

Ministère de l'Enseignement Supérieur

REPUBLIQUE DU MALI

Et de la Recherche Scientifique

UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI

UNIVERSITE DES SCIENCES DES
TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES
DE BAMAKO



FACULTE DE MEDECINE ET
D'ODONTO-STOMATOLOGIE

N°.....

TITRE

Evaluation de la délétion de *Pfhrp2* et *Pfhrp3*
dans des échantillons Discordants à
Plasmodium falciparum par les Tests de
Diagnostic Rapide au Mali.

THESE

Présentée et soutenue publiquement le/...../2025 devant le jury
de la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie par

M. SIDIBE MANDE

Pour obtenir le grade de Docteur en médecine (Diplôme d'Etat)

JURY

Président : M. Mahamadou Soumana SISSOKO, Maître de Recherche,

Membres : M. Antoine DARA, Maître de Conférences Agrégé,

M. Abdoulaye Kassoum KONE, Maître de Conférences Agrégé,

Directrice : Mme Aminatou KONE, Maître de Conférences.

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mes chers parents Feu(e) Souleymane SIDIBE et Rokia BENGALY

À la mémoire de mes parents bien aimés Feu(e) Souleymane SIDIBE et Rokia BENGALY.

Votre amour, votre soutien indéfectible et vos sacrifices ont pavé le chemin de cette réussite.

Votre absence est une douleur constante, mais votre souvenir est ma plus grande source d'inspiration. Cette thèse vous est dédiée et je prie le bon Dieu pour le repos éternel de vos âmes.

A ma Tante feu(e) Awa BENGALY et à mes feu(e)s grands parents Mandé SIDIBE, Soumaila BENGALY et Salimata DIALLO

Votre modestie, votre simplicité, votre tolérance ont fait de vous des personnes particulières. Ce travail est aussi le vôtre. J'aurai voulu que vous soyez là aujourd'hui mais l'Omniscient l'a voulu autrement. Puisse Allah vous accepter dans son paradis

A ma très chère grand-mère Nabintou SOGODOGO

A la femme extraordinaire qui m'a élevée, ma tendre grand-mère.

Tes valeurs, ta résilience et ta tendresse ont forgé la personne que je suis aujourd'hui.

Tu m'as appris la valeur du travail, l'importance de la persévérance et la beauté de l'amour.

Cette thèse est un humble hommage à tout ce que tu m'as donné.

Remerciements

A **Allah** L'unique, le clément, le tout Miséricordieux, le seul à être imploré pour ce nous désirons, il n'a jamais engendré, n'a pas été engendré non plus, et nul n'est égal à lui. **ALHAMDOLILLAH** par ta grâce j'ai pu mener à terme ce travail. Ton assistance n'a jamais manqué durant toute ma vie dans toute mes entreprises ne serait-ce qu'une seconde dont ce travail ne fait guère exception. Je suis satisfaite de toi comme Seigneur, satisfaite de l'islam comme religion satisfaite du **Prophète Muhammad (SAW)** comme Prophète et messenger.

Au Professeur Abdoulaye DJIMDE :

Cher Maître, merci pour la confiance que vous m'avez accordée en me donnant ce sujet. Vous m'avez accueillie à bras ouverts dès notre premier contact, et depuis, je me souviens comme si c'était hier, votre disponibilité, votre abord facile, votre soutien indéfectible, votre sympathie, votre rigueur scientifique et votre amour pour le travail bien fait ont accompagné la réalisation de ce travail. Merci pour vos conseils précieux et votre encadrement de qualité.

Ce travail est tout à fait à votre honneur. Qu'il soit le témoin de ma profonde gratitude. Que Dieu vous bénisse et vous accorde tout ce que votre cœur désire.

A mes Tontons et Tantes,

Merci pour les conseils et bénédictions. Que Dieu vous donne longue vie et une bonne santé.

A mes Frères et Sœurs,

Spécialement Soumaila DIALLO, Fanta Tenin SIDIBE, Nabintou SIDIBE, Mariam SIDIBE et feu(e) Djénéba SIDIBE.

Votre confiance en moi, vos conseils, vos soutiens sans faille et votre amour pour l'unicité de la famille ont été mes armes durant ce parcours. Puisse Dieu nous garder aussi longtemps avec la réalisation de nos différents rêves

A Tout le personnel de l'unité Néonatalogie du Centre de Reference CVI :

Dr. Mane Konaté, Dr. Ouattara Aicha Koné, Dr. Mariam Traoré, Dr Hawoye Maiga, Dr

Ramata Fané, Dr. Dicko, Dr Mamadou Diarra et Dr. Mamadou Sidibé

Merci pour vos précieux conseils et vos partages d'expérience, qu'Allah vous bénisse

A ma charmante fiancée Maimouna Djibril Dembélé :

Merci pour ta patience, ta compréhension, ton soutien, tes conseils et surtout tes douas tout au long de l'élaboration de ce document. Merci pour ta présence dans ma vie.

A tous mes camarades internes :

Salif A Kamaté, Yacouba Sylla, Philippe Diarra, Souleymane Yattara, Mamadou Diarra, Amadou Niangaly, Oumou Dara, Aminata Esther Bagayoko, Aïchata Dembele, Allaye Sagara

Merci pour la confiance, les échanges de connaissance et toutes mes excuses pour mes erreurs commises. Que le bon Dieu puisse consolider d'avantage nos liens d'amitié.

A mes camarades de promotion

Que Dieu nous donne la sagesse de demeurer toujours dans l'union sacrée que nous avons forgée tout au long de ce long parcours.

A mes merveilleux amis

Mahamadou Doucouré, Minamba Doumbia, Mohamed Naby Coulibaly, Ibrahim Diallo, Souleymane Doumbia, Dramane Doumbia, Moumine Ousmane Diarra, Moussa L Bagayoko, Youssouf Diarra alias Thalès, Famouké Camara.

Aucune expression ne sera à la hauteur de ma profonde gratitude. Vous avez toujours été sources de bons conseils. Merci pour tout et qu'Allah fortifie ce lien d'amitié. Amen !

A tous mes enseignants du primaire jusqu'au lycée.

A toute l'équipe de MEDRU du PMRTC/DEAP : particulièrement aux Professeurs Abdoulaye Djimdé, Aminatou Koné, Antoine Dara, Dinkorma Ouologuem, Souleymane Dama, Laurent Dembélé, Amadou Niangaly, feu Karim Traoré ; aux Docteurs Mamadou Tékéte, Bakary Fofana, Sékou Sissoko, Fatoumata O Maiga, Aliou Traoré, Nouhoum Diallo, Nianwalou Jacob Dara, Amadou Bamadio, Aly Kodio, Bilal Traoré, Bouran Sidibé, Siaka Goita, Yacouba Nani Barré, François Dao, Fatoumata I Ballo, Fatalmoudou Tandina, Fanta Sogoré, Hinda Doucouré, Bassirou Diakité, Moussa Doumbia, Djénéba Diallo, Abdoul Karim Samaké, Mohamed Maiga, Kadia Doumbia, Issa Traoré, Ahmed Konaté, Souleymane Babouya Koné, Karim Sawadogo, Diagassan Doumbia, Fatoumata Sow, Ousmaila Diakité, Mohamed Touré, Fatoumata Diallo, Jean Christophe Dembélé, Joël Dougnon, Ramata Poudiougou, Hawa Dembélé.

A tout le personnel de l'administration : Ibrahim Kamaté, Youssouf Fané, Daoulé Diallo, Boubakar Kodio, Sékou Doumbo, Mariam Kouyaté.

A toutes les personnes qui se sentiraient omises : mes chaleureux remerciements.

A la mémoire de toutes les victimes du paludisme.

A tout le personnel du Département d'Épidémiologie des Affections Parasitaires, du Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme de la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie, et de la Faculté de Pharmacie.

Hommage aux membres du jury

À notre Maître et Président du jury

Pr. Mahamadou Soumana SISSOKO

- Maître de recherche en Biostatistique, Recherche Clinique-Santé Publique
- Directeur adjoint du PMRTC
- Coordinateur pédagogique du cours supérieur d'épidémiologie pour les cadres supérieurs de la santé en Afrique
- Enseignant-Chercheur

Cher Maître,

C'est une grande joie pour nous de vous avoir comme Président du jury. Malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de présider ce travail, soyez-en remercié. Nous espérons que cet humble travail sera à la hauteur de vos espérances. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance. Qu'Allah vous accorde santé et longévité. Amen !

À notre Maître et Juge

Pr. Antoine DARA

- Maître de Conférences Agrégé en Biologie Moléculaire
- PhD en Microbiologie et Immunologie
- Enseignant-Chercheur au PMRTC
- Responsable du laboratoire de génomique du PMRTC

Cher Maître,

Nous avons beaucoup appris de vos valeurs humaines et scientifiques. Votre contribution nous a été d'un grand atout pour la réalisation de ce travail. Nous ne saurions être assez reconnaissants pour toute la considération que vous avez portée à ce travail. Recevez ici nos sincères remerciements. Puisse Dieu vous donner santé et longévité afin que plusieurs générations d'apprenants bénéficient de votre enseignement. Amen !

À notre Maître et Juge

Pr. Abdoulaye Kassoum KONE

- Maître de Conférences Agrégé de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Médecine et d’Odonto-Stomatologie (FMOS) ;
- Enseignant chercheur au Parasites and Microbes Research and Training Center (PMRTC) ;
- PhD en Parasitologie et Entomologie Médicales au Parasites and Microbes Research and Training Center (PMRTC) ;
- Responsable du laboratoire de diagnostic des parasitoses au PMRTC.

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Vos qualités humaines, scientifiques et votre humilité font de vous un Maître apprécié par vos étudiants. Trouvez ici cher maître l’expression de nos sincères remerciements. Qu'Allah vous accorde santé et longévité. Amen

À notre Maître et Directrice de thèse

Pr. Aminatou KONE

- Maître de Conférences en Biologie Moléculaire
- PhD en Sciences Médicales
- Enseignant-Chercheur au PMRTC

Chère Maître,

Je tiens à vous exprimer ma plus sincère gratitude pour votre encadrement exceptionnel et votre soutien tout au long de ce travail. Vos précieux conseils, votre disponibilité et votre expertise ont été essentiels à la réussite de ce travail. Chère Maître, sachez que vous êtes une référence pour nous et recevez ici l'expression de notre profond respect et de nos sincères remerciements. Qu'Allah vous accorde santé et longévité. Amen !

Liste des abréviations

ACTs : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique

BHQ2 : Black Hole Quencher 2

Cq : Cycle quantification en PCR

dNTPs : Désoxyribonucléotides Triphosphates

FM : Frottis Mince

FMOS-FAPH : Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie et de la Faculté de Pharmacie

GE : Goutte Épaisse

HRP2/3 : Histidine Rich Protein 2 et 3

kDA : kilo dalton

LDH : Lactate Déshydrogénase

MgCl : Chlorure de magnésium

NFW : Nuclease-Free Water

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pb : paire de base

P : *Plasmodium*

Pf : *Plasmodium falciparum*

Pv : *Plasmodium vivax*

Pm : *Plasmodium malariae*

Po : *Plasmodium ovale*

Pk : *Plasmodium knowlesi*

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne

Pf3D7_XXXXXX : Désigne des loci (positions génétiques) sur le génome de *P. falciparum*

PfHRP2 : Protéine 2 riche en histidine produite par *Plasmodium falciparum*

PfHRP3 : Protéine 3 riche en histidine produite par *Plasmodium falciparum*

pLDH: *Plasmodium* Lactate Déshydrogénase

PMRTC: Parasites and Microbes Research and Training Center

QBC : Quantitative Buffy Coat

qPCR : Quantitative PCR (PCR en temps réel)

RDT : Rapid Diagnostic Test (équivalent anglais de TDR)

SLIS : Système Local d'Information Sanitaire

SPP : Abréviation de "species" (utilisée pour "*Plasmodium spp.*")

Taq : *Thermus aquaticus*

TDR : Test de Diagnostic Rapide

µl : microlitre

Listes des tableaux

Tableau 1 : Signes cliniques de gravité regroupés	18
Tableau 2 : Les différentes cibles antigéniques en fonction des espèces plasmodiales.....	24
Tableau 3 : Mélange réactionnel pour un volume final de 20 µl	33
Tableau 4 : Mélange réactionnel de la deuxième amplification avec un volume final de 20 µL.	33
Tableau 5 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour le test qHRP2/3-del [8].....	35
Tableau 6 : Mélange réactionnel pour un volume final de 10 µl	35
Tableau 7 : Détection multiplex des gènes <i>PfHRP2</i> et <i>PfHRP3</i> dans les échantillons discordants.....	41

Listes des figures

Figure 1 : Carte des pays endémiques du paludisme dans le monde en 2025.....	8
Figure 2 : Incidence annuelle du paludisme ajustée au taux d'utilisation des établissements de santé dans 75 districts sanitaires du Mali, 2019	10
Figure 3 : Anophèle femelle prenant son repas sanguin.....	11
Figure 4 : Cycle de développement de <i>Plasmodium falciparum</i>	14
Figure 5 : Principe des TDR.....	23
Figure 6 : Exemple d'interprétation des TDR	25
Figure 7 : zones d'études stratifiées en fonction de la transmission du paludisme au Mali ...	29
Figure 8 : Répartition des sexes parmi les discordants	38
Figure 9 : Distribution des échantillons discordants dans les 13 districts sanitaires.....	39
Figure 10 : Echantillons positifs aux TDR par districts	39
Figure 11 : Positivité des tests discordants au genre <i>Plasmodium</i>	40
Figure 12 : Positivité de l'espèce <i>P.falciparum</i> parmi les discordants	40

Tables des matières

Dédicace	I
Remerciements	II
Liste des abréviations	VIII
Listes des tableaux	X
Listes des figures	XI
Tables des matières	XII
1. INTRODUCTION.....	1
2. OBJECTIFS	5
2.1 Objectif général :.....	5
2.2 Objectifs spécifiques :	5
3. GENERALITES :.....	7
3.1 Définition :	7
3.2 Epidémiologie :	7
3.2.1 Dans le Monde :	7
3.2.2 En Afrique :	8
3.2.3 Au Mali :	9
3.3 Agent pathogène et vecteur :.....	10
3.3.1 Agent pathogène :.....	10
3.3.2 Vecteur :	11
3.4 Cycle Biologique du Paludisme	12
3.4.1 La phase asexuée chez l’homme	12
3.4.2 La phase sexuée chez le moustique.....	13
3.5 Physiopathologie	14
3.5.1 Accès Palustre	14
3.5.2 Paludisme grave ou compliqué :	15
3.5.2.1 Neuropaludisme :	15

3.5.2.2 Anémie palustre :	15
3.5.2.3 Splénomégalie palustre :	16
3.6 Diagnostic du Paludisme	16
3.6.1 Diagnostic clinique	16
3.6.2 Diagnostic biologique	18
3.6.2.1 Diagnostic biologique direct	18
3.6.2.2 Diagnostic indirect	19
3.7 Stratégies de lutte contre le paludisme	25
3.7.1 La prise en charge des cas de paludisme non compliqué et grave	25
3.7.2. Les mesures préventives	26
3.7.2.1 La prévention du paludisme pendant la grossesse	26
3.7.2.2. La chimio prévention du paludisme saisonnier :	26
3.7.2.3 La vaccination contre le paludisme :	27
3.7.3. La lutte antivectorielle	27
4. METHODOLOGIE	29
4.1 Lieu d'étude :	29
4.2 Type et période d'étude :	29
4.3 Population d'étude :	30
4.4 Echantillonnage :	30
4.5 Critères de sélection et de non-sélection	30
4.5.1 Critère de sélection :	30
4.5.2 Critère de non-sélection :	31
4.6 Procédure d'étude :	31
4.6.1 Collecte de données et d'échantillons :	31
4.6.2 Méthodes de laboratoire	31
5. Résultats	38
6. Commentaires et discussion :	43

7. Conclusion :.....	47
8. Recommandations :.....	47
9. REFERENCES.....	48
10. FICHE SIGNALÉTIQUE	52

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Le paludisme ou malaria est une parasitose causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'humain principalement par la piqûre de moustique infecté du genre *Anophèles*. A ce jour six espèces plasmodiales sont rencontrées chez l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (*P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*), *Plasmodium knowlesi* et *Plasmodium cynomolgi* [1].

Le paludisme demeure un fardeau majeur de santé publique. Malgré les efforts considérables déployés depuis plus d'un demi-siècle pour le contrôler et l'éradiquer, cette maladie parasitaire touche encore plus de 40% de la population mondiale.

En 2023, selon l'OMS il a été estimé à 263 millions, le nombre de cas de paludisme dans le monde dont 597 000 décès , soit une hausse de 11 millions de plus qu'en 2022 [1].

Le continent Africain porte la plus lourde conséquence avec 95 % de décès dus au paludisme en 2023. Les enfants de moins de 5 ans sont les premières victimes de la maladie avec 76 % des décès dus au paludisme survenant dans cette classe d'âge [1].

Au Mali, le paludisme constitue la première cause de morbidité avec 34% des motifs de consultations et une forte mortalité chez les enfants de moins de 5 ans. Selon le Système local d'information sanitaire (SLIS), le nombre de personnes atteintes du paludisme au Mali ne diminue pas. En 2022, plus de 2,6 millions de cas ont été confirmés de paludisme sur le territoire [2].

Selon le même rapport, SLIS a enregistré 3 204 275 de cas confirmés de paludisme dont 2 156 330 cas simples et 1 047 945 cas graves avec malheureusement 1 480 cas de décès. Sur le plan économique, le paludisme affecte la croissance économique annuelle de notre pays d'environ 1,3%. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes sont les couches les plus affectées[3].

Pour réduire l'utilisation abusif et non adaptée des médicaments antipaludiques, éviter l'augmentation de la pression médicamenteuse conduisant au développement et à la propagation des parasites résistant aux traitements, l'OMS recommande depuis 2009, que tout cas suspect de paludisme soit confirmé par un examen biologique avant l'instauration d'un traitement[4].

Bien que la Goutte Epaisse (GE) demeure la méthode de référence pour la confirmation du diagnostic, cette recommandation a conduit à une utilisation élargie des Tests de Diagnostic Rapides (TDR) qui sont devenus des outils de diagnostics de choix dans les zones reculées et limitées en termes de plateau de technique.

Au Mali, le diagnostic du paludisme repose principalement sur ces TDR, représentant environ 90% des tests effectués. Les TDR permettent entre autres la détection du *Plasmodium* par la recherche de la protéine riche en histidine 2 et 3 (HRP2 et HRP3) par réaction croisée, le lactate déshydrogénase (pLDH) et l'aldolase. Ces TDR présentent quelques avantages tels que : la rapidité, la simplicité, la facilité de manipulation et le coût.

Selon le rapport de l'OMS 2021, 275 millions de TDRs ont été distribués par les différents programmes nationaux.

Le SLIS rapporte en moyenne 4 millions de TDR HRP2 par année pour le diagnostic du paludisme au Mali. Les tests utilisés en routine ciblent l'antigène HRP2 présent chez le *P. falciparum* qui est le parasite le plus fréquent et dont l'accumulation dans le sang facilite la détection.

Cependant on constate l'émergence des souches de *P. falciparum* présentant une délétion du gène *pfhrp2* et/ou *pfhrp3*, qui peut les rendre indétectables par ces TDRs.

Cette émergence fait courir le risque d'accroître le nombre de résultats faussement négatifs, des erreurs de diagnostic avec des conséquences pour les patients s'ils ne reçoivent pas un traitement antipaludique adéquat.

La première identification de parasites *P. falciparum* porteurs de délétions des gènes *Pfhrp2/3* fut faite en 2010, dans le bassin Amazonien péruvien par Gamboa et collaborateurs [5]. Depuis, des analyses rétrospectives menées sur des parasites dans la région du Loreto de l'Amazone péruvienne ont révélé une augmentation progressive de la prévalence des parasites porteurs de la délétion sur les gènes *Pfhrp2/3*. Ainsi la prévalence est passée de 20,7 % pour les parasites collectés de 1998 à 2001 à 40,6 % pour ceux collectés de 2003 à 2005 [5].

Cette prévalence varie selon les régions géographiques endémique au paludisme. Des études menées dans d'autres pays, notamment en Inde[6], au Mali[7], au Honduras[8], au Ghana[9], en Colombie[10,11], au Myanmar[12], au Surinam[13], en Guyane[8] et au Sénégal[14], ont

obtenu des estimations nettement inférieures au seuil critique de 5% défini par l’OMS comme le seuil à partir duquel l’utilisation du TDR HRP2 devrait être reconsidérer.

Plus récemment en Afrique, la prévalence des délétions doubles des gènes *Pfhrp2/3* à un taux remarquablement élevé fut observé en Érythrée (2018) chez 80 % des parasites [15]. Depuis, des cas sporadiques de délétion ont été détectés au Mali et nous nous sommes proposés dans cette étude de faire une évaluation à l’échelle du pays des cas de délétion des gènes *Pfhrp2* et *Pfhrp3* pour surveiller l’émergence des parasites *P. falciparum* présentant ces délétions.

OBJECTIFS

2. OBJECTIFS

2.1 Objectif général :

Evaluer la délétion de *Pfhrp2* et *Pfhrp3* dans des échantillons discordants à *Plasmodium falciparum* par les tests de diagnostic rapide au Mali.

2.2 Objectifs spécifiques :

- 1) Déterminer la fréquence des échantillons discordants par district.
- 2) Déterminer la prévalence de la délétion *Pfhrp2* et *Pfhrp3* dans les échantillons discordants.
- 3) Mesurer la prévalence de la double délétion *Pfhrp2/3* dans les échantillons discordants.

GENERALITES

3. GENERALITES :

3.1 Définition :

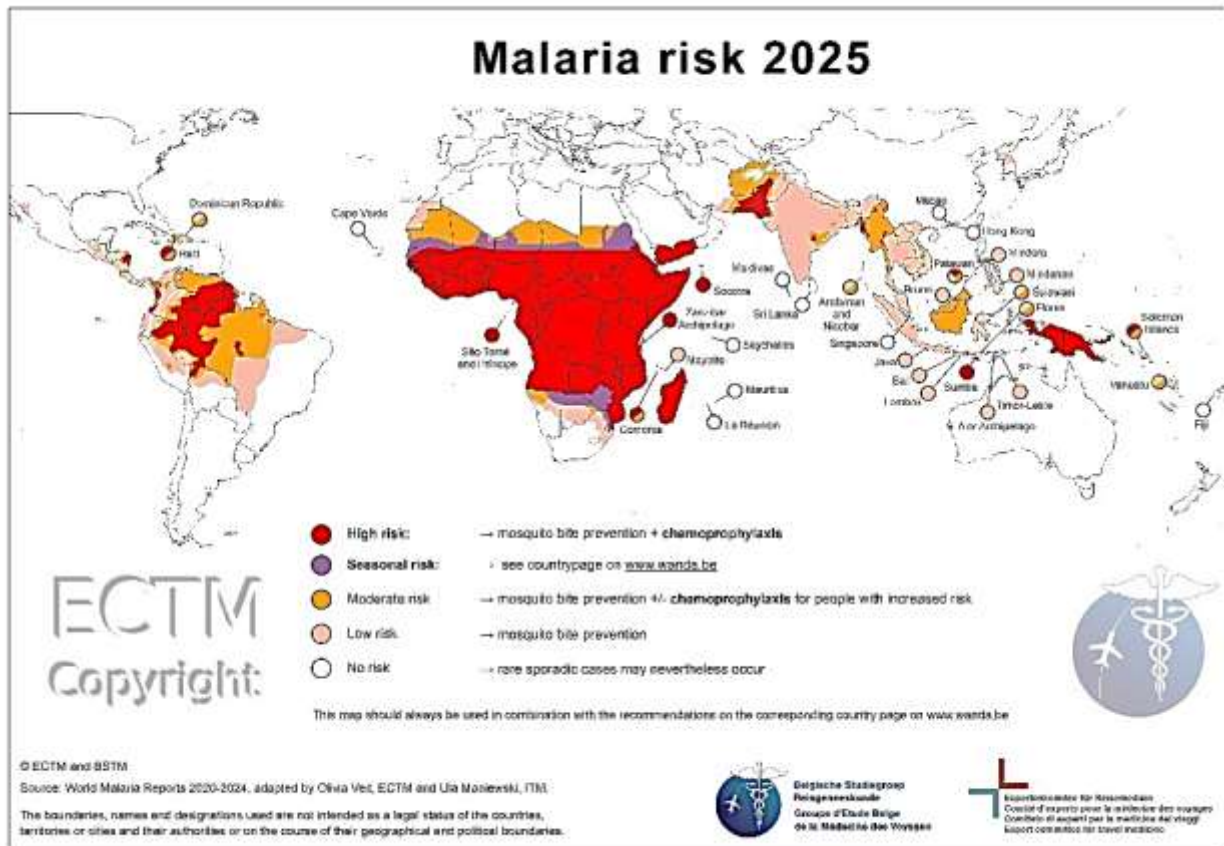
Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à la présence et au développement dans le foie puis dans les hématies d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Il est transmis à l'homme par la pique infectante du moustique femelle du genre *Anophèles* [16].

3.2 Epidémiologie :

L'épidémiologie du paludisme est extrêmement variable d'une zone géographique à une autre. Cette hétérogénéité est sous la dépendance de nombreux facteurs notamment la distribution des *anophèles* et leur capacité vectorielle, ainsi que les caractéristiques biologiques des parasites. Un autre facteur extrêmement important est le rôle de l'immunité mais aussi le climat. Même si le paludisme entraîne la mort d'un très grand nombre de personnes chaque année, la mortalité est faible par rapport au nombre présumé d'accès palustres survenant sur une même période. La réponse clinique à l'infection est extrêmement variable allant de l'infection asymptomatique à la survenue d'un accès grave pouvant entraîner la mort du patient[17].

3.2.1 Dans le Monde :

Le paludisme sévit dans les régions intertropicales dont les trois principales zones à forte transmission sont l'Afrique subsaharienne, l'Asie du Sud-Est et l'Amérique du Sud[18].



Source : <https://www.wanda.be/fr/a-z-index/malaria-carte-du-monde/>

Figure 1 : Carte des pays endémiques du paludisme dans le monde en 2025

3.2.2 En Afrique :

Les différents faciès épidémiologiques du paludisme en Afrique

Il existe schématiquement cinq faciès épidémiologiques du paludisme en Afrique :

- **Le faciès équatorial dans la forêt et les savanes post-forestières :** paludisme stable avec transmission pérenne et prémunition forte dès l'âge de 5 ans ;
- **Le faciès tropical dans les savanes humides :** paludisme stable avec transmission saisonnière longue > 6 mois et une prémunition établie à 10 ans ;
- **Le faciès sahélien des savanes sèches et des steppes :** paludisme instable avec transmission saisonnière courte < 6 mois (par exemple : août à novembre au Mali), prémunition plus longue à établir liée à la régularité de la transmission ;
- **Le paludisme austral des plateaux du sud de l'Afrique :** paludisme instable à transmission saisonnière, immunité apparemment peu solide, risque d'épidémies ; Le paludisme des montagnes entre 1000 et 1500m : paludisme instable avec transmission

limitée par la température (cap des 18°C), peu ou pas d'immunité, épidémies violentes (exemple : Burundi), grandes variations interannuelles en fonction de la température et de la pluviométrie, impact du réchauffement climatique.

Ces faciès, pouvant coexister dans un même pays, ils permettent de définir la stratégie d'administration de la chimio prophylaxie selon la région visée et/ou la période de l'année[19].

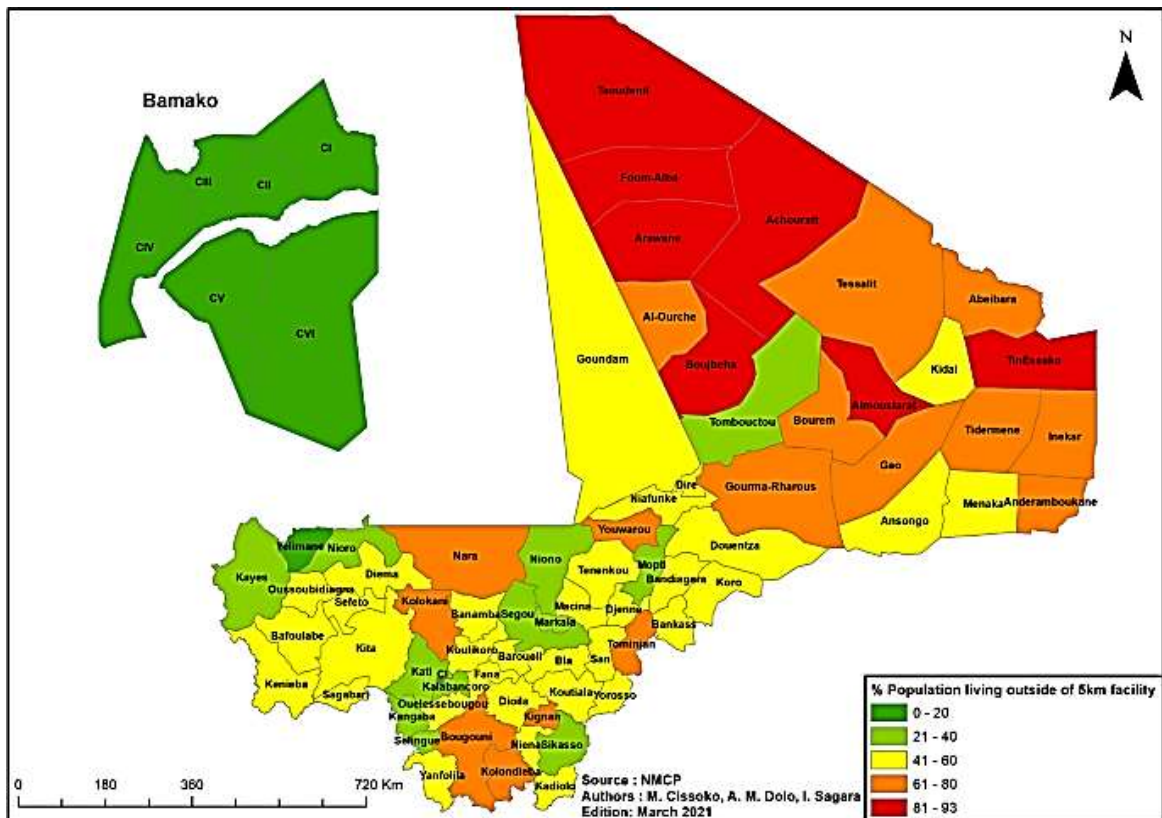
3.2.3 Au Mali :

Au Mali, le paludisme est de type saisonnier c'est-à-dire que la transmission est endémique avec un pic saisonnier pendant la saison des pluies. Il y a une extrême variabilité de la situation épidémiologique qui est fonction des faciès géo climatiques.

Il existe différents niveaux épidémiologiques de transmission du paludisme suivant la stratification recommandée par l'OMS [20].

Après ajustement avec le taux de fréquentation, l'incidence ajustée du paludisme à l'échelle district sanitaire en 2019 selon la classification de l'OMS, se présente comme suit (Figure 2) :

- 12 sur 75 districts sanitaires dans la zone de transmission très faible dont aucun district sanitaire n'avait moins de 5 cas pour 1000 personnes-année ; 7 districts sanitaires avec incidence entre 5 et 50 cas pour 1000 personnes-année et 5 districts sanitaires avec incidence entre 50 et 100 cas pour 1000 personnes-année ;
- 19 sur 75 districts sanitaires dans la zone de transmission faible ;
- 20 sur 75 districts sanitaires dans la zone de transmission modérée ;
- 24 sur 75 districts sanitaires dans la zone de forte transmission.



Source : <https://www.nature.com/articles/s41598-022-11974-3>

Figure 2 : Incidence annuelle du paludisme ajustée au taux d'utilisation des établissements de santé dans 75 districts sanitaires du Mali, 2019

(Source : Cissoko M et al 2022)

3.3 Agent pathogène et vecteur :

3.3.1 Agent pathogène :

On compte 6 espèces différentes de *Plasmodium* transmissibles à l'Homme :

- *Plasmodium falciparum* majoritaire sur le continent africain. C'est le plus virulent, il cause près de la moitié des décès liés au paludisme.
- *Plasmodium vivax* qui coexiste avec *falciparum*. Il est surtout présent en Asie, Amérique latine et certaines régions d'Afrique.
- *Plasmodium ovale* est surtout localisé en Afrique de l'Ouest. Il n'est pas mortel, mais peut causer des rechutes plusieurs années après la première infection.
- *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi* sont moins fréquents[21].

- Le premier cas connu de paludisme à *Plasmodium cynomolgi* naturellement acquis chez l'homme a été décrit en 2014[22]

3.3.2 Vecteur :

Les moustiques (Diptera : Culicidae) constituent la plus importante famille de vecteurs d'agents pathogènes. Un vecteur n'est pas une simple seringue récupérant un agent pathogène chez un vertébré pour l'injecter à un autre. C'est un point de passage obligatoire pour la diffusion de l'agent pathogène qui va soit « simplement » s'y multiplier (virus) ou y assurer une part de son cycle (parasites). Les moustiques ont une vie aquatique au stade larvaire puis aérienne au stade adulte. Parmi eux figurent les anophèles, vecteurs de *Plasmodium* sp, parasite responsable du paludisme. Il existe environ 500 espèces d'anophèles, dont une cinquantaine capable de transmettre le paludisme à l'homme. Dans la pratique, 20 espèces assurent l'essentiel de la transmission dans le monde. Les autres ne participent pas à la transmission soit parce qu'ils piquent de préférence l'animal, soit parce qu'ils sont réfractaires aux *Plasmodium* ou à une souche de *Plasmodium*. Il existe une grande variation dans la capacité des différentes espèces d'anophèles à transmettre les différentes espèces plasmodiales. Pour des espèces d'anophèle et de *Plasmodium* données, il existe aussi souvent des différences sensibles de capacité à transmettre, selon l'origine géographique. Cette capacité est déterminée génétiquement. Selon les zones géographiques, on distingue des vecteurs principaux à grande répartition géographique, des vecteurs d'importance locale et des vecteurs secondaires dont le rôle reste à préciser [23].



Figure 3 : Anophèle femelle prenant son repas sanguin

Source : <https://nuitsansmoustique.fr/moustique-piqures/les-moustiques-en-france/lanophele-tout-savoir-sur-ce-moustique/>

3.4 Cycle Biologique du Paludisme

Même si le rôle clé du moustique anophèle dans la transmission du paludisme était connu, ce n'est qu'à partir de 1948 que toutes les phases du cycle de développement du parasite ont été élucidées.

On peut citer deux phases qui caractérisent le cycle biologique du paludisme :

- Une phase de multiplication asexuée ou schizogonie se déroulant chez l'homme (comportant une phase hépatique ou exo-érythrocytaire et une phase érythrocytaire),
- Une phase de multiplication sexuée, appelée sporogonie chez le moustique (avec les oocystes évoluant vers les sporozoïtes)

3.4.1 La phase asexuée chez l'homme

L'infection a lieu lors d'un repas sanguin par un anophèle femelle infecté, c'est-à-dire contenant des parasites présents sous forme de sporozoïtes dans ses glandes salivaires. Ces formes parasitaires infectantes sont alors injectées avec la salive dans la circulation sanguine. Ils gagnent le foie via la circulation générale où a lieu une première phase de multiplication par reproduction asexuée dans les hépatocytes, dite « schizogonie pré-érythrocytaire » ou « cycle extra-érythrocytaire » : transformation en schizonte pré-érythrocytaire (« corps bleus »). Cette schizogonie peut être retardée dans certains hépatocytes où les parasites restent en attente (hypnozoïtes) entre un et 18 mois pour les espèces *P. vivax* et *P. ovale*. Au bout de 5 à 8 jours, l'éclatement des schizontes adultes libère des dizaines de milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Ils vont ensuite envahir les globules rouges et conduire à la formation de trophozoïtes (forme en anneau).

Ces trophozoïtes évoluent en schizontes par reproduction asexuée lors de la « schizogonie érythrocytaire » ou « cycle intra-érythrocytaire ». La rupture des hématies parasitées libère ensuite des dizaines de milliers de nouveaux mérozoïtes dans la circulation sanguine qui vont parasiter d'autres globules rouges lors d'un nouveau cycle érythrocytaire.

Le développement de tous les parasites est synchrone chez un même individu et la libération concomitante des mérozoïtes est à l'origine du pic fébrile.

La durée du cycle érythrocytaire varie en fonction des espèces plasmodiales et détermine l'intervalle entre chaque pic fébrile. Celui-ci est de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* (fièvre tierce), 72 heures pour *P. malariae* (fièvre quarte) et seulement 24 heures pour *P. knowlesi*. Plusieurs cycles se succèdent ainsi pouvant conduire à un très grand nombre d'hématies parasitées. La densité parasitaire est d'ailleurs un critère de gravité de la maladie.

Après 9 à 11 jours environ, chez *P. falciparum*, certains parasites érythrocytaires asexués évoluent en gamétocytes mâles et femelles lors de la gamétocytogénèse. Les gamétocytes sont les formes sexuées transmissibles et infectantes pour le moustique.

Même si les humains hébergent des formes sexuées de parasites, la multiplication chez l'homme, hôte intermédiaire est toujours de type mitotique (asexué).

Ainsi les gamétocytes ne peuvent poursuivre leur évolution que lorsqu'ils sont ingérés par des anophèles, hôtes définitifs qui assurent la pérennisation des espèces plasmodiales en assurant la reproduction sexuée du *Plasmodium*.

3.4.2 La phase sexuée chez le moustique

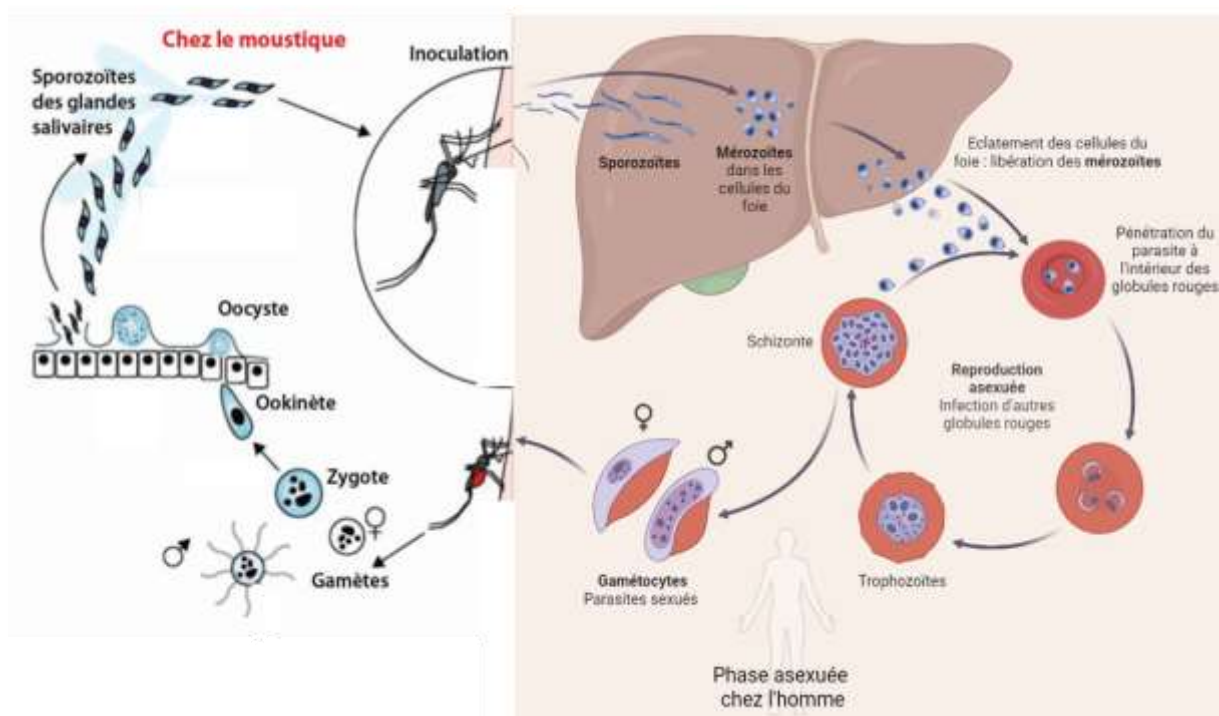
Chez le vecteur, le cycle sporogonique débute par l'ingestion de gamétocytes mâles et femelles matures qui circulent dans le sang périphérique de l'hôte humain lors du repas sanguin d'un anophèle femelle.

Dans son système digestif aura lieu une reproduction sexuée des parasites avec recombinaison méiotique.

Si les deux gamétocytes ayant fusionné sont issus de clones différents de parasites (en cas de poly-parasitisme chez l'individu infectant pour le moustique), ceci va générer de la diversité allélique (polymorphisme génétique) par recombinaison génétique.

Au niveau de la paroi intestinale, les gamétocytes fusionnés (zygotes diploïdes) vont se différencier en ookynète puis en oocyste qui contiendra plusieurs milliers de sporozoïtes haploïdes à maturité.

Les sporozoïtes ainsi générés lors de cette phase dite « sporogonique » perforent la capsule de l'oocyste et la lame basale et sont libérés dans l'hémolymphe puis ils migrent vers les glandes salivaires, où ils seront inoculés lors d'un prochain repas sanguin. Les sporozoïtes restent infectants dans les glandes salivaires pendant toute la durée de vie du moustique.



Source : www.sciencesetavenir.fr/redaction/infographies/PNG/cycle-de-vie-Plasmodium.png

Figure 4 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*.

3.5 Physiopathologie

En dépit de nombreuses études et des modèles expérimentaux, la physiopathologie du paludisme demeure toujours mal élucidée bien que son impact sur certains organes ait été clairement défini.

Elle peut être divisée en accès palustre non compliqué, en neuropaludisme et les autres formes graves (Anémie palustre et Splénomégalie palustre)

3.5.1 Accès Palustre

Le facteur déclenchant de la fièvre est la présence du pigment malarique ou hémozoïne dans le sang. Il provient de l'éclatement des hématies parasitées et agirait sur les centres bulbares thermorégulateurs.

La fièvre peut avoir une allure continue (cycle endo-érythrocytaire mal synchronisé) ou avoir une périodicité (cycle endo-érythrocytaire bien synchronisée avec libération régulièrement répétée de pigment malarique dans le sang).

L'hépatomégalie et surtout la splénomégalie sont la conséquence de l'hyperactivité du système monocyte-macrophage chargé de débarrasser l'organisme aussi bien du pigment malarique que des débris érythrocytaires[24].

3.5.2 Paludisme grave ou compliqué :

3.5.2.1 Neuropaludisme :

Il ne s'observe que chez des sujets non immuns (jeunes enfants, expatriés, sujets vivant en zone hypo-endémique, etc. ...). Par ailleurs, une seule des espèces plasmodiales, *P. falciparum*, peut provoquer le neuropaludisme. Dans cette espèce, les schizontes endo-érythrocytaires sont normalement absents du sang périphérique et ne se retrouvent que dans les capillaires viscéraux, cérébraux en particulier[25].

3.5.2.2 Anémie palustre :

En zone sub-saharienne, le concept d'anémie palustre est difficile à définir, l'on reconnaît à l'anémie souvent des étiologies multifactorielles, mais elle atteint avec prédilection les nourrissons, les enfants et les femmes enceintes notamment les primigestes.

L'anémie est le plus souvent attribuée au paludisme quand elle survient chez les malades en période de transmission intense du paludisme (saison des pluies et surtout vers la fin de celle-ci).

L'anémie associée est un facteur de pronostic de la maladie palustre ; elle est la conséquence de la lyse des globules rouges non parasités qui serait secondaire aux modifications survenant à la surface de ces cellules au cours de l'infection palustre notamment la surexpression des IgG et des protéines d'origine parasitaires.

On ne connaît pas chez l'homme l'importance relative de cette hémolyse concernant les globules rouges non parasités.

Cependant, l'hémolyse secondaire à l'introduction du sporozoïte des plasmodies dans l'organisme était la plus connue pour expliquer l'anémie observée au cours d'une infection palustre. Plus récemment l'accent a été mis sur le rôle d'un déficit de production de la moelle hématopoïétique à cause d'un phénomène de dysérythropoïèse.

Dans cette inhibition intervient des facteurs parasitaires, les médiateurs solubles libérés par les lymphocytes ou les macrophages, un dysfonctionnement des macrophages.

Les mécanismes de l'anémie associée au paludisme sont encore incomplètement élucidés mais la conjonction de ces deux mécanismes constitue un facteur d'aggravation et de mauvaise tolérance à l'anémie[26,27].

3.5.2.3 Splénomégalie palustre :

La rate, organe essentiel, agit comme moyen de défense par séquestration d'hématies parasitées et sans doute d'hématies saines sensibilisées par des antigènes plasmodiaux. Elle participe également aux déclenchements des mécanismes cellulaires et humoraux.

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

Chez l'enfant de 4 mois à 10 ans, la fréquence de la splénomégalie est considérée comme un bon indice de morbidité palustre.

Dans les zones d'endémie palustre stable, elle disparaît progressivement entre 10 et 15 ans, témoignant de l'acquisition de la prémunité[28].

3.6 Diagnostic du Paludisme

3.6.1 Diagnostic clinique

Il est exclusivement lié à la schizogonie endo-érythrocytaire et dépend du type de paludisme ainsi pour :

- Le paludisme de primo infection

Classiquement l'incubation est de 7 à 21 jours, elle est cliniquement muette. Le tableau est celui d'un embarras digestif fébrile. Il est fréquent chez les touristes et les jeunes enfants.

Il se manifeste durant les premiers cycles de développement endo-érythrocytaire du parasite.

- L'accès palustre non compliqué

Il est parfois précédé de prodromes tels que : céphalées, nausées, herpès labial. Typiquement il est caractérisé par la périodicité des symptômes.

Trois phases se succèdent :

-les frissons marqués par une forte température (>38°5)

- la chaleur qui peut durer 3 à 4 h, accompagnée le plus souvent de céphalées
- des douleurs abdominales, d'importantes sueurs avec une chute thermique.

Classiquement la fièvre tierce (survenant toutes les 48 h) est causée par *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* ; la fièvre quarte (survenant toutes les 72 h) est provoquée par le *P. malariae*.

- Paludisme viscéral évolutif

Il est rencontré chez des sujets en zone d'endémie après une longue exposition aux infestations palustres. Les signes essentiels sont l'asthénie, l'anorexie, la splénomégalie et une modification des paramètres biologiques dont l'anémie.

Parfois chez l'enfant, il y a un retard staturo-pondéral. Un traitement précoce et adapté permet une guérison clinique et biologique.

- La fièvre bilieuse hémoglobinurique (FBH)

Elle survient le plus souvent chez des sujets en zone d'endémie avec des antécédents d'accès palustres et observant une prophylaxie ou des traitements intermittents par des amino alcools.

Le début est brutal marqué par une hémolyse intravasculaire, une anémie, un ictère, une chute de tension.

Il y a la présence de douleurs intenses en barre au niveau de la ceinture pelvienne, une oligurie avec des urines « rouge-porto ». La parasitémie peut-être nulle ou modérée[29].

- Le neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées

Ces formes sont l'apanage de *P. falciparum* et sans traitement ils peuvent conduire à la mort au bout de 72 heures.

Les critères de paludisme grave ont été actualisés par l'OMS en 2000. Ces critères sont les mêmes chez l'adulte et chez l'enfant[30].

Il s'agit de la présence des formes asexuées de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi* dans le sang associé à l'un des signes suivants :

Tableau 1 : Signes cliniques de gravité regroupés

Observation Clinique	Observation biologique
- Trouble de conscience	- Anémie grave (Hb < 5g/dl, Ht < 15%)
- Convulsions généralisées	- Insuffisance rénale : diurèse < 400 ml/ 24h
- Collapsus cardio-vasculaire	ou créatinémie > 265µM chez l'adulte ;
- Syndrome de détresse respiratoire	diurèse < 12 ml/ kg/ 24h ou créatinémie
- Hyperthermie Température corporelle 39-41°C	élevée pour l'âge chez l'enfant
- Prostration	- Hypoglycémie Glycémie < 2.2mmol/l
- Ictère Clinique	- Acidose métabolique : bicarbonates
- Hypothermie Température corporelle < 36°C	plasmatiques < 15 mmol/L
- Œdème pulmonaire (radiologique)	- Hémoglobinurie macroscopique
- Hémorragie spontanée	- Hyperparasitémie ≥ 4% chez le sujet non
	immun, ou ≥ 20% chez le sujet immun
	- Hyperlactacidémie (acide
	lactique > 5mmol/l)

3.6.2 Diagnostic biologique

Le diagnostic du paludisme doit être confirmé par un diagnostic biologique. La confirmation du diagnostic biologique permet de réduire l'utilisation des antipaludiques dans le traitement injustifié pour les fièvres non palustres

3.6.2.1 Diagnostic biologique direct

Le diagnostic direct est fiable et a pour but de confirmer ou infirmer le diagnostic clinique. Ces techniques comprennent la goutte épaisse, le frottis mince, le « Buffy coat test » quantitatif (QBC; « quantitative Buffy coat »), et la PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) [31].

La goutte épaisse (GE) et le frottis mince (FM) sont respectivement des techniques de concentration et d'identification qui consistent à étaler 5-10 µl (GE) et 3-6 µl (FM) de sang sur une lame porte-objet. Après séchage le frottis mince est fixé au méthanol puis la lame est colorée au GIEMSA préparé à 10 % pendant 15-20 mn.

La lecture est faite au microscope à l'objectif 100 en immersion. Ainsi le noyau du *Plasmodium* est coloré au rouge vif et le cytoplasme en bleu. L'association GE/FM est la technique la plus

recommandée et demeure la référence pour le diagnostic du paludisme dans les pays en développement [32].

La PCR est une technique de biologie moléculaire permettant d'obtenir *in vitro* un grand nombre de copies d'ADN, à partir d'une séquence initiale. Il s'agit d'amplifier un fragment d'ADN extrait à partir du sang ou tout autre prélèvement biologique infecté par le parasite en utilisant des amorces spécifiques.

La détection de l'ADN parasitaire par la technique de PCR est l'une des approches les plus sensibles pour diagnostiquer le paludisme, mais le coût élevé limite leur utilisation. La PCR demande une longue procédure, des équipements et des réactifs spécialisés et coûteux.

Le « Buffy Coat » quantitatif est un autre test direct et rapide pour le diagnostic du paludisme. Il est basé sur la coloration à l'acridine orange des plasmodies dans les échantillons de sang périphérique centrifugés dans un tube à microhématocrite (QBC).

L'examen du microtube se fait sous source de lumière UV (microscopie à fluorescence). L'orange d'acridine colore toutes les cellules contenant de l'acide nucléique et la fluorescence associée est observable sous une lumière bleu-violet à travers un microscope, permettant ainsi d'identifier les globules rouges infectés.

3.6.2.2 Diagnostic indirect

Le principe est basé sur la recherche d'anticorps dans le sérum du malade. Les techniques sont indicatives d'une infection antérieure (persistance des anticorps même après l'infection) et présente. Ces techniques incluent : les tests de diagnostic rapide (tests immunochromatographiques), l'immunofluorescence indirecte, l'hémagglutination passive et le test Elisa[33].

TDR : Les TDR sont des tests immunochromatographiques sur membrane capables de détecter les antigènes du parasite *Plasmodium* dans le sang[34].

Les TDR actuels permettent de détecter trois antigènes : la protéine II riche en histidine (HRP2), la lactate déshydrogénase (LDH) et l'aldolase. La protéine HRP2 est fabriquée en grande quantité uniquement par *P. falciparum* et constitue la cible des TDR les plus couramment utilisés.

L'aldolase : une protéine pan-plasmodiales (commune à toutes les espèces de plasmodies)

L'aldolase est une enzyme clé du cycle du glucose, commune aux cinq espèces de *Plasmodium* contaminant l'Homme.

L'aldolase est retrouvée dans les membranes des stades schizontes. Il n'a pas été observé de souches non sécrétrices d'aldolase.

Cet antigène commun aux cinq espèces de *Plasmodium* est une cible détectée par certains tests de diagnostic rapide et combinée à la recherche d'un antigène spécifique de *P. falciparum*.

Une des limites de ce type de test mise en évidence par plusieurs études est sa réactivité fréquemment mise en défaut pour détecter *P. ovale* et sa sensibilité modérée dans la détection de *P. malariae* alors que sa capacité à détecter *P. falciparum* et *P. vivax* est bonne [35]. A noter qu'une aldolase spécifique de *P. vivax* (iso-enzyme) est utilisée par quelques fabricants de TDR [36].

La p-LDH : Protéine lactate déshydrogénase plasmodiale : une protéine pan plasmodiale comme l'aldolase.

La Plasmodium lactate déshydrogénase est une enzyme présente chez toutes les plasmodies humaines. Cette enzyme qui est la dernière enzyme impliquée dans le cycle du glucose est synthétisée par les stades érythrocytaires asexués et les gamétocytes matures.

Les isoformes des lactate-déshydrogénases plasmodiales peuvent être différenciées des LDH humaines par leurs épitopes antigéniques ainsi que leurs caractéristiques enzymatiques. Cela a été démontré pour *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. vivax* qui synthétisent des isoformes de pLDH avec des épitopes propres à chaque espèce et des épitopes communs aux différentes espèces permettant ainsi leur détection par anticorps monoclonaux spécifiques de chaque espèce ou commun.

Les études génétiques ont montré que le gène de la pLDH est constitué de séquences conservées mais aussi de séquences variables entre les espèces, voire entre sous-espèces : ces variabilités expliquent l'efficacité variable de la détection de la pLDH selon les espèces pour un même anticorps monoclonal. La pLDH est produite par des parasites viables. Par conséquent sa recherche peut être utilisée pour suivre l'efficacité d'un traitement anti paludique [35].

Il existe des isoformes spécifiques d'espèce(s) plasmodiale(s) :

- la lactate déshydrogénase spécifique de *P. vivax* (pLDH-Pv)
- la lactate déshydrogénase spécifique de *P. falciparum* (pLDH-Pf)
- la lactate déshydrogénase spécifique de *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* (pLDHPvom)

Les limites des tests ciblant ces protéines sont : une diminution de sensibilité avec les faibles parasitémiés et des réactions croisées entre pLDH-Pv et *P. knowlesi*.

Une protéine plasmodiale spécifique : Pf-HRP2 (Protéine-2 Riche en Histidine)

PfHRP2 est une protéine soluble de 30kDa, stable à la chaleur, synthétisée uniquement par *Plasmodium falciparum* à tous les stades érythrocytaires et par les gamétocytes jeunes.

La protéine est libérée lors d'une rupture du schizonte et se trouve donc dans le sang de l'individu infecté.

Le rôle exact de cette protéine est mal connu mais elle semble agir comme une hème polymérase qui détoxifie l'hème libre issue de la dégradation de l'hémoglobine de l'hôte en hémozoïne inactive (pigment malarique) dans la vacuole parasitophore [35].

Cette protéine, codée par le gène *pfhrp2* situé dans la région sub-télomérique du chromosome 8, contient de multiples répétitions de motifs d'acides aminés composés d'histidine et d'alanine formant des motifs standard tels que : AHHAHHAAD (type 2) et AHHAAD (type 7).

Ces motifs induisent une grande variabilité de la protéine et permettent la détection de la protéine par de nombreux anticorps différents [37,38]. Les TDR basés sur Pf-HRP2 ont pour avantages d'avoir une bonne sensibilité et spécificité pour *Plasmodium falciparum* et d'avoir une meilleure stabilité thermique.

De plus, il est décrit une corrélation positive entre la concentration de cette protéine dans le sang, la densité parasitaire et la sévérité clinique [39].

Ainsi, Pf-HRP2 pourrait être utilisée comme biomarqueur de la sévérité/gravité d'un accès palustre [40].

Cependant elle reste circulante longtemps après la mort/disparition des parasites.

Ainsi les TDR basés sur PfHRP2 ne peuvent donc pas être utilisés dans le suivi de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques car la protéine persiste jusqu'à 28 jours dans le sang périphérique après l'élimination du parasite [37].

Par ailleurs, ces tests ont plusieurs limites. Il existe des réactions croisées avec la protéine PfHRP3, qui a une composition en acides aminés proche de Pf-HRP2 pouvant donc être reconnue par les anticorps anti-Pf-HRP2.

En cas de forte parasitémie, l'excès d'antigène peut entraîner un résultat faussement négatif ou faiblement positif, appelé effet prozone.

Ce phénomène est dû à la saturation des anticorps fixés sur la membrane, par l'excès d'antigènes libres entraînant un défaut de capture des complexes antigènes - anticorps marqués et donc un défaut de détection [37].

Une protéine plasmodiale spécifique : Pf-HRP3 (Protéine 3 Riche en Histidine) :

Protéine structurellement très similaire à HRP2 produit également par le *Plasmodium falciparum*, il est situé sur le chromosome 13 du parasite avec une taille estimée à 289 paires de bases.

Elle s'exprime au stade intra-érythrocytaire du parasite *Plasmodium falciparum*, comme HRP2, HRP3 contient des motifs répétitifs riches en histidine et alanine, mais moins bien caractérisés fonctionnellement que HRP2.

Bien que les anticorps présents sur la bandelette réactive soient dirigés contre l'antigène HRP2, il existe un risque de réaction croisée avec un autre antigène de la famille HRP, la protéine HRP3, compte tenu de la similitude des séquences d'acides aminés [41].

Les TDR ciblant HRP2 sont généralement plus sensibles et plus thermostables que les TDR détectant la LDH ou l'aldolase [42].

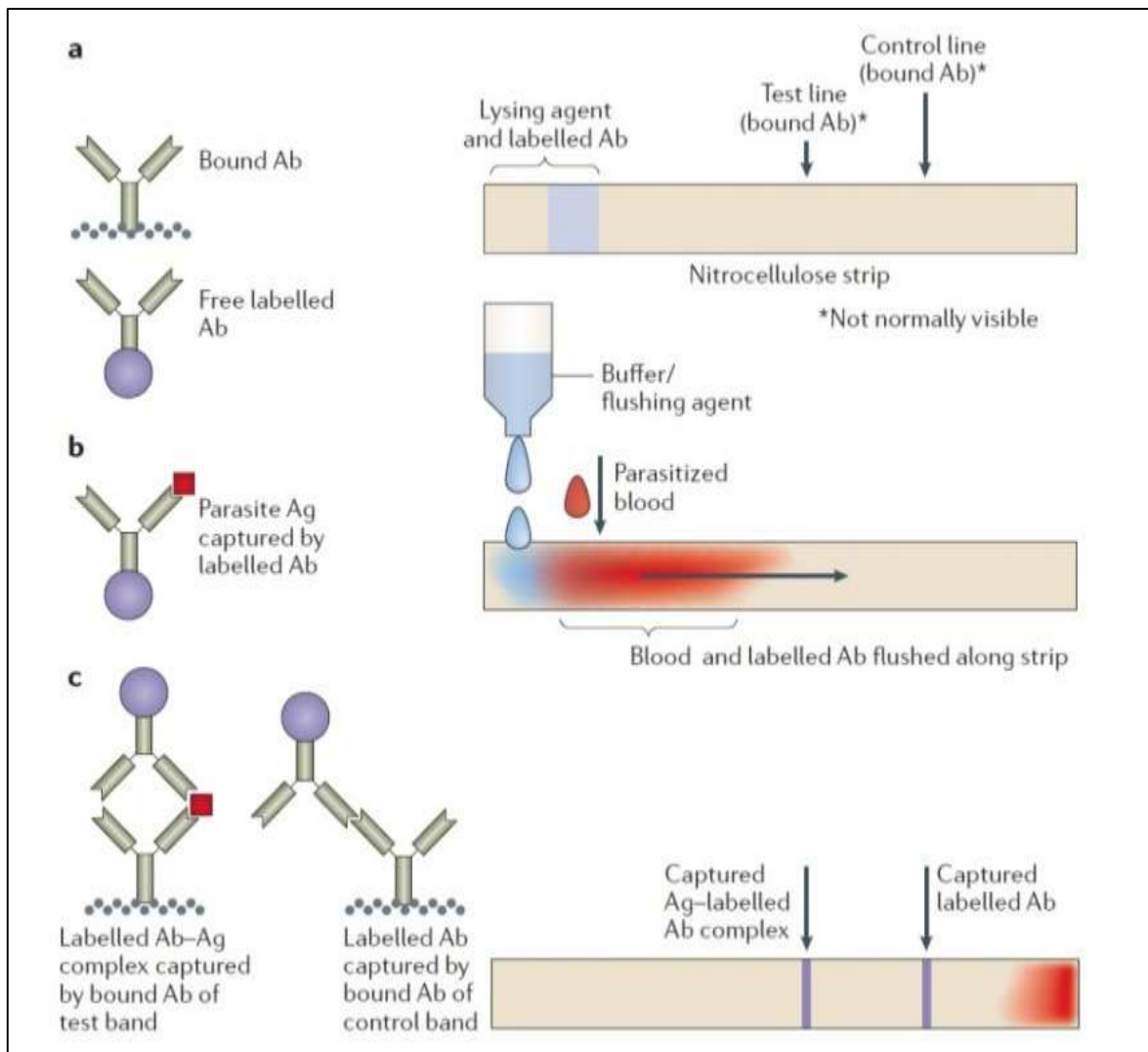


Figure 5 : Principe des TDR

Source : Bell et al. *Nature reviews microbiology* – 2006

Principe d'un test immunochromatographique

Phase 1 : Hémolyse et reconnaissance de l'antigène par l'anticorps marqué (Figure 5b)

Une fois le sang transféré dans le puits d'échantillon, la première étape du test consiste à mélanger le sang du patient avec un agent lysant dans le même puits ou dans un puits différent (tampon).

La rupture des hématies qui en résulte libère davantage la protéine plasmodiale recherchée.

L'anticorps marqué, présent dans le puits ou sur la bandelette peut alors se fixer sur l'antigène cible et former un complexe antigène-anticorps.

Phase 2 : Migration du complexe antigène-anticorps et de l'excès d'anticorps marqué libre le long de la bandelette de nitrocellulose (Figure 5b)

Le sang et le tampon déposés sur la bandelette ou dans le puits se mélangent avec l'anticorps marqué et sont entraînés le long de la bandelette jusqu'aux lignes d'anticorps fixés.

Phase 3 : Fixation aux lignes test et témoin (Figure 5c)

Si l'antigène est présent, le complexe anticorps-antigène marqué est piégé sur la ligne test.

Le reste des anticorps marqués est piégé sur la ligne témoin. Si suffisamment d'anticorps marqués s'accumulent, le marqueur coloré devient visible à l'œil nu et forme une mince ligne.

La ligne contrôle est un témoin permettant de valider le test et d'attester de la bonne conservation du TDR.

Les différents types de TDR

Depuis leur développement au début des années 2000, le nombre de kits commerciaux visant à diagnostiquer le paludisme n'a cessé de croître et atteint aujourd'hui plusieurs dizaines.

Ces kits diffèrent par : i) les antigènes ciblés, ii) le nombre d'antigènes recherchés, et iii) les industriels qui les commercialisent et les ont mis au point.

Les antigènes ciblés par les TDR paludisme actuellement sur le marché sont les suivants :

- la protéine-2 riche en histidine (HRP2) ;
- la lactate déshydrogénase (LDH) ;
- l'aldolase.

Ces protéines synthétisées par les plasmodies sont identifiées à l'aide d'anticorps de capture qui ciblent des antigènes communs à plusieurs espèces plasmodiales comme l'aldolase ou la pan-pLDH permettant d'écartier ou de confirmer le diagnostic d'accès palustre sans préciser l'espèce (bande dite Pan, aspécifique) ou des antigènes spécifiques d'une seule espèce comme par exemple Pf-HRP2 signant un accès à *P. falciparum* ou Pv-pLDH un accès à *P. vivax*. (Tableau 2).

Tableau 2 : Les différentes cibles antigéniques en fonction des espèces plasmodiales

Espèces plasmodiales	Pf-HRP2	pLDH			Aldolase
		Pf-pLDH	Pan-pLDH	Pvom-pLDH	
<i>P. falciparum</i>	X	X	X		X
<i>P. vivax</i>			X	X	X
<i>P. malariae</i>			X	X	X
<i>P. ovale</i>			X	X	X
<i>P. knowlesi</i>			X		X

HRP2: protéine 2 riche en histidine; pLDH: lactate-déshydrogénase plasmodiale; Pf: *Plasmodium falciparum*; pan : ensemble des espèces de *Plasmodium*; Pvom: Antigène spécifique de *Plasmodium vivax, ovale et malariae*; Pv: *Plasmodium vivax*.

Les différents types de TDR disponibles sur le marché peuvent être :

- Simples, à deux bandes, une bande pour le contrôle et une ciblant un antigène
- Combinés, à plusieurs bandes,
 - o A trois bandes : une bande control, une bande spécifique de Pf, et une autre bande de spécificité variable. Pour la détection de *P. falciparum* les anticorps anti-PfHRP2 ou Pf-pLDH peuvent être utilisés.

A cette bande, peut être associée une bande non spécifique d'espèces (bande Pan = anti-pan-pLDH ou anti-aldolase), ou une spécifique d'espèces (ex : anti-pLDH spécifique d'espèces).

- o A quatre bandes où l'on peut retrouver l'association des trois types d'anticorps :
 - i) bande contrôle, ii) spécifique de *P. falciparum* (bande Pf), iii) non spécifique d'espèce (bande Pan) et iv) spécifique d'espèce non *falciparum*.

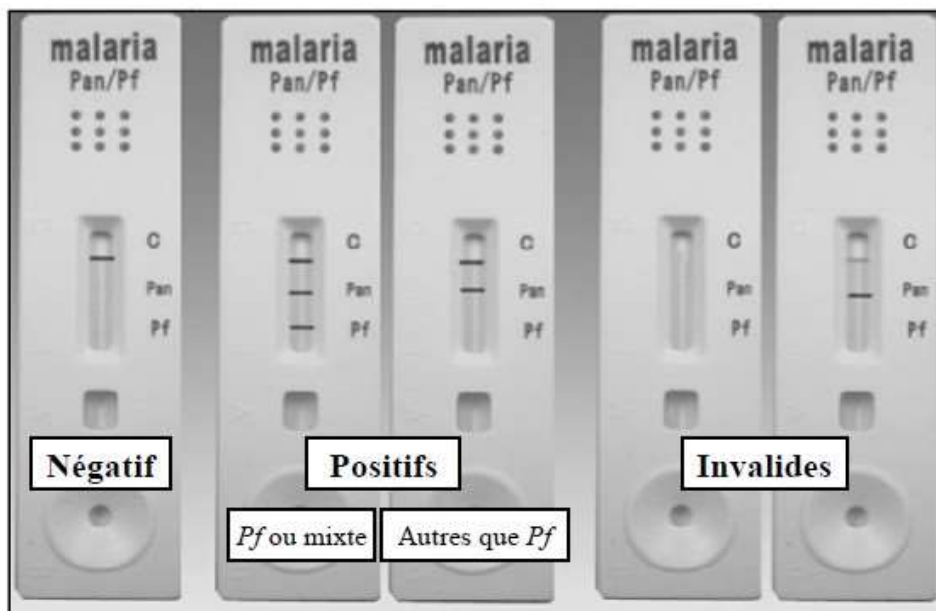


Figure 6 : Exemple d'interprétation des TDR

Source : Bell et al. Nature reviews microbiology – 2006

3.7 Stratégies de lutte contre le paludisme

3.7.1 La prise en charge des cas de paludisme non compliqué et grave

Les cas de paludisme sont pris en charge au niveau des structures sanitaires. L'OMS recommande l'utilisation des CTAs pour le traitement du paludisme non compliqué à chaque

fois que la voie orale est possible et l'artésunate par voie intraveineuse pour le traitement des cas de paludisme grave.

En l'absence d'artésunate, il est recommandé d'utiliser l'Artéméther de préférence à la Quinine [43].

Le gouvernement du Mali s'est engagé à assurer gratuitement le traitement de l'accès palustre chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes tout en fournissant les formations sanitaires en TDR et en CTA.

3.7.2. Les mesures préventives

Le traitement préventif intermittent (TPI), la chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) et la lutte anti-vectorielle (LAV) constituent les mesures de prévention contre le paludisme au Mali [44].

3.7.2.1 La prévention du paludisme pendant la grossesse

Le traitement préventif intermittent (TPI) avec la Sulfadoxine-Pyriméthamine est recommandé pour prévenir le paludisme pendant la grossesse.

Ce traitement est administré gratuitement à raison d'une cure supervisée par mois entre le 4ème et le 8ème mois de la grossesse [45]. Chaque cure est composée d'une prise unique de 3 comprimés de Sulfadoxine (500mg) et Pyriméthamine (25mg) chacun.

3.7.2.2. La chimio prévention du paludisme saisonnier :

La chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) est une nouvelle stratégie pour le contrôle du paludisme chez les enfants de moins de 5ans impliquant l'administration mensuelle de Sulfadoxine-Pyriméthamine + Amodiaquine (SP+AQ) pour la prévention du paludisme [43].

Elle est plus adaptée à des zones où le paludisme est saisonnier avec une transmission intense pendant trois ou quatre mois de l'année.

Cette CPS concerne les pays (en majorité Africains) qui répondent à ces critères et pour lesquels la SP et l'AQ conservent leur efficacité contre *P. falciparum*. SP+AQ a ainsi une

chimioprophylaxie d'environ quatre semaines, la protection diminue ensuite rapidement nécessitant un renouvellement du traitement chaque mois.

3.7.2.3 La vaccination contre le paludisme :

En Avril 2025, le Mali, à travers son Ministère de la Santé Publique a introduit le vaccin antipaludique dans son programme de vaccination de routine des enfants allant de 5 à 36 mois mettre ainsi en œuvre une approche hybride de vaccination. L'administration des trois premières doses mensuelles se fait tout au long de l'année en fonction de l'âge, suivie par la quatrième et cinquième doses administrées les années suivantes de manière saisonnière en mai ou juin avant le début de la forte transmission du paludisme[46].

3.7.3. La lutte antivectorielle

Le Mali a adopté les méthodes de lutte antivectorielle pouvant être utilisées au niveau individuel et communautaire pour protéger contre les piqûres de moustiques [45]. Il s'agit de :

- La promotion des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action
- Le traitement ciblé des gîtes larvaires
- La pulvérisation intra-domiciliaire
- La promotion de l'hygiène et de l'assainissement.

METHODOLOGIE

4. METHODOLOGIE

4.1 Lieu d'étude :

Notre étude a été réalisée dans 13 districts sanitaires au Mali, représentés sur le graphique ci-dessous :

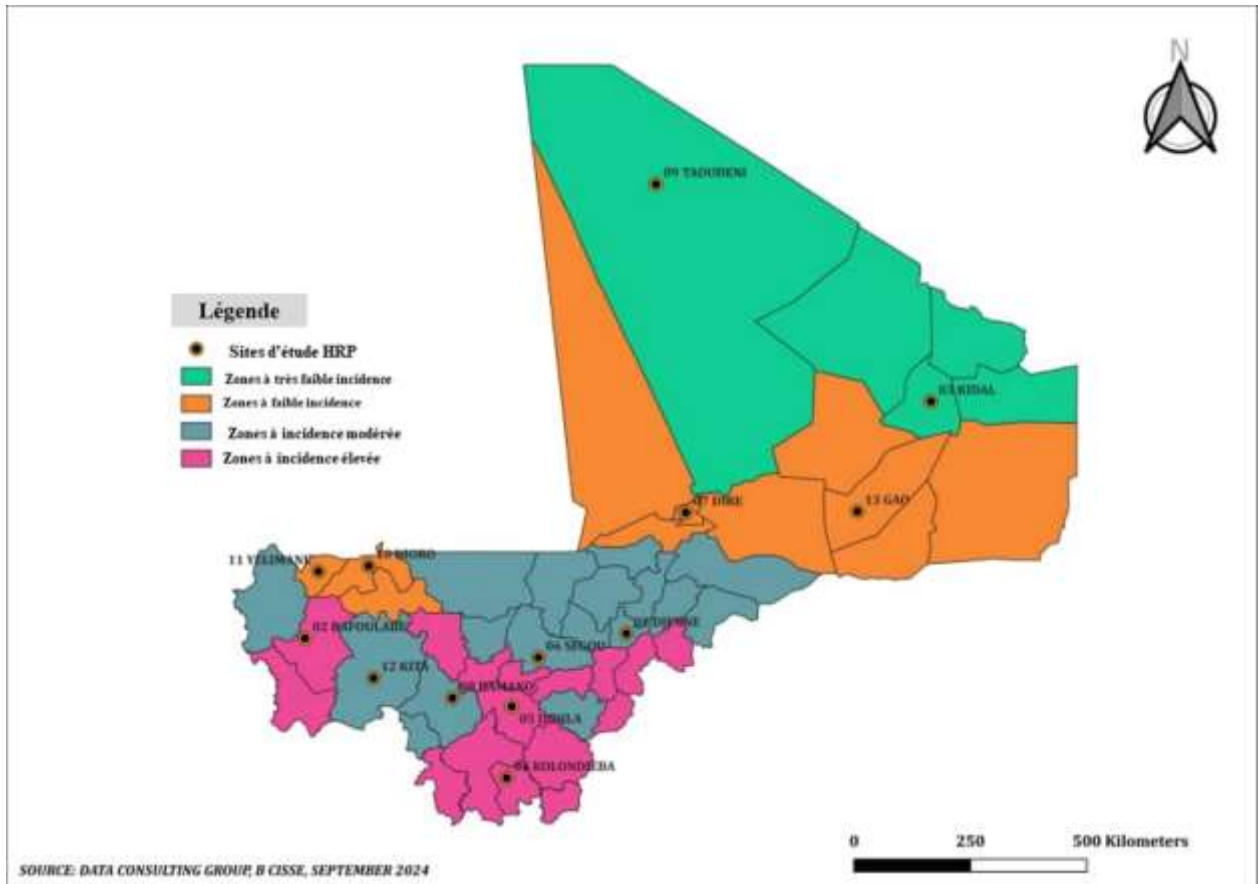


Figure 7 : zones d'études stratifiées en fonction de la transmission du paludisme au Mali

Le choix des 13 districts découle d'un échange avec le Programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) basé sur certains critères :

- Les faciès épidémiologiques,
- La disponibilité et l'accessibilité des centres,
- Sécuritaires

4.2 Type et période d'étude :

Nous avons réalisé une étude transversale prospective pendant la période de haute transmission du paludisme entre juillet et décembre 2023.

4.3 Population d'étude :

Tout patient consentant avec suspicion de paludisme se présentant dans les centres de santé sélectionnés.

Notre symptomatologie clinique comprenait les signes comme : la fièvre, les frissons, les maux de têtes, les douleurs musculaires ou articulaires, les vomissements et tous autres signes évoquant le paludisme.

4.4 Echantillonnage :

La taille d'échantillon estimée était de 22969 cas suspects de paludisme, obtenue à partir de l'étude mère.

Une étude ou les calculs de taille d'échantillons ont été effectués en collaboration avec Robert Verity avec le package DRpower® du logiciel R. Elle visait à collecter les échantillons de 5 à 10 grappes (cliniques) par district, soit 412 échantillons pour les 12 districts.

100 échantillons positifs par grappe (soit 6 grappes au totales) ont été ajoutés en provenance du district de Bamako, qui porte le total à 13 districts.

4.5 Critères de sélection et de non-sélection

4.5.1 Critère de sélection :

Nos analyses ont porté sur les échantillons qui ont montré une discordance de résultat entre les deux tests de TDR utilisés dans notre étude.

Définitions des termes :

- **Echantillons positifs** : un échantillon était dit positif lorsqu'il était positif à l'un des 2 TDR (HRP2 et pLDH).
- **Echantillons négatifs** : un échantillon était dit positif lorsqu'il était négatif aux 2 TDR.
- **Echantillons discordants** : Dans le cadre de notre étude, un échantillon était considéré comme discordant lorsque le TDR à HRP2 était négatif tandis que le TDR pLDH était positif.



Source : Image PDNA Bamako

Cette discordance entre les 2 TDR (HRP2 et pLDH) suggère principalement deux hypothèses :

- Une infection par une espèce de *Plasmodium* autre que *P. falciparum*
- Un cas de délétion du gène *Pfhrp2* d'où l'intérêt de l'analyse moléculaire

4.5.2 Critère de non-sélection :

- Échantillons avec TDRs HRP2 positifs
- Échantillons avec TDR HRP2 et pan LDH négatifs

4.6 Procédure d'étude :

4.6.1 Collecte de données et d'échantillons :

Les données et échantillons (confettis et TDR) ont été recueillis sur les sites par du personnel qualifié, préalablement formé.

Des explications ont été données à chaque participant potentiel, dans sa langue maternelle. Les participants ont ensuite donné leur consentement éclairé et fourni des informations (âge, sexe, lieu de résidence, l'utilisation du test de dépistage du paludisme et de médicaments antipaludiques au cours des 2 dernières semaines, le voyage dans une autre localité du pays au cours des 30 derniers jours) via un questionnaire.

4.6.2 Méthodes de laboratoire

A. Extraction d'ADN

Matériels et réactifs :

Blouse, paires de gants, paires de ciseaux, confettis, racks, plaque 96 puits, pipettes (10 – 100, 200, 1000), embouts (10, 20, 200, 1000), papier hygiénique, paillage, couverture à aluminium, centrifugeuse, agitateur thermique, congélateur.

L'extraction d'ADN de nos échantillons a été faite à partir du protocole de chelex[®].

Protocole de Chelex[®] :

Le principe repose sur l'utilisation d'une résine échangeuse d'ions appelée Chelex[®] 100, utilisé pour piéger les ions métalliques, les empêchant d'interférer avec l'extraction et la qualité de l'ADN.

- 1) Découper 6mm de diamètre du confetti puis mettre dans une plaque de 96 avec un échantillon par puit.
- 2) Ajouter 1ml de saponine 0,5% puis fermer la plaque avec la couverture à aluminium
- 3) Incuber à la température ambiante pendant toute la nuit (overnight).
- 4) Centrifuger à 4000 rpm pendant 2mns et enlever la saponine.
- 5) Ajouter 1ml de PBS 1X (étapes Z)
- 6) Répéter l'étape de centrifugation et l'étape Z jusqu'à ce que la solution soit claire
- 7) Ajouter 50µl de Chelex® 20%
- 8) Ajouter 100µl de NFW
- 9) Bien refermer la plaque
- 10) Incuber à 100° pendant 20mns puis centrifuger à 4000 rpm pendant 2mn
- 11) Prendre 120µl de surnageant qui contient l'ADN
- 12) Conserver à -20°C

NB : une fois les ADN extraits ils sont transférés dans des plaques pour être conservés à -20°

B. Analyse moléculaire :

Pour L'analyse de la délétion, les échantillons ont d'abord été testés par qPCR puis confirmés par la PCR classique pour détecter le genre *Plasmodium*, les échantillons positifs ont ensuite été soumis au diagnostic d'espèce toujours par la qPCR et la PCR classique ;

Enfin, seuls les échantillons positifs à *Plasmodium falciparum* par PCR ont été analysés pour la recherche des délétions des gènes *Pfhrp2et/3*

- PCR Classique :

Principe de la PCR classique :

Elle est basée sur l'amplification de manière exponentielle in vitro d'une séquence d'ADN en présence d'amorces spécifiques ; d'enzyme (Taq polymérase) ; de nucléotides et d'un milieu tampon.

Première amplification du gène rplu1,5 :

Préparation du mélange réactionnel (Buffer, Taq polymérase, dNTPs, MgCl₂) dans un tube 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction.

Répartir 21µl du mélange réactionnel préparer dans chaque puit et ajout de 4µl de l'ADN extrait.

Centrifuger brièvement la plaque puis placer la plaque bien fermée dans le thermocycleur pour l'amplification avec le programme adéquat.

Tableau 3 : Mélange réactionnel pour un volume final de 20 µl

Réactifs	Volume 1X reaction	Volume (µl) 1.1 X n. échantillon
Milieu tampon (2X)	10 µL	
Amorce sens (rPLU1)	1,25 µL	
Amorce anti sens (rPLU5)	1,25 µL	
ADN	5 µL	
Eau pour PCR	2,5 µL	
Volume final	20 µL	

Amorces de la première amplification :

rPLU 1 : 5' – TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA – 3'

rPLU 5 : 5' – CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC – 3'

NB : On multiplie le volume par tube par le total de tube à traiter sans oublier d'ajouter quelques volumes supplémentaires pour compenser d'éventuelles pertes.

Deuxième amplification :

Même principe mais avec une modification au niveau des amorces, du volume d'eau et de la Taq polymérase.

Tableau 4 : Mélange réactionnel de la deuxième amplification avec un volume final de 20 µL.

Réactifs	Vol for 1X reaction	Volume (µl) 1.1 X n. échantillon
Milieu tampon (2X)	10 µL	
Amorces sens (rFAL 1, rMAL 1, rVIV 1 and rOVA 1) 10 µM	0,25 µL	
Amorces anti-sens (rFAL 2, rMAL 2, rVIV 2 and rOVA 2) 10 µM	0,25 µL	
ADN	2 µL	
Eau pour PCR	7,50 µL	
Volume final	20 µL	

Amorces de la deuxième amplification [47]:

Espèces	Sequences Oligo (5'--3')	Taille (pb)
<i>Plasmodium Falciparum</i>	rFAL 1 : – TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT –	205
	rFAL 2 : – ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC –	
<i>Plasmodium malariae</i>	rMAL 1 : – ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC –	144
	rMAL 2 : – AAA ATT CCC ATG CAT AAA TTA TAC AAA –	
<i>Plasmodium Vivax</i>	rVIV 1 : – CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAG TGA TAC –	117
	rVIV 2 : – ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA –	
<i>Plasmodium Ovale Curtis</i>	rOVA 1 : – ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA –	787
	rOVA 2 : – GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG –	

Les produits de la PCR2 obtenus ont été ensuite soumis à l'électrophorèse après migration sur gel.

PCR quantitative ou PCR en temps réel :

Technique permettant la détection et la quantification d'une séquence d'ADN en temps réel à l'aide des Fluorophores (c'est-à-dire à chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent).

L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité d'ADN cible.

Principe :

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR conventionnelle) ou au cycle < 40 (PCR semi quantitative).

Un test qPCR multiplex a été conçu en utilisant trois tests TaqMan différemment marqués détectant le *Pfhrp2* (Pf3D7_0831800) et les gènes *Pfhrp3* (Pf3D7_1372200) et le gène à copie unique *Pfmr2e2* (Pf3D7_105800) comme contrôle interne.

Seuls les échantillons avec un **Cq** compris entre 18 et 37,5 pour le contrôle interne, *pfrnr2e2*, ont été considérés comme éligibles pour l'analyse du statut de suppression de *Pfhrp2/3*.

Ces tests multiplexés identifient de manière correcte les souches de *P. falciparum* portant des délétions connues de *Pfhrp2* (souche PfDD2) et *Pfhrp3* (souche PfHb3) ainsi qu'une souche sans délétion (souche PfNF54) et ces souches étaient nos contrôles

Le milieu réactionnel pour la qPCR était formé par :

Le MASTER MIX (composé du Mg Cl, Buffer, dNTPs, Taq polymérase) déjà préparé, H₂O ainsi que les Amorces et les Probes (fluorescents).

Tableau 5 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour le test qHRP2/3-del [8]

Gène cible	Taille	Nom de l'oligo	Séquence oligo [5' à 3']	Fluorophores	Conc. en 5×Mélange
<i>Pfrrnr2e2</i> (PF3D7_1015800)	107 pb	IC-PfRNR2E2 forw	AGTATCCAAAACACTATAATTCCA AGTAC	—	1,5 µM
		IC-PfRNR2E2 rev	ATTTTTCCTTTCTTAACAGTTTCTT CC	—	1,5 µM
		IC-PfRNR2E2 Cy5	CCTTTTAGTTGCCCCGAATTTACA A	Cy5-BHQ2	1,125 µM
<i>phrp2</i> (PF3D7_0831800)	286 pb	PfHRP2 forw	GTATTATCCGCTGCCGTTTTTGCC	—	1,5 µM
		PfHRP2 rev ^b	TCTACATGTGCTTGAGTTTCG	—	1,5 µM
		PfHRP2 TxRd	TTCCGCATTTAATAATAACTTGTGT AGC	TexasRed-BHQ2	0,375 µM
<i>phrp3</i> (PF3D7_1372200)	289 pb	PfHRP3 forw	ATATTATCCGCTGCCGTTTTTGCT	—	1,5 µM
		PfHRP3 rev	CCTGCATGTGCTTGACTTTCGT	—	1,5 µM
		PfHRP3 YY	CTCCGAATTTAACAATAACTTGTTT AGC	YakimaJau ne-BHQ2	0,75 µM

Tableau 6 : Mélange réactionnel pour un volume final de 10 µl

Réactifs	Volume par réaction en (µl)	Volume (µl) 1,1 x n. échantillon
----------	-----------------------------	----------------------------------

Master Mix	5	
Primers Mix 5x (Amorces + Probes)	2	
H2O	1	
ADN	2	

Une fois le mélange réactionnel préparé (10 µl comme volume final) ; répartir 8µl dans chaque puit puis ajout de 2µl de l'ADN extrait.

Gestion des données et analyse statistique :

Les données ont été saisies sur le Microsoft® Access® 365

L'analyse finale a été exécutée sur le logiciel R pour calculer les différentes prévalences des délétions de gènes.

Considérations éthiques :

Le protocole de recherche a été soumis et approuvé par le comité d'éthique de l'USTTB. Aucun sujet déclinant de participer à l'étude n'a été inclus. Le consentement libre et éclairé de tous les participants a été obtenu.

RESULTATS

5. Résultats

5.1 Nombre de cas inclus :

Parmi les cas de paludisme présumés dans les 13 districts sanitaires, 6975 (30 %) se sont révélés positifs aux TDR (HRP2 et pLDH) et parmi les résultats positifs, 100 patients (1.4%) ont montré de la discordance avec les deux tests de TDR et ont constitué notre échantillon d'étude.

5.2 Fréquence des patients en fonction du sexe chez les discordants :

Notre population d'étude avait une légère prédominance masculine (figure 8) sans différence considérable.

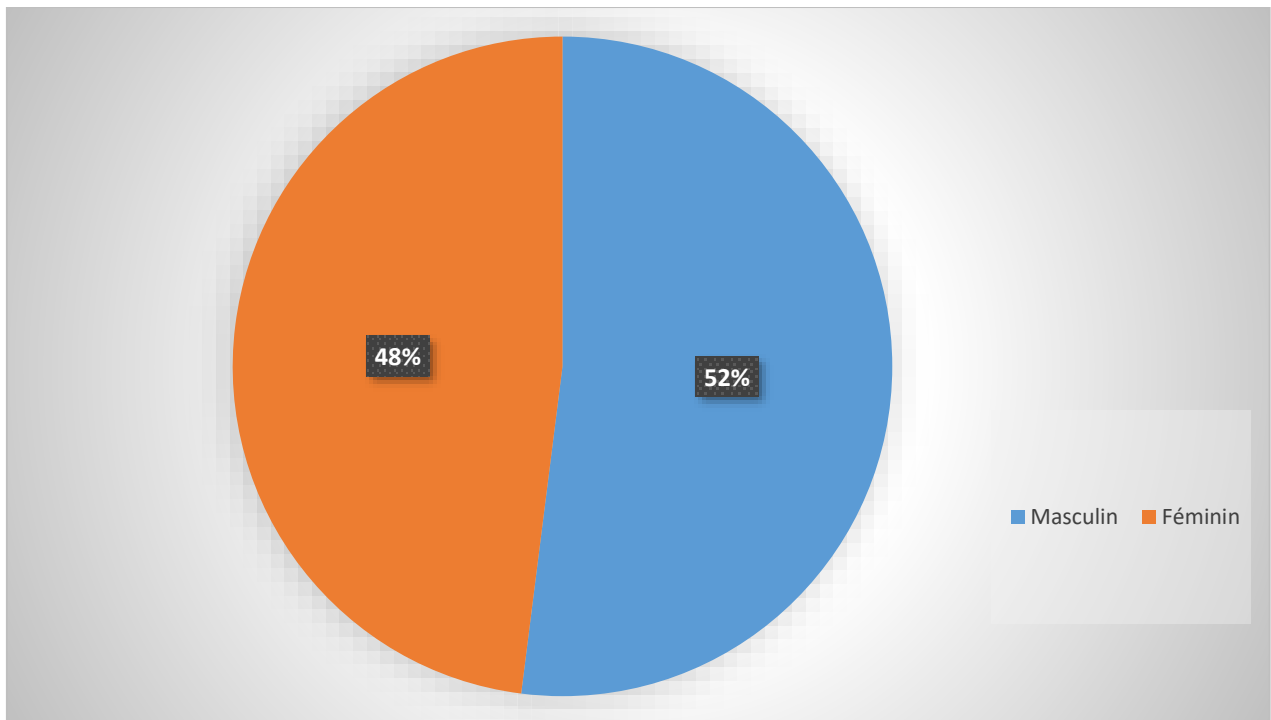


Figure 8 : Répartition des sexes parmi les discordants

5.3 Distribution des discordants dans les 13 districts :

Les échantillons discordants ont été retrouvés dans tous les 13 districts sanitaires du Mali à des proportions différentes (Figure9)

Il existe une variation considérable du nombre d'échantillons discordants d'une localité à l'autre. Certaines localités comme Diré, Djenne et Taoudéni étaient bien représentées, tandis que les localités de Kidal et Yelimané étaient faiblement représentées.

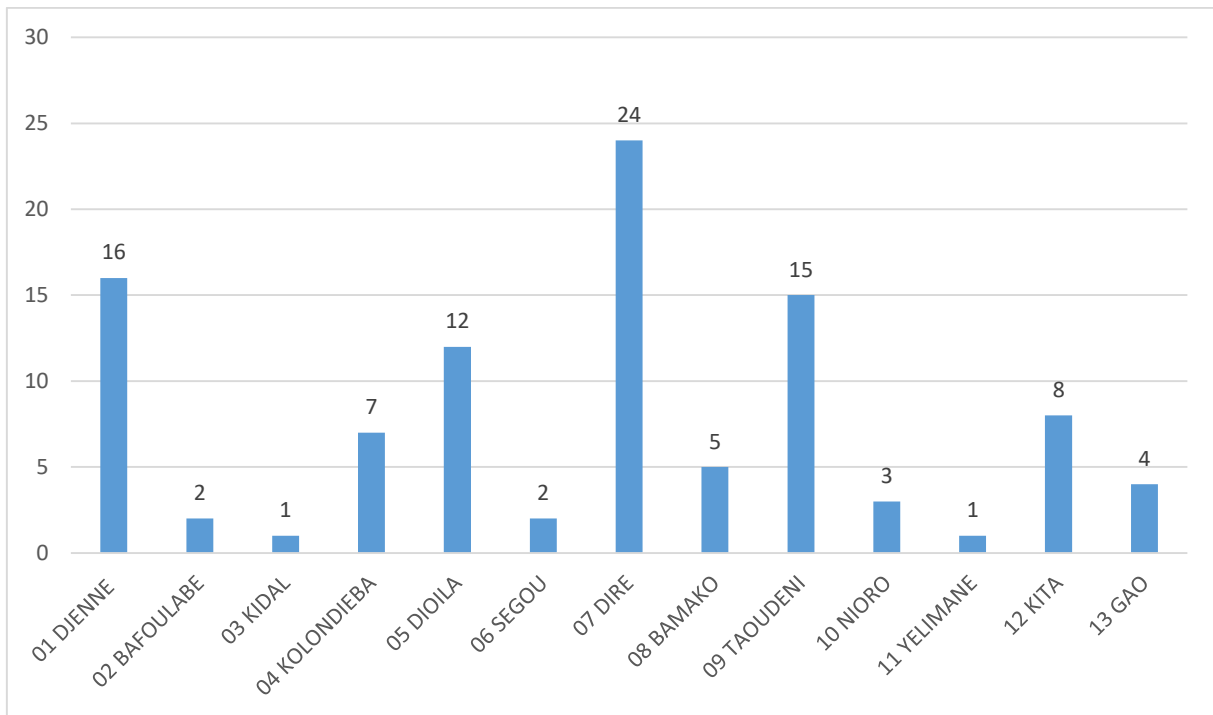


Figure 9 : Distribution des échantillons discordants dans les 13 districts sanitaires

5.4 Répartition des échantillons positifs aux TDR dans les 13 districts :

La figure 10 montre le nombre d'échantillons positifs aux TDR dans les 13 districts, Bafoulabé (1019), Dioila (1009) et Kolondiéba (974) étaient les districts ayant les plus grands nombres de cas de positifs par contre les districts de Yelimané (137), Taoudéni (41) et Kidal (41) ont enregistré moins de cas.

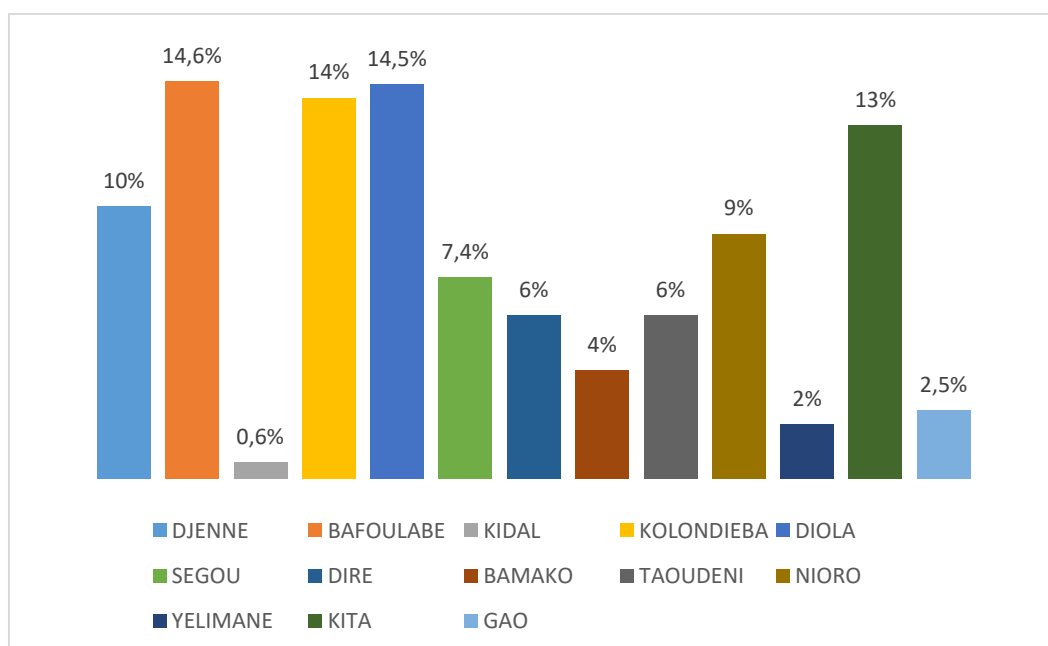


Figure 10 : Echantillons positifs aux TDR par districts

5.5 Fréquence des échantillons positifs au genre *Plasmodium* et à *Plasmodium falciparum* :

La figure 11 montre que sur nos échantillons discordants 85% étaient positifs au genre *Plasmodium* tandis que 15% étaient négatifs.

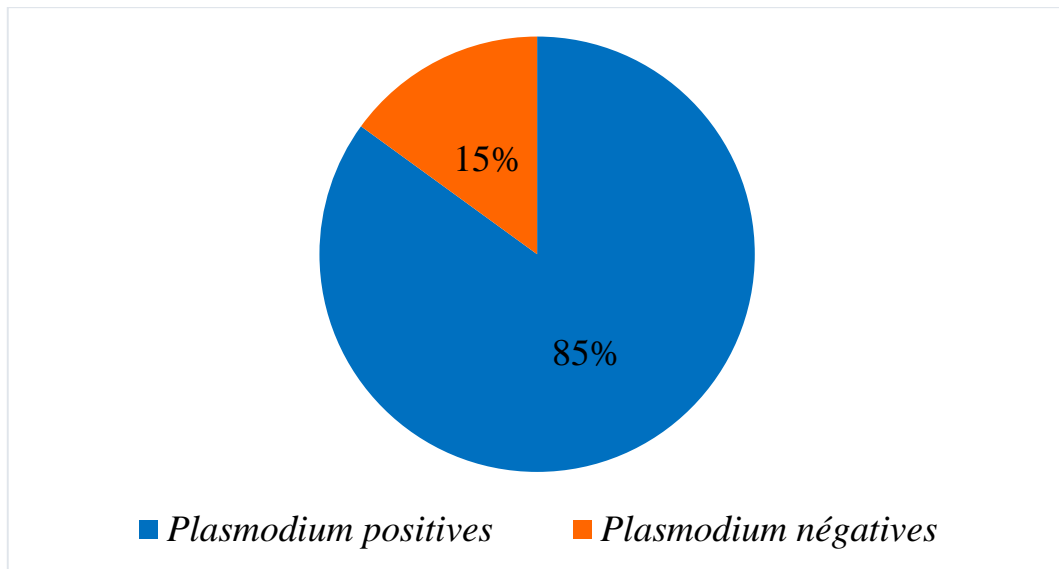


Figure 11 : Positivité des tests discordants au genre *Plasmodium*

Pour le diagnostic d'espèce (figure 12) environ 24% étaient positifs à l'espèce *Plasmodium falciparum* et les 76% restant pourraient être attribués aux autres espèces du *Plasmodium*.

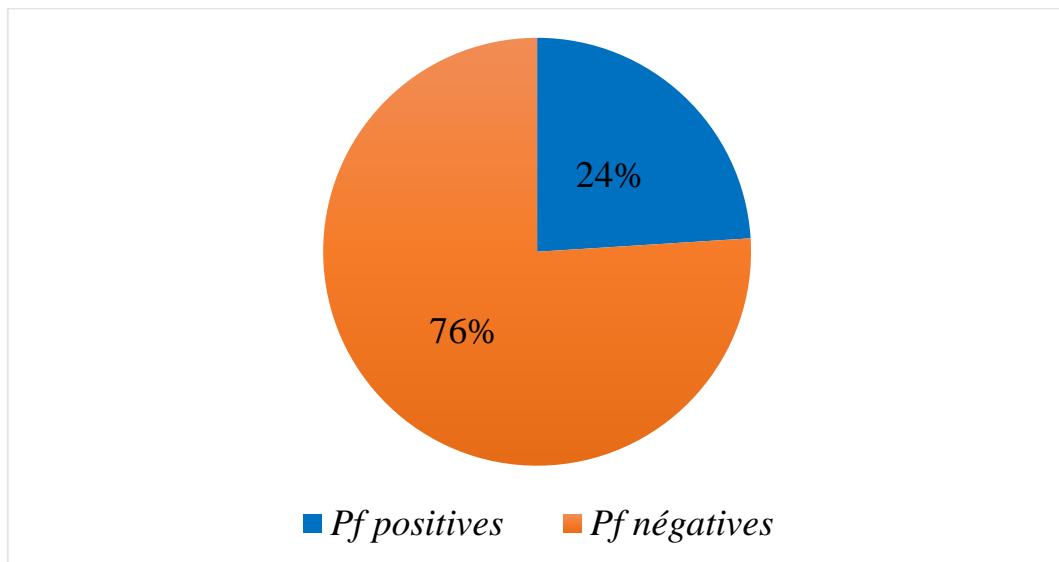


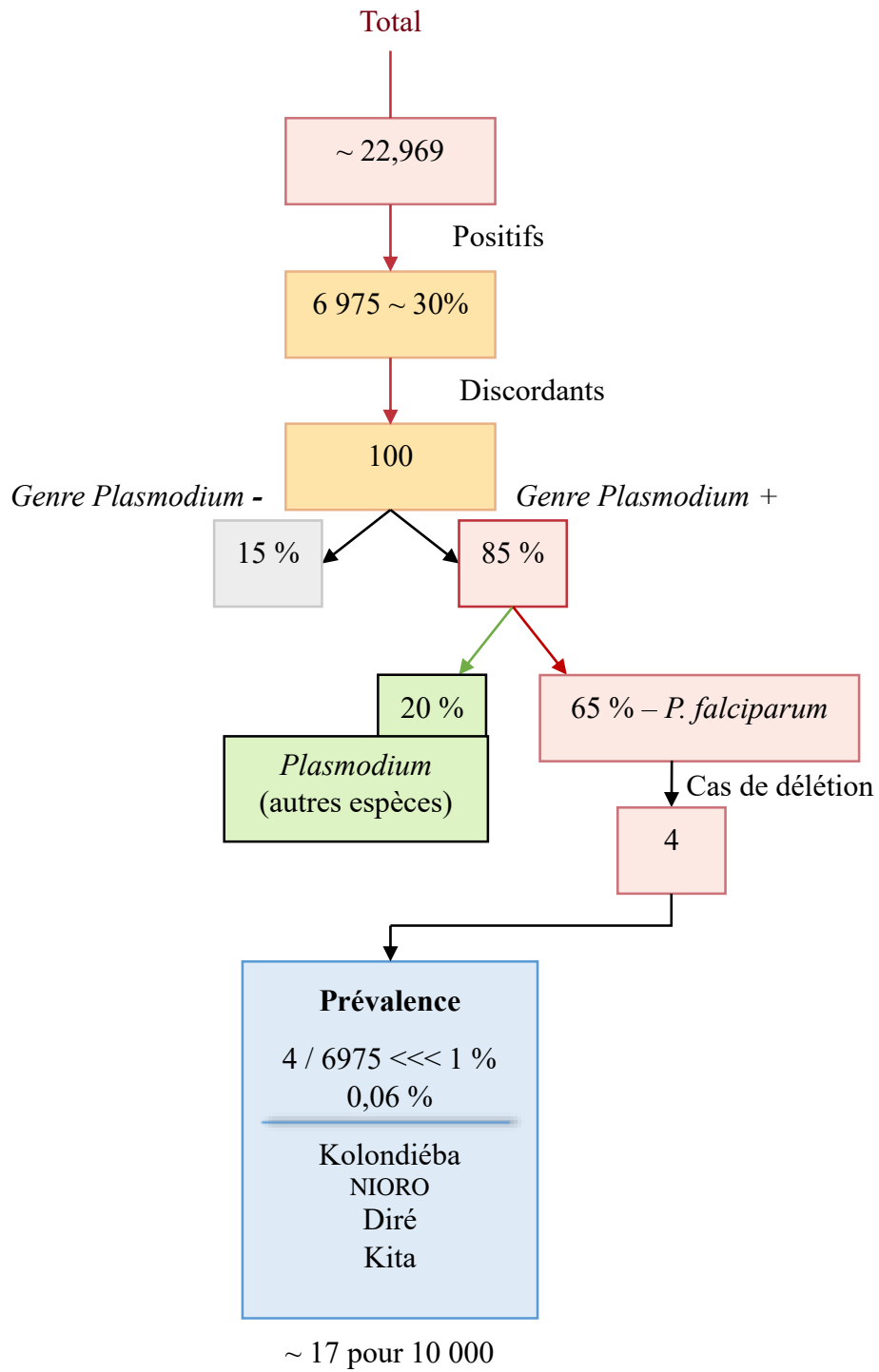
Figure 12 : Positivité de l'espèce *P.falciparum* parmi les discordants

5.6 Résultat de l'analyse de la délétion des gènes *Pfhrp2 et/3* parmi les discordants à *P. falciparum*

Le tableau ci-dessous fait état de 4 cas de délétions, soit (2 pour *Pfhrp3*, 1 pour le *Pfhrp2* et 1 pour *Pfhrp2/3*) répartis respectivement dans les centres de santé de Kolondieba, Dire, Niore et Kita.

Tableau 7 : Détection multiplex des gènes *PfHRP2* et *PfHRP3* dans les échantillons discordants

Génotypes	CENTRES DE SANTEs									
	DJENNE (n=1)	BAFOULABE (n=2)	KOLONDIÉBA (n=4)	DIOLA (n=3)	DIRE (n=5)	BAMAKO (n=1)	TAOUDENI (n=1)	NIORO (n=1)	KITA (n=2)	Délétion
<i>Pfhrp2+</i> / <i>Pfhrp3+</i>	1	2	3	3	4	1	1	0	1	
<i>Pfhrp2+</i> / <i>Pfhrp3-</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
<i>Pfhrp2-</i> / <i>Pfhrp3+</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Pfhrp2-</i> / <i>Pfhrp3-</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	1	2	4	3	5	1	1	1	2	4



6. Commentaires et discussion :

Cette étude visait à évaluer la prévalence des délétions des gènes *Pfhrp2* et *Pfhrp3* au Mali. L'étude a été menée sur 22 696 patients provenant de 13 districts de santé, dont 6 975 étaient positifs aux deux tests TDR. Parmi ces positifs, 100 tests se sont révélés discordants pour les tests (TDR HRP2 et pLDH)

La distribution géographique des échantillons discordants montre que les districts de Diré, Djenné et Taoudéni étaient les plus représentatifs, tandis que ceux de Bafoulabé, Ségou, Yelimané et Kidal étaient sous-représentés. Une telle variation peut être attribuée à des différences dans l'accès aux services de santé dans certaines zones du pays et aux différences épidémiologiques régionales.

Concernant la répartition du nombre total d'échantillons positifs aux tests de diagnostic rapide dans les 13 districts sanitaires. On observe une forte variation géographique des cas détectés, les districts de Bafoulabé (1019), Dioila (1009) et Kolondiéba (974) enregistrent les plus hauts taux de positivité. Cette prédominance peut s'expliquer par une transmission plus intense du paludisme dans ces zones,

Une accessibilité ou couverture sanitaire active (une meilleure couverture des campagnes de dépistage communautaire peut augmenter le nombre de tests réalisés donc plus que détectés) et aussi la présence des facteurs socio-environnementaux

A l'inverse, des districts comme Yelimané (137), Taoudéni (41) Kidal (41) présentent un nombre beaucoup plus faible de cas de positifs. Cela pourrait s'expliquer par :

- Une faible transmission dans ces zones,
- Une densité de population plus faible,
- Accès plus limité au dépistage, entraînant sous-diagnostic
- Sécuritaire et enfin les conditions de conservation des TDR

L'analyse qPCR a révélé que 15 % des échantillons discordants étaient négatifs pour *Plasmodium*. Ceci pourrait être attribué à une différence de cible entre les deux tests ou à des erreurs techniques liée à la qPCR.

En parallèle, 24 % des échantillons discordants étaient positifs pour *P. falciparum*. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés au Sénégal par Wurtz et al. (2013) [48], qui avaient

trouvé une faible proportion de parasites avec délétions *pfhrp2*, particulièrement chez des patients asymptomatiques avec de faibles charges parasitaires.

Cette faible prévalence des échantillons positifs au *P. falciparum* pourrait être attribuée au nombre de cas discordants relativement faible dans notre étude ou soit à une autre infection que *P. falciparum*.

Concernant la prévalence des délétions des gènes *Pfhrp2/3*, nous avons identifié quatre cas (0.06%) : un cas de délétion *Pfhrp2*, un cas de délétion *Pfhrp3* et deux cas de double délétion *Pfhrp2/3*.

Comparativement aux études antérieures, nos résultats sont similaires à ceux de Sabin S Nundu et al. au RDC [49] (avec 4 cas de délétions soit 0.08%) et celui de Rebecca Thomson et al.[50] (5 cas de délétions sur ces échantillons de Tanzanie)

Parmi les 4 cas de délétions : 3 cas étaient du gène *Pfhrp2* et 1 cas du gène *Pfhrp3*

Pour les 5 cas de délétions : 3 cas de *Pfhrp2* et 2 cas de *Pfhrp3*

Par contre nos résultats sont inférieurs à ceux de Koïta et al.[7] (2012) et Casimire Tarama et al. [51] (2023) réalisée au Burkina, qui ont respectivement rapporté :

10 (2%) et 11 (4.4%) cas de délétions (tous en *Pfhrp2*). Cette différence pourrait être attribuée aux méthodologies utilisées :

PCR nichée, la microscopie, le séquençage avec protocole illumina ont été utilisés dans l'étude Burkinabè, Population d'étude (uniquement des enfants asymptomatiques dans l'étude Burkinabè), et aussi au nombre d'échantillons discordants analysés,

Nos résultats sont néanmoins supérieurs à celui de Ruthly François et al. [52] qui n'ont trouvé aucun cas de délétion dans la province de Kinshasa, République Démocratique du Congo. Cela pourrait être expliqué par des disparités méthodologiques (lieu d'étude limité uniquement dans la province de Kinshasa, seulement les échantillons avec une forte densité ont été testées) une sensibilité variable des outils de détection ou une hétérogénéité spatiale dans l'émergence des souches porteuses de délétions.

La présence de délétions *Pfhrp2/3* pose un défi majeur à l'utilisation des TDR basés sur la détection de la protéine HRP2.

Par ailleurs, ces résultats renforcent la nécessité d'une surveillance moléculaire accrue notamment dans les zones où les délétions ont été observées. Des études plus approfondies sont nécessaires pour comprendre l'impact de ces délétions sur les tendances cliniques et thérapeutiques du paludisme, notamment en ce qui concerne l'efficacité des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACTs).

Ensuite, la sensibilité des TDR peut varier en fonction des conditions environnementales et de la charge parasitaire, ce qui peut influencer la détection des parasites. Enfin, bien que la qPCR soit une méthode de référence pour la détection des délétions *Pfhrp2/3*, la confirmation des résultats par séquençage génomique approfondi serait souhaitable pour mieux caractériser les mutations associées à ces délétions.

Notre étude présentait certaines limites à savoir : l'absence de l'utilisation du séquençage pour valider les délétions, la taille réduite de l'échantillon analysé pour les délétions (seulement 100) et enfin les limites techniques liées aux TDR et à la qPCR.

CONCLUSION

7. Conclusion :

Cette étude met en évidence une prévalence extrêmement faible (0,06%) des délétions des gènes *Pfhrp2* et */3* au Mali. Néanmoins elle met en évidence le besoin d'une surveillance continue des délétions dans les zones à risque afin de circonscrire la propagation à l'échelle nationale.

8. Recommandations :

Nous recommandons au terme de notre étude :

➤ Aux autorités sanitaires :

- Maintenir l'utilisation des TDR à HRP2 comme outil de diagnostic du paludisme, car leur performance reste acceptable à ce niveau de délétion.
- Renforcer la surveillance nationale des délétions *Pfhrp2* et *Pfhrp3*, surtout dans les zones où ces délétions ont été détectées.

➤ Aux personnels de santé :

- Former les agents de santé à respecter les procédures de réalisation de ces TDR, comme indiqué par le fabricant et à bien interpréter les résultats de TDR.
- Faire une confirmation par microscopie des cas de TDR négatifs lorsque les signes cliniques du paludisme sont persistants chez le malade afin d'éviter les faux négatifs.

➤ Aux chercheurs :

- Poursuivre les recherches sur la dynamique des délétions *Pfhrp2* et *Pfhrp3*.

9. REFERENCES

1. Organisation Mondiale de la Santé. Rapport de l’OMS sur le paludisme. 2024.
2. Institut National de la Statistique. . EIP Mali 2021(INSTAT), PNLP. Enquête sur les Indicateurs du Paludisme au Mali 2021.Cited 2022 août p. 193. 2021.
3. M. Diallo I. Lutte contre le paludisme : L’innovation choisie pour mener une riposte à la maladie. [Internet]. 2022 [cited 2023 Nov 22. 2024.
4. World Organisation Health. World Malaria Report. 2021 p. 322.
5. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PLoS One*. 25 janv 2010;5(1):e8091.
6. Bharti PK, Chandel HS, Ahmad A, Krishna S, Udhayakumar V, Singh N. Prevalence of *pfhrp2* and/or *pfhrp3* Gene Deletion in *Plasmodium falciparum* Population in Eight Highly Endemic States in India. *PLoS One*. 2016;11(8):e0157949.
7. Koita OA, Doumbo OK, Ouattara A, Tall LK, Konaré A, Diakité M, et al. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the *hrp2* gene. *Am J Trop Med Hyg*. févr 2012;86(2):194-8.
8. Abdallah JF, Okoth SA, Fontecha GA, Torres REM, Banegas EI, Matute ML, et al. Prevalence of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions in Puerto Lempira, Honduras. *Malar J*. 21 janv 2015;14:19.
9. Amoah LE, Abankwa J, Oppong A. *Plasmodium falciparum* histidine rich protein-2 diversity and the implications for PfHRP 2: based malaria rapid diagnostic tests in Ghana. *Malar J*. 18 févr 2016;15:101.
10. Murillo Solano C, Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Pava Z, Dorado E, Incardona S, et al. Deletion of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (*pfhrp2*) and Histidine-Rich Protein 3 (*pfhrp3*) Genes in Colombian Parasites. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131576.
11. Dorado EJ, Okoth SA, Montenegro LM, Diaz G, Barnwell JW, Udhayakumar V, et al. Genetic Characterisation of *Plasmodium falciparum* Isolates with Deletion of the *pfhrp2* and/or *pfhrp3* Genes in Colombia: The Amazon Region, a Challenge for Malaria Diagnosis and Control. *PLoS One*. 16 sept 2016;11(9):e0163137.
12. Li P, Xing H, Zhao Z, Yang Z, Cao Y, Li W, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in the China-Myanmar border area. *Acta Trop*. déc 2015;152:26-31.
13. Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Ceron N, Adhin MR, Chandrabose J, Krishnalall K, et al. Variation in *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (*Pfhrp2*) and *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 3 (*Pfhrp3*) Gene Deletions in Guyana and Suriname. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126805.

14. Wurtz N, Fall B, Bui K, Pascual A, Fall M, Camara C, et al. Pfhrrp2 and pfhrrp3 polymorphisms in Plasmodium falciparum isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. *Malar J.* 24 janv 2013;12:34.
15. Berhane A, Anderson K, Mihreteab S, Gresty K, Rogier E, Mohamed S, et al. Major Threat to Malaria Control Programs by Plasmodium falciparum Lacking Histidine-Rich Protein 2, Eritrea. *Emerg Infect Dis.* mars 2018;24(3):462-70.
16. M. Maiga PAK. Intérêts du TDR palus(TDR) dans le diagnostic du paludisme chez les nourrissons de 0 à 59 mois et les femmes enceintes dans le district de Bamako : cas de la commune VI. 2012.
17. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Physiopathologie du paludisme. 2014.
18. Rogier C, Henry MC, Trape JF. Evaluation épidémiologique du paludisme en zone d'endémie [Epidemiologic evaluation of malaria in endemic areas]. *Med Trop (Mars).* 2009 Apr;69(2):123-42.
19. MOUCHET, Jean, CARNEVALE, Pierre, COOSEMANS, Marc, et al. Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers santé*, 1993, vol. 3, p. 220-238.
20. PNL. Plan stratégique de lutte contre le paludisme, 2013-2017, PNL [Internet]. [cited 2023 Feb 3].
21. Paludisme : Définition, Symptômes, Diagnostic, Traitement, Prévention [Internet]. [cited 2023 Jan 30]. 2023.
22. Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. *Malar J.* 24 févr 2014;13:68.
23. Pages F, Orlandi-Pradines E, Corbel V. [Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection]. *Med Mal Infect.* mars 2007;37(3):153-61.
24. DEI-CAS, Eduardo, MAUROIS, Pierre, et VERNES, Alain. Physiopathologie du paludisme. 1986.
25. Severe Malaria Observatory. Pathophysiologie du paludisme grave. 2014.
26. DIA S. Epidémiologie du paludisme dans une zone soudanoguinéenne du Mali, Kambila cercle de Kati. 2011.
27. PONGPONRATN, Emsri, RIGANTI, Mario, PUNPOOWONG, Benjane, et al. Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1991, vol. 44, no 2, p. 168-175.
28. DIA S. Epidémiologie du paludisme dans une zone soudanoguinéenne du Mali, Kambila cercle de Kati. 2021.
29. Djibo A, Souna-Adamou A, Brah Bouzou S. [Blackwater fever in adults with sickle cell anemia. Two fatal cases]. *Med Trop (Mars).* 2000;60(2):156-8.

30. Severe and complicated malaria. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84 Suppl 2:1-65.
31. Organisation Mondiale de la Santé. Stratégies d'utilisation des antipaludiques : besoins de données, traitement du paludisme non compliqué et prise en charge du paludisme pendant la grossesse, rapport d'une consultation informelle, Genève. [Internet]. 1994 [cité 20 août 2024]. Disponible sur: <https://iris.who.int/handle/10665/59532>
32. Thellier M, Datry A, Alfa Cissé O, San C, Biligui S, Silvie O, et al. Diagnosis of malaria using thick bloodsmears: definition and evaluation of a faster protocol with improved readability. *Ann Trop Med Parasitol.* mars 2002;96(2):115-24.
33. PDF [Internet]. [cité 21 févr 2025]. Disponible sur: https://www.revues-ufhb-ci.org/fichiers/FICHIR_ARTICLE_1917.pdf
34. Howard RJ, Uni S, Aikawa M, Aley SB, Leech JH, Lew AM, et al. Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Cell Biol.* oct 1986;103(4):1269-77.
35. Houzé S. Rapid diagnostic test for malaria. *Bull Soc Pathol Exot.* févr 2017;110(1):49-54.
36. Véronique D. Haute Autorité de santé. 2016;
37. Mouatcho JC, Goldring JPD. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. *J Med Microbiol.* oct 2013;62(Pt 10):1491-505.
38. Baker J, Ho MF, Pelecanos A, Gatton M, Chen N, Abdullah S, et al. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. *Malar J.* 17 mai 2010;9:129.
39. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF). Prise en charge et prévention du paludisme d'importation. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation. Mise à jour 2017 des recommandations pour la pratique clinique 2007. 2017; 2017;
40. Bruneel F, Tubach F, Mira JP, Houze S, Gibot S, Huisse MG, et al. Imported *falciparum* malaria in adults: host- and parasite-related factors associated with severity. The French prospective multicenter PALUREA cohort study. *Intensive Care Med.* oct 2016;42(10):1588-96.
41. Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, Cheng Q, et al. Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. *J Clin Microbiol.* août 2006;44(8):2773-8.
42. False-negative RDT results and implications of new reports of *P. falciparum* histidine-rich protein 2/3 gene deletions [Internet]. [cité 21 févr 2025]. Disponible sur: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-GMP-2017.18>
43. Organisation Mondiale de la Santé. Lignes directrices de l'OMS sur le paludisme, 16 février 2021, Genève [Internet]. 2021 [cité 20 août 2024]. Disponible sur:

https://files.magicapp.org/guideline/d6d81915-587c-489a-ac9a-585692eac6b8/published_guideline_5542-1_0.pdf

44. Diarra NH. Amélioration de la qualité de la mise en œuvre de la chimio prévention du paludisme saisonnier : Recherche formative à Koulikoro au Mali en 2020. Mali Santé Publique. 4 août 2021;85-93.
45. PNLP. Programme National de Lutte contre le Paludisme. Plan stratégique de lutte contre le paludisme 2013-2017 [Internet]. 2013 [cité 20 août 2024]. 2013 2024.
46. OMS | Bureau régional pour l’Afrique. Le Mali devient le premier pays à utiliser une nouvelle approche hybride de vaccination pour lutter contre le paludisme. 2025 avr.
47. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. Am J Trop Med Hyg. avr 1999;60(4):687-92.
48. Wurtz N, Fall B, Bui K, Pascual A, Fall M, Camara C, et al. Pfhrrp2 and pfhrp3 polymorphisms in Plasmodium falciparum isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. Malar J. 24 janv 2013;12:34.
49. Nundu SS, Arima H, Simpson SV, Chitama BYA, Munyeku YB, Muyembe JJ, et al. Low prevalence of Plasmodium falciparum parasites lacking pfhrp2/3 genes among asymptomatic and symptomatic school-age children in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. Malar J. 19 avr 2022;21:126.
50. Thomson R, Beshir KB, Cunningham J, Baiden F, Bharmal J, Bruxvoort KJ, et al. pfhrp2 and pfhrp3 Gene Deletions That Affect Malaria Rapid Diagnostic Tests for Plasmodium falciparum: Analysis of Archived Blood Samples From 3 African Countries. J Infect Dis. 1 nov 2019;220(9):1444-52.
51. Assessing the histidine-rich protein 2/3 gene deletion in Plasmodium falciparum isolates from Burkina Faso | Malaria Journal | Full Text.
52. François R, Kashamuka MM, Banek K, Bala JA, Nkalani M, Kihuma G, et al. Plasmodium falciparum with pfhrp2/3 Deletion Not Detected in a 2018–2021 Malaria Longitudinal Cohort Study in Kinshasa Province, Democratic Republic of the Congo. Am J Trop Med Hyg. août 2023;109(2):273-6.

10. FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : SIDIBE

Prénom : Mandé

Nationalité : Malienne

Année de soutenance : 2025

Email : mandesidibe08@gmail.com

Directrice de thèse : Pr Aminatou KONE

Titre de la thèse : Evaluation de la délétion de *Pfhrp2* et *Pfhrp3* dans des échantillons Discordants à *Plasmodium falciparum* par les Tests de Diagnostic Rapide au Mali.

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie de l'U.S.T.T.B.

Secteurs d'intérêt : Santé publique, Parasitologie, Epidémiologie.

Résumé :

Le paludisme demeure une maladie endémique majeure au Mali, classée comme la première cause de morbidité et de mortalité, en particulier chez les enfants de moins de cinq ans. Dans ce contexte, les Tests de Diagnostic Rapide (TDR), basés sur la détection de la protéine PfHRP2 de *Plasmodium falciparum*, jouent un rôle crucial en raison de leur rapidité et de leur facilité d'utilisation. Cependant, l'efficacité de ces TDR est menacée par l'émergence de souches de *P. falciparum* qui ont perdu, par délétion, les gènes *Pfhrp2* et/ou *Pfhrp3* (codant pour PfHRP2 et PfHRP3). Ces délétions entraînent des résultats faussement négatifs aux TDR, compliquant le diagnostic et compromettant la prise en charge adéquate des patients, ce qui peut avoir des conséquences graves.

L'objectif principal de cette thèse était d'évaluer la prévalence de ces délétions génétiques dans des échantillons de patients maliens ayant obtenu des résultats discordants entre la clinique et le TDR. L'étude a analysé des échantillons provenant de 22 696 patients répartis dans 13 districts sanitaires, parmi lesquels 100 échantillons ont été identifiés comme discordants. L'analyse moléculaire par qPCR a révélé la présence de délétions de *Pfhrp2* et/ou *Pfhrp3* dans ces échantillons. Plus précisément, l'étude a identifié un cas de délétion *Pfhrp2* isolée, un cas

de délétion *Pfhrp3* isolée et deux cas de double délétion *Pfhrp2/3*. Les districts de Diré, Djenné et Taoudéni ont montré la plus forte proportion d'échantillons discordants.

L'étude met en évidence une prévalence extrêmement faible (0,06%) des délétions des gènes *Pfhrp2* et */3* au Mali. Néanmoins elle met en évidence le besoin d'une surveillance continue des délétions dans les zones à risque afin de circonscrire la propagation à l'échelle nationale. Cette veille permettra d'adapter les politiques de santé publique et de garantir une prise en charge efficace et pertinente des cas de paludisme, contribuant ainsi à la réduction de la morbidité et de la mortalité liées à cette maladie au Mali.

Mots clés : *Pfhrp2/3*, délétion, TDR, Mali

Name: SIDIBE

First Name: Mande

Nationality: Malian

Thesis Supervisor: Prof. Aminatou KONE

Year of Defense: 2025

Email: mandesidibe08@gmail.com

Thesis Title: Evaluation of *Pfhrp2* and *Pfhrp3* Gene Deletions in Discordant *Plasmodium falciparum* Samples by Rapid Diagnostic Tests in Mali

Place of Deposit: Library of the Faculty of Medicine and Odontostomatology, U.S.T.T.B.

Fields of Interest: Public Health, Parasitology, Epidemiology

Abstract :

Malaria remains a major endemic disease in Mali and is ranked as the leading cause of morbidity and mortality, particularly among children under five years of age. In this context, Rapid Diagnostic Tests (RDTs), based on the detection of the *PfHRP2* protein of *Plasmodium falciparum*, play a crucial role due to their rapidity and ease of use. However, the effectiveness of these RDTs is threatened by the emergence of *Plasmodium falciparum* strains that have lost, through deletion, the *Pfhrp2* and/or *Pfhrp3* genes (encoding *PfHRP2* and *PfHRP3*). These deletions lead to false-negative RDT results, complicating diagnosis and compromising appropriate patient management, which may have serious consequences.

The main objective of this thesis was to evaluate the prevalence of these genetic deletions in samples from Malian patients who obtained discordant results between clinical findings and RDTs. The study analyzed samples from 22,696 patients across 13 health districts, among which 100 samples were identified as discordant. Molecular analysis using qPCR revealed the presence of *Pfhrp2* and/or *Pfhrp3* deletions in these samples. More specifically, the study identified one case of isolated *Pfhrp2* deletion, one case of isolated *Pfhrp3* deletion, and two cases of double *Pfhrp2/3* deletion. The districts of Diré, Djenné, and Taoudéni showed the highest proportion of discordant samples.

The study highlights an extremely low prevalence (0.06%) of *Pfhrp2* and/or *Pfhrp3* gene deletions in Mali. Nevertheless, it emphasizes the need for continuous surveillance of these deletions in at-risk areas in order to limit their spread at the national level. This monitoring will make it possible to adapt public health policies and ensure effective and appropriate management of malaria cases, thus contributing to the reduction of malaria-related morbidity and mortality in Mali.

Keywords : *Pfhrp2/3*, deletion, RDT, Mali

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette faculté, de mes Chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure au nom de l'être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires. Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient. Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès sa conception. Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité. Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père. Que les hommes m'accorent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !