Un étalement de mauvaise qualité, non monocellulaire, est « illisible ». Un étalement mal coloré (trop clair, trop foncé ou avec des dépôts de colorants) est difficile à « lire » et peut être à l'origine de résultats erronés.

Avantages

Le frottis mince permet une meilleure identification de l'espèce plasmodiale et son stade de développement (Moody, 2002), l'étude de la densité plasmodiale et des signes hématologiques associés. Il permet également le diagnostic d'autres agents pathogènes sanguicoles. Il est adapté à l'urgence. Le séchage ne prend que quelques secondes, et est très bien indiqué en milieu hospitalier ou une prise en charge rapide s'impose.

Inconvénient

Une manque de sensibilité par rapport à la goutte épaisse

### Estimation quantitative des parasites sur la lame.

Afin d'apprécier correctement le degré d'infestation du patient par le *Plasmodium*, il est important de connaître la parasitémie (nombre de parasites par microlitre). Il est indispensable d'avoir ces informations pour prévenir des cas sévères du paludisme et d'adopter un mode de traitement efficace chez le patient, identifier son stade de développement, la présence ou l'absence de l'hémozoïne.

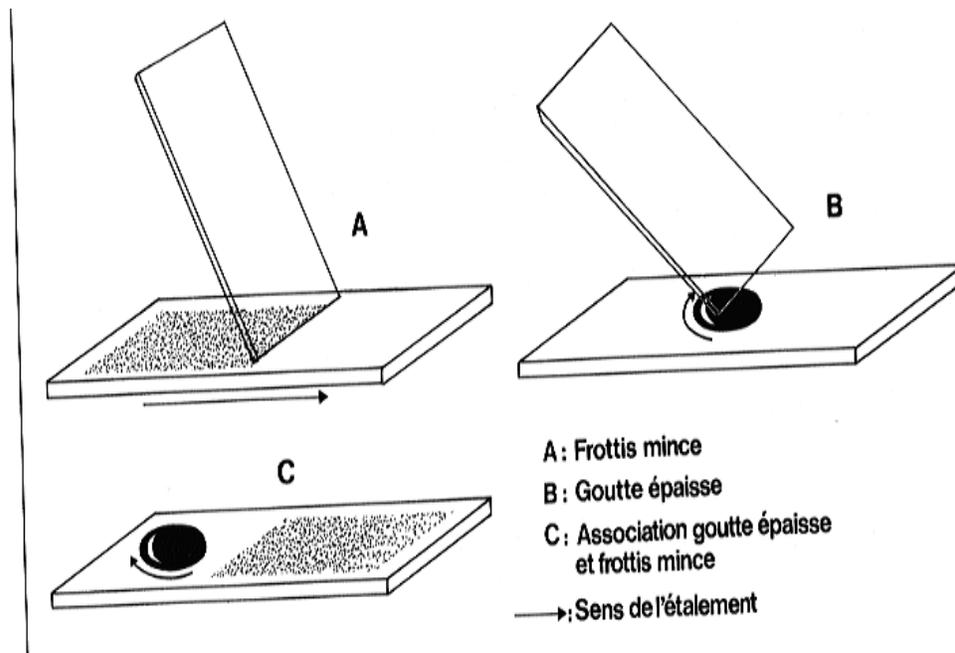
#### - Avantages des étalements sanguins

Ces techniques permettent de déterminer les stades et les espèces de *Plasmodium* d'une part, et de déterminer la charge parasitaire d'autre part. La microscopie permet également d'établir l'indice plasmodique et l'indice gamétocytaire, deux indices épidémiologiques importants.

L'examen de la goutte épaisse doit constituer la première étape, car elle présente l'avantage de concentrer 20 fois plus de parasites qu'un frottis mince bien que les parasites puissent paraître déformés, rendant leur identification difficile. Si la présence de parasites est détectée, l'espèce devra alors être identifiée par l'examen du frottis mince. L'idéal est de prélever du sang quand la température corporelle est élevée. La goutte est indiquée dans les enquêtes épidémiologiques.

#### - Inconvénients des étalements sanguins:

Ces techniques demandent un microscopiste bien expérimenté et une source de lumière. Il est à signaler aussi la lenteur d'exécution de ces techniques (au moins 1 heure pour le résultat d'une goutte épaisse et 15 à 20 mn pour celui d'un frottis mince). Elles ne permettent pas la mise en évidence de la parasitémie systémique (séquestration des hématies parasitées dans les capillaires profonds). Les hématies séquestrées sont celles qui contiennent des schizontes mûrs, seuls les globules rouges parasités par de jeunes trophozoïtes ou de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* peuvent circuler dans le sang périphérique.



**Figure4:** Réalisation de la goutte épaisse et du frottis mince (D'après Sbergal et al., 1986).

## 5-2 Techniques d'identification morphologique.

### **QBC:Quantitative Buffy Coat.**

#### - Principe:

Il consiste à rechercher à l'aide d'un microscope à fluorescence les parasites dans un prélèvement de sang contenu dans un tube capillaire et coloré à l'acridine orange (AO) qui est le marqueur fluorescent.

#### -Avantages

Le seuil de détection est bas (1 hématie par microlitre), sa réalisation est simple et rapide. Le diagnostic des autres agents sanguicoles (filaire) est possible.

#### - Inconvénients

La technique nécessite un microscope à fluorescence qui est onéreux. Le QBC manque aussi de spécificité. Le test ne permet pas le diagnostic de l'espèce, ni de quantifier la densité plasmodiale, ni les signes hématologiques associés.

## 5-3 Techniques de diagnostic immunologique.

## **Elisa et IFI (Immunofluorescence indirecte).**

### Principe

Le test ELISA est une réaction à double sandwich utilisant des anticorps monoclonaux et polyclonaux capables de reconnaître les antigènes plasmodiaux.

Le test d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur étalement de sang ou la culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum* est une technique chère et compliquée.

Les limites d'utilisation du diagnostic indirect sont:

- contre indication suite à un traitement préalable;
- surveillance post thérapeutique;
- transfusion sanguine;
- enquêtes épidémiologiques.

### 5-4 Techniques de diagnostic immunoenzymatique.

Ces tests à double sandwich utilisent des anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement les anticorps parasitaires contenus dans le sang.

Ces tests de migration comportent plusieurs étapes:

- dans la phase de migration une réaction entre antigènes parasitaires et conjugués;
- migration du complexe ainsi formé à travers la membrane cellulosique;
- réaction du complexe avec les anticorps monoclonaux fixés sur la membrane cellulosique.

**Le test Parasight-F® et le test malaquick** (Becton Dickinson Tropical Diseases USA).

Le Parasight-F® est un test manuel sur bandelette. C'est un test immunochromatographique qui détecte le *Plasmodium falciparum* histidine-rich protéine-2 (PfHRP-2) (Beatle, 1994 et Singhn, 1997). Le *Plasmodium falciparum* histidine-rich protéine-2 est un antigène soluble dans l'eau, produit par les trophozoïtes du *P. falciparum* et par les gamétocytes immatures (Rock, 1987). Elle est exprimée sur la surface de la membrane des globules rouges immatures.

Ce test ne peut en aucun cas détecter les infections causées par *P. vivax*, *P. ovalae* et *P. malariae*. Le Parasight-F® utilise pour le marquage un antigène monoclonal anti HRP-2 conjugué à la Rhodamine qui colore les endroits de la bandelette où il a pu détecter la présence de l'antigène en question. Ce test utilise deux anticorps monoclonaux spécifiques pour l'antigène pHRP. Le test est performant suivant les instructions du pratiquant.

Les études faites par Humar et al. (1997) et Pieroni et al. (1998) ont évoqué la sensibilité et la spécificité du Parasight-F® de *P. falciparum* comparées à la PCR. Ils ont démontré que la spécificité et la sensibilité du test Parasight-F® sont de 88 et 97% respectivement. La sensibilité réduite est indicative de haute compétence de la PCR pour la détection des faibles niveaux de parasitémie.

Le test malaquick (immunochromatographique diagnostics Sydney, Australie, distribué en France par les laboratoires Fumeze) possède l'avantage d'une utilisation simplifiée d'immunochromatographique. Cette technique peut être recommandée tant en situation de précarité qu'en pratique hospitalière. Ce test utilise deux anticorps anti HRP-2. Un des anticorps marqués à l'or colloïdal, visible par sa coloration violette, imprègne une petite zone de la bandelette. Au dessus de cette zone se trouve l'autre anticorps, fixé sous forme d'un trait transversal.

Le test de recherche de HRP-2 est simple, rapide, et commode. En zone d'endémie du paludisme, la recherche de l'HRP-2 de l'OMS caractérise un test de diagnostic de *P. falciparum* adapté aux structures de soins périphériques ne disposant pas d'un microscope. Cependant ce test est spécifique aux formes asexuées du *P. falciparum* seules capables de produire le HRP-2.

Ces tests (Parasight-F® et Malaquick) détectent environ 20 parasites par µl. Un inconvénient est la persistance de l'antigène dans le sang après un traitement. Les parasites disparaissent laissant une quantité non négligeable de métabolites, dont la HRP-2. Le test reste donc positif plusieurs jours après la guérison.

## 5-5 L'Amplification *in vitro* de l'ADN ou «Polymerase Chain Reaction» (PCR).

### Principe

Elle consiste à amplifier *in vitro* en plusieurs copies un fragment de gène codant pour une protéine du *Plasmodium* en utilisant deux amorces spécifiques. Cette amplification consiste à utiliser de courtes séquences d'ADN (oligonucléotides) comme amorces et une enzyme (la Taq polymérase) pour répliquer en copies multiples une portion d'ADN dont les séquences aux extrémités 3' et 5' sont connues. Les 2 oligonucléotides doivent avoir une séquence complémentaire des extrémités de chacun des deux brins d'ADN. La synthèse à partir des deux amorces a lieu simultanément et aboutit à la duplication de la séquence matrice initiale.

### Cycle de la réaction de la PCR.

Une réaction de PCR correspond à une multiplication exponentielle ( $2^n$ ) cycle comprenant chacun trois étapes: la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. Tous les réactifs nécessaires à la synthèse sont soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape.

- la dénaturation :

Elle permet de séparer la molécule d'ADN se trouvant sous forme de double brin en deux simples brins à une température de 94°C;

- l'hybridation:

Elle permet d'apparier des amorces aux séquences nucléotidiques complémentaires sur les deux brins d'ADN séparés lors de la dénaturation.

Le temps d'appariement étant environ 30 secondes à une minute ne permet pas aux deux brins d'ADN de s'apparier favorisant ainsi la formation du complexe ADN Amorce. La température d'appariement ( $T_h$ ) qui varie entre 40 à 60°C, est fonction de la température de ramollissement ( $T_m$ ) ou de  $T_m = 16,6 \log \{[Na] + 0,41(\%G-C) = 81,5[Na]\}$ .

%G-C = % en dGTP et Dctp.

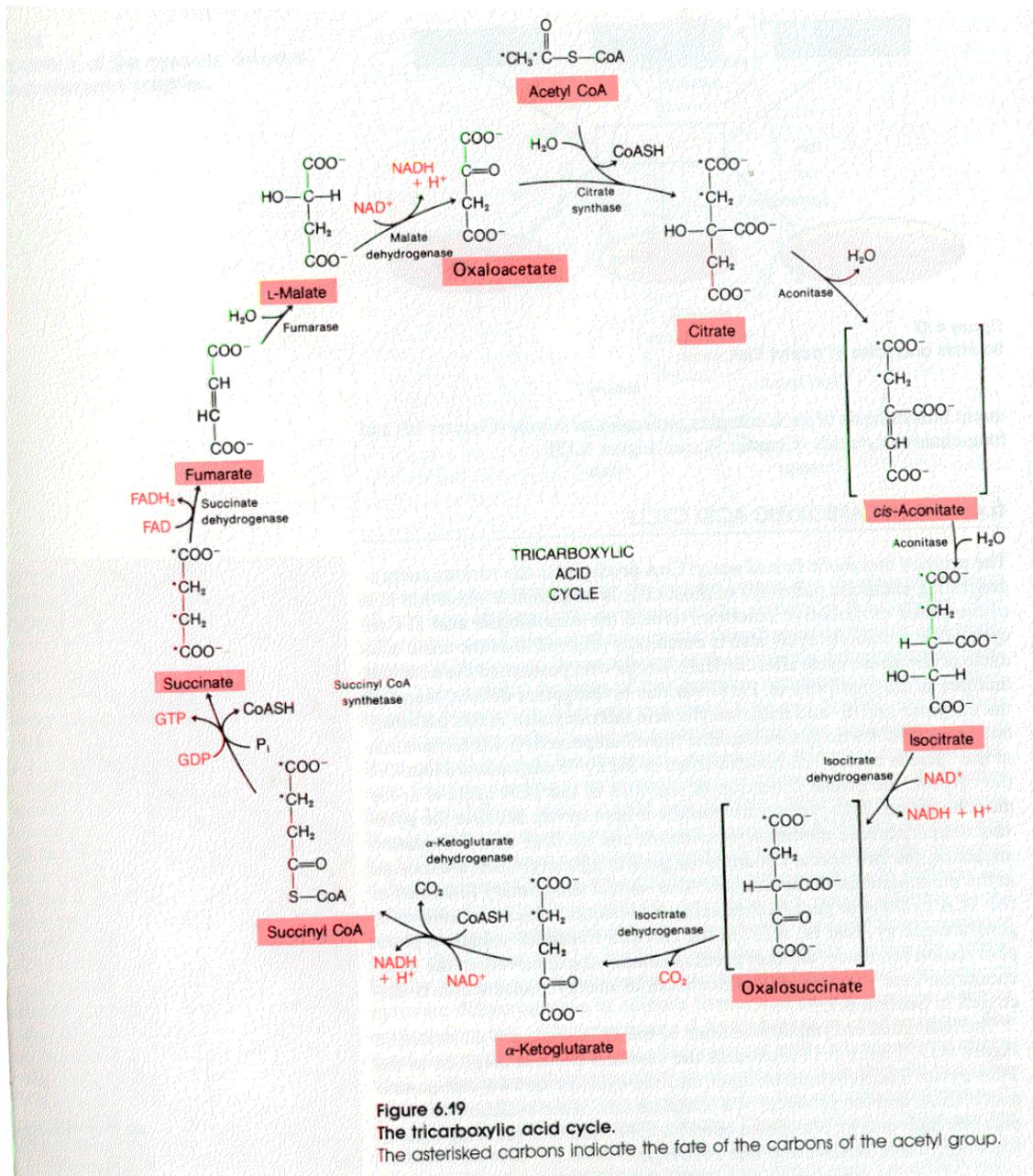
- l'élongation: Elle permet la synthèse de la nouvelle copie qui est complémentaire à la séquence de la matrice. Cette synthèse commence par

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

## 6-LDH

### Rôle

La lactate déshydrogénase est une enzyme que possède le *Plasmodium*. Elle a une habileté d'utiliser le 3-acétyl pyridine adénine dinucléotide NAD (APAD) comme coenzyme dans la formation du pyruvate à partir de la lactate. La LDH utilise aussi le APAD pour l'oxydation de la lactate (Matcler et al., 1993). La mesure du parasite LDH (pLDH) conduit à la détection de la présence de *P. falciparum*. Le parasite de la LDH est une enzyme glycolytique soluble qui exprimé au cours des étapes asexués des parasites de paludisme.



**Figure 5: Cycle de Krebs.**

Distribution chez les vertébrés.

Chez la plupart des vertébrés, on peut, en principe, après extraction de la fraction LDH, séparer 5 molécules à mobilité électrophorétique différente mais qui ont chacune l'activité lactico-déshydrogénase. Ce sont des isoenzymes dont

les molécules, synthétisées dans un même organisme, ne diffèrent sur le plan fonctionnel que par leur affinité pour le pyruvate ou la lactate. Pour la mise en évidence d'urée (dénaturant), le mélange des 5 isoenzymes ne fournit plus que 2 constituants séparables par électrophorèse, ce sont les monomères des molécules tétramériques des isoenzymes. Les 5 molécules d'isoenzymes sont donc constituées à partir de 2 sous-unités: la chaîne M (= A) et la chaîne H (= B). La synthèse relative de ces chaînes est plus ou moins importante suivant les organes. La molécule LDH-M4, abondante dans le muscle à une forte affinité pour le pyruvate, elle est donc très efficace pour la fermentation lactique alors que la molécule LDH-H4, abondante dans le cœur a une forte affinité pour la lactate. Le cœur, bien oxygéné, utilise moins la fermentation que les autres muscles. Une autre sous-unité, la chaîne C (=X) a été identifiée, sa répartition dans les organes chez les vertébrés est variable et elle n'est synthétisée que dans le testicule chez les mammifères.

#### Chromosome portant le gène.

Le gène *Plasmodium falciparum* LDH ne contient pas d'introns et est présent en une seule copie sur le chromosome 13.

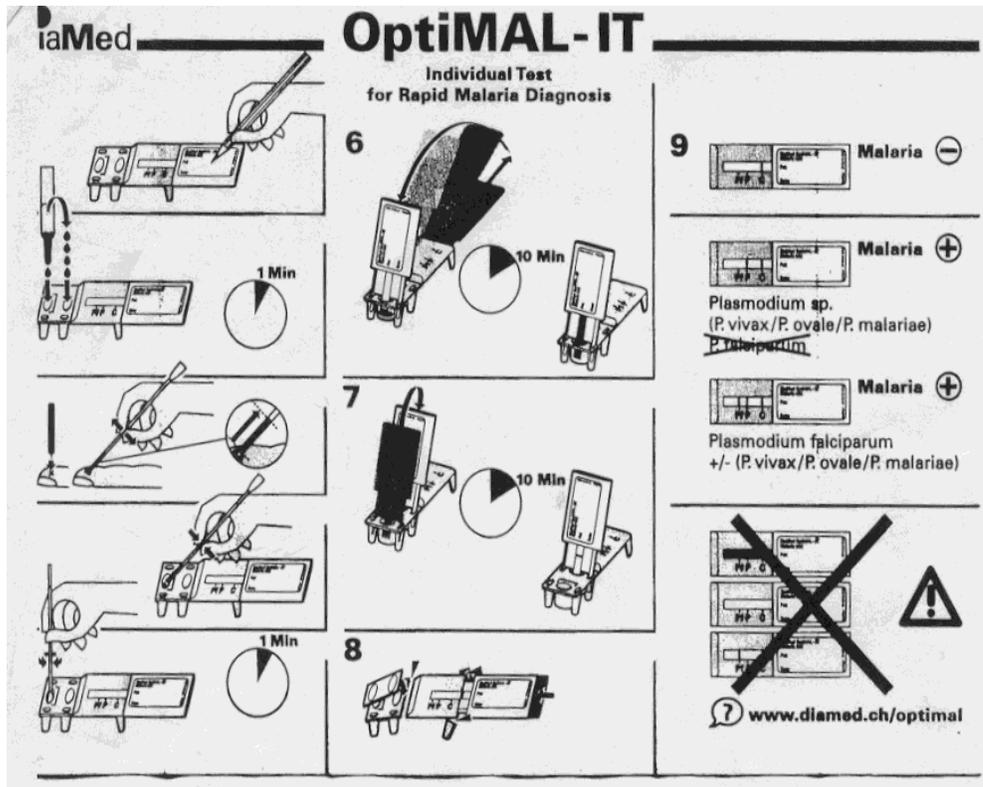
#### Détection du plasmodium déshydrogénase (pLDH).

L'activité du pLDH est proportionnelle à la parasitémie (Moody, 2002). Le pLDH est une enzyme glycolytique synthétisée par toutes les formes plasmodiales et à tous les stades de leur développement (Moody, 2000).

#### Le test OptiMAL-IT.

Il s'agit d'une technique rapide immunochromatographique basée sur la détection du *Plasmodium* lactate déshydrogénase (pLDH). Ce test a pour but d'utiliser des anticorps monoclonaux dirigés contre le métabolisme enzymatique intracellulaire du *Plasmodium* lactate déshydrogénase (pLDH) présent et libéré par les érythrocytes infectées (2000, Evaluation of OptiMAL-IT assay). Il a la capacité de distinguer le *Plasmodium falciparum* des trois autres espèces de *Plasmodium*. Cette capacité est particulièrement importante dans les pays où les différentes espèces coexistent (Ferro, B 2002, performance of OptiMAL-IT®).

Des études faites par le groupe (Moody, 2002) ont montré que la sensibilité de l'OptiMAL-IT pour *Plasmodium vivax* et *Plasmodium falciparum* sont respectivement 88 et 94% et la spécificité 99 et 100%. L'OptiMAL-IT est incapable d'identifier les infections mixtes, bien que sa sensibilité et sa spécificité soient similaires à celles de l'observation microscopique de *P.vivax* quand on compare avec la PCR (Moody, 2002).



**Figure 9:** test OptiMAL-IT de DiaMed

## IV. METHODOLOGIE

### 1 Cadre et lieu de l'étude.

Présentation de la zone d'étude.

L'aire dans laquelle l'essentiel de notre étude a été réalisé (zone de Missira) fait partie de l'Arrondissement Central du Cercle de Kolokani. Elle se situe sur la rive droite de la rivière Baoulé qui marque la limite entre les cercles de Kolokani et de Kita. En fait la zone de Missira est comprise dans l'entité géographique nommée « Boucle du Baoulé ».

### **Situation géographique.**

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

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

### Climat, végétation et faune.

Le climat est de type soudanien avec une nette tendance sahélienne vers le nord. Les deux saisons principales sont : la saison des pluies en relation avec des vents soufflant du Sud-ouest (mousson) et la saison sèche durant laquelle l'harmattan, ce vent chaud et sec est orienté Nord-est/Sud-ouest est prédominant. La saison sèche qui s'étale de Novembre à Mai comprend deux périodes bien distinctes: une saison fraîche (Novembre - Février) avec des températures mensuelles de 23 à 29°C (moyennes sur 40 ans: 1930-1970), des humidités relatives moyennes de 22 à 51% et une évaporation moyenne mensuelle variant de 76 à 317 mm (moyennes sur 19 ans: 1951-1970). Une saison sèche chaude pendant laquelle les températures moyennes mensuelles (29-35°C) et les humidités relatives moyennes de 27 à 69% sont plus élevées. L'évaporation atmosphérique en moyenne de 304 à 422 mm/mois est également très intense. La saison de pluies couvre la période de Juin à Octobre et la valeur

annuelle des précipitations diminue progressivement du Sud vers le Nord. Des moyennes établies sur une période de 40 ans note un maximum de 1150,9 mm et un minimum de 630,4 mm.

La végétation est de type savane arborée avec un tapis herbacé. L'arbre le plus fréquent est le karité (*Vitellaria paradoxa*). Le paysage typique de la zone consiste en une surface d'érosion plane ancienne (pédiment) où s'élèvent des reliefs gréseux aux pentes abruptes entourés d'éboulis et protégés dans leur partie supérieure par un couvert de grès résistant ou une cuirasse latéritique. La faune est constituée par des nombreux insectes d'importance médicale dont le groupe des Culidae (les Anophèles, Culex et Aèdes). Parmi les vertébrés, on rencontre des reptiles et plusieurs espèces d'oiseaux et de mammifères.

## 2 Hydrographie.

Le réseau hydrographique de la Boucle du Baoulé est formé par le Baoulé et ses affluents. Le Baoulé (842 km) prend sa source dans les monts Mandingues, à 700 m d'altitude avec la confluence des rivières Simanko et Kéniébaoulé. Il se jette dans le Bakoy au Nord de Toukoto. Les plus importants des affluents du Baoulé sont de la source vers l'embouchure: le Bafing (rive gauche), le kényé (rive gauche), le Dla (rive droite), le kényébako (rive gauche), le Bading-ko (rive gauche). Le Dla qui marque la limite sud de la zone de Missira représente le déversoir du lac Wénia. Ce cours d'eau constitue des gîtes larvaires pour les simulies (vecteur de l'*Onchocerca Volvulus*) et des gîtes permanents pour le développement des anophèles.

## 3 Structure actuelle de la population.

La population est compte 1300 habitants constitués de sédentaires et de nomades et comprend différentes ethnies (recensement LBMA, 2004). Les sédentaires sont représentés par les Malinkés et les khassonkés à l'ouest et au Sud, les Sarakolé, les bambara et les Kakoloh au Nord et à l'Est. Les nomades sont des peulhs et des Maures. Les premiers conduisent généralement

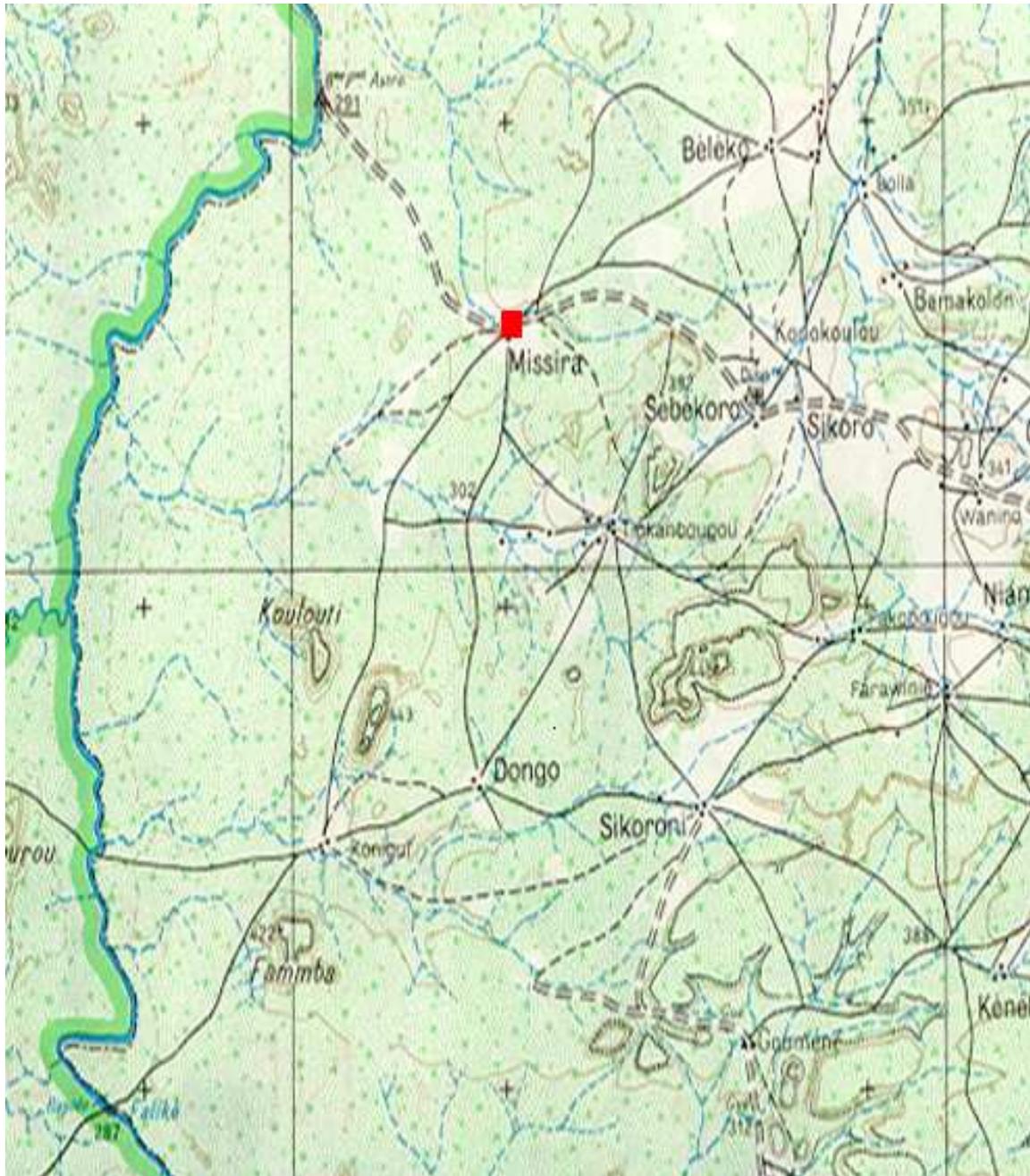
d'importants troupeaux de bovins et les seconds sont plutôt spécialisés dans l'élevage des ovins et caprins.

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

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

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

Ce village a fait l'objet d'une thèse de doctorat sur l'onchocercose. Il n'y a aucun poste de santé dans le village. Le centre le plus proche est à 8 kilomètres, il s'agit du Centre de Santé Communautaire de Sébékoro vers lequel sont acheminés les malades. La prévalence du paludisme dans le village de Missira est de 52% de la population générale (Ousmane KOITA, 2001).



**Figure 5: cartographie de la région de Missira (Sources IGM).**

#### 4 Type de l'étude.

Il s'agit d'une étude transversale qui s'est déroulée sur une période de deux mois.

#### 5 Période de l'étude.

Notre étude s'est déroulée du 27 Avril au 1 Juin 2004, période de transmission moins intense du paludisme à l'entrée de la saison des pluies.

#### 6 Critères d'inclusion et de non inclusion.

##### 6-1 Critères d'inclusion.

Avoir un âge compris entre 1 et 9 ans et faisant partie des sujets recensés.

Avoir l'assentiment des parents ou tuteurs en charge de l'enfant.

##### 6-2 Critères de non inclusion.

Il s'agissait de tous les enfants qui ont un âge inférieur à 1 an et ceux qui ont plus de 9 ans. Ainsi que tous les sujets qui ont refusé de participer à l'étude d'une manière directe ou indirecte.

#### 7 Echantillonnage.

Notre échantillon a été exhaustif, incluant tous les enfants âgés de 1 à 9 ans vivant dans le village de Missira. Au total, 304 enfants âgés de 1 à 9 ans recensés pendant la période d'étude.

#### 8 Gestions et exploitations statistiques des données.

Les formulaires d'enquête étaient vérifiés systématiquement sur le terrain à la fin de la journée. Ils ont été stockés dans des cantines métalliques et transportées vers le Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (L.B.M.A) où ils ont fait l'objet d'une vérification rigoureuse. Toutes les lames de goutte épaisse ont été relues au L.B.M.A par des lecteurs expérimentés, les confettis ont été mis dans

des enveloppes, classés et gardés. Les données ont été saisies sur le logiciel Excel (Microsoft office 2003). Les analyses statistiques ont été faites à partir du logiciel SPSS (version 11.0 pour Windows). Les tests statistiques utilisés sont:

le chi carré et le test de probabilité exact de Fisher pour la comparaison des proportions. L'obtention d'une probabilité p inférieure ou égale à 0,05 était en faveur de l'existence d'un lien statistique entre les variables comparées.

#### 9 Considérations éthiques.

Le protocole de recherche a été examiné et validé par le comité éthique médicale de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto stomatologie (FMPOS) dans le cadre de la phase II de l'essai clinique de la molécule d'AQ13.

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

Puis, nous avons rencontré le maire de la commune rurale de Sébékoro dont fait partie le village de Missira et les responsables du village de Missira. Après l'accord du chef du village, du conseil du village et du maire de la commune rurale de Sébékoro, un formulaire de consentement fut élaboré en détaillant toutes les modalités de la participation à l'étude. La participation à l'étude était volontaire. Durant toute la période de l'étude, toute la population (participant à l'étude ou non participant) a bénéficié de nos prestations (prises en charges des affections courantes, références sur des structures de santé compétentes et/ou hospitalisation sur place).

#### 10 Techniques d'analyse.

##### 10-1 Variables cliniques.

##### 10-1-1 Température.

Nous avons utilisé la mesure de la température axillaire. Cette mesure était faite en plaçant le thermomètre dans le creux axillaire pendant une durée fixe. Etait

considéré comme fébrile tout enfant ayant une température supérieure ou égale à 37,5° C.

### 10-1-2 La palpation de la Rate.

La rate a été classée selon la méthode de Hackett :

Rate 0: rate normale, non palpable même en inspiration forcée.

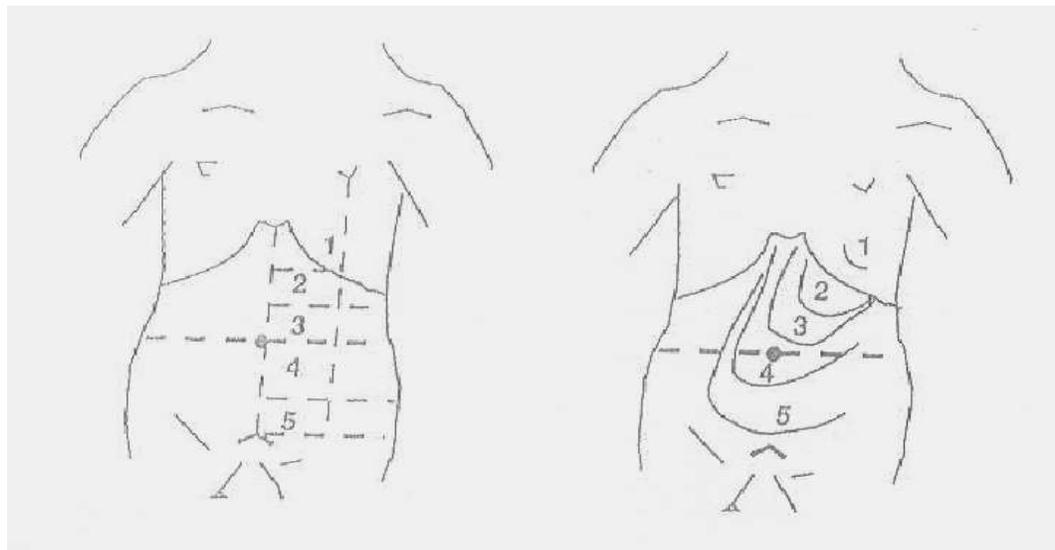
Rate 1: rate palpable à la respiration normale.

Rate 2: rate palpable sur la ligne mamalonnaire gauche, ne dépassant pas une ligne horizontale passant à égale distance entre le rebord costale et l'ombilic.

Rate 3: rate dépassant cette ligne sans franchir l'ombilic.

Rate 4: rate dépassant l'ombilic sans franchir l'horizontale passant à égale distance entre l'ombilic et la symphyse pubienne.

Rate 5: rate dépassant cette ligne horizontale.



**Figure 6:** classification des splénomégalies selon la méthode de Hackett.

10-1-3 La mesure de la tension artérielle

10-1-4 Le poids

10-1-5 La taille

10-1-6 Appréciation des conjonctives

10-1-7 La détresse respiratoire

10-1-8 La recherche de signes neurologiques (obnubilation, convulsion, coma)

## 10-2 Variables sociodémographiques

- âge,
- sexe,
- origine,
- la classification ethnique sur la base du nom de famille de l'enfant.

## 10-3 Variables biologiques.

### **10-3-1 Goutte épaisse et frottis mince.**

Chaque échantillon a servi à confectionner sur des lames différentes un frottis mince et une goutte épaisse.

#### 10-3-2 Réalisation de la goutte épaisse.

La lame porte objet (Fisher) était numérotée et le sang obtenu par ponction digitale était déposé au centre. A l'aide d'une seconde lame, on procède à la défibrination mécanique par des mouvements circulaires de sorte à avoir un diamètre d'environ 1 cm. Les lames étaient ensuite séchées dans les boîtes de collection OMS puis colorées et acheminées au laboratoire.

#### 10-3-3 Préparation du giemsa.

Dans un tube en plastique de 50 ml: ajouter 5 ml de giemsa (Sigma, St Louis, USA) pour 45 ml d'eau distillée tamponnée. Agiter le mélange très doucement. Cette quantité de 50 ml permet de colorer un nombre important de lames.

#### Coloration des lames.

Les lames étaient colorées suivant la technique à un temps au Giemsa (Sigma, St Louis, USA) à 5% dans de l'eau tamponnée à pH 7,2. Cette technique permet en même temps la déshémoglobination et la coloration des éléments du sang. Après séchage, les frottis sanguins sont au préalable fixés au méthanol (2 minutes) avant la coloration.

- Après séchage, plonger verticalement la lame de goutte épaisse dans le bac contenant le giemsa dilué à 5% pendant 30 minutes;
- rincer à la pissette avec de l'eau de robinet et sécher sur le râtelier à l'abri des mouches.

Le rinçage de la goutte épaisse se fait délicatement à la pissette pour ne pas décoller la goutte.

Nous avons également utilisé la technique de Field pour la coloration de grandes quantités d'échantillons. Elle est composée de bleu de méthylène polychrome (A) et de l'éosine (B). Les solutions sont conservées dans des cuves de coloration couvertes.

1- tremper l'étalement sec mais non fixé dans la solution A pendant 1 ou 2 secondes;

Plonger le film dans la solution B pour 1 ou 2 secondes;

2- le retirer de la solution A et rincer immédiatement à l'aide d'eau propre (vase à bec plein d'une eau qui coule lentement conviendrait en la circonstance);

3- plonger le film dans la solution B pour 1 à 2 secondes;

4- le rincer à l'eau propre pour quelques secondes;

5- le sécher dans une position verticale.

Si les étalements sont vieux ou très épais, les hématies risquent de ne pas s'étaler dans le court laps de temps dévoué à la coloration. Si cela est à prévoir, tremper l'étalement dans de l'eau propre pendant quelques secondes (ou jusqu'à ce que l'hémoglobine soit dispersée avant la coloration).

#### Lecture de la goutte épaisse.

la lecture des gouttes a été effectuée au laboratoire de biologie moléculaire appliquée à l'aide d'un microscope optique (Nikon Eclipse E400, Japon ; Olympus Optical co, Japon) en immersion ( Stephens Scientific- riverdale, USA) à l'objectif 100. La parasitémie a été quantifiée suivant la méthode quantitative leucocytaire. Les parasites étaient comptés en même temps que les leucocytes sur la lame. Lorsque le nombre de 300 leucocytes était atteint, le compte est arrêté. La parasitémie était obtenue par la formule suivante (Payne, 1989):  $P = (X / Y) 7500$  parasites par  $\text{mm}^3$  de sang où X est le nombre de parasites comptés au microscope et Y le nombre de leucocytes comptés (300 leucocytes) et 7500 la moyenne leucocytaire par  $\text{mm}^3$  de sang chez l'homme.

10-3-2 Le taux d'hémoglobine: mesuré à l'aide de l'hémocue selon les instructions de fabricant (Mathie Ickeringill)

C'est un appareil portable (Angelholm, Suède) fonctionnant avec pile ou courant électrique. Il permet de déterminer le taux d'hémoglobine d'une quantité de sang calibrée introduite dans une microcuvette par une méthode spectrophotométrique. Il est peu encombrant et peut fonctionner sur groupe électrogène. Le taux d'hémoglobine peut être rapidement évalué (quelques secondes) à l'admission du patient.

10-3-2-1 Matériels et réactifs.

- Gants;
- Microcuvettes à usage unique contenant des réactifs (chimiques) sous forme déshydratée;
- Photomètre portable (instrument mesurant la lumière) fonctionnant avec le courant électrique à l'aide d'un adaptateur ou cinq piles de 1,5 volts.

Chaque microcuvette a un volume de 10 µl et un petit orifice pour la lumière de 0,13 mm entre les parois parallèles de la fenêtre optique. La microcuvette contient trois réactifs sous forme déshydratée qui convertissent l'hémoglobine en hémoglobinazide (HiN3):

- le désoxychlorate de sodium hémolyse les cellules sanguines ;
- le nitrite de sodium convertit l'hémoglobine (fer ferreux) en méthémoglobine (fer ferrique),
- l'azide de sodium convertit la méthémoglobine en méthémoglobinazide (HiN3)

10-3-2-2 Protocole.

Après ponction du bout du doigt, la quatrième goutte de sang au niveau de la ponction est placée dans la microcuvette par action capillaire. Cette microcuvette est insérée dans le photomètre de l'hémocue. 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.

Après mesure le photomètre refait son O automatiquement et vérifie l'intensité de la source lumineuse et le fonctionnement de la cellule lumineuse. Une micro cuvette de contrôle est fournie avec chaque photomètre pour permettre la vérification de la calibration de celui-ci.

Le test doit être effectué dans les 10 minutes suivant le remplissage de la microcuvette.

Alors que l'utilisation de l'hémocue est très simple, il faut être rigoureux dans son utilisation et l'apprentissage est utile. On recommande la supervision du laboratoire d'hématologie local pour qu'il vérifie les bonnes pratiques.

De nombreuses études suggèrent que les échantillons capillaires sont sujets à plus d'erreurs que les échantillons veineux ou artériels. En pratique, il convient d'analyser deux prélèvements. Le résultat est acceptable si les deux chiffres sont proches. On peut utiliser des échantillons de sang veineux ou artériel mélangés et insérés immédiatement dans la microcuvette.

### 10-3-3 Le test OptiMAL-IT.

C'est un test immunochromatographique qui permet de détecter le LDH des différents plasmodies. Ce test utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes des plasmodies.

#### 10-3-3-1 Matériels et réactifs.

- un dispositif composé d'un puits de réaction (contenant le conjugué) et d'un puits de lavage et des bandelettes réactives démontables avec anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes des plasmodies;

- une solution de lyse et de lavage (Buffer);
- une lancette;
- une fermeture pour puits;
- un tampon désinfectant;
- une micropipette à usage unique de 10 µl;

#### 10-3-3-2 Protocole

- ouvrir la trousse d'aluminium, placer le dispositif contenant les deux puits (un puits de réaction contenant des anticorps monoclonaux et un puits de

lavage) horizontalement sur une surface plane, écrire la date et le nom du patient dans la zone réservée à cet effet.

- Décapuchonner l'ampoule du buffer, mettre 1 goutte (environ 10 µl) du tampon dans le puits de réaction et 4 (40 µl) dans le puits de lavage. Attendre 1 minute.

- Désinfecter le bout du doigt du patient avec le tampon désinfectant, laisser sécher, piquer la partie latérale du doigt à l'aide de la lancette stérile. Recueillir le sang à l'aide de la micropipette (environ 8 à 12 µl) à usage unique. Le sang veineux peut être utilisé en aspirant avec la pipette de la même manière.

- Transférer le volume total de sang prélevé avec la micropipette dans le puits de réaction tout en remuant légèrement. Attendre 1 mn.

- Placer le dipstick dans le puits de réaction. Attendre 10 mn ou tout desquelles il y aura migration de la totalité du mélange de sang et du réactif du puits le long de la partie réactive de la bandelette.

- Placer ensuite la bandelette dans le puits de lavage pendant 10 mn.

- Sortir la bandelette du puits de lavage et replacer la dans le support en plastique. Fermer les deux puits avec le couvercle en plastique. Casser les pose pieds et les jeter dans la poubelle.

Lire la réaction et interpréter les résultats. Conserver la bandelette testée en cas de besoin.

### 10-3-3-3 Interprétation des résultats.

La présence ou l'absence des bandes permet d'interpréter les résultats. On distingue 3 bandes de réaction:

- une bande de contrôle (bande C);
- une bande commune aux trois espèces du parasite (bande P) sans le *Plasmodium falciparum*;
- une bande spécifique à *Plasmodium falciparum* (bande Pf). Le résultat est valide lorsque la bande de contrôle est bien visible et la partie réactive de la bandelette est exempte de sang. Le test est ininterprétable lorsque la bande de contrôle et la bande Pf seules sont visibles.

Le test est négatif lorsque seule la bande C est visible.

Le test est positif à *Plasmodium ovale*; *Plasmodium malariae*; *Plasmodium vivax* lorsque la bande de contrôle C et la bande P sont visibles.

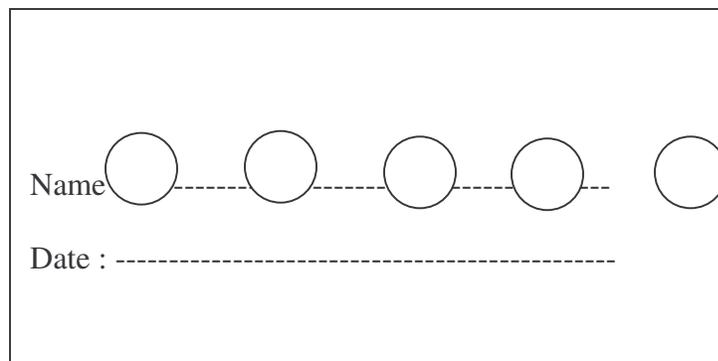
Le test est positif à *P. falciparum* lorsque les 3 bandes(C, P et Pf) sont visibles.

#### 10-3-4 Techniques de PCR.

##### 10-3-4-1 Confection des confettis.

A l'aide du vaccinostyle une ponction capillaire était effectuée sur le troisième doigt, après désinfection à l'alcool. La première goutte était éliminée à l'aide d'un morceau de coton sec. Une à trois gouttes de sang étaient ensuite déposées sur les deux cercles du papier filtre (Scheilcher & Schuell- Keene, USA). Le papier filtre était ensuite numéroté en fonction de l'identité du patient et mis à sécher à l'abri des mouches et de la poussière.

Après séchage, les confettis sont enveloppés et acheminés dans un carton au laboratoire



**Figure 10:** Confettis en spot.

Le protocole comprend trois étapes qui sont: l'extraction de l'ADN plasmodiale, l'amplification génique *in vitro*, et la révélation du produit amplifié.

##### 10-3-4-2 Extraction de l'ADN plasmodial.

L'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par Wooden et al., (1992). Les spots de confettis imbibés de sang sont découpés à l'aide de ciseaux et introduits dans des tubes Eppendorff de 1,5 ml (Robbins Scientific - Sunnyvale,

CA). 1 ml de saponine (Sigma - St Louis, MO) à 1% dans de l'eau distillée était ajouté et incubé pendant une nuit à 4°C. La saponine dissout la double couche phospholipidique du globule rouge. Cette altération détruit la membrane de l'hématie et libère le parasite. L'incubation à 4°C à pour effet l'inhibition des enzymes libérées par la lyse des hématies. Le papier filtre était ensuite lavé à l'aide du PBS 1X (Sigma - St Louis, MO) 3 fois ou jusqu'à ce que la solution devienne claire. Le PBS est un détergent qui enlève l'hémoglobine et le reste de la saponine présents dans la solution. Une fois la dernière solution de lavage éliminée, 200 µl de Chelex-100 (Bio Rad - Hercules, CA) à 5% dans de l'eau distillée sont ajoutés et chauffés à 56°C pendant 15 mn dans un bain marie. L'ADN se trouve normalement lié aux ions  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  qui sont des cofacteurs. Le Chelex-100 permet la chélation de ces cations polyvalents et libère l'ADN. Sa capacité de chélation est de 0,6 méq/g de métaux lourds. Le papier filtre est ensuite trituré à l'aide d'embout de pipette et le tube centrifugé à 12000g pendant 3 mn dans une centrifugeuse Eppendorff (Robbins Scientific).

L'échantillon est porté à ébullition à 100°C pendant 8 mn. Après avoir trituré une dernière fois le papier filtre est rejeté. L'ébullition à 100°C permet d'achever la libération de l'ADN. La centrifugation à 12000 g pendant 3 mn permet le dépôt du Chelex-100 au fond du tube tandis que le surnageant qui contient l'ADN est recueilli et conservé à 20°C.

#### Préparation des mélanges réactionnels

Mélange 1 ou Mix 1 : Il était composé de: 19,5µl d'eau distillée (GIBCO-Grand Island, NY), auxquels étaient ajoutés 3 µl de la solution tampon à la concentration 10X puis 1,5 µl de solution de  $MgCl_2$  à 50 mM. Ensuite 1 µl de chacun des 4 dNTPs à 10 mM suivi de 1µl de chaque oligonucléotide à 50 µM.

Mélange 2 ou Mix 2 était constitué en ajoutant à 12 µl d'eau distillée, 2 µl de la solution tampon à la concentration 10X et 0,5 µl de solution de *Taq polymérase* (Gibco, Grand Island, NY) à 5 unités par µl.

Les tableaux I et II donnent la composition des Mix 1 et Mix 2.

**Tableau I:** composition du mélange réactionnel 1 (Mix 1)

Concentration des réactifs	Réactifs	volume	concentration finale
	Eau stérile	9,5µl	---
10x	Tampon	3 µl	1x
50mM	Mgcl2	2 µl	2 mM
10mM	Dinucléotide phosphate	4 µl	0,2mM
50 µM	Amorce 5'	1 µl	1mM
50 µM	Amorce3'	1 µl	1 mM
		30,5µl	

Le volume de ce mélange est de 30,5µl dans chaque tube, auquel sera ajouté un grain de wax. Le grain de wax a pour rôle de séparer les amorces, la Taq polymérase et l'ADN afin d'empêcher les amplifications non spécifiques, et aussi d'éviter l'évaporation du volume réactionnel au cours de l'amplification.

**Tableau II:** composition du mélange réactionnel 2 (Mix2).

Concentration des réactifs	Réactifs	volume	concentration finale
	Eau stérile	12µl	----
10x	Tampon PCR	2 µl	1x
5 u	Taq polymerase	0,5µl	0,05u
		14,5µl	

#### 10-3-4-4 Protocole opératoire.

L'ensemble de la réaction était réalisée dans un tube à PCR de 0,2 ml (Robbins Scientific - Sunnyvale, CA) et le volume réactionnel total était de 50 µl. Dans le tube de 0,2 ml étaient disposés 30,5 µl du Mix 1 auquel est ajouté un grain du Wax (Perkin Elmer). Le tube était ensuite porté à 73°C pendant 3 mn pour inactiver les enzymes. Après refroidissement, 14,5 µl du Mix 2 étaient ajoutés suivis de 5 µl de la solution contenant l'ADN à amplifier. Le tube ainsi prêt était

placé dans le thermocycleur GENE AMP\* PCR system 2700 (Applied Biosystem) et le programme d'amplification était enfin appliqué.

### Programme

Pour la PCR simple du gène LDH, la dénaturation initiale est effectuée à 95°C pendant 2 mn; suivent 35 cycles d'amplification avec dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation à 58°C pendant 1 minute et extension à 72°C pendant 1 minute et un cycle d'extension finale 72°C pendant 10 minutes.

Pour la nested PCR (augmentation de la sensibilité de l'amplification) avec les amorces du gène LDH, la première amplification comporte une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 mn suivie de 35 cycles d'amplification avec dénaturation proprement dite à 94°C pendant 30 secondes, hybridation à 58°C pendant 1 minute, extension à 72°C pendant 1 minute et l'extension finale 72°C pendant 10 minutes. Au moment de la deuxième amplification, 2 µl de produit de la première amplification sont utilisés comme matrice d'ADN. Les conditions d'amplification sont les mêmes que celles de la PCR simple.

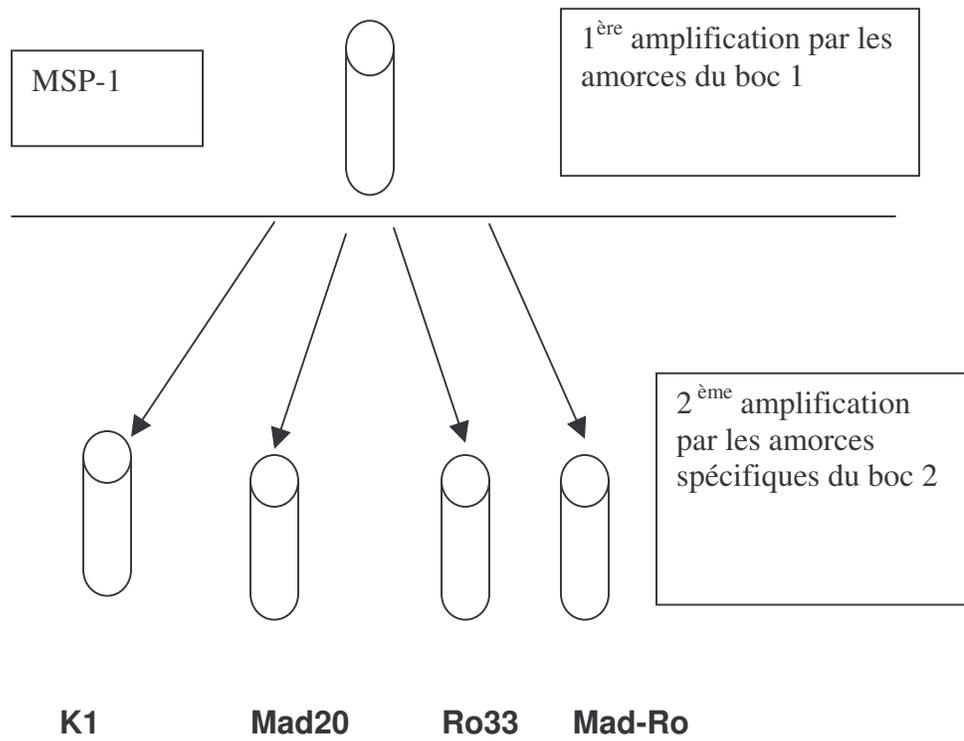
Pour la PCR simple du gène de MSP-1, la température de dénaturation initiale est de 95°C pendant 5 minutes, suivent 35 cycles d'amplification avec dénaturation de 94°C pendant 30 secondes, hybridation à 55°C pendant 30 secondes, l'extension à 72°C pendant 2 minutes.

L'amplification du bloc 2 (utilisation des amorces spécifiques K1, MAD20, RO33) a été faite par nested PCR (PCR nichée). Elle consiste à amplifier le produit obtenu durant la première amplification par les amorces spécifiques K1, MAD20 et RO33. Ainsi 2 µl de la première amplification (MSP-1) sont ajoutés au mélange réactionnel final (Mix1 et Mix2).

Une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C suivie de 35 cycles de:

- dénaturation pendant 30 secondes à 94°C,
- appariement pendant 30 secondes à 57°C,
- extension pendant 1 minute à 72°C.

**PCR nichée**



### 10-3-4-5 Séquence de LDH

```
ATG GCA CCA AAA GCA AAA ATC GTT TTA GTT      30
GGC TCA A GGT ATG ATT GGA GGA GTA ATG GCT    60
ACC TTA ATT GTT CAG AAA AAT TTA GGA GAT      90
GTA GTT TTG TTC GAT ATT GTA AAG AAC ATG     120
CCA CAT GGA AAA GCT TTA GAT ACA TCT CAT     150
ACT AAT GTT ATG GCA TAT TCA AAT TGC AAA      180
GTA AGT GGT TCA AAC ACT TAT GAC GAT TTG     210
GCT GGA GCA GAT GTA GTA ATA GTA ACA GCT     240
GGA TTT ACC AAG GCC CCA GGA AAG AGT GAC     270
AAA GAA TGG AAT AGA GAT GAT TTA TTA CCA     300
TTA AAC AAC AAG ATT ATG ATT GAA ATT GGT     330
GGT CAT ATT AAG AAG AAT TGT CCA AAT GCT     360
TTT ATT ATT GTT GTA ACA AAC CCA GTA GAT     390
G TA TGG TAC AAT TAT TAC ATC AAC ATT CAG    420
GTG TTC CTA AAA ACA AGA TTA TTG GTT TAG     450
GTG GTG TAT TAG ATA CAT CAA GAT TGA AGT     480
ATT ACA TAT CTC AGA AAT TAA ATG TAT GCC     510
CAA GAG ATG TAA ATG CAC ACA TTG TAG GTG     540
CTC ATG GAA ATA AAA TGG TTC TTT TAA AAA     570
GAT ACA TTA CTG TAG GTG GTA TCC CTT TAC     600
AAG AAT TTA TTA ATA ACA AGT TAA TTT CTG     630
ATG CTG AAT TAG AAG CTA TAT TTG ATA GAA     660
CTG TTA ATA CTG CAT TAG AAA TTG TAA ACT     690
TAC ATG CAT CAC CAT ATG TTG CAC CAG CTG     720
CTG CTA TTA TCG AAA TGG CTG AAT CCT ACT     750
TAA AAG ATT TGA AAA AAG TAT TAA TTT GCT     780
CAA CCT TGT TAG AAG GAC AAT ATG GAC ACT     810
CCG ATA TAT TCG GTG GTA CAC CTG TTG TTT     840
TAG GTG CTA ATG GTG TTG AAC AAG TTA TCG     870
AAT TAC AAT TAA ATA GTG AGG AAA AAG CTA     900
AAT TTG ATG AAG CCA TAG CTG AAA CTA AGA     930
GAA TGA AGG CAT TAG CTT AA                  950
```

Figure 10: Séquence du gène de PfLDH de GenBank (gi/ 10180805/ gb/ AF 251291.1/ AF 251291)

Légende : La séquence de l'amorce PfLDH 5' est soulignée en jaune : **A GGT ATG ATT GGA GGA GTA ATG GCT**

La séquence de l'amorce PfLDH 3' est soulignée en violet: **T TTG ATG AAG CCA TAG CTG AAA CTA AGA GA**

La séquence de l'amorce RTLHDH 5'est soulignée en bleu: **TTGCGTAAGTGGTTC AACAC**

La séquence de l'amorce RTLHDH 3'est soulignée en vert: **AACCCA GTAGATGT**

#### 10-3-4-6 Préparation du gel à 2%.

Deux grammes d'agarose ultra pure (GIBCO, Life Technologies) sont pesés puis versés dans un erlenmeyer de 1000 ml. Ensuite 100 ml de TBE 0,5X (GIBCO, Life Technologie) étaient ajoutés et le mélange est porté à 100°C pendant 1 min 30s. Après chauffage, 30 µl de Bromure d'Ethydium (0,3 mg/ml -Sigma) sont ajoutés. La préparation ainsi obtenue est coulée dans un support de gel avec un peigne à 10, 15 ou 20 dents suivant le nombre d'échantillons. La polymérisation du gel a lieu en 25 minutes.

#### 10-3-4-7 Révélation des produits amplifiés.

Douze microlitres du produit d'amplification mélangés à 2 µl de «dye» (Quality Biological Inc, Gaithersburg, MD) étaient chargés dans un gel d'agarose à 2% placé dans un bac de migration contenant 700 ml de Tris Borate EDTA 0,5X (GIBCO, Life Sciences) et de 210 µl de Bromure d'Ethydium (GIBCO, Life Sciences). Une tension de 100 V (200 mA) était appliquée pendant 45mn. Au niveau de la première colonne de migration étaient déposés 12 µl de marqueur de poids moléculaire (Boehringer Mannheim, Indianapolis IND). Le gel était rendu fluorescent par le Bromure d'Ethydium (Sigma, St Louis, Mo). Après l'arrêt de la migration le gel était photographié sous UV (Transilluminateur, Fisher) à l'aide d'une caméra photo (KODAK®). L'image visualisée est interprétée et les bandes identifiées pour chaque paire d'amorces étaient ensuite enregistrées dans le tableau sur windows 2000.

#### 10-3-4-8 Interprétation des résultats.

Sur la photographie les produits amplifiés apparaissent sous forme de bandes. La taille des produits amplifiés est exprimée en nombre de paires de base en référence au standard à l'aide du programme, «Kodak EDAS290». Les standards utilisés sont pBR322/*Hae* III, pBR328/*Bgl* I et pBR328/*Hinf* I (Molecular Markers V et VI - Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN).

### 10-3-5 séquençage de gène

Nous avons utilisé le séquenceur automatique de nucléotide CEQTM 2000 XL de Beckman Coulter (Fullerton, Ca) utilisant le système capillaire.

#### 10-3-5-1 Purification des amplicons

##### Procédure

Vingt microlitres des amplifiats (produits amplifiés par PCR) sont transférés dans des plaques de lavage de 96 puits à fond plat (Millipore, France) avec 150 $\mu$ l d'eau stérile et le mélange est aspiré par une pompe à vide montée sur un compresseur; cette opération est répétée 2 fois. Ensuite, 40  $\mu$ l d'eau stérile est ajoutée dans chaque puits et la plaque est soumise à une agitation pendant 5 à 10 minutes; Le contenu de la plaque est transféré dans une autre plaque de 96 puits (Corning, NY) avant de procéder au cycle de séquençage (conserver à – 30°C avant usage).

#### 10-3-5-2 Cycle de séquençage

##### Mélange

Trois  $\mu$ l d'amplifiats lavés sont ajoutés à 1  $\mu$ l d'amorce (allée ou retour) et 4  $\mu$ l de DUTCS (Quick Start Master Mix contenant le tampon, les DNTPS, les colorants de charge des nucléotides, l'ADN polymérase (Invitrogen, CA) pour séquençage, le volume réactionnel de 10  $\mu$ l est obtenu avec un ajout de 2  $\mu$ l d'eau. Les plaques sont ensuite scellées avec une feuille plastique.

##### Conditions d'amplification pour le séquençage

Stade1 : 75° pendant 2 mn

Stade 2 : 94° pendant 2 mn

Stade 3 : 96° pendant 20 s

Stade 4 : 50° pendant 10s

Stade 5: 60° pendant 4 mn

Stade 6: retour 30 fois au stade 2

Stade 7 : 4° jusqu'à l'infini

### 10-3-5-3 Préparation de plaques de Séphadex

#### Matériels

Plaques de Séphadex-50

Poudre de Séphadex Tm G-50 (Amersham Biosciences AB)

Moule de Séphadex-50 plaques

#### Procédure

Remplir le moule avec la poudre Séphadex;

Ajuster le niveau de la poudre dans le moule;

Bien placer la plaque dans le moule en inversant le système;

Transférer toute la poudre dans la plaque;

Additionner 300 µl (150 µl deux fois) d'eau et conserver à 4° avant usage.

### 10-3-5-4 Purification des produits de séquençage.

Centrifuger la plaque Séphadex-50 pendant 5 mn à 2500 rpm pour enlever l'eau;

Additionner 10 µl du produit séquencé dans la plaque Séphadex;

Superposer la plaque Séphadex sur une plaque en maintenant soigneusement les plaques en utilisant un adaptateur ;

Centrifuger pendant 5mn à 2500 rpm, récupérer l'éluant et procéder au séchage avec le speedvac pendant 20 mn et placer le formamide à la température ambiante;

Après séchage, additionner 25 µl de formamide plus une goutte d'huile minérale dans chaque puits;

Procéder au séquençage.

Additionner 150 µl d'eau dans la plaque Séphadex si on ne l'utilise pas et la conserver à 4°C.

## V. RESULTATS

### 5-1 Caractéristiques socio-démographiques

**Tableau I:** répartition de l'échantillon en fonction du sexe et de l'âge.

Classes d'âge	Sexe				Total	%
	Masculin %		Féminin	%		
<i>1- 5 ans</i>	<i>100</i>	<i>64,1</i>	<i>83</i>	<i>56,1</i>	<b>183</b>	<b>60,2</b>
<i>6- 9 ans</i>	<i>56</i>	<i>35,9</i>	<i>65</i>	<i>43,9</i>	<i>121</i>	<i>39,8</i>
<b>Total</b>	<b>156</b>	<b>100</b>	<b>148</b>	<b>100</b>	<b>304</b>	<b>100</b>

Les sujets de sexe masculin 51,3% (156/304) étaient plus représentés que ceux de sexe féminin 48,7 (148/304) dans notre échantillonnage. Le sexe ratio est de 1, 05 en faveur du sexe masculin.

### 5-2 Comparaison des résultats de la goutte épaisse et du test OptiMAL-IT

#### 5-2-1 Prévalence globale

**Tableau II:** taux de prévalence estimé par les deux tests (la goutte épaisse et le test OptiMAL-IT).

	<i>Effectif Total</i>	<i>Effectif Positif</i>	<i>Pourcentage</i>
<b>Goutte épaisse</b>	<i>304</i>	<i>122</i>	<b>40,1</b>
<b>Test OptiMAL</b>	<i>304</i>	<i>123</i>	<b>40,5</b>

La prévalence de l'infection palustre par l'observation de la goutte épaisse était de 40,1% dans notre population d'étude soit 122 / 304 et celle du test OptiMAL-IT était de 40,5% soit 121/304.

#### 5-2-2 Valeurs diagnostiques

**Tableau III:** comparaison des résultats du test OptiMAL-IT par rapport à la goutte épaisse.

Test OptiMAL-IT	<i>Goutte épaisse</i>				Total	
	Positive	%	Négative	%		
<i>Positif</i>	114	93,4	9	4,9	123	40,5
<b>Négatif</b>	<b>8</b>	6,6	173	95,1	181	59,5
<b>Total</b>	122	100	182	100	304	100

Test OptiMAL-IT	Pourcentages
Sensibilité	93,4% (114/122)
Spécificité	95,1% (173/182)
Valeur prédictive négative	95,6% (173/181)
Valeur prédictive positive	92,7% (114/123)
Concordance Kappa	0,88

Nous avons observé 9 faux positifs par la technique de l'OptiMAL-IT par rapport à la goutte épaisse. C'est à dire négatifs à la goutte épaisse mais positifs au test OptiMAL-IT. De même 8 échantillons négatifs par la technique de l'OptiMAL-IT s'étaient avérés positifs à la goutte épaisse.

Nous avons obtenu une bonne concordance Kappa= 0,88.

Un cas d'association de *P. malariae* et de *P. ovale* a été identifié à la fois par le test OptiMAL-IT et par la goutte épaisse.

5-2-3 Charge parasitaire**Tableau IV:** résultats du test OptiMAL-IT en fonction des différentes classes de la parasitémie.

<b>Test Parasitémie (Tf / mm<sup>3</sup>)</b>	<b>OptiMAL-IT</b>		
	<i>Effectif total</i>	<i>Fréquence positive</i>	<i>Pourcentage positif</i>
25-50	17	16	94,1
<b>75-500</b>	71	65	91,5
<b>525-1000</b>	15	15	<b>100</b>
<b>&gt;1000</b>	19	18	94,7
<b>Totale</b>	122	114	

La moyenne géométrique de la densité parasitaire positive était de 261,26± 995,51. La densité minimale était de 25 trophozoïtes par mm<sup>3</sup> de sang et la maximale de 6375 trophozoïtes par mm<sup>3</sup> de sang. Les sujets les plus nombreux sont ceux ayant une parasitémie comprise entre 75-500, soit 58,2% (71/ 122) suivi des patients ayant une parasitémie supérieure à 1000 trophozoïtes par mm<sup>3</sup> de sang (15,6%).

L'analyse de ce tableau nous indique que le test OptiMAL-IT a pu mettre en évidence des parasites dans toutes les classes de densité parasitaire. La concordance dans la classe de parasitémie moyenne (525-1000 trophozoïtes par mm<sup>3</sup> de sang) a été de 100%.

**Tableau V** : résultats de la parasitémie en fonction de l'âge.

Classes d'âge	Parasitémie								Total	
	25-50	%	75-500	%	525-1000		>1000			
<b>1-5 ans</b>	8	47,1	49	69	10	66,7	16	84,21	<b>83</b>	68
<b>6-9 ans</b>	9	52,9	22	31	5	33,3	3	15,79	<b>39</b>	32
<b>Total</b>	17	100	71	100	15	100	19	100	122	100

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les classes d'âge par rapport aux classes de parasitémie. ( $\chi^2 = 5,77$  et  $p = 0,12$ ).

Les densités parasitaires inférieures à 75 p/μl augmentaient avec l'âge, tandis que celles supérieures ou égales 75 p/μl diminuaient avec l'âge.

#### 5-2-4 Espèces

**Tableau VI**: étude comparative des résultats du test OptiMAL-IT et de la goutte épaisse en fonction des espèces de plasmodies.

Espèce	Pf		Pm		Po	
	GE	P	N	P	P	N
<b>OptiMAL-IT</b>						
<b>Positif</b>	111	12	5	118	3	120
<b>Négatif</b>	8	173	1	180	0	181
<b>Total</b>	119	185	6	298	3	301

L'analyse de ce tableau nous montre que le test OptiMAL-IT nous a permis de poser le diagnostic d'espèce dans la grande majorité des cas. Aucun cas de *Plasmodium vivax* n'a été retrouvé.

L'échantillon 3179 est négatif au test OptiMAL-IT et positif à la goutte épaisse.

**Tableau VII:** sensibilité du test OptiMAL-IT sur les différents stades parasitaires de *Plasmodium falciparum*.

Test OptiMAL -IT	<i>Plasmodium falciparum</i>				
	Tf	%	Gam	Tf + Gam	Tf + Sch
<i>Positif</i>	111	93,3	2	5	2
<i>Négatif</i>	8	6,7	0	0	0
<b>Total</b>	119	100	2	5	2

**NB** Tf: Trophozoïte de *P. falciparum*, Sch: Schizonte de *P. falciparum*, **Gam**: gamétocyte de *P. falciparum*.

Le test OptiMAL-IT a permis l'identification des différents stades parasitaires de *P. falciparum* avec une concordance de 100% avec la goutte épaisse. Nous n'avons pas obtenu de Schizonte seule mais plutôt en association.

5-2-5 Distribution de la fréquence de l'infection plasmodiale par groupe d'âge

**Tableau VIII:** répartition de l'indice plasmodique (goutte épaisse, test OptiMAL-IT) en fonction de l'âge.

Classes d'âge	Goutte épaisse Positive		Test OptiMAL-IT	
	Effectif	Fréq positive	Effectif	Fréq Positive
<b>1-5 ans</b>	183	<b>83</b>	183	<b>83</b>
<b>6- 9 ans</b>	121	<b>39</b>	121	<b>40</b>
<b>Total</b>	304	122	304	123

Fréq : Fréquence

Il y avait une différence statistiquement significative entre les classes d'âge par rapport aux résultats de la goutte épaisse. ( $\chi^2 = 5,22$  et  $p = 0,02$ ). Ainsi qu'entre les classes d'âge du point de vue résultat du test OptiMAL-IT. ( $\chi^2 = 4,57$  et  $p = 0,04$ ).

Les enfants de 1 à 5 ans étaient les plus infectés par les plasmodies avec une fréquence de 45,36% (83 / 183) contre 32,23% (39/121) pour la goutte épaisse et 45,36% (83 / 183) contre 33,06 (40/121) pour le test OptiMAL-IT.

5-2-6 Distribution de la fréquence de l'infection selon le statut la fièvre

Tableau IX: relation entre la positivité à la goutte épaisse, au test OptiMAL-IT et l'état fébrile des patients.

Température	Goutte épaisse		Test OptiMAL-IT	
	Positive	%	Positive	%
< 37,5°C	72	59,02	73	59,35
≥ 37,5°C	50	40,98	50	40,65
<b>Total</b>	122	100	123	100

Nous pouvons dire que l'état fébrile des patients n'est pas lié à la positivité de la goutte épaisse ( $\chi^2 = 0,29$  ;  $p = 0,63$ ). De même qu'au test OptiMAL-IT ( $\chi^2 = 0,12$  ;  $p = 0,72$ ).

5-2-7 Distribution de la fréquence de l'infection selon le statut de l'hémoglobine

**Tableau X:** relation entre la positivité de la goutte épaisse et le taux d'hémoglobine.

Hémoglobine	Goutte épaisse Positive	Pourcentage %
< 10	51	41,8
≥ 10	71	58,2
<b>Total</b>	122	100

Il ressort de ce tableau qu'il n'existe pas de relation statistiquement significative entre la positivité de la goutte épaisse et le taux d'hémoglobine ( $\chi^2 = 2,8$ ;  $p = 0,1$ ).

### 5-3 Résultats moléculaires

#### 5-3-1 Polymerase chain reaction

**Tableau XI:** les échantillons concordants et discordants par la goutte épaisse et le test OptiMAL-IT.

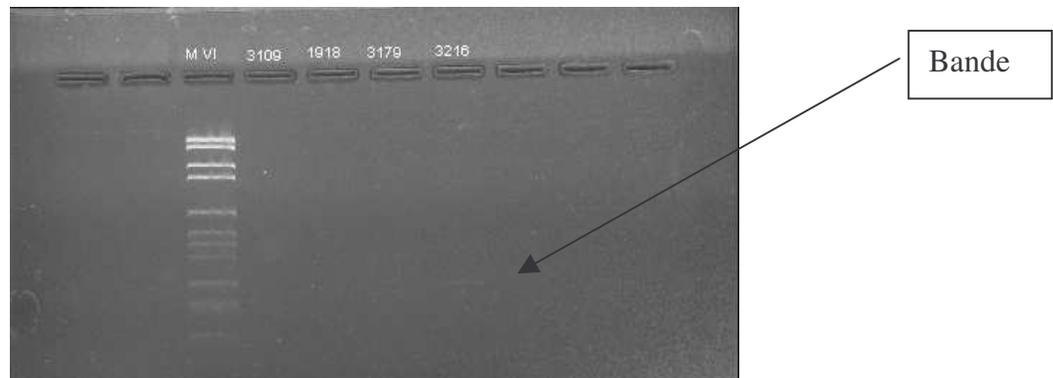
<b>GE - OptiMAL-IT</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage</b>
<b><i>Concordants</i></b>	<i>287</i>	<i>94,41</i>
<b><i>Discordants</i></b>	<i>17</i>	<i>5,59</i>
<b><i>Total</i></b>	<i>304</i>	<i>100</i>

La PCR a été faite sur 17 échantillons non concordants qui constituent les faux positifs et les faux négatifs du test OptiMAL-IT par rapport à la goutte épaisse.

**Tableau XII:** répartition des échantillons traités par la technique de la PCR nichée de MSP-1.

<b><i>Allotypes</i></b>	<b><i>Effectifs positifs</i></b>	<b><i>Pourcentage</i></b>
<b><i>PCR –</i></b>	<i>14</i>	<i>82.35</i>
<b><i>PCR +</i></b>	<i>3</i>	<i>17,65</i>
<b><i>Total</i></b>	<i>17</i>	<i>100</i>

Sur les 17 échantillons discordants traités, seul 17,65% (3/17) se sont avérés être positifs par la PCR. Parmi les trois échantillons positifs à la PCR, deux échantillons étaient positifs à la goutte épaisse et un positif au test OptiMAL-IT.

**Gel 1**

**Figure 11** : résultat de la PCR à laquelle l'échantillon 3216 (positif à la goutte épaisse, négatif au test OptiMAL-IT et négatif à la PCR nichée) a été positif aux amorces EBA-175 (Erythrocyte Binding Antigen-175). Sur cette photo le marqueur VI est en position 3 et l'échantillon 3216 en position 7 sur le gel.

**Tableau XIII**: étude comparative du test OptiMAL-IT par rapport à la PCR de MSP-1.

Test	PCR(MSP-1)				Total	%
	<i>Positive</i>	%	<i>Négative</i>	%		
<i>Positive</i>	1	33,3	6	42,9	7	41,2
<i>Négative</i>	2	66,7	8	57,1	10	58,8
<i>Total</i>	3	100	14	100	17	100

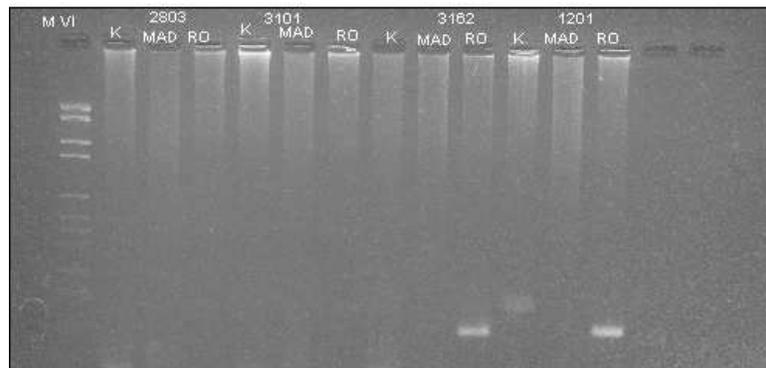
Ce tableau nous montre qu'il n'y a pas une concordance entre ces deux tests. Nous avons observé 6 faux positifs et 2 faux négatifs par le test OptiMAL-IT comparé à la PCR.

**Tableau XIV**: prévalence des allotypes de la MSP-1 des échantillons discordants positifs à la PCR.

Echantillons/Allotypes	K1	MAD20	RO33	Total
<b>3113</b>	0	0	1	1
<b>3118</b>	0	1	0	1
<b>3162</b>	0	0	1	1
<b>Total</b>	0	1	2	3
<b>Fréquence</b>	0	33,33	66,67	100

L'allotype RO33 a été majoritaire avec 66,67%. Nous n'avons pas retrouvé l'allotype K1 au cours de notre amplification. Nous n'avons pas observé de polymorphisme intra-allélique chez un même patient au cours de notre étude.

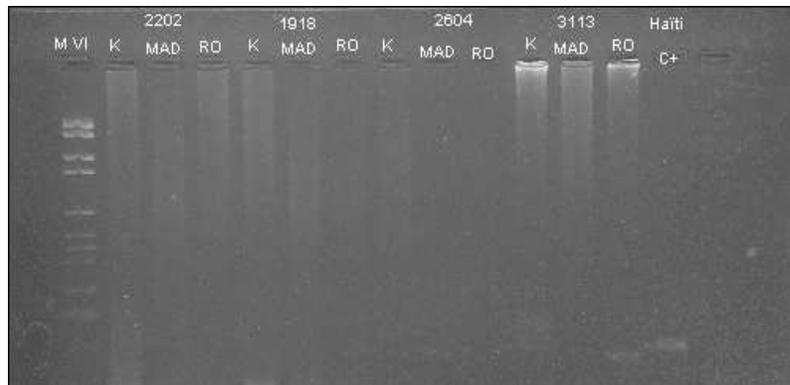
## Gel 2



**Figure 12** : résultat de la PCR à laquelle l'échantillon 3162 (négatif à la goutte épaisse, positif au test OptiMAL-IT) a été positif aux amorces RO33 par la PCR nichée.

Sur cette figure, le puits 1 représente le marqueur VI, les 6 puits suivants l'amplification des échantillons 2803 et 3101 avec les marqueurs K1, MAD20 et RO33 n'ont donné aucune amplification. L'échantillon 1201 qui est un contrôle positif amplifié avec les amorces K1, MAD20 et RO33 dans les puits 11,12,13 a révélé une bande avec le marqueur K1 et RO33.

## Gel 3

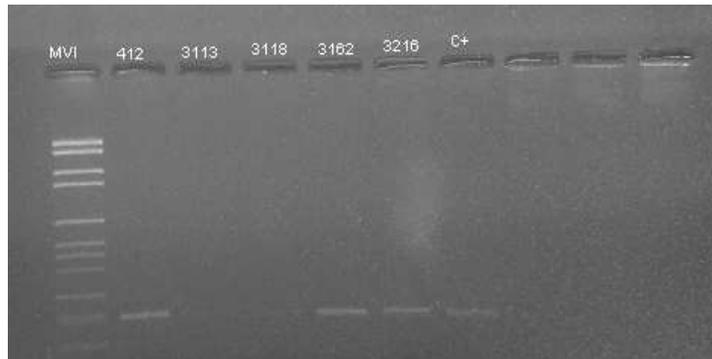


**Figure 13** : résultat de la PCR à laquelle l'échantillon 3113 (positif à la goutte épaisse et négatif au test OptiMAL-IT) a été positif aux amorces RO33 par la PCR nichée.

A part l'échantillon 3113 qui était positif avec le marqueur RO33, les autres échantillons se sont révélés négatifs à la PCR de MSP-1 avec les marqueurs K1, MAD20 et RO33. La bande dans le puits 14 était le contrôle positif.

Nous avons utilisé une paire d'amorces permettant d'amplifier le fragment d'ADN de PfLDH de 222 paires de bases entre l'échantillon 3162 et 3216. Les produits ainsi obtenus étaient ainsi séquences.

#### Gel 4



**Figure 14:** résultat de la PCR à laquelle les échantillons 412 (positif à goutte épaisse et au test OptiMAL-IT), 3118 (positif à la goutte épaisse et négatif au test OptiMAL-IT), 3162 (positif au test OptiMAL-IT et négatif à la goutte épaisse), 3216 (positif à la goutte épaisse, négatif au test OptiMAL-IT, négatif à la PCR nichée et positif aux amorces EBA-175 (Erythrocyte Binding Antigen-175) ont été positifs aux amorces PfLDH.

Cette photo de gel d'agarose montre les produits d'amplification obtenus avec les amorces de PfLDH avec les échantillons 412, 3118, 3162 et 3116. Ces amplifiats présentent le même profil migratoire, reflétant une stabilité de la partie conservée du gène.

**Les Résultats de séquençage.** Les produits de PCR obtenus (figure 13) ont été séquencés. Leur séquence a été comparée à la séquence du gène de *Plasmodium falciparum* (PfLDH) avec le numéro d'accès au GenBank est AF251291.

Pfldh Pfldhmal4	ATG GCA CCA AAA GCA AAA ATC GTT TTA GTT -----	30
Pfldh Pfldhmal4	GGC TCA GGT ATG ATT GGA GGA GTA ATG GCT -----	60
Pfldh Pfldhmal4	ACC TTA ATT GTT CAG AAA AAT TTA GGA GAT -----	90
Pfldh Pfldhmal4	GTA GTT TTG TTC GAT ATT GTA AAG AAC ATG -----	120
Pfldh Pfldhmal4	CCA CAT GGA AAA GCT TTA GAT ACA TCT CAT -----	150
Pfldh Pfldhmal4	ACT AAT GTT ATG GCA TAT TCA AAT <u>TGC AAA</u> ----- <u>-T TGC AAA</u>	180 10
Pfldh_ Pfldhmal4	<u>GTA AGT GGT TCA AAC ACT TAT GAC GAT TTG</u> <u>GTA AGT GGT TCA AAC ACT TAT GAC GAT TTG</u>	210 40
Pfldh Pfldhmal4	GCT GGA GCA GAT GTA GTA ATA GTA ACA GCT <u>GCT GGA GCA GAT GTA GTA ATA GTA ACA GCT</u>	240 70
Pfldh Pfldhmal4	GGA TTT ACC AAG GCC CCA GGA AAG AGT GAC <u>GGA TTT ACC AAG GCC CCA GGA AAG AGT GAC</u>	270 100
Pfldh Pfldhmal4	AAA GAA TGG AAT AGA GAT GAT TTA TTA CCA <u>AAA GAA TGG AAT AGA GAT GAT TTA TTA CCA</u>	300 130
Pfldh Pfldhmal4	TTA AAC AAC AAG ATT ATG ATT GAA ATT GGT <u>TTA AAC AAC AAG ATT ATG ATT GAA ATT GGT</u>	330 160
Pfldh Pfldhmal4	GGT CAT ATT AAG AAG AAT TGT CCA AAT GCT <u>GGT CAT ATT AAG AAG AAT TGT CCA AAT GCT</u>	360 190
Pfldh Pfldhmal4	TTT ATT ATT GTT GTA ACA <u>AAC CCA GTA GAT</u> <u>TTT ATT ATT GTT GTA ACA AAC CCA GTA GAT</u>	390 220
Pfldh Pfldhmal4	<u>GTT A TGG TAC AAT TAT TAC ATC AAC ATT CAG</u> <u>GT - - -</u>	420 222

**Figure 15:** Alignement de la séquence nucléotidique de l'échantillon 3162 (GE négative, OptiMAL-IT positif) avec la séquence PfLDH du GenBank.

La séquence utilisée comme amorce allée pour amplifier le fragment est soulignée et est similaire à la séquence du GenBank. La séquence utilisée

comme amorce retour soulignée est identique à celle de la séquence du GenBank.

L'échantillon 3162 a été positif au test d'OptiMAL-IT mais négatif à la goutte épaisse. Le fait que la PCR soit positive atteste que la goutte épaisse a donné un faux négatif. Les fragments des 2 séquences sont totalement identiques et aucune mutation nucléotidique n'est observée le long du fragment de 222 nucléotides amplifiés par la technique de PCR et révélés par le séquençage.

Alignement de l'amorce retour de l'échantillon 3216

Pfldh	ATG GCA CCA AAA GCA AAA ATC GTT TTA GTT	30
Pfldhmal5	--- --- --- --- --- --- --- ---	
Pfldh	GGC TCA GGT ATG ATT GGA GGA GTA ATG GCT	60
Pfldhmal5	--- --- --- --- --- --- --- ---	
Pfldh	ACC TTA ATT GTT CAG AAA AAT TTA GGA GAT	90
Pfldhmal5	--- --- --- --- --- --- --- ---	
Pfldh	GTA GTT TTG TTC GAT ATT GTA AAG AAC ATG	120
Pfldhmal5	--- --- --- --- --- --- --- ---	
Pfldh	CCA CAT GGA AAA GCT TTA GAT ACA TCT CAT	150
Pfldhmal5	--- --- --- --- --- --- --- ---	
Pfldh	ACT AAT GTT ATG GCA TAT TCA AAT <u>TGC AAA</u>	180
Pfldhmal5	--- --- --- --- --- --- --- ---	
Pfldh	<u>GTA AGT GGT TCA AAC ACT TAT GAC GAT TTG</u>	210
Pfldhmal5	--- --- <u>GGT TCA AAC ACT TAT GAC GAT TTG</u>	24
Pfldh	GCT GGA GCA GAT GTA GTA ATA GTA ACA GCT	240
Pfldhmal5	<u>GCT GGA GCA GAT GTA GTA ATA GTA ACA GCT</u>	54
Pfldh	GGA TTT ACC AAG GCC CCA GGA AAG AGT GAC	270
Pfldhmal5	<u>GGA TTT ACC AAG GCC CCA GGA AAG AGT GAC</u>	84
Pfldh	AAA GAA TGG AAT AGA GAT GAT TTA TTA CCA	300
Pfldhmal5	<u>AAA GAA TGG AAT AGA GAT GAT TTA TTA CCA</u>	114
Pfldh	TTA AAC AAC AAG ATT ATG ATT GAA ATT GGT	330
Pfldhmal5	<u>TTA AAC AAC AAG ATT ATG ATT GAA ATT GGT</u>	137
Pfldh	GGT CAT ATT AAG AAG AAT TGT CCA AAT GCT	360
Pfldhmal5	<u>GGT CAT ATT AAG AAG AAT TGT CCA AAT GCT</u>	167
Pfldh	TTT ATT ATT GTT GTA ACA <u>AAC CCA GTA GAT</u>	390
Pfldhmal5	<u>TTT ATT ATT GTT GTA ACA AAC CCA GTA GAT</u>	197
Pfldh	<u>G T</u> TA TGG TAC AAT TAT TAC ATC AAC ATT CAG	420
Pfldhmal5	<u>G T</u> --- --- ---	199

**Figure 16:** Alignement de la séquence nucléotidique de l'échantillon 3216 (GE positive, OptiMAL-IT négatif) avec la séquence PfLDH (gi/ 10180805/gb/ AF251291.1/ AF251291).

La séquence utilisée comme amorce aller pour amplifier le fragment est soulignée et est similaire à la séquence du GenBank. La séquence utilisée comme amorce retour soulignée est identique à celle de la séquence du GenBank.

L'échantillon 3216 a été négatif au test d'OptiMAL-IT mais positif à la goutte épaisse. Ce résultat indique que le parasite était présent dans le sang (parasitémie de 1025 parasites/ $\mu$ l) mais que les antigènes plasmodiaux de LDH n'étaient reconnaissables par les anticorps monoclonaux sur la bandelette réactive du test OptiMAL-IT. Le fait que la PCR est positive réconforte que l'OptiMAL-IT a donné un faux négatif. Les fragments des 2 séquences sont totalement identiques et aucune mutation nucléotidique n'est observée le long du fragment de 199 nucléotides amplifiés par la technique de PCR et révélés par le séquençage.

## VI. COMMENTAIRE ET DISCUSSIONS

Cette étude nous a permis de déterminer les valeurs diagnostiques de l'OptiMAL-IT par rapport à la goutte épaisse classique et de déterminer le polymorphisme génétique du gène codant pour la lactate déshydrogénase (LDH) de *Plasmodium falciparum* dans le village de Missira (cercle de Kolokani).

### 1 Méthodologie

Notre étude a été réalisée pendant la saison sèche entre Avril et Juin 2004. L'année est caractérisée par une période de saison sèche de Novembre à Mai et une période hivernale qui commence au mois de Juin et finit en Octobre.

La raison du choix du village de Missira comme lieu d'étude se justifie par son accessibilité en toute saison (situé à 50 Km à l'Est de Kolokani) et par la bonne collaboration qui existe entre la population du village et notre centre de recherche. Le village de Missira est par ailleurs une zone d'endémie palustre qui a servi de lieu d'étude pour l'essai thérapeutique de l'ivermectine dans le traitement de l'onchocercose (Bissan, 1985). La présence sur place d'une structure de santé facilite nos conditions de collecte des données et de suivi clinique des patients.

Le choix de la période d'étude (début de saison de pluie) a dû cependant influencer nos indices plasmodiques eu égard au faible taux d'inoculation entomologique. Les données obtenues en période de forte transmission (octobre) n'ont cependant pas montré de différence statistiquement significative. Cela montre que la transmission du paludisme dans le village de Missira s'étale sur presque toute l'année. Koita et *al.*, 2000 ont montré une distribution similaire de l'infection palustre dans le village de Bancoumana situé à 60 Km au sud-ouest de Bamako.

Les enfants de 1 à 9 ans ont constitué notre population d'étude du fait du suivi aisé de cette tranche de la population. Ceux-ci étant déjà recensés, ils se présentaient à l'inclusion suivant l'ordre de présentation au centre de santé.

Nous avons au cours de notre étude collecté les échantillons de sang sur papier confetti selon la technique des spots afin d'éviter l'utilisation d'une chaîne de froid pour la conservation, de minimiser les contaminations et de prélever des quantités identiques de sang chez chaque enfant. Cette technique a l'avantage d'éviter l'utilisation d'anticoagulant qui pourrait inhiber la réaction d'amplification génique ultérieure.

Notre échantillonnage a été exhaustif pendant la période d'étude. Il est comparable à celui utilisé par Oduola et *al* au Nigeria.

L'ADN a été extrait selon la technique du Chelex-100. Les réactifs utilisés au cours de cette technique sont stables à la température ambiante et ne présentent pas de danger pour le manipulateur à l'inverse de la technique du phénol / chloroforme qui est toxique et celle au méthanol qui est très contaminant.

Nous avons utilisé la technique de la PCR nichée (nested PCR) pour l'amplification de la séquence désirée. Cette technique a l'avantage de permettre l'amplification de très petites parasitemies. Koita et *al.*, Doumbo et *al.* ont procédé de façon similaire au cours des études effectuées à Bancoumana et à Ménaka. Les amorces utilisées sont celles s'hybridant aux séquences nucléotidiques conservées des blocs 1 et 3 du gène de la MSP-1 et permettant l'amplification du bloc 2 qui est variable. Ces amorces nous ont ainsi permis le typage des allotypes K1, MAD20, RO33 tel que décrit par Tanabé et *al* et Certa et *al.*

Nous avons utilisé des méthodes de dépistage de l'infection palustre qui s'appuient sur des caractères parasitaires différents, la goutte épaisse qui explore les caractéristiques morphologiques du parasite, les tests rapides qui s'adressent aux antigènes libérés au cours du cycle du parasite, la PCR explore l'empreinte génétique au niveau de l'ADN parasite et en fin le séquençage pour confirmer nos résultats.

## 2 Caractères sociodémographiques de la population

L'analyse de la distribution de notre population d'étude selon l'âge a montré une prédominance des enfants dont la tranche d'âge était comprise entre 1 et 5 ans

avec une fréquence de 60,2%. Les enfants âgés de 6 à 9 ans étaient les moins représentés avec 39,8%. Parmi les 304 enfants étudiés, 156 (51,3%) sont de sexe masculin et 148 (48,8%) de sexe féminin avec un sexe ratio de 1,05 en faveur du sexe masculin (Tableau I).

Des résultats similaires ont été obtenus par Bagayogo et *al.* en 2003 au centre hospitalier de Luxembourg ont obtenu au cours de leur étude, 50,09% des enfants de 5 à 12 ans de sexe masculin et 49,91 de patients de sexe féminin. Une étude faite par Keita M.M en milieu hospitalier à Bamako en pédiatrie en 2000 a aboutit au même résultat. Toutes ces études se sont déroulées chez les enfants.

### 3 Prévalence de l'infection palustre chez les enfants

La prévalence de l'infection palustre dans notre population d'étude était de 40,1% par la goutte épaisse tandis qu'elle était de 52% en fin d'hivernage à Missira (Koita et *al.* 2001). Cette variabilité de la prévalence de l'infection à *Plasmodium falciparum* d'une zone à une autre, et d'année en année aurait 2 raisons essentielles. D'une part cela pourrait s'expliquer par les variations de la pluviométrie (très faible dans le septentrion malien avec un écosystème très différent de la steppe soudanienne) et d'autre part par l'augmentation de la couverture socio sanitaire et de la sensibilisation de la population pour les mesures préventives.

Il est possible que la prévalence obtenue au cours de notre étude augmente durant la saison de pluie nous permettant de faire une comparaison avec d'autres faciès durant la même période d'étude. *Plasmodium falciparum* a été l'espèce plasmodiale la plus rencontrée au cours de notre étude avec 111 sujets infectés, soit 93,3%. Il a été retrouvé en 2004 au village de Missira une formule parasitaire composée de 84,9% de *Plasmodium falciparum* (Ly, 2005). Ceci confirme les résultats de l'étude faite par Gaye et *al* au Sénégal en 1989 qui rapportent que cette espèce est la plus fréquente en Afrique de l'Ouest.

La différence de prévalence des espèces plasmodiales selon Burkot et *al* serait due à une meilleure efficacité de la transmission des sporozoïtes de l'espèce *P.*

*falciparum* et aussi du fait que la seule espèce qui attaque toutes les hématies. L'analyse de la distribution des classes d'âge en fonction de la positivité de la goutte épaisse nous a montré que c'est surtout la classe d'âge de 1 à 5 ans qui était la plus infectée avec 68% (83/122). Une étude faite en 2001 par Koïta et al dans la même zone montrait que la classe d'âge de 0 à 9 ans était la plus infectée avec 51% contre 15% des sujets de plus de 20 ans. Ceci pourrait s'expliquer par la mise en place graduelle de l'immunité anti-palustre dans cette tranche de la population.

#### 4 Distribution de la densité parasitaire

La distribution de la densité parasitaire positive a été très variable. Cette densité a une moyenne géométrique de 261,26 plus ou moins 995,51, une minimale de 25 et une maximale de 6375. Les sujets ayant une parasitémie comprise entre 75 et 500 parasites par/  $\mu\text{l}$  étaient les plus représentés (58,2%) suivis des patients ayant une parasitémie supérieure à 1000 (15,6%) (Tableau IV). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus en 2004 par Bougouma au Burkina Faso avec 40% des sujets ayant une densité parasitaire inférieure à 1000 parasites par microlitre. L'analyse de la charge parasitaire supérieure à 75 parasites par microlitre montre une nette régression de la parasitémie avec l'âge. La fréquence des enfants de la classe d'âge de 1 à 5 ans ayant une parasitémie supérieure 1000 trophozoïtes/ $\mu\text{l}$  a été de 84,21% comparée à 15,79% chez les enfants de la classe d'âge de 5 à 9 ans.

Pour les parasitémies inférieures à 75 trophozoïtes par microlitre la fréquence des enfants infectés augmente avec l'âge. Celle-ci a été de 47,1% chez les enfants de la classe d'âge de 1 à 5 ans et de 52,9% pour la classe de 5 à 9 ans (tableau V). Une étude effectuée par Bougouma en 2004 au Burkina Faso montrait que le portage de charges parasitaires supérieures à 10000 p/ $\mu\text{l}$  de sang régressait avec l'âge. Cette charge a été de 17,2% chez l'enfant contre 4,3% chez l'adulte. La fréquence des charges parasitaires inférieures à 1000 trophozoïtes/ $\mu\text{l}$  augmentait cependant avec une fréquence de 31% chez les enfants et 82% chez l'adulte. La diminution de la parasitémie chez les enfants

âgés (de plus de 10 ans) s'expliquerait par l'augmentation de l'exposition due aux piqûres infestantes des moustiques avec acquisition d'une immunité graduelle antiplasmodiale. Les enfants de moins de 5 ans n'ayant pas été en contact avec plusieurs souches n'ont pas encore acquis cette immunité d'où les parasitémies élevées.

Nos observations vont de paire avec celles faites par Cox et al en 1994 en Guinée et Rogier et al, au Sénégal, 2001. Ces auteurs ont expliqué la baisse de la densité parasitaire par acquisition de l'immunité. Les enfants de moins de 1 an n'étant pas concernés car protégés par les anticorps maternels. Trape et al. ont abordé dans le même sens en 1994 au Sénégal en précisant que la densité parasitaire atteint son maximum durant la deuxième année de vie et commence à décroître après l'âge de 15 à 19 ans.

##### 5 Etude comparative de la goutte épaisse et de l'OptiMAL-IT

Nous avons comparé 2 méthodes qui n'explorent pas la même caractéristique du parasite, l'une s'adressant aux caractéristiques morphologiques du parasite et l'autre aux antigènes. C'est ainsi que nous avons soumis 304 échantillons à la fois à la technique de goutte épaisse et le test OptiMAL-IT. Nous avons obtenu 122 (40,1%) enfants positifs à la goutte épaisse et 123 au test OptiMAL-IT (40,5%). Les données obtenues par les 2 techniques sont presque identiques avec une concordance de 0,88. Néanmoins, nous avons obtenu des faux négatifs (6,6%) et des faux positifs (4,9%) par la technique de l'OptiMAL-IT lorsque la goutte épaisse a été considérée comme la technique de référence. Le test a une bonne sensibilité (93,4%), une bonne spécificité (95,1%), est simple à utiliser, mais ne permet pas une quantification de la parasitémie et ne précise pas le stade de développement du parasite. Les autres paramètres diagnostics telles la valeur prédictive négative et valeur prédictive positive ont été respectivement de 95,6% et de 92,7%. Le test OptiMAL-IT a une bonne concordance Kappa qui a été de 0,88. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Rénion Saye en 2004 au village de Faladiè, une sensibilité de

97,2%, une spécificité de 95,4%, une valeur prédictive positive de 96,7%, une valeur prédictive négative de 96,1% et une bonne concordance Kappa de 0,93.

Palmer et al. (1998), après examen microscopique d'échantillons sanguins, ont trouvé pour le test OptiMAL-IT, une sensibilité de 88% et une spécificité de 99% pour *Plasmodium falciparum*. John et al. (1998) ont de même obtenu des résultats comparables avec 94% de sensibilité lors d'un essai au sud de l'Inde. Hunt- Cook et al en Gambie ont trouvé une sensibilité de 91,3% et une spécificité de 94% lors d'une étude en Gambie en utilisant le même test.

Le test OptiMAL-IT nous a donc permis d'identifier *P. falciparum* seul ou associé à une autre espèce. L'espèce *P. malariae* associé à *P. ovale* a été identifiée à la fois par le test OptiMAL-IT et par la goutte épaisse.

La présence de faux négatifs s'expliquerait par les faibles parasitémies. Le fabricant a dans le cas de l'OptiMAL-IT prévu un seuil de détection de 50-100 parasites par mm<sup>3</sup> de sang. Durant notre période d'étude qui correspondait à la saison sèche, les faibles parasitémies sont les plus fréquentes se traduisant par les faux négatifs observés. Nous avons des faux négatifs avec des parasitémies assez élevées, ceci était très surprenant, car la parasitémie était élevée par rapport au seuil de non détection (50-100/μl) et faible par rapport à des parasitémies très élevées à partir desquelles des effets de masque au niveau des anticorps monoclonaux des bandelettes réactives du test sont observées. Notre hypothèse est que des mutations ponctuelles se produiraient au gène de LDH correspondant à l'épitope de la partie antigénique et ferait en sorte que l'anticorps monoclonal ne puisse le reconnaître. Il a été observé qu'un changement d'un seul acide aminé entraînerait une altération d'un antigène (Imamichi et al., Shulman et al., 2001).

En ce qui concerne les faux positifs, aucune hypothèse explicative ne semble supporter cet état de fait et nécessite donc une analyse plus poussée.

## 6 Etude comparative de la goutte épaisse du test OptiMAL-IT et de la PCR de MSP-1

Afin de partager les résultats discordants des 2 tests, nous avons eu recours à la technique d'amplification par la PCR en utilisant les marqueurs polymorphiques du bloc II de MSP-1 (Koita, 2000). Nous avons utilisé la PCR nichée pour augmenter la sensibilité de la technique. Nous avons réalisé la PCR sur 17 échantillons dont les résultats de la goutte épaisse et du test OptiMAL-IT ne concordaient pas. Ce procédé nous permettait de lever toute ambiguïté. Sur les 8 échantillons qui étaient des faux négatifs par le test OptiMAL-IT, nous avons identifié deux échantillons qui s'étaient avérés positifs après amplification par les marqueurs de PCR. Un échantillon sur 9 des faux positifs à l'OptiMAL-IT s'était révélé positif à la PCR de MSP-1.

La fréquence des faux positifs de l'OptiMAL-IT par rapport à la PCR a été de 42,9% et celle des faux négatifs de 66,7%. Ces résultats étaient attendus puisque les marqueurs polymorphiques ne sont pas appropriés pour être des tests de diagnostic, en effet les gènes de MSP-1 peuvent subir des variations de telle sorte que les amorces n'arrivent plus à s'apparier, la formation des parasites hybrides de MSP-1 en est une illustration (Koita et al. 2005).

## 7 Etude du polymorphisme

L'utilisation du gène de la MSP-1 permet d'évaluer l'impact de l'infection polyclonale au niveau des échantillons dont les résultats étaient discordants. Ainsi aucun des sujets avec un résultat discordant n'avait plus d'un allotype (infection monoclonale) dans le sang au moment des tests. Ce résultat a été retrouvé avec le test ParaSight-F® lors que des faux négatifs ont été identifiés en comparaison avec la goutte épaisse et la PCR (Koita et al. 2005)

L'amplification du gène de la MSP1 nous a permis d'identifier les 3 allèles décrits de par le monde. L'allèle le plus fréquent a été RO33 avec 66,67% de l'ensemble des allèles. Cette observation est identique à celle faite par Koita et al en 1996, Ouattara et al en 1997 et N'Toumi en al au Sénégal. Ces auteurs décrivaient une fréquence élevée de RO33 au cours de la saison de pluie avec une

recrudescence de l'allèle K1 et des cas de paludisme grave en fin de saison de transmission. Mercereau et al au Sénégal ont également observé une distribution similaire des allèles en utilisant des échantillons collectés de par le pays.

Nous avons confirmé les échantillons amplifiés par la PCR de MSP-1 avec des marqueurs moléculaires plus conservés notamment ceux du PfLDH. Ainsi, nous avons amplifié l'échantillon 3113 qui était positif à la goutte épaisse mais négatif au test OptiMAL-IT, l'échantillon 3118 positif à la goutte épaisse mais négatif au test OptiMAL-IT, l'échantillon 3162 négatif à la goutte épaisse mais positif au test OptiMAL-IT par la PCR de PfLDH. Ces résultats suggèrent que la technique de PCR reste le test le plus sensible et doit être réservée qu'aux centres de référence de diagnostic (à cause de sa technicité et de son coût) pour le contrôle de qualité de nos laboratoires. Le cas particulier de l'échantillon 3216 confirme encore de l'utilité des marqueurs conservés pour le diagnostic. En effet, il a été négatif à la PCR avec les marqueurs polymorphiques de MSP-1, son test OptiMAL-IT était négatif malgré une parasitémie élevée (1025p/μl), nous avons observé une bande de PCR lors de l'amplification avec la paire d'amorce provenant du gène de l'Erythrocyte Binding Antigen-175 (EBA-175). En effet, PfEBA-175 et PfLDH sont des gènes essentiels à la biologie du parasite, l'un pour son entrée à l'intérieur de l'érythrocyte et l'autre pour son besoin énergétique. Ainsi les marqueurs obtenus des gènes conservés sont les plus indiqués pour leur inclusion dans les tests de diagnostic, ces résultats de PCR avec PfLDH ont été confirmés avec la technique de séquençage où les séquences nucléotidiques (Figures 15 et 16) présentent une parfaite homologie avec celle séquencée par Shan et al., (2001) se trouvant dans la base de données de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ) sous le numéro d'accès AF251291.

## VII. CONCLUSION

Notre étude a montré que le test rapide OptiMAL-IT de DiaMed a les mêmes valeurs diagnostiques que la technique d'identification morphologique de la goutte épaisse. Nous avons décelé des faux négatifs probablement dus à des faibles parasitémies mais aussi des faux négatifs lorsque les parasitémies étaient de loin supérieures au seuil de détection établi par le fabricant. L'étude a suggéré que les marqueurs moléculaires obtenus des gènes dont les séquences nucléotidiques sont conservées sont souhaitables pour être insérées dans les tests rapides de diagnostic au lieu des marqueurs moléculaires des gènes polymorphiques adaptés aux études de génétique de population.

## VIII. RECOMMANDATIONS

Au terme de notre étude nous formulons les recommandations suivantes:

➤ **Aux autorités sanitaires nationales:**

- permettre l'accessibilité aux antimalariques surtout dans les régions les plus éloignées,
- appuyer les études de recherches éventuelles sur le paludisme.
- la mise en place d'un laboratoire de référence au niveau régional pour le contrôle de qualité des tests rapides de diagnostic parasitaire,
- la formation des techniciens de santé à la technique d'identification des espèces (goutte épaisse et frottis mince) par la microscopie,
- mettre à la disposition des centres de santé de nouveaux tests de dépistage du paludisme tels OptiMAL-IT, Core™
- le maintien et le renforcement des cantines scolaires pour que les enfants se portent bien sur le plan nutritionnel.

➤ **Aux autorités sanitaires locales de Kolokani et le CSCOM de Toumanibougou**

- IEC (Information, éducation et communication) sur le mécanisme de transmission du paludisme,
- IEC (Information, éducation et communication) sur les différentes méthodes de prévention,
- IEC (Information, éducation et communication) sur l'imprégnation des supports et former les populations à sa pratique,
- Former le personnel en mettant en place une infrastructure adaptée à leurs besoins,
- Effectuer un dépistage rapide par les tests d'immunocapture et une prise en charge précoce des cas de paludisme simple et grave,
- Formation de personnels sanitaires par rapport à l'évacuation des malades atteints de formes graves.

➤ **A la population de Missira:**

- Former les mères, à la prise en charge des cas de fièvre suivant un organigramme à élaborer par le programme régional de lutte contre le paludisme et l'identification correcte des cas présentés,
- Lutter contre les vecteurs en éliminant les gîtes larvaires et les anophèles de manière naturelle ou artificielle par les insecticides,
- Fermer les portes et les fenêtres dès le crépuscule jusqu'à l'aube, faire porter par les enfants des vêtements longs et éviter leur exposition dehors,
- Conduire l'enfant au centre de santé dès la survenue de la maladie afin d'éviter les formes graves du paludisme,
- Eloigner les champs de maïs des concessions afin d'éviter une trop grande agressivité des moustiques.

➤ **Au fabricant du test OptiMAL-IT (DiaMed)**

- Augmenter la sensibilité du test OptiMAL-IT,
- Adapter la température de conservation du test en fonction du lieu d'étude.
- Diminuer le coût du test OptiMAL-IT

## IX. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Anonyme.** Aide mémoire; OMS, N°94, révisé octobre 1998.

Report of the WHO informal consultation.

*Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio. Efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces, WHO, Geneve, Swistzerland.*

**Anthony Moody.**

*Rapid test for malaria parasites.*

American society for Microbiology, clinical Microbiology Reviews, vol 15 jan. 2002, p. 66-78.

**Beate C, long GW, Weiss WR, MC Elroy PD, Maret SM, Oloo AJ, Hoffman SL,** 1994. *Diagnosis of malaria by detection of Plasmodium falciparum HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen capture assay.* Lancet 343: 564-568.

**Bintou Ly.**

*Epidemiologie du paludisme en saison sèche dans une zone de savane nord soudanienne, Missira (Kolokani).* Memoire de DEA, 2005.

**Bissan Yiriba**

*Bio-écologie de Simulium damnosum S.L. (Diptera- Simuliidae) en zone de savane soudano- sahélienne région de la Boucle du Baoulé (Missira- cercle de Kolokani) incidence sur la transmission de l'onchocercose. Thèse, 1985.*

**Bougouma Edith Christiane**

*Morbidité du paludisme en Zone hyper endémique du Burkina Faso: Etude de l'incidence plasmodique et de l'incidence clinique.*

*Thèse de Ph 2004.*

**Burkot T.R.** et coll. 1987

*The efficiency of sporozoite transmission in the human malarial, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax.*

*Bull. W. H. O. 65(3) : 375.80.*

**Burgmann H, Looareesuwan S, Kapiotis S, et al:**

*Serum levels of Erythropoietin in acute Plasmodium Falciparum malaria.* Am J Med Trop Hyg 54: 280-283, 1996.

**BZIK. D.J., Fox.B.A and Gonyer.K.**

*Expression of Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase in Escherichia Coli.* Molecular and Biochemical Parasitology 1993 59, 155-166.

**Carnevale P., Robert V., et al. (1984)**

*Faciès épidémiologiques des paludismes en Afrique Subsaharienne. Etudes médicales 3 : 123-33.*

**Certa U., Rotmann D., Matile H., Reber-Liske R.**

*A naturally gene encoding the major surface antigen precursor P190 of P. falciparum. Lacks tripeptides repeats. EMBO J. 1987; 6:1556-1563.*

**Corre A.P., Bah M.D., Diallo S., Fall K.L., Sow A., Ndiaye K. I.P., Antonio ZP, ROFFIJ.**

*Paludisme et grossesse XXIXe congrès des Gynécologues et obstétriciens de langue française, Dakar , Sénégal, 26-29 Mai 1982.*

**Cox M., J., Kum D.E., Tavul L., et al. (1994)**

*Dynamics of malaria parasitaemia associated with febrile illness in children from a rural area of madang, Papua New Muinea. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88 : 191-97*

**Dembélé**

*Paludisme et grossesse, saisonnalité et relations avec petits poids de naissance à Bougoula hameau (Sikasso, Mali). Thèse Med Bamako, 1995 N°20.*

**Diani F.**

*Evaluation de la situation sanitaire au Mali. thèse de doctorat de Pharmacie, Bamako 1985*

**Dicko AA**

*Epidémiologie du paludisme dans la région de Mopti en de l'élaboration d'un programme régional de lutte. Thèse med. Bamako 1995.*

**Ferro, B.E. Gonzalez, I.J. Carvajal, F. Palma, G.I. Saravia, N.G. 2002, Mem Inst Oswaldo Cruz, 731-5. Performance of OptiMAL-IT ® in the diagnosis of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum infections in a malaria referral center in Colombia.**

**Gaye O., Bah I. B, Diallo S., Faye O., Boudon. D (1989)**

*Une étude de morbidité palustre en milieux rural et urbain au Sénégal*

**Gérard Martet, François Piron**

*Diagnostic du paludisme. Septembre 2000.  
Http:// asmt.louis.fr /diagnostic.html.*

**Gilles M.T., & De Meillon B.** (1968), Pub. Sth. Afr. Inst. Med. Res.54, Pp; 343 of the Sahara.

**Gilles H.**

*Diagnostic methods in malaria, Im H. M. Gilles and D. A. Warrell (ed.), essential malariology, 3rd ed. P. Edward Arnold, London, Univerted Kingdom, 1993.78.*

**Humar, A., Ohrt, M.A. Harrington, D. Pillai, and K.C. Kain.** 1997. *Parasigh® test compared why the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnostic of Plasmodium falciparum malaria in travelers.* Am. J. Trop. Med. Hyg. 56: 44-48.

**Hunt-Cooke, A. H., P. L. Chiodini, T. Docherty, A. H. Moody, J. Ries, and M. Pinder.** 1999.

*Comparaison of a parasite lactate dehydrogenase-based immunochromatographic antigen detection assay (OptiMAL®) with microscopy for the detection of malaria parasites in human blood samples.* Am. J. Trop. Med. Hyg. 60: 20-23.

**Iqbal, J., Sher, A. HIRA, P.R. Al. Owaish, R.J Clin microbial,** Nov 1999, 3644-6. *Comparaison of the OptiMAL-IT test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants*

**Jam Shaid, Iqbal, Parsotamr. Hira, Ali Sher, and Abdul Aziz Al-enezi.** *Diagnosis for imported malaria by Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase (pLDH) and Histidine –Rich Protein 2 (pf HRP-2). Based immunocapture Assays.* Am J. Trop. Med. Hyg. 64(1, 2), 2001, p.20-23.

**John, S. M., A. Sundarsanam, U. Sitaram, and A. H. Moody.**1998. *Evaluation of OptiMAL-IT®, a dipstick test for the diagnosis of malaria.* Ann. Trop. Med. Parasitol. 92: 621-622.

**Kanaani. J., and Ginsburg. H.**

*Transport of lactate in Plasmodium falciparum infected human erythrocytes.* Journal of cellular physiology 1991 n° 149, 469-476.

**Keita M.M**

*Etude retrospective des hyperthermies lies aux suspicions d'infections bactériennes invasives dans le service de pédiatrie de CHU GABRIEL TOURE de janvier- Décembre 2000.*

*Thèse de Médecine ; Bamako, 2003 ; 03-M-18*

**Koita Ousmane.**

*Evaluation épidémiologique du paludisme le long du tronçon de la route trans. Saharienne du Mali.*

Thèse de Pharmacie FMPOS Bamako, 1988 ; n° 26

**Koita O**

*Molecular Studies of Clonality, Transmission and Severe Disease in Malaria.*  
Thèse de PhD, Tulane University, New Orleans Louisiane.

**Koita O., Dao S., Sango H.A., Keita. N., Mounkoro M., Maïga M.**

*Epidémiologie de la transmission du paludisme dans le cercle de Ménaka. 2004.*  
Rapport technique.

**Krogstad D J**

*Plasmodium species (malaria).* In Mandell GM (ED): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, ed 4, New York, Churchill-Livingstone, 1995.

**Kwiatkowski D:** *TNF-inducing malaria toxin: A Sheep in wolf's clothing?* Ann Trop Med Parasitol 87: 613-616, 1993.

**Limangeni Mankhambo, Maxwel Kanjala, Sarah Rudman, Valentino M. Lema, and Stephen J. Rogerson.**

*Evaluation of the OptiMAL-IT Rapid Antigen Test and Species- Specific PCR to Detect Placental Plasmodium falciparum infection at Delivery.*  
College of Medecine, university of Malawi, Blantyre, and wellcome Trust Research Laboratories and Department of obstetrics and Gynaecology, college of medicine, university of Malawi, Blantyre, Malawi; school of Tropical Medecine, university of Liverpool, Liverpool, United Kingdom; and Department of Medecine, university of Melbourne, Melbourne, A. 29Octobre 2001.

**Makler, M.T., J.M. Ries, J.A. Williams, J.E. Bancroft, R.C. Piper, B.L. Gibbins, and D.J. Hinrichs.** 1993.

*Parasite lactate dehydrogenase as an assay for Plasmodium falciparum drug sensitivity.* Am J. Trop. Med. Hyg. 48: 739-741.

**Makler, M.T., and D.J. Hinrichs.** 1993. *Measurement of the lactate dehydrogenase activity of Plasmodium falciparum as an assessment of Parasitémie.* Am. J. Trop. Med. Hyg, 48: 205-210.

*Malaria diagnostic de laboratoire.*

<http://www.rph.gov.au/lobs/halm/malaria/France/fdiagnosis.html>.

**Molyneux M., Marsh K.**

*Epidemiological aspects of severe and complicated malaria recherches needs.*  
Appl. Field. Res malaria Reports 1991, 1992, 1996, 1998.

**Moody, A., A., Hunt-Cooke, E. Gabbett, and P. Chiodini.** 2000.

*Performance of the OptiMAL-IT ® malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the hospital for tropical diseases, London. Br. J. Haematol. 109: 891-894.*

**Nancy SHULMAN, Andrew R. Zolopa, Doug Passaro, Robert W. Shafer, WEI Huang, David Katzenstein, Dennis M. Israelski, Nick Hellmann, Chris Petropoulos and Jeannette Whitcomb.** 2001

*Phenotypic hypersusceptibility to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in treatment-experienced HIV- infected patients: impact on virological response to efavirenz- based therapy. AIDS 2001, 15: 1125-1132.*

**Odile Mercerau Puijalon., Thierry Fandeur., Serge Bonnefoy., Catherine Jacquenot., Jean Louis Sarthou.**

*A study of the genomic diversity of Plasmodium falciparum in Senegal typing by the use of the polymerase chain reaction. Acta Tropica. 1991. 49: 293-304.*

**Oduola , A.M., G.O. Omitowoju, A. Sowunmi, M.T. Makler, C.O. Falader, D.E. Kyle, F.A. Fehintola, O.A. Ogundahunsi, R.C. Piper, B.G. Shuster, and W.K. Mihous.** 1997. *Plasmodium falciparum : evaluation of lactate dehydrogenase in monitoring therapeutic response to standard anti-malarial drugs in Nigeria .Exp.Parasitol.87:283-289.*

**OMS 1992**

*Evaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques pour le traitement du paludisme à Plasmodium falciparum non compliqué dans les régions de transmission élevée.*

**OMS 1993**

*Grandes lignes du plan d'action de l'OMS pour la lutte contre le paludisme 1993-2000. Conférence ministérielle sur le paludisme. Amsterdam 27 octobre 1992*  
Paludisme (Généralités)

[Http://www.Vulgaris.medical.com/testp/paludisme.html](http://www.Vulgaris.medical.com/testp/paludisme.html)

**OMS 2001; Roll Back Malaria**

*Qu'est-ce que le Paludisme?*

**Ousmane Koita, Sounkalo Dao, Mamadou W. Bagayogo, Moussa Kaloga, Mamadou Keita, Issa O. Diallo et Donald J. Krogstad.**

*Utilisation des Marqueurs Polymorphiques de MSP-1 dans la description épidémiologique du paludisme en zone de Savane du Nord du Mali, Missira, Kolokani Octobre 2001. Université de Bamako, Mali. Tulane Department of Tropical Medicine and Center of Infectious Diseases, New Orleans, LA.*

**Ousmane A. Koita, Ogobara K. Doumbo, Amed Ouattara, Lalla K. Tall, Aoua Konare, Mahamadou Diakite, Mouctar Diallo, Issaka Sangara, Safiatou N. Doumbo, Amagana Dolo, Issa Traore, Donald J. Krogstad.** 2005.

*False-negative Parasight F tests from deletion of the Hrp2 gene.* The Mali – TMRC supplement in the American journal of tropical medicine and hygiene (soumis).

**Ousmane A. Koita, Ogobara K. Doumbo, Amed Ouattara, Lalla K. Tall, Mouctar Diallo, Mahamadou Diakite, John L. Gerone, Sekou F. Traore, Gjibril Sangare, Yeya T. Touré, Toumani Sidibé, Mahamadou M. keita Donald J. Krogstad.** 2005.

*Hybrid Plasmodium falciparum Sequences Identified Under conditions of natural transmission: Risk Factor for Cerebral Malaria.* The Mali – TMRC supplement in the American journal of tropical medicine and hygiene (soumis).

**Palmer, C. J. F. Lindo, W. I. Klaskala, J. A. Quesada, R. Kainsky, M. K. Baum, and A. L. Ager.** 1998.

*Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum malaria.* J. Clin. Microbiol. 36: 203-206.

**Pieroni, P., C.D. mills, C. Ohrt, M.A. Harrington, and K.C. Kain.** 1998.

*Comparison of parasight® and ICT® malaria Pf test with the polymerase chain reaction for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in travelers.* Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92: 166-169.

**Piper, R.C., D.L. Vanderjagt, J.J. Voltrok, and M. Lakleer.** 1996. *Malaria lactate dehydrogenase: Target for diagnosis and drug development.* Ann. Trop. Med. Parasitol. 90:433.

**Piper, R.J., Lebras, L. Wentworth, A. Huntcook, S. Houze, P. Chiodini, and M. Makler .** 1999. *A capture diagnostic assay for malaria using Plasmodium lactate dehydrogenase (Pldh).* Am. J. Trop. Med. Hyg. 60, 109-118.

### **Rénion Saye**

*Intéret de l'OptiMAL-IT dans le diagnostic du paludisme et le suivi du traitement aux antimalariques au Mali.*

Thèse de Pharmacie, 2005.

**Ricci, L. Viani, I. Piccolo, .Fabio, A. Calderaro, A. Galati, L. Perandin, F.Vecchia, L.Manca, N.Dettori, G.Turano, A.Chezzi, C.** Octobre 2000

*Evaluation of OptiMAL-IT Assay test to detect imported malaria in Italy.*

**Robert F., F. N'toumi., G. angel., D. Candito., C. Rogier., T. Fandeur., J.L. Sarthou., O. Merceau Puijalon.**

Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients

with severe malaria in Dakar, Senegal. *Tran. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996; 90:709-711.

**Rock, E.P., K. Marsh, S.J. Saul, T.E. Wellems, D.W. Taylor, W.L. Maloy, and R.J. Howard.** 1987. *Comparative analysis of the Plasmodium falciparum histidine- rich proteins HRP1, HRP2 and HRP3 in malaria diagnostic of diverse origin.* *Parasitologie* 95: 209-227.

**Rogier C.,** Spiegel H., 2001

*Diagnostic des accès palustres en zone d'endémie : bases théoriques et implications pratiques.* *Méd. Trop.* 61(1), 27-46.

**Roth, E.F., J.R. Calvin. M.C., Max. Audit. T., Rosa. J., and Rosa. R. 1988**

*The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with Plasmodium falciparum malaria parasites.*

*Blood* 72, 1922-1925.

**Schofield L, Vivas L, Hackett F, et al:** *neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF- $\alpha$ -inducing toxin of Plasmodium falciparum: Prospects for the immunotherapy of severe malaria.* *Ann Trop Med Parasitol* 87: 617-626, 1993.

**Selvam R, Baskaran G:** Hematological impairments in recurrent *Plasmodium vivax* infected patients. *Jpn J Med Sci Biol* 49: 151-165, 1996.

**Simmons. D.L., Hyde. J.E., Mackay. M., Goman. M. And Scaife. J.** 1985.

*Cloning studies on the gene coding for L-(+)- lactate dehydrogenase of Plasmodium falciparum.*

*Molecular and Biochemical parasitology* 15, 231-243

**Singh N, Valecha N, Sharma VP,**1997. *Malaria diagnosis by field workers using immunochromatographic test.* *Trans R SOC Trop. Med. Hyg* 91: 209-227.

**Tanabe. K.**

*Glucose transport in malaria infected erythrocytes. Parasitology of to day, (6), 225-229. 1990.*

**Tanabe K., Mackey M., Goman M., Scaife John.**

*Allelic dimorphic in a surface antigen gene of P. falciparum.* J. Mol. Biol. 1987; 195:273-287.

**TOMOZUMI IMAMICHI, MICHAEL A. MURPHY, HIROMI IMAMICHI, and H. CLIFFORD LANE.** 2001

*Amino Acid Deletion at Codon 67 and Thr- to- Gly Change at Codon 69 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Confer Novel Drug Resistance Profiles.* Laboratory of Molecular Retrovirology, Clinical Services Program, Science Applications International Corporation- Frederick, National Cancer Institute-Frederick, Frederick, and Laboratory of Immunoregulation, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland.

**Touré, Y.T., CAH. O.R.S.T.O.M.,** Sér, Int. Med. Et Parasitol., vol. Xx, n°2, 1983: 125-131.

*Etude de la sensibilité d'Anopheles gambiae sensu lato aux insecticides dans la zone rurale de savane soudanienne au Mali.*

**Touré Y. T., V. Petrassi, S.F. Traoré, A. Coulibaly, H.M. Maiga, O. Sangaré, M. Sow, M.A. Dideco et M.Coluzzi** (1994) Genetics, 94213-223.

*Ecological genetics studies in the chromosomal from Mopti of An.gambiae S.S in Mali, west Africa.*

**Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P,**

*The Dielmo project: A longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal.*

*Am Jour Trop Hyg* 1994. 91: 602-605.

**Vander. Jagt. D. L., L.A., and Heid-Rich. J.E.** 1981.

*Partial purification and characterization of lactate dehydrogenase from Plasmodium falciparum.*

*Molecular and Biochemical parasitology* 4, 255-264.

**Wooden j., Goulde.E., Paullat., Sibley CH.**

*P. falciparum: a simple polymerase chain reaction for differentiating strains.* *Exp. Parasitol.* 1992. 75; 207-21.

## X. FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom :** ALZOUMA Younsa

**Prénom :** Fatoumata

**Date de soutenance :** 21 Mai 2005

**Ville de soutenance :** Bamako

**Pays d'origine :** Niger

**Titre de la thèse:** Performances diagnostiques du test rapide OptiMAL-IT. Place de la biologie moléculaire dans l'évaluation du polymorphisme génétique de la lactate déshydrogénase (LDH) de *Plasmodium falciparum*.

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie.

**Secteur d'intérêt :** Recherche au Laboratoire de biologie moléculaire appliquée

### Résumé

Le but de notre étude était d'évaluer le polymorphisme génétique de la lactate déshydrogénase (LDH) de *Plasmodium falciparum* et d'estimer les paramètres diagnostiques du test OptiMAL-IT par rapport aux techniques de PCR et de la goutte épaisse (GE). Notre étude s'était déroulée dans le village de Missira Cercle de Kolokani en période sèche (Avril - mai). Notre échantillon comptait 304 enfants âgés de 1 à 9 ans. Au cours de cette étude nous avons obtenu les mêmes valeurs diagnostiques entre le test optimal et la technique d'identification morphologique de la goutte épaisse.

La fréquence des enfants positifs au test OptiMAL-IT au cours de cette étude était de 40,5 % soit 123/304. La prévalence de l'infection palustre par l'observation de la goutte épaisse était de 40, 1 % (122/304). Le test OptiMAL-IT a donné une bonne sensibilité de 93,4%, une spécificité de 95,1 %, une VPN de 95,6 % et une VPP de 92,7% par rapport à la goutte épaisse. Le test de kappa de Cohen (0,88 %) réalisés sur l'ensemble des résultats a montré qu'il existe une très bonne concordance entre les résultats du test OptiMAL-IT et la goutte

épaisse. Nous avons observé 8 faux négatifs (6,6%) probablement dus à des faibles parasitémies, mais aussi des faux négatifs malgré des parasitémies supérieures aux seuils de détections établis par le fabricant qui (50-100 parasites /  $\mu$ l de sang). Neuf faux positifs (4,9%) ont été aussi décelés dont une analyse plus poussée pourrait nous donner plus d'information.

Afin de départager les résultats discordants (17) des 2 tests nous avons utilisé la technique d'amplification par la PCR en utilisant des marqueurs polymorphiques du bloc 2 de MSP1. Nous n'avons pas obtenu des résultats satisfaisants entre la PCR et les 2 tests. Cet état de fait était attendu puisque les marqueurs polymorphiques ne sont pas appropriés pour être des tests de diagnostic. L'utilisation des marqueurs moléculaires plus conservés notamment ceux de PfLDH pour confirmer les échantillons amplifiés par la PCR de MSP1 nous a permis d'obtenir des bons résultats et de connaître l'utilité de ces marqueurs. Ces résultats de PCR avec PfLDH ont été confirmés avec la technique de séquençage où les séquences nucléotidiques (figure 15 et 16) présentent une parfaite homologie avec celle séquencée par Shan et al 2001, se trouvant sur la base de données de GenBank sous le numéro d'accès AF251291.

**Mots clés:** Plasmodium falciparum, PfLDH, test OptiMAL-IT, PCR, Mali.

**Name:** ALZOUMA Younsa

**Surname:** Fatoumata

**Defence date:** 21 Mai 2005

**Defence country:** Bamako

**Title:** Performances diagnosis of rapid test OptiMAL-IT. Place of biologie molecular in evaluation of genetic polymorphism of the lactate dehydrogenase (LDH) of *Plasmodium falciparum*.

**In reserve at:** Medical, Pharmacial and dentistry library of faculty of Mali

**Subject interest:** seek at the laboratory of Molecular Biologie, malaria.

### **Abstract**

The goal of our study was to evaluate the genetic polymorphism of the lactate dehydrogenase (LDH) of *Plasmodium falciparum* and to consider the parameters diagnosis of the OptiMAL-IT test compared to the techniques of PCR and of the thick blood smear. We carried out a cross-sectional study within 304 children from 1 to 9 years old during the dry season (April-May) in the village of Missira in Kolokani areas (Mali). During this study we obtained the same diagnostic values between the OptiMAL-IT test and the morphological technique of identification of the blood smear. The frequency of the positive children to the OptiMAL-IT test during this study was 40,5 % is 123/304. The prevalence of the malaria infection by the microscopic observation of the blood smear was 40, 1 % (122/304). The OptiMAL-IT test gave a good sensitivity of 93,4%, a specificity of 95,1 %, the Negative Predictive Value (NPV) was 95,6% and the Positive Predictive Value (PPV) was 92,7% compared to the blood smear. The kappa test of Cohen (0,88%) showed a good agreement between the OptiMAL-IT test and the thick blood smear. We observed 8 cases of false negatives (6,6%) in spite of some with higher parasitemia than the threshold of detections establish by the manufacturer (50-100 parasites/ $\mu$ l of blood). Nine false positive (4,9%) were also detected of which a more thorough analysis could give us more information. In order to decide between the unmatched results (17) of the 2 tests we used the technique of amplification by the PCR by using polymorphic markers of block 2 of

MSP1. We did not obtain a suitable result between the PCR and the 2 tests. This established fact was expected since the polymorphic markers are not adapted to be diagnostic tests. The use of more conserved molecular markers in particular those of PfLDH to confirm the samples amplified by the PCR of MSP1 enabled us to obtain good results and to know the utility of these markers. These results of PfLDH PCR were confirmed by gene sequencing and the nucleotidic sequences (figure 15 and 16) have a perfect homology with those sequenced by Shan et al. 2001, being on the basis of data of GenBank under the number of access AF251291.

**Key words:** *Plasmodium falciparum*, PfLDH, OptiMAL-IT test, PCR, Mali.

### **SERMENT DE GALIEN**

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et des condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.