

UNIVERSITE DU MALI
Direction de l'Enseignement Supérieur
FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE
ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

Année: 2001

Thèse N° 6

Titre: Étude de la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* chez l'homme et chez les vecteurs en relation avec le mode de transmission du paludisme à Donéguebourg (Arrondissement central de Kati)

THESE

*Présentée et soutenue publiquement le.....
Devant la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie*

Par

Mr Brahima BAGAYOKO

Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie (DIPLOME D'ETAT)

JURY:

Président: Professeur Amadou DIALLO

Membres: Docteur Abdrahamane S. MAÏGA

Docteur Amagana Dolo

Docteur Sékou F. TRAORE (Co-Directeur)

Professeur Yéya T. TOURE (Directeur de thèse)

Ce travail effectué au MRTC/DEAP/FMPOS du Mali a bénéficié d'un appui financier de TDR/OMS (Projets ID 930762 et 960948) et de l'assistance technique du LPD/NIH.

LISTE ACADEMIQUE
2001-2002

ADMINISTRATION

DOYEN: MOUSSA TRAORE - **PROFESSEUR**

1^{er} ASSESSEUR: Feu AROUNA KEITA - **MAITRE DE CONFERENCES AGREGE**

2^{ème} ASSESSEUR: ALHOUSSEYNI AG MOHAMED - **MAITRE DE CONFERENCES AGREGE**

SECRETAIRE PRINCIPAL: YENIMEGUE ALBERT DEMBELE - **MAITRE DE CONFERENCES AGREGE**

AGENT COMPTABLE : YEHIYA HIMINE MAIGA - **CONTROLEUR DES FINANCES**

LES PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Aliou 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 Ali 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

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Amadou DOLO	Gynéco-Obstétrique
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE Dit DIOP	Chirurgie Générale
Mr Alhousséyni Ag MOHAMED	O.R.L.
Mr Abdoulaye K. DIALLO	Anesthésie-Réanimation
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mme SY Aïssata SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique
Mr Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique
Mr Sadio YENA	Chirurgie Générale
Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale

5. ASSISTANTS CHEF DE CLINIQUE

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie
Mr Sékou SIDIBE	Orthopédie-Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie-Réanimation
Mr Tiéman COULIBALY	Orthopédie-Traumatologie
Mme TRAORE J. THOMAS	Ophtalmologie
Mr Nouhoum ONGOIBA	Anatomie & Chirurgie Générale
Mr Zanafon OUATTARA	Urologie
Mr Zimogo Zié SANOGO	Chirurgie Générale
Mr Adama SANGARE	Orthopédie-Traumatologie
Mr Youssouf COULIBALY	Anesthésie-Réanimation
Mr Samba Karim TIMBO	O.R.L.
Mme TOGOLA Fanta KONIPO	O.R.L.

iv

Mr Sanoussi BAMANI	Ophtalmologie
Mr Doulaye SACKO	Ophtalmologie
Mr Issa DIARRA	Gynéco-Obstétrique
Mr Ibrahim ALWATA	Orthopédie-Traumatologie

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1 PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
Mr Bréhima KOUMARE	Bactériologie-Virologie
Mr Siné DAVO	Anatomie Pathologie Histochimie

Mr Sanoussi BAMANI
Mr Doulaye SACKO
Mr Issa DIARRA
Mr Ibrahim ALWATA

Ophtalmologie
Ophtalmologie
Gynéco-Obstétrique
Orthopédie-Traumatologie

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1 PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO
Mr Bréhima KOUMARE
Mr Siné BAYO
Mr Gaoussou KANOUTE
Mr Yéya T. TOURE
Mr Amadou DIALLO
Mr Moussa HARAMA
Mr Ogobara DOUMBO

Chimie Générale & Minérale
Bactériologie-Virologie
Anatomie-Pathologie-Histoembryologie
Chimie analytique
Biologie
Biologie Chef de D.E.R.
Chimie organique
Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Anatole TOUNKARA
Mr Yénimégué Albert DEMBELE
Mr Amadou TOURE

Immunologie
Chimie Organique
Histoembryologie

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Bakary M. CISSE
Mr Abdrahamane S. MAIGA
Mr Adama DIARRA
Mr Mamadou KONE

Biochimie
Parasitologie
Physiologie
Physiologie

6. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mahamadou CISSE
Mr Sékou F. TRAORE
Mr Abdoulaye DABO
Mr Abdrahamane TOUNKARA
Mr Ibrahim I. MAIGA
MR Benoît KOUMARE
Mr Moussa Issa DIARRA
Mr Amagana DOLO
Mr Kaourou DOUCOURE

Biologie
Entomologie médicale
Malacologie, Biologie animale
Biochimie
Bactériologie-Virologie
Chimie analytique
Biophysique
Parasitologie
Physiologie

7. ASSISTANTS

Mr Mounirou BABY
Mr Mahamadou A.THERA

Hématologie
Parasitologie

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAIGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie, Chef de D.E.R.
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Mr Hamar A. TRAORE	Médecine interne
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie
Mr Bah KEITA	Pneumo-Physiologie
Mr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Mr Somita KEITA	Dermato-Léprologie
Mr Moussa Y. MAIGA	Gastro-Entérologie
Mr Abdel Kader Traoré	Médecine Interne

3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mamadou DEMBELE	Médecine interne
Mr Mamady KANE	Radiologie
Mme Tatiana KEITA	Pédiatrie
Mr Diankiné KAYENTAO	Pneumologie
Mme TRAORE Mariam SYLLA	Pédiatrie
Mr Siaka SIDIBE	Radiologie
Mr Adama D. KEITA	Radiologie
Mme SIDIBE Assa TRAORE	Endocrinologie

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 Séydou DIAKITE	Cardiologie
Mme Habibatou DIAWARA	Dermatologie
Mr Mamadou B. CISSE	Pédiatrie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie

5. ASSISTANTS

Mr Cheick Oumar GUINDO	Neurologie
------------------------	------------

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Bouba DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Bakary I. SACKO	Biochimie
Mr Sidiki DIABATE	Bibliographie
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souleymane GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du milieu
Mr Arouna COULIBALY	Mathématiques
Mr Mamadou Bocary DIARRA	Cardiologie
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie Médicale
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mr Saibou MAIGA	Législation

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. A.E. YAPO	BIOCHIMIE
Pr. M.L. SOW	MED. LEGALE
Pr. DOUDOU BA	BROMATOLOGIE
Pr. M. BADIANE	PHARMACIE CHIMIQUE
Pr. BABACAR FAYE	PHARMACODYNAMIE
Pr. ERIC PICHARD	PATHOLOGIE INFECTIEUSE
Pr. MOUNIROU CISS	HYDROLOGIE
Dr G. FARNARIER	PHYSIOLOGIE
Pr AMADOU PAPA DIOP	BIOCHIMIE

LISTE ACADEMIQUE
2001-2002

ADMINISTRATION

DOYEN: MOUSSA TRAORE - **PROFESSEUR**

1^{er} ASSESSEUR: Feu AROUNA KEITA - **MAITRE DE CONFERENCES AGREGE**

2^{ème} ASSESSEUR: ALHOUSSEYNI AG MOHAMED - **MAITRE DE CONFERENCES AGREGE**

SECRETAIRE PRINCIPAL: YENIMEGUE ALBERT DEMBELE - **MAITRE DE CONFERENCES AGREGE**

AGENT COMPTABLE : YEHIYA HIMINE MAIGA - **CONTROLEUR DES FINANCES**

LES PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Aliou 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 Ali 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

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Amadou DOLO	Gynéco-Obstétrique
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE Dit DIOP	Chirurgie Générale
Mr Alhousseyni Ag MOHAMED	O.R.L.
Mr Abdoulaye K. DIALLO	Anesthésie-Réanimation
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mme SY Aïssata SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique
Mr Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique
Mr Sadio YENA	Chirurgie Générale
Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale

5. ASSISTANTS CHEF DE CLINIQUE

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie
Mr Sékou SIDIBE	Orthopédie-Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie-Réanimation
Mr Tiéman COULIBALY	Orthopédie-Traumatologie
Mme TRAORE J. THOMAS	Ophtalmologie
Mr Nouhoum ONGOIBA	Anatomie & Chirurgie Générale
Mr Zanafon OUATTARA	Urologie
Mr Zimogo Zié SANOGO	Chirurgie Générale
Mr Adama SANGARE	Orthopédie-Traumatologie
Mr Youssouf COULIBALY	Anesthésie-Réanimation
Mr Samba Karim TIMBO	O.R.L.
Mme TOGOLA Fanta KONIPO	O.R.L.

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAIGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie, Chef de D.E.R.
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Mr Hamar A. TRAORE	Médecine interne
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie
Mr Bah KEITA	Pneumo-Phtysiologie
Mr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Mr Somita KEITA	Dermato-Leprologie
Mr Moussa Y. MAIGA	Gastro-Entérologie
Mr Abdel Kader Traoré	Médecine Interne

3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mamadou DEMBELE	Médecine interne
Mr Mamady KANE	Radiologie
Mme Tatiana KEITA	Pédiatrie
Mr Diankiné KAYENTAO	Pneumologie
Mme TRAORE Mariam SYLLA	Pédiatrie
Mr Siaka SIDIBE	Radiologie
Mr Adama D. KEITA	Radiologie
Mme SIDIBE Assa TRAORE	Endocrinologie

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 Séydou DIAKITE	Cardiologie
Mme Habibatou DIAWARA	Dermatologie
Mr Mamadou B. CISSE	Pédiatrie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie

5. ASSISTANTS

Mr Cheick Oumar GUINDO	Neurologie
------------------------	------------

D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEUR

Mr Boubacar Sidiki CISSE Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Arouna KEITA Matière médicale
Mr Ousmane DOUMBIA Pharmacie chimique
Mr Flabou BOUGOUDOGO Bactériologie-Virologie

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Boulkassoum HAIDARA Législation
Mr Elimane MARIKO Pharmacologie, **Chef de D.E.R.**
Mr Massa SANOGO Chimie analytique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Drissa DIALLO Matières médicales
Mr Alou KEITA Galénique
Mr Ababacar I. MAIGA Toxicologie
Mr Yaya KANE Galénique

D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEUR

Mr Sidi Yaya SIMAGA Santé publique, **Chef de D.E.R.**

2. MAITRE DE CONFERENCES AGRGE

Mr Moussa A. MAIGA Santé publique

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Yanick JAFFRE Anthropologie
Mr Sanoussi KONATE Santé publique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE Santé publique
Mr Adama DIAWARA Santé publique
Mr Hamadoun SANGHO Santé publique
Mr Massambou SACKO Santé publique

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Bouba DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Bakary I. SACKO	Biochimie
Mr Sidiki DIABATE	Bibliographie
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souléyman GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du milieu
Mr Arouna COULIBALY	Mathématiques
Mr Mamadou Bocary DIARRA	Cardiologie
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie Médicale
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mr Saibou MAIGA	Législation

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. A.E. YAPO	BIOCHIMIE
Pr. M.L. SOW	MED. LEGALE
Pr. DOUDOU BA	BROMATOLOGIE
Pr. M. BADIANE	PHARMACIE CHIMIQUE
Pr. BABACAR FAYE	PHARMACODYNAMIE
Pr. ERIC PICHARD	PATHOLOGIE INFECTIEUSE
Pr. MOUNIROU CISS	HYDROLOGIE
Dr G. FARNARIER	PHYSIOLOGIE
Pr AMADOU PAPA DIOP	BIOCHIMIE

Mr Sanoussi BAMANI
Mr Doulaye SACKO
Mr Issa DIARRA
Mr Ibrahim ALWATA

Ophtalmologie
Ophtalmologie
Gynéco-Obstétrique
Orthopédie-Traumatologie

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1 PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO
Mr Bréhima KOUMARE
Mr Siné BAYO
Mr Gaoussou KANOUTE
Mr Yéya T. TOURE
Mr Amadou DIALLO
Mr Moussa HARAMA
Mr Ogobara DOUMBO

Chimie Générale & Minérale
Bactériologie-Virologie
Anatomie-Pathologie-Histoembryologie
Chimie analytique
Biologie
Biologie Chef de D.E.R.
Chimie organique
Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Anatole TOUNKARA
Mr Yénimégué Albert DEMBELE
Mr Amadou TOURE

Immunologie
Chimie Organique
Histoembryologie

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Bakary M. CISSE
Mr Abdrahamane S. MAIGA
Mr Adama DIARRA
Mr Mamadou KONE

Biochimie
Parasitologie
Physiologie
Physiologie

6. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mahamadou CISSE
Mr Sékou F. TRAORE
Mr Abdoulaye DABO
Mr Abdrahamane TOUNKARA
Mr Ibrahim I. MAIGA
MR Benoît KOUMARE
Mr Moussa Issa DIARRA
Mr Amagana DOLO
Mr Kaourou DOUCOURE

Biologie
Entomologie médicale
Malacologie, Biologie animale
Biochimie
Bactériologie-Virologie
Chimie analytique
Biophysique
Parasitologie
Physiologie

7. ASSISTANTS

Mr Mounirou BABY
Mr Mahamadou A.THERA

Hématologie
Parasitologie

DEDICACES

Au tout puissant clément et miséricordieux

Ce travail est le tien. Tu as guidé et surveillé mes pas jusqu'à ce jour.

A mon père, Dougoufana Bagayoko, père de famille exemplaire, ce travail est le couronnement de tous les sacrifices que vous avez consentis pour faire de moi un homme « équilibré ». Votre dévouement sans relâche, votre bonté, votre grande générosité sont entre autres, au tant de qualités pour moi, un modèle d'identification sociale.

A ma mère Yiritio Traoré, mère de famille infatigable, en m'amenant à accepter et aimer les autres avec leurs différences, tu as cultivé en moi, les vertus de la tolérance et de l'amour du prochain sur fond de tendresse et d'affectivité. Trouves ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon amour filial.

A mes grand-frères Alfousseyni K. Bagayoko, Mamadou Bagayoko et Salif Bagayoko.

Vous m'avez donné toutes les affections, toutes les attentions que peut donner un frère. Vous avez été toujours à mes côtés dans les moments les plus difficiles. Vous m'avez soutenu dans toutes mes entreprises de façon morale et financière. Chers frères ! Ce travail est le vôtre.

Au Docteur Magaran M. Bagayoko, cette thèse a été facilitée par votre appui technique et moral. Votre grande disponibilité et votre savoir-faire ne m'ont jamais fait défaut. Vous m'avez toujours soutenu dans les moments difficiles. Je ne pourrais vous remercier assez de votre bien faisances.

A Sédian Baba Camara et sa famille pour votre soutien de tous genres. Je ne pourrai vous remercier assez. Trouvez ici l'expression de mon profond respect.

A tous mes amis et diplômés de l'ENI : Seïdina Oumar Diallo, Samba Kéita, Abdramane Diallo, Paul Amaga Dara, Issa Traoré sans oublier les amis de Bamakou Hamed Dia Soumaré, Mohamed L. Haïdara, Ibrahima Siré Sangaré, Toumani D. Sangaré, Cheick Sagara et Mariam Diané.

Aux familles de Mr Fadiala Sissoko à Missabougou, Thiam à Hamdalaye, Mr Djassiki Kéita à Bougouni, Mr Sory Ibrahim Koné à Sikasso.

REMERCIEMENTS

Il me tient à cœur de remercier très sincèrement toutes les personnes de bonne volonté qui de loin ou de près ont contribué tant soit peu à la réalisation de ce travail.

Cependant, je ne saurais jamais énumérer de façon exhaustive les parents, amis, collaborateurs et maîtres qui m'ont apporté leurs soutiens moraux, matériels et scientifiques tout au long de cette thèse.

Qu'ils trouvent tous ici l'expression de ma profonde gratitude !

Mes remerciements vont à toute l'équipe du Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC) du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS) et notamment à mes maîtres:

- Au professeur Yéya Tiémoko TOURE, directeur de cette thèse. Cher maître, votre motivation constante, votre amour du travail bien fait, votre passion immodérée pour la science et la technologie font de vous un chercheur admirable. Vous n'avez ménagé aucun effort pour suivre cette thèse depuis le début jusqu'à la rédaction. Scientifique infatigable et méticuleux, vous n'avez jamais cessé de lire et de relire entre les pages de cette thèse. Ce travail est le fruit de l'effort conjugué de toute une équipe une équipe de recherche à laquelle vous avez su inculquer l'esprit de la compétitivité dans l'honnêteté scientifique, puisse ce travail exprimer toute ma profonde reconnaissance et mon admiration.
- Au Docteur Sékou Fantamady TRAORE, co-directeur de cette thèse. Cher maître, votre apport intellectuel et matériel ainsi que vos conseils de grand frère ne m'ont jamais fait défaut aux moments cruciaux. Cher maître, votre grande ambition scientifique, doublé de votre esprit d'ouverture font de vous un scientifique et un pédagogue admirable. Votre grande disponibilité et votre amour au travail bien fait ont permis dans la réalisation de cette thèse. Trouvez ici ma profonde gratitude !
- Au Docteur Richard K. SAKAI, scientifique efficace, modeste, discret, et sympathique, vous n'avez jamais hésité à nous faire bénéficier de votre soutien tant sur le plan technique que matériel tout au long de la réalisation de ce travail. En dehors du travail votre humanisme fait de vous un modèle. Je vous prie d'accepter ma profonde reconnaissance.
- A mon formateur Dr Djibril Sangré, qui, malgré ses multiples occupations, n'a ménagé aucun effort pour m'apporter son assistance technique et ses conseils pratiques du début à la fin de cette thèse. Cher grand frère, en supervisant cette thèse vous m'avez permis de faire mes premiers pas dans la recherche scientifique. Merci de votre soutien moral et scientifique.
- Aux membres du jury qui, en dépit de leurs multiples occupations, ont bien voulu accepter de siéger dans ce jury. Nos remerciements:
 - A notre maître et président du jury, Professeur Amadou DIALLO, professeur à la FMPOS, chargé de cours de Biologie animal et de Zoologie et Chef de D.E.R Biologie à la FMPOS. Cher maître, c'est un grand honneur que vous me faites en acceptant la présidence du jury de cette thèse. Vos grandes qualités pédagogiques et scientifiques et votre

humeur constamment joviale font de vous un maître admirable. En plus de vos qualités scientifiques nous gardons de vous l'image du maître aux qualités humaines inestimables. Je vous prie d'accepter ma profonde reconnaissance.

- A notre maître et juge, Docteur Abdrahamane Sidey MAIGA, Maître de conférences à la FMPOS, chargé de cours de Parasitologie et de Mycologie à la FMPOS, chef de service de Parasitologie à l'INRSP. Cher maître, vos grandes qualités pédagogiques, votre rigueur dans le travail bien fait, ont été pour moi des éléments de motivation pour la recherche en parasitologie médicale. Vous me faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury de thèse. Trouvez ici ma profonde reconnaissance.
- A notre maître et juge, Docteur Amagana DOLO, Maître assistant à la FMPOS, chargé de cours de parasitologie à la FMPOS, Chercheur au DEAP/FMPOS. Cher maître, Votre savoir-faire scientifique et votre grand courage dans la recherche ont marqué notre attention. Veuillez trouver ici l'expression de votre profonde gratitude.

- Aux chercheurs du MRTC

Bakary Sissoko le doyen, Dr Madama Bouaré, Madame Traoré Yaye Sow, Dr Abdoulaye Touré, Dr Guimogo Dolo, Oumou Niaré, Nafomon Sogoba, Dr Mamadou B. Coulibaly, Alpha Seydou Yaro, Mohamed Fofana et Dr Ousmane Koïta.

Dès mes premières heures parmi vous j'ai vu, des hommes intègres, pleins de bon sens. La gérontocratie que vous avez initiée fait maintenir l'ambiance scientifique. Chacun de vous a donné le maximum de lui pour m'aider chaque fois que j'étais en nécessité. Les mots me manquent pour vous remercier de votre entière disponibilité.

- A monsieurs Adama Dao et Adama Sacko, pour vos multiples efforts tant sur le terrain qu'au laboratoire. Ce travail a été réalisé grâce votre grande disponibilité, votre concours de tous les jours ainsi qu'à votre soutien moral et matériel. Je ne saurai vous remercier assez.
- A mes camarades de thèse: Zoumana Fané, Yaya Ibrahim Coulibaly et Mahamadou B. Touré pour leur collaboration franche et constructive.
- Aux techniciens de MRTC/DEAP
Boubacar Coulibaly, Moussa Diallo, Abdramane Fofana. Vous avez toujours répondu présent et avec enthousiasme quand j'avais besoin de vous. Vous m'avez gratifié tant de respect. C'est le lieu de vous remercier pour tout ce vous faites pour moi. Je vous souhaite une bonne carrière professionnelle.
- A nos guides: Bakossa Niaré, Yacouba Niaré, Boua Niaré, Youssouf Diarra, les captureurs et toute la population de Donéguébougou pour leur constance disponibilité.
- A l'administrateur du MRTC, Souleymane Karembé pour son grand courage. Merci pour tous.
- A tous les chauffeurs du MRTC/DEAP, pour leur motivation.

- A mes amis et collègues Docteurs: Al hatji Hamadoun Sidibé, Moussa T. Koné Youssouf Diawara, Issa K. Cissé, Zankè Diarra, Alphadi Boubacar Dicko, Nouhoum Diarra, Gaoussou Koïta, Lassine Soumano, Maïmouna M. Dembelé, Assétou Coulibaly et les autres Hawa Traoré, Ousmane B. Coulibaly, Yacouba Diabaté, Falaye Kéïta, Mariam Kanté.
- A mes collègues et camarades diplômés de l'ENSUP au laboratoire MRTC Ibrahim Baber, Moussa Kéïta et Ibrahim Sissoko
- Au professeur Ogobara Doumbo et tout le personnel de TMRC/DEAP
- A mes aînés : Moussa Sogoba, Mohamed Balla Niambélé tous au DEAP.

LISTE DES ABREVIATIONS

A: Adénine

ADN: Acide Désoxyribose Nucléique

An. arabiensis : *Anopheles arabiensis*

An. gambiae s.l.: *Anopheles gambiae sens large*

An. gambiae s.s.: *Anopheles gambiae sens strict*

ARN: Acide Ribonucléique

C: Cytosine

C.E: Concentré Emulsifiable

DEAP: Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires

ddl: degré de liberté

ELISA: Enzyse Linked Immuno Sorbant Assay

FMPOS: Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie

G: Guanine

h: taux d'inoculation entomologique

IG: Indice Gamétocytaire

IP: Indice Plasmodique

kDa: kilodalton

MgCl₂ : Chlorure de Magnesium

MRTC: Malaria Research and Training Center (centre de recherche et de formation sur le paludisme)

MSP: Merozoite Surface Protein (protéine à la surface du mérozoïte)

OMS.: Organisation Mondiale de la Santé

P. falciparum : *Plasmodium falciparum*

P: probabilité

SIDA: Syndrome Immuno-Déficiences Acquises

TBE: Tris Borate EDTA

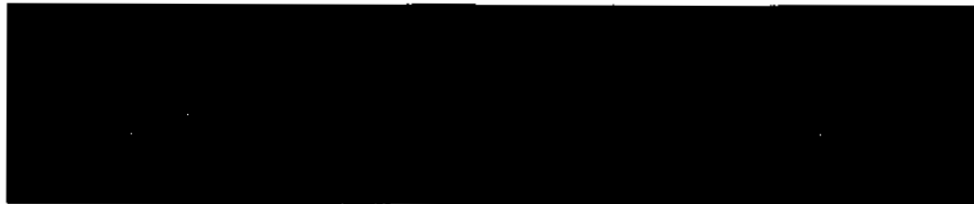
X²: Chi carré

%: pourcentage

Sommaire

1- INTRODUCTION	2
2. GENERALITES	7
2.1 Cycle biologique	7
2.2 Organisation cytogénétique et diversité génétique des parasites	9
2.3 Autres marqueurs génétiques	14
2.4 Méthodes d'étude du polymorphisme chez <i>P. falciparum</i>	16
3. MATERIELS ET METHODES D'ETUDE	20
3.1 Lieu d'étude	21
3.2 Etude de la transmission du paludisme	30
3.3 Etude de la diversité des allotypes (MSP-1 et MSP-2)	50
3.4 Considérations éthiques	56
3.5 Gestion et analyse des données	56
4 - RESULTATS	59
4.1 Etudes Entomologiques	59
4.2 Etudes Parasitologiques	78
4.3 Etude de la diversité allotypique de <i>P. falciparum</i>	81
4.4 Etudes de la complexité des infections	93
5. DISCUSSION	99
5.1 Etudes entomologiques de la transmission	99
5.2 Etudes parasitologiques de la transmission	105
5.3 Etude de la diversité des allotypes de <i>P. falciparum</i>	105

6- CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	110
Conclusion	110
Recommandations	111
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	113
RESUME.....	123
ABSTRACT	125



1- INTRODUCTION

Le paludisme est une parasitose d'importance majeure estimée être responsable de plus de 2 millions de morts par an dans le monde intertropical et surtout en Afrique au Sud du Sahara (OMS, 1997). En conjonction avec le SIDA, le paludisme est un facteur de premier plan contribuant au ralentissement du développement socio-économique du continent africain.

Au Mali, le paludisme constitue la première cause de morbidité (15,6%) et de mortalité (13%). En général, les enfants de moins de 10 ans et les femmes enceintes, sont les plus touchés avec 80 à 90% des cas (PNLP, 1997). Le taux de prévalence du paludisme infection varie de 1 à 5% en zone Subsaharienne; de 7,2 à 40% en zone sahélienne et plus de 85% en zone de savane Sud soudanienne dont *Plasmodium falciparum* prédomine avec 85 à 90% de la formule parasitaire (Doumbo *et al.*, 1989).

Dans le monde, la transmission du paludisme est assurée par plusieurs espèces d'anophèles. Les principaux sont: *Anopheles gambiae* s.l. (Giles, 1902) et *Anopheles funestus* (Giles, 1900). Les études effectuées par Touré *et al.*, en 1979; 1983 et 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 Sélingueni ont montré que le complexe *An. gambiae* est composé d'*An. arabiensis* et de trois formes chromosomiques d'*An. gambiae* s.s. dénommées Bamako, Savane et Mopti (Coulibaly, 1985). Ces formes chromosomiques contribuent toutes à la transmission du paludisme et de la filariose de Bancroft (Touré, 1989). Par ailleurs, les variations de fréquence et les taux d'infection des espèces observées à Banambani, ont permis de mieux comprendre la notion de transmission par "Relais" (Touré *et al.*, 1984). Les études similaires effectuées par Sangaré (1996) ont confirmé que la transmission est intense et stable à Donéguébougou. D'autres études de Sangaré, en 2000 ont montré un polymorphisme génétique de la « merozoite surface protein » (MSP) de *P. falciparum* chez le vecteur à Donéguébougou. Il existe plusieurs mécanismes à

l'origine de ce polymorphisme chromosomique. Parmi ces mécanismes nous pouvons citer: la cassure et le réarrangement des chromosomes durant la mitose (Cappai *et al.*, 1989), la duplication des régions répétitives, la recombinaison entre les chromosomes homologues et non homologues au cours de la sporogonie chez le vecteur (Ranford-Cartwright *et al.*, 1993; Babiker *et al.*, 1997). La recombinaison dans la progéniture ou avec d'autres génotypes pourrait donner de nouvelles souches de *P. falciparum* (Walliker *et al.*, 1987; Wellems *et al.*, 1990). En outre, l'existence d'infections mixtes chez la même espèce plasmodiale, a été démontrée par plusieurs auteurs (Ranford-Cartwright *et al.*, 1991; Day *et al.*, 1992; Babiker *et al.*, 1994; Koïta *et al.*, 1994; Ntoumi *et al.*, 1995). Le phénomène a été observé aussi bien en saison sèche qu'en saison de pluies (Babiker *et al.*, 2000). Ces différentes modifications se caractérisent par un polymorphisme chromosomique de séquences et de tailles des marqueurs génétiques MSP-1 et 2 de *P. falciparum*. D'autres études effectuées par Mario *et al.*, en 2000 ont montré une relation entre la distribution géographique d'*Anopheles albimanus* et d'*Anopheles pseudopunctipennis* et le polymorphisme du gène de la « circumsporozoite protein » (CSP) de *Plasmodium vivax* au Mexique. Ces auteurs ont étudié le phénomène aussi bien au laboratoire que sur le terrain. Pour mieux cerner ce problème de la diversité génétique de *P. falciparum* associée au système de relais observé à Donéguébougou, il serait important d'étudier l'impact des facteurs parasitologiques sur la transmission du paludisme.

En effet, la lutte contre le paludisme reste de nos jours une des priorités du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP). De ce fait, le polymorphisme allélique de *Plasmodium* constitue un obstacle majeur pour le traitement et la recherche d'un vaccin antipaludique. La déclaration de politique nationale de lutte contre le paludisme stipule l'élaboration au niveau de chaque région d'un programme régional en fonction des caractéristiques locales de la maladie, du vecteur et de l'environnement (PNLP, 1993). Ce travail pourrait fournir au Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP)

des indicateurs pertinents sur le mode de transmission par relais du paludisme au Mali.

L'échange de gènes entre les chromosomes pendant la sporogonie pose de véritables problèmes et complique d'avantage l'étude de la dynamique des populations de *P. falciparum* et des vecteurs. La description de *P. falciparum* chez l'homme à été principalement concentrée sur sa diversité génétique (Conway et Mc Bride, 1991; Arnot *et al.*, 1993, Babiker *et al.*, 1994). De nos jours une cinquantaine de marqueurs génétiques ont été identifiés et séquencés dont la « merozoite surface protein 1 et 2 » (MSP-1 et 2). Ces deux marqueurs ont été utilisés pour étudier le polymorphisme allélique de *P. falciparum* dans cette étude. Ainsi, les résultats de cette thèse permettront de compléter les précédents en vue d'une meilleure compréhension de la diversité génétique de *P. falciparum* chez l'Homme et chez les vecteurs du paludisme à Donéguébougou.

Pour réaliser cette étude nous nous sommes fixés les objectifs suivants:

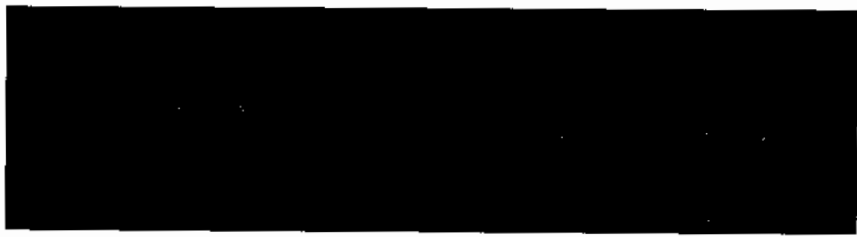
Objectifs:

• **général:**

Etudier la relation entre le mode de transmission du paludisme et la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* chez le moustique et chez l'homme à Donéguébougou.

• **spécifiques:**

- i. Evaluer les paramètres entomologiques et parasitologiques de la transmission du paludisme,
- ii. Déterminer le polymorphisme allélique de la MSP-1 et de la MSP-2, en fonction des variations saisonnières de la transmission du paludisme chez les vecteurs,
- iii. Caractériser les variations saisonnières du polymorphisme allélique de la MSP-1 et de la MSP-2 au sein de la population humaine,
- iv. Comparer la diversité génétique de *P. falciparum* observée chez les populations humaine et anophélienne en rapport avec le système de transmission naturelle du paludisme à Donéguébougou.



2. GENERALITES

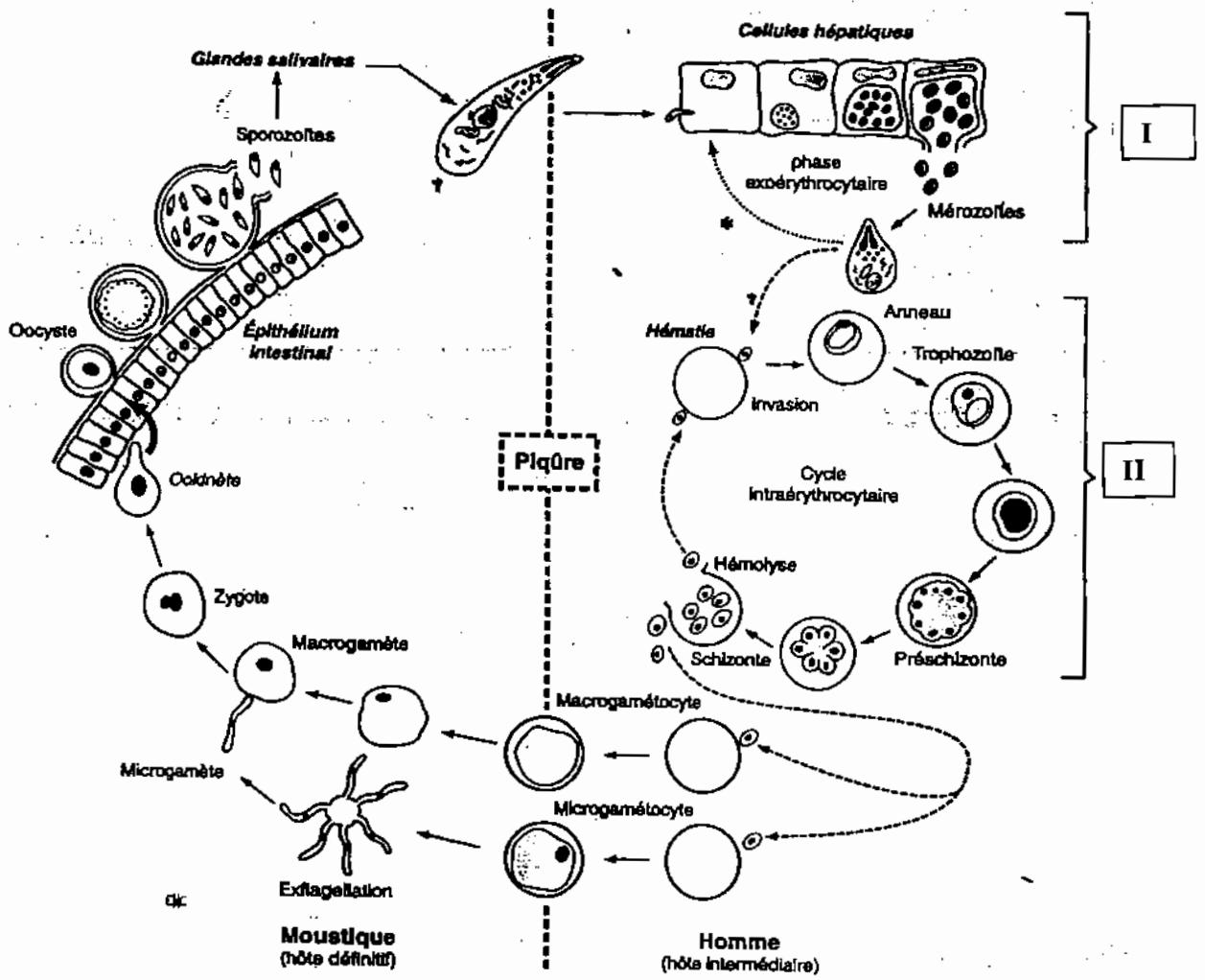
2.1 Cycle biologique

Plasmodium falciparum est un protozoaire intracellulaire. Son cycle biologique nécessite un hôte invertébré poïkilotherme (anophèle) et un hôte vertébré homéotherme (Homme). Le moustique qui permet la reproduction sexuée du parasite est l'hôte définitif et celle asexuée se passe chez l'homme (hôte intermédiaire).

Chez l'hôte humain, le parasite est haploïde. Il se multiplie de façon asexuée dans les hépatocytes en libérant des mérozoïtes de première génération (I). Ces mérozoïtes infectent les hématies, se multiplient puis se transforment en schizontes. Ces schizontes éclatent pour donner des mérozoïtes de deuxième génération (II). Certains d'entre eux infectent de nouvelles hématies tandis que d'autres se différencient en gamétocytes migrant vers le sang périphérique pour être ingérés par les moustiques au cours de leur repas de sang.

C'est chez le moustique, qu'a lieu la reproduction sexuée: la sporogonie. Elle résulte de la fusion des gamètes (micro et macro) après leur fertilisation et aboutit à la formation d'un zygote (forme diploïde du parasite). C'est pendant la sporogonie que le génome de *P. falciparum* subit d'importantes modifications qui seraient à l'origine de sa diversité génétique.

Figure 1: Cycle évolutif du plasmodium (*Encyclopédie Médico-Chirurgicale Tome 4 8-507-A-10*) .



I = Phase Pré-érythrocytaire
II = Phase Erythrocytaire

2.2 Organisation cytogénétique et diversité génétique des parasites du paludisme

Les études cytogénétiques des parasites du paludisme ont jusqu'à présent produit peu d'informations sur l'organisation du génome et le nombre de chromosomes aux différents stades du cycle biologique (Figure 1).

Le génome de *P. falciparum* est organisé entre 14 chromosomes (Kemp *et al.*, 1987, Wellems *et al.*, 1992), lesquels varient en taille de 650 à 340.000 kilo base (kb); (Triglia *et al.*, 1992). La taille des chromosomes homologues diffère entre les différents clones de laboratoire, mais aussi entre des isolats de parasites fraîchement collectés (Corcoran *et al.*, 1988; Babiker *et al.*, 1991). Durant la multiplication mitotique, des réarrangements géniques ont lieu fréquemment au niveau de la région subtélomérique des chromosomes (Janse *et al.*, 1993).

Actuellement beaucoup de gènes ont été assignés à leurs chromosomes; respectifs grâce à la technique d'hybridation et de "blotting" (Kemp *et al.*, 1990; Walker-Jonah *et al.*, 1992). Plusieurs loci polymorphiques ont été également identifiés et une extension de la diversité génétique a été observée au sein des populations naturelles de parasite (Walliker *et al.*, 1973).

Récemment la base moléculaire du polymorphisme de plusieurs gènes a été révélée (Tanabe *et al.*; 1987, Smythe *et al.*; 1991). L'usage de la " Polymerase Chain Reaction" (PCR) a rendu possible l'analyse de ces gènes polymorphiques. (Kimura *et al.*, 1990; Arnot *et al.*; 1993). L'analyse des populations de parasites du paludisme dans la nature ont démontré que les allèles de gènes sur différents chromosomes présentent un modèle Mendélien de transmission de caractères héréditaires (Walliker *et al.*, 1987). Ainsi l'identification des allèles de tels gènes non liés a produit un outil très pratique pour l'étude des populations naturelles de parasite et des mécanismes de recombinaisons au sein de ces populations. Les recombinaisons entre gènes à différents loci dans le génome ont lieu pendant la phase sexuée du parasite au sein du moustique. Celles-ci

aboutissent à une apparition de nouveaux génotypes de parasites contenant de nouvelles combinaisons de gènes, lesquelles peuvent se maintenir par survie.

La diversité génétique des parasites a été observée au sein des populations naturelles par l'usage de différentes formes de plusieurs variants de marqueurs biochimiques, enzymatiques et d'antigènes polymorphiques. Parmi les caractères biochimiques et moléculaires utilisés pour étudier le polymorphisme chez les populations de *P. falciparum* figurent les antigènes détectés par les anticorps monoclonaux, les protéines détectées par l'électrophorèse à deux dimensions sur gel de polyacrylamide (2D-PAGE); les "Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) de certains gènes; les sondes d'ADN de séquences spécifiques et les différences de taille entre les chromosomes homologues (Kemp *et al.*, 1990). L'analyse des différentes séquences et les tailles des régions de nombre variable de nucléotides répétés *en tandem* a permis d'identifier un polymorphisme allélique de tels gènes chez *P. falciparum* (Kimura *et al.*, 1990).

Figure 2: Schéma de l'organisation du gène de la MSP-1. Le gène de la MSP-1 est divisée en 17 domaines ou blocs (Tanabe *et al.*, 1987). Les portions claires correspondent aux régions conservées; les hachurées aux régions semi-conservées et celles noires (pleines) sont polymorphiques.

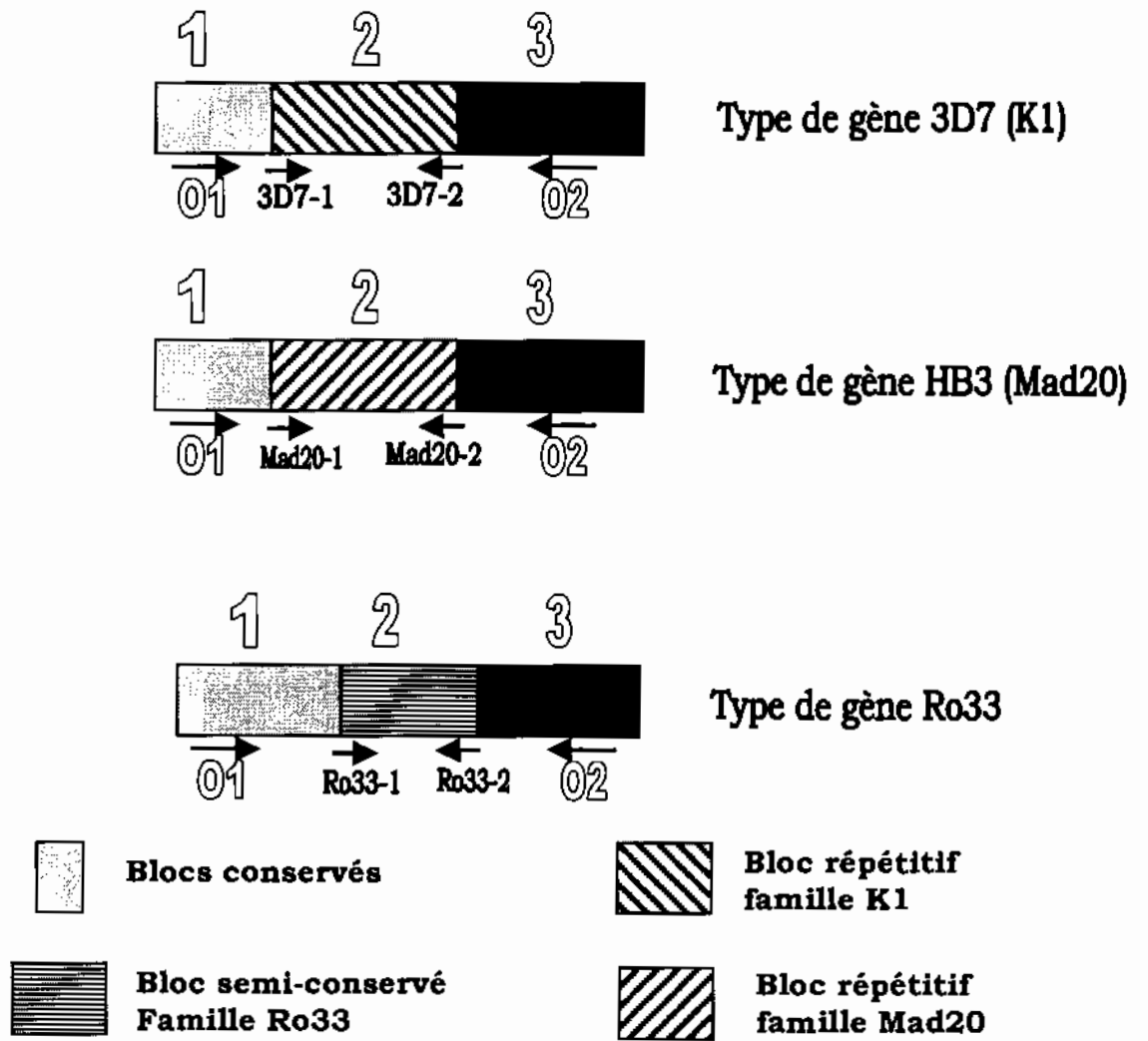


2.2.1 Merozoite surface protein 1 (MSP-1):

Le bloc 2 de la MSP-1 a essentiellement trois types de séquences nucléotidiques appelées K1, Mad20 et RO33. Les allèles des familles K1 et Mad20 contiennent une chaîne d'acides aminés à chaque bout de la séquence codant la région de tripeptide qui se répète (9 fois environ). Ces séquences sont spécifiques à la famille. Les amorces désignées à partir de ces régions permettent une amplification spécifique de l'une des deux familles alléliques mais pas des deux à la fois.

L'allèle de la famille RO33 ne possède pas de séquence répétitive, mais peut quand même être amplifié à l'aide des amorces spécifiques. Le fragment de PCR produit à partir de la famille RO33 est de taille invariable. Les associations d'allèles entre ces trois familles alléliques de la MSP-1 sont: K1/Mad20; K1/RO33; Mad20/RO33; K1/Mad20/RO33.

Figure 3: Schéma illustrant les différents allotypes de la MSP-1 basé sur la répartition des séquences polymorphiques du bloc 2.



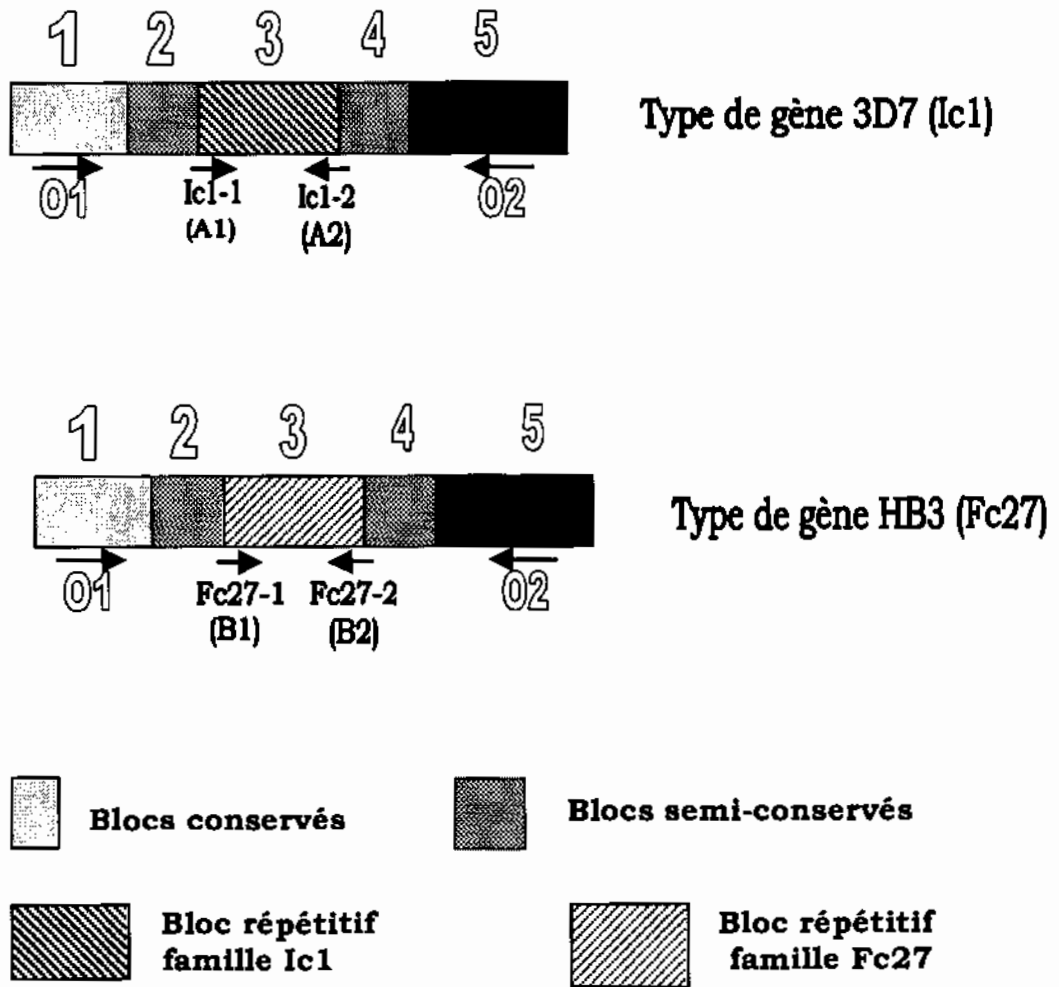
2.2.2 Merozoite surface protein 2 (MSP-2) :

Les allèles de la MSP-2 peuvent être divisés entre deux familles alléliques distinctes sur la base des séquences répétitives au niveau du bloc 3 et du bloc 4. Ces familles sont dénommées la famille FC27 et la famille IC1 (Smythe *et al.*, 1991). Les allèles de la famille FC27 contiennent une copie ou plus d'une répétition de 32 amino-acides tandis que les allèles de la famille IC1 contiennent des copies multiples de 4 aminoacides et/ou 8 aminoacides se répétant.

L'association entre les deux types d'allèles est appelée IC1/FC27. Les séquences nucléotidiques flanquant les régions répétitives diffèrent selon les deux types de familles alléliques.

Les amorces spécifiques à chaque famille allélique peuvent générer à partir de la PCR des fragments spécifiques de la dite famille allélique tout en démontrant une variation en taille car ces amorces utilisent des régions répétitives du gène.

Figure 4: Schéma illustrant les différents allotypes de la MSP-2 basé sur la répartition des séquences polymorphiques du bloc 2.



2.3 Autres marqueurs génétiques

2.3.1 Circumsporozoite Protein (CSP)

C'est une glycoprotéine de la surface du sporozoïte. Elle est la première protéine étudiée dans le cadre de la recherche du vaccin anti-sporozoïtique. Elle est codée par un gène découvert par Dame *et al.*, en 1984.

Cette protéine se caractérise par la présence de tetrapeptide NANP (Asn-Ala-Asn-Pro) répétés 37 à 41 fois intercalés alternativement par un nombre limité de séquences répétées NVDP (Asp-Val-Asp-Pro). Cette séquence NVDP constituerait un épitope immuno-dominant et semble en partie responsable de la protection obtenue lors des essais de vaccination contre les sporozoïtes chez les animaux. Le séquençage de 18 isolats originaires de Thaïlande par Jongwutiwes *et al.* en 1992, a montré un polymorphisme au niveau de la CSP. Ce polymorphisme semble être généré par des mutations ponctuelles, et des recombinaisons. Sa fonction n'est pas bien définie. Cependant, la CSP semble jouer un rôle dans l'infectivité du sporozoïte. La CSP est exprimée pendant la sporogonie, elle est mise en évidence à la surface du sporozoïte au moment de la pénétration de l'hépatocyte.

2.3.2 Thrombospondin Related Adhesive Protein (TRAP)

C'est une glycoprotéine de 63 kDa. Elle est composée de 559 acides aminés. Sa structure tridimensionnelle n'est pas encore connue. C'est une protéine apparentée aux protéines de croissance telles que la properdine, la thrombospondine et l'antistatine (Robson *et al.* 1988). Elle présente également une homologie de structure avec la CS protéine. Son gène a été localisé sur le chromosome 13 de *P. falciparum*.

Elle comporte dans sa séquence le motif RGD (Arg-Gly-Asp) qui serait nécessaire pour l'adhésion cellulaire. Cette séquence contient également une partie répétée *en tandem* de 9 nucléotides qui coderait pour des séquences

peptidiques riches en Proline. Il existerait un polymorphisme allélique au niveau de ce gène.

Elle semble être impliquée dans la reconnaissance et la pénétration des sporozoites dans l'hépatocytes. Ce gène serait essentiellement expressif chez les formes pré-érythrocytaires.

2.3.3 Glutamate Rich Protein (GLURP)

C'est une glycoprotéine riche en glutamate de 220 kDa. Elle a été isolée et séquencée par Bore *et al.*, en 1991 et comporte 1271 acides aminés. Le gène de la GLURP est caractérisé par la présence de 2 régions R1 et R2. Ces régions 1 et 2 ont respectivement 6 et 14 unités répétitives. Une grande variabilité a été observée au sein des isolats de cette protéine. Sa fonction serait à présent méconnue. Le gène est exprimé à tous les stades de développement du parasite.

2.3.4 Heat Shock Protein 70 (HSP70)

Les HSP sont des protéines retrouvées chez beaucoup d'organismes. On les appelle communément les protéines de stress. Elles sont induites quand la température s'élève et par le contact avec les ions métalliques lourds.

On rencontre chez *P. falciparum* deux types de HSP :

- HSP 70 kDa (Yang *et al.*, 1987) ;
- HSP 90 kDa (Bonnfoy *et al.*, 1994).

La comparaison des séquences du gène codant pour HSP 70 de *P. chabaudi* (Shepard *et al.*, 1989) et de *P. cynomology* (Eckert *et al.*, 1992) a montré une homologie de structure avec celles de plusieurs autres espèces de *Plasmodium*

Le gène HSP est exprimé pendant la phase hépatique et érythrocytaire du cycle des différents parasites (Eckert *et al.*, 1992).

2.4 Méthodes d'étude du polymorphisme chez *P. falciparum*

2.4.1 Méthodes immunologiques

Elles permettent d'étudier la diversité antigénique. La première caractérisation du polymorphisme de l'infection par *P. falciparum* a été réalisée à la sérologie. En effet des anticorps monoclonaux spécifiques des stades érythrocytaires de *P. falciparum* ont été produits par immunisation de souris. Ces anticorps ont été utilisés pour serotyper les parasites d'isolats par les techniques d'immunofluorescence, de western blotting (Fruh *et al.*, 1991).

2.4.2 Méthodes de biologie moléculaire

La biologie moléculaire s'intéresse uniquement au génome du parasite notamment l'étude d'un certain nombre de marqueurs génétiques. Il existe plusieurs techniques dont le choix dépend de l'objectif de l'étude.

2.4.2.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ou Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction:

Le polymorphisme de restriction a été décelé pour la première fois en 1978 par Kan *et al.*, et en 1979 par Jeffreys dans les gènes de globine humaine. Il est basé sur la présence ou l'absence de site de restriction d'une enzyme donnée. En effet dans le génome, il existe des points précis où différentes enzymes isolées de bactéries sont capables de couper l'ADN. Ces sites sont spécifiques à chaque enzyme et leur emplacement varie selon l'individu. Ils peuvent aussi être utilisés comme marqueurs génétiques. Pour mettre en évidence ce type de polymorphisme l'ADN est divisé en fragments par des enzymes de restriction (Sanger, 1981). Les produits de digestion sont séparés en fragments par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,6%. Ils sont ensuite transférés sur une feuille de nitrocellulose où ils peuvent être révélés à l'aide d'une sonde radioactive ou fluorescente complémentaire du brin d'ADN du gène étudié. La

technique ci-dessus décrite peut être appliquée à l'ARN, d'où l'appellation « Northern Blotting » (Kaplan & Delpech, 1989), ou à l'ADN, elle est dite « Southern blotting » (Southern, 1975).

Les RFLP ont servi à étudier le polymorphisme au niveau de la TRAP (Thrombospondin Related Adhesive Protein) et à identifier les formes chromosomiques (Mopti et Bamako/Savane) d'*An. gambiae* s.s. (Favia, 1996).

2.4.2.2 La Polymerase Chain Reaction (PCR) ou Réaction de polymérisation en chaîne

La PCR a été mise au point en 1985 par *Karry Mullis*. Cette technique a permis de donner un coup de pouce au diagnostic bio-médical. Elle est actuellement utilisée pour étudier le polymorphisme de la MSP-1 et de la MSP-2.

Le principe consiste à amplifier en quelques heures, un brin d'ADN en plusieurs copies identiques. Elle utilise la propriété semi-conservative de l'ADN pour synthétiser le brin complémentaire à partir des petites molécules simples ou amorces. Les bases se séparent ou s'apparient deux à deux d'un brin à l'autre (A avec T, G avec C), sous l'action d'agents chimiques ou de la chaleur (dénaturation). Pour se répliquer, les deux brins se séparent et servent de matrice à la synthèse d'un nouveau brin. Les amorces spécifiques utilisés vont se fixer sur les régions homologues correspondantes du génome pour les amplifier (étape d'hybridation et d'extension). Ces différentes réactions sont effectuées à l'aide d'une enzyme polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* (*Taq polymerase*). Le processus d'amplification (PCR) se fait suivant trois étapes : la dénaturation de l'ADN double brins, l'hybridation des amorces et l'extension des brins complémentaires synthétisés. La séquence cible doit être connue ou au moins celles des deux régions contiguës. Deux nucléotides complémentaires de ces régions encadrant la cible sont synthétisés. Ces oligonucléotides serviront d'amorces pour la synthèse de la séquence cible à la suite d'un cycle de dénaturation et de reconstitution qui

conduit à la réplication de la région encadrée par les amorces et à l'amplification exponentielle de la séquence cible.

Il est également possible d'utiliser l'ARN comme matrice. Dans ce cas, il faudrait au préalable effectuer une transcription reverse de l'ARN en ADN Cette variante de la PCR est appelée « Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction » (RT-PCR).

MATERIELS ET METHODES

3. MATERIELS ET METHODES D'ETUDE

3.1 Lieu d'étude

Le village de Donéguébougou est situé dans l'Arrondissement Central de Kati, à 30 km au Nord-Est de Bamako. Il est limité au Nord par le village de N'Garan, à l'Est par les villages de Sirababougou et de Torodo, au Sud par le village de Sirakoro, à l'Ouest par le village de Banambani. Ses coordonnées géographiques sont: 7°98'03" longitude Ouest et 12°80'50" latitude Nord (Figure 5).

3.1.1 Historique

Le village de Donéguébougou a été fondé au 19^e siècle par un chasseur du nom de Donégué Niaré. De retour d'une chasse, il trouva le site de Donéguébougou propice à l'agriculture et à la chasse. Il s'y installa et ceci près du grand puits sacré qui demeura l'unique puits du village jusqu'à son tarissement dans les années soixante.

Donégué fasciné par la chasse, est venu de Torodo, son village d'origine. Donégué et ses frères érigèrent le premier hameau du village qui a pris le nom de "Donéguébougou" qui signifie en Bambara le hameau de Donégué. Plus tard les Niaré autochtones furent rejoints par les Diarra et l'unique famille Peulh du village: les Diallo.

Figure 6: Village de Donéguebougou

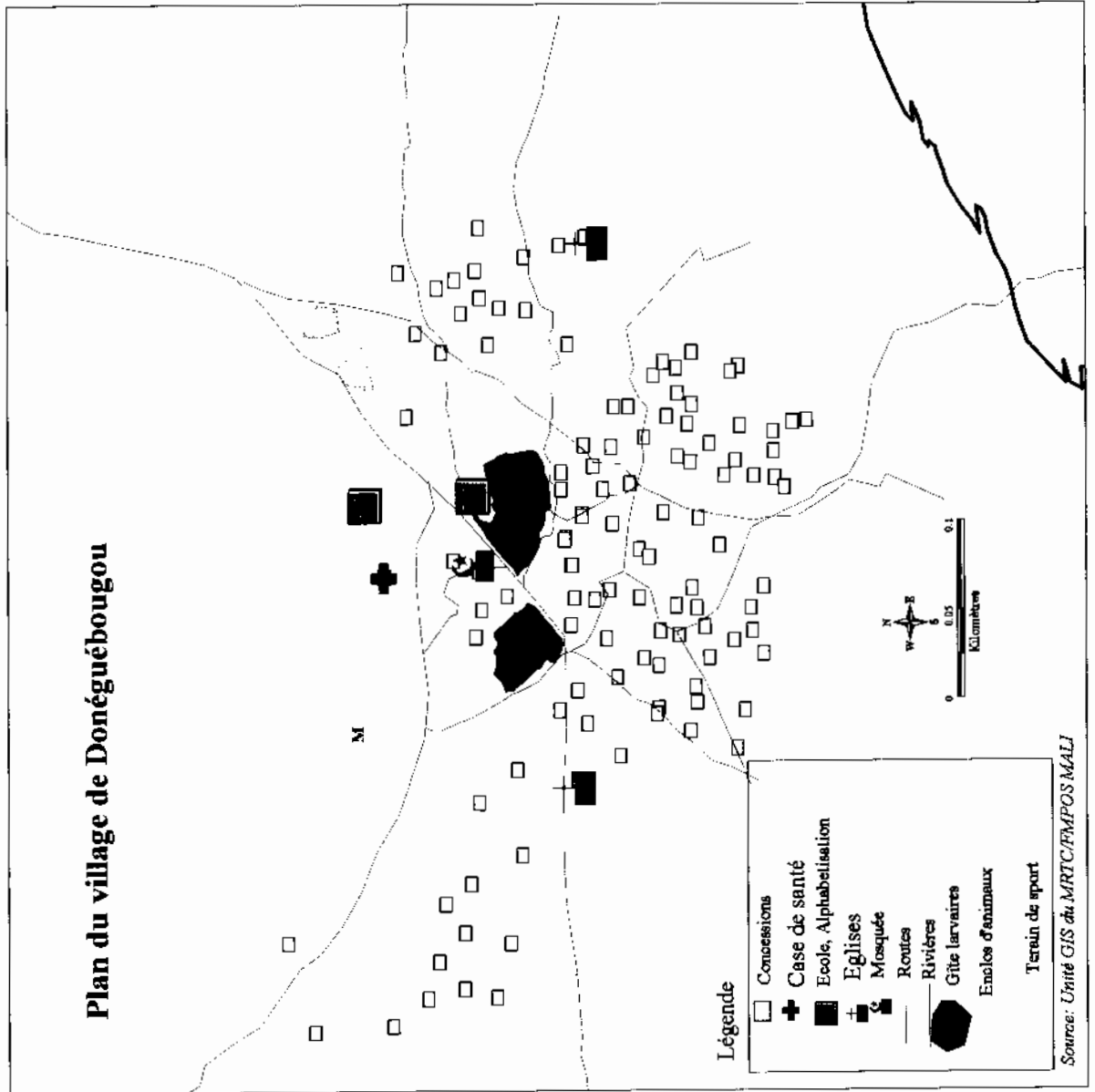
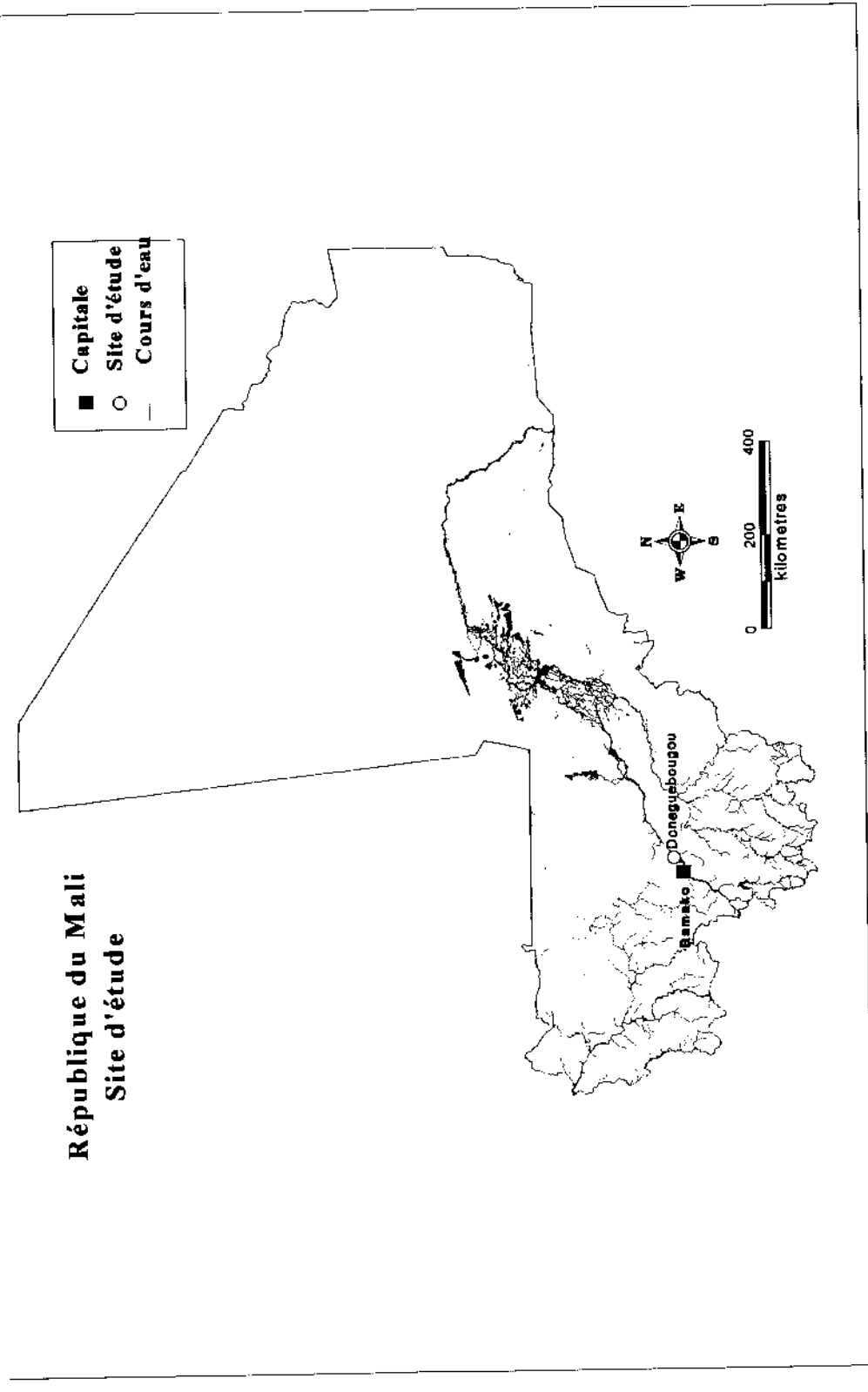


Figure 5: Localisation du Site d'étude



Source: MRTC - Unite de GIS/RS

3.1.2 Relief

Il est composé par des collines de nature gréseuse, des plaines et des dépressions: Le Kouloudjan, le Kouloubléni et le Kôkôfè-koulou qui sont les prolongements du plateau mandingue et culminent respectivement à 543; 415 et 400 mètres.

3.1.3 Hydrographie

Le koba au Sud du village bien que temporaire constitue le principal cours d'eau. Son lit et surtout celui de ses principaux affluents révèlent par endroit des trous qui représentent de véritables gîtes larvaires pour les anophèles en saison de pluies.

A l'Est du village la rivière Farani et à l'Ouest le Banifrani sont deux cours d'eau qui ne tarissent qu'au mois de février.

Pour ce qui est du Koba son assèchement est total à partir du mois de mars.

3.1.4 Climat et végétation

Le climat est du type soudanien avec deux vents dominants: la mousson venant du Sud-Ouest et l'harmattan du Nord-Est divisent l'année en deux saisons:

- une saison des pluies de juin en octobre, avec le maximum de pluie en août, et une densité anophélienne élevée en septembre
- une saison sèche comprenant une saison sèche fraîche de novembre à février et une saison sèche chaude de mars à juin avec des températures moyennes élevées (31 - 33°C).

La végétation est une savane arborée typique du climat soudanien, très modifiée par les activités humaines. On distingue:

- une strate herbacée composée en saison humide de hautes graminées estompant le relief; ce sont essentiellement *Pennisetum pedicellatum*, *Andropogon pseudopicus*, *Andropogon gayanus*,
- une strate arborée en voie de dégradation à cause des défrichements pour les cultures et surtout aux coupes incontrôlées du bois de chauffage. L'arbre le

plus commun est *Vitellaria paradoxa* (Karité). On y rencontre également: *Kaya senegalensis*, *Parkia biglobosa*, *Tamarindus indica*, *Bombax costatum*, *Landolphia senegalensis*, *Sterculia setigera*, *Isobertinia doka*, *Terminalia macroptera*..

- sur les berges du koba, on retrouve des vergers, une végétation riche en lianes (*Landolphia senegalensis*) et des vestiges d'une galerie forestière.

Récapitulatifs des données météorologiques pendant les différentes saisons des années 1999 et 2000 (informations climatologiques de la station de Bamako ville : Direction nationale de la Météo du Mali).

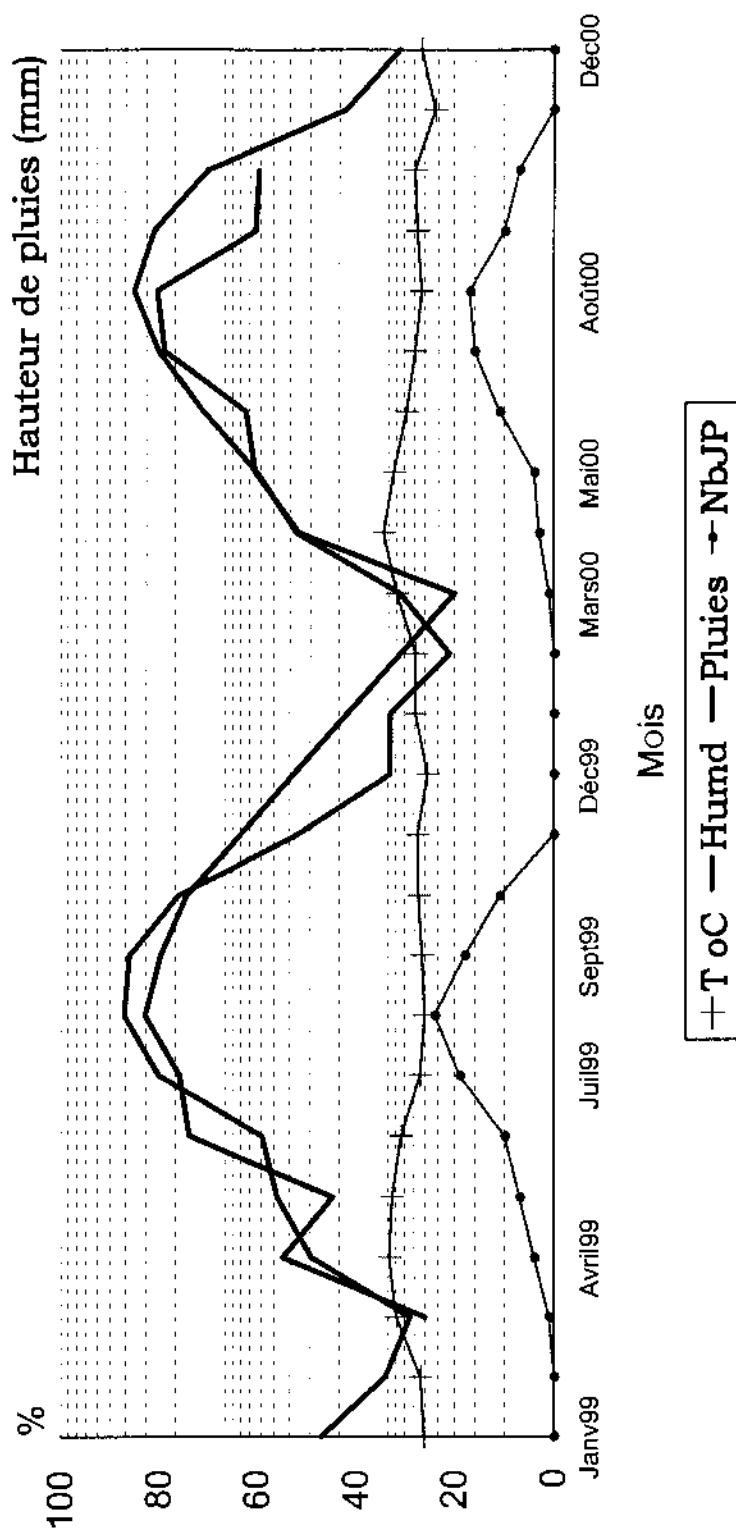
Saisons	Température (°C)	Humidité (%)	Pluviométrie	
			Hauteur (mm)	Nbre de jours de pluies
Saison sèche fraîche 1999	28,3	37	6	1
Saison sèche chaude 1999	32,2	55	230,7	21
Saison de pluies 1999	26,8	82	907,1	72
Saison sèche fraîche 1999-2000	27,2	35	0	0
Saison sèche chaude 2000	32,0	54	177,5	19
Saison de pluies 2000	27,6	79	615	50
Saison sèche fraîche 2000	25,3	37	0	0
Moyenne Annuelle	28.5	53.905	-	-
Total annuel	-	-	1936.3	163

Saison sèche fraîche = novembre en février

Saison sèche chaude = mars en juin

Saison de pluies = juillet en octobre

Figure 7: Représentation graphique des données météorologiques de Janvier 1999 à Décembre 2000 de la station de Bamako ville



3.1.5 Population

La population de Donéguébougou compte environ 1100 habitants dont 60% d'enfants de moins de 15 ans selon le recensement de 2000.

Cette population se compose de: Bambaras (Niaré, Diarra, Coulibaly, Konaré, Traoré) majoritaires qui sont les autochtones, quelques Malinkés (Keïta) et Peulhs (Diallo).

A Donéguébougou on rencontre trois types d'habitation:

- des cases rondes avec toit conique en paille;
- des maisons rectangulaires avec toit de tôle;
- des maisons rondes ou rectangulaires avec toit en terrasse.

Tous ces types de maisons constituent des lieux de repos pour les anophèles. A côté des habitations humaines existent des enclos de branchages servant de bergerie, de petits enclos pour les porcs et la volaille.

Les coutumes locales se ramènent aux pratiques animistes (célébrations annuelles de fêtes sacrées, rites funéraires). Il existe cependant quelques musulmans, et chrétiens (protestants et catholiques).

3.1.6 Activités économiques

Les activités économiques sont essentiellement basées sur l'agriculture et on distingue trois groupes de cultures:

- les cultures vivrières: mil, sorgho, maïs, riz, arachide, haricot, patates, manioc.
- les cultures maraîchères: Pomme de terre, tomate, aubergine, oignon, gombo.
- les cultures fruitières: *Maguifera digitata*, bananiers.

Les produits de cueillette sont: les noix de *Vitellaria paradoxa*, les fruits de *Parkia biglobosa*, de *Tamarindus indica*, de *Landolphia senegalensis*.

L'élevage des bovins, des caprins, des ovins, des porcins et de la volaille, constitue une activité secondaire.

3.1.7 Faune

Parmi les insectes d'importance médicale on rencontre:

- les *Culicidae*: *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*;
- les *Muscidae*: *Musca domestica*.

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

3.1.8 Infrastructures socio-sanitaires

Le village de Donéguébougou dispose d'un dispensaire communautaire qui a été construit en novembre 1994 avec l'appui du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires de l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie à travers le projet SELF-HELP de l'Ambassade des Etats-Unis d'Amérique au Mali. Le village a été également doté d'une école fondamentale en décembre 1994 par la coopération canadienne. Les autres édifices publics sont représentés par l'église Protestante, l'église Catholique, une mosquée et par un centre d'alphabétisation.

3.2 Etude de la transmission du paludisme

3.2.1 Etudes Entomologiques

3.2.1.1 Période, type, échantillonnage

Les études se sont déroulées d'avril 1999 en décembre 2000 à raison d'un séjour mensuel de 12 jours. L'étude était de type prospectif à passages transversaux. Les études entomologiques ont porté sur un échantillon représentatif de la faune résiduelle et de la population anophélienne vectrice active la nuit.

Echantillonnage

L'échantillonnage était de type stratifié. Le village a été divisé entre deux strates selon des critères topographiques (agrégation des maisons, plateau et vallée) et écologiques (végétation abondante ou non, sol rocailleux ou latéritique).

De ces deux strates 30 cases sont tirées au hasard par séance de capture, proportionnellement au nombre de type de cases (maison en tôle, terrasse et paille).

La taille minimale de l'échantillon de moustiques a été calculée en utilisant la formule de l'intervalle de confiance autour d'une proportion. Les taux d'infection des moustiques à Donéguébougou (respectivement pour *An. gambiae s.l* et *An. funestus*) par Sangaré, 1996 ont été utilisés pour estimer la taille minimum de l'échantillon de moustiques. Cette taille minimum a été estimée après un réajustement de 20% (problèmes d'identification) à 600 moustiques (*An. gambiae s.l.*). Pour *An.funestus*, elle a été estimée à 475 moustiques. Le risque alpha était de 5%.

3.2.1.2 Techniques de capture

➤ *Capture de jour ou spray-catch*

Au total 6 séances de spray-catch ont été organisées à chaque passage à raison de 30 cases prospectées par séance. Ceci fait un total mensuel de 180 cases à prospecter.

Les captures par spray-catch ont lieu les après-midi entre 15 heures et 18 heures. Ceci dans le but d'obtenir le maximum de femelles semi-gravidés d'*An. gambiae* s.l. Pour chaque case prospectée le nombre de dormeurs, le nom du propriétaire et le type de case sont indiqués sur une fiche de collecte de données.

Avant la pulvérisation, les orifices et les fenêtres de la chambre sont fermés. Les aliments pouvant être contaminés par l'insecticide sont extraits de la case à pulvériser. Les draps blancs sont ensuite étalés sur le plancher. L'insecticide est ensuite pulvérisé à l'intérieur de la case. La porte est maintenue fermée pendant 5 à 10 minutes. Au bout de ce temps, on ouvre la porte et les anophèles suffoqués tombent sur les draps. Ils sont collectés et mis dans des flacons de 20 ml contenant quelques ml du fixateur de Carnoy. Le fixateur de Carnoy est un mélange composé d'une partie d'acide acétique glacial (CH₃COOH) dans trois parties d'éthanol absolu (C₂H₅OH). A l'intérieur de chaque flacon est introduite une étiquette portant le numéro de la chambre et la date de capture.

Les moustiques du spray-catch sont triés morphologiquement (Figure 8) par espèces (*An. gambiae* s.l. et *An. funestus*) nous procédons ensuite à une répartition suivant leur état de réplétion: jeun, gorgé, semi-gravide et gravide.

Le tri des moustiques (*An. gambiae* s.l. et *An. funestus*) se fait individuellement. Chaque moustique est affecté d'une étiquette portant le numéro de la case à l'intérieur de laquelle, il a été capturé et son numéro d'identification par rapport à l'ensemble des moustiques récoltés dans la chambre.

Toutes les femelles *Anopheles funestus* sont testées à l'ELISA:

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

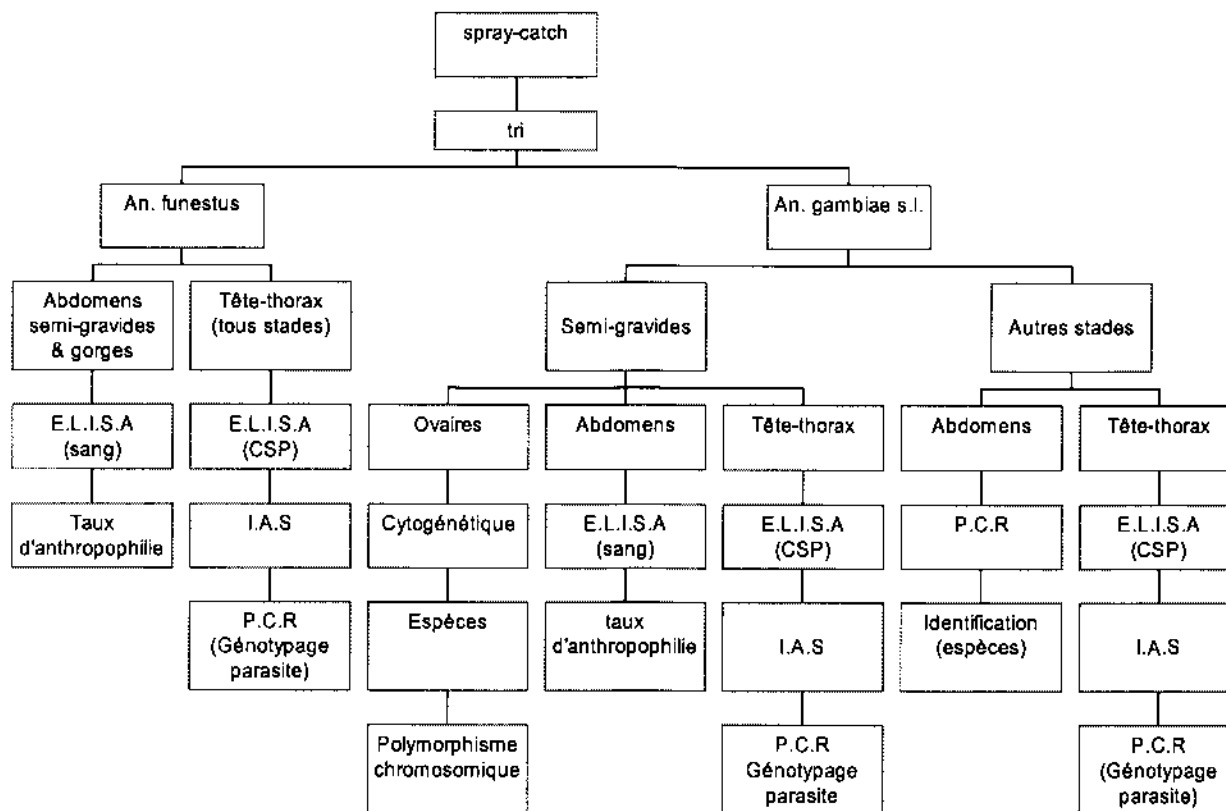
- les abdomens des semi-gravides et des gorgés pour l'identification des repas de sang.

Pour *An. gambiae* s.l.:

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

- Les têtes-thorax sont testées à l'ELISA pour estimer l'indice d'antigène sporozoitique (IAS), le repas de sang pour déterminer le taux d'anthropophilie.
- Les ovaires sont examinés par la méthode cytogénétique en vue de l'identification chromosomique des différents taxa du complexe *An. gambiae*.
- Les autres femelles d'*An. gambiae* s.l. à jeuns, gorgés et gravides sont disséqués en deux parties: tête-thorax et abdomen. Les têtes thorax sont testées à l'ELISA comme pour les semi-gravides, et les abdomens à la PCR pour distinguer l'espèce A (*An. gambiae* s.s.) de l'espèce B (*An. arabiensis*).

Figure 8: Diagramme de traitement des moustiques issus des captures par pulvérisation d'insecticide (spray-catch).



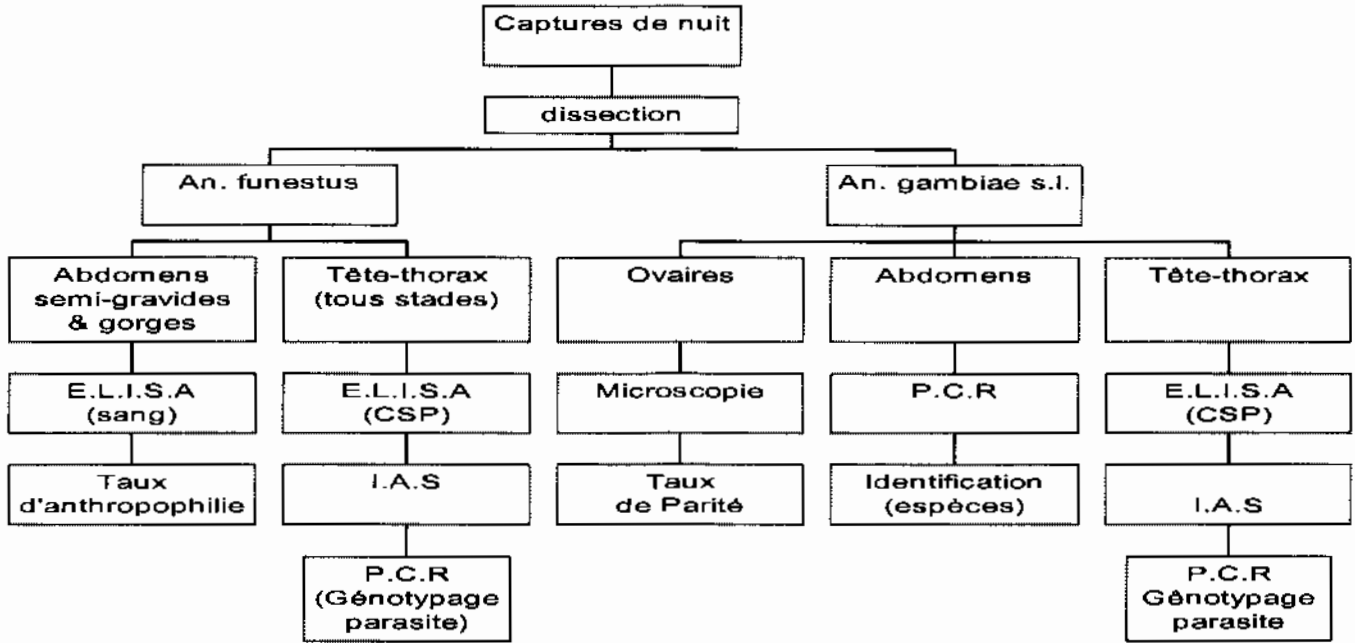
➤ **Capture de nuit sur appât humain**

Quatre séances de captures nocturnes (CN) ont été mensuellement organisées sur appât humain conformément à la méthode d'échantillonnage. Les captureurs (en même temps appâts) sont au nombre de huit, répartis entre deux points de capture. Deux équipes de deux captureurs sont constituées au niveau de chaque poste.

La première équipe travaille de 18h à 00h et la seconde de 00h à 6h du matin avec un captureur à l'intérieur et un autre à l'extérieur de l'habitation échangeant de poste toutes les deux heures pour corriger les biais de capture liés au captureur entre l'intérieur et l'extérieur de la case.

Les captures se font à l'aide d'un aspirateur à bouche (type Coluzzi et Petrarca, 1973) à l'intérieur duquel est placé un pot en carton servant à la récupération des moustiques capturés et d'une lampe torche pour voir les moustiques lors des piqûres. Les moustiques issus des captures nocturnes ont été morphologiquement identifiés et disséqués (Figure 9) le lendemain matin à l'aide d'une loupe et d'un microscope alimenté par un groupe électrogène. La dissection a porté sur des moustiques à jeun afin de déterminer le taux de parité par la méthode de Detinova (1963). Lors de la dissection le même numéro est attribué à l'ovaire, à la portion tête-thorax et au reste de l'abdomen du moustique. Les restes de l'abdomen des moustiques (*An. gambiae* s.l.) ayant servi à l'étude des taux de parité sont individuellement conservés dans des microtubes contenant du fixateur de carnoy. Ils serviront à l'identification de l'espèce A (*An. gambiae* s.s.) et de l'espèce B (*An. arabiensis*) par la méthode PCR.

Figure 9: Diagramme de traitement des anophèles des captures de nuit (C.N).



3.2.1.3 Techniques d'identification et d'analyses biologiques

• **Identification chromosomique des membres du complexe *An. gambiae***

Les ovaires des femelles semi-gravides fixés, issus du spray catch sont traités selon la technique habituelle de l'observation cytologique (Coluzzi 1968):

a) Technique de préparation Chromosomique

Les ovaires extraits sont déposés sur une lame porte-objet. Ensuite deux gouttes de colorant sont ajoutées pour la préparation des lames: orcéine - acéto -lactique (2g d'orcéine dans une solution de 50 ml d'acide acétique et 50 ml d'acide lactique). Le temps de coloration dure 3 à 4 minutes; l'excès de colorant est éliminé avec de l'acide propionique à 50%. On recouvre la préparation d'une lamelle et on fait éclater les cellules nourricières en tapotant légèrement dessus ; un papier buvard permet d'éliminer l'excès de liquide sortant de la préparation. On ajoute une petite quantité d'acide lactique qui s'infiltré sous la lamelle, permet d'éviter le dessèchement rapide de la lame. Les préparations chromosomiques ainsi faites sont lisibles immédiatement ou après plusieurs mois de conservation au réfrigérateur.

b) Identification chromosomique

La lecture se fait à l'aide d'un microscope muni d'objectifs à contraste de phase (x 25 ou x 40), à l'aide de la carte chromosomique établie par Coluzzi *et al.* 1969.

La garniture chromosomique des anophèles est composée de trois paires de chromosomes: 1 paire d'hétérosomes et deux paires d'autosomes. Les espèces du complexe *An. gambiae* sont identifiées à partir de l'aspect du chromosome X.

Ainsi, on remarque que:

- Le chromosome X d'*An. gambiae* s.s. est caractérisé par une portion claire proximale suivie d'un grand "puff" (renflement). On constate la présence d'une large bande claire au milieu. Le petit "puff" est distal;

- Le chromosome X d'*An. arabiensis* débute par d'épaisses bandes sombres presque d'égales longueurs suivies d'une zone claire. Le petit "puff" se situe presque au milieu et le grand est distal.

Les bras autosomiques restent liés deux à deux par leur centromère. Ils constituent de ce fait deux chromosomes submétacentriques de tailles différentes. Le chromosome le plus long est le n° 2; le n°3 est plus court. Ils sont constitués de bras gauche (2L) et de bras droit (2R) pour le chromosome n°2; de même pour le chromosome n°3 (3L) pour le bras gauche, (3R) pour le bras droit (L pour "left" et R pour "right" en anglais). L'étude du polymorphisme chromosomique d'*An. arabiensis* et d'*An. gambiae* s.s. est basée sur la lecture de la séquence des bandes chromosomiques. Ces séquences peuvent présenter des inversions paracentriques flottantes ou fixées.

Au Mali, les principales inversions sont: a, b, c, d, e, f pour *An. arabiensis* sur 2R et a sur 3R. Pour *An. gambiae* s.s., on observe également j, b, c, d, u sur 2R et a sur 2L. L'inversion standard est notée +. Ces inversions s'associent pour donner des arrangements chromosomiques qui à leur tour donnent des arrangements karyotypiques.

Les principaux arrangements chromosomiques sur 2R sont b, ab, bc, be et bf pour *An. arabiensis*. En ce qui concerne *An. gambiae* s.s., les arrangements chromosomiques sont: jcu, jbcu, b, cu, bcu, bc, u et + sur 2R. La combinaison de ces derniers, a conduit à leur répartition en trois groupes de populations distinctes dénommées Mopti, Bamako et Savane (Touré *et al.*, 1983, 1984).

• **Identification des espèces par la technique PCR**

Les abdomens des moustiques (*An. gambiae* s.l.) à jeuns, gorgés et gravides issus des spray-catch et des captures nocturnes ont été traités à la PCR en vue de déterminer l'espèce A (*An. gambiae* s.s.) et l'espèce B (*An. arabiensis*). L'avantage de cette technique réside dans le fait, qu'elle permet l'identification d'espèce quel que soit son sexe, son état de réplétion et son stade de développement (larves ou adultes).

La technique consiste à extraire, amplifier, et révéler les bandes d'ADN des moustiques. La révélation se fait à partir de l'électrophorèse du produit de l'amplification.

a) Extraction de l'ADN du moustique:

- les moustiques sont répartis en fonction de leur provenance;
- les tubes Eppendorf de 1,5 ml sont numérotés conformément à l'étiquette accompagnant chaque moustique;
- mettre 50 μ l de "grinding buffer"(tampon d'extraction) dans chaque tube contenant le moustique; triturer avec le pilon jusqu'à l'écrasement complet du moustique;
- incuber au bain-marie à 65°C pendant 30mn;
- ajouter 7 μ l d'acétate de potassium à 8 moles pendant que les tubes sont encore chauds; bien mélanger l'ensemble en tapotant sur le tube;
- faire refroidir sur la glace pendant 30 mn;
- centrifuger à 14000 tours/mn pendant 15 mn et transférer le surnageant dans des tubes Eppendorf contenant 100 μ l d'éthanol à 100%; bien mélanger;
- verser le surnageant sur du papier hygiénique;
- ajouter 100 μ l d'éthanol à 70%, centrifuger 5 mn;
- verser le surnageant et laisser sécher les tubes contenant l'ADN
- dissoudre l'ADN ainsi extrait et purifier dans 100 μ l de Tris-EDTA (Ethylene Dinitro Tetra acetic Acid) ou dans de l'eau distillée et stérile; conserver à -4°C jusqu'à l'amplification.

b) Composition de la mixture d'amplification pour un spécimen

- 5,13 µl d'eau déionisée stérile ;
- 1 µl de PCR buffer (10X) ;
- 1 µl de MgCl₂ ;
- 0,2 µl de dNTP (dTTP, dATP, dGTP, dCTP) ;
- 0,2 µl d'amorce 1 *
- 0,2 µl d'amorce 2 **
- 0,2 µl d'amorce 3 ***
- 0,07 µl de Taq polymérase.

NB:* = universel, commun à l'espèce A et à l'espèce. B

** = spécifique à l'espèce A; *** = spécifique à l'espèce B.

Pour l'amplification de l'ADN d'un spécimen, il faut un volume total de 10 µl dont 8 µl de cette mixture et 2 µl de l'ADN extrait (ADN du moustique). Dans les contrôles l'ADN extrait est remplacé par l'eau pour le contrôle négatif, et les contrôles positifs contiennent respectivement l'ADN d'*An. gambiae* s.s et l'ADN d'*An. arabiensis*.

Pour éviter l'évaporation de la solution pendant l'amplification, un couvercle dénommé "hot bonnet" referme la machine PCR

c) Amplification de l'ADN extrait du moustique

Elle se passe dans une machine programmable de type **PTC® 100** ou **200** (**P**rogrammable **T**hermal **C**ontroller **100** ou **200**), il se produit un ensemble de phénomènes cycliques. Un cycle comprend trois principales étapes:

- i) La dénaturation à 94°C au cours de laquelle les deux brins de la molécule d'ADN se séparent ;
- ii) L'appariement à 50°C où les amorces par le jeu de la complémentarité des bases (A-T; C-G) se fixent sur les différents brins séparés.

iii) L'extension à 72°C où sous l'action de la Taq polymérase les désoxynucléotides triphosphates (dNTP) viennent compléter l'action des amorces. Ce processus a lieu selon un programme introduit d'avance comprenant 30 cycles.

**Figure 10: Photo d'une machine programmable d'amplification de PCR
(type PTC® 100)**



d) Préparation du gel et l'électrophorèse

La migration électrophorétique de l'ADN s'effectue sur du gel solidifié qui se prépare à partir de 100ml de TBE (0,5x): tris acide borique, 5 µl de l'éthidium bromide et 2 g d'Agarose à 2%. Ce mélange est cuit pendant 2 minutes à 100°C et mis dans un bac à électrophorèse où il se solidifie. Sur ce gel, des puits sont faits à partir de peignes adaptés, pour recevoir les différentes solutions: 2 µl de bleu de bromothymol et 10µl de l'ADN amplifié d'une part, et d'autre part, dans les puits situés aux deux extrémités du gel 15 µl de marqueur constitué de molécule d'ADN de tailles différentes et dont certaines sont spécifiques à l'espèce A (*An. gambiae* s.s.) ou à B (*An. arabiensis*). Dans les puits situés entre les marqueurs sont introduits, l'ADN des différents échantillons à identifier.

Le TBE 0,5X utilisé comme électrolyte est introduit dans la cuve électrophorétique. La migration des bandes d'ADN se fait en fonction de leurs poids moléculaires après passage du courant électrique.

e) Lecture des bandes d'ADN pour l'identification des espèces

Le gel est transféré sur un appareil de visualisation à ultra-violet. La bande de chacune des réactions est comparée à celle de l'espèce A (*An. gambiae* s.s) ou B (*An. arabiensis*) des contrôles positifs. Les bandes d'ADN sont révélées à la lumière ultra-violette fluorescente grâce à la présence du bromure d'éthidium fixé sur leurs ponts d'hydrogène.

- **Technique d'identification du repas de sang par ELISA chez le moustique**

Le sang contenu dans l'estomac des moustiques femelles conservées individuellement dans des microtubes après dissection est identifié par la technique ELISA (Beier *et al.*, 1988) en vue de déterminer le taux d'anthropophilie des espèces vectrices. Cette technique ELISA se déroule selon le protocole suivant:

a) Mode opératoire:

- mettre le sang avec 50µl de PBS (Phosphatase Buffer Saline) dans les tubes Eppendorf ;
- triturer l'ensemble jusqu'à obtenir une solution homogène ;
- ajouter 200µl de PBS ;
- établir les fiches correspondant aux échantillons ;
- déposer 50µl de solution de repas de sang dans les différents puits selon la fiche préétablie;
- laisser incuber pendant trois heures;
- laver deux fois les plaques avec du PBS-TWEEN;
- déposer 50µl du mélange: de la solution D et de la solution du conjugué double (peroxydase pour humain et phosphatase pour bovin) laisser incuber pendant une heure;
- laver trois fois les plaques avec du PBS-TWEEN, déposer 100µl d'ABTS à la peroxydase et lire après 30 minutes à l'œil nu: la coloration verte signifie sang humain;
- laver encore deux fois la même plaque avec du PBS-TWEEN, mettre 100µl de révélateur à la phosphatase par puits et lire après une heure de temps ou le lendemain: (la coloration jaune signifie sang de bovin).

b) Préparation des solutions:

- Solution "D": ajouter 25 µl de Tween 20 à 100 ml de BB (Blocking Buffer) ;
- Conjugué double: prendre pour une plaque de 96 puits 5ml de solution "D", ajouter 2,5µl de peroxydase et 20µl de phosphatase, mélanger vigoureusement avec un agitateur de type « vortex » pendant quelques minutes ;

- Révélateur à la peroxydase: pour une plaque, prendre 5ml de la solution de peroxydase "A" et 5ml de la solution de peroxydase "B".
- Révélateur à la phosphatase: prendre pour une plaque 8ml d'eau distillée, ajouter 2ml de "phosphatase substrate" et 2 comprimés de Nitro-phenyl-phosphate, dissoudre complètement les comprimés en agitant doucement la solution.

• **Technique ELISA de détection des antigènes sporozoïtiques chez les moustiques**

Les têtes thorax de toutes les espèces vectrices capturées et identifiées sont testées à l'ELISA pour la détermination du taux d'infection des populations vectrices.

a) Mode opératoire:

- mettre individuellement les têtes thorax dans les tubes Eppendorf de 1,5ml ;
- porter les références (date, lieu et méthode de capture, l'espèce capturée) ;
- ajouter 50 µl de BBNP40 (Nonidetp-40) dans chaque tube ;
- écraser mécaniquement à l'aide de petits pilons et ajouter 200µl de BB pour obtenir un volume final de 250µl dans les tubes ;
- déposer 50µl de l'anticorps monoclonal non marqué dans chaque puits d'une plaque de microtitration et laisser incuber pendant 30 minutes à la température ambiante ;
- aspirer l'anticorps non marqué, mettre 200 µl de BB (Blocking Buffer) et laisser incuber une heure de temps ;
- Aspirer le BB, puis mettre 50µl de chaque broyat de moustique dans les puits correspondants ;
- mettre en même temps les contrôles positifs et négatifs dans les puits correspondants et laisser incuber pendant deux heures,
- aspirer les broyats de moustiques et laver les plaques deux fois avec du PBS-TWEEN (solution de lavage);

- déposer 50µl d'anticorps monoclonal marqué à la peroxydase dans chaque puits et laisser incubé pendant une heure;
- aspirer l'anticorps monoclonal marqué et laver trois fois les plaques avec du PBS-TWEEN;
- ajouter 100µl de substrat révélateur (substrat ABTS) par puits;
- faire la lecture visuellement à partir de la coloration après 30 à 60 minutes: les puits de la plaque colorés en vert contiennent les moustiques positifs.

b) Préparation des solutions :

- Solution de lavage (PBS Tween) :
- dissoudre 9,65g de PBS dans 1000ml d'eau distillée et ajouter 500µl de Tween 20.

Solutions des contrôles positifs :

- Dissoudre 25µg de réactif dans 25µl d'eau distillée,
- Tube I: mettre 5µl de la solution de contrôle dans 500µl de BB,
- Tube II: mettre 10µl du tube I dans 1000µl de BB,
- Tube III: mettre 10µl du tube II dans 500µl de BB.

Solution d'anticorps monoclonal non marqué

Prendre pour une plaque 5ml de PBS et ajouter 20µl d'anticorps.

Solution d'anticorps monoclonal marqué

Prendre pour une plaque 5ml de BB et ajouter 10µl d'anticorps.

Solution révélatrice

Pour une plaque prendre 5ml de l'ABTS peroxydase substrat et 5ml de peroxydase solution B les mélanger assez bien par l'agitateur. Solution BBNP40: faire le mélange de 5ml de BB plus 25µl de NP40 et avec l'agitateur agiter pendant 15mn.

Solution de BB (Blocking Buffer) pour 1 volume de 500ml:

- Il faut:

2,5g de caséine (0,5%),

50ml de NaOH (0,1N),

450ml de PBS (PH=7),

0,05g de Thimersol,

0,01g de phénol rouge.

- Prendre 100ml de NAOH à 0,1N plus 5g de caséine et faire bouillir l'ensemble tout en agitant le mélange,

- une fois en ébullition arrêter le chauffage et ajouter petit à petit 900ml de PBS tout en agitant doucement,

- ajouter ensuite le Thimersol et le phénol rouge et laisser refroidir,

- le PH est ensuite ajusté à 7,4 par addition de goutte de HCl.

3.2.1.4 Détermination de la durée du cycle gonotrophique

Le cycle gonotrophique est le temps qui s'écoule entre la prise du repas de sang par l'anophèle femelle, et la ponte subséquente.

Les femelles à jeun des captures nocturnes sont gorgées sur des poulets et celles bien gorgées sont mises dans une cage avec observation de leur état de réplétion toutes les six heures jusqu'à la ponte.

3.2.1.5 Les paramètres mesurés

a) Fréquence des espèces vectrices

Elle exprime la composition des espèces rencontrées. Elle est égale au nombre total de l'espèce donnée divisé par le nombre total (n) de moustiques capturés.

b) Agressivité (ma)

Ce paramètre correspond au nombre moyen de piqûres d'une espèce donnée, reçues par homme et par mois (P/h/m).

L'agressivité se calcule de deux manières:

i. En capture de jour (Spray-catch):

C'est le nombre total d'anophèles femelles d'une espèce donnée gorgée et semi-gravides capturées dans une chambre, divisé par le nombre de personnes ayant dormi dans cette chambre la veille.

ii. En capture de nuit:

L'agressivité est égale: nombre total d'anophèles d'une espèce donnée capturée divisé par le nombre de captureurs.

c) Taux de parité

C'est la proportion de femelles pares sur l'ensemble des femelles disséquées (pares + nullipares). Ce paramètre est déterminé à partir des femelles à jeun des captures nocturnes en utilisant la méthode de Déténova.

d) Taux d'infection (IAS)

Il correspond au pourcentage d'anophèles d'une espèce donnée ayant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires: indice sporozoïtique (IS) ou d'antigène circumsporozoïtique (IAS) par rapport au total des moustiques examinés à l'ELISA.

e) Taux d'anthropophilie (T.a)

Le Taux d'anthropophilie est la proportion de femelles pour une espèce d'Anophèle, ayant pris leur repas de sang sur Homme. Ce paramètre est égal

au nombre de moustiques avec sang d'origine humaine X 100 divisé par le total examiné.

$$T.a = \frac{\text{nombre de sang d' origine humaine}}{\text{Total examiné}} \times 100 (\%)$$

f) Taux d'inoculation entomologique (h)

Il représente le nombre de piqûres infectantes reçues par homme et par unité de temps (nuit, mois, ou année). $h = ma.IAS$ (formule de Mac-Donald); où **ma** est l'agressivité et l'**IAS**, l'indice antigène sporozoïtique. Il est estimé espèce par espèce. La transmission globale est égale à la somme des (h) des différentes espèces vectrices.

3.2.2 Etudes Parasitologiques

L'estimation des paramètres parasitologiques (indice plasmodique, indice gamétocytaire, charge parasitaire) a été faite sur l'ensemble des enfants de Donégouéougou âgés de 0-15 ans révolus.

Les enquêtes parasitologiques se sont déroulées en saison sèche chaude (de mars à juin), en saison de pluies (de juin à octobre) et en saison sèche fraîche (de novembre à février) de 1999 à 2000.

Les gouttes épaisses confectionnées ont été lues pour identifier les espèces plasmodiales sur le terrain.

3.2.2.1 Confection de gouttes épaisses

Une goutte épaisse a été confectionnée à partir du sang prélevé à la pulpe de l'index ou du majeur de la main gauche. Le doigt est préalablement nettoyé avec du coton imbibé d'alcool. La piqûre est faite à l'aide d'un vaccinostyle stérile.

La première goutte de sang est éliminée afin d'éviter la fixation avec l'alcool, la seconde est recueillie sur une lame porte-objet portant le numéro d'identification du sujet.

A l'aide de l'angle d'une autre lame on confectionnait des spirales en sens unique en étalant le sang sur un diamètre d'un centimètre environ de manière à défibriner mécaniquement la goutte de sang. La lame est ensuite placée dans une boîte (type OMS) afin d'éviter les mouches, la poussière et le soleil.

3.2.2.2 Coloration et lecture des lames

La coloration est effectuée au Laboratoire avec du Giemsa à 3% pendant 45 minutes. Pour un litre de Giemsa à 3% on utilise 30cc de Giemsa et 970cc d'eau tamponnée de pH 7,2.

La lecture se fait au microscope optique à un grossissement 1000 (objectif à immersion x 100 et Oculaire x10).

L'appréciation de la charge parasitaire se fait par la méthode leucocytaire quantitative sur goutte épaisse. Cette méthode consiste à compter le nombre de parasites par rapport à 300 leucocytes.

La méthode de calcul est la suivante : on considère que le nombre moyen de leucocytes est de 7500 par mm³ de sang (Payne, 1993).

Soit X le nombre de parasites comptés au microscope correspondant à 300 leucocytes et Y la parasitémie

$$Y = \frac{X \times 7500}{300} \text{ (parasites / mm}^3 \text{ de sang)}$$

3.2.2.3 Confection des papiers filtres

Au moment de la confection de la goutte épaisse, quelques gouttes de sang sont recueillies sur du papier filtre comportant le numero d'identification de l'individu. Les genotypes de *Plasmodium falciparum* sont déterminés à partir de ces papiers filtres ou « paper blots » en utilisant la technique de la « Nested PCR ».

3.2.2.4 Les paramètres parasitologiques mesurés**a. L'indice plasmodique (I.P.)**

C'est le pourcentage de sujets, dans la population examinée, porteurs de plasmodies dans le sang périphérique. Il est calculé à partir de la formule:

$$\text{I.P.} = \frac{\text{nombre de porteurs de Plasmodium dans le sang} \times 100}{\text{nombre de sujets examinés (étalements sanguins)}}$$

b. L'indice gamétocytaire (I.G.)

Il correspond au pourcentage de sujets porteurs de gamétocytes par rapport au nombre total de gouttes épaisses (G.E) examinées quel que soit l'espèce plasmodiale.

$$\text{I.G.} = \frac{\text{nombre de porteurs de gamétocytes}}{\text{nombre total de G.E examinées}} \times 100 (\%)$$

3.4 Etude de la diversité des allotypes (MSP-1 et MSP-2)

L'ensemble des moustiques testés infectés de sporozoïtes de *P. falciparum* à l'ELISA entre 1999 et 2000 ont été utilisés pour l'étude du polymorphisme du bloc 2 de la MSP-1 et bloc 3 de la MSP-2 chez les vecteurs. L'ADN plasmodial extrait à partir des spots de sang sur les papiers filtres dont les gouttes épaisses étaient positives a été utilisé pour l'aspect parasitologique. L'étude était de type prospectif à passages transversaux et elle a porté sur le restant de la solution du broyat de la portion tête thorax utilisée à l'ELISA provenant des moustiques infectés de *P. falciparum*.

De façon aléatoire, 30 restants de solution ELISA ont été analysés pour chacune des trois saisons de transmission.

L'analyse du polymorphisme allélique (MSP1 et MSP2) a été réalisée à partir de l'ADN de *P. falciparum* extrait des moustiques infectés de Donéguebougou.

3.4.1.1 Extraction de l'ADN de *P. falciparum* chez les moustiques infectés

L'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par Tamura *et* Aotosoka (1998). Les suspensions ELISA des têtes-thorax infectées d'antigènes "circumsporozoïte protein" ont été incubées à 65°C pendant au moins 15 mn. Elles ont ensuite été traitées avec de l'acétate de potassium à (8 M) avant d'être incubées à 4°C pendant 30 mn. L'ADN était ensuite précipité avec de l'éthanol et résuspendu dans un volume de 50 µl d'eau stérile et ensuite portée à ébullition pendant 5 mn afin d'inactiver les nucléases et les protéases. En attendant leur utilisation pour la PCR, l'ADN était gardé à -20°C. L'incubation à 65°C avait pour effet la lyse complète de la membrane de toutes les cellules du moustique et du parasite. L'acétate de potassium (8M) avait pour effet de débarrasser l'ADN de toutes traces de protéines.

L'ébullition à 100°C permet d'achever la libération de l'ADN et en même temps d'inactiver les nucléases et les protéinases.

3.4.1.2 Amplification de l'ADN extrait

Elle 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.

L'amplification de l'ADN a été réalisée en utilisant des amorces flanquant les régions polymorphiques de la MSP-1 et de la MSP-2. Pour la MSP-1, les amorces reconnaissent les séquences du bloc 1 et 3 flanquant le bloc 2 lequel inclut des acides aminés répétés. Pour la MSP-2, les amorces reconnaissent les séquences conservées des blocs 1 et 4 autour de la région centrale du gène, laquelle contenait des séquences variables et des acides aminés répétés *en tandem* (Figure 3). Pour augmenter la sensibilité de la PCR deux types d'amorces étaient utilisés: l'externe (OUTER) et l'interne (NESTED) (Ranford-Cartwright et Babiker, 1992).

L'ADN amplifié provenant de la première PCR (OUTER) était utilisé comme l'ADN matricielle pour la seconde amplification PCR, utilisant les amorces "Nested". Les conditions d'amplification PCR étaient les suivantes: l'ADN était amplifié dans une mixture de réaction PCR contenant le PCR buffer (50mM KCL, 10mM Tris-HCL [pH8,8], 2.5 mM MgCL₂ 0.02% gélatine), 100 nM de chaque amorce, 75 uM de chaque dATP, dTTP, dGTP et 0,5 unités "d'AmpliTaq DNA polymérase (Boehringer)". Les échantillons étaient recouverts d'huile minérale.

Pour la MSP-1, l'ADN était soumis à 30 cycles (94°C/25s; 50°C/35s; 68°C/15s) d'amplification performés sur une machine thermique Biometra TRIO. Les conditions et les nombres de cycles étaient les mêmes pour les amorces "Outer" et "Nested" de la MSP-1. Durant le cycle final l'étape de l'extension à 68°C était continue pour 10 mn.

Pour la MSP-2, l'ADN était amplifié utilisant différentes conditions pour chacun des deux types d'amorces. Au cours de la première réaction PCR les amorces externes étaient utilisées à 30 cycles d'amplification de 94°C/25s ; 42°C/1min et 65°C/2min étaient exécutés. La seconde amplification utilisant les amorces "Nested" était aussi pour 30 cycles, à 94°C /25s; 50°C/min et 70°C/2min. L'étape de l'extension à 65°C ou 70°C, était pour 10minutes.

Les séquences spécifiques d'allèles de MSP-1 (MAD20; K1; RO33) et de MSP-2 (IC1; FC27) étaient amplifiées utilisant les mêmes conditions précédentes de réaction PCR, mais en remplaçant les amorces par celles s'hybridant au niveau des séquences spécifiques de l'une des trois souches de la MSP-1 (MAD20; K1; RO33) et/ou l'une des deux souches de la MSP-2 (IC1; FC27). Pour la MSP-1 les séquences spécifiques des trois allèles étaient amplifiées utilisant 30 cycles, à 94°C /30s; 55°C/15s et 72°C/30s. Pour la MSP-2 les séquences spécifiques des deux allèles étaient amplifiées utilisant 30 cycles à 94°C /25s; 54°C/60s et 70°C/60s.

La technique de réaction PCR dite nichée (<<nested>>) a été utilisée pour augmenter la sensibilité et la spécificité de la PCR. 2 µl de chaque produit "Outer PCR" servaient d'ADN matrice à la seconde PCR.

3.4.1.3 Révélation des produits amplifiés

12 µl du produit d'amplification mélangés à 2 µl de colorant (Quality Biological Inc, Gaithersburg, MD) étaient chargés dans un gel d'agarose à 1,5% placé dans un bac de migration contenant 700 ml de Tris Borate EDTA (0,09 M boric acid ; 0,09 M Tris ; 0,002 M EDTA) 0,5X et de Bromure d'Ethidium (5µg/ml) (GIBCO). Une tension de 90 volts (200mA) était appliquée pendant 45 mn. Au niveau du premier trou de migration, étaient déposés 5 à 6µl d'une solution marqueur moléculaire de type **XIV** (Boehringer Mannheim, Indianapolis IND). Après arrêt de la migration le gel était photographié sous lumière ultra-violette à l'aide d'une camera Photo (FOTODYNE®). L'image du gel était ainsi marquée et conservée pour une interprétation ultérieure.

3.4.1.4 Préparation du gel à 1,5%

1,5 g d'agarose ultra pure sont pesés puis versés dans un erlenmeyer de 1000 ml. Ensuite 100ml de TBE 0,5X étaient ajoutés et le mélange est porté à ébullition pendant 2 minutes dans un four à micro-onde. Après chauffage, 5ul de BET(5ug/ml -Sigma) sont ajoutés. La préparation ainsi obtenue est coulée dans un support de gel avec un peigne qui porte des dents.

3.4.1.5 Interprétation des résultats et estimation de la taille des fragments d'ADN amplifiés

Au stade sporozoïte chez le moustique, le parasite du paludisme est haploïde, alors la présence de plus d'un allèle d'un gène donné chez le même moustique (tête-thorax) ne peut s'expliquer que par une infection mixte provenant d'allotypes différents de parasites.

L'analyse par PCR de chaque gène implique deux étapes d'amplification, utilisant un "Nested Primer" durant la deuxième étape. Cette approche qui augmente la sensibilité de la détection à la PCR permet également d'amplifier avec succès l'ADN extrait des échantillons présentant une faible parasitémie (Ranford-Cartwright *et al.*, 1993, 1997) Des amorces spécifiques aux différentes familles ont été utilisées durant la deuxième partie de la PCR pour définir les familles alléliques des deux gènes (MSP-1 & MSP-2) présents dans les échantillons.

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 aux tailles standards se trouvant au niveau du marqueur moléculaire **XIV** (Boehringer - Mannheim, Indianapolis, IN). Tous les fragments de la MSP-1 et de la MSP-2 amplifiés durant la première partie d'amplification qui n'ont pas produit de fragments pendant la deuxième partie, ont été classés comme étant des allèles ' non caractérisés'

L'estimation de la taille des fragments d'ADN amplifiés contenant des séquences de nucléotides répétées en tandem et de nombre variable révèle des difficultés techniques. Ainsi pour minimiser les erreurs de mesure, les fragments de taille proche ont été groupés dans un même panier "numérique discret" autour d'une taille moyenne. Bien que chaque panier puisse contenir plusieurs allèles avec des nombres différents de séquences répétées (polymorphisme de séquences), et de tailles différentes (polymorphisme de tailles) elles étaient considérées comme ayant une même taille moyenne.

L'analyse du nombre moyen de clones estimé à partir de la combinaison des allèles aux deux loci a été faite utilisant la méthode employée par Babiker *et al.* en Tanzanie 1994 (voir gestion et analyse des données).

Figure 11 : Description du gel

M = marqueur moléculaire XIV

+ = contrôle positif

- = contrôle négatif

De 1 à 12 : fragments amplifiés par PCR du gène codant pour la protéine de surface du mérozoïte (MSP-2)

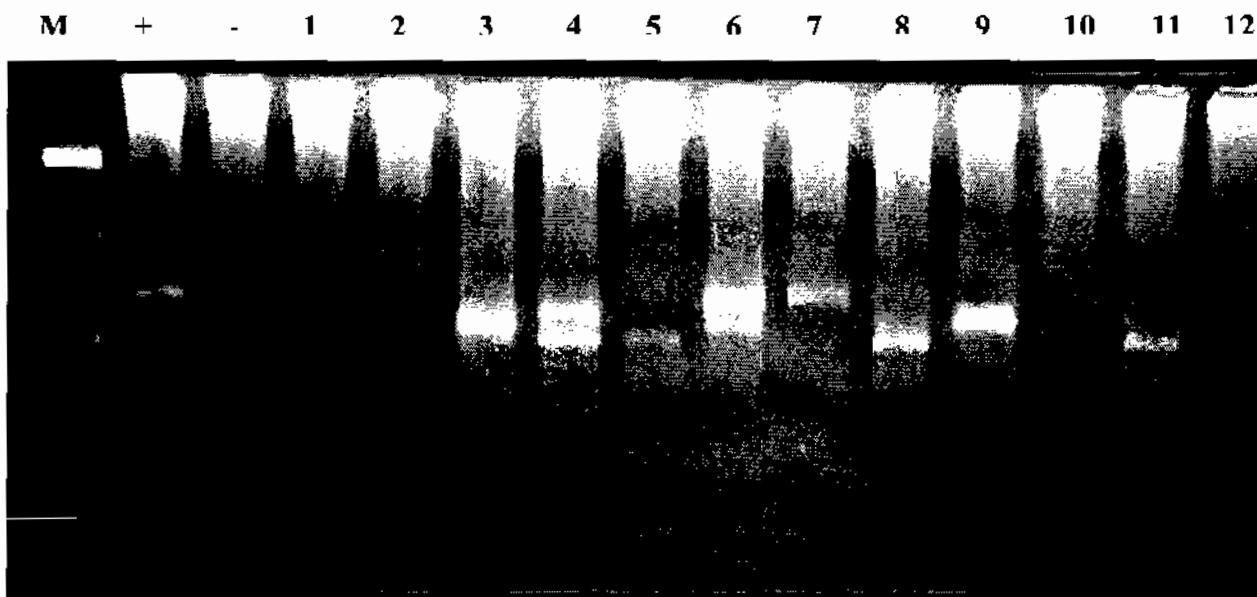
Chaque numéro représente un enfant infecté par *P. falciparum*.

Les numéros (n°) 4 et 6 indiquent une infection mixte

Les enfants n° 1 ; 2 ; 10 ; 12 ne présentent pas de fragments PCR après amplification.

Les autres échantillons sur ce gel sont infectés par un seul allèle de la MSP-2 de *P. falciparum*.

Figure 11 : Photos d'un gel à 1,5% d'agarose après coloration au bromure d'éthidium.



3.5 Considérations éthiques

Le protocole de cette étude a été approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie du Mali (FMPOS) avant son exécution sur le terrain. Un autre aspect, était la présence permanente d'un médecin pendant tout le temps de l'étude, cela a permis d'assurer la couverture sanitaire gratuite des habitants de Donéguébougou et de ceux des villages environnants. Outre l'ancienne collaboration avec ce village, le DEAP a également pris en charge la formation de deux aides-soignants originaires du village au centre de santé de Kati. Le DEAP s'occupe également de l'évacuation des cas graves et des cas d'urgence sur Kati et Bamako et de leur prise en charge.

3.6 Gestion et analyse des données

- Les données collectées ont été enregistrées sur des fiches de base conçues à cet effet. Elles ont ensuite été saisies en utilisant le logiciel SSPS version 10.1.
- L'analyse des données a été faite en utilisant le logiciel EpiInfo 6.04 cfr et SSPS version 10.1.
- Le logiciel EXCEL 2000 a été utilisé pour les représentations des tableaux.
- Les représentations graphiques ont été faites avec le logiciel Havard graphics 98.
- Les tests statistiques utilisés sont :

- le Khi-carré (X^2) de Pearson pour la comparaison des taux et proportions (fréquences des espèces, taux d'infection des espèces vectrices, les taux d'anthropophilie, les taux de parité,).
- le test ANOVA pour comparaison des moyennes.
- Les effectifs théoriques inférieurs à 5 ont été éliminés de l'analyse.
- Le risque alpha est fixé à 5%.

-Le nombre moyen de clones estimé à partir d'échantillons caractérisés pour le polymorphisme allélique de la MSP-1 et de la MSP-2 de *P. falciparum* se calcule selon la méthode suivante "Simple méthode".

La MSP-2 a deux possibilités de type de clones contre 3 possibilités pour la MSP-1.

Par exemple: lorsqu'un type de fragment de PCR (1 clone) est obtenu à un locus (MSP-2) et tandis que deux types de fragments (2 clones) sont observés à l'autre locus (MSP-1). Ceci aboutit à 2 clones avec les deux loci combinés (MSP-1 + MSP-2). Aux deux loci nous avons seulement 2 bien que le maximum est égal à 5, il est conseillé de considérer le minimum c'est à dire 2 clones.

Exemple de méthode de calcul du nombre minimum de clones/échantillon (n.m.cl):

Nombre de clones observés	locus msp1	locus msp2	2 loci
1	15	9	3
2	13	28	13
3	13	11	18
4	9	5	12
5	3	0	7
total	53	53	53

-Pour le locus MSP-1 n.m.cl / moustique = 2,5 clones
 -Pour le locus MSP-2 n.m.cl / moustique = 2,2 clones
 -Pour les loci (MSP-1+MSP-2) n.m.cl / moustique = 3,1 clones

$$\begin{aligned} \text{n.m.cl (MSP-1)} &= \frac{(15 \times 1) + (13 \times 2) + (13 \times 3) + (9 \times 4) + (3 \times 5)}{53} \\ &= 2,5 \text{ clones / moustiques} \end{aligned}$$

RESULTATS

4 - RESULTATS

4.1 Etudes Entomologiques

4.1.1 Fréquences des espèces vectrices

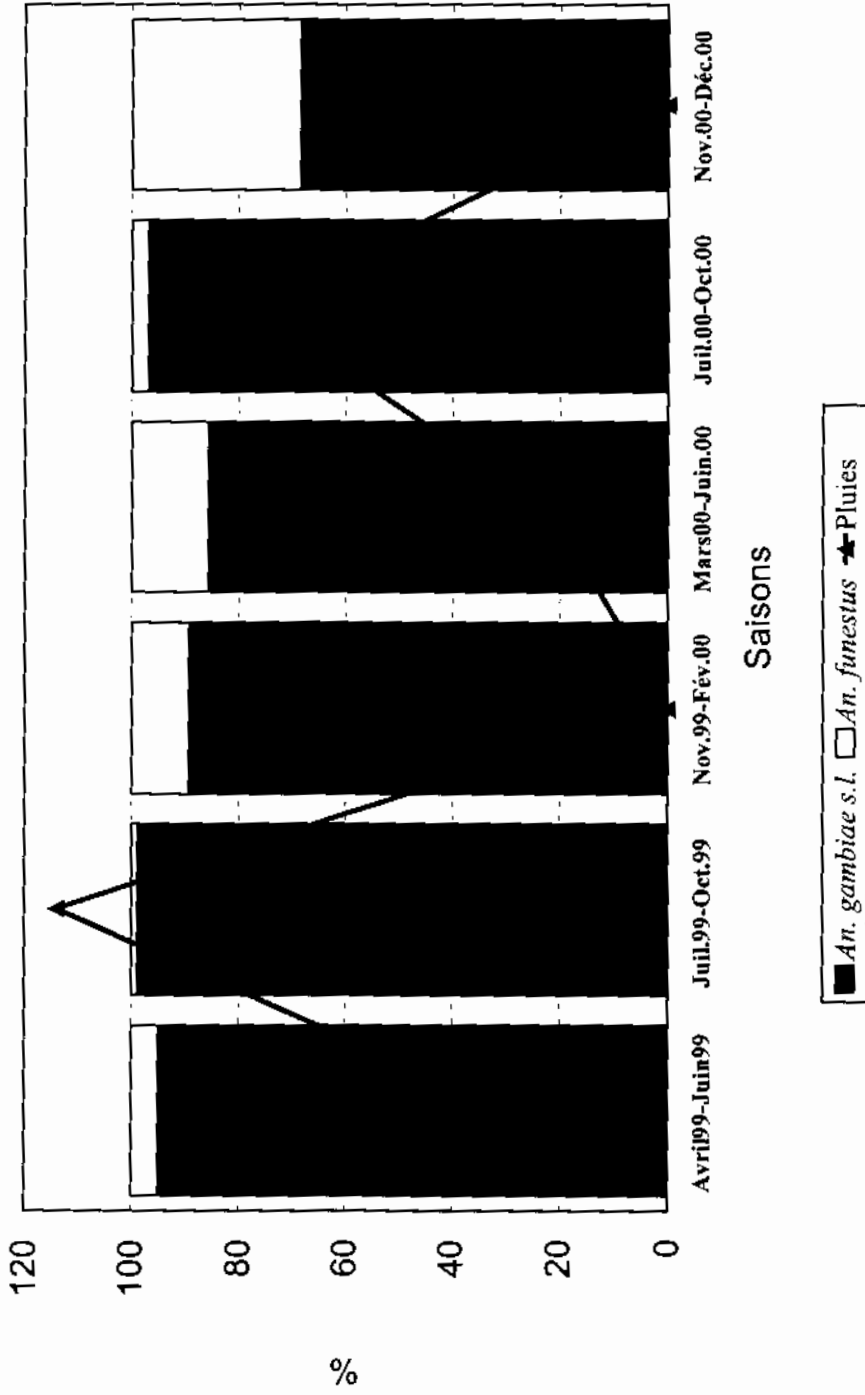
4.1.1.1 Fréquences des espèces (*An. gambiae s.l.* et *An. funestus*)

Tableau 1: Distribution saisonnière des fréquences d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus*.

espèces saisons/annee	<i>An. gambiae s.l.</i>		<i>An. funestus</i>		Total n
	n	%	n	%	
avril99-juin99	381	95,01	20	4,99	401
juil.99-oct.99	9117	98,85	106	1,15	9223
nov.99-fév.00	2209	89,32	264	10,68	2473
mars00-juin00	138	85,71	23	14,29	161
juil.00-oct.00	5462	96,88	176	3,12	5638
nov.00-déc.00	908	68,48	418	31,52	1326
Total	18215	94,76	1007	5,24	19222

La répartition saisonnière des fréquences de moustiques obtenus par spray-catch et captures de nuit à Donéguebougou (d'avril 1999 en décembre 2000) a montré une large prédominance ($p < 0,0001$) d'*An. gambiae s.l.* (94,76%, $n = 19222$) par rapport à *An. funestus* (5,24%). Les fréquences relatives des deux vecteurs subissaient des variations saisonnières significatives ($X^2 = 2380,81$; ddl = 5 ; $p < 0,0001$). Les fréquences les plus élevées d'*An. gambiae s.l.* ont été observées pendant l'hivernage (98,85% et 96,88% durant les hivernages 1999 et 2000) par contre celles d'*An. funestus* ont connu une hausse en saison sèche fraîche (31,52% en novembre et décembre 2000).

Fig. 12 : Répartition saisonnière des fréquences d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus* à Donéguébougou (1999-2000)



4.1.1.2 Composition du complexe *Anopheles gambiae***Tableau 2** : Distribution saisonnière des fréquences d'*An. gambiae* s.s. et d'*An. arabiensis* après identification par PCR.

espèces saisons	<i>An. gambiae</i> s.s		<i>An. arabiensis</i>		Total
	n	%	n	%	
Avril99-Juin99	78	84,78	14	15,22	92
Juil.99-Oct.99	1266	78,78	341	21,22	1607
Nov.99-Fév.00	321	71,33	129	28,67	450
Mars00-Juin00	75	59,52	51	40,48	126
Juil.00-Oct.00	2504	86,37	395	13,63	2899
Nov.00-Déc.00	323	66,46	163	33,54	486
Total	4567	80,69	1093	19,31	5660

De manière générale, la fréquence moyenne relative d'*An. gambiae* s.s. (80,69%, n = 5660) était nettement plus élevée que celle d'*An. arabiensis* (19,31%) durant la période d'étude ($X^2 = 4264,55$; ddl = 1; $p < 0,0001$).

Ces fréquences ont connu des variations saisonnières significatives ($X^2 = 192,68$; ddl = 5 ; $p < 0,0001$). Les fréquences d'*An. gambiae* s.s. les plus élevées sont observées en saisons de pluies (86,37% en 2000) et les plus faibles en saison sèche chaude (59,52% en 2000). Nous constatons le phénomène inverse pour *An. arabiensis*: les faibles fréquences sont observées durant la saison de pluie (13,63%) et les plus élevées en saison sèche chaude (40,48%).

Figure 13: Répartition saisonnière des fréquences d'*An. gambiae* s.s. et d'*An. arabiensis*

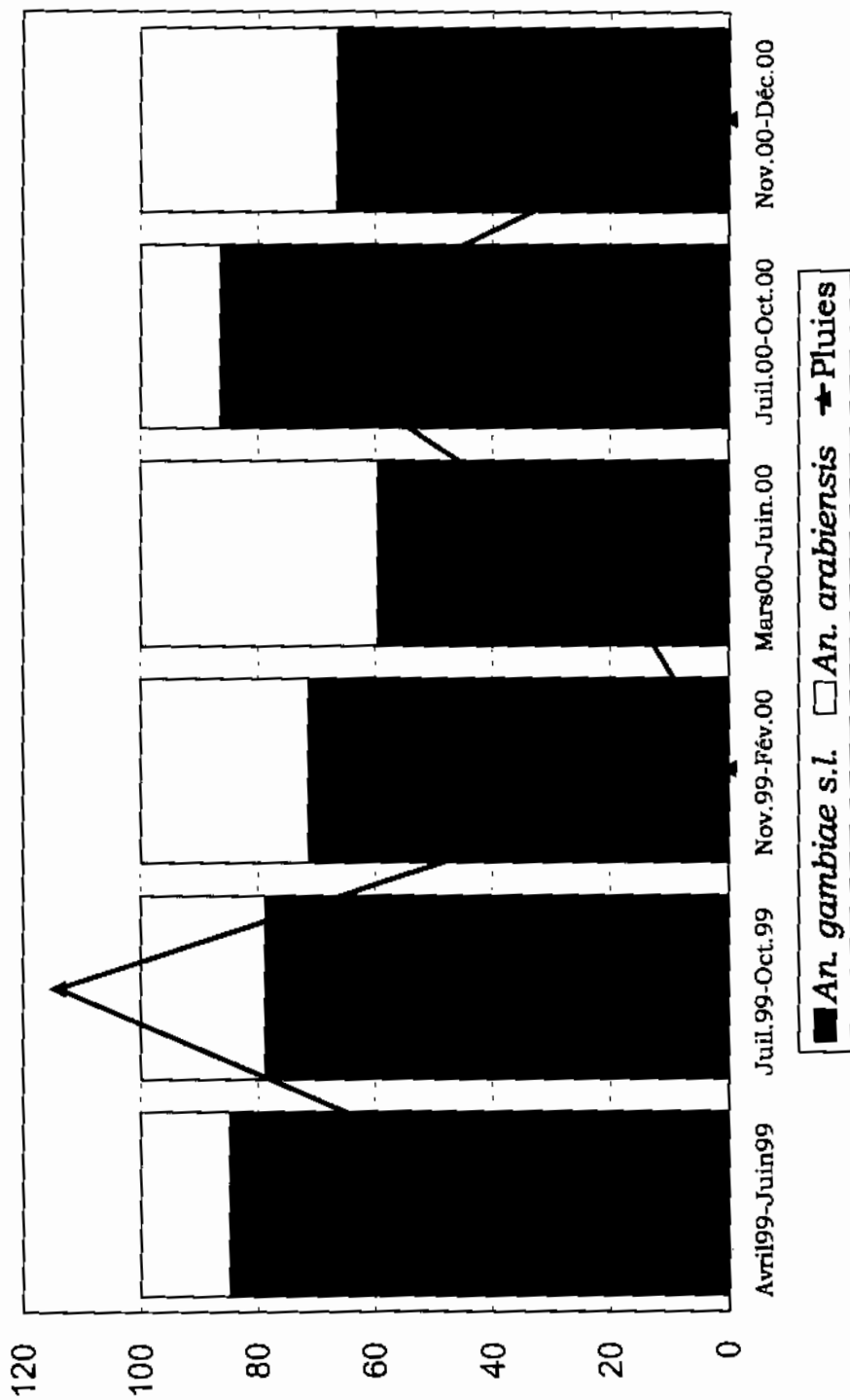


Tableau 3 : Variations saisonnières des fréquences relatives des formes chromosomiques d'*An. gambiae* s.s. après identification cytogénétique.

saisons	taxa Bamako		Savane		Mopti		Autres*		Total
	n	%	n	%	n	%	n	%	n
avril99-juin99	0	0,00	2	2,67	73	97,33	0	0,00	75
juil.99-oct.99	63	20,13	119	38,02	129	41,21	2	0,64	313
nov.99-fév.00	31	17,32	64	35,75	69	38,55	15	8,38	179
mars00-juin00	0	0,00	0	0,00	9	1000	0	0,00	9
juil.00-oct.00	85	22,91	172	46,36	110	29,65	4	1,08	371
nov.00-déc.00	9	16,67	19	35,19	23	42,59	3	5,56	54
Total	188	18,78	376	37,56	413	41,26	24	2,40	1001

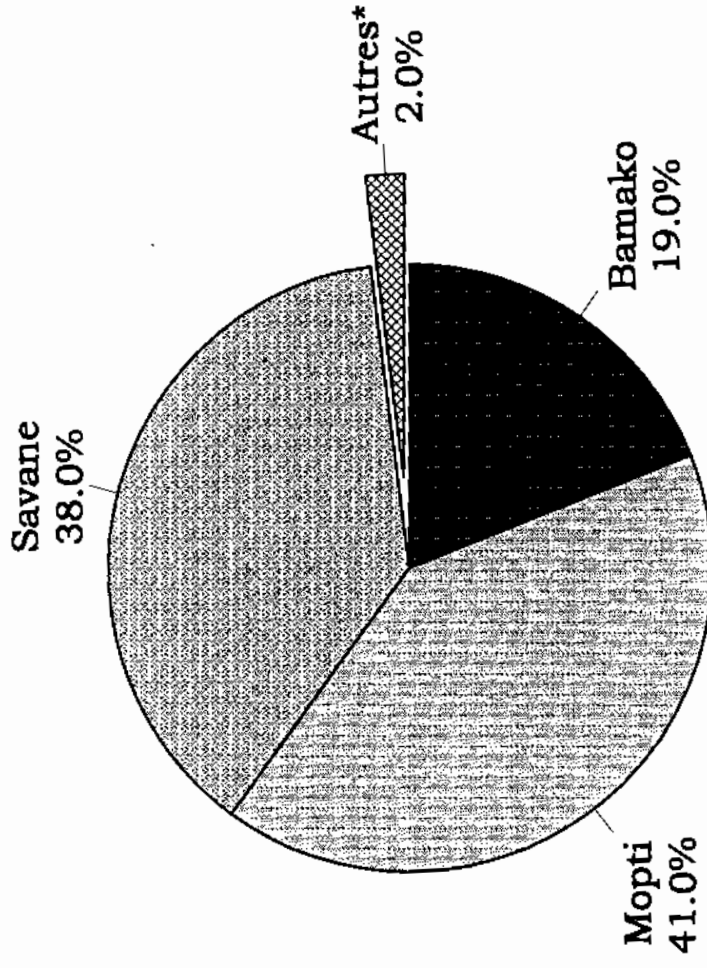
Autres* = Hybrides : Mopti/Savane ; Bamako/Savane ou Mopti/Bamako (rare).

Le tableau 3 montre une variation statistiquement significative entre les fréquences moyennes des formes chromosomiques rencontrées ($X^2 = 518,76$; ddl = 3 ; $p = 0,000001$) : Mopti (41,26% ; $n = 1001$), Savane (37,56%), Bamako (18,78%) et les Hybrides (2,40%). La fréquence de la forme chromosomique Mopti était nettement supérieure à celle de Bamako ($X^2 = 120,37$; ddl = 1 ; $p < 0,0001$). Il n'a pas été constaté de différence statistiquement significative entre les fréquences de Mopti et de Savane ($X^2 = 2,86$; ddl = 1 ; $p = 0,09$). Celle des Hybrides était hautement inférieure à celle de la forme Bamako ($X^2 = 141,89$; ddl = 1 ; $p < 0,0001$).

Les fréquences des formes chromosomiques Mopti et Savane ont subi des variations saisonnières significatives : Mopti ($X^2 = 131,33$; ddl = 5 ; $p < 0,0001$), Savane ($X^2 = 8,34$; ddl = 3 ; $p = 0,039$). La forme Mopti a atteint son pic en saison sèche chaude avec 97,33% (avril et juin 1999) et 100% (mars et juin 2000). Les plus faibles fréquences ont été observées pendant les saisons humides (29,65% entre juillet et octobre 2000).

Celle de Bamako n'a pas connu de variations saisonnières significatives ($X^2 = 2,95$; ddl = 3 ; $p = 0,399$).

Fig. 14 : Repartition des fréquences des formes chromosomiques d'*An. gambiae* s.s.



4.1.2 Etude des taux de Parité

Tableau 4 : Taux de Parité saisonnière d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus* pendant les différentes saisons d'avril 1999 en décembre 2000 à Donéguébougou.

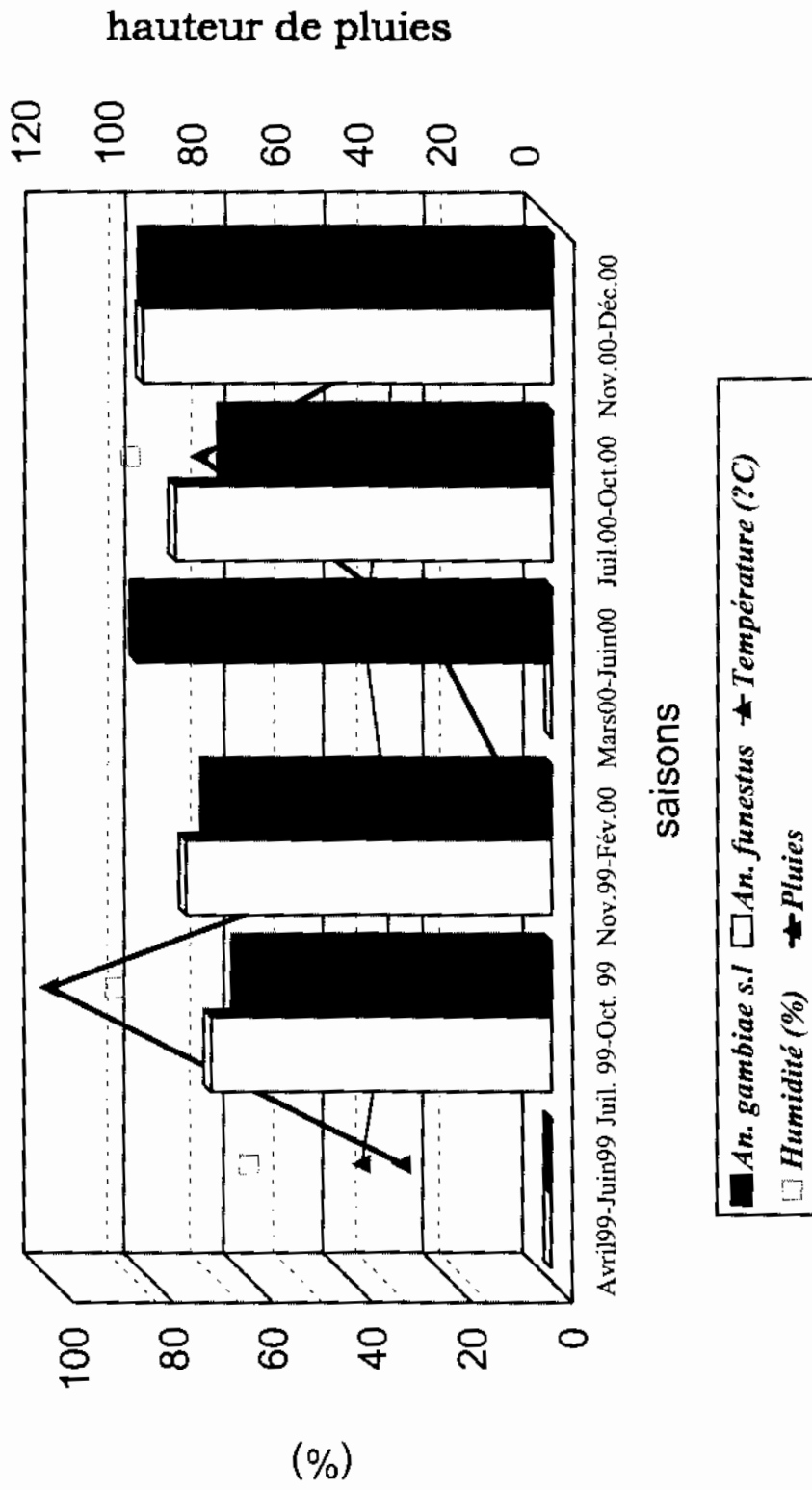
espèces saisons	<i>An. gambiae s.l.</i>				<i>An. funestus</i>			
	T.D	P	neg	%	T.D	P	neg	%
avril99-juin99	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
juil. 99-oct. 99	1718	1291	427	75,15	66	45	21	68,18
nov.99-fév.00	58	48	10	82,76	30	22	8	73,33
mars00-juin00	1	1	0	100	0	0	0	0,00
juil.00-oct.00	836	656	180	78,47	49	37	12	75,51
nov.00-déc.00	52	51	1	98,08	28	23	5	82,14
Total	2665	2047	618	76,81	173	127	46	73,41

T.D = Total Disséqué ; P = nombre de moustiques Pares

Les taux moyens de parité ne diffèrent pas significativement (X^2 corrigé de Yates = 0,87; $p = 0,35$) entre *An. gambiae s.l.* (76,81%, $n = 2665$) et *An. funestus* (73,41 %, $n = 173$).

Les taux de parité d'*An. gambiae s.l.* subissent des variations saisonnières hautement significatives ($X^2 = 18,32$; ddl = 3; $p = 0,0004$). Les taux les plus élevés d'*An. gambiae s.l.* s'observent en saison sèche fraîche (82,8 à 98,1%). Par contre, il n'existe pas de différences statistiquement significatives entre ceux observés pour *An. funestus* ($X^2 = 2,13$; ddl = 3 ; $p = 0,546$).

Figure 15 : Taux de Parité saisonnière d'*An. gambiae* s.l. et d'*An. funestus*



4.1.3 Etude de l'agressivité des vecteurs

Tableau 5 : Taux d'agressivité moyenne mensuelle par homme (nombres de piqûres de moustique par homme et par mois) pour *An. gambiae s.l.* et *An. funestus*.

espèces saisons	N.D.	<i>An. gambiae s.l.</i>		<i>An. funestus</i>		Total	
		n	P/h/m	n	P/h/m	n	P/h/m
avril 99	934	127	4,1	8	0,3	135	4,3
mai 99	914	25	0,8	2	0,1	27	0,9
juin 99	428	15	1,1	2	0,1	17	1,2
juillet.99	432	412	28,6	0	0,0	412	28,6
août 99	440	1046	71,3	1	0,1	1047	71,4
septembre 99	451	2262	150,5	2	0,1	2264	150,6
octobre 99	456	1372	90,3	8	0,5	1380	90,8
novembre 99	447	517	34,7	17	1,1	534	35,8
décembre 99	435	101	7,0	21	1,4	122	8,4
janvier 00	242	35	4,3	25	3,1	60	7,4
février 00	203	17	2,5	20	3,0	37	5,5
mars 00	376	8	0,6	4	0,3	12	1,0
avril 00	208	18	2,6	8	1,2	26	3,8
mai 00	283	9	1,0	2	0,2	11	1,2
juin 00	445	33	2,2	0	0,0	33	2,2
juillet.00	439	91	6,2	0	0,0	91	6,2
août 00	462	723	46,9	4	0,3	727	47,2
septembre 00	459	1727	112,9	7	0,5	1734	113,3
octobre 00	437	674	46,3	37	2,5	711	48,8
novembre 00	429	328	22,9	65	4,5	393	27,5
décembre 00	459	145	9,5	43	2,8	188	12,3
Total	9379	9685	31,0	276	0,9	9961	31,9

P/h/m = nombre de piqûres de moustiques par homme et par mois.

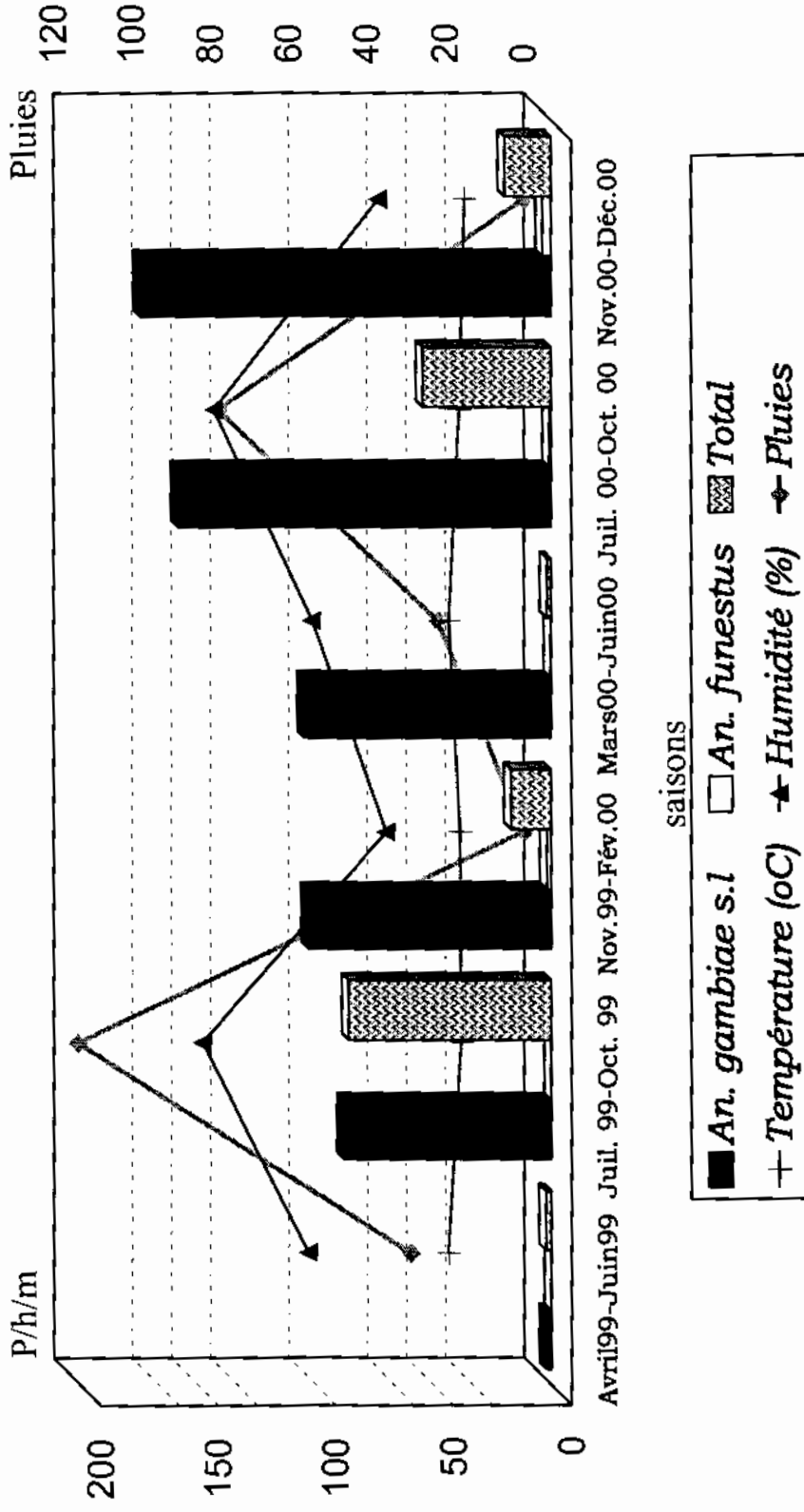
N.D. = nombre total de dormeurs

Les résultats ci-dessus (tableau 5) ont permis de constater 31,9 piqûres par homme et par mois (P/h/m) en moyenne. L'agressivité moyenne mensuelle a été de 31,0 P/h/m pour *An. gambiae s.l.* et 0,9 P/h/m pour *An. funestus*.

L'agressivité globale présente un pic en hivernage avec 113,3 et 150,6 P/h/m (Septembre 1999 et 2000). On observe le même phénomène avec *An. gambiae s.l.* durant les saisons de pluies: 112,9 P/h/m et 150,5 P/h/m (respectivement

en septembre 2000 et 1999). Quant à *An. funestus*, il semble plus agressif pendant la période sèche froide (3,1 P/h/m en janvier 2000 et 4,5 P/h/m en novembre 2000).

Figure 16 : Agressivité moyenne mensuelle par homme pour *An. gambiae s.l.* et *An. funestus*



4.1.4 Etude des taux d'infection

Tableau 6 : Variations mensuelles des taux d'infection d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus* à Donéguébougou (avril 1999 – décembre 2000).

espèces mois	<i>An. gambiae s.l.</i>			<i>An. funestus</i>			Total		
	T.T.	Pos.	%	T.T.	Pos.	%	T.T.	Pos.	%
Avril 99	285	0	0,00	16	1	6,25	301	1	0,33
Mai 99	55	2	3,64	4	1	25,00	59	3	5,08
Juin 99	34	0	0,00	1	0	0,00	35	0	0,00
Juillet.99	734	25	3,41	0	0	0,00	734	25	3,41
Août 99	1186	47	3,96	10	0	0,00	1196	47	3,93
Septembre 99	1576	39	2,47	24	0	0,00	1600	39	2,44
Octobre 99	1152	52	4,51	37	0	0,00	1189	52	4,37
Novembre 99	679	137	20,18	28	2	7,14	707	139	19,66
Décembre 99	173	37	21,39	39	2	5,13	212	39	18,40
Janvier 00	58	2	3,45	92	1	1,09	150	3	2,00
Février 00	27	0	0,00	46	4	8,70	73	4	5,48
Mars 00	18	0	0,00	11	1	9,09	29	1	3,45
Avril 00	36	0	0,00	10	0	0,00	46	0	0,00
Mai 00	15	0	0,00	3	0	0,00	18	0	0,00
Juin 00	73	3	4,11	0	0	0,00	73	3	4,11
Juillet.00	165	6	3,64	3	0	0,00	168	6	3,57
Août 00	1517	54	3,56	11	0	0,00	1528	54	3,53
Septembre 00	2831	159	5,62	38	0	0,00	2869	159	5,54
Octobre 00	1080	176	16,30	103	9	8,74	1183	185	15,64
Novembre 00	630	64	10,16	215	8	3,72	845	72	8,52
Décembre 00	274	12	4,38	153	11	7,19	427	23	5,39
Total	12598	815	6,47	844	40	4,74	13442	855	6,36

T.T. = Total Testé ; Pos. = nombre de positifs

Le taux d'infection global observé au sein de la population anophélienne est de 6,36% à Donéguébougou entre avril 1999 et décembre 2000 (tableau 7). *An. gambiae s.l.* a un taux d'infection moyen de 6,47% et celui d'*An. funestus* est 4,74%. Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les taux d'infection moyens d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus* (X^2 corrigé de Yates = 3,69 ; $p = 0,055$).

Les taux d'infection subissent des variations mensuelles hautement significatives pour *An. gambiae s.l.* ($p < 0,0001$) mais non pour *An. funestus* (X^2 corrigé de Yates = 0,75 ; $p = 0,388$).

Le taux d'infection global pour le village évolue proportionnellement par rapport à celui d'*An. gambiae s.l.* en fin de saison de pluies. Il a été de 19,66% en novembre 1999 et pour l'ensemble du village tandis que celui d'*An. gambiae s.l.* a atteint 21,39% en décembre 1999.

Figure 17 : Répartition des Taux d'infection mensuels d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus*.

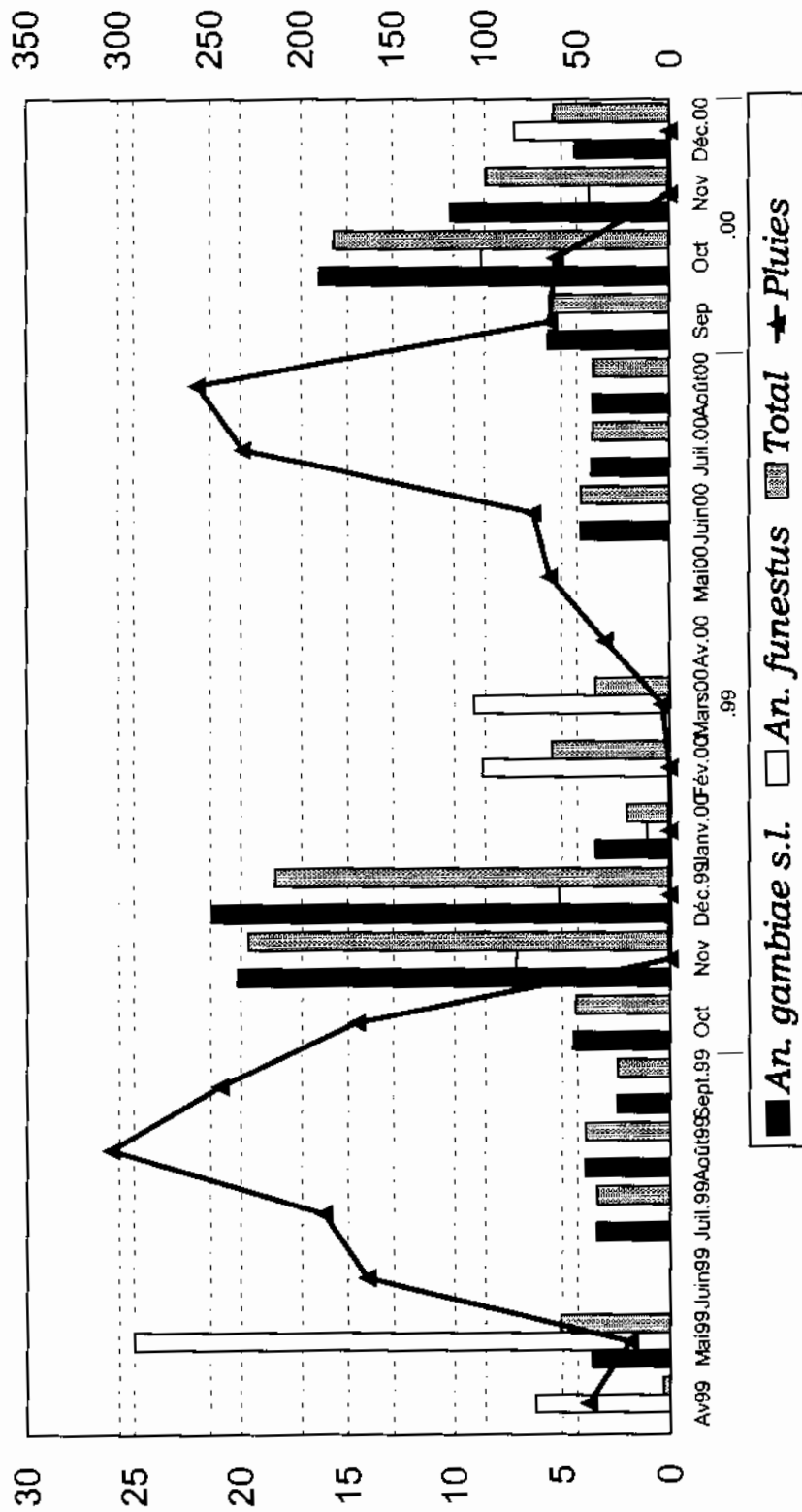


Tableau 7 : Variations saisonnières des taux d'infection d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus* à Donéguebougou.

espèces saisons	<i>An. gambiae s.l.</i>			<i>An. funestus</i>			Total		
	T.T	Pos.	%	T.T	Pos.	%	T.T	Pos.	%
avril99-juin99	374	3	0,80	21	2	9,52	395	5	1,27
juil.99-oct.99	4648	163	3,51	71	0	0,00	4719	163	3,45
nov.99-fév.00	937	176	18,78	172	9	5,81	1092	186	16,94
mars00-juin00	142	3	2,11	23	1	4,35	165	4	2,42
juil.00-oct.00	5593	395	7,06	155	9	5,81	5748	404	7,03
nov.00-déc.00	904	75	8,30	368	19	5,16	1273	94	7,38
Total	12598	815	6,47	844	40	4,74	13442	856	6,37

T.T. = Total Testé ; Pos. = nombre de positifs

Le taux d'infection global était en moyenne égal à 6,37% (n = 13442) à Donéguebougou d'avril 1999 en décembre 2000. IL n'existait pas de différence statistique significative entre les taux d'infection d'*An. gambiae s.l.*: 6,47%, n = 12598 et celui d'*An. funestus*: 4,74%, n = 844 (X^2 corrigé de Yates = 2,74; p = 0,098).

Les taux d'infection suivaient des variations saisonnières hautement significatives pour *An. gambiae s.l.* ($X^2 = 345,56$; ddl = 5; p < 0,0001) par contre celui d'*An. funestus* ne connaissait pas de différences statistiquement significatives ($X^2 = 5,07$; ddl = 5 ; p = 0,408).

Ce taux d'infection d'*An. gambiae s.l.* augmentait en saison sèche fraîche (18,78% entre novembre 1999 et février 2000) tandis qu'il était relativement faible en saison sèche chaude (0,80% en 1999 et 2,11% en 2000).

Tableau 8 : Répartition saisonnière des taux d'infection d'*An. gambiae* s.s. et d'*An. arabiensis*.

espèces saisons	<i>An. gambiae</i> s.s.			<i>An. arabiensis</i>		
	T.T.	Pos.	%	T.T.	Pos.	%
avril99-juin99	78	2	2,56	14	1	7,14
juil.99-oct.99	1266	93	7,35	341	13	3,81
nov.99-fév.00	321	157	48,91	129	11	8,53
mars00-juin00	75	2	2,67	51	0	0,00
juil.00-oct.00	2504	350	13,98	395	28	7,09
nov.00-déc.00	323	54	16,72	163	17	10,43
Total	4567	658	14,41	1093	70	6,40

T.T. = Total Testé; Pos. = Nombre de Positifs

An. gambiae s.s. présente un taux d'infection moyen (14,41% ; n = 4567) nettement plus élevé (X^2 corrigé de Yates = 49,12; p < 0,0001) que celui d'*An. arabiensis* (6,40%; n = 1093).

Les taux d'infection varient significativement d'une saison à une autre aussi bien pour *An. gambiae* s.s. (X^2 = 380,08; ddl = 5; p < 0,0001) que pour *An. arabiensis* (X^2 = 13,01; ddl = 5; p < 0,0233).

Le taux, le plus élevé a été observé en saison sèche fraîche (48,91%) pour *An. gambiae* s.s. Quant à *An. arabiensis*, il était élevé pendant la même période fraîche (10,43% en novembre et décembre 2000).

Tableau 9 : Répartition saisonnière des taux d'infection des formes chromosomiques d'*An. gambiae* s.s.

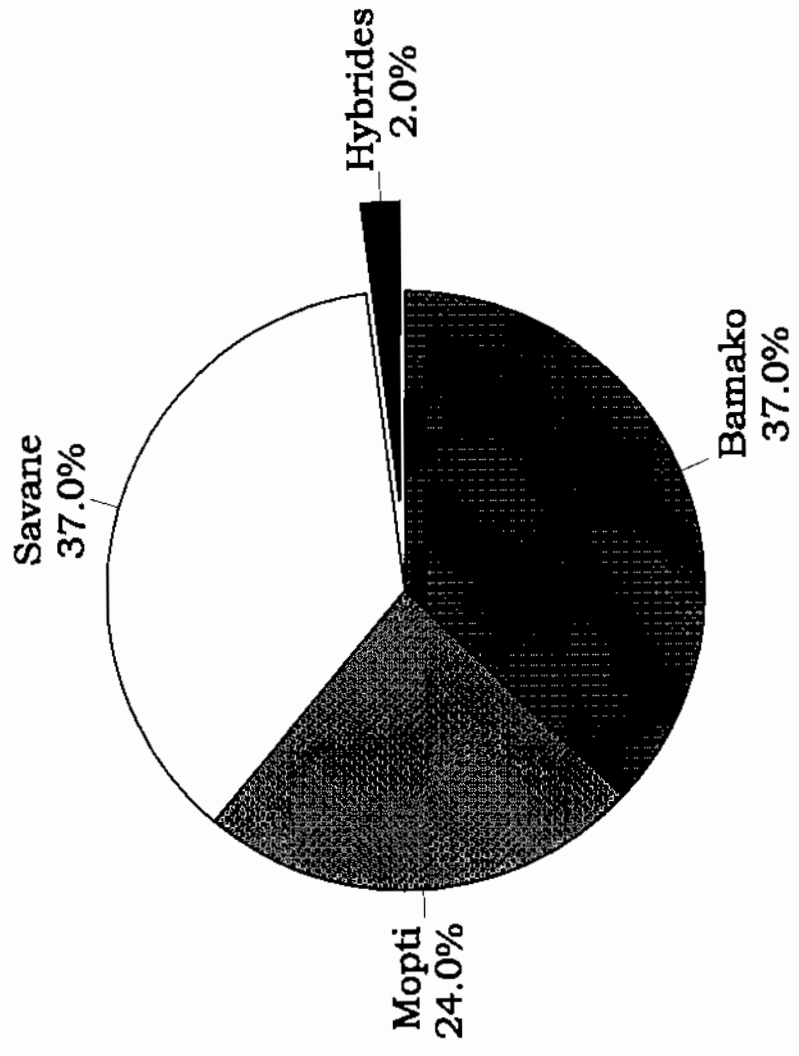
F. Chr. saisons	Bamako			Savane			Mopti			Autres*		
	T.T.	Pos.	%	T.T.	Pos.	%	T.T.	Pos.	%	T.T.	Pos.	%
avril99-juin99	0	0	0,0	2	0	0,0	73	0	0,0	0	0	0,0
juil.99-oct.99	63	19	30,2	119	37	31,1	129	36	27,9	2	1	50,0
nov.99-fév.00	31	31	100	64	61	95,3	69	50	72,5	15	0	0,0
mars00-juin00	0	0	0,0	0	0	0,0	9	2	22,2	0	0	0,0
juil.00-oct.00	85	83	97,7	171	166	97,1	110	97	88,2	4	0	0,0
nov.00-déc.00	9	9	100	19	19	100	23	23	100	3	0	0,0
Total	188	142	75,5	375	283	75,5	413	208	50,4	24	1	4,17

T.T. = Total Testé; Pos. = Nombre de Positifs; F. Chr. = Formes chromosomiques.
Autres* = Hybrides: Mopti/Savane ; Bamako/Savane ou Mopti/Bamako (rare).

Les formes Bamako et Savane présentaient les mêmes taux d'infection (75,5%). Celle de Mopti a été de 50,4% (n = 413). Ces taux d'infection moyens chez les formes Bamako et Savane étaient significativement plus élevés que celui de Mopti ($X^2 = 65,98$; ddl = 2; p = 0,0001).

Le taux d'infection chez les trois formes subissait des variations saisonnières significatives (Bamako: X^2 corrigé de Yates = 73,82; p = 0,0001, Savane: $X^2 = 178,85$; ddl = 2; p = 0,0001, Mopti : $X^2 = 202,03$; ddl = 5; p = 0,0001).

Fig. 19: Répartition des taux d'infection des formes chromosomiques d'*An. gambiae* s.s.



4.1.5 Etude des taux d'anthropophilie

Tableau 10 : Taux d'anthropophilie des moustiques : *An. gambiae s.l.* et *An. funestus* pendant les différentes saisons à Donéguébougou (avril 1999 – décembre 2000).

saisons	espèces <i>An. gambiae s.l.</i>			<i>An. funestus</i>		
	T.T	Positifs	%	T.T	Positifs	%
avril99-juin99	146	137	93,8	11	11	100
juil.99-oct.99	2254	2168	96,2	2	2	100
nov.99-fév.00	477	444	93,1	54	14	25,9
mars00-juin00	34	30	88,2	1	-	-
juil.00-oct.00	2528	2306	91,2	33	30	90,9
nov.00-déc.00	406	381	93,8	109	103	94,5
Total	5845	5466	93,5	210	160	76,2

T.T. = Total Testé

L'observation du tableau 10 montre que *An. gambiae s.l.* avait un taux d'anthropophilie (93,5%, n = 5845) nettement supérieur (X^2 corrigé de Yates = 89,82; $p < 0,0001$) à celui d'*An. funestus* (76,2%, n = 210). Ce taux subissait des variations saisonnières hautement significatives aussi bien avec *An. gambiae s.l.* ($X^2 = 50,29$; ddl = 5; $p < 0,001$) qu'avec *An. funestus* ($X^2 = 103,54$; ddl = 3; $p < 0,0001$). *An. gambiae s.l.* avait son taux le plus élevé en saison de pluies 1999 (96,2%) et le plus faible durant la saison sèche chaude 2000 (88,2%). Le taux observé avec *An. funestus* varie de 25,9 à 100%.

4.1.6 Etude des Taux d'Inoculation Entomologique (TIE)

Tableau 11: Variations saisonnières des taux d'inoculation entomologique (TIE) d'*An. gambiae s.l.* et *An. funestus* à Donéguebougou (avril 1999 – décembre 2000).

saisons	espèces <i>An. gambiae s.l.</i>			<i>An. funestus</i>			Total h
	m.a	T. inf.	h	m.a	T. inf.	h	
avril99-juin99	5,95	0,0364	0,2164	0,4628	0,3125	0,1446	0,3610
juil.99-oct.99	340,66	0,1436	48,9097	0,7275	0,0000	0,0000	48,9097
nov.99-fév.00	48,51	0,4501	21,8376	8,6441	0,2205	1,9063	23,7439
mars00-juin00	6,41	0,0411	0,2636	1,6850	0,0909	0,1532	0,4167
juil.00-oct.00	212,31	0,2911	61,8014	3,2573	0,0874	0,2846	62,0861
nov.00-déc.00	32,41	0,1454	4,7125	7,3559	0,1091	0,8026	5,5150
Total	30,98	0,0647	2,0041	0,8828	0,0474	0,0418	2,0459

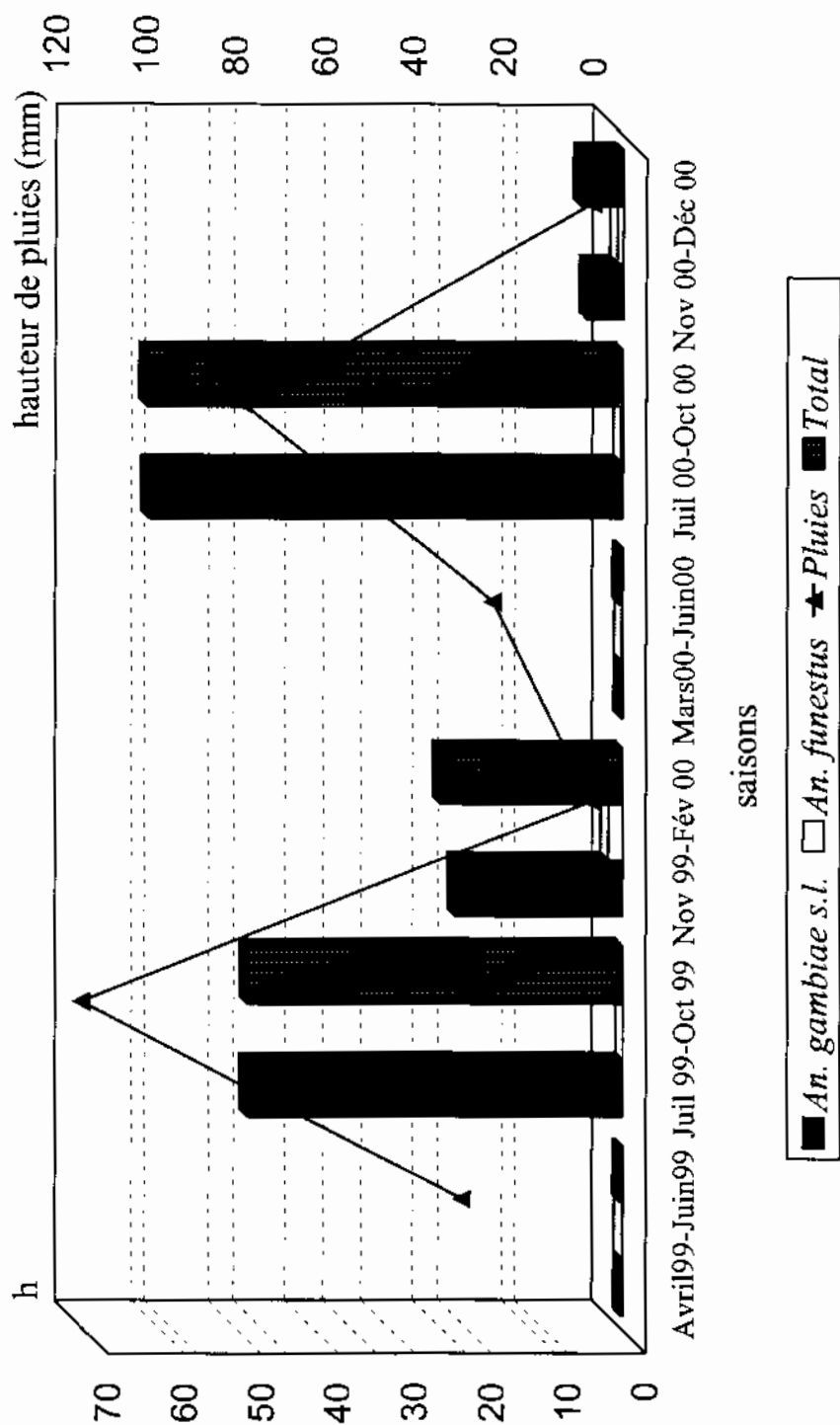
m.a = agressivité moyenne par mois

T. inf. = taux d'infection des moustiques

h = taux d'inoculation entomologique (TIE).

Le taux d'inoculation entomologique (h) était en moyenne faible : 0,047 piqûre infectante par homme et par mois (P/h/m) pour *An. funestus* et relativement élevé pour *An. gambiae s.l.*: 2,004 P/h/m. Le taux le plus élevé était observé pendant la saison de pluies 1999 pour *An. gambiae s.l.* (48,910) tandis que celui d'*An. funestus* se situait en saison sèche fraîche avec 1,906 P/h/m.

Figure 21 : Taux d'inoculation entomologique des espèces vectrices Donéguébougou.



4.2 Etudes Parasitologiques

4.2.1 Répartition par sexe de l'échantillon d'étude

Tableau 12 : Répartition de la population d'étude par classe d'âge selon le sexe pendant la période d'étude (avril 1999 – décembre 2000).

âge sexe	0 - 1 an		2 - 4 ans		5 - 9 ans		10 - 15 ans		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Masculin	33	53,2	72	51,8	110	54,5	123	54,2	338	53,7
Féminin	29	46,8	67	48,2	92	45,5	104	45,8	292	46,3
Total	62	100	139	100	202	100	227	100	630	100

Au total 630 enfants de 0-15 ans ont été recensés au cours de la période d'étude. Il n'existe pas de différence statistiquement significative ($\bar{X}^2 = 6,72$; ddl = 3; p = 0,96) entre la proportion des tranches d'âge masculines (53,7%) et celle féminine (46,3%).

4.2.2 Etude de la Prévalence du Paludisme

Tableau 13 : Incidence du paludisme chez les enfants de 0 – 15 ans à Donéguebougou d'avril 1999 en décembre 2000).

paramètres: saisons	Proportion G.E positives.		Proportion porteurs gamécytes		Total
	n	%	n	%	
avril99-juin99	271	47,6	5	0,9	569
juil.99-oct.99	325	66,1	38	7,7	492
nov.99-fév.00	138	64,5	6	2,8	214
mars00-juin00	85	63,0	13	9,6	135
juil.00-oct.00	141	84,9	15	9,0	166
nov.00-déc.00	89	67,9	15	25,0	131
Total	1049	61,5	92	5,4	1707

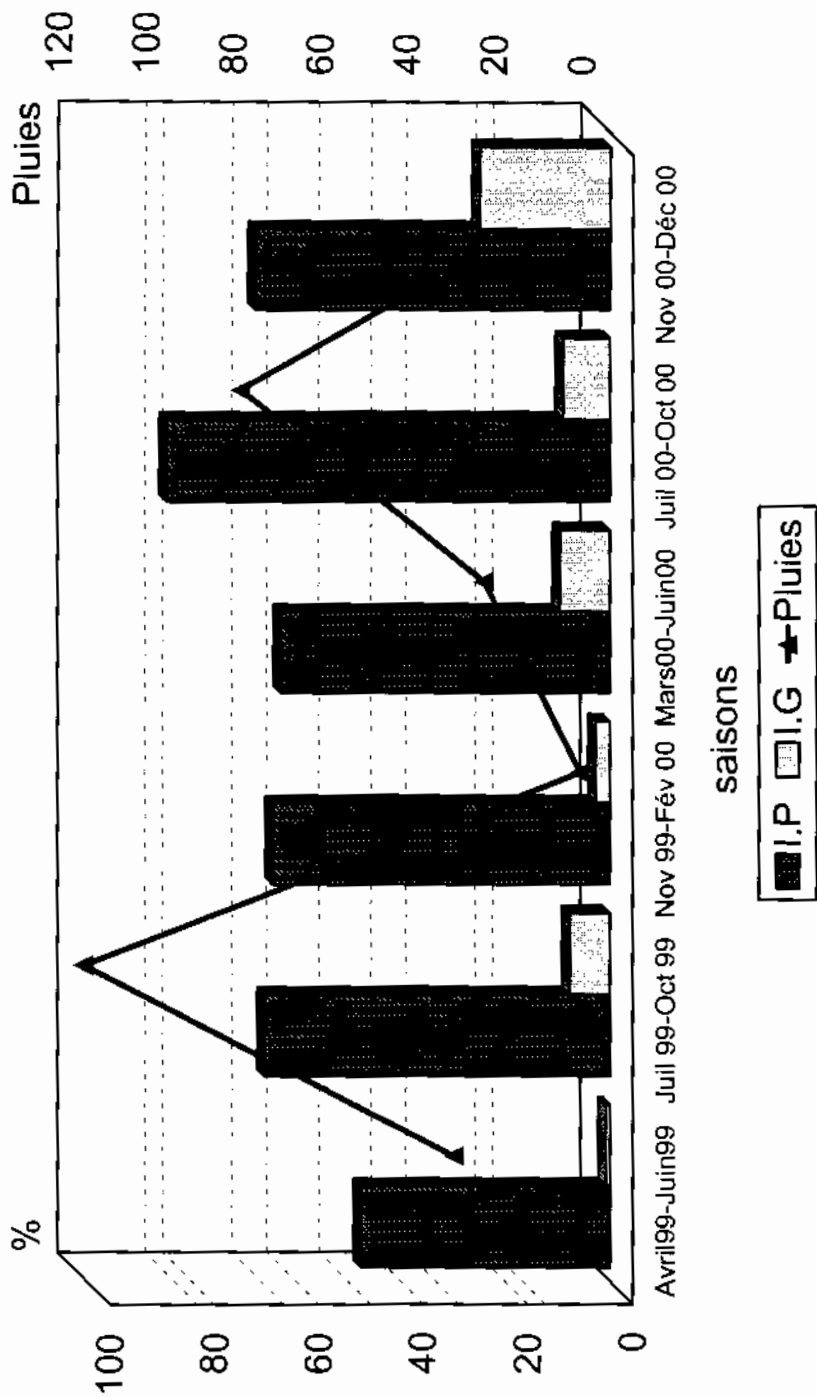
G.E = gouttes épaisses

La proportion moyenne de G.E positives à Donéguebougou est de 61,5% chez les enfants de 0–15 ans et 5,4% de la cohorte sont porteurs de gamécytes. Cette proportion subissait des fluctuations saisonnières hautement significatives ($X^2 = 92,26$; ddl = 5; $p < 0,0001$).

Le taux de porteur de gamécytes connaît également des variations par saison ($X^2 = 49,29$; ddl = 5; $p = 0,0001$).

L'incidence du paludisme est plus élevée en saison de pluies 2000 (84,9%) et plus faible en saison sèche chaude 1999 (47,6 %). En outre, la proportion de porteurs de gamécytes varie de 0,9 à 25,0 % durant la période d'étude.

Figure 22: Incidence du paludisme chez les enfants de 0 - 15 ans à Donéguébougou d'avril 1999 en décembre 2000).



4.3 Etude de la diversité allotypique de *P. falciparum*

4.3.1 Sensibilité de la technique PCR pour l'identification de *P. falciparum* chez les hôtes

Tableau 14 : Comparaison de la sensibilité PCR pour l'identification de *P. falciparum* chez les hôtes.

saisons	Hôtes			Moustique		
	T.T.	Pos.	%	T.T.	Pos.	%
avril99-juin99	569	222	39,02	93	4	4,30
juil.99-oct.99	492	270	54,88	490	171	34,90
nov.99-fév.00	214	122	57,01	291	246	84,54
mars00-juin00	135	82	60,74	42	4	9,52
juil.00-oct.00	166	139	83,73	474	388	81,86
nov.00-déc.00	131	86	65,65	96	84	87,50
Total	1707	921	53,95	1486	897	60,36

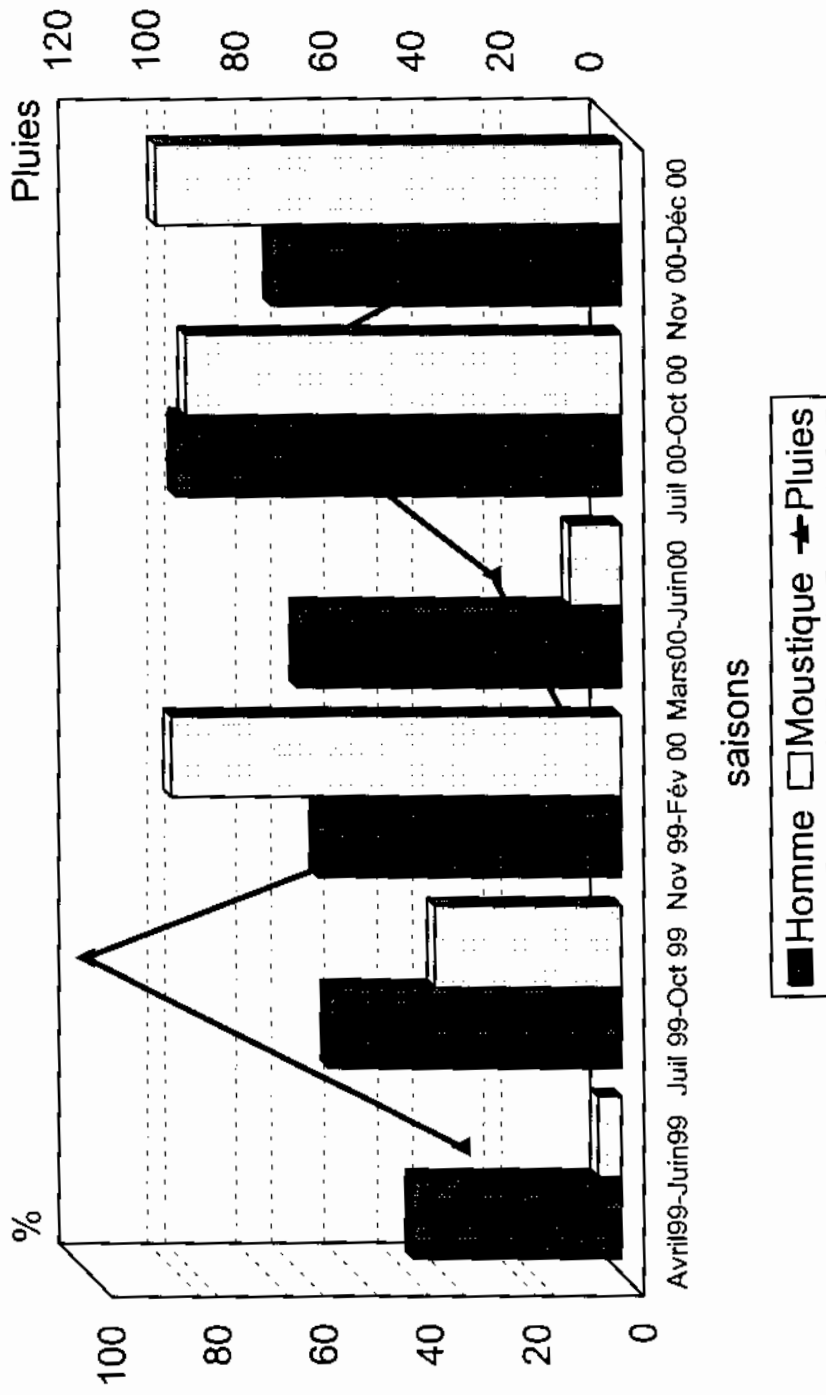
T.T. = Total testé; Pos. = nombre positifs

La prévalence du paludisme en moyenne chez les populations de vecteurs (60,36% ; n = 1486) était supérieure (X^2 corrigé de Yates = 13,05; p = 0,0003) à celle obtenue avec les humains (53,95% ; n = 1707).

Ces taux connaissent également des variations saisonnières hautement significatives (X^2 de Pearson = 492,48 ; ddl = 5 ; p = 0,0001) chez les vecteurs et aussi chez les humains (X^2 de Pearson = 121,06; ddl = 5; p = 0,0001).

C'était en saison sèche fraîche qu'on observait les fortes prévalences chez les moustiques (87,50% entre novembre 1999 et février 2000). Chez l'homme, elle était plus élevée en saison de pluies 2000 (83,73%).

Figure 23: Comparaison de la sensibilité PCR à l'indentification de *P. falciparum* chez les hôtes.



4.3.2 Diversité allotypique chez les espèces vectrices

Tableau 15 : Fréquence saisonnière et distribution des allèles MSP-1 (K1, Mad20 et Ro33) de *P. falciparum* chez les vecteurs à Donéguébougou (avril 1999 – décembre 2000)..

espèces saisons	K1		Mad20		Ro33		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
avril99-juin99	2	28,6	2	28,6	3	42,9	7	100
juil.99-oct.99	103	33,3	81	26,2	125	40,5	309	100
nov.99-fév.00	173	36,5	123	25,9	178	37,6	474	100
mars00-juin00	3	33,3	2	22,2	4	44,4	9	100
juil.00-oct.00	299	34,8	227	26,4	334	38,8	860	100
nov.00-déc.00	65	34,9	67	36,0	54	29,0	186	100
Total	645	35,0	502	27,2	698	37,8	1845	100

La fréquence moyenne pour K1 est 35,0%; 27,2% pour Mad20 et 37,8% pour Ro33. Il n'existe pas de différences significatives entre les proportions moyennes des allotypes K1 et Ro33 ($X^2 = 3,04$; ddl = 1; $p = 0,081$). La fréquence de l'allèle K1 était hautement plus élevée que celle de Mad20 ($X^2 = 26,22$; ddl = 1; $p < 0,0001$). Les fréquences saisonnières des allèles (MSP-1) ne subissaient pas de variations statistiques significatives ($X^2 = 11,08$; ddl = 6 ; $p = 0,086$).

Figure 24 : Distribution saisonnière des fréquences et des allèles K1, Mad20 et Ro33 (MSP-1) chez les vecteurs.

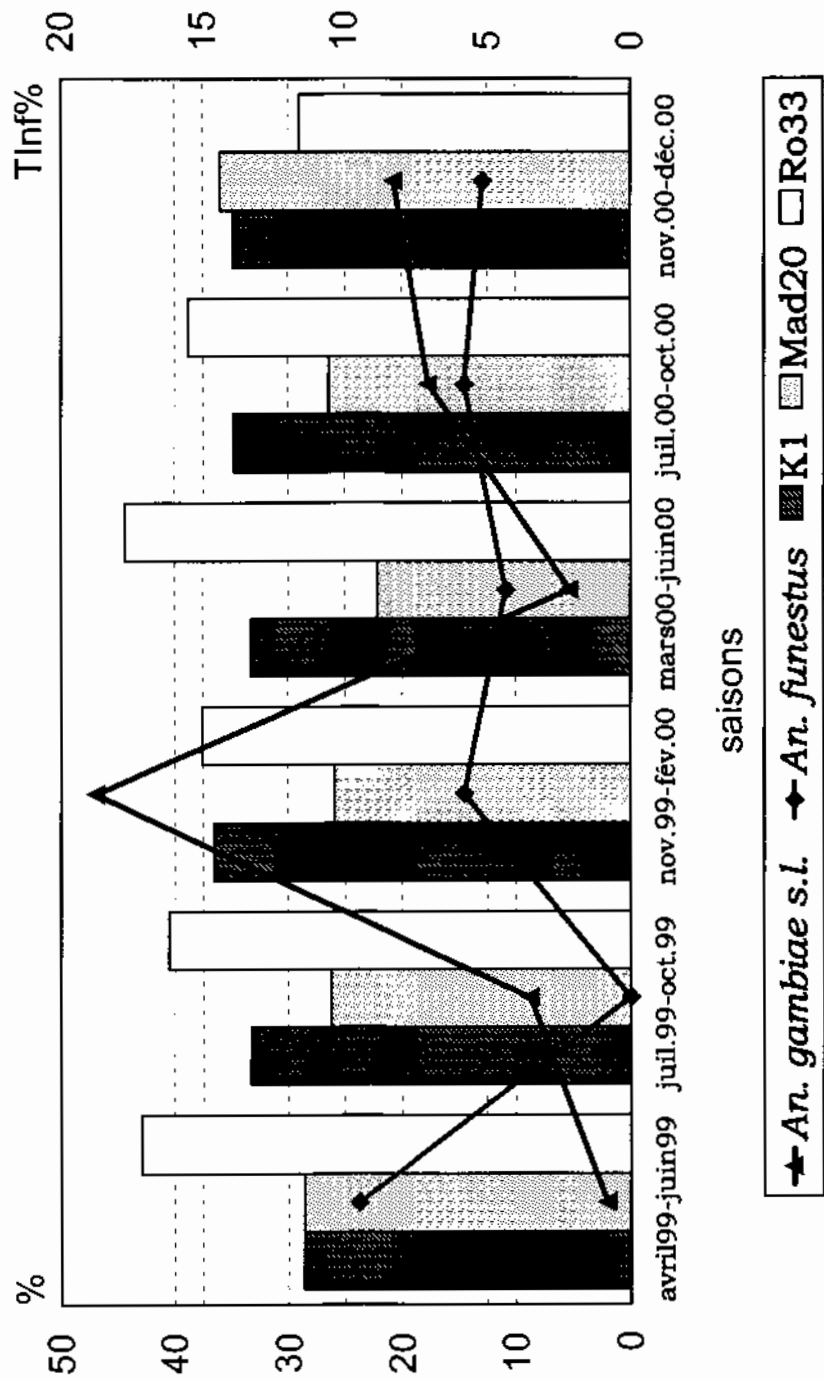


Tableau 16 : Fréquence saisonnière et distribution des allèles de la MSP-2 (Ic1 et Fc27) de *P. falciparum* chez les vecteurs à Donéguebougou (avril 1999 – décembre 2000)..

allèles saisons	Ic 1		Fc 27		Total	
	n	%	n	%	n	%
Avril99-Juin99	1	50,0	1	50,0	2	100
Juil.99-Oct.99	136	52,5	123	47,5	259	100
Nov.99-Fév.00	169	50,1	168	49,9	337	100
Mars00-Juin00	3	50,0	3	50,0	6	100
Juil.00-Oct.00	254	51,2	242	48,8	496	100
Nov.00-Déc.00	33	47,8	36	52,2	69	100
Total	596	51,0	573	49,0	1169	100

L'allèle Ic1 a une fréquence moyenne de 51,0% et celle de Fc27 est de 49,0%. Il n'a pas été constaté de différence statistique significative entre les deux fréquences moyennes ($X^2 = 0,91$; ddl = 1 ; p = 0,341).

La fréquence des allèles de la MSP-2 ne connaissait pas également de fluctuations statistiquement significatives d'une saison à une autre ($X^2 = 0,62$; ddl = 3 ; p = 0,892).

Figure 25: Distribution saisonnière des fréquences des allèles Ic1 et Fc27 (MSP-2) chez les vecteurs.

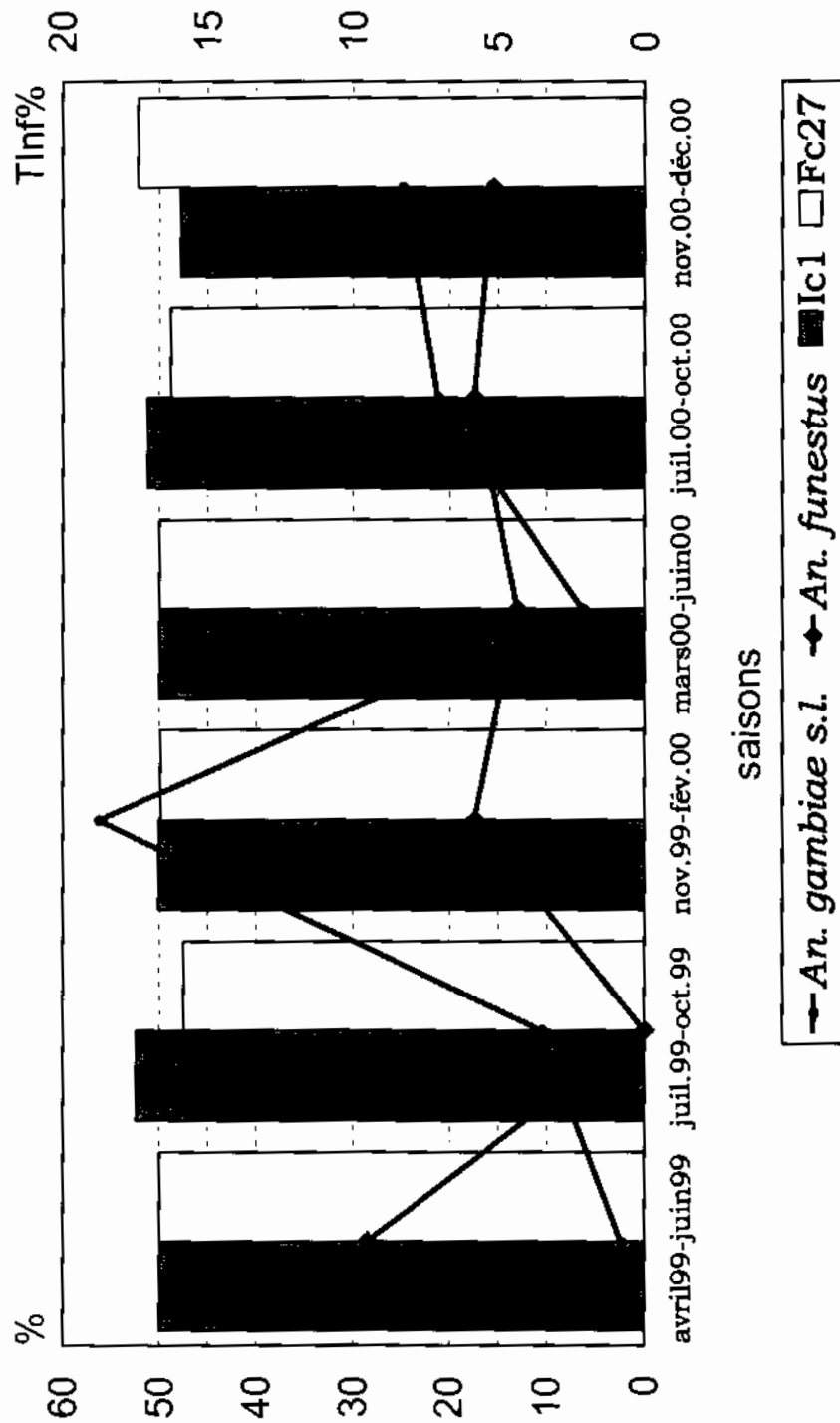


Tableau 17 : Distribution de fréquences des différents types d'allèles MSP-1 et MSP-2 chez les populations d'anophèles : *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* et *An. funestus*.

allèles	espèces	<i>An. gambiae s.s.</i>		<i>An. arabiensis</i>		<i>An. funestus</i>		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%
MSP-1	K1	42	77,8	7	13,0	5	9,9	54	100
	Mad20	32	86,5	3	8,1	2	5,4	37	100
	Ro33	86	92,5	5	5,4	2	2,2	93	100
	Hyb.1*	581	85,4	69	10,1	30	4,4	680	100
MSP-2	Ic1	160	83,3	20	10,4	12	6,3	192	100
	Fc27	148	88,6	7	4,2	12	7,2	167	100
	Hyb.2*	347	85,7	41	10,1	17	4,2	405	100

Hyb.1* = Hybrides MSP-1 (K1/Mad20 ; K1/Ro33 ; K1/Mad20/Ro33 ; Mad20/Ro33) ; Hyb.2* = Hybride MSP-2 (Ic1/Fc27).

L'allèle K1 avait une proportion: de 77,8 % pour *An. gambiae s.s.*, de 13,0 % pour *An. arabiensis* et de 9,9 % pour *An. funestus*. La fréquence observée pour l'allèle Mad20 était de 86,5% chez l'*An. gambiae s.s.*, 8,1% chez l'*An. arabiensis* et 5,4% chez l'*An. funestus*.

Quant à Ro33, il avait une fréquence de: 92,5% pour *An. gambiae s.s.*, à 5,4% pour *An. arabiensis* et 2,2% pour *An. funestus*. Les fréquences des allotypes MSP-1 (K1, Mad20, Ro33, Hybrides) ne variaient pas significativement entre *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* ($X^2 = 3,20$; ddl = 2 ; p = 0,2021). Il n'y avait également pas de différence statistique significative entre celles d'*An. funestus* et d'*An. arabiensis* (Test exact de Fisher, p = 0,305).

Les proportions des allèles de la MSP-2 (Ic1, Fc27, Hybrides), n'ont pas connu de variation statistiquement significative entre *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* ($X^2 = 5,58$; ddl = 2; p = 0,062).

Tableau 18 : Nombre et distribution de fréquences des allèles MSP-1 et MSP-2 chez les formes chromosomiques d'*An. gambiae* s.s à Donéguébougou (avril 1999 – décembre 2000).

allèles	F. chr.	Bamako		Savane		Mopti		Autres*		Total
		n	%	n	%	n	%	n	%	n
MSP-1	K1	7	19,44	15	41,7	13	36,11	1	2,78	36
	Mad20	4	16,00	9	36,00	7	28,00	5	20,00	25
	Ro33	17	23,29	35	47,9	19	26,03	2	2,74	73
	Hyb.1*	108	21,51	217	43,2	164	32,67	13	2,59	502
MSP-2	Ic1	27	21,95	54	43,90	36	29,27	6	4,88	123
	Fc27	28	21,71	55	42,64	39	30,23	7	5,43	129
	Hyb.2*	64	21,84	128	43,69	94	32,08	7	2,39	293

Autres* = Hybrides: Mopti/Savane; Bamako/Savane ou Mopti/Bamako (rare);
F. chr. = formes chromosomiques.

Les fréquences des allèles MSP-1 étaient significativement plus élevées chez la forme Savane que chez la forme Bamako (X^2 corrigé de Yates = 10,56; $p = 0,0012$). On n'observait pas de différence statistiquement significative entre les formes Mopti et Savane ($X^2 = 1,41$; ddl = 3; $p = 0,70$).

Pour les allèles MSP-2, il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les formes chromosomiques rencontrées ($X^2 = 3,17$; ddl = 6; $p = 0,787$).

4.3.3 Etudes de la diversité chez l'Homme

Tableau 19 : Distribution de fréquence des allèles MSP-1 chez les enfants de 0 à 15 ans à Donéguebougou (avril 1999 – décembre 2000).

allèles saisons	K1		Mad20		Ro33		Total
	n	%	n	%	n	%	
avril99-juin99	171	37,1	122	26,5	168	36,4	461
juil.99-oct.99	173	38,3	88	19,5	191	42,3	452
nov.99-fév.00	110	38,1	80	27,7	99	34,3	289
mars00-juin00	46	32,2	42	29,4	55	38,5	143
juil.00-oct.00	100	37,3	87	32,5	81	30,2	268
nov.00-déc.00	72	39,1	53	28,8	59	32,1	184
Total	672	37,4	472	26,3	653	36,3	1797

L'analyse de ce tableau, montre que l'allotype K1 était le plus fréquent (37,4%), suivi de Ro33 (36,3%). Il n'a pas été constaté de différence significative entre les proportions de K1 et de Ro33. L'allèle Mad20 avait la plus faible fréquence avec 26,3% ($X^2 = 41,46$; ddl = 1 ; $p < 0,0001$).

Les fréquences des allèles Mad20 et Ro33 subissaient des variations saisonnières significatives (Mad20 : $X^2 = 17,73$; ddl = 5 ; $p = 0,0033$ et Ro33 : $X^2 = 13,45$; ddl = 5 ; $p = 0,0195$). On constate que le taux de Mad20 a atteint 32,5 % pendant la saison de pluies 2000 et que celui de Ro33 atteignait 42,3% en saison humide 1999.

Fig. 26: Distribution de fréquence des allèles MSP-1 chez les enfants de 0 à 15 ans.

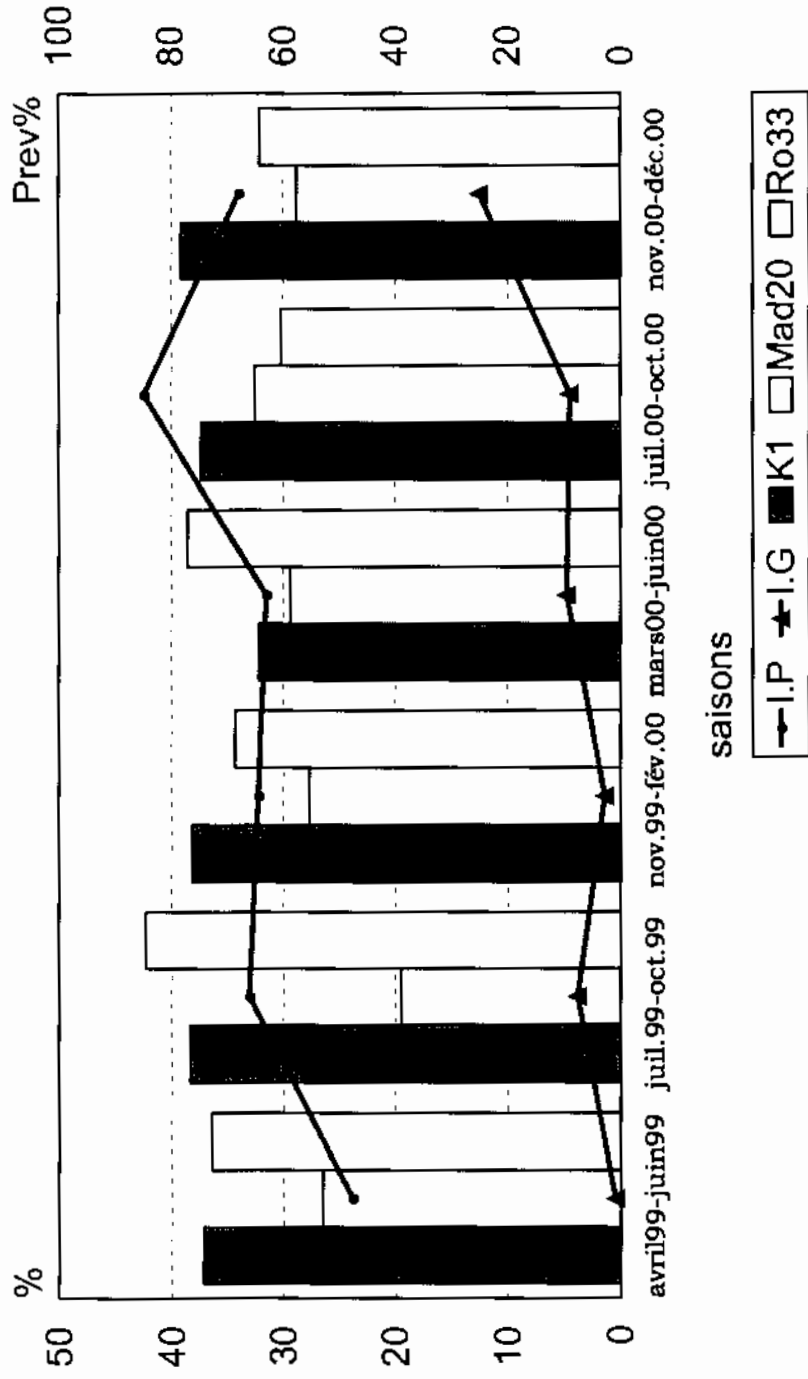


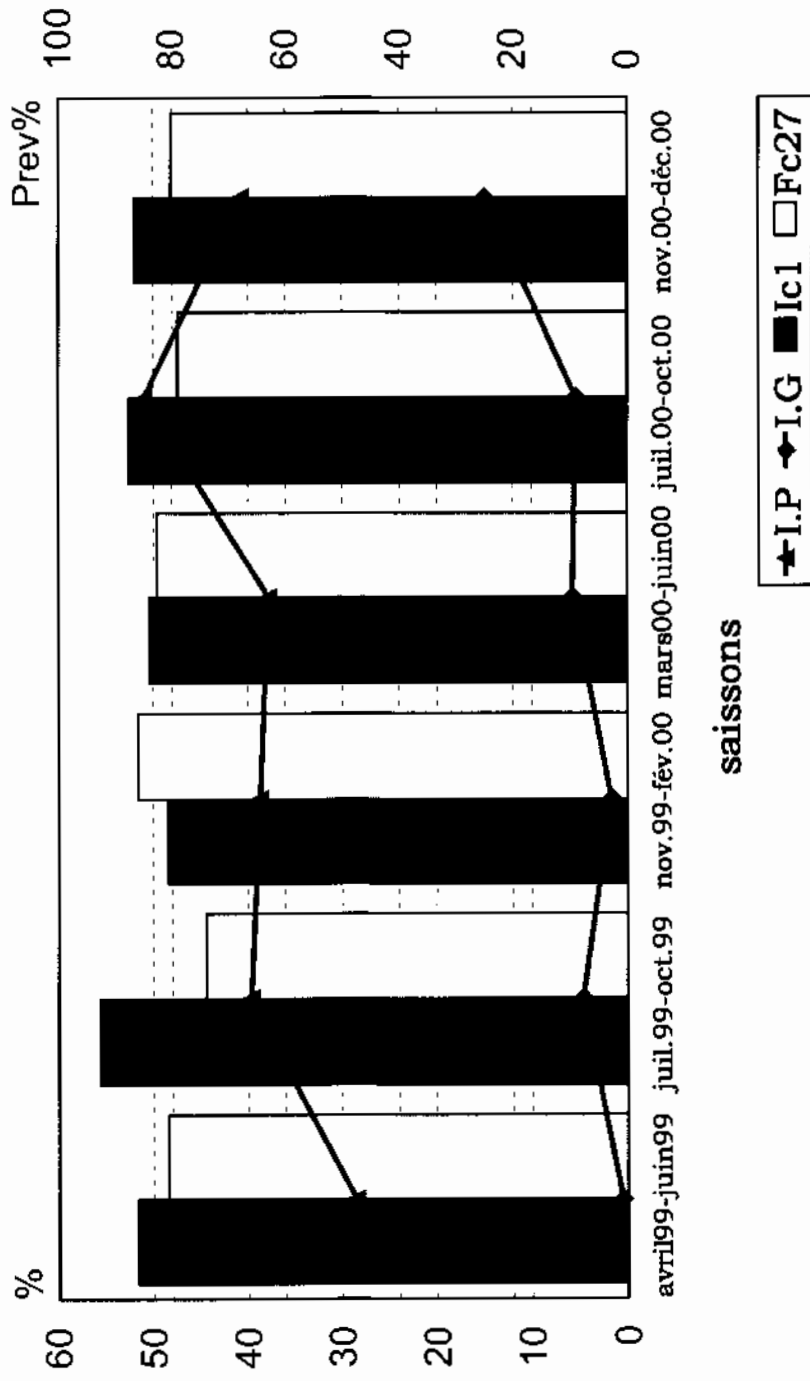
Tableau 20 : Répartition de fréquence des allèles de la MSP-2 chez les enfants de 0 à 15 ans à Donéguébougou (avril 1999 – décembre 2000).

saisons	allèles		Fc27		Total
	Ic1 n	%	n	%	
avril99-juin99	175	51,6	164	48,4	339
juil.99-oct.99	207	55,6	165	44,4	372
nov.99-fév.00	90	48,4	96	51,6	186
mars00-juin00	66	50,4	65	49,6	131
juil.00-oct.00	113	52,6	102	47,4	215
nov.00-déc.00	83	51,9	77	48,1	160
Total	734	52,3	669	47,7	1403

La proportion moyenne de l'allotype Ic1 : 52,3%, étaient statistiquement supérieure à celle de Fc27 : 47,7% ($X^2 = 6,02$; ddl = 1 ; $p = 0,0141$).

Il n'y a pas eu de variation saisonnière statistiquement significative entre ces deux allèles ($X^2 = 3,08$; ddl = 5 ; $p = 0,687$).

Fig. 27: Répartition saisonnière de fréquences des allèles de la MSP-2 chez les enfants de 0 à 15 ans.



4.4 Etudes de la complexité des infections

4.4.1 Répartition des mono-infections et des infections mixtes par la MSP-1

Tableau 21: Distribution saisonnière des mono-infections et des infections mixtes par MSP-1 chez les populations humaine et anophélienne à Donéguébougou (avril 1999 – décembre 2000).

saisons	Hôtes		Homme			Moustique				
	Mono		Mixtes		Total	Mono		Mixtes		Total
	n	%	n	%		n	%	n	%	
avril99-juin99	43	21,4	158	78,6	201	0	0,0	3	100	3
juil.99-oct.99	101	40,4	149	59,6	250	52	31,9	111	68,1	163
nov.99-fév.00	11	9,2	109	90,8	120	61	26,0	174	74,0	235
mars00-juin00	25	33,8	49	66,2	74	0	0,0	4	100	4
juil.00-oct.00	37	28,0	95	72,0	132	58	15,1	325	84,9	383
nov.00-déc.00	10	12,2	72	87,8	82	16	19,8	65	80,2	81
Total	227	26,4	632	73,6	859	187	21,5	682	78,5	869

Mono = mono-infetions ; Mixtes = infections mixtes.

Les fréquences moyennes des infections mixtes ont été: de 73,6% et de 26,4 % pour les mono-infections chez l'homme. On a observé une différence hautement significative entre ces deux proportions ($X^2 = 381,90$; ddl = 1; $p < 0,0001$). Chez le moustique, le même constat a été fait: 78,5 % d'infections mixtes et 21,5 % d'infections mono spécifiques ($X^2 = 569,92$; ddl = 1; $p < 0,0001$).

Ce tableau montre que les infections mixtes MSP-1 chez l'homme et chez le moustique diffèrent significativement d'une saison à une autre à Donéguébougou ($X^2 = 332,80$; ddl = 5; $p < 0,0001$). Les proportions variaient de 59,6 à 90,8 % chez l'homme et de 68,1 à 100 % chez le vecteur.

Quant aux fréquences saisonnières des mono-infections, elles étaient nettement plus élevées chez le moustique: 78,5% que chez l'homme : 73,6% ($X^2 = 121,71$; ddl = 5; $p < 0,0001$) à Donéguébougou.

Fig. 28 : Distribution saisonnière des mono-infections de la MSP-1 chez les hôtes

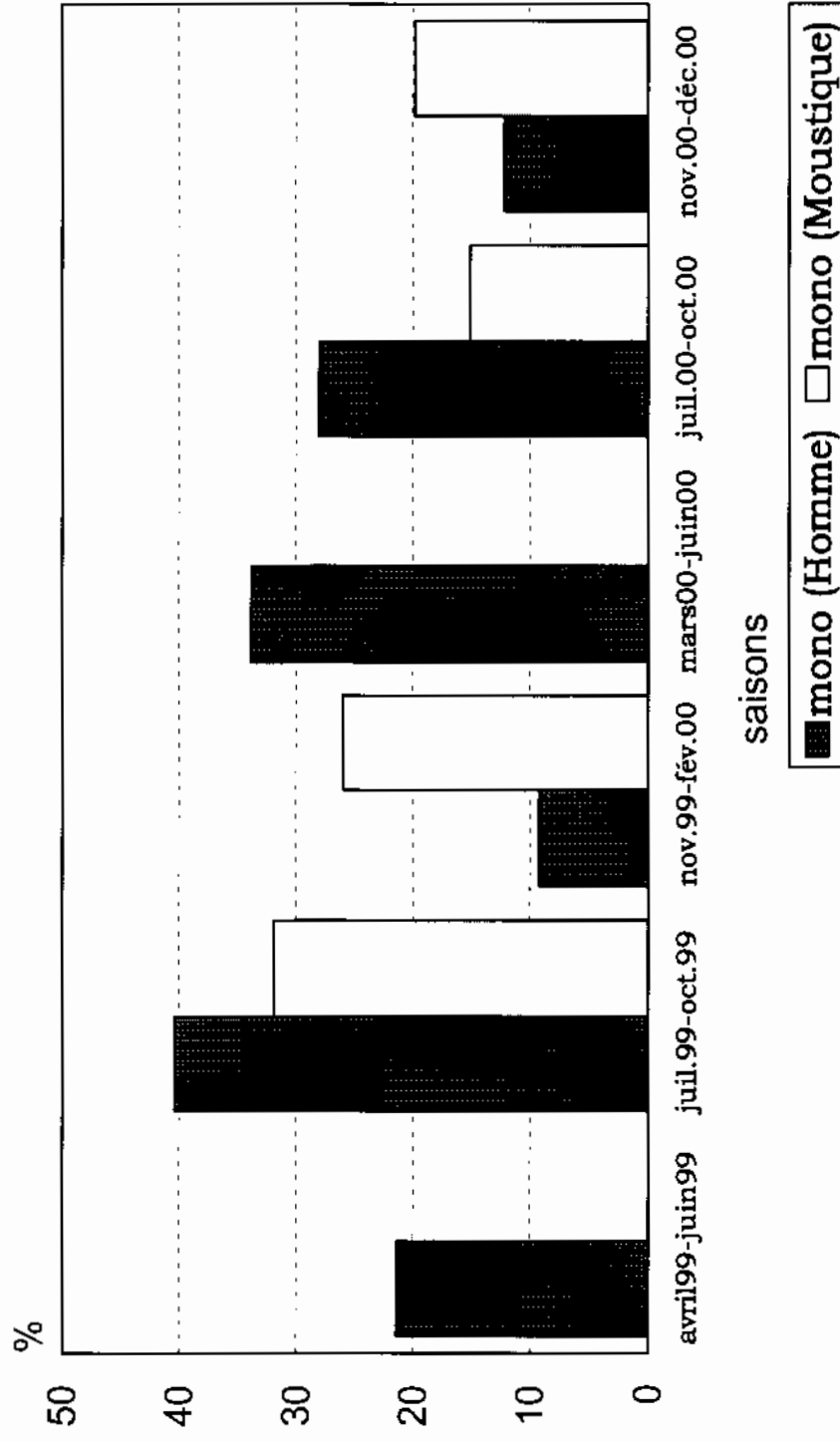
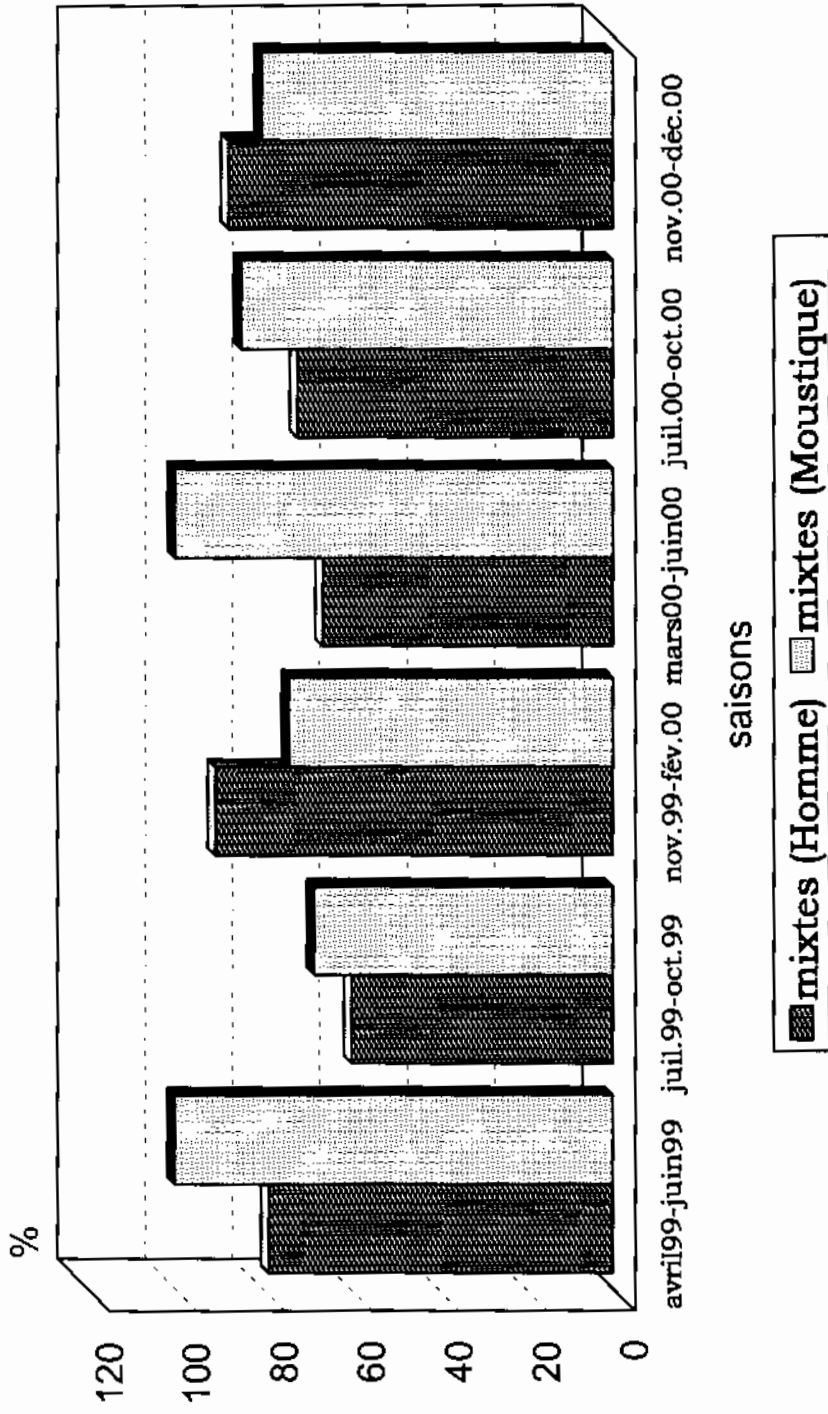


Fig. 28 : Distribution saisonnière des mono-infections de la MSP-1 chez les hôtes



4.4.2 Répartition des mono-infections et des infections mixtes par la MSP-2

Tableau 22 : Distribution saisonnière des mono-infections et des infections mixtes par la MSP-2 chez les populations humaine et anophélienne.

Hôtes saisons	Homme					Moustique				
	Mono		Mixtes		Total	Mono		Mixtes		Total
	n	%	n	%		n	%	n	%	
avril99-juin99	47	25,0	141	75,0	188	2	100	0	0,0	2
juil.99-oct.99	90	37,8	148	62,2	238	50	31,8	107	68,2	157
nov.99-fév.00	28	25,2	83	74,8	111	115	50,9	11	49,1	226
mars00-juin00	15	20,3	59	79,7	74	2	50,0	2	50,0	4
juil.00-oct.00	40	30,3	92	69,7	132	154	47,4	171	52,6	325
nov.00-déc.00	9	10,6	76	89,4	85	39	72,2	15	27,8	54
Total	229	27,7	599	72,3	828	362	47,1	406	52,9	768

Mono = mono-infections; Mixtes= infections mixtes.

Les fréquences moyennes des mono-infections et des infections mixtes ont été respectivement de 27,7 % et de 72,3 % chez l'homme. Une différence statistique significative a été observée entre ces proportions ($X^2 = 330,68$; ddl = 1; $p < 0,0001$) chez l'homme et également chez le moustique ($X^2 = 5,04$; dll = 1; $p = 0,0247$). Il a été observé 37,8% de mono-infections chez l'homme contre 31,8% chez le vecteur pendant l'hivernage 1999. De même, 68,2% d'infections mixtes s'observaient chez le moustique contre 62,2% chez l'homme durant la même période.

Les fréquences des infections mono-spécifiques et mixtes MSP-2 connaissent des variations saisonnières nettement significatives chez les deux hôtes: Homme ($X^2 = 180,58$; dll = 5; $p < 0,0001$); moustique ($X^2 = 252,20$; dll = 5; $p = 0,0001$).

Fig. 29: Distribution saisonnière des mono-infections de la MSP-2 chez les hôtes.

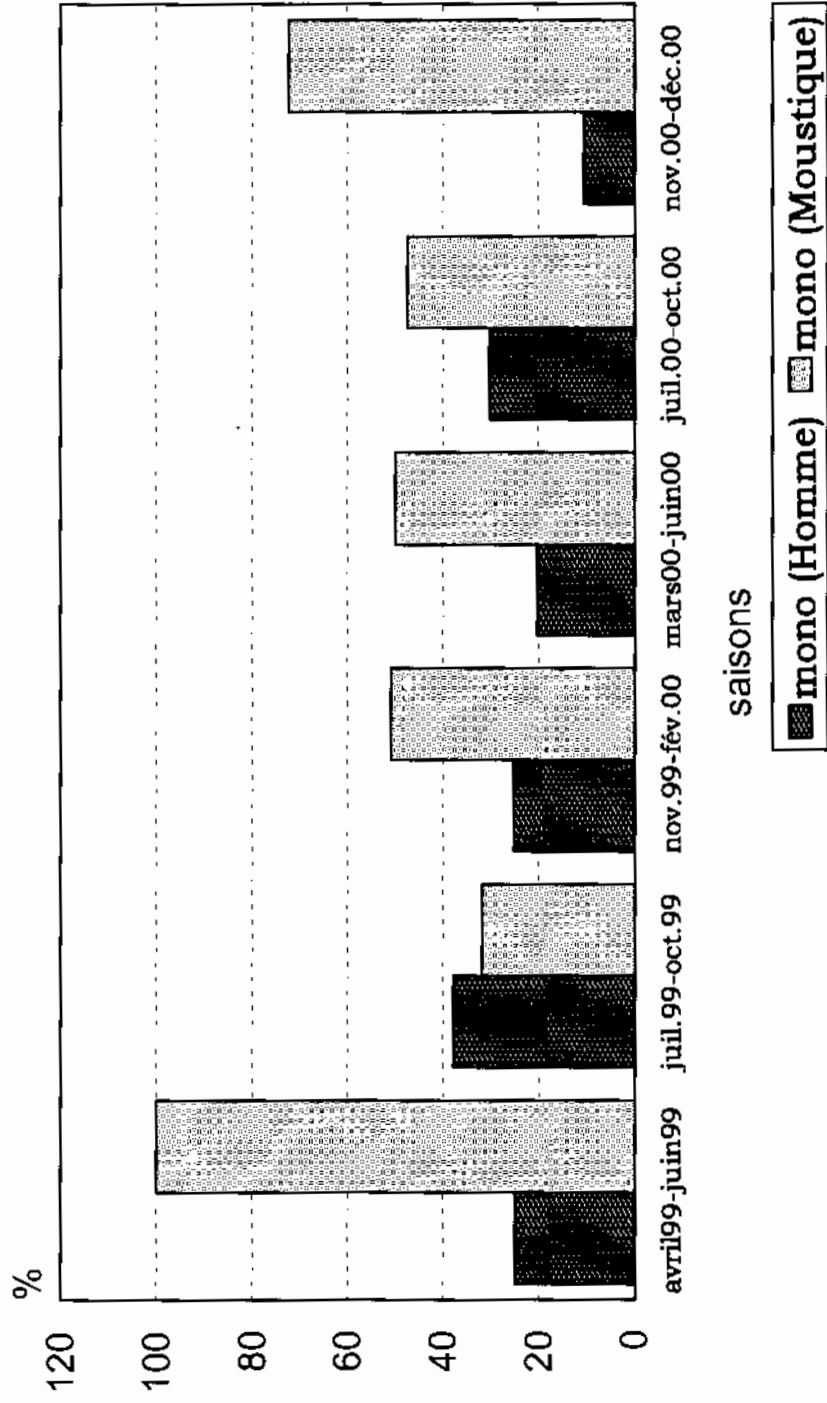


Fig. 29: Distribution saisonnière des infections mixtes de la MSP-2 chez les hôtes.

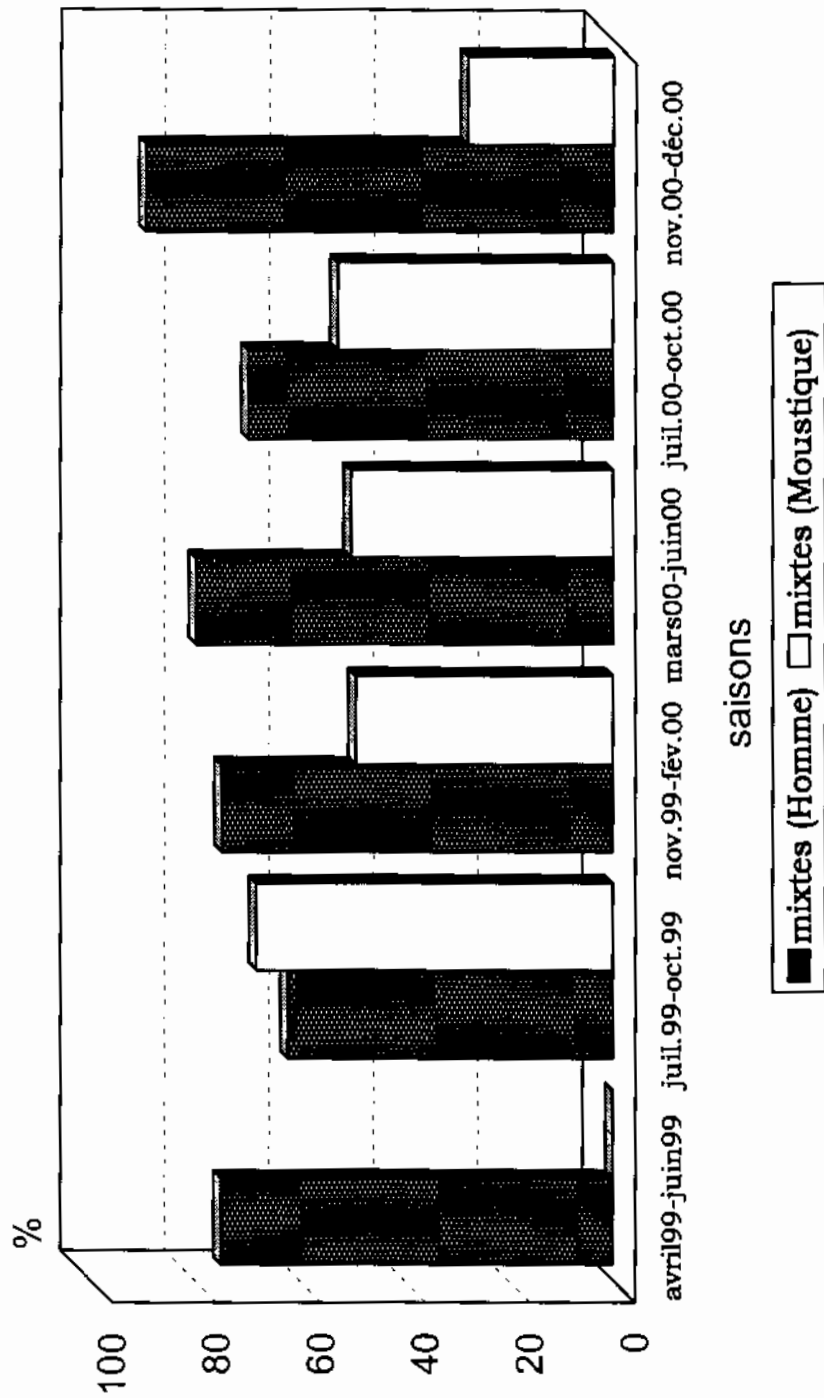


Tableau 23: Distribution du nombre moyen de clones (n.m.cl.) de parasites observés chez le moustique.

loci saisons	MSP1			MSP2		
	min.	nb.	n.m.cl	min.	nb.	n.m.cl
avril99-juin99	5	3	2,3	4	2	1,0
juil.99-oct.99	5	163	2,0	4	157	1,9
nov.99-fév.00	5	235	2,2	4	226	1,7
mars00-juin00	5	4	2,8	4	4	1,8
juil.00-oct.00	5	383	2,3	4	326	1,8
nov.00-déc.00	5	81	2,4	4	51	1,3
Total	5	869	2,2	4	766	1,8

min. = minimum de fragments observés ;

nb. = nombre d'échantillons;

n.m.cl = nombre moyen de clones de parasites.

Le nombre moyen de clones de parasite observé avec la MSP-1 (2,2 clones) était statistiquement comparable à celui de la MSP-2 (1,8 clones) chez le moustique à Donéguébougou durant la période d'étude ($F = 0,28$; $p = 0,607$).

Tableau 24 : Distribution saisonnière du nombre moyen de clones (**n.m.cl.**) de parasites observés chez les humains.

loci saisons	MSP1NA			MSP2NA		
	min.	nb.	n.m.cl	min.	nb	n.m.cl
avril99-juin99	3	201	2,3	3	172	1,7
juil.99-oct.99	3	250	1,8	3	227	1,5
nov.99-fév.00	3	120	2,4	3	111	1,7
mars00-juin00	3	74	1,9	3	74	1,8
juil.00-oct.00	3	132	2,0	3	132	1,6
nov.00-déc.00	3	82	2,2	3	85	1,9
Total	3	859	2,1	3	801	1,7

min. = minimum de fragments observés ;
 nb. = nombre d'échantillons ;
 n.m.cl = nombre minimum de clones.

Il n'existait pas de différence statistique significative chez l'homme entre le nombre moyen de clones de parasite observé avec la MSP-1 (2,1 clones) qu'avec la MSP-2 (1,7 clones) à Donéguébougou durant la période d'étude.

Ce nombre ne subissait pas de variation saisonnière significative d'une part pour la MSP-1 (ANOVA $F = 45,92$; $p = 0,98$) et d'autre part pour la MSP-2 (ANOVA $F = 34,42$; $p = 0,99$).

Discussions

5. DISCUSSION

5.1 Etudes entomologiques de la transmission

5.1.2 Etude des populations vectrices

La faune anophélienne vectrice du paludisme à Donéguébougou était composée d'*An. gambiae s.l.* (94,76%) et *An. funestus* (5,24%).

La fréquence d'*An. gambiae s.l.* augmentait avec les premières pluies (juin - août) et diminuait progressivement en fin de saison pluvieuse (octobre - novembre) tandis que la fréquence d'*An. funestus* évoluait en sens inverse de celle d'*An. gambiae s.l.* La fréquence la plus élevée d'*An. funestus* était observée en début de saison sèche fraîche (novembre - décembre).

De nombreux auteurs (Touré 1979) avaient constaté que la fréquence d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus* variaient mensuellement en sens inverse avec la pluviométrie. Les fréquences les plus élevées d'*An. gambiae s.l.* s'observaient au début et au milieu de l'hivernage tandis que celles d'*An. funestus* se situaient en fin de saison de pluies et au début de la saison sèche fraîche.

Ces variations de fréquences pour *An. gambiae s.l.* seraient essentiellement liées à une diversité des gîtes larvaires, à un développement rapide d'une part et à la disparition progressive des larves d'autre part, due au tarissement des gîtes permanents. Alors que pour *An. funestus*, il s'agit d'un développement de longue durée suivi de la stabilisation des gîtes et d'une production plus élevée (Touré 1979).

Parmi les membres du complexe *An. gambiae*: *An. gambiae s.s.* représentait 80,69% et prévalait principalement en saison pluvieuse tandis qu'*An. arabiensis* représentait 19,31% avec des fréquences plus élevées en périodes de saison sèche fraîche et chaude 2000 (respectivement 33,54 % et 40,48 %).

Cette variation de distribution saisonnière des deux espèces s'expliquerait par des différences d'adaptation aux conditions du milieu (température, humidité).

Ces observations concordent avec celles d'autres auteurs (Touré 1983, 1984; Coulibaly 1985; Traoré 1989). Selon ces auteurs *An. gambiae s.s.* s'observe

essentiellement dans les conditions d'humidité relativement élevée tandis qu'*An. arabiensis* est moins hygrophile.

Des échantillons de moustiques capturés dans les habitations humaines, *An. gambiae* s.s. étaient composés en moyenne de 18,78% de la forme Bamako, 37,56% de Savane, 41,26% de Mopti. Pendant que la forme Mopti était observée durant toute l'année. Celles de Bamako et Savane étaient trouvées principalement pendant la saison des pluies, et pas au-delà de décembre en saison sèche.

Il existe à présent la preuve suffisante qu'*An. arabiensis* et la forme chromosomique Mopti d'*An. gambiae* s.s sont maintenus continuellement toute l'année avec une réduction due à l'effet de saison sèche ($p < 0,0001$).

Cependant sous les mêmes conditions, il n'était pas possible de capturer les formes chromosomiques Bamako et Savane de janvier en juin. Toutes les études jusque là entreprises sont pourtant en faveur d'une possible estivation au stade adulte, même si la preuve n'est pas encore établie.

En effet à partir des études de marquage lâcher et ré-capture il a été possible d'estimer la taille minimale et effective de la population qui leur permette de se maintenir d'une saison de pluies à une autre, en partant d'un système de "bottleneck" durant la saison sèche (Touré *et al.*, 1998). De ces études, il n'a pas été en évidence de façon nette le ou les formes Bamako et Savane en état d'estivation pourraient se trouver. Les mécanismes de survie par lesquels les formes chromosomiques Bamako et Savane arrivent à traverser la saison sèche peuvent varier d'une localité à une autre en relation avec les conditions environnementales (Sangaré en 1994). Cependant à Donéguebougou, comme dans d'autres localités où les méthodes de capture étaient plus variées et beaucoup plus fréquemment employées, aucune des formes Bamako et Savane n'a été retrouvée en saison sèche chaude. Ceci indique une limite dans l'efficacité des multiples méthodes de collecte jusque là employées. Il est très invraisemblable que Bamako et savane, réapparaissant immédiatement avec un comportement anthropophile et endophile normal, aient pu échapper

a une quelconque détection durant les six mois de saison sèche si elles avaient été présentes en état de situation gono-active. Ainsi plusieurs possibilités peuvent être prises en compte dans le cadre de leur soudaine réapparition dans une condition physiologique active de larve et d'adulte en début de saison de pluies.

L'origine des premiers adultes de Bamako et Savane trouvés en début de saison de pluie à Donéguébougou reste encore à déterminer. En dépit de leur brusque apparition en Juin-Juillet immédiatement après les premières augmentations de l'humidité relative, il est difficile d'accepter que ces femelles émergent d'une situation d'estivation. Ceci d'autant plus qu'à la même période, a été également récoltés des mâles et des larves de Bamako et de Savane. Les mâles d'anophèles sont généralement très fragiles par rapport aux femelles et survivent difficilement à des conditions défavorables.

Les femelles actives de Bamako et Savane dans le village de Donéguébougou depuis fin juin avant les périodes de forte humidité (août - septembre) pourraient ne pas être originaires du village et par conséquent n'être pas réactivées à partir d'une situation d'humidité élevée. Car leur apparition coïncide avec la mise en eau, de souhaitables gîtes larvaires avec comme résultats la capacité pour chacune des deux formes chromosomiques de se maintenir et se multiplier. Dans ces conditions les moyens par lesquels Bamako et Savane arrivent à atteindre le village de Donéguébougou restent à élucider. Il est possible que ces deux formes se récolonisent de façon progressive, le long des cours d'eau, comme à Moribabougou et Kalabancoro où elles sont présentes durant toute la saison sèche (Touré *et al.*, 1994).

Les taux de parité moyens d'*An. gambiae s.l* et d'*An. funestus* étaient toujours très élevés (> 75%) et ne différaient pas significativement entre eux (p > 0,05). Ceci implique les deux espèces se reproduisaient semblablement. Seuls les mois durant lesquels on observe de fortes précipitations (Août-Septembre) qu'*An. gambiae s.l.* présente un taux de parité faible en liaison avec les densités élevées de ces mois. Durant la saison sèche les taux de parité observés étaient

élevés du fait des faibles densités observées entraînant ainsi la longévité de cette espèce vectrice. Un tel schéma a déjà été décrit par Bagayoko en 1996 à Bancoumana. Les variations des facteurs climatiques (température, humidité) ainsi que des densités seraient à l'origine des variations de la longévité d'*An. gambiae s.l.* Cette espèce vectrice présentait des variations saisonnières significatives des taux de parité.

Pour *An. funestus* les taux de parité les plus faibles se situent en saison de pluies (juillet - octobre). L'insuffisance des pluies durant ces dernières années fait que la densité était faible. On observait des taux de parité toujours élevés pour l'*An. funestus* en fin de saison pluvieuse et en saison sèche fraîche (82,14% en novembre et décembre 2000). Nous avons observé que l'agressivité anophélienne subissaient des variations saisonnières hautement significatives à Donéguébougou ($p = 0,0004$).

L'agressivité était proportionnelle à la densité. Elle a atteint 150,5 P/h/m pour *An. gambiae s.l.* en septembre 1999 pendant qu'*An. funestus* présentait son pic en saison sèche fraîche (4,2 P/h/m en novembre 2000). L'augmentation de la densité d'*An. gambiae s.l.* et d'*An. funestus* pendant et après l'hivernage est une observation classique en zone de savane soudanienne (Touré, 1979; Traoré, 1989). Selon ces auteurs les densités anophéliennes les plus élevées s'observent en pleine saison de pluies et ceci serait dû au nombre élevé de gîtes larvaires à cette période.

L'étude du comportement trophique a révélé qu'*An. gambiae s.l.* et *An. funestus* sont très anthropophiles (plus de 85% des repas de sang était d'origine humaine). A Donéguébougou, les taux d'anthropophilie d'*An. gambiae s.s.* (93,5%) et étaient significativement plus élevés que celui d'*An. funestus* (76,2%; avec $p < 0,0001$). Touré en 1979; Traoré en 1989 à Banambani; et Bagayoko en 1996 à Bancoumana ont trouvé qu'*An. gambiae s.l.* et *An. funestus* étaient très anthropophiles.

Les taux d'infection d'*An. gambiae s.l.* (6,47%) et d'*An. funestus* (4,74%) étaient statistiquement comparables ($p = 0,055$). Par contre, il existait une différence significative entre le taux d'infection moyen d'*An. arabiensis* et d'*An. gambiae s.s.* ($p < 0,0001$). Le taux, le plus élevé a été trouvé chez *An. gambiae s.s.* avec 14,41%. La différence du taux d'infection entre ces deux espèces pourrait s'expliquer par leur mécanisme d'adaptation aux conditions environnementales d'une part et susceptibilité aux différents génotypes de *P. falciparum*. *An. gambiae s.l.* était rencontré durant toute l'année.

Les taux d'infection d'*An. gambiae s.s.*; d'*An. arabiensis* et d'*An. funestus* subissaient une variation saisonnière significative ($p < 0,05$). Ces variations saisonnières du taux d'infection s'expliqueraient d'une part par celles de l'indice gamétocytaire ($p < 0,0001$): les densités gamétocytiques de l'hôte vertébré sont déterminantes dans le pourcentage d'infection chez le moustique (Babiker *et al.*, 1997); de même par la charge gamétocytaire. La maturité et la nature génétique des populations de gamétocyte ainsi que les facteurs environnementaux expliqueraient en partie les variations saisonnières des charges oocystiques et des taux d'infection des espèces vectrices. D'autre part, ces différences saisonnières du taux d'infection pourraient être liées aux variations de la longévité et aux fluctuations saisonnières de densité des trois espèces vectrices. Les taux d'infection des espèces vectrices évoluaient différemment en fonction de leurs fréquences saisonnières. En saison sèche chaude 1999, *An. funestus* avait un taux d'infection moyen de 9,52% avec 21 moustiques testés contre 5,81% ($n = 172$) en saison sèche fraîche 1999 - 2000. Celui d'*An. gambiae s.s.* (48,91%; $n = 321$; en saison sèche fraîche 1999 - 2000) évoluait proportionnellement par rapport au taux d'*An. gambiae s.l.* (18,78%; $n = 937$). D'autre part, il n'a pas été constaté de différence statistiquement significative entre les taux d'infection des formes chromosomiques Bamako et Savane ($p = 0,987$). Par contre, il existait une différence nettement significative entre ceux de Bamako et de Mopti ($p < 0,0001$). Ceci pourrait s'expliquer par une déviation trophique de l'une des espèces vectrices ou des formes chromosomiques d'*An. gambiae s.s.* Ce phénomène serait probablement lié à la présence massive et constante de

troupeaux d'animaux à cette période ou à une susceptibilité génétique du *Plasmodium falciparum*.

5.1.3 Etude des taux d'inoculation entomologique

Le système vectoriel à Donéguébougou est composé de cinq entités :

An. funestes, *An. arabiensis* et les trois formes chromosomiques d'*An. gambiae* s.s. Avec un tel système vectoriel la transmission du paludisme à Donéguébougou est continue presque sur toute l'année mais avec des variations saisonnières.

La transmission due à *An. gambiae* s.s. devenait très intense: 48,91 et 61,80 piqûres infectantes par homme et par mois (P/h/m) respectivement durant les saisons de pluies (juillet – Octobre). Le taux d'inoculation entomologique d'*An. funestus* était par contre très faible en hivernage 0,284 P/h/m pendant la même période. Cette espèce transmettait le paludisme principalement en saison sèche fraîche (Novembre-Février). Les variations de l'intensité de la transmission du paludisme à Donéguébougou étaient directement tributaires des taux d'infection qui a leur tour sont sous la dépendance de différents facteurs comme le réservoir de gamétocytes, la longévité des espèces vectrices, leur anthropophilie et les facteurs du milieu (température, humidité); ainsi que la pluviométrie qui module les fluctuations de population des espèces vectrices. En effet, les modifications qui interviennent dans la structure de la population vectrice conditionneraient les variations de l'intensité de la transmission du paludisme (Petrarca et Beier 1992).

Les composants du système vectoriel *An. gambiae* s.s.; *An. arabiensis* et *An. funestus* contribuent tous à la transmission du paludisme à Donéguébougou suivant un système de relais. Ce système de relais indiquait des différences de longévité ou d'adaptation des trois espèces vectrices aux conditions environnementales.

Ceci explique le maintien de la transmission vectorielle sur une longue période de l'année à Donéguébougou; avec une nette efficacité du système vectoriel en fin de saison de forte transmission.

L'efficacité du système vectoriel en fin de saison de forte transmission a déjà été observée par plusieurs auteurs: Touré (1979); Sow (1994); Bagayoko (1996).

5.2 Etudes parasitologiques de la transmission

Le taux élevé de l'indice plasmodique chez les enfants de 0-9 ans en zone de savane soudanienne a été déjà observé par plusieurs auteurs Dolo (1989); Doumbo (1992).

L'incidence paludique était élevée (> 60%) chez les enfants de 0-15 ans durant toute l'année. Le taux moyen de porteurs de gamétocytes était égal à 5,4% chez les enfants de 0-15 ans. Ce taux persistait pendant la longue saison sèche où le niveau de transmission n'est pas détectable (malade asymptomatique). Ceci témoigne l'intensité et le mode particulier de la transmission constaté à Donégouéougou en hivernage et en saison sèche fraîche.

Les taux de prévalence des gamétocytes et des formes asexuées étaient significativement plus élevés en saison sèche à Bancoumana qu'en saison des pluies (Ouattara, 1998). Cette observation serait en rapport avec l'inféctivité des gamétocytes pour les moustiques.

5.3 Etude de la diversité des allotypes de *P.falciparum*

5.3.1 La sensibilité de la PCR pour l'identification de *P. falciparum* chez les hôtes

La PCR a été significativement plus sensible pour l'identification de *P. falciparum* chez les moustiques que chez l'homme ($p = 0,0003$). Le taux de succès de la PCR sur un total de 1486 échantillons testés positifs à L'ELISA était de 60,36%. Chez l'homme, la prévalence était de 53,95% sur 1707 papiers confettis testés. Ce taux était très faible en saison sèche chaude 39,02% ($n = 569$) par rapport à la saison des pluies 83,73% ($n=166$).

La différence dans la sensibilité chez les deux hôtes pourrait être due à plusieurs facteurs parmi lesquels:

- les méthodes utilisées pour l'extraction du matériel génétique du parasite. La méthode de précipitation à l'alcool a été utilisée pour l'ADN plasmodial pour le vecteur et celle du Chelex pour le sang humain sur les confettis.
- la conservation du matériel peut avoir un effet négatif sur les résultats de la PCR compte tenu du fait de la dégradation de l'ADN par les nucléases. Cependant dans nos conditions de travail les échantillons (broyats de moustique) sont conservés dans du fixateur de Carnoy à -70°C . Les seules actions en faveur d'une détérioration quelconque de l'ADN se situent au niveau : des procédures ELISA qui souvent nécessitent plus de trois heures de manipulation à la température ambiante avant d'obtenir les premiers résultats et à la solution de dilution de l'ADN. Pour minimiser l'impact d'une longue manipulation les solutions d'échantillons positifs étaient immédiatement ramener au Réfrigérateur de type Revco® à -70°C .
- la présence de mutations ponctuelles au niveau des sites d'appariement des amorces est une éventualité qui n'est pas à négliger. Ces mutations pouvant introduire de nouvelles souches responsables d'une transmission intense augmentant la fréquence des recombinaisons des différents génotypes. Babiker *et al.*, en 1997 ont montré qu'il existe une corrélation entre l'intensité de la transmission paludéenne, la charge parasitaire et le taux de reproduction sexuée.

5.3.2 Variations de la fréquence des allotypes

L'amplification génique à l'aide de nos amorces a permis d'identifier les trois allotypes de la MSP-1 (K1, Mad20, Ro33) et les deux de la MSP-2 (Ic1, Fc27) décrits à cette date à Donéguébougou. Les fréquences saisonnières de chaque allotype de la MSP-1 (K1, Mad20, Ro33) et de la MSP-2 (Ic1, Fc27) n'ont pas connu de variation statistique significative chez les espèces vectrices. *An. gambiae* s.s. possédait la plus forte fréquence moyenne avec la MSP-1 et la MSP-2 respectivement 85,4% et 85,7%. Il a été constaté que la fréquence de Ro33 (92,5%) était significativement supérieure à celle de K1 (77,8%) chez *An. gambiae* s.s. ($p = 0,011$). Alors que, K1 avait un taux de 13,0% contre

5,4 % de Ro33 chez *An. arabiensis*. Les fréquences moyennes des allotypes K1 (35,0%) et Mad20 (27,2%) différaient significativement chez le moustique dans l'ensemble ($p < 0,0001$). Aucune différence statistique significative n'a été observée entre les fréquences des autres allèles de la MSP-1 et de la MSP-2. A cet effet, *An. gambiae* s.s. serait beaucoup plus susceptible à l'allèle Ro33 qu'à K1.

Les variants de la MSP-1 étaient significativement plus fréquents chez la forme chromosomique Savane qu'avec celle de Bamako ($p = 0,0012$). Cette différence pourrait être liée aux facteurs géo-climatiques affectant l'interaction hôte - parasite (Rodriguez *et al.*, 2000). Il n'y avait pas de variation significative de proportion des allèles entre les autres formes chromosomiques.

Chez l'homme, les allotypes K1 et Ro33 ont présenté des taux significativement plus élevés ($p < 0,05$) que celui de Mad20 pendant la période d'étude. Le type K1 a été le plus dominant chez l'homme alors que Ro33 prédominait chez le vecteur. Ces proportions variaient suivant les saisons pour Ro33 et Mad20 ($p < 0,05$). Sangaré, en 2000 a trouvé dans la même localité que l'allotype K1 était prédominante chez l'homme. Les études similaires effectuées chez les enfants de 0 à 9 ans à Bancoumana (Koïta , 2000; Ouatara, 1998) ont eu une prédominance de Ro33 chez l'homme en saison de pluies. Par ailleurs, le même résultat a été trouvé par NToumi *et al.*, en 1995 sur 65 patients à Dakar (Sénégal),

La fréquence élevée de Ic1: 52,3% contre 47,7% de Fc27 ($p = 0,0141$) pourrait être associée à la réponse immunitaire de l'hôte humain. Les variants de la MSP-2 n'ont pas connu d'évolution saisonnière statistique significative ($p = 0,687$) chez l'Homme. Face à cette diversité génétique du parasite, une importante question est de savoir que les allotypes présentent des variations saisonnières en fonction du mode de transmission de la maladie. A Donéguébougou le niveau et la durée de la transmission affectent probablement le polymorphisme génétique de *P. falciparum*. L'impact de la transmission sur la structure et la dynamique de la population de *P. falciparum* a été trouvé en Tanzanie et au Soudan (Babiker *et al.*, 1997, 2000). Le degré élevé du polymorphisme allélique constaté est le plus souvent du à des facteurs

liés à l'hôte humain et aux moustiques vecteurs. En effet chez l'hôte humain les différents clones produisent de façon périodique des taux différents de gamétocytes infectants. Ce phénomène varie d'un individu à un autre suivant l'état immunitaire et la nature de la souche parasitaire (Babiker *et al.*, 1997). En outre, le polymorphisme observé en saison sèche pourrait s'expliquer par la continuité de la transmission en fin de la saison de pluies.

L'analyse des résultats de l'amplification des deux loci (MSP-1 et la MSP-2) indique que le nombre moyen de clones de parasites par moustique est de 3,4 clones. Ce nombre ne subissait pas de variations saisonnières significatives ($p > 0,05$). Le nombre moyen clones par moustique avec la MSP-1 était de 2,2. Il correspondait à 1,8 clones avec la MSP-2. Celui observés chez les humains aux deux loci combinés est égal à 3,2 clones/homme. Ce nombre ne variait significativement d'une saison à une autre ($p > 0,05$). Chez l'homme, il était de 2,1 clones avec la MSP-1 et 1,7 clones avec la MSP-2. Ce résultat était comparable à celui trouvé par Babiker *et al.*, 2000.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

6- CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Conclusion

Cette étude à Donéguébougou a montré que la transmission du paludisme est assurée par un système vectoriel très complexe composé d'*An. funestus*; *An. arabiensis* et les trois formes chromosomiques d'*An. gambiae* s.s. (Bamako, Mopti, Savane). Tous ces composants contribuent à la transmission mais agissent par un système de relais. *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* transmettaient principalement pendant la saison de pluie (juin - octobre) tandis qu'*An. funestus* assuraient la relève en fin de saison de pluies.

La diversité du système du vecteur a pour conséquence l'intensification et la prolongation de la transmission du paludisme observée sur une grande partie de l'année dans ce village. Avec ce système, la population humaine (0-15 ans) demeure infectée presque tout le long de l'année par des génotypes de parasite différents. L'indice plasmodique élevé chez les enfants (2 - 9 ans) supérieur à 50%, classe Donéguébougou en zone d'hyper endémicité palustre à transmission stable.

Les fréquences des différents allotypes de la MSP-1 et 2 ont connu des variations saisonnières significatives. *An. arabiensis* transmettait plus la variante Fc27.

A Donéguébougou, il a été observé au cours de l'étude une différence saisonnière dans la distribution des infections mono spécifiques et mixtes des allotypes de la MSP-1 et de la MSP-2 chez les deux hôtes. Nous avons constaté que la fréquence des infections mixtes est plus élevée en saison sèche fraîche chez l'Homme et en saison sèche chaude chez le moustique. Le taux d'infections mixtes a été significativement plus élevé que celui d'infections mono spécifiques aussi bien avec MSP-1 qu'avec la MSP-2. Vue la prédominance d'*An. gambiae* s.s. durant une bonne partie de l'année et le caractère préliminaire des résultats il serait difficile d'établir une relation entre la diversité génétique et la transmission par relais observée à Donéguébougou.

Recommandations

Il sera nécessaire d'étudier d'avantage la diversité génétique de *P. falciparum* et la susceptibilité d'une espèce vectrice pour les différents allotypes de parasite rencontrés. En plus, cette étude pourrait aider le PNLN à adopter un meilleur schéma thérapeutique contre le paludisme.

BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Arnot, D. E. Roper, C. Bayoumi, R. A.** (1993) Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular & Biochemical Parasitology* 61: 15-24.
2. **Babiker H.A., Ranfort-Cartwright L., Sultan A., Satti G., and Walliker D.,** (1994) Genetic evidence that R1 chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* is caused by recrudescence of resistant parasites. *Transactions of the Royal society of Tropical Medecine and Hygiene* 88.
3. **Babiker H.A. and Walliker D.** (1997) Current views on the population structure of *P. falciparum*: Implications for control. *Parasitology today* 13: (7) 262-267.
4. **Babiker H.A., Abdel-Muhsin A.A., Hamad A., Mackinnon M.J., Hill W.G. and Walliker D.** (2000) Population dynamics of *Plasmodium falciparum* in an unstable malaria area of eastern Sudan. *Parasitology*, **120**, 105-111.
5. **Bagayoko M.M.** (1996) Etude entomologique de la transmission du paludisme à Bancoumana (Arrondissement de Sibi, cercle de Kati). *Mémoire de DEA, ISFRA, Bamako-Mali*.
6. **Beier J.C., Perkins P.V., Wirtz R.A., Koros J., Diggs D., Gargan T.P., II & Koech D.K.** (1988). Bloodmeal identification by direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: *Culicidae*) in Kenya. *J. Med. Entomology*, 25: 9-16.

7. **Beier J.C., Peter V. Perkins, Joseph K Koros, Fred K. Onyango, Thomas P. Gargan, Robert A. Wirtz, Davy K. Koech, and Clifford R. Roberts,** (1990). Malaria sporozoites detection by dissection and ELISA to assess infectivity of afrotropical *Anopheles* (Diptera: *Culicidae*). *J. Med. Entomology*, 27: (3) 377-384.

8. **Bonnefoy S., Attal G., Langley G., Tekala F., Mrecerau Puijalon O.** (1994) Molecular charcterisation of the Heat Shock Protein 90 gene of the human malaria parasite *P. falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*. **67**: 157-170.

9. **Borre M.B., Dziegiel, M., Hogh, B., Peterson, E., Rieneck, K., Riley, E., Meis, J.F., Aikawa, M., Nakaura, K., Harada, M., Wind, A., Jakobsen, P.H., Cowlam J. and Jepsen, S., Axelsen, N.H. and Vuust, J.** (1991). Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of vertebrate life cycle *Molecular & Biochemical Parasitology* 49: 119-132.

10. **Cappai R., Schravendijk M.R., Anders F.R., Peterson M.G., Thomas LM, Cowman A.F., Kemp D.J.** (1989) Expression of the RESA gene in *P. falciparum* isolate FCR3 is prevented by a subtelomeric deletion. *Molecular Cell and Biology*. August: 3584-3587.

11. **Coluzzi et Petrarca,** (1973) Aspirator with paper cup for collecting mosquitoes and others insects. *News* **33**: 249-250.

12. **Coluzzi, M.** (1967) Cytogenetic observations on species A and B of the *Anopheles gambiae* species complex *Parasitology* **9**: 73-88.

- 13. Coluzzi, M.** (1982) Spacial distribution of chromosomal inversion and speciation in anopheline mosquitoes. In *Mecanismos of specialisation* (C. Barigozzi, ed.), pp. 143-149. *A.R. Liss Inc., New York.*
- 14. Conway, D.J., Greenwood, B.M. & McBride** (1991). The epidemiology of multiple clones *Plasmodium falciparum* in Gambian patients. *Parasitology* **103**: 7-16.
- 15. Conway, D.J., Greenwood, B.M. & McBride** (1991). Population genetics of *Plasmodium falciparum* within a malaria hyper-endemic area. *Parasitology* **103**: 7-16.
- 17. Conway, D.J., Greenwood, B.M. & McBride, JS** (1992). Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* polymorphic antigens in a malaria-endemic population. *Infection and immunity* **60**: 1122-1127.
- 18. Corcoran LM, Thompson JK, Walliker D., Kemp DJ.** (1988) Homologous recombination within subtelomeric repeats sequences genarates chromosomes size polymorphisms in *P. falciparun*. *Cell*. 807-813.
- 19. Coulibaly, A.,** (1985) Etude des variations saisonnières des fréquences des membres du complexe *Anopheles gambiae s.l.* à Banambani (Cercle de Kati) et à Selinkeniyi (Cercle de Yanfolila). *Thèse de Doctorat 3^{ème} Cycle ISFRA Bamako-Mali.*
- 20. Dame JB, Williams JL, McCutchan T.H., Weler JL, Wirtz R.A., Hochmeyer W.T., Maloy W.L., Haynes J.D., Shneider I., Robert D., Sanders G.S., Reddy E.P., Diggs C. I., Miller L.H.,** (1984). Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the surface of the human malaria parasite *P. falciparum*. *Science* **225**: 593-599.

- 21. Day, K.P., Koella, J.C., Nee, S., Gupta, S. & Read, A.** (1992) Population genetics and dynamics of *Plasmodium falciparum*: an ecological view. *Parasitology* **104**: S35-S52.
- 22. Detinova,** (1963). Determination of the physiological female *Anopheles* from the changes of the tracheal system of the ovaries. *Med. Parazit (most)* 14-45.
- 23. Dombo, O., Ouattara N.I., Koïta O., Maharaux A., Touré Y.T., Traoré S.F., et Quilici M.,** (1989). Approche éco-géographique du paludisme en milieu urbain: ville de Bamako au Mali. *Ecol. Hum.* **8** (3) 3-15.
- 24. Doumbo, O.,** (1992) Epidémiologie du paludisme au Mali. Etude de la chloroquino-résistance. Essai de stratégie de contrôle basée sur l'utilisation des rideaux imprégnés de perméthrine associée au traitement systématique des accès fébriles. *Thèse de Doctorat Sciences Biologiques (Parasitologie Pathologie, Ecologie), Montpellier.*
- 25. Eckert V., Sanchez L., Cochrane A., Enea V.** (1992) *P. cynomolgy* the *hsp 70* gene. *Experimental Parasitology.* **75**: 323-328.
- 26. FAVIA G., Della Tore A., Bagayoko M., Lanfrancotti A., Sagnon N., Touré Y.T. and M. Coluzzi** (1997). Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Biology* **6** (4) 377-383
- 27. Fruh K., Doumbo O., Muller H.M., McBride J., Crisanti A., Touré Y.T., Bujard H.** (1991) Human antibody response to the major merozoite surface antigen of *P.falciparum* in strain and short-lived *Infect. Immun*: 1319-1324.

- 28. Janse, C.J.** (1993) Chromosome size polymorphic and rearrangements in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today* **9** (1): 19-22.
- 29. Kaplan J.C., Delpech M.** (1989) Biologie moléculaire et médecine, de la biologie à la clinique. *Flammarion Médecine-sciences*, Paris.
- 30. Kemp, D., Cowman, A. and Walliker, D.** (1990) Genetic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Advances in Parasitology* **29**:75-149.
- 31. Kemp, D.J., Thompson J.K., Walliker, D. and Corcoran, L.M.** (1987). Molecular karyotype of *Plasmodium falciparum*: Conserved linkage groups and expandable Histidine-Rich Protein genes. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA.* **84**: 7672-7676.
- 32. Kimura, E., Mattel, D., Di Santi, S.M. & Scherf, A.** (1990). Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: High prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived from malaria patients. *Gene* **91**: 57-62.
- 33. Koita O.**, (1988) Contribution à l'étude épidémiologique du paludisme le long de la route trans-saharienne au Mali *Thèse de Doctorat Pharmacie ENMP*.
- 34. Koita O.**, (2000) Molecular studies of clonality, transmission and severe malaria. *Philosophy Doctor, Tulane University*.
-
- 35. Lilla G.C., Mario, H.R., Jose, C.N., Cuauhtemoc, V., Kevin C.K., and Juan, E.H.** (1999) Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK 247 in Southern Mexico. *American Society for Microbiology. Infection and Immunity*, p 410-412.

36. **Mac-Donald G.**, (1950) .The analysis of rates in diseases in which super infection occurs. *Trop. Dis Bull.***47**, 10:907-915.
37. **Miller, L.H., Robert, T., Shahabuddin, M. & McCutchan, T.F.** (1993) Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Molecular and Biochemical Parasitology* **59**:1-14.
38. **Ntoumi, F., contamin, H., Rogier, C., Bonnefoy, S., Trape, J.F& Mercereau-Pujalon, O.** (1995). Age dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am. J. of Trop. Med. and Hyg.* **52**, 81-88.
39. **OMS.** (1997) Evaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques pour le traitement de *P. falciparum* non-complicé dans les régions de transmission élevée.
40. **Ouattara A.** (1998) Diversité allotypique et morbidité palustre à *Plasmodium falciparum* à Bancoumana. *Thèse de Doctorat Pharmacie FMPOS. Bamako, Mali.*
41. **Paul, R.E.L., Packer M.L., Walmsley, M., Lagog, M., Ranford-Cartwright, L.C., Paru, R. & Day, K.** (1995). Mating patterns in malaria parasite populations of Papua New Guinea. *Science*, **269**, 1709-1711
42. **Payne D.** (1988) Use and limitation of light microscopy for diagnosing malaria at the health care level. *Bull. WHO*, **66**: 621-626.
43. **Petrarca V, Beler JC** (1992). Intraspecific chromosomal polymorphism in the *Anopheles gambiae* complex as a factor affecting malaria Transmission in the Kisumu area. *Am J Trop Med Hyg* **46**:229-237.

- 44. Petrarca V., Sakai R., Touré Y.,** (1994) .The *Anopheles gambiae* complex: Population dynamics and Evidence for aestivation in Mali.
Oral communication at the 43 RD Annual meeting of the Am. Society of Trop. Med. and Hyg. Cincinnati, Ohio, November 13-17.
- 45. PNLP.** (1997) Document de Politique de lutte Antipaludique Révisée. Unité de coordination Nationale de la lutte antipaludique. Programme National de lutte antipaludique (PNLP).
- 46. Poudiougou B.,** (1995) Epidémiologie du paludisme grave au Mali: intérêt clinique des anticorps anti-TRAP (Thrombospondin Related Adhesive Protein).
Thèse de Médecine FMPOS, Bamako, N° 28.
- 47. Prensier, G. And Slomianny, C.** (1986) the karyotype of *Plasmodium falciparum* determined by ultra structural serial sectioning and 3D reconstruction. *The Journal of Parasitology* **72**: 11-18.
- 48. Ranford- Cartwright, L.; Balf, P.; Carter R & Walliker, D** (1993) Frequency of cross fertilization in the human malaria parasite *P.falciparum*
Parasitology 107; 11-18.
- 49. Robson KJH., Hall JRS., Jennings MW., Harris TJR., Marsh K., Newbold CI., Tate VE., Weatherall DJ.** (1988) A highly conserved amino acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature* **335**: 79-82.
- 50. Rodriguez M.H., Lilia GC, Juan, E.H., Jose, A.N., Cuauhtemoc, V., Kevin, C.K. and Robert A. W.** (2000) Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62** (1), pp. 122-127.

- 51. Sangaré D.** (1996) Etude de la transmission du Paludisme à Donéguébougou (Arrondissement central de Kati). *Mémoire de la D.E.A., ISFRA, Bamako-Mali*
- 52. Sangaré D.** (2000) Dynamique des populations d'*Anopheles gambiae s.l.*, d'*Anopheles funestus* et de *Plasmodium falciparum* en relation avec le système de transmission par "relais" à Donéguébougou (Arrondissement central de Kati). *Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle, ISFRA, Bamako-Mali.*
- 53. Sanger F.** (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science*. **214**: 1205-1209.
- 54. Scott J., Brogdon W. and Collins F.H.,** (1993) Diagnostic polymerase Chain Reaction (PCR) for distinguishing five members of the *Anopheles gambiae* Complexe. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*49 (3)
- 55. Shepard M., Kemp DJ., Anders RF., Lew AM.** (1989) High level sequence homology between a *P. chaudi* heat shock protein and it *P. falciparum* equivalent. *Molecular Biochemical Parasitology*. **33**: 101-103.
- 56. Smythe JA., Coppel RL., Martin RK., Oduola AM., Kemp DJ., Anders RF.** (1991) Structure diversity in the *P. falciparum* merozoite surface antigen 2. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, **88**: 1751-1755.
- 57. Southern EM.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. M. Biol.*; **98**: 503-517.
- 58. Tamura, K. and Aotosoka, T.** (1998) Rapid isolation method of animal mitochondria DNA by the alkaline lysis procedure. *Biochem. Genet.* **26**, 815-819.

- 59. Tanabe, K., Mackay, M Goman, and Scaife, J.G.** (1987). Allelic dimorphic in a surface antigen gene of *P. falciparum* *J.Mol.Biol.***195**: 273-287.
- 60. Touré Y.T., Dolo G., Petrarca V., Traoré, S.F., Bouaré M., Dao. A., Carnahan J., and Taylor C.E.,** (1998). Mark-release-recapture experiments with *Anopheles gambiae* s.l in Banambani village, Mali, to determine population size and structure. *Medical and Veterinary Entomology* **12**. 74-83
- 61. Touré Y.T** (1979) Bio-écologie des anopheles (Diptera: culicidae) dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali (village de Banambani). Incidence sur la transmission du paludisme et de la filariose de Bancroft. *Thèse de 3^{eme} cycle; Centre Pédagogique Supérieur.*
- 62. Touré Y.T.** (1989) The current state of studies of malaria vectors and the vectorial campaign in West Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83** 39-41.
- 63. Touré Y.T., Petrarca V. & Coluzzi M.** (1984) Bioécologie et importance vectorielle des taxa du complexe *An. gambiae* au Mali. *IV^{eme} congrès sur la protection de la santé humaine et des cultures en milieu tropical*
- 64. Touré Y.T., Petrarca, V., Traoré, S.F., Coulibaly, A., Maiga, H.M., Sankaré, O., Sow, M., DiDeco, M.A & M. Coluzzi.** (1994) Ecological genetics studies in the chromosomal form Mopti of *An. gambiae* s.s. In Mali, West Africa. *Genetica*, **94** 213-223.
- 65. Traoré S.F.** (1989) Etude du comportement et de la contribution à la transmission du paludisme des membres du complexe *An. gambiae* à Banambani (Cercle de Kati). *Thèse de Doctorat 3^{eme} cycle, ISFRA, Bamako-Mali.*
- 66. Triglia, T., Wellems, T.E. & Kemp, D.J.** (1992). Toward a high-resolution map of the *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology to day* **8**: 225-229.

- 67. Walker-Jonah, A., Dolan, SA. Gwardz, R.W., Panton, L.J. and Wellems, T.E** (1992). An RFLP map of the *Plasmodium falciparum* genome, recombination rate and favored linkage groups in a genetic cross. *Molecular and Biochemical Parasitology* **51**:313-320.
- 68. Walliker, D. Carter, R., & Morgan, S.** (1973) Genetic recombination in *P.berghei*. *Parasitology* **66**:309-320.
- 69. Walliker, D. Quakyi, I.A., Wellems, T.E., McCutchan, T.F., Szarfman, A., London, W.T., Corcoran, L.M., Burkot, T.R. and Carter, R.** (1987). Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* **236** 1661-1666.
- 70. Wellems, T.E., Walker- Jonah, A. & Panton, L.J.** (1992) Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proceeding of the National Academy Sciences USA*. **88**: 3382-3386.
- 71. Yang YF., Tan-Arya, Sharma YD., Kilejiian A.** (1987) The primary structure of a *P. falciparum* polypeptide related to heat shock proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**: 61-68.

Nom : Bagayoko
Prénom : Brahima

Titre : Etude de la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* chez l'homme et chez les vecteurs en relation avec le mode de transmission du paludisme à Donéguébougou.

Année de soutenance :
Ville de soutenance : Bamako
Pays d'origine : Mali
Lieu de dépôt : Bibliothèque de la FMPOS
Secteur d'intérêt : Entomologie et parasitologie médicales

Résumé

Des études dynamiques ont été effectuées entre avril 1999 et décembre 2000 pour évaluer la relation entre la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* basée sur les allèles de la MSP et le mode de transmission par relais du paludisme à Donéguébougou. C'est un village situé à 35 kilomètres Nord-Est de Bamako dans la zone de savane.

Ces études entomologiques et parasitologiques ont été longitudinales avec des passages transversaux mensuels de 12 jours. Les tests de laboratoire ont été faits comme: les gouttes épaisses colorées au Giemsa pour l'étude parasitologique; la détection de l'antigène CSP et l'identification de l'origine des repas de sang de moustique par ELISA; l'identification par la PCR des membres du complexe *An. gambiae* et le génotypage de la MSP de *P. falciparum*; la détermination cytogénétique des formes chromosomiques d'*An. gambiae* s.s (Mopti, Bamako et Savane).

Les études entomologiques indiquent qu'avec 19.222 moustiques collectés, les proportions étaient respectivement 94,76% et 5,24% pour *An. gambiae* s.l. et *An. funestus*. Le complexe *An. gambiae* était composé de 80,69% (n = 5.660) d'*An. gambiae* s.s. et 19,31% d'*An. arabiensis*. Les fréquences des trois formes chromosomiques d'*An. gambiae* s.s. étaient réparties respectivement 41,26%; 37,56%; 18,78 et 2,40% pour les formes Mopti, Savane, Bamako et les hybrides.

Les taux d'infection, les plus élevés of *An. gambiae s.l.* and *An. funestus* étaient respectivement observés en fin de saison de pluies (7,03%) et en début de saison sèche fraîche (16,94%). Le taux d'inoculation entomologique (TIE) cumulatif dans le village était de 190,40 piqûres infectantes par homme et par mois (P/h/m) durant la période d'étude.

Le taux d'infection chez la population humaine diminuait de la saison humide (84,9%) à la saison sèche fraîche (67,9%) avec $P < 0,0001$. Des variations saisonnières significatives sont observées avec ce taux ($P < 0,0001$). L'indice gamétocytaire subit les mêmes variations ($P < 0,0001$).

Il n'y avait de différences saisonnières significatives dans la distribution des fréquences alléliques (MSP-1 et MSP-2) chez la population humaine et chez les vecteurs ($P > 0,05$). Le niveau, le plus élevé des infections mixtes des génotypes de *P. falciparum* chez l'homme est observé en saison sèche fraîche (90,8%); chez les populations de moustique, le plus élevé arrivait en saison sèche chaude (100%) à Donéguébougou. Des variations saisonnières significatives étaient observées avec le nombre de clones de parasites chez les vecteurs (2,1 clones/moustique pour la MSP-1 et 1,7 clones/moustique pour la MSP-2) tandis qu'aucune différence significative n'existait chez la population humaine (3,2 clones/homme pour les deux loci).

Last name: Bagayoko

First name: Brahima

Title: A Study of genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in human hosts and vectors mosquitoes in relationship between the malaria transmission patterns in Donéguébougou.

Date:

City: Bamako

Country: Mali

Depository: Te Library of the Faculty of Medicine, Pharmacy and Odonto-Stomatology

Area of interest: Medical Entomology and Parasitology

Abstract

Dynamic studies have been carried out from April 1999 to December 2000, to assess the relationship between the genetic diversity of the *P. falciparum* parasite based on MSP alleles and the pattern of transmission of relay of malaria in Donéguébougou. It is a village located at 35 kilometers northeast of Bamako in the savanna area.

These entomological and parasitological studies of 12 days duration have been conducted monthly for the whole year. Laboratory assays were done as follows: Giemsa-Stained thick blood smears for parasitologic study; the detection of CSP antigen and of origin of the blood meals of mosquito by ELISA; PCR identification of members of the complex *An. gambiae* and *P. falciparum* MSP genotyping; cytogenetic determination of chromosomal forms of *An. gambiae* s.s. (Mopti, Bamako and Savanna).

Entomological studies indicate that from 19,222 mosquitoes collected, 94.76% and 5.24% were respectively for *An. gambiae* s.l. and *An. funestus*. The complex *An. gambiae* were composed of 80.69% (n = 5,660) *An. gambiae* s.s. and 19.31% *An. arabiensis*. The frequencies of the three chromosomal forms of *An. gambiae* s.s. were respectively 41.26%; 37.56%; 18.78% and 2.40% for Mopti, Savanna Bamako and hybrids forms.

The highest infection rates for *An. gambiae* s.l. and *An. funestus* were observed respectively at the end of the rainy season (7,03%) and in the dry cool season

(16,94%). The cumulative Entomological Inoculation Rate (EIR) in the village was 190.40 infective bites per man over the period of study.

The infection rate in the human population decreased from the Wet season (84.9%) to the dry cool season (67.9%) with $P < 0.0001$. Significant seasonal variations are observed with plasmodic rate ($P < 0.0001$). The gametocyte rate also varied significantly ($P < 0.0001$).

There was no significant seasonal differences in the allelic frequency distributions of MSP-1 and MSP-2 in the human population and vectors. The highest level rates of mixed infections of *P. falciparum* genotypes (distinct parasite clones) in human population was observed in the dry cool season (90.8%); in the mosquito population, the highest level occurred in dry hot season (100%) in Donéguébougou. Significant seasonal variations were observed in the number of clones of parasites in the vectors (2.1 clones/mosquito for MSP-1 and 1.7 clones/mosquito for MSP-2). Where as no significant differences were seen in the human population (3.2 clones/man for the two loci).



LOCALITE: *Donéguebougou*
 DATE:

CAPTURE DANS LES HABITATIONS HUMAINES
 METHODES DE CAPTURES: perythrenoïde spray catch
 NOMBRE DE CASES PROSPECTEES: 30
 ESPECES CAPTUREES:

N°Case	Type	Propriétaire Case	Dormeurs	Jeuns	Gorgés	Sgrav	Grav	Total	m a	Co.ID	Strates
082.05	Terre										2
097.01	Terre										2
013.01	Tôle										2
079.03	Tôle										2
036.02	Tôle										2
052.01	Tôle										2
060.04	Tôle										2
004.02	Tôle										2
040.02	Tôle										2
089.01	Tôle										2
009.01 H	Paille										2
003.06	Terre										2
062.04	Terre										2
063.02	Terre										2
092.03	Terre										2
070.02	Terre										2
082.04	Terre										2
080.04	Terre										2
092.01	Terre										2
061.03	Tôle										2
082.02	Terre										2
058.01 H	Terre										2
039.01	Terre										1
019.02	Terre										1
103.01	Terre										1
087.02	Terre										1
074.04	Terre										1
051.03	Tôle										1
094.02	Paille										1
100.01	Terre										1
Total											

Densité moyenne :

Agressivité moyenne:

CAPTURE DE NUIT

LOCALITE:

ESPECE:

POSTE N°:

DATE:

NOMBRE DE CAPTUREURS APPAT:

INT.:

EXT.:

TRANCHE	INTERIEUR						EXTERIEUR					
	MOUSTIQUES CAPTURES			TOTAL FEM/ TRANCHE	AUTRES ESPECES	MOUSTIQUES CAPTURES			TOTAL FEM/ TRANCHE	AUTRES ESPECES		
	MALES	FEMELLES				MALES	FEMELLES					
HORAIRE		Jeuns	Gorg.	Gravid.			Jeuns	Gorg.	Gravid.			
18h - 20h												
20h - 22h												
22h - 00h												
00h - 02h												
02h - 04h												
04h - 06h												
TOTAL												

SERMENT DE GALIEN

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

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

D'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et 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 des actes criminels.

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

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

Amen !
