

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPÉRIEUR

REPUBLIQUE DU MALI

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI



Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako (USTTB)

FACULTE DE MEDECINE ET D'ODONTOSTOMATOLOGIE (FMOS)

Année universitaire 2016-2017

N°.....

Titre

Influence de la Persistance de *P. falciparum* et de la multiclonalité sur le risque de paludisme clinique à Kéniéroba, Mali.

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le...../...../2018

Devant la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie

**Par M. Amadou CISSE**

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine (DIPLOME D'ETAT)

**Jury**

**Président :** Professeur Souleymane DIALLO

**Membre :** Docteur Amadou NIANGALY

**Co-directeur :** Docteur Seïdina A.S. DIAKITE

**Directeur de thèse :** Professeur Mahamadou DIAKITE

## Dédicaces

### **Bismillâhir Rahmânir Rahîme**

**Au nom d'ALLAH le Tout Puissant le Très Miséricordieux.** Grand merci pour ta grâce et ton assistance de ma naissance à aujourd'hui. Ce travail vient de toi car la réussite de tout projet n'est que ta volonté. Paix et salut sur le Prophète Mohammed, sa noble Famille et ses Compagnons, AMEN !

### **A mon papa, Alou Cissé: Papa**

Tu as préféré nous inscrire tous à l'école sans exception ; pour que nous ayons ce privilège d'être instruits. Père, grâce au Tout Puissant et à ta détermination nous voilà au terme de ce travail. Puisse Dieu me donner la force, la chance et le temps de te témoigner toute ma reconnaissance. Tu as inculqué en nous, la cohésion, le travail, le partage, la justice et l'équité. Que Dieu te garde longtemps dans la santé le bonheur et la foi pour récolter les fruits de longues années de sacrifice pour tes enfants. Puisse Dieu nous permettre d'être à la hauteur de ce que tu as toujours souhaité pour nous. Il n'existe point de mots pour te dire merci. Sois rassuré de notre profonde reconnaissance et notre profond amour.

### **A Ma mère Sira Magassa (longévité dans la foi le bonheur)**

Douce mère ;

Tendre mère ;

Vénérable mère ;

Tu es toujours prête à tout sacrifier pour que nous tes enfants devenions meilleurs. Après nous avoir donné naissance, tu nous as aimés, éduqués, dorlotés; tout en nous apprenant la bonté, la modestie, la tolérance, le pardon et l'amour du prochain. Tu nous as appris à rester

unis comme un seul homme. Comme le dit ce proverbe « **Unissez-vous comme un fagot et il sera difficile de vous briser** » Sois sûre que les leçons dispensées ont été bien apprises.

**A mes oncles et tantes maternels:** Bouyé Keita, Modibo Cissé, Hata Soucko, Bintou Soucko, (Feue) Niamé Soucko et (Feue) Diaka Magassa. Vous vous êtes occupés d'une grande partie de mon éducation. Mes sincères remerciements pour vos encouragements et votre soutien indéfectible manifesté à mon égard.

**A mes frères et sœurs:** Saloumou Cissé, Mamadou Cisse, Cheickne Cissé, Abdou Cissé, Ladji Cissé, Bakary Cissé et Adama Cissé, (Feue) Mamousira Cissé, Djouma Cissé. Je vous dis que la fraternité est une chose précieuse, et il est de notre devoir de la consolider et de la garder jalousement. Soyons unis pour être un bon exemple à suivre. Ce travail n'est qu'un exemple pour vous, mais faites tous mieux.

**A ma très chère épouse Aichata Samassa :** Merci pour m'avoir aimé tel que je suis. Je sais à quel point ta présence me rassure. Je compte beaucoup sur toi pour un avenir meilleur car « derrière un grand homme il y a toujours une grande dame »

## Remerciements

**Au Pr Mahamadou Diakité** qui m'a accueilli à bras ouvert et qui a eu confiance en moi en me donnant ce sujet de thèse malgré mes faibles connaissances dans le domaine. Merci cher maître pour votre humilité, votre disponibilité et vos encouragements. Que le Tout-Puissant vous bénisse et vous accorde longue vie.

**A toute l'équipe du MRTC** et particulièrement l'Unité Immunogénétique et Hémoglobinopathie du MRTC : Dr Seidina Diakité, Dr Karim Traoré, Dr Saibou Doumbia, Dr Drissa Konaté, Dr Mory Doumbouya, Mr Moussa Keita, Dr Ibrahim Sanogo, Dr Ismaila Coulibaly, Mr Abdoul Salam Keita, Dr Mamadou Seydou Traoré, Dr N'kotié Doumbia, Dr Bourama Keita, Dr Mamadou Coulibaly, Dr Oumou Coulibaly Sans vous, cette thèse ne serait pas ce qu'il est, car vous avez tous participé à sa réalisation de par vos conseils et vos encouragements. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité. Recevez ici mes sincères salutations ainsi que ma reconnaissance.

**A mes amis** : Dr Ladji Doucouré, Dr Stapha Diarra Dr Soya Touré, Dr Soumaila K Sidibé, Saloumou Cissé, Sékou Cissé, Cheick Hamalla Cissoko, Fousseyni Doucouré, Mohamed K Dembélé, Ibrahim Konté

**A mes camarades de Promotion:** Abdoulaye Koné, Mahamadou Almahamoudou Maiga, Youssouf Touré

A mes cadets de l'Unité d'Immunogénétique et Hémoglobinopathie : Daoud Ourde Ousmane, Alkaly Doumbia, Assietou Maiga, Fatoumata Kassé, Nouhoum Koné, Sidy Modibo Kane Diallo, Souleymane Maiga.

A la famille Diarra au Point G

A la 7ème promotion du Numerus clausus « Feu Aliou Ba »

A tous les enseignants, personnels et étudiants de la Faculté  
de Médecine et d'Odontostomatologie de Bamako.

---

**Cher Maître et Président de Jury : Professeur Souleymane DIALLO**

- **Pharmacien Biologiste**
- **Professeur de Bactériologie-virologie à la Faculté de Pharmacie**
- **Colonel Major des services de santé des armées**
- **Ancien directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) de Bamako.**

Nous avons admiré votre disponibilité incommensurable, votre rigueur scientifique et vos qualités sociales.

Votre sens du partage et surtout, votre modestie font de vous un maître apprécié de tous.

Soyez assuré de notre estime et de notre profond respect.

## **A notre Maître et Juge**

### **Docteur Amadou NIANGALY**

- **Docteur en Pharmacie**
- **Master en Parasitologie-Mycologie-Entomologie Médicale**
- **Assistant en parasitologie- Mycologie à la Faculté de Pharmacie**

Vos qualités intellectuelles, votre générosité et votre ouverture d'esprit font de vous une personne appréciée de tous ;

Nous vous prions d'accepter l'expression de nos sincères reconnaissances et de respect.

**A notre Maître et Co-directeur :**

Docteur Seïdina A.S. DIAKITE

- **Docteur en pharmacie de l'Université de Bamako**
- **PhD en immunologie d'UPMC (Paris)**
- **Maître-assistant en Immunologie à la FAPH.**

Cher maître, tout au long de ce travail, nous avons admiré vos qualités humaines et pédagogiques

Veillez recevoir ici cher maître l'expression de notre sincère admiration et de notre profond respect.



**A notre Maître et directeur de thèse :**

Professeur Mahamadou DIAKITE

- **Docteur en Pharmacie**
- **DPhil en immunogénétique**
- **Responsable du laboratoire Immunogénétique et de Parasitologique (MRTC)**
- **Chef du département des Relations Extérieures et de coopération de l'USTTB**
- **Directeur scientifique adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique de l'USTTB**
- **Secrétaire permanent du comité d'éthique (FMOS/FAPH)**

Nous sommes reconnaissants pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de diriger ce travail.

Nous avons admiré votre disponibilité, votre rigueur scientifique et vos Qualités sociales.

Votre sens du partage, et surtout votre modestie font de vous un maître apprécié de tous.

Qu'Allah le tout Puissant vous accorde une bonne santé et la longévité!

## Liste des sigles et abréviations

**CD** : *Cluster of Differentiation* (Agrégat de différenciation)

**COI** : Complexity Of Infection (Complexité de l'infection)

**COIL** : COIL : Complexity Of infection Likelihood (Probabilité de complexité de l'infection)

**CSP** : Circumsporozoïte proteïne (Protéine majeur à la surface du sporozoïte)

**CR1** : Récepteur-1 du complément

**RF** : Case reporte forme (Fiche de Rapport des Cas)

**CSA**: Chondroïtine Sulfate A

**CSCOM** : Centre de Santé Communautaire

**CTA** : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine

**DDT** : Dichloro-diphényl trichloro-éthane

**DHA** : Dihydroartémisinine

**EDM** : *Electron Dense Material* (Matériel riche en électron)

**EMG** : Gaussien Exponentiellement Modifié

**FMPOS** : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie

**G6PD** : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

**GPI**: Glycosyl Phosphatidyl inositol

**GR**: Globule Rouge

**HAP-2** : *Histone Activator Protein-2*

**H3K9me3** = Histone-3 lysine-9 méthyle-3

**Hb** : Hémoglobine

**HPLC** : Chromatographie liquide de haute performance

**HE** : alpha-thalassémie hétérozygote

**ICAM-1**: Intercellular Adhesion Molecule1 (Molécule 1 d'adhésion intercellulaire)

**Ig** : Immunoglobuline

**IL** : Interleukine

**IP** : Indice Plasmodique

**IS** : Indice Splénique

**KAHRP** : Knob-Associated Histidin Rich Protein (Protubérance associé à la protéine riche en histidine)

**MRTC**: Malaria Research and Training Center (Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme)

**NIAID**: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Institut National d'Allergologie et de Maladies Infectieuses)

**NIH**: National Institutes of Health (Instituts Nationaux de la Santé)

**NK Cell** : Natural Killer Cell (Cellule tueuse naturelle)

**NO**: monoxyde d'azote

**PCR** : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)

**PECAM** : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (Molécule d'adhésion cellulaire à l'endothélium des plaquettes, PECAM-1)

**Pf**: *Plasmodium falciparum*

**PfCRT** : *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance transporter

**PfEMP1** : *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1 (Protéine-1 membranaire érythrocytaire de *P. falciparum*)

**PfHP1** : *Plasmodium falciparum* histone Protein-1

**PfHRP** : *Plasmodium falciparum* Histidin Rich Protein (Protéine riche en histidine de *P. falciparum*)

**PmP**: Multiconalité

**PNLP** : Programme national de lutte contre le Paludisme

**QBC**: Quantitative Buffy Coat

**USA**: United States of America

**RBC**: *Red Blood Cell* (Globules rouge)

**RESA** : *Ring Erythrocyte Surface Antigen* (Antigène à la surface de l'érythrocyte au stade d'anneau)

**SLC**: *Single level cell*

**SMFA**: *Standard Membrane Feeding Assay*

**SNP**: Single-nucléotide Polymorphism

**SP**: Sulfadoxine-pyriméthamine

**TNF**: *Tumor Necrosis Factor* (Facteur nécrosant tissulaire)

**USTTB** : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

**VCAM1** : *Vascular Cell Adhesing Molecular 1* (Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1)

**WHO/OMS** : *World Health Organization* (Organisation mondiale de la Santé)

**WT** : **Wild type** (Sujet normal pour l'alpha-thalassémie)

## Table des matières

<b>Dédicaces</b> .....	<b>2</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>10</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>18</b>
<b>2. Objectifs</b> .....	<b>21</b>
2.1. Objectif général .....	21
2.2. Objectifs spécifiques .....	21
<b>3. Généralités sur le paludisme</b> .....	<b>22</b>
3.1. Epidémiologie du paludisme .....	22
3.1.1. Différents faciès épidémiologiques.....	23
3.1.2. Agents pathogènes.....	25
3.1.2.1. Taxonomie .....	25
3.1.2.2. Différentes espèces de <i>Plasmodium</i> infectant l'homme.....	26
3.1.3. Cycle biologique.....	28
3.2. Polyclonalité de l'infection à <i>P. falciparum</i> .....	32
3.3. Persistance de <i>P. falciparum</i> .....	34
3.4. Physiopathologie du paludisme.....	34
3.4.2. Accès de primo-invasion .....	35
3.4.3. Accès palustre simple.....	35
3.4.4. Accès chez les patients immuns.....	36
3.4.5. Paludisme grave et compliqué.....	36
3.4.6. Prévention et traitement du paludisme .....	40
3.4.7. Prévention .....	40

3.4.8.	Traitement curatif des accès palustres graves.....	45
3.4.9.	Traitement spécifique de quelques manifestations du paludisme	45
<b>4.</b>	<b>Méthodologie</b> .....	<b>47</b>
4.1.	Cadre d'étude .....	47
4.2.	Lieu d'étude .....	47
4.2.1.	Situation géographique.....	47
4.2.2.	Végétation/hydrographie/climat .....	49
4.2.3.	Infrastructures socio-sanitaires .....	51
4.2.4.	Activités socio-économiques et culturelles.....	51
4.3.	Type et période d'étude.....	52
4.4.	Population d'étude.....	52
4.5.	<i>Critères d'inclusion</i> .....	53
4.6.	Critères de non inclusion .....	53
4.7.	Collecte et traitement des échantillons de recherche.....	53
4.8.	Variables mesurées.....	54
4.9.	Examens de laboratoire utilisés .....	55
4.10.	Gestion et l'analyse des données .....	55
4.11.	Considérations éthiques.....	57
4.12.	Définition des termes:.....	57
<b>5.</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>59</b>
5.1.	Résultats globaux.....	59
5.2.	Résultats descriptifs .....	60
5.3.	Résultats analytiques .....	64
<b>6.</b>	<b>Commentaires et Discussion</b> .....	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusion et recommandations</b> .....	<b>77</b>
7.1.	Conclusion.....	77

---

7.2. Recommandations.....	77
<b>8. Annexes.....</b>	<b>79</b>
8.1. Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10 .....	79
8.2. Détection de la mutation 202 A/G responsable du déficit en G6PD.....	81
8.3. Technique de la goutte épaisse .....	87
8.4. Procédures Standard Opératoires (SOP) : Frottis Mince.....	91
8.5. Détermination du taux d'hémoglobine.....	95
8.6. Détermination du groupe sanguin ABO.....	98
8.7. Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alpha-thalassémie par PCR .....	100
<b>9. Fiche signalétique.....</b>	<b>103</b>
<b>10. Summary.....</b>	<b>105</b>
<b>11. SERMENT D'HIPPOCRATE .....</b>	<b>106</b>
<b>12. Références bibliographiques .....</b>	<b>108</b>

## Liste des Figures

<b>Figure 1:</b> cycle biologique du plasmodium.....	31
<b>Figure 2:</b> carte de bancoumana .....	48
<b>Figure 3 :</b> repartition de la prevalence de l'infection a <i>P. falciparum</i> et des cas cliniques du paludisme enregistres sur la periode d'etude en fonction des mois.....	63
<b>Figure 4 :</b> persistance de <i>P. falciparum</i> stratifiee selon l'age et le sexe	65
<b>Figure 5 :</b> (A) polyclonalite des infections palustres au cours de 2 mois de saison humide et 2 mois saison seche. (B) prevalence de la polyclonalite des infections en fonction des periodes.....	66
<b>Figure 6 :</b> correlation entre la proportion de polyclonale et la persistance de p. Falciparum.....	67
<b>Figure 7 :</b> technique de la goutte epaisse.....	88
<b>Figure 8:</b> technique du frottis mince .....	93
<b>Figure 9 :</b> analyseur et microcuvettehemocue.....	95
<b>Figure 10 :</b> mecanisme de mesure du taux d'hb par l'appareil hemocue 201+ le resultat est exprime en gramme d'hemoglobine par decilitre de sang (g/dl) .....	96



## Liste des Tableaux

<b>Tableau I :</b> classification du paludisme en fonction du niveau d'endemicite .....	24
<b>Tableau II:</b> repartition des volontaires selon la tranche d'age et le sexe .....	60
<b>Tableau III:</b> repartition des sujets en fonction du groupe sanguin .....	61
<b>Tableau IV:</b> repartition des volontaires en fonction du type d'hémoglobine .....	61
<b>Tableau V:</b> repartition des volontaires en fonction du déficit en g6pd ...	62
<b>Tableau VI:</b> repartition des participants en fonction de l'alpha-thalassemie. ....	62
<b>Tableau VII:</b> repartition des épisodes palustres selon les catégories d'age. ....	64
<b>Tableau VIII:</b> résultats de l'analyse de régression multivariée du risque clinique de paludisme <sup>a</sup> .....	68

## 1 Introduction

Maladie parasitaire, fébrile et hémolysante ; le paludisme est une érythrocytopathie due au développement et à la multiplication dans l'organisme humain d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la pique infectante d'un moustique femelle du genre *Anophèles*. Bien que de progrès importants aient été réalisés dans la lutte contre le paludisme, cette maladie demeure une menace majeure pour la santé de la population mondiale [1].

Au Mali, le paludisme est la première cause de consultation, d'hospitalisation et de mortalité dans les formations sanitaires et sa prévalence nationale est de 36% chez les enfants de moins de 5ans selon l'enquête sur les indicateurs du paludisme au Mali en 2015 [2]. Dans les zones endémiques du paludisme, l'expression clinique de la maladie est influencée par plusieurs facteurs, notamment l'acquisition de l'immunité anti palustre qui elle-même est lié à l'âge. Cependant, des facteurs liés au parasite et à son interaction avec l'hôte pourraient être déterminant non seulement pour l'expression clinique de la maladie, mais aussi, pour sa transmission par l'anophèle.

Les études sur la persistance de la parasitémie et sur la polyclonalité parasitaire sont nécessaires pour une meilleure compréhension de la maladie. Ces deux phénomènes pourraient influencer l'acquisition de l'immunité anti palustre [3, 4]. La plus part des études faites étaient transversales [4-8] et elles étaient focalisées sur les groupes d'âge des populations exposées ou sur le phénotype clinique de l'infection (symptomatique ou asymptomatique). Ces études précédentes ne

prennent pas en compte la dynamique de l'infection par *P. falciparum* au niveau individuel.

Les études antérieures ont démontré qu'au cours de l'infection à *P. falciparum*, en particulier dans les zones à forte transmission, qu'un patient pourrait être simultanément infecté par de multiples clones de *P. falciparum* génétiquement distincts. Cette polyclonalité peut influencer la durée et les conséquences de l'infection [9-12]. Pourtant, les associations contradictoires ont été rapportées par certaines études, notamment celle de Kiwuwa et al en Ouganda ont trouvé que le paludisme sévère était significativement associé à une forte complexité de l'infection [9]. Par contre, Al-Yaman et al ont rapporté que le risque réduit de paludisme clinique était associé à des infections poly clonales de *P. falciparum* en Papouasie-Nouvelle-Guinée [13]. En outre, plusieurs études ont révélé que des infections polyclonales antérieures étaient moins susceptibles de provoquer le paludisme clinique en cas de nouvelles infections à *P. falciparum* [11, 14, 15].

Malgré ces études, il n'est pas clair si l'immunité anti palustre est une conséquence de l'exposition continue à des antigènes présentés simultanément dans une infection poly clonale ou le résultat d'un portage prolongé de parasites, tous ces deux phénomènes sont communs aux infections à *P. falciparum* dans les zones où la transmission est intense [11, 12, 16, 17]. Ainsi, notre étude avait pour but d'évaluer le rôle de la persistance de *P. falciparum* et de sa polyclonalité au cours de l'accès palustre dans le village de Kéniéroba.

## Hypothèse de recherche

La persistance et la polyclonalité de l'infection à *P. falciparum* sont corrélées à la diminution du risque de paludisme clinique.

## 2. Objectifs

### 2.1. Objectif général

Etudier l'influence de la persistance et de la polyclonalité de l'infection à *P. falciparum* dans le village de Kéniéroba entre 2013 et 2014

### 2.2. Objectifs spécifiques

1. Déterminer la répartition temporelle de l'infection à *P. falciparum* entre juin 2013 et mai 2014 dans le village de Kéniéroba ;
2. Déterminer la polyclonalité de l'infection à *P. falciparum* dans le village de Kéniéroba entre juin 2013 et mai 2014 ;
3. Décrire la dynamique de l'infection palustre chez les patients vivant dans le village de Kéniéroba en fonction de l'âge ;
4. Déterminer la relation entre la persistance et la polyclonalité de *P. falciparum* dans le village de Kéniéroba entre juin 2013 et mai 2014.

### 3. Généralités sur le paludisme

Le paludisme est une maladie potentiellement mortelle due à des parasites transmis à l'homme par des piqûres de moustiques femelles infectés. Les jeunes enfants, les femmes enceintes et les voyageurs non immunisés venant de régions exemptes de paludisme sont particulièrement vulnérables à la maladie.

Au niveau mondial, l'incidence du paludisme est estimée en baisse de 18 % ; elle passe en effet de 76 cas de paludisme pour 1 000 habitants exposés au risque de paludisme en 2010 à 63 cas pour 1 000 en 2016. La région Asie du Sud-Est enregistre la baisse la plus prononcée (48 %), suivie des régions Amériques (22 %) et Afrique (20 %). Entre 2015 et 2016, la mortalité liée au paludisme a connu une baisse dans les régions Asie du Sud-Est (44 %) et Afrique (37 %), et par contre elle a augmentée dans les régions Amériques et Méditerranée orientale [18].

#### 3.1. Épidémiologie du paludisme

Le paludisme est une parasitose due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique femelle du genre Anophèles. La transmission du paludisme est élevée dans toute la zone intertropicale entre le 30° de latitude nord et le 30° de latitude sud, particulièrement en Afrique où la majorité des cas sont enregistrés [19]. La distribution du paludisme est extrêmement variable d'une zone géographique à une autre, voire à l'intérieur du même village. Cette hétérogénéité est influencée par de nombreux facteurs tels que le vecteur, l'hôte et le parasite. Tous ces facteurs sont en relation dynamiques avec les facteurs environnementaux et socio-économiques qui conditionnent l'épidémiologie du paludisme [20].

### 3.1.1. Différents faciès épidémiologiques

Les indices qui permettent de classer les zones de transmission du paludisme sont fonction des facteurs qui conditionnent l'épidémiologie du paludisme. L'indice de stabilité décrit par McDonald permet de classer le paludisme en deux zones :

- ✓ Les zones de paludisme stable ou endémique: la transmission du paludisme est longue et intense entraînant une prémunition permettant aux individus de limiter les manifestations cliniques graves chez les jeunes enfants.
- ✓ Les zones de paludisme instable ou épidémique: la transmission du paludisme est très courte et il sévit sous forme épidémique. Ce caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition. Toutes les classes d'âge sont à risque de développer la maladie [21].

**Tableau I** : Classification du paludisme en fonction du niveau d'endémicité [22]

Niveau d'endémicité	IP % chez les enfants de 2-9 ans (Yaoundé, 1962)	IS % chez les enfants de 2-9 ans (Kampala, 1950)	Transmission
<b>Hypo-endémique</b>	<10	<10	Sporadique
<b>Méso-endémique</b>	11-50	11-50	Périodique en fonction de la pluviométrie
<b>Hyper-endémique</b>	50-75	50-75	Intense et saisonnale
<b>Holo-endémique</b>	>75	>75	Peut survenir toute l'année

IP: Indice plasmodique; IS: Indice Splénique

Au Mali, Il y a une extrême variabilité de la situation épidémiologique en fonction des faciès géo-climatiques, entraînant cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme [23].

- Une zone soudano-guinéenne à transmission saisonnière longue  $\geq 6$  mois. Dans cette zone, l'indice plasmodique (IP) chez les enfants de 2 à 9 ans est  $\geq 80\%$ . L'état de prémunition est acquis vers l'âge de 5-6 ans



au prix d'une mortalité infantile élevée. Cette zone couvre toutes la partie sud du pays (Sikasso, sud des régions de Kayes, Koulikoro et Ségou) ;

- Une zone sahélienne à transmission saisonnière courte  $\leq 3$  mois. Dans cette zone, l'IP se situe entre 50-70% chez les enfants de 2 à 9 ans. L'état de prémunition est rarement atteint avant l'âge de 9-10 ans. Cette zone recouvre toute la partie centrale du pays (Mopti et le nord des régions de Kayes, Koulikoro et Ségou) ;
- Une zone de transmission sporadique voire épidémique correspondant aux régions du Nord (Tombouctou, Gao, Kidal, Ménaka et Taoudéni). L'IP est en dessous de 5% chez les enfants de 2 à 9 ans. Tous les groupes d'âge sont à risque de paludisme grave.
- Des zones de transmission bi- ou plurimodales comprenant le delta intérieur du fleuve Niger et les zones de barrages (Manantali, Sélingué, Markala) et de rizicultures (petits barrages du pays Dogon). L'IP se situe entre 40-50% chez les enfants de 2 à 9 ans. Dans ces zones, l'anémie reste un phénotype clinique important.
- Des zones peu propices à l'impaludation particulièrement dans les milieux urbains comme Bamako et Mopti où le paludisme est hypo endémique. L'IP est  $\leq 10\%$  chez les enfants de 2 à 9 ans et les adultes peuvent faire des formes graves et compliquées de paludisme.

### 3.1.2. Agents pathogènes

#### 3.1.2.1. Taxonomie

Sur le plan taxonomique, le *Plasmodium* appartient au règne des *Protista*, au sous-règne des *Protozoa*, au Phylum des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoa*, à la sous-classe des *coccidia* à l'ordre des *Eucoccidae*, au sous-ordre des *Haemosporidae*, à la famille des *Plasmodidae*, au Genre *Plasmodium*.

Le genre *Plasmodium* comprend environ 172 espèces qui infectent les oiseaux, les reptiles et les mammifères. Les autres genres du même groupe comprennent *Hepatocystis*, *Haemoproteus* et *Leucocytozoon*, dont aucun n'est infectieux pour l'homme. Les parasites des humains et des primates font tous partie soit du sous-genre *Plasmodium* (*Plasmodium*) soit du sous-genre (*Laverania*), alors que tous les autres infectant les mammifères font partie du sous-genre hétérogène (*Vinckeia*).

### **3.1.2.2. Différentes espèces de *Plasmodium* infectant l'homme**

Le paludisme est transmis par un protozoaire du genre *Plasmodium*. Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* touchant diverses espèces animales, mais seulement cinq de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine [20].

#### **3.1.2.2.1. *Plasmodium falciparum***

C'est l'espèce responsable de la fièvre tierce maligne, elle est la plus redoutable et la plus intensément répandue en Afrique sub-saharienne. Elle est responsable de la quasi-totalité des décès dus au paludisme. Elle représente 85 à 90% de la formule parasitaire au Mali. Il attaque aussi bien les érythrocytes jeunes (réticulocytes) que les plus âgés. L'espèce *P. falciparum* est surtout répandue dans les zones intertropicales où le paludisme sévit de façon endémique.

#### **3.1.2.2.2. *Plasmodium vivax***

Beaucoup plus rare en Afrique, il est très largement répandu en Amérique du Sud et en Asie. Les mélanodermes en grande majorité

étaient considérées comme résistants à l'infection, toute fois les récentes études ont montré que le *P. vivax* peut infecter les Duffy négatifs.

Les manifestations cliniques liées à *P. vivax* sont classiquement considérées comme bénignes, hors parfois on observe des accès de reviviscences (formes de rechute). Cependant, dans les zones d'endémie palustre il peut avoir des répercussions graves sur l'état de santé des populations, notamment en causant des anémies chez l'enfant [20]. Son incubation est de 11 à 13 jours avec souvent des rechutes tardives.

#### **3.1.2.2.3. *Plasmodium malariae***

Sévit en Afrique de manière beaucoup plus sporadique. Il est surtout responsable des reviviscences très tardives (jusqu'à 20 ans après le retour de la zone d'endémie). Les mécanismes physiopathologiques de ces formes tardives ne sont pas totalement élucidés. Certains évoquent la présence de mérozoïtes latents dans les voies lymphatiques. Les manifestations cliniques dues à l'infection sont bénignes, toutefois il peut entraîner des complications rénales [20]. Son incubation peut aller de 15 à 21 jours.

#### **3.1.2.2.4. *Plasmodium ovale***

Il est essentiellement retrouvé en Afrique intertropicale du centre et de l'ouest. Les manifestations cliniques sont généralement modérées. Son évolution est bénigne mais il peut persister dans le foie sous forme dormante provoquant des rechutes tardives [20]. Son incubation peut aller de 15 jours au minimum jusqu'à 4 ans. Les méthodes génétiques ont récemment montré que *P. ovale* se compose de deux sous-espèces, *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* [24, 25].

### **3.1.2.2.5. *Plasmodium knowlesi***

Sévit en Asie du Sud-Est (particulièrement en Malaisie et à Bornéo) et en zone forestière car il touchait initialement les singes. Il est morphologiquement proche de *P. malariae* et se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24 heures responsable d'une fièvre quotidienne. Il existe de rares formes graves, voire mortelles avec une parasitémie élevée [20].

### **3.1.3. Cycle biologique**

Le cycle du *Plasmodium* est un cycle complexe qui comprend un hôte intermédiaire (l'homme), où il se trouve sous une forme haploïde et se multiplie de manière asexuée et un hôte définitif, l'anophèle femelle, chez qui se déroule la reproduction sexuée.

#### **3.1.3.1. Cycle Chez le moustique (Sporogonie)**

Lors d'un repas sanguin sur une personne infectée, l'anophèle femelle ingère des formes asexuées du *Plasmodium* ainsi que les gamétocytes mâles et femelles. Ces derniers parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'ex flagellation et forme des micro gamètes qui fécondes les gamètes femelles. Il en résulte un zygote appelé ookinete ; celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique suivie par plusieurs milliers de mitoses qui conduit à la production de sporozoïtes, forme infectante pour l'homme. L'éclatement de l'oocyste libère des éléments mobiles et haploïdes dans l'hémolymphe. Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infectante. Chez le

moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule entre 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et l'espèce en cause.

### **3.1.3.2. Cycle chez l'homme (Schizogonie)**

#### **3.1.2.2.3. Cycle exo érythrocytaire**

Au cours de la piqûre, l'anophèle femelle infecté injecte dans un capillaire des sporozoïtes. Les sporozoïtes passent dans la circulation générale et, en quelques minutes, ils envahissent les hépatocytes grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure à la surface du sporozoïte (CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte du côté de l'espace de Disse, espace directement en contact avec le sang circulant. Le sporozoïte entre alors dans une phase de réplication au sein de la vacuole parasitophore et de prolifération intracellulaire qui repousse en périphérie le noyau de la cellule. Il finit par constituer une masse multinucléée appelée schizonte (schizonte hépatocytaire) qui conduit à la libération de plusieurs dizaines de milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure 8 à 15 jours selon les espèces.

#### **3.1.2.2.4. Cycle intra érythrocytaire**

C'est la seule phase symptomatique du cycle et est d'intensité variable selon le statut immunitaire de la personne infectée. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte vont débiter le cycle sanguin asexué de prolifération de *P. falciparum* en infectant les érythrocytes. Le mérozoïte pénètre grâce à un processus parasitaire actif et se différencie en anneau (trophozoïte jeune), puis en trophozoïte mature, stade à partir duquel une intense phase répliative commence. Il donne alors naissance au schizonte (schizonte érythrocytaire). Celui-ci, après

segmentation, montre une forme caractéristique de rosace, puis libère 8 à 32 mérozoïtes qui rapidement réinfectent des érythrocytes sains. L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*.

L'apparition des gamétocytes a eu lieu après un certain nombre de cycles. Certains trophozoïtes se transforment en gamétocytes différenciés mâles et femelles. Ce cycle asexué dure 10 à 40 jours selon la température extérieure et les espèces en cause [26]. Ces gamétocytes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. A la suite d'une nouvelle piqûre par un anophèle, les gamétocytes mâles et femelles (au dimorphisme sexuel marqué) sont ingérés par l'anophèle avec le repas sanguin et un nouveau cycle commence. Il est à noter que moins de 20% des piqûres de moustiques contenant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires sont responsables d'infections en zone endémie [27].

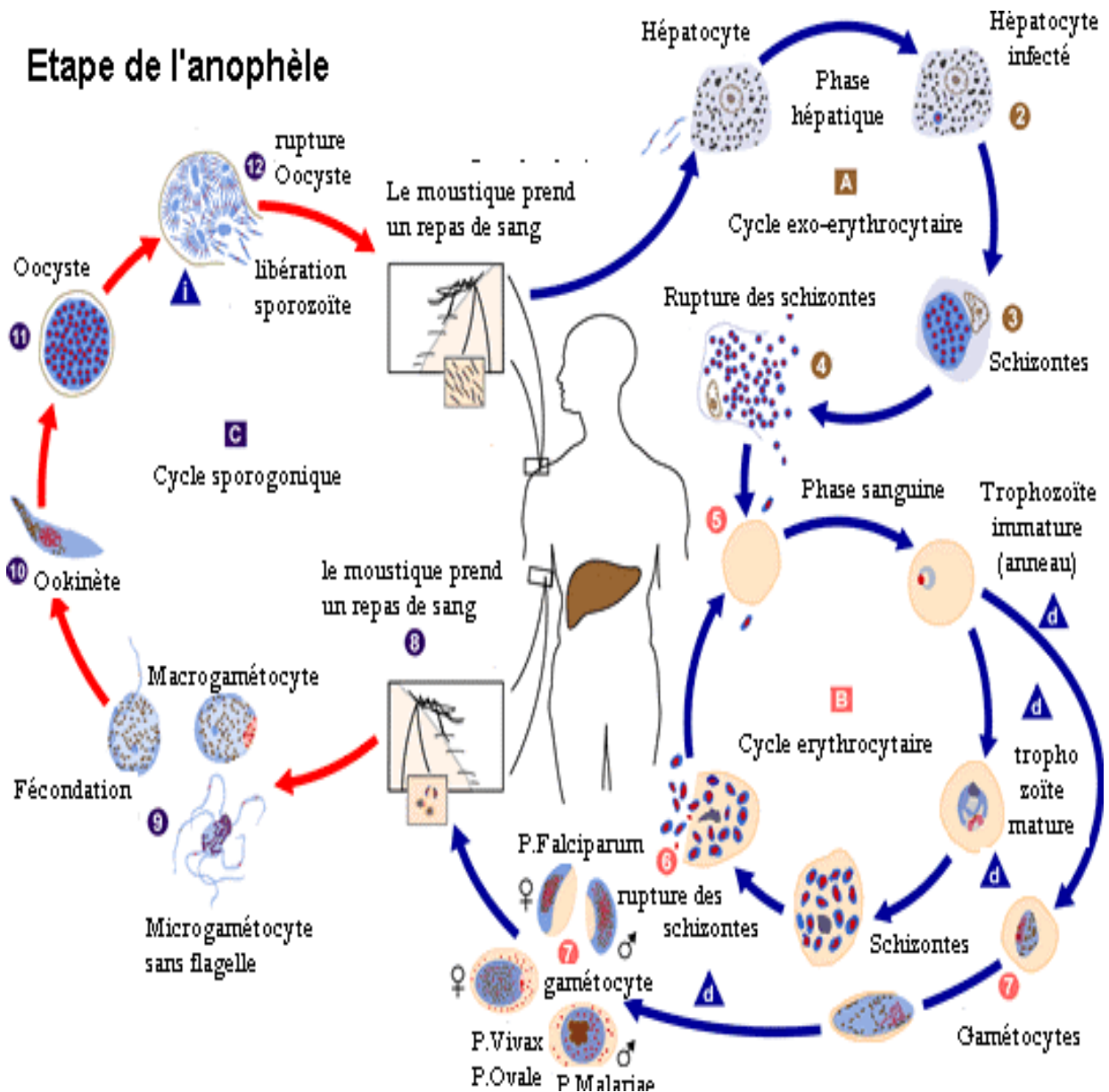


Figure 1: Cycle biologique du Plasmodium

Source: <https://www.google.com/search?q=cycle+biologique+de+p+falciparum>. (Consulté le 02/05/2018)

### 3.2. Polyclonalité de l'infection à *P. falciparum*

L'intensité et la durée de la transmission palustre dans le contexte épidémiologique africain sont variables d'une région ou même d'un village à l'autre. Ainsi, le nombre de piqûres infectantes reçues, leur fréquence, la durée de la période de transmission, les espèces vectrices locales, les habitudes culturelles des populations, leurs parcours thérapeutiques et leur appartenance ethnique, peuvent affecter l'épidémiologie du paludisme. L'ensemble de ces facteurs, parmi lesquels les modalités de l'exposition à *P. falciparum* joue un rôle-clé, définit l'endémicité du paludisme dans une région donnée, le caractère pérenne ou saisonnier de la transmission, et, va finalement imposer le rythme de l'acquisition de l'immunité naturelle anti palustre, qui va gouverner la distribution de l'infection à *P. falciparum* en fonction de l'âge

- L'incidence des cas cliniques, la prévalence de l'infection palustre, les densités parasitaires, le nombre de génotypes parasitaires co-infectants, caractérisant l'infection à *P. falciparum* seront distribués de façon constante ou non, au cours de la vie d'une personne en fonction des facteurs qui déterminent l'acquisition de l'immunité anti palustre naturelle. Parmi tous les paramètres de l'infection, de nombreuses études ont montré l'importance de la multiplicité (ou complexité) de l'infection, définie comme le nombre minimal de génotypes parasitaires distincts portés par un individu infecté [28]. Ce paramètre détermine les éléments suivants de la biologie et de l'épidémiologie du parasite [29, 30].



- Gamétocytogenèse [12] détermination du sexe et allocation des sexes (proportion des mâles, i.e. sex-ratio [31, 32] conduisent au succès de la transmission à partir des stades sexuels [12, 33].
- Structure des populations du parasite : le nombre de génotypes co-infectants et con-spécifiques détermine la probabilité d'autofécondation entre gamétocytes génétiquement identiques chez le vecteur [34-36].
- Evolution de la virulence : le nombre de génotypes Co-infectants dans une infection multiple et/ou mixte détermine la compétition intra- et interspécifique au sein des hôtes homme et vecteur [33, 37-39]

Les premières études de la diversité génétique des isolats sanguins humains menées avec des marqueurs iso enzymatiques ou d'après l'analyse de variants antigéniques avaient déjà montré qu'un hôte héberge communément plusieurs génotypes distincts de parasites dans les zones où le paludisme est endémique [40, 41]. Les méthodes de génotypage moléculaire basées sur l'amplification de l'ADN par PCR ont ensuite permis de caractériser génétiquement la composition et la diversité des infections naturelles à *P. falciparum* chez l'homme. Elles ont été largement appliquées à l'étude ponctuelle ou au suivi longitudinal des populations de parasites présentes dans le sang circulant des patients paludéens symptomatiques ou asymptomatiques, dans une très grande variété de contextes épidémiologiques, et pour toutes les classes d'âges lors de suivis longitudinaux menés dans les villages de Dielmo et Ndiop au Sénégal [42] de Madang en Papouasie-Nouvelle-Guinée [43], en Tanzanie [44] et au Mali [45].

Néanmoins, ces études ont montré que les infections à *P. falciparum* étaient composées de plusieurs génotypes Co-infectants, quasiment dans tous les contextes de transmission : transmission intense [45-50], moyenne et saisonnière, rurale ou urbaine [51-55] ou de transmission faible et saisonnière [16, 56] en Afrique, mais aussi en Asie du Sud-est [57] ou en Amérique Latine [58, 59].

D'autres études de variabilité génétique ont montré une relation directe entre le degré d'endémicité des parasites et la variation génétique [59, 60]. Dans les zones endémiques palustres comme l'Afrique subsaharienne, les infections polyclonales de *P. falciparum* présentent une grande diversité génétique et un déséquilibre de liaison (LD) faible. En revanche, dans les zones à faible endémie, comme les pays d'Amérique du Sud, les patients souffrant de paludisme devraient avoir des infections causées par un seul clone avec une diversité génétique limitée et une LD plus étendue [46].

### **3.3. Persistance de *P. falciparum***

La dynamique des infections chez l'homme dépend de l'intensité et de la durée de la transmission, mais aussi du degré d'immunité et de la susceptibilité génétique du sujet. L'issue d'une infection est très variable du portage asymptomatique aux formes graves et compliquées. Le portage prolongé du parasite dans le sang périphérique peut constituer un réservoir pour l'infection du vecteur au début de la saison de transmission.

### **3.4. Physiopathologie du paludisme**

Le paludisme et ses complications sont la résultante d'une cascade d'évènements physiopathologiques, influencés à la fois par le parasite et

les facteurs liés à l'hôte y compris l'immunité et les facteurs de susceptibilité génétiques.

### 3.4.2. Accès de primo-invasion

Par définition, il apparaît chez un sujet neuf, non-immun, c'est-à-dire chez l'enfant de 4 mois à 4 ans, chez les personnes récemment déplacées d'une région exempte de paludisme vers une zone d'endémie en absence de mesures préventives [61]. L'incubation, encore appelée phase pré-patente dure de 7 à 20 jours et est cliniquement muette.

L'invasion est marquée par l'apparition d'une fièvre continue. Le tableau clinique est celui d'un embarras gastrique fébrile avec anorexie, douleurs abdominales, nausées, parfois vomissements, diarrhée, associés à des céphalées et à des myalgies. A l'examen clinique, le foie (surtout chez l'enfant) est parfois augmenté de volume, la rate est normale, les urines sont rares, foncées et peuvent contenir des protéines [62]. Ce paludisme de primo-invasion peut guérir spontanément après plusieurs épisodes fébriles. Une splénomégalie modérée apparaît dans ce cas, signe tardif au cours de la primo-invasion et élément de bon pronostic. S'il s'agit d'une invasion à *P. falciparum*, elle évolue parfois vers l'accès pernicieux secondaire annoncé par la majoration des céphalées et l'apparition de signes neurologiques [62].

### 3.4.3. Accès palustre simple

Il correspond à la schizogonie érythrocytaire et réalise les tableaux de la fièvre tierce maligne à *P. falciparum* ou bénigne à *P. vivax*, *P. ovale* ou de la fièvre quarte bénigne à *P. malariae*. Classiquement, l'accès palustre simple évolue en trois phases, soit après une phase prodromique, associant céphalées, anorexie, nausées, soit brutalement avec :

- la sensation de froid avec frissons intenses, céphalées et vomissements, pendant 1 à 2 heures,
- la fièvre d'ascension rapide à 40°C ou plus ; le pouls est très rapide ou lent. Après avoir été pâle, le malade est congestif, vultueux.
- la sensation de malaise est intense. Cette période dure de 1 à 4 heures. Les sueurs profuses accompagnent la défervescence, laissant le patient asthénique et courbaturé. L'hépatosplénomégalie est inconstante. Cet accès se répète tous les 2 ou 3 jours selon l'espèce plasmodiale, pendant environ une dizaine de jours. Il peut, soit donner lieu ultérieurement à quelques rechutes similaires, plus ou moins éloignées (*P. malariae*, *ovale* et *vivax*) soit évoluer à tout instant vers l'accès pernicieux (*P. falciparum*).

#### **3.4.4. Accès chez les patients immuns**

Le portage d'infection plasmodiale asymptomatique est fréquent dans les zones où la transmission est pérenne. Il faut penser à une autre maladie infectieuse associée à un paludisme asymptomatique.

#### **3.4.5. Paludisme grave et compliqué**

L'infection palustre est le plus souvent asymptomatique en zone holo- et d'hyper-endémie chez les enfants d'âge scolaire. L'apparition des formes graves est surtout liée à la virulence de l'espèce *P. falciparum* et au niveau de l'immunité acquise des personnes [63]. Les concepts physiopathologiques du paludisme grave font intervenir deux phénomènes interdépendants : la séquestration des hématies parasitées et le phénomène immunologique.

##### **3.4.5.2. Séquestration**

C'est l'adhésion des érythrocytes infectés aux cellules endothéliales des capillaires veineux au moyen d'interaction spécifiques entre les

molécules d'origine parasitaire présentes à la surface des globules rouges infectés avec les récepteurs correspondants à la surface des cellules endothéliales, aboutissant à l'obstruction des micro vaisseaux. Trois mécanismes concourent à ce phénomène : l'auto-agglutination, la formation de rosettes «ou *rosetting*» et la cytoadhérence.

#### **3.4.5.3. Auto- agglutination**

Elle correspond à un regroupement des érythrocytes infectés entre eux pour former des micros agrégats susceptibles d'obstruer les capillaires profonds. Elle a été observée chez de nombreuses souches de *P. falciparum* étudiées en culture au laboratoire. Pour certains auteurs, elle est favorisée par les plaquettes portant les récepteurs CD36 à leurs surfaces [64].

#### **3.4.5.4. Formation des rosettes «ou rosetting»**

Les hématies parasitées ont la faculté d'attirer autour d'elles des hématies non-infectées pour former des rosettes : c'est le phénomène de « *rosetting* ». La formation des rosettes est la conséquence de la liaison entre des ligands parasitaires (PfEMP1) présents à la surface des hématies infectées et leurs récepteurs correspondant sur les globules rouges non infectés. Plusieurs récepteurs pour les ligands parasitaires (PfEMP1) impliqués dans ce phénomène ont été décrits à la surface des globules rouges : récepteur 1 du complément (CR1/CD35), tri-saccharides des groupes sanguins A et B, CD36, PECAM-1/CD31 (*Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*).

Les anticorps (IgM et IgG) et certains composants du complément (C3b et C4b) jouent aussi un rôle dans ce phénomène à travers le récepteur 1 du complément (CR1) [63]. Il aboutit à la formation d'un agrégat qui

contribue à l'obstruction des petits vaisseaux sanguins. Il varie d'une souche plasmodiale à l'autre et est corrélé au degré de sévérité du paludisme [64-66]. La formation de rosettes constitue un mode de protection pour le parasite contre le système phagocytaire de la rate et exerce un effet délétère pour l'hôte par blocage du flux sanguin.

#### 3.4.5.5. Phénomène de Cytoadhérence

La cytoadhérence des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire ou aux cellules trophoblastiques placentaires entraînent la libération de médiateurs pro inflammatoires (cytokines) impliqués dans la sévérité de la maladie [67]. C'est le mécanisme qui a été le mieux étudié ces dernières années. Ce phénomène permet au *Plasmodium* de se développer plus facilement grâce à un environnement gazeux favorable et d'échapper à la clairance splénique et provoquer une obstruction des micro vaisseaux surtout au niveau cérébral qui semble être la principale cause du neuropaludisme. La séquestration entraînerait aussi une dilatation des micro vaisseaux par la libération du monoxyde d'azote (NO), responsable de l'œdème cérébral et pulmonaire.

Les hématies parasitées expriment à leur surface des protubérances (*knobs*) qui semblent jouer un rôle important dans leur adhésion aux cellules endothéliales. Il s'agit de protubérances protéiniques auxquelles sont incorporés des antigènes plasmodiques. Parmi ces antigènes plasmodiques on peut citer : PfEMP-1 et 2 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 et 2*) ; PfHRP-1 (*Plasmodium falciparum Histidin Rich Protein*) ou KAHRP (*Knob-Associated Histidin-*

*Rich Protein*), RESA (*Ring Erythrocyte Surface Antigen*) et EDM (*Electron-Dense- Material*).

Parmi ces protéines parasitaires associées aux knobs, PfEMP-1 est le ligand parasite le mieux caractérisé. PfEMP-1 interagit avec des récepteurs spécifiques au niveau des cellules endothéliales vasculaires et du syncytiotrophoblaste tels que l'ICAM-1 (Inter Cellular Adhésion Molécule-1), le CD36, le VCAM-1 (Vascular Cell Adhesing Molecular-1), le CD31 ou PECAM-1, le CSA (Chondroitin Sulfate A) et la sélectine. L'adhésion des hématies parasitées à ces récepteurs entraîne leur séquestration à l'intérieur de la microcirculation. La séquestration permet aux hématies parasitées d'échapper à la clairance splénique et de contribuer à la gravité du paludisme.

#### **3.4.5.6. Mécanismes immunologiques**

Le système à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes CD4 et les macrophages qui jouent un rôle très important dans la pathogénèse du neuropaludisme. Les antigènes plasmodiaux facilitent le recrutement des macrophages et la libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6.) dont leurs actions se conjuguent au phénomène de ralentissement circulatoire conséquence de la séquestration [20]. Parmi ces médiateurs, le TNF- $\alpha$  est la cytokine clé de l'infection palustre car à faible dose, il est nécessaire pour l'élimination des parasites et à forte dose, il devient pathologique.

### 3.4.6. Prévention et traitement du paludisme

#### 3.4.7. Prévention

Malgré des années de recherche, peu de candidats vaccins prometteurs ont été mis au point. Il existe différentes mesures de prévention qui peuvent protéger soit contre l'infection, soit contre le développement de la maladie chez les individus infectés. Les mesures qui protègent contre l'infection visent le vecteur de la maladie, à savoir l'anophèle. Celles-ci peuvent être des mesures de protection personnelle (individuelles ou familiales): vêtements de protection, insectifuges, pulvérisation intra domiciliaire des habitations en utilisant des insecticides à effet rémanent, ou des mesures de protection de la collectivité ou population telle que la gestion environnementale en vue de limiter la transmission. Ainsi, la chimio-prophylaxie individuelle s'adresse à toute personne à risque d'exposition en zone impaludée (femme enceinte, expatriés, voyageurs, touristes ou migrants). Elle n'empêche pas l'infection mais évite les formes graves.



**3.4.7.1 La Chimio prévention saisonnière du Paludisme (CPS)** qui est une nouvelle intervention, elle s'adresse aux enfants de 03 à 59 mois et consiste à administrer chez ceux enfants un traitement complet (d'amodiaquine et de sulfadoxine-pyriméthamine AQ+SP) a commencé au début de la saison de transmission en donnant au maximum quatre doses pendant celle-ci à un intervalles réguliers d'un mois.(dans la mesure où les deux médicaments conservent une efficacité antipaludique suffisante). Elle assure une prévention sûre et efficace contre les cas de paludisme à *Plasmodium falciparum* non compliqués et sévères en zone de forte transmission saisonnière [68].

La recommandation stratégique de l'OMS pour la CPS se fonde sur les résultats de sept études réalisées dans des zones de forte transmission saisonnière du paludisme dans les régions sahéliennes et subsahéliennes de l'Afrique subsaharienne entre 2002 et 2011. Ces études montrent que la CPS avec administration mensuelle de SP + AQ chez les enfants âgés de 3 à 59 mois pendant une période allant jusqu'à quatre mois au cours de la saison de forte transmission du paludisme :

- Évite environ 75 % de l'ensemble des accès palustres ;
  - Évite environ 75 % des accès palustres graves ;
  - Pourrait entraîner une diminution de la mortalité de l'enfant d'environ 1 pour 1000 ;
  - Réduit probablement l'incidence de l'anémie modérée [69].
- Cependant, il faut noter que les conséquences de l'administration de la CPS pendant plusieurs années n'ont pas encore été évaluées ; et on n'a pas signalé d'évènements indésirables graves qui sont probablement rares. A part des vomissements juste après la prise des molécules SP et AQ, certaines affections non graves et qui disparaissent d'elles mêmes sans laissé des séquelles. Une

étude réalisée en Gambie avec la distribution communautaire de la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine et Amodiaquine en TP I chez les enfants de 6 ans et moins a donné une efficacité de 87% contre le paludisme[70]. Selon une revue par Greenwood, chez les enfants plus jeunes (âge inférieur à 5 ans) le traitement intermittent préventif réduit la mortalité infantile liée au paludisme de 40%[71]. Ces différentes études ont permis à l’OMS de recommander la stratégie de la chimioprévention du paludisme saisonnier avec la sulfadoxine-pyriméthamine et l’amodiaquine pour les régions :

- où plus de 60 % de l’incidence annuelle du paludisme sont enregistrés sur quatre mois ;
- où la morbidité palustre représente la majeure partie de la morbidité chez l’enfant
- (incidence > 10 cas de paludisme pour 100 enfants au cours de la saison de transmission) ;
- où l’efficacité antipaludique de la SP et de l’AQ est conservée.

Au Mali, le Ministère de la Santé a adopté la CPS en 2014 dans tout le pays. La CPS, autrefois appelée « traitement préventif intermittent du paludisme chez les enfants », est définie comme « l’administration intermittente d’un traitement complet par un médicament antipaludique pendant la saison de haute transmission du paludisme pour éviter la maladie, l’objectif étant de maintenir des concentrations thérapeutiques de médicament antipaludique dans le sang pendant la période où le risque de contracter le paludisme est plus élevé ».

La stratégie de la CPS consiste à administrer un maximum de quatre cycles de traitement de SP + AQ à intervalles d’un mois à des enfants

âgés de 3 à 59 mois dans les régions de forte transmission saisonnière du paludisme [72]. La CPS avec SP + AQ procure un degré élevé de protection jusqu'à quatre semaines, ensuite la protection diminue rapidement. Il est par conséquent important de respecter un intervalle d'un mois (SP+AQ à J1, AQ J2 et à J3) entre les cycles de la CPS afin d'obtenir un niveau de protection élevé et de minimiser l'apparition de parasites du paludisme résistants à SP + AQ.

Les doses de la SP (500mg +25mg) et AQ (153mg) doivent être administrées comme suit pendant les trois ou quatre cycles de la saison de transmission :

- Jour 0 : dose unique de SP + première dose d'amodiaquine (par un agent de santé)
- Jour 1 : deuxième dose d'amodiaquine (parent ou tuteur)
- Jour 2 : troisième dose d'amodiaquine (parent ou tuteur).

Les doses de SP et AQ doivent être administrées en fonction de l'âge comme suit :

- Comprimé SP (500 mg + 25 mg).

Les enfants âgés de 3 à 11 mois reçoivent un demi-comprimé en dose unique le premier jour.

Les enfants âgés de 12 à 59 mois reçoivent un comprimé entier en dose unique le premier jour.

- Comprimé AQ (153 mg).

Les enfants âgés de 3 à 11 mois reçoivent un demi-comprimé en dose quotidienne unique pendant 3 jours.

Les enfants âgés de 12 à 59 mois reçoivent un comprimé entier en dose quotidienne unique pendant 3 jours.

La protection contre le paludisme clinique est associée à l'administration des deuxième et troisième doses d'amodiaquine. Par conséquent, il importe qu'un enfant reçoive des doses complètes de SP + AQ pendant chaque cycle de traitement de la CPS. La période d'administration de la CPS est définie de manière à cibler la période durant laquelle le risque de contracter le paludisme est le plus élevé pour les enfants. Par exemple, la CPS a été administrée en août, septembre et octobre dans des essais sur le terrain au Burkina Faso [73], alors qu'au Sénégal, elle a été administrée en septembre, octobre et novembre [74], couvrant la période où le risque de contracter le paludisme est le plus élevé. En 2016, 15 millions d'enfants vivant dans 12 pays d'Afrique sahélienne ont été protégés par des programmes de chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) [75].

L'objectif est de maintenir les concentrations thérapeutiques de médicaments antipaludiques dans le sang pendant toute la période de plus grand risque. Cela réduira l'incidence du paludisme simple et grave et de l'anémie associée, ce qui aura pour résultat des enfants en meilleure santé et plus forts, capables de se développer et de grandir sans interruption des épisodes de la maladie. La CPS s'est avérée efficace, rentable et réalisable pour la prévention du paludisme chez les enfants dans les zones où la saison de transmission du paludisme ne dépasse pas quatre mois. Depuis son approbation par l'OMS, la CPS a permis de prévenir jusqu'à 75% des cas de paludisme [76].

### **Traitement curatif de l'accès palustre simple**

En cas de paludisme simple non compliqué, l'OMS recommande l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine

(CTA). Les différentes options thérapeutiques recommandées par l'OMS sont les suivantes:

- **Artéméther-luméfantrine**, dans tous les pays du monde) ;
- **Artésunate plus amodiaquine**, dans les zones où le taux de succès thérapeutique de l'amodiaquine en monothérapie est supérieur à 80% ;
- **Artésunate plus sulfadoxine-pyriméthamine**, dans les zones où le taux de succès thérapeutique de la SP en monothérapie est supérieur à 80%.

Au Mali, l'association sulfadoxine-pyriméthamine (SP) est actuellement préconisée pour le traitement intermittent préventif chez les femmes enceintes.

- **Artésunate plus méfloquine** (données de toxicité insuffisantes pour recommander son utilisation en Afrique) qui est contre-indiquée en cas d'épilepsie.

#### **3.4.8. Traitement curatif des accès palustres graves**

L'artésunate injectable est le médicament de choix dans la prise en charge du paludisme grave à *P. falciparum* chez l'adulte ainsi que chez l'enfant. Elle doit être administrée en raison de 2,4 mg/kg de poids corporel par voie intraveineuse (IV) ou intramusculaire (IM).

Si l'on n'a pas d'artésunate injectable, il peut être remplacé par l'artéméther ou la quinine.

Prendre le relais avec CTA par voie orale dès que le malade peut avaler.

#### **3.4.9. Traitement spécifique de quelques manifestations du paludisme**

En cas de fièvre importante, il faut ajouter un antipyrétique de type paracétamol.

En cas de convulsion ou trouble de la conscience, il faut ajouter un myorelaxant de type diazépam ou phénobarbital.

En cas d'anémie sévère (taux Hb < 6 g/dl), très souvent une transfusion sanguine est nécessaire.

En cas de vomissement important, il faudrait ajouter un antiémétique de type métoclopramide injectable ou metopimazine injectable.

## 4. Méthodologie

### 4.1. Cadre d'étude

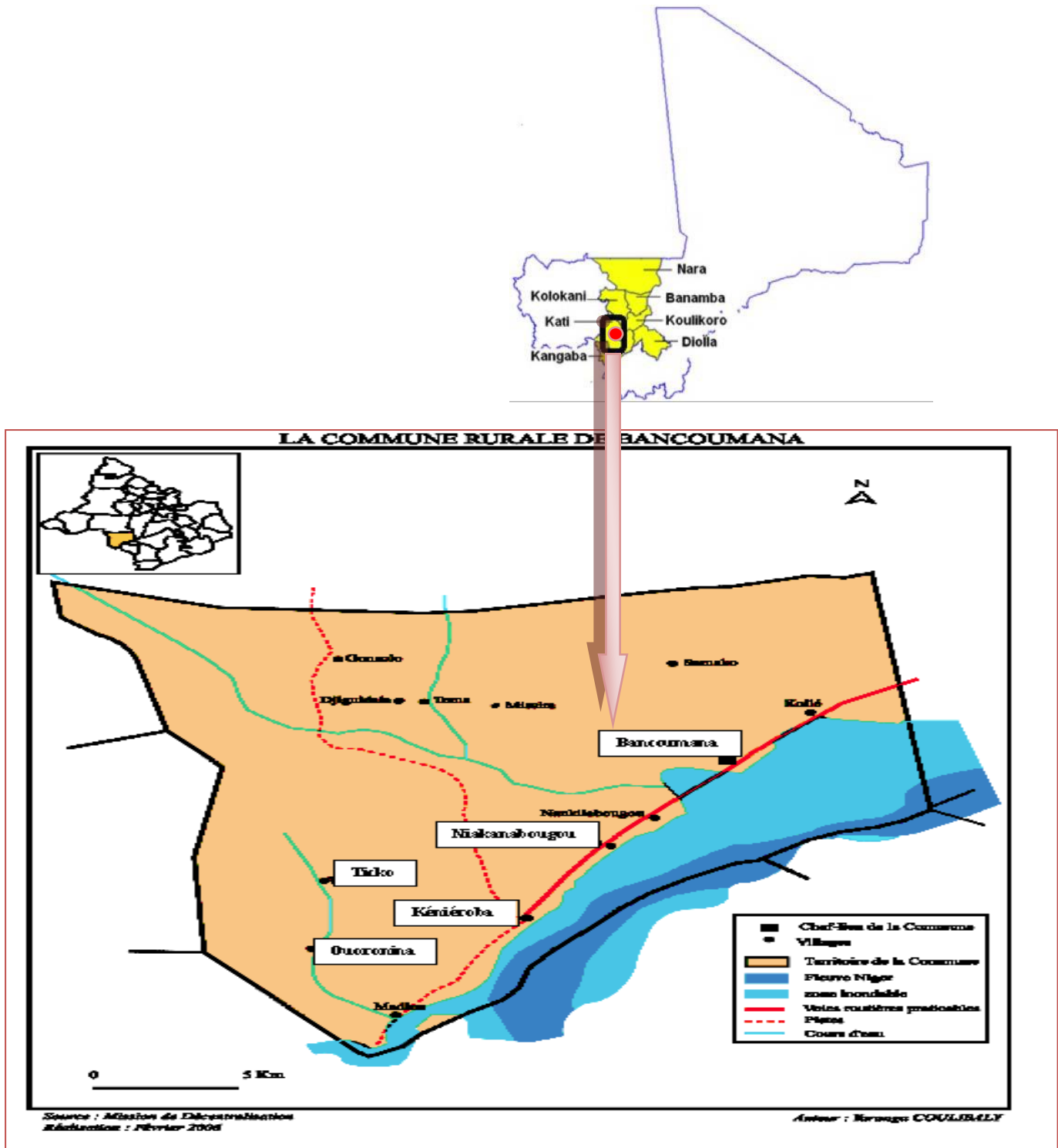
Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre USTTB et les instituts nationaux de santé (NIAID/NIH) des Etats-Unis d'Amérique sur un projet de recherche sur le paludisme à *P. falciparum*. Elle a porté sur une sous-cohorte de patients vivant à Kéniéroba et visait à explorer de façon générale les facteurs impliqués dans l'immunité innée et acquise contre le paludisme.

### 4.2. Lieu d'étude

Notre étude s'est déroulée dans le village de Kéniéroba, dans la commune rurale de Bancoumana. Bancoumana est un village situé à 60 km au sud-ouest de Bamako sur la route nationale RN15 dans la zone soudano-guinéenne. La commune comporte 4 centres de santé et un centre de santé communautaire qui est celui de Bancoumana, qui est en partenariat avec le MRCT/NIH depuis 1993. La commune de Bancoumana est limitée au nord par celle de Siby, à l'est par la commune du Mandé, au sud-ouest par la commune du Minindian et au sud-est de Niagadina et de Kourouba.

#### 4.2.1. Situation géographique

Kéniéroba est situé au sud-ouest de Bamako à peu près 70km sur la route nationale RN15 de Kangaba. Il est limité au sud-est par le village de Fourda, au nord par le village de Nanguilabougou et à l'ouest par le village de Ticko. Le Village Kéniéroba est d'environ 2341 habitants selon le recensement de notre équipe clinique en 2012. Il est majoritairement peuplé de Malinké, de Peulh et de Bambara (recensement MRTC/FMPOS, 2012).



Source : <http://anthropodev.revues.org/469>

**Figure 2:** Carte de Bancoumana



#### 4.2.2. Végétation/hydrographie/climat

Le village de Kéniéroba est situé le long du fleuve Niger (ou fleuve Djoliba) qui constitue le principal réseau hydrologique. La couverture végétale originale rencontrée sous un climat soudano-guinéen marque la transition entre la savane arborée et la forêt guinéenne. Ce type de végétation est rencontré encore en l'état au niveau des bois sacrés et le long du fleuve Niger. Cependant, les feux de brousse, l'exploitation du bois de chauffage, les défrichements nécessaires aux cultures ont profondément dégradé cette végétation. La savane arborée constitue la principale formation végétale. On y rencontre également quelques galeries forestières :

- une strate arborée avec les espèces telles que *Bombax costatum* (kapokier), *Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn. (Karité), *Parkia biglobosa* Jacq. (Néré), *Tamarindus indica* L. (tamarinier), *Manguifera indica* L. (manguier);
- une strate arbustive composée de *Combretum micranthum* G. Don (kinkéliba); *Guieras senegalensis* JF. Gmel (kundiè en bambarrea), *Cassia sieberiana* DC (case de sieber, sindja (Pular));
- une strate herbacée ou savane de graminées dont *Cymbopogon giganteus* Chiov. (Tièkala), *Pennisetum pedicellatum* Trin et *Andropogon* sp (Ouaga) ; et une galerie forestière caractéristique de la savane guinéenne se forme le long du fleuve Niger.

Deux grandes saisons se succèdent dans cette zone : la saison des pluies de juin à octobre et la saison sèche de novembre à mai. Une courte saison de transition s'étalant de novembre à janvier que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de

fôbônda qui se caractérise par un adoucissement des températures par l'arrivée des côtes atlantiques de l'harmattan.

L'habitat, de type traditionnel, est constitué de cases rondes et rectangulaires en terre battue et aux toitures en chaumes coniques. De plus en plus, quelques maisons ont leurs toitures en tôle. Ces différents types de maisons propices au repos des moustiques, favorisent une densité et une agressivité anophélienne élevées. L'environnement physique du village est propice à la transmission du paludisme.

En effet, le village est situé dans une grande plaine qui s'étend jusqu'au fleuve Niger. La plaine présente de nombreuses retenues d'eau pendant la saison des pluies. C'est une plaine de riziculture. Les retenues d'eau avec des crevasses naturelles du sol peuvent être des gîtes larvaires potentiels. Pendant la saison des pluies, il existe des cultures intra domiciliaires et une prolifération d'herbes sauvages dans le village, contribuant ainsi à augmenter la densité et l'agressivité des moustiques. La température la plus élevée se situe à ~40°C au mois de mai et la plus basse est voisine de 18°C aux mois de décembre-janvier. La température moyenne annuelle est autour de 23°C.

D'une manière générale, le climat y est assez agréable et la végétation est luxuriante. La faune entomologique est constituée d'invertébrés et d'arthropodes. *Anophèles gambiae sl* et *An. funestus* abondent dans les villages où ils assurent la transmission du paludisme et de la filariose de Bancrofti surtout en saison des pluies. *Anophèles gambiae sl* est le vecteur majeur du paludisme rencontré dans le village.

### 4.2.3. Infrastructures socio-sanitaires

Le village de Kéniéroba dispose d'un dispensaire animé par un infirmier de premier cycle. Il relève de l'aire de santé de Bancoumana. Kéniéroba dispose aussi d'une école fondamentale avec un premier cycle et un second cycle.

### 4.2.4. Activités socio-économiques et culturelles.

Les activités économiques dominantes dans la commune rurale de Bancoumana sont marquées par l'agriculture, l'élevage, la pêche, l'artisanat, le commerce et la cueillette. L'agriculture constitue la principale activité économique des populations. La plaine de Kéniéroba est propice aux cultures vivrières et industrielles. Aux abords du village, dans les retenues d'eau (deux digues), la culture du riz (*Oryza sativa* L., *O. glaberrima* S.) est très développée. Celle du sorgho (*Sorghum vulgare* J.), du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf & Hubb), du maïs (*Zea mays* L.), du haricot (*Vigna unguiculata* L.), du papaye (*Carica papaya* L.), de l'orange (*Citrus sinensis* L.) et du citron (*Citrus limonum* RISSO.) a lieu surtout dans les alentours des concessions ou dans des jardins privés.

La culture du dah (*Hibiscus sabdariffa* L.), du coton (*Gossypium barbadense* L.), de l'arachide (*Arachis hypogae* L.), de la courge (*Cucurbita pepo* L.), du melon (*Cucurmis melo* L.), de concombre (*Cucumis sativus* L.) de l'oignon (*Allium cepa* L), de la patate douce (*Ipomoea batatas* L.), de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), du piment (*Pimenta officinalis* Lindl.), de la poivre de guinée (*Capsicum annum* L.), du tabac (*Nicotiana tabaccum* L.), du cotonnier (*Gossypium herbaceum* L.), du sésame (*Sesamum indicum* L.), de la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), de la banane (*Musa paradisiaca*

L.) ainsi que d'autres produits maraîchers constituent d'importantes ressources de revenu pour la population. La taille des exploitations est très variable et dépend de la capacité de travail de la famille ainsi que du patrimoine foncier.

L'élevage des ovins, des caprins et des bovins y est pratiqué comme une activité économique secondaire. On y retrouve aussi quelques équidés (ânes et chevaux) utilisés comme animaux de trait. La plupart des villageois thésaurisent leurs revenus dans l'élevage et dans les cultures industrielles. L'artisanat local est peu développé (cordonnerie, forgerie, maçonnerie, poterie). En dehors de la commercialisation des produits agricoles, le commerce des produits de consommation courante y est pratiqué. Une foire hebdomadaire a lieu à Kéniéroba chaque jeudi favorisant ainsi le phénomène d'automédication par la circulation facile des médicaments en provenance de la Guinée et du Nigeria.

L'islam représente la religion la plus dominante avec 95% de personnes qui s'en déclarent. Cependant, les religions traditionnelles sont assez présentes dans certaines grandes familles et sont visibles dans les pratiques quotidiennes de la vie socioculturelle.

#### **4.3. Type et période d'étude**

Nous avons mené une étude longitudinale sur une cohorte de 500 participants dans le village de Kéniéroba entre juin 2013 et mai 2014 avec des passages transversaux à intervalle de deux semaines.

#### **4.4. Population d'étude**

Nous avons recruté 500 personnes âgées de 1 à 65 ans, au prorata de la répartition par âge de la population du village de Kéniéroba. Lorsque

cela était possible, nous avons enrôlé des familles entières vivant dans une concession unique (c'est-à-dire logement).

#### **4.5. Critères d'inclusion**

Nous avons inclus dans cette étude tous les volontaires répondant aux critères suivants:

- Résider dans le village de Kéniéroba pour l'année complète de l'étude,
- Accepter volontairement de participer à l'étude comme attestée par le consentement libre et éclairé obtenu des parents ou des tuteurs des enfants âgés de moins de 18 ans,
- Être âgé de 1 à 65 ans,
- Avoir un taux d'hémoglobine  $\geq 8,5$  g/dl.

#### **4.6. Critères de non inclusion**

Nous n'avons pas inclus dans notre étude, les sujets qui sont dans les situation telles que toute condition les rendant incapable de suivre le protocole (par exemple : maladie psychiatrique, hémophilie) ou maladies chroniques connues.

#### **4.7. Collecte et traitement des échantillons de recherche**

Après avoir obtenu le consentement libre et éclairé de chaque volontaire (ou du parent/tuteur de ceux âgés de moins de 18 ans), nous avons assigné à chaque participant un numéro d'identification unique et enregistré son nom, son sexe et son âge. Tous les participants ont été vivement encouragés à se présenter au centre de santé de Kéniéroba à tout moment en cas de signe de paludisme (notamment la fièvre).

Des échantillons de sang, ont été recueillis chez les participants toutes les 2 semaines par ponction au niveau de la pulpe du doigt. Cet

échantillon de sang était utilisé pour confectionner des papiers filtres (Whatman 3MM) imbibé de sang (Confettis) et des gouttes épaisses sur lame. Les confettis et les gouttes épaisses, étaient séchés et conservés à température ambiante jusqu'à leur utilisation. Si les participants présentaient des symptômes du paludisme (température axillaire  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  ou un antécédent de fièvre, céphalées, malaise, etc.) au moment d'une visite programmée ou imprévue, la goutte épaisse était réalisée pour la recherche de parasite. En cas de résultat positif, le patient était référé au centre de santé de Kéniéroba pour une meilleure prise en charge.

Il convient de noter que la microscopie n'était pas réalisée systématiquement pendant l'étude. La goutte épaisse était effectuée seulement dans le but de diagnostiquer le paludisme clinique chez les participants qui présentaient des symptômes du paludisme comme indiqué ci-dessus, pendant la période d'étude.

Pour les besoins de l'analyse de nos données, le paludisme clinique a été défini comme une température axillaire  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  associée à une densité parasitaire asexuée  $> 5.000/\mu\text{L}$  en utilisant la microscopie [11]. Au moment de l'inclusion, le groupe sanguin ABO/Rh, le type d'hémoglobine (AA, AS ou AC) et le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et  $\alpha$ -thalassémie ont été déterminés pour chaque participant tels que décrits antérieurement [77]

#### **4.8. Variables mesurées.**

Les variables suivantes ont été mesurées :

Variables sociodémographiques : l'âge, le sexe et la résidence.

Variables biologiques : le taux d'hémoglobine, le type d'hémoglobine, le statut d'alpha-thalassémie, le groupe sanguin ABO/Rh et le déficit en G6PD.

Variables parasitologiques: parasitémie.

#### **4.9. Examens de laboratoire utilisés**

Chaque patient inclus a fait l'objet d'un prélèvement sanguin au bout du doigt. Sur ce prélèvement, nous avons effectué les analyses suivantes (décrites en détails en annexe) portant sur:

- la détermination du type d'hémoglobine par l'appareil D-10 de Bio-Rad dont le principe est basé sur la chromatographie liquide de haute performance [78].
- le taux d'hémoglobine a été mesuré avec l'appareil HemoCue® 201<sup>+</sup> selon les spécifications du fabricant [79]
- la détection de la suppression de 3,7kb d'alpha-thalassémie a été faite en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne nichée (*Nested-PCR*) afin d'identifier les enfants l'hétérozygote (- $\alpha/\alpha$ ) et homozygotes (- $\alpha/-\alpha$ ) [80].
- le groupe sanguin ABO a été déterminé par le test d'agglutination en utilisant des kits commerciaux à base d'anticorps monoclonaux (Linear Chemicals) [81].

#### **4.10. Gestion et l'analyse des données**

Les données ont été recueillies sur les fiches de rapport de cas (CRF). Les dossiers et les échantillons de produits biologiques des participants ont été codés en attribuant un numéro unique d'étude à chaque participant. Les CRF ont été faxés dans la base de données conçue en utilisant un appareil appelé «DataFAX DF/Net Research Inc, USA».

Une série de monitorages internes et externes a été instaurée pour assurer la bonne qualité des données collectées. A chaque passage, la prévalence de *P. falciparum* au niveau de la population a été calculée comme la proportion (%) des individus qui étaient positifs à *P. falciparum* par PCR parmi le nombre total d'individus qui ont fourni des échantillons de sang. Seules les données des personnes chez lesquelles des échantillons d'au moins deux tiers des 22 collections d'échantillons prévues sont disponibles (soit 430/500 personnes inscrites) ont été analysées.

À chacun de mois sélectionné (Juin, Novembre, Février et Avril) c'est à dire deux mois en saison humide et deux mois en saison sèche, la proportion polymorphique (polyclonalité) a été calculée pour chaque individu Pf-positif comme proportion (%) de réactions polymorphes parmi le nombre total de réactions réussies (réactions qui ont donné des effets monomorphes ou polymorphes appels nucléotidiques) des 24 réactions qui composent l'analyse à code à barres 24-SNP. Seules les données provenant d'échantillons avec  $\geq 13$  essais réussis (Jun-V1, 96%, Nov.-V1, 82%, Fév-V1, 88% et Avr-V1, 98%) ont été analysées.

La Persistance de *P. falciparum* stratifié par âge et par sexe a été analysée en utilisant le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn et du test de Mann-Whitney, respectivement. Les distributions COI et polyclonalité ont été analysées entre les 4 mois choisi en utilisant le test de Chi-carré et le test de Kruskal-Wallis, respectivement. Les associations entre Persistance-Pf et polyclonalité ont été analysées en utilisant le test de corrélation de Rang de Spearman.



Une analyse de régression linéaire multiple a été effectuée pour évaluer l'association entre la réponse et les variables explicatives multiples (par exemple, l'effet des facteurs de l'hôte sur Persistance-Pf). Pour les données cliniques, un modèle de régression logistique a été utilisé pour analyser le risque de paludisme clinique sur une année et les modèles de régression proportionnelle des risques de Poisson et Cox ont été utilisés pour analyser, respectivement, le nombre d'épisodes de paludisme et le premier épisode de paludisme clinique.

#### **4.11.Considérations éthiques**

Cette étude a été soumise à l'approbation du Comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie au Mali (Lettre N°2013-32/CEFMPOS du 3 avril 2013 et Lettre N°2013-117 du 13 décembre 2013 en Annexes). Le consentement volontaire, libre et éclairé a été obtenu auprès des parents ou tuteurs des enfants participants en plus de l'assentiment pour les enfants âgés de 12 à 17 ans. L'étude a été supervisée par un moniteur clinique afin de s'assurer de la conformité du protocole. Cette étude a été conduite selon la révision actuelle de la Déclaration d'Helsinki et selon les règlements et les lignes directrices de la Conférence internationale sur l'harmonisation et les Bonnes pratiques cliniques (ICH-GCP) qui offre la plus grande protection à la personne. Pour tous les prélèvements sanguins, nous avons utilisé le matériel à usage unique et respecté les règles d'asepsie et de bonnes pratiques cliniques et de laboratoire.

#### **4.12.Définition des termes:**

**La persistance de *P. falciparum* (Persistance-Pf)** a été définie comme la proportion des échantillons sanguins positifs à *P. falciparum* sur l'ensemble des prélèvements effectués au cours de la période d'étude (1 an) chez une personne.

**La polyclonalité** a été définie comme le nombre de clone de *P. falciparum* détecté en utilisant le test de code-barres de 21 mutations ponctuelles (SNPs) effectué sur ADN parasitaire.

## 5. Résultats

### 5.1. Résultats globaux

Nous avons enrôlé dans notre étude 500 participants âgés de 1 à 65 ans. Dans le souci d'une meilleure représentativité de la population, nous avons stratifié la population d'étude en 10 classes d'âge et les sujets étaient appariés en âge et en sexe autant que possible. La proportion de chacune des classes d'âge tournait autour de 10%. Le sex-ratio était de 0.76 en faveur du sexe féminin. La tranche d'âge **7 – 8** ans était la plus représentée avec 12,2% et le groupe sanguin O était majoritaire avec une proportion de 35,27%. La proportion d'HbAS était de 13,95%.

## 5.2. Résultats descriptifs

**Tableau II:** Répartition des volontaires selon la tranche d'âge et le sexe

Tranche d'âge (ans)	Masculin n (%)	Féminin n (%)	Sexe ration	Total
1 – 2	22 (10,8)	18 (6,3)	1,22	40
3 – 4	21 (9,7)	33 (11,6)	0,63	540
5 – 6	19 (8,7)	29 (10,2)	0,65	48
7 – 8	33 (15,2)	28 (9,8)	1,17	61
9 – 10	31 (14,3)	27 (9,5)	1,14	58
11 – 12	24 (11,1)	27(9,5)	0,88	51
13 – 16	33 (15,2)	24 (8,4)	1,37	57
17 – 30	9 (4,1)	39 (13,7)	0,23	48
31 – 40	5 (2,3)	33 (11,6)	0,15	38
> 40	19 (8,70)	26 (9,1)	0,73	45
<b>Total</b>	<b>216</b>	<b>284</b>	<b>0.76</b>	<b>500</b>

Le sexe féminin était plus représenté dans les différentes tranches d'âges excepté les tranches d'âge **1-2 ans, 7- 8 ans, 9-10 ans et 13-16 ans** qui étaient dominés par le sexe masculin

**Tableau III :** Répartition des sujets en fonction du groupe sanguin

Groupe sanguin	Effectif	Pourcentage
A	149	29,85
AB	42	8,48
B	132	26,45
O	176	35,27
Non fait	01	0,20
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>100</b>

Le groupe sanguin O était majoritaire avec 35,27% tandis que le groupe sanguin AB était minoritaire avec 8,48%. Un échantillon non fait.

**Tableau IV :** Répartition des volontaires en fonction du type d'hémoglobine

Type d'hémoglobine	Effectif	Pourcentage
AA	377	76,16
AC	43	8,68
AS	69	13,95
CC	1	0,20
SC	5	1,01
Non fait	5	1,00
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>100</b>

La forme HbAS était de 13,95% contre 8,68 pour la forme AC. Un seul cas de la forme HbCC a été observé.

**Tableau V:** Répartition des volontaires en fonction du déficit en G6PD

Déficit en G6PD	Effectif	Pourcentage
Homozygote (A-)	24	4,8
Normal (A+)	413	82,6
Hétérozygote (A+ /-)	53	10,6
Inconnu*	10	2,0
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>100</b>

\*n'ont pas donné de résultats

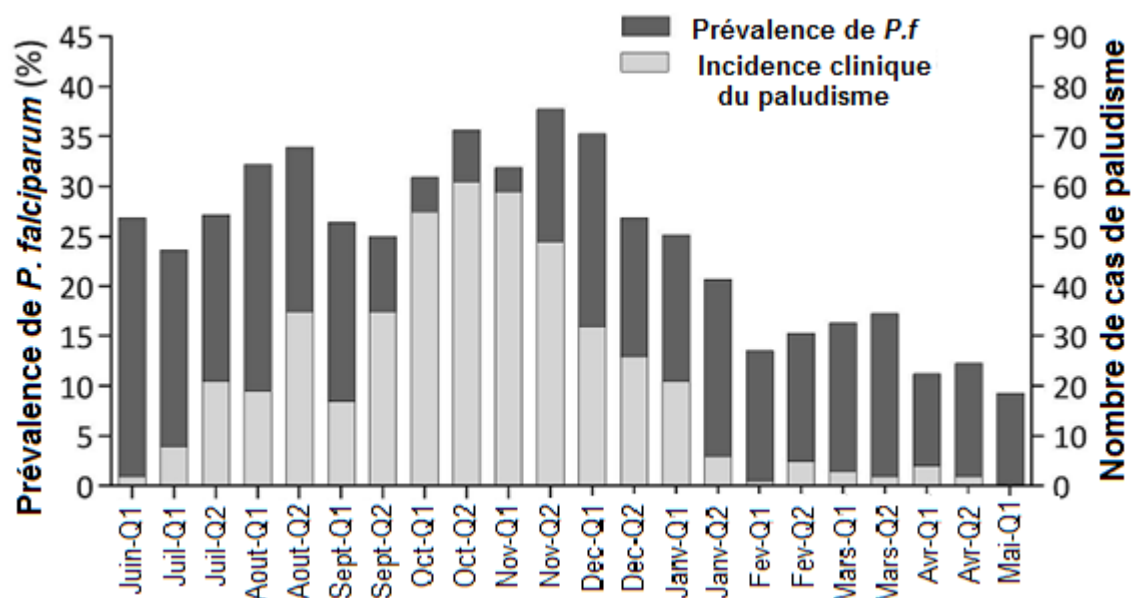
La forme hétérozygote représentait 10,81% des participants à l'étude. Dix échantillons n'ont pas donné de résultats.

**Tableau VI :** Répartition des participants en fonction d'alpha-thalassémie.

Alpha thalassémie	Effectif	Pourcentage
Hétérozygote (HE)	162	32,4
Homozygote (HO)	11	2,2
Normal (WT)	314	62,8
Inconnu*	13	2,6
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>100</b>

\*n'ont pas donné de résultats

L'alpha thalassémie à l'état hétérozygote était retrouvé chez 33,26% des participants.



**Figure 3 :** Répartition de la prévalence de l'infection à *P. falciparum* et des cas cliniques du paludisme enregistrés sur la période d'étude en fonction des mois.

La prévalence de l'infection à *P. falciparum*, détectée par PCR, était le plus élevée dans la deuxième quinzaine du mois de novembre 2013 avec 37% et la plus faible dans la première quinzaine de mai 2014 avec 17%.

Deux pics ont été observés dans l'incidence des cas de paludisme en mi-août et mi-octobre 2013.

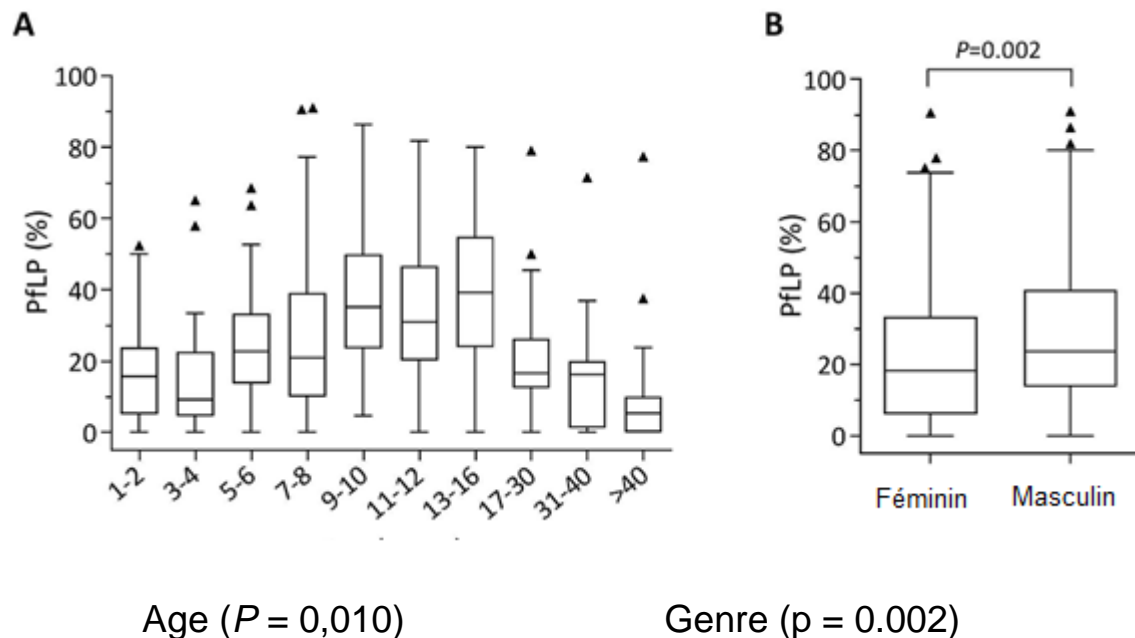
### 5.3. Résultats analytiques

**Tableau VII :** Répartition des épisodes palustres selon les catégories d'âge.

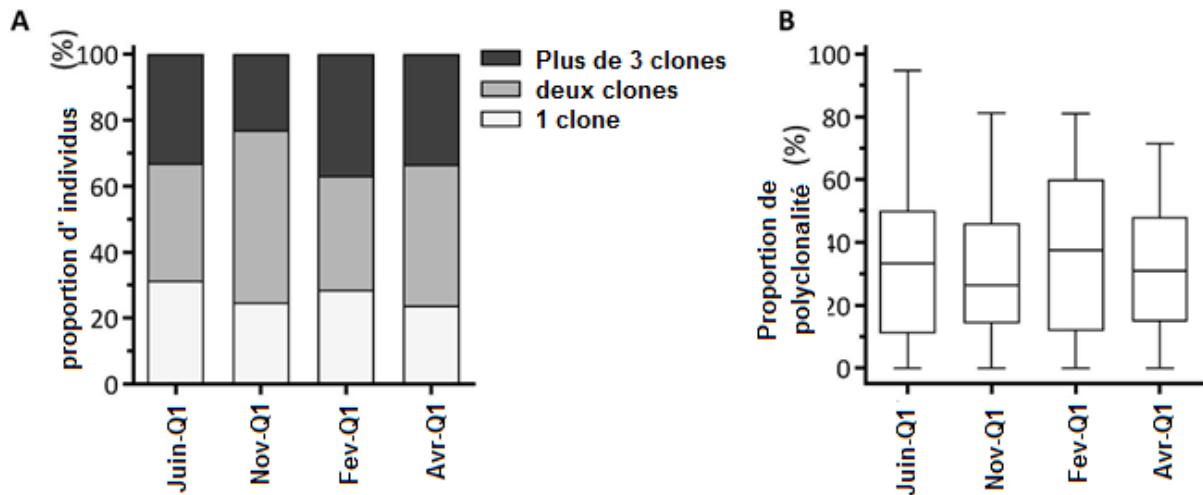
Age (ans)	N	Proportion des cas de paludisme	Nombre moyen d'épisodes palustres
1 - 2	40	67,7	1,7 ± 1,5
3 - 4	54	79,6	1,7 ± 1,5
5 - 6	48	83,3	2,1 ± 1,5
7 - 8	61	77,0	1,6 ± 1,3
9 - 10	58	53,4	0,8 ± 0,9
11 - 12	51	45,1	0,8 ± 1,1
13 - 16	57	19,3	0,2 ± 0,6
17 - 30	48	6,3	0,1 ± 0,3
31 - 40	38	10,5	0,1 ± 0,3
> 40	45	6,7	0,1 ± 0,4
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>46,4</b>	<b>0,9 ± 1,3</b>

Au total, 469 cas de paludisme ont été enregistrés chez 232 participants sur une année alors que 86% de cas ont été enregistrés chez les enfants âgés de moins de 6 ans. Globalement, les enfants de moins de six ans faisaient en moyenne 2 épisodes palustres par an.



**Figure 4** : Persistance de *P. falciparum* stratifiée selon l'âge et le sexe

Nous avons constaté que les personnes âgées de 9 à 16 ans avaient des proportions de cas positifs à *P. falciparum* significativement plus élevés comparées à celles âgées de moins de 9 ans et de plus de 17 ans ( $p = \mathbf{0.010}$ , test de comparaison multiple de Dunn). La persistance longitudinale de *P. falciparum* dans la cohorte est en corrélation avec l'âge et semble être associée au sexe masculin. En moyenne, *P. falciparum* a été détecté dans 27% des prélèvements effectués chez les sujets masculins contre 17% pour les sujets de sexe féminin ( $p = \mathbf{0,0024}$ , test de Mann-Whitney).

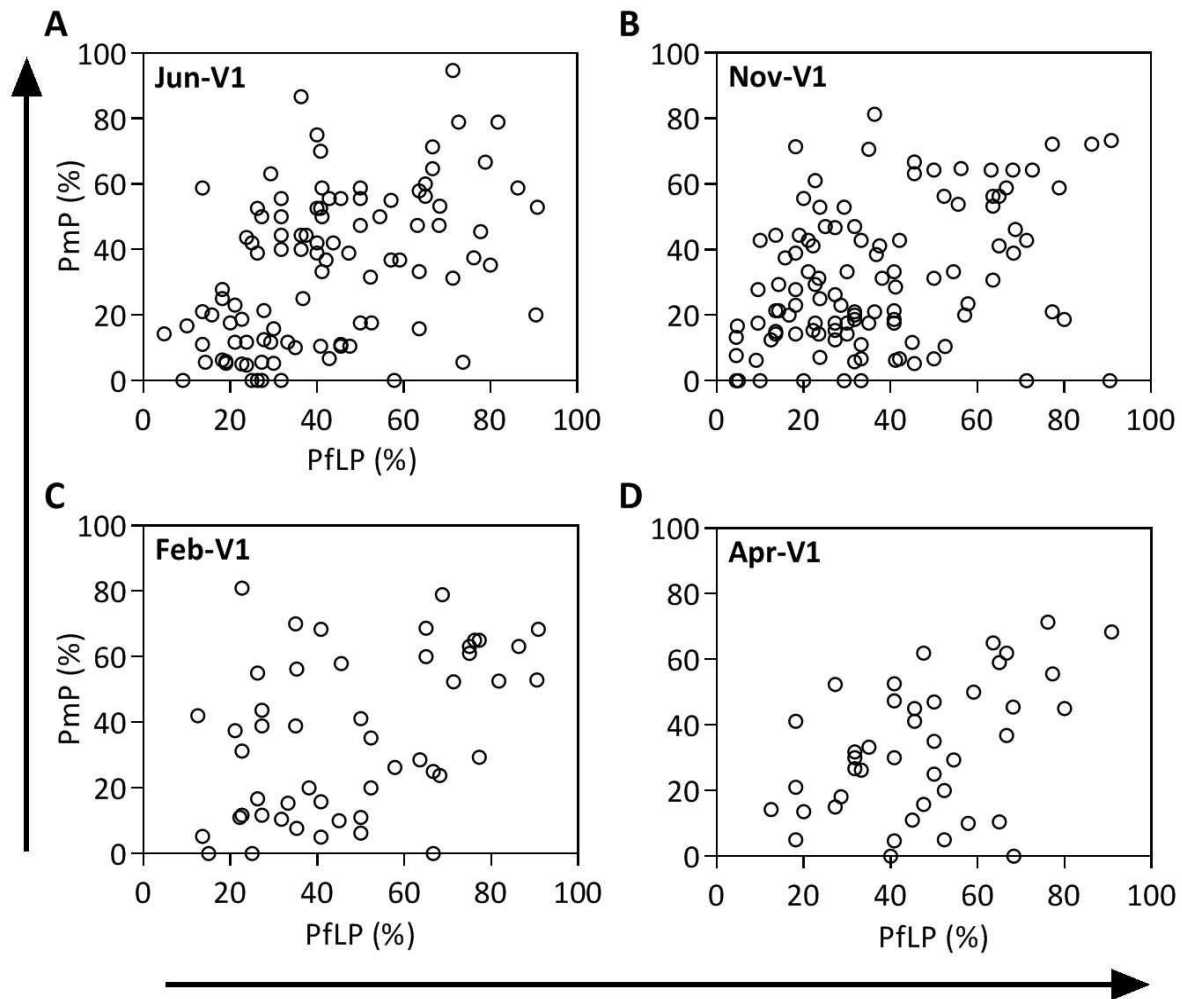


**Figure 5 : (A) Polyclonalité des infections Palustres au cours de 2 mois de saison humide et 2 mois saison sèche. (B) Prévalence de la polyclonalité des infections en fonction des périodes.**

Les infections poly clonales ont été observées tout au long de la période d'étude.

La majorité des infections était constituée de deux clones.

La proportion d'infection polyclonale atteignait en moyenne 35%.



**Figure 6 : Corrélation entre la proportion de polyclonale et la persistance de *P. falciparum***

La proportion de polyclonalité est en corrélation statistiquement significativement avec la persistance de l'infection à *P. falciparum* à tous les niveaux

(A) Juin-V1 ( $r = 0,47$ , test de corrélation de Spearman =  $0,30 \pm 0,61$  ;  $p < 0,001$ );

(B) Novembre-V1 ( $r = 0,36$ ,  $0,18 \pm 0,52$ ,  $p < 0,001$ )

(C) Février-V1 ( $r = 0,42$ ,  $0,15 \pm 0,63$ ,  $p = 0,003$ ); et

(D) Avril-V1 ( $r = 0,39$ ,  $0,09 \pm 0,63$ ,  $p = 0,011$ ).

**Tableau VIII : Résultats de l'analyse de régression multivariée du risque clinique de paludisme<sup>a</sup>**

Variables explicatives	Apparition de paludisme		Nombre d'épisodes palustres		Temps avant le premier épisode de paludisme	
	OR <sup>b</sup> , (IC <sup>c</sup> 95%)	<i>p</i>	RR <sup>d</sup> , (IC95%)	<i>P</i>	HR <sup>e</sup> , (IC95%)	<i>p</i>
<b>Age</b>	0,88 (0,86±0,91)	<b>&lt;0,001</b>	0,78(0,73±0,82)	<b>&lt;0,001</b>	1,01(0,99±1,03)	0,410
<b>Sexe</b>	0.61 (0,23±1,59)	0,317	0,77(0,34-1.74)	0,526	0,90(0,49-1,67)	0,735
<b>Persistance-Pf</b>	0,35(0,20±0,60)	0,001	0,37(0,22±0,61)	<b>&lt;0,001</b>	1,07(074±1,53)	0,692
<b>Polyclonalité</b>	1,65(0,55-5,25)	0.377	1,01(0.37-2.77)	0,983	1,66(0,67-3,86)	0,269

OR : odds ratio. IC : intervalle de confiance. RR : risque relatif. HR : taux de dangerosité.

En utilisant comme point de départ le passage de la première quinzaine du mois de juin, nous avons analysé l'impact du genre, de l'âge, de la persistance de l'infection à *P. falciparum* et de la polyclonalité sur 3 mesures du risque de paludisme sur une année :

- 1) la survenue du paludisme
- 2) Le nombre d'épisodes de paludisme
- 3) Le temps avant le premier épisode de paludisme

Pour cette analyse, nous avons inclus seulement les sujets qui étaient positifs à *P. falciparum* dès le premier passage (première quinzaine du mois de juin) et chez qui une infection polyclonalité et une persistance de

la parasitémie ont été constatées. Au total, 103 patients ont été inclus dans cette analyse. Les patients ont été classés en deux sous-groupes (en fonction des degrés de persistance de la parasitémie et de la polyclonalité (**élevé** = persistance ou polyclonalité au-delà du 75ème percentile et **faible** = persistance ou polyclonalité en deçà du 75ème percentile). La polyclonalité et le genre n'étaient pas significativement associés à l'apparition du paludisme ou au nombre d'épisodes de paludisme, et aucun des facteurs n'a été associé au délai observé avant le premier épisode de paludisme.

## 6. Commentaires et Discussion

Le paludisme reste un problème majeur de santé publique lequel la lutte et l'élimination seront longue et difficile en absence d'un vaccin efficace [14]. Notre objectif était d'évaluer l'influence de la persistance de l'infection à *P. falciparum* et de sa polyclonalité sur le risque de paludisme clinique à Kéniéroba entre 2013 et 2014. Plusieurs chercheurs considèrent cela comme un objectif réaliste à long terme. En zone d'endémie palustre, les individus hébergent une ou plusieurs souches de parasite en même temps. Le nombre de clones qu'héberge un patient est un paramètre important à prendre en compte dans l'épidémiologie du paludisme. En effet, selon l'étude de Ntoumi et al au Gabon en 2000, certains clones étaient surreprésentés dans les isolats provenant des cas cliniques que dans les isolats provenant des porteurs asymptomatiques [82]. La protection contre le paludisme à *P. falciparum* est graduellement acquise après des infections répétées et elle dépend largement de l'intensité de l'exposition aux *Plasmodium* [83].

La gravité et la fréquence des épisodes palustres diminuent avec l'âge dans les zones de transmission élevée. Néanmoins, les parasites sont souvent détectés dans le sang de porteurs asymptomatiques et la prévalence du parasite est largement utilisée comme une mesure du niveau de transmission [84]. Les mécanismes par lesquels l'immunité protectrice contre le paludisme est acquise et maintenue ne pas encore complètement élucidés [85]. La persistance et le degré de clonalité des infections à *Plasmodium falciparum* pourraient influencer l'installation et

le maintien de l'immunité anti palustre dans les zones d'endémie palustre.

Le choix de Kéniéroba s'explique par la disponibilité des infrastructures sanitaires et de recherche et surtout du fait que nous avons une longue expérience de recherche biomédicale dans la zone. La population est disponible à prendre part dans la recherche contre le paludisme. En outre, Kéniéroba, situé en zone sud-soudanienne, est accessible en toute saison et offre un cadre de recherche représentatif des régions situées dans le sud du Mali avec une transmission saisonnière longue du paludisme (juin à décembre). La réalisation de l'étude a été rendue possible par l'obtention de la permission communautaire et cela a permis leur adhésion à notre méthodologie de travail et aux objectifs de étude.

La persistance de l'infection à *P. falciparum* a été définie comme un paramètre qui mesure le nombre de fois qu'une personne est infectée par *P. falciparum* sur un temps donné. Cela implique que la fréquence ou la durée de l'exposition à *P. falciparum*, ou encore la diversité génomique de l'infection, puisse influencer le risque de paludisme clinique. Ainsi, les personnes présentant une persistance de *P. falciparum* plus élevée seraient plus susceptibles d'acquérir une immunité protectrice efficace contre le paludisme clinique. Bien que plusieurs études aient évalué l'impact de la positivité initiale à *P. falciparum* en début de saison de transmission sur le risque de paludisme clinique au cours de la même saison [11, 86, 87]. L'effet de la persistance de l'infection à *P. falciparum* et de sa polyclonalité n'a pas été examiné.

Nous avons suivi sur une année entière, avec des passages répétés toutes les deux semaines, 500 volontaires âgés de 1 à 65 ans vivant dans le village de Kéniéroba dans la commune rurale de Bancoumana.

Les femmes étaient majoritaires avec un sexe ratio de 0.76 et la classe d'âge 7-8 ans était majoritaire avec 12.2% (tableau II). L'effet de la persistante de l'infection à *P. falciparum* et la polyclonalité sur le risque subséquent de paludisme clinique ont été évalués,

Au cours de notre étude, nous avons utilisé la PCR pour déterminer le taux d'infection à *P. falciparum* et le code barre d'ADN constitué de 24-SNPs a été utilisé pour déterminer la polyclonalité de l'infection à *P. falciparum*. Ainsi, nous avons observé que la prévalence de l'infection à *P. falciparum* et l'incidence de la maladie variaient en fonction des périodes avec des pics observés au mois de novembre 2013 (37% ; figure 3). Ces résultats sont par contre supérieurs à nos résultats antérieurs de 2012 (donnée non publiées) avec un pic de 27,6% au mois d'octobre dans le même village. Ce décalage de pic pourrait s'expliquer par une variation de la pluviométrie entre les années.

- Nos données montrent l'effet de l'âge de l'hôte sur la prévalence transversale du paludisme à *P. falciparum* qui a été déjà rapporté lors des études menés au Sénégal [88] et en Tanzanie [89]. La prévalence du paludisme à *P. falciparum* était plus faible chez les plus jeunes enfants (1 – 8 ans) et les adultes (> 17 ans) par rapport aux groupes d'âge intermédiaires (fig4A). Conformément à ces résultats, notre analyse de la persistance de l'infection à *P. falciparum* a révélé un effet significatif de l'âge de l'hôte, qui devient significatif chez les personnes âgées de 9 à 16 ans (fig4A). Il semblerait que cette catégorie d'âge tolèrent mieux la présence du Parasite et développent une immunité protectrice efficace, surtout dans notre site d'étude où la transmission du Paludisme est intense.



Bien que nous n'ayons pas évalué la stabilité de la relation entre l'âge et la persistance de l'infection à *P. falciparum* d'une année à l'autre dans notre population étudiée, l'effet de l'âge sur la prévalence du paludisme à *P. falciparum* a été observé dans plusieurs régions où l'intensité de la transmission décroissante était associée à un changement de la prévalence du paludisme à *P. falciparum* avec un pic dans les groupes d'âge plus âgés [88, 90, 91].

Il faudra donc réévaluer cette dynamique en tant que changements locale de l'intensité la de transmission.

Nos résultats ont montré l'influence du sexe sur la persistance de l'infection à *P. falciparum* à Kéniéroba. Elle était plus élevée chez les hommes (27% ; figure 4b) par rapport aux femmes (17%) dans cette population. Notre étude n'a pas pu expliquer la prévalence plus élevée chez les hommes de cette population. Il est possible que l'effet du sexe observé sur la prévalence de *P. falciparum* puisse être liés aux facteurs socio-culturels et comportementaux qui les exposent aux piqûres des moustiques, ou par contre la disparité dans l'utilisation de la moustiquaire imprègne d'insecticide au moment du sommeil. D'autres études ont aussi évoqués la réponse immunitaire à l'infection *P. falciparum* comme explication possible [92].

Le génotypage de gènes polymorphes à la surface du mérozoïte (MSP-1 et MSP-2) est une méthode largement utilisée pour détecter les infections polyclonales à *P. falciparum*. Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser un test de code-barres d'ADN à 24-SNPs indépendants. Ceci permet d'avoir une sensibilité plus élevée pour apprécier la

polyclonalité de l'infection. Etant donné que cette technique de barcodage n'a été utilisée que pour surveiller la dynamique de la population parasitaire jusqu'à maintenant [93-95], Nos données préliminaires ont montré que le code barre de 24 SNPs peut détecter plus de 20% des infections polyclonales que le génotypage du gène *MSP2*. Plus de 70% des infections à *P. falciparum* détectées dans les échantillons de notre étude ont été jugées polyclonales (fig5B). Cette proportion est supérieure à celle mesurée par le génotypage de *MSP2* à Kambila (25%), un village où la dynamique de la transmission du paludisme est similaire à celle de Kéniéroba [11]. En outre, cette forte prévalence de la polyclonalité a été observée tout au long de la période d'étude (figure 5). Ces résultats suggèrent que la persistance de l'infection à *P. falciparum* au cours de la saison sèche pourrait entraîner des changements dans la polyclonalité dans cette région.

Il y a deux aspects à retenir pour l'interprétation de ces données : L'absence d'effet saisonnier sur la multiclonalité au niveau de la population ne signifie pas nécessairement que la multiclonalité au sein des individus est stable tout au long de l'année. En outre, l'étude actuelle n'a pas été conçue pour évaluer la durée du portage pour les clones individuels de parasites *in vivo*. Par conséquent, nous ne pouvons pas déterminer s'il y avait des différences dans la durée de l'infection par des clones individuels entre les saisons humides et sèches.

Notre analyse a révélé une corrélation significative entre multiclonalité et Persistance-Pf, mettant en évidence l'importance de la multiclonalité comme indicateur du portage de parasite, en particulier dans les zones de transmission élevée où la prévalence des infections poly génomiques

peut dépasser 70%. Cependant, les coefficients de corrélation étaient  $\leq 0,47$ . En conséquence, la Persistance-Pf était significativement associée à la survenue du paludisme clinique et au nombre d'épisodes sur un an. Ces résultats sont conformes aux données précédentes et appuient un modèle de protection contre le paludisme clinique résultant d'un portage persistant ou répété de parasite mais pas nécessairement du nombre de clones à un moment précis [11, 14, 15, 96]. Il est intéressant de noter qu'il n'y avait aucune association entre l'une des variables explicatives testées et l'épisode du premier paludisme, qui a été utilisé comme mesure supplémentaire du risque dans certaines études [11, 14, 15, 97]. Le facteur de l'âge n'a pas non plus montré de corrélation significative, le moment du premier épisode de paludisme pourrait ne pas être un indicateur approprié dans le cadre de cette étude.

### **Perspectives de l'étude.**

Dans le futur, d'autres études seront nécessaires afin de mieux comprendre des souches de *P. falciparum* en prenant en compte les polymorphismes du globule rouge et de l'hémoglobine et sur le risque de paludisme clinique dans d'autres situations épidémiologiques.

### **Limites de notre étude**

Notre étude a eu un certain nombre de limites. Nous n'avons pas mesuré la densité parasitaire comme point final et nous ne sommes donc pas en mesure d'évaluer les corrélations entre la densité du parasite et les facteurs de l'hôte ainsi que les facteurs parasitaires tels que le COI dans cette population. En outre, les études futures devront étudier les impacts d'autres déterminants extrinsèques de la transmission et du portage des parasites tels que les précipitations, la température et l'utilisation des

outils de transmission-contrôle (par exemple, les moustiquaires et la pulvérisation résiduelle à l'intérieur, ce qui peut introduire des variations du niveau du ménage). Notre étude a été limitée à 1 an et devra être étendue au-delà pour déterminer la stabilité de l'âge et les effets de genre sur la Persistance-Pf avec l'évolution de la dynamique de transmission. D'autres participants peuvent également être nécessaires pour évaluer correctement les effets de plusieurs facteurs d'hôte sous-représentés (par Ex., Polymorphismes de globules rouges) sur la Persistance-Pf et le risque clinique de paludisme. En outre, *P. malariae* qui était le seul autre *Plasmodium* spp détecté dans notre cohorte s'est produit rarement. Le portage persistant et le risque de coïnfection des espèces plasmodiales devraient être évalués dans un contexte différent avec des méthodologies plus ciblées.

## 7. Conclusion et recommandations

### 7.1. Conclusion

Au terme de notre étude, nous pouvons conclure que la plus forte et la plus faible Persistance de *P. falciparum* ont été observées en novembre 2013 et mai 2014 (**37%** et **17%** respectivement). La Persistance de *P. falciparum* a été observée surtout dans la catégorie d'âge de 9 à 16 ans. Les hommes avaient une Persistance de *P. falciparum* plus élevée que les femmes. Notre étude démontre que, dans le contexte de la transmission saisonnière élevée du paludisme, la multiclonalité était positivement associée à la persistance de la positivité de *P. falciparum*, mais seul le Pf persistant était significativement associé au risque clinique de paludisme. Notre étude souligne l'importance considérable de la prise en compte de la persistance de l'infection à *P. falciparum* dans les études futures qui évaluent le risque clinique de paludisme.

### 7.2. Recommandations

Au terme de notre étude et au vu de nos résultats, nous pouvons formuler des recommandations suivantes :

- **Aux populations:**

- d'amener leurs enfants en consultation dès les premiers symptômes évocateurs du paludisme et d'être disponibles lors des études de recherche clinique sur cette maladie.

- **Aux autorités sanitaires et administratives:**

- d'encourager et de financer d'avantage la recherche médicale sur le paludisme et autres maladies infectieuses afin d'aboutir à des meilleurs méthodes efficace pour mieux contre le paludisme à *P. falciparum*

- **Aux chercheurs:**

- de faire des études plus détaillées sur la polyclonalité de *P. falciparum* en prenant en compte les covariantes telles que les polymorphismes du globule rouge et de l'hémoglobine qui semblent être très prévalent dans les zones d'endémie palustre

## 8. Annexes

### 8.1. Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10

#### Principe de la procédure du D-10

Le D-10 Dual Program repose sur le principe de la séparation des analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par échange d'ions. Les échantillons sont automatiquement dilués dans le système D-10 puis injectés dans la cartouche analytique. Le système D-10 envoie un gradient programmé de tampon de force ionique croissante (il existe 2 solutions de réactif de force ionique différentes, l'une hyper concentrée en ion et l'autre peu concentrée en ion. La machine mélange de façon automatique au fil du temps ces solutions pour obtenir une solution finale de concentration croissante) dans la cartouche ; les molécules d'hémoglobine sont alors séparées en fonction de leur interaction ionique avec le matériel contenu dans la cartouche. Les molécules d'hémoglobine séparées traversent ensuite la cellule à circulation du photomètre filtre où sont mesurés les changements d'absorbance à 415 nm. Le logiciel D-10 intègre les données brutes recueillies lors de chaque analyse. Un étalonnage à deux niveaux est employé pour déterminer les concentrations des différents types d'Hb recherchés. Un compte-rendu d'analyse et un chromatogramme sont générés pour chaque échantillon. La surface de l'A1c est calculée à l'aide d'un algorithme gaussien exponentiellement modifié (EMG) qui permet d'exclure la surface des pics dus à l'A1c labile et à l'hémoglobine carbamylée de la surface du pic A1c.

#### Prélèvement et manipulation des échantillons

#### Type d'échantillon

On utilise le Sang total.

### **Précautions relatives au prélèvement des échantillons**

Comme toute substance d'origine humaine les échantillons de sang doivent être manipulés en appliquant les procédures de biosécurité d'usage. Les échantillons de sang total doivent être recueillis dans un tube sous vide contenant de l'EDTA.

### **Conservation des échantillons**

Les échantillons de sang total peuvent être conservés jusqu'à 4 jours entre 2 et

8 °C, et à -40°C si l'échantillon ne peut être traité avant une semaine.

### **Préparation des échantillons**

Porter les tubes d'échantillons à température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant l'essai. Les échantillons sont stables à température ambiante pendant 1 jour. Aucune préparation particulière des échantillons n'est nécessaire. Il n'est pas nécessaire d'agiter les tubes avant le chargement. Les tubes d'échantillons sont placés dans le portoir à échantillons du D-10 puis mis dans le système D-10. S'assurer que les codes-barres sur les échantillons sont tournés vers l'arrière de l'appareil. Utiliser des adaptateurs spéciaux pour les tubes de 12, 13 et 14 mm de diamètre. Retirer tous les adaptateurs pour les tubes de 16 mm de diamètre. Les tubes dont la hauteur est comprise entre 75 mm et 100 mm peuvent être utilisés. Si l'échantillon se trouve dans un tube de taille ou de type anormal ou si le tube contient moins de 2,0 ml d'échantillon, une pré dilution est nécessaire. Pour prédiquer, pipeter 1,5 ml de solution de lavage/dilution dans un micro tube de 1,5 ml étiqueté puis ajouter 5 µL de l'échantillon de sang total. Boucher le tube et bien mélanger. Utiliser un adaptateur pour le micro tubes de 1,5 ml.



## 8.2. Détection de la mutation 202 A/G responsable du déficit en G6PD

### ✚ Extraction de l'ADN humain par le Kit QIAamp® (QIAGEN)

#### ✚ Principe

Le principe de l'extraction de l'ADN par le Kit QIAGEN est basé sur la libération, la cristallisation, le lavage et enfin la récupération de l'ADN.

### ✚ Matériel et composition du Kit QIAamp® (QIAGEN)

Matériel :

- Ciseaux
- Gants stériles
- Pipettes de 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Embouts de 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Agitateur
- Chronomètre
- Congélateur
- Box de conservation
- Marqueur indélébile
- Plaque chauffante
- Racks pour les tubes
- Centrifugeuse
- Mouchoir
- Thermomètre
- Tube Ependorf de 1,5ml
- Tube de 2ml
- Colonne Qiagen munie de filtre
- Confettis

**Réactifs :**

- Kit QIAGEN

- Ethanol absolute
  
- Composition du Kit QIAamp® (QIAGEN)
  - Buffer ATL
  - Buffer AL
  - Buffer AW1
  - Buffer AW2
  - Buffer AE
  - Protéinase K

#### **Prélèvement**

On recueille quelques gouttes de sang sur le confetti et on laisse sécher à l'air libre à l'abri de poussière et du soleil.

#### **Procédure**

- Découper les spots de confettis imbibés de sang à l'aide de ciseaux et les introduire dans les tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Ajouter 180 µl de Buffer ATL et incubé à 85°C pendant 10 minutes,
- Centrifuger brièvement et ajouter 20 µl de protéinase K, mélangé à l'aide d'un Vortex
- Incuber les tubes et leur contenu à 56°C pendant une heure
- Centrifuger brièvement les tubes pour faire descendre le liquide suspendu à leur paroi,
- Ajouter 200 µl de Buffer AL dans chaque tube et les agiter à l'aide d'un vortex
- Incuber les tubes à 70°C pendant 10 minutes,
- Centrifuger les tubes et ajouter 200 µl d'éthanol absolu (96 -100%) dans chaque tube,
- Agiter les tubes à l'aide d'un vortex puis centrifuger brièvement les tubes

- Transférer doucement tout le contenu des tubes dans une colonne Qiagen munie de filtre
- Fermer la colonne et la centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute.
- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un autre tube de 2 ml
- Mettre 500 µl de Buffer AW1 dilué avec de l'éthanol (19 ml de Buffer AW1 plus 25 ml de L'éthanol) dans la colonne,
- Centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute,
- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un autre tube de 2 ml
- Mettre 500 µl de Buffer AW2 dilué avec de l'éthanol (13 ml de Buffer AW2 plus 30ml de L'éthanol) dans la colonne,
- Centrifuger à 14000 tours par minute pendant 3 minutes.
- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un tube eppendorf 1,5 ml.
- Mettre 160 µl de Buffer AE dans la colonne et incubé à la température ambiante de la salle pendant une minute,
- Centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute,
- Jeter la colonne et garder le filtrat contenu dans le tube eppendorf 1.5 ml à + 4°C (Ce filtrat contient l'ADN extrait et purifié)

### **Amplification de l'exon 4 du gène de la G6PD par PCR**

#### **Principe**

Le principe consiste à faire le diagnostic de la mutation ponctuelle au niveau du gène de la G6PD par une PCR nichée. Au cours de cette technique, le produit issu d'une première PCR est de nouveau Amplifié à l'aide d'un second couple d'amorce qui s'hybride à une partie interne (nichée) de la séquence amplifiée. En mélangeant le couple d'amorce

avec l'ADN de l'homme dans des conditions d'hybridation, elles se positionnent en face de leurs séquences complémentaires respectives. Puis en faisant agir une ADN polymérase (Taq polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'=>3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié.

## **Matériels et réactifs.**

### **Matériel**

-Gants stériles -Tubes de 0. 2ml, 1. 5ml, -Pipettes de 2µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl -Embouts de 2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl -Marqueur indélébile -Chambre à PCR -Racks pour les tubes -Thermo cycler - Réfrigérateur

### **Réactifs** :

#### **Les amorces de la première amplification**

-A2 : GTCTTCTGGGTCAGGGAT


-B2 : GGAGAAAGCTCTCTCTCC

#### **Les amorces de la deuxième amplification**

-NA4: CCTGTTCCCTCTGCCACA

-NB4: GGGGGTCTCAAGAAGTAC

-Platinum super Mix

 **Procédure de la PCR** Il s'agit d'une PCR en deux temps où le produit de la première réaction est amplifié dans un deuxième temps.

- 1 - Déterminer le nombre N d'échantillon à traiter.
- 2- Prendre un tube Eppendorf 1.5 ml.
- 3- Mettre (N+1) x 22.5 µl de Platinum supermix.
- 4- Ajouter (N+1) x 0.1 µl de chacun des amorces **A2** et **B2** pour la première amplification ou **NA4** et **NB4** pour la deuxième amplification.
- 5- Bien mélanger.

6- Distribuer ce mélange dans les tubes PCR 0.2 ml déjà identifiés en raison de 22.7 µl de mélange par tube PCR.

7- Mettre dans chacun des tubes PCR 2.5 µl d'ADN de l'échantillon correspondant pour la première amplification (1µl du produit de la première amplification de l'échantillon pour la deuxième amplification).

8- Placer les tubes PCR dans la machine de PCR et mettre en marche le programme A (Dénaturation initial 95°C pendant 3 min, 45 cycles de : 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 45 seconde, 72°C pendant 1 min. Extension final 72 °c pendant 5 min) pour la première amplification et le programme B (Dénaturation initial 95°C pendant 3 min, 35 cycles de : 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 45 seconde, 72°C pendant 1 min. Extension final 72 °c pendant 5 min) pour la deuxième amplification.

#### **Programme de la première amplification**

- Dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes Puis 45 cycles de :
- Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
- Hybridation à 60°C pendant 45 secondes
- Extension à 72°C pendant 1 minute - Extension finale à 74°C pendant 5 minutes
- conservation + 4°C pendant un temps indéterminé

#### **Programme de la deuxième amplification**

- Dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes
- Hybridation à 60°C pendant 1 minute - Extension à 72°C pendant 45 secondes
- Extension finale à 74°C pendant 5minutes
- conservation + 4°C pendant un temps indéterminé

Procédures standard opératoires (SOP) de la goutte épaisse

**✚ Procédure** C'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang et l'identification des différentes espèces (frottis sanguin).

### **✚ Matériels**

- Deux (2) lames porte-objet propres et bien dégraissée
- Vaccinostyle stérile
- Alcool 70°
- Colorant de Giemsa pur
- Coton hydrophile sec
- Eau tamponnée, PH=7,2
- Boîte à lames ou couvercle pour protéger les frottis pendant le séchage
- Chiffon de coton propre et ne peluchant pas
- Crayon noir à mine grasse ou marqueur indélébile
- Stylo à bille
- Bacs de coloration
- Eprouvette graduée
- Râtelier, chronomètre
- Huile d'immersion
- Registre ou formulaire de notification
- Un compteur manuel
- Gant

### **✚ Lieu de prélèvement**

A l'extrémité d'un doigt gauche(en général 3e doigt après le pouce), sur la face latérale du doigt sain. Au lobe de l'oreille, après l'avoir réchauffé entre les doigts. Au talon ou gros orteil chez le nourrisson, après l'avoir réchauffé.

### 8.3. Technique de la goutte épaisse

Après avoir noté les renseignements relatifs sur le formulaire ou le registre approprié, ainsi que l'identité du patient sur la lame, réaliser la goutte comme suite :

1. En tenant la main gauche du malade la paume tournée vers le haut, choisir le troisième doigt après le pouce (le gros orteil peut être utilisé chez les nourrissons. Le pouce ne doit jamais être utilisé chez les adultes ou les enfants).
2. Avec un tampon de coton légèrement imbibé d'alcool, nettoyer le doigt en appuyant fermement pour enlever la saleté et la graisse du bout du doigt.
3. Avec le chiffon de coton propre, essuyer le doigt en appuyant fermement pour stimuler la circulation du sang.
4. Avec un vaccinostyle stérile, piquer le bout du doigt d'un seul geste.
5. Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec. S'assurer qu'il ne reste pas de fibres de coton sur le doigt, qui pourraient se mélanger au sang.
6. En procédant rapidement et en tenant les lames propres uniquement par les bords, recueillir le sang comme suit :
7. Appuyer doucement sur le doigt et recueillir une petite goutte de sang au milieu de la lame (cf. figure).
8. Essuyer le sang restant sur le bout du doigt avec un tampon de coton.
9. Tenir la lame supérieure par les bords.
10. Placer le coin de l'autre lame au centre de la goutte de sang
11. Etendre légèrement la surface de la goutte par des mouvements spiralés appuyés de la lame (cf. figure).

12. Assurer cette défibrination mécanique pendant quelques secondes et étendre la goutte sur environ 1 cm de diamètre.

13. Laisser la préparation à plat, à l'abri de la poussière, de la chaleur et des mouches pendant deux heures en zone sahélienne. Respecter ce long temps de séchage sinon il y a risque de décollement de la préparation lors de la coloration (cf. figure).

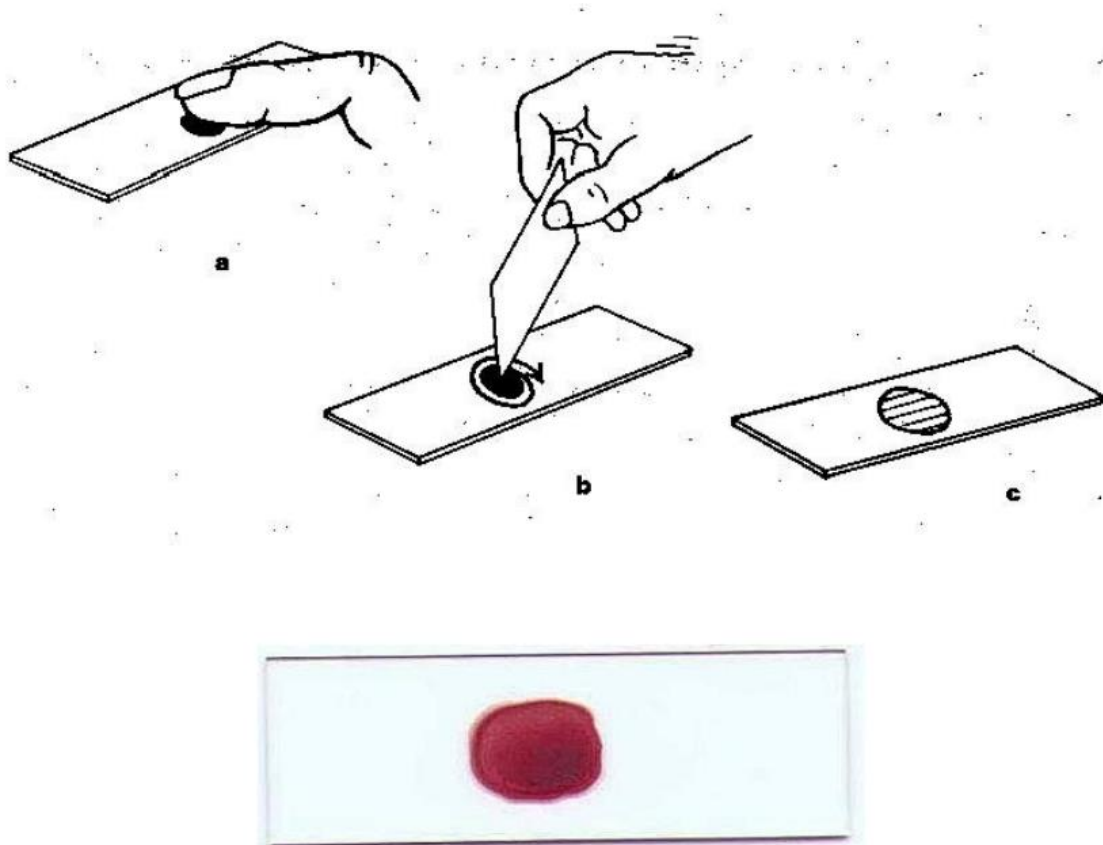


Figure 7 Technique de la goutte épaisse

**Technique de coloration de Giemsa.** C'est une méthode de coloration classique employée en routine pour la coloration des étalements sanguins et pour le diagnostic du paludisme. Toujours maintenir la bouteille bien fermée dans un endroit frais, à l'abri de la lumière solaire directe. Les bouteilles en verre blanc peuvent être



recouvertes d'une enveloppe de papier noir épais pour les protéger de la lumière.

- Fixer le frottis mince en le tapotant doucement avec un tampon de coton imbibé de méthanol, ou en le trempant dans un récipient de méthanol pendant quelques secondes.
- Préparer la solution de Giemsa à 3 ou 5 dans l'eau tamponnée (PH 7,2) et bien mélanger le colorant. Verser doucement le colorant dans la bague jusqu'à ce que la lame soit entièrement recouverte.
- Laisser colorer pendant 30 à 45 mn pour 30 (15 mn pour 10), à l'abri de la lumière solaire et de la poussière. Les lames sont ensuite rincées et séchées sur un râtelier.

#### Aspect

La lecture se fait au microscope à l'objectif 100 à l'huile d'immersion

- a) Le fond doit être propre, exempt de débris, coloré en bleu
- b) Les noyaux des leucocytes sont en violet foncé.
- c) Les parasites du paludisme sont bien définis, avec une chromatine rouge foncé et un cytoplasme d'une bleue pâle. Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, on peut voir un semis de granulations de Schuffner dans le fantôme de l'érythrocyte hôte, en particulier sur les bords du frottis.

#### Méthodes de numération des parasites du paludisme dans les gouttes épaisses.

##### **Parasites par $\mu\text{l}$ (= $\text{mm}^3$ )**

On trouvera ci-dessous une méthode pratique de précision suffisante. Elle consiste à dénombrer les parasites par  $\mu\text{l}$  de sang dans un frottis épais, par rapport à un nombre prédéterminé de leucocytes. On prend comme norme une moyenne de 7500 leucocytes par  $\mu\text{l}$ . Malgré

l'imprécision due aux variations du nombre de leucocytes parmi des personnes en bonne santé et aux variations encore plus grandes observées chez les malades, cette valeur permet des comparaisons valables. Avant de commencer à compter, on examinera l'équivalent de 0,25µl de sang (environ 100 champs, avec un oculaire 7 X (ou 10X) et un objectif à immersion dans l'huile 100X) dans le frottis épais pour déterminer l'espèce de parasite et les stades présents. Ensuite, on appliquera la méthode suivante qui convient pour les frottis positifs :

1. Un compteur manuel à 4 chiffres nécessaire pour dénombrer séparément les parasites et les leucocytes.
2. a) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié 10 parasites ou plus, noter les résultats sur le formulaire de notification, en indiquant le nombre de parasites par 300 leucocytes.  
b) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié neuf parasites ou moins, continuer de compter jusqu'à 500 leucocytes et noter le nombre de parasites par 500 leucocytes.
3. Dans chaque cas, le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes peut être converti en nombre de parasites par µl par la simple formule mathématique suivante :

Nombre de parasite X 7500 /Nombre de leucocytes =**Nombre de parasite par µl**

En d'autres termes, si 300 leucocytes sont comptés, le nombre de parasites est à multiplier par 25 et si 500 leucocytes sont comptés, le nombre de parasites est à multiplier par 15.

#### 8.4. Procédures Standard Opératoires (SOP) : Frottis Mince

Le frottis sanguin consiste en la réalisation d'un étalement monocellulaire des éléments sanguins. Lames à tenir par les bords pour éviter les empreintes digitales graisseuses. Plus la lamelle utilisée pour faire le frottis est mince, plus fin le frottis sera.

##### Matériel

- 2 lames porte-objet dégraissées
- Vaccinostyle stérile
- Alcool 70°
- Colorant de Giemsa pur
- Coton hydrophile sec
- Eau tamponnée, pH= 7,2

Méthanol absolu

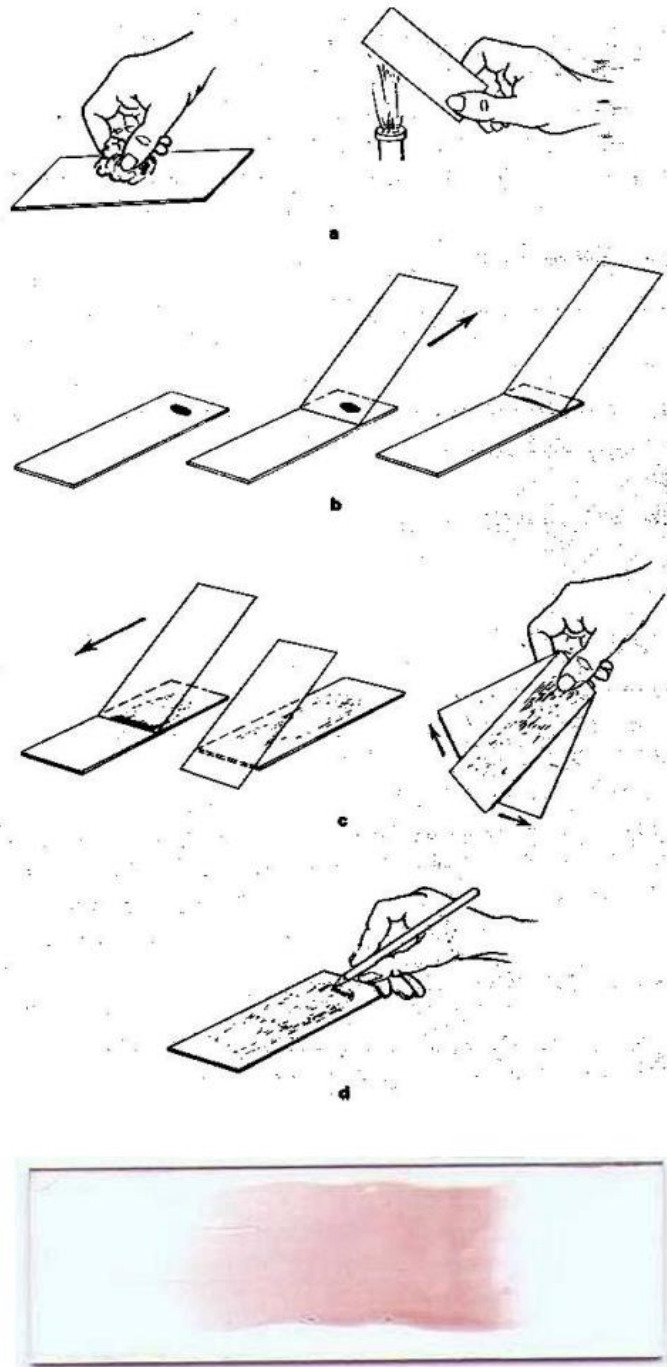
##### Lieu du prélèvement

- a. A l'extrémité d'un doigt gauche (ni index, ni pouce), sur la face latérale du doigt qui ne doit être ni œdémateux, ni cyanosé, ni traumatisé, ni infecté.
- b. Au lobe de l'oreille, après l'avoir réchauffé entre les doigts
- c. Au talon ou au gros orteil chez le nourrisson, après l'avoir réchauffé.

##### Technique

1. Dégraisser la lame à l'alcool (ou au toluène); faire sécher à l'air ou près d'une flamme ou avec un appareil sèche- cheveu (fig. 7a).
2. Désinfecter le bout du 3eme ou 4eme doigt avec de l'alcool 70°.
3. Piquer le doigt avec un vaccinostyle stérile, d'un seul geste.
4. Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec.
5. Déposer une goutte de sang capillaire ou veineux à l'une des extrémités de la lame.

6. Poser le bord de la deuxième lame en avant de la goutte de sang, le faire glisser en arrière jusqu'au contact de la goutte de sang qui va se répandre sur toute la largeur du bord de la lame supérieure dans l'angle formé par les 2 lames.
7. Incliner la lame supérieure de 45°.
8. Pousser fermement la deuxième lame le long de la lame de sang, en la tenant inclinée à 45°, d'un geste rapide et régulier, en avant, vers l'extrémité libre de la lame porte-objet. S'assurer que la deuxième lame reste bien en contact avec la surface de la lame de sang pendant qu'on procède à l'étalement.
9. Faire sécher le film mince de sang obtenu en agitant la lame à l'air. Le frottis doit présenter deux bords et une queue, zones électives de lecture.
10. Porter le nom du patient ou le numéro de l'examen sur la marge de la lame ou sur la partie large du frottis sanguin au crayon de papier.
11. Placer la lame dans la boîte horizontale (type OMS), à l'abri des mouches, de la poussière et d'une trop forte chaleur si on ne peut la colorer immédiatement.
12. Fixer le frottis sanguin avec le méthanol
13. Appliquer le colorant de May-Grunwald-Giemsa, ou l'Hémacolor ou colorer avec le Giemsa 3% dans de l'eau tamponnée.



**Figure 8:** *Technique du frottis mince*

### **Technique de Coloration avec l'Hemacolor®**

- Fixer le frottis avec le méthanol en plongeant deux fois 3 secondes

- Laisser sécher la lame à l'air libre ou faire sécher avec une machine sèche cheveux.
- Plonger la lame 3 à 5 fois une seconde dans la solution d'éosine, qui colore le noyau du parasite en rouge.
- Rincer à l'eau propre.
- Plonger la lame 3 à 5 fois une seconde dans la solution de bleu de
- Méthylène qui colore le cytoplasme du parasite en bleu.
- Rincer à l'eau propre.
- Laisser sécher.
- Lire la lame au microscope optique binoculaire avec l'objectif 100 en immersion.

#### **Méthode de la numération des parasites du paludisme dans les frottis mince.**

Une méthode simple pour dénombrer les parasites dans le frottis mince consiste à compter 1000 hématies sur la queue, zone élective de lecture du frottis mince. On dénombre les hématies parasitées sur 1000 hématies dans un frottis mince. Le résultat est exprimé en pourcentage d'hématies parasitées. Cette méthode est surtout utilisée dans les essais cliniques de nouveaux médicaments antipaludiques. Elle semble être plus précise que le nombre de parasites par  $\mu\text{l}$  de sang. L'inconvénient majeur est qu'elle consomme suffisamment de temps.

## 8.5. Détermination du taux d'hémoglobine

Le taux d'hémoglobine a été mesuré par l'appareil HemoCue Hb201+ micro cuvette.



**Figure 9 : Analyseur et MicrocuvetteHemoCue**

Source : Photo prise à Kéniéroba

### **Principe de la méthode**

La réaction dans la microcuvette repose sur une réaction modifiée de formation d'azoture de méthémoglobine. Les érythrocytes sont hémolysés pour libérer l'hémoglobine. L'hémoglobine est convertie en méthémoglobine, laquelle réagit avec de l'azoture pour donner de l'azoture de méthémoglobine dont l'absorbance est mesurée

dans l'analyseur .Cette absorbance est directement proportionnelle à la concentration de l'Hb.

### **Matériel et réactifs**

-Appareil analyseur

-MicrocuvetteHemoCue

-Lancette

-Alcool 70°

-Coton

### **Technique**

-cibler un doigt, bien désinfecté avec le tampon d'alcool à 70°; -piquer en un coup sec avec une lancette ; nettoyer la première goutte de sang, presser le bout du doigt pour avoir une deuxième goutte ;

- Appliquer la microcuvette sur la goutte de sang. La quantité nécessaire est aspirée automatiquement dans la microcuvette par capillarité.

-Après avoir enlevé minutieusement toute trace de sang présente à la surface de la microcuvette, la mettre sur son support et l'insérer ensuite dans le photomètre



**Figure 10 : Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+**  
Le résultat est exprimé en gramme d'hémoglobine par décilitre de sang (g/dl)



Source : [www.hemocue.com](http://www.hemocue.com)

## 8.6. Détermination du groupe sanguin ABO

### Nous avons déterminés le groupe sanguin par l'épreuve de Beth VINCEN

#### Principe

Cette méthode consiste a recherché les antigènes A, B ou D à la surface des globules rouges, par un test d'agglutination utilisant les sérums Anti-A, anti-B et anti-D.

#### Matériel et réactifs

- lame porte objet
- cure-dent
- coton
- alcool 70°
- lancette
- crayon de papier
- Sérums tests, (anticorps) : anti-A (couleur bleu), anti-B (couleur jaune), anti-D (incolore).

#### Mode opératoire

-marquer à l'aide de crayon de papier le numéro d'identification du sujet sur trois lames porte objet en les marquant A, B et D

-cibler un doigt

-nettoyer le doigt avec un tampon d'alcool à 70°

-piquer en un coup sec le bout du doigt par une lancette et nettoyer la première goutte de sang avec le coton sec;

- presser le bout du doigt pour avoir d'autres gouttes et déposer une goutte (de 10µl) de sang sur chacune des trois lames porte objets.

-ajouter :- une goutte (10µl) du sérum anti-A sur la goutte de la lame A

-une goutte (10µl) du sérum anti-B sur la goutte de la lame B

- une goutte (10 $\mu$ l) du sérum anti-D sur la goutte de la lame D ;
- turturer les trois gouttes avec trois cure-dents différents.

### **Résultat**

Observer l'agglutination avec les sérums tests:

- sérum anti-A + le sang = agglutination (présence de l'antigène A)
- sérum anti-B + le sang = agglutination (présence de l'antigène B)
- sérum anti-D + le sang = agglutination (présence de l'antigène D) pour le rhésus.

L'absence d'agglutination signifie l'absence d'antigène correspondant.

Ce qui nous permet de déterminer les phénotypes : A +, B+, AB+, O+, A-, B -, AB-, O-

## 8.7. Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alpha-thalassémie par PCR

Il s'agit d'une PCR nichée (nested PCR) où le produit de la première PCR est amplifié de nouveau dans une deuxième PCR.

### Matériel et réactifs

- Matériels
  - Termocycler
  - Micropipette (1000µl, 200µl et 10µl)
  - Embout pour micropipette (1000µl, 200µl et 10µl)
  - Tube PCR 0.2ml
- Réactifs
  - Le Tris-HCl, pH 8.5
  - KCl
  - Betaine (Sigma)
  - dNTP (ATP, GTP, TTP, CTP)
  - Taqpolymerase
  - Les Amorces:
    - α2/3.7F = 5'-CCCCTCGCCA AGTCCACC C-3'
    - α2R= 5'-AGACCAGGAAGGGCCGGTG-3'
    - 3.7/20.5R= 5'- AAAGCACTCTAGGGTCCAG CG-3'
    - A3.7F= 5'-CTTTCCCTACCCAGAGCCAGGTT -3'
    - 3.7R1= 5'-CCACTTTCCCTCCTCCATCCC-3'
    - α2R1= 5'-AGGAG GGCCCGTTGGGAGGC-3'


### Procédure

#### Première amplification

Il s'agit d'une PCR multiplex visant à amplifier en même temps dans la même réaction, le fragment d'ADN portant la délétion 3.7 et le fragment d'ADN normal sans délétion. Ces deux fragments ont en commun une

amorce ( $\alpha 2/3.7F$ ) la seconde amorce étant spécifique pour chaque fragment ( $\alpha 2R$  pour le fragment normal et  $3.7/20.5R$  pour le fragment délétère). Il consiste à amplifier approximativement 5ng d'ADN (2.5  $\mu$ l d'ADN extrait avec le Qiagen) dans un volume réactionnel de 25  $\mu$ l dont la composition est la suivante:

- 20 mmol/L de Tris-HCl pH 8.5
- 50 mmol/L KCl
- 1.5 mmol/L  $MgCl_2$
- 1 mol/L de Betaine
- 0.3  $\mu$ mol/l de chaque amorce ( $\alpha 2/3.7F$ ,  $\alpha 2R$  et  $3.7/20.5R$ )
- 0.2 mmol/L de chaque dNTP
- 1.25 unité de platinium Taq polymerase (Invitrogen)

 **Deuxième amplification** Chaque produit de première amplification est

amplifié deux fois dans deux tubes de PCR différents. Dans le tube de PCR N°1, les amorces spécifique pour le fragment normal ( $A3.7F$  et  $\alpha 2R1$ ) sont utilisé alors que dans le tube de PCR N°2 sont introduites les amorces spécifiques pour les gènes délétères ( $A3.7F$  et  $3.7R1$ ).

Dans chaque tube de PCR 1  $\mu$ l d'une dilution au 1 /20 est utilisé dans un volume réactionnel de 25  $\mu$ l de même composition que dans la première amplification

Le programme utilisé pour l'amplification est le suivant : Il est le même pour la première et la deuxième amplification.

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 5 minutes Suivit de 35 cycle de :
- Dénaturation : 97°C pendant 45 secondes.
- Renaturation : 60°C pendant 1 minute et 15 secondes.

- Extension : 72°C pendant 2 minutes et 30 secondes Une extension Final à 72°C pendant 5 minutes.

### Migration du produit de PCR

On utilise un gel d'agarose à 2% auquel est incorporé du bromure d'éthidium (~ 3µg/100ml) dans TBE 0.5X. La migration se fait à 200 volts pendant 30 minutes et la révélation est faite à la lumière UV.

### Interprétation

Présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 signifie que le sujet possède le gène Normal. Présence d'une bande de 1.8 kb dans le tube N° 2 signifie que le sujet possède le gène délétère. Trois scénarios sont possibles : 1- Le sujet est Normal : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et l'absence de bande dans le tube N° 2 2- Le sujet est  $\alpha$ -thalassémique hétérozygote : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et aussi la présence d'une bande de 1.8kb dans le tube N° 2 3- Le sujet est  $\alpha$ -thalassémique homozygote : On observe la présence d'une bande de 1.8 kb dans le tube N° 2 et l'absence de bande dans le tube N° 1

## 9. Fiche signalétique

**Titre de la thèse :** Influence de la Persistance de *Plasmodium falciparum* et de la multiclonalité sur le risque de paludisme clinique à Kéniéroba, une zone de transmission saisonnière du Mali.

**Nom et prénom du candidat :** Cisse Amadou

Adresse du candidat : Tél. (00223) 78 86 76 79

Pays d'origine : Mali

**Lieu de dépôt de la thèse :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie de l'USTTB

**Domaine d'étude :** Médecine.

**Secteurs d'intérêt :** Parasitologie, Immunogénétique, épidémiologie

### Résumé.

Les effets de l'infection persistante par *Plasmodium falciparum* (Pf) et la multiclonalité sur le risque subséquent de paludisme clinique ont été rapportés, mais la relation entre ces 2 paramètres et leurs impacts relatifs sur le résultat clinique de l'infection ne sont pas comprises. Une étude longitudinale de cohorte a été menée dans une zone saisonnière et à transmission élevée du Mali, dans laquelle 500 sujets âgés de 1 à 65 ans ont été suivis pendant 1 an. Des échantillons de sang ont été prélevés toutes les 2 semaines, et les cas de paludisme ont été diagnostiqués et traités. L'infection Pf chez chaque individu à chaque moment a été évaluée par PCR spécifique aux espèces, et la Persistance Pf par personne (Persistance-Pf, proportion d'échantillons Pf positifs sur 1 an) a été calculée. L'action de la multiclonalité de Pf a été mesurée à l'aide d'un test de code à barres d'ADN 24-SNP à 4 points de temps (deux en saison humide et deux en saison sèche) sur un an. La Persistance-Pf a été positivement corrélée avec multiclonalité à chaque point de temps (tous  $r \geq 0,36$ ; tous  $P \leq 0,011$ ). Lorsque les facteurs de

l'hôte (par exemple, l'âge, le sexe), la Persistance-Pf et la multiconalité (au début de la saison de transmission) ont été analysés ensemble, l'augmentation de l'âge et du Persistance-Pf élevé a été associée à une diminution de l'apparition clinique du paludisme ou à un nombre réduit d'épisodes de paludisme (pour les deux Résultats,  $P < 0,001$  pour l'âge, et  $P = 0,005$  pour Persistance-Pf). Nos résultats démontrent que le transport persistant de parasites, mais pas la multiconalité de base, est associé à un risque réduit de maladie clinique dans cette population. Notre étude souligne l'importance de considérer l'exposition répétée aux parasites dans les études futures qui évaluent le risque clinique de paludisme.

**Mots clés :** *P. falciparum*, Multiconalité, Facteurs humain, prévalence longitudinale, Mali



## 10. Summary

The effects of persistent *Plasmodium falciparum* (Pf) infection and multiclonality on subsequent risk of clinical malaria have been reported. However, the relationship between these 2 parameters and their relative impacts on the clinical outcome of infection are not understood. A longitudinal cohort study was conducted in a seasonal and high transmission area of Mali in which 500 subjects aged 1 to 65 years were followed for 1 year. Blood samples were collected every 2 weeks, and incident malaria cases were diagnosed and treated. Pf infection in each individual at each time point was assessed by species-specific nested-PCR, and Pf longitudinal prevalence per person (Pf-Persistence, proportion of Pf-positive samples over 1 year) was calculated. Multiclonality of Pf infection was measured using a 24-SNP DNA barcoding assay at 4 time-points (two in wet season, and two in dry season) over one year. Pf-Persistence was positively correlated with multiclonality at each time point (all  $r=0.36$ ; all  $P<0.011$ ). When host factors (e.g., age, gender), Pf-Persistence, and multiclonality (at the beginning of the transmission season) were analyzed together, only increasing age and high Pf-Persistence were associated with reduced clinical malaria occurrence or reduced number of malaria episodes (for both outcomes,  $P<0.001$  for age, and  $P = 0.005$  for Pf-Persistence). Our findings have shown that persistent carriage of parasite, but not baseline multiclonality, is associated with reduced risk of clinical disease in this population. Our study suggests taking in account the importance of repeated exposure to parasite infection in future studies in evaluating the risk of clinical malaria.

**Key words:** *P. falciparum*, Multiclonality, Host factors, longitudinal prevalence, Mali.

## 11. 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.

Admise 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 la conception.

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

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères. Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

**Je le jure !**

# ***Références bibliographiques***

## 12. Références bibliographiques

1. **OMS**, 1. WHO. World Health Organization/OMS. *World Malaria Report*. 2016.
2. EIPM, *Enquête sur les Indicateurs du Paludisme au Mali en 2015*. 2015.
3. Baliraine, F.N., et al., *High prevalence of asymptomatic plasmodium falciparum infections in a highland area of western Kenya: a cohort study*. J Infect Dis, 2009. **200**(1): p. 66-74.
4. Golassa, L., et al., *Detection of a substantial number of sub-microscopic Plasmodium falciparum infections by polymerase chain reaction: a potential threat to malaria control and diagnosis in Ethiopia*. Malar J, 2013. **12**: p. 352.
5. Kaisar, M.M., et al., *Epidemiology of Plasmodium infections in Flores Island, Indonesia using real-time PCR*. Malar J, 2013. **12**: p. 169.
6. Jenkins, R., et al., *Prevalence of malaria parasites in adults and its determinants in malaria endemic area of Kisumu County, Kenya*. Malar J, 2015. **14**: p. 263.
7. Betuela, I., et al., *Epidemiology of malaria in the Papua New Guinean highlands*. Trop Med Int Health, 2012. **17**(10): p. 1181-91.
8. Donnelly, B., et al., *Plasmodium falciparum malaria parasitaemia among indigenous Batwa and non-indigenous communities of Kanungu district, Uganda*. Malar J, 2016. **15**(1): p. 254.
9. Kiwuwa, M.S., et al., *Genetic diversity of Plasmodium falciparum infections in mild and severe malaria of children from Kampala, Uganda*. Parasitol Res, 2013. **112**(4): p. 1691-700.
10. Babiker, H.A., A.A. Gadalla, and L.C. Ranford-Cartwright, *The role of asymptomatic P. falciparum parasitaemia in the evolution of antimalarial drug resistance in areas of seasonal transmission*. Drug Resist Updat, 2013. **16**(1-2): p. 1-9.
11. Sonden, K., et al., *Asymptomatic Multiclonal Plasmodium falciparum Infections Carried Through the Dry Season Predict Protection Against Subsequent Clinical Malaria*. J Infect Dis, 2015. **212**(4): p. 608-16.
12. Nassir, E., et al., *Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of Plasmodium falciparum during the dry and transmission-free season of eastern Sudan*. Int J Parasitol, 2005. **35**(1): p. 49-55.

13. al-Yaman, F., et al., *Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of Plasmodium falciparum in a highly endemic area: a prospective community study*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1997. **91**(5): p. 602-5.
14. Liljander, A., et al., *Clearance of asymptomatic P. falciparum Infections Interacts with the number of clones to predict the risk of subsequent malaria in Kenyan children*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16940.
15. Farnert, A., et al., *Transmission-dependent tolerance to multiclonal Plasmodium falciparum infection*. J Infect Dis, 2009. **200**(7): p. 1166-75.
16. Roper, C., et al., *Seasonal changes in the Plasmodium falciparum population in individuals and their relationship to clinical malaria: a longitudinal study in a Sudanese village*. Parasitology, 1998. **116 ( Pt 6)**: p. 501-10.
17. Nsango, S.E., et al., *Genetic clonality of Plasmodium falciparum affects the outcome of infection in Anopheles gambiae*. Int J Parasitol, 2012. **42**(6): p. 589-95.
18. OMS. *Rapport sur le paludisme dans le monde malaria journal 2017*; Available from: <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/fr/> ( 21/03/2018).
19. Aubry, P., *Paludisme actualites Medecine tropicale*, 2017.
20. (ANOFEL), A.F.d.E.d.P.e.M., *Paludisme*. 2014.
21. MacDonald, G., *The Epidemiology and Control of Malaria*. Oxford University press, 1957.
22. Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., Dominique, R.L., & Sircoulon, J., *Biodiversite du Paludisme dans le monde*. John Lebbey EUROTEXT, 2004. **420**: p. 420:35-6.
23. Doumbo, O., *Epidémiologie sur paludisme au Mali, étude de la chimiorésistance, essai de stratégie de contrôle basé sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine*. 1992.
24. Sutherland, C.J., et al., *Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite Plasmodium ovale occur globally*. J Infect Dis, 2010. **201**(10): p. 1544-50.
25. Su, X.Z., *Human malaria parasites: are we ready for a new species?* J Infect Dis, 2010. **201**(10): p. 1453-4.
26. médico-chirurgicale, E., *Cycle évolutif du Plasmodium Tome 48-507-A-10*.
27. Coulibaly, I.H., *Etude sur les connaissances, attitudes et Pratiques des meres d'enfants de 0-59 mois Sur le paludisme dans la commune rurale Etude sur les connaissances, attitudes et*

*Pratiques des meres d'enfants de 0-59 mois Sur le paludisme dans la commune rurale De bancoumana.* 2012.

28. Contamin, H., et al., *PCR typing of field isolates of Plasmodium falciparum.* J Clin Microbiol, 1995. **33**(4): p. 944-51.
29. Tibayrenc, M., *Toward an integrated genetic epidemiology of parasitic protozoa and other pathogens.* Annu Rev Genet, 1999. **33**: p. 449-77.
30. Paul RE, A.F., Robert V. and 80, *The evolutionary ecology of Plasmodium.* Ecology Letters, 2003. **6**: p. 866-80.
31. Read, A.F., et al., *Gametocyte sex ratios as indirect measures of outcrossing rates in malaria.* Parasitology, 1992. **104 ( Pt 3)**: p. 387-95.
32. Robert, V. and C. Boudin, *[Biology of man-mosquito Plasmodium transmission].* Bull Soc Pathol Exot, 2003. **96**(1): p. 6-20.
33. Read, A.F. and L.H. Taylor, *The ecology of genetically diverse infections.* Science, 2001. **292**(5519): p. 1099-102.
34. Dye, C. and H.C. Godfray, *On sex ratio and inbreeding in malaria parasite populations.* J Theor Biol, 1993. **161**(1): p. 131-4.
35. Hill, W.G. and H.A. Babiker, *Estimation of numbers of malaria clones in blood samples.* Proc Biol Sci, 1995. **262**(1365): p. 249-57.
36. Nee, S., S.A. West, and A.F. Read, *Inbreeding and parasite sex ratios.* Proc Biol Sci, 2002. **269**(1492): p. 755-60.
37. de Roode, J.C., et al., *Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(21): p. 7624-8.
38. Smith, D.L., et al., *The entomological inoculation rate and Plasmodium falciparum infection in African children.* Nature, 2005. **438**(7067): p. 492-5.
39. Smith, T., et al., *Consequences of multiple infection with Plasmodium falciparum in an area of high endemicity.* Parasitologia, 1999. **41**(1-3): p. 247-50.
40. Carter, R. and A. Voller, *The distribution of enzyme variation in populations of Plasmodium falciparum in Africa.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1975. **69**(4): p. 371-6.
41. Conway, D.J., B.M. Greenwood, and J.S. McBride, *The epidemiology of multiple-clone Plasmodium falciparum infections in Gambian patients.* Parasitology, 1991. **103 Pt 1**: p. 1-6.
42. Mercereau-Puijalon, O., *[Molecular analysis of Plasmodium falciparum infections in man].* Transfus Clin Biol, 1999. **6**(1): p. 44-56.

43. Bruce, M.C., et al., *Age- and species-specific duration of infection in asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea*. Parasitology, 2000. **121 ( Pt 3)**: p. 247-56.
44. Farnert, A., et al., *Genotyping of Plasmodium falciparum infections by PCR: a comparative multicentre study*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001. **95(2)**: p. 225-32.
45. Takala, S.L., et al., *Dynamics of polymorphism in a malaria vaccine antigen at a vaccine-testing site in Mali*. PLoS Med, 2007. **4(3)**: p. e93.
46. Anderson, T.J., et al., *Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Mol Biol Evol, 2000. **17(10)**: p. 1467-82.
47. Beck, H.P., et al., *Analysis of multiple Plasmodium falciparum infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine SPf66*. J Infect Dis, 1997. **175(4)**: p. 921-6.
48. Bogreau, H., et al., *Genetic diversity and structure of African Plasmodium falciparum populations in urban and rural areas*. Am J Trop Med Hyg, 2006. **74(6)**: p. 953-9.
49. Ntoumi, F., et al., *Age-dependent carriage of multiple Plasmodium falciparum merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections*. Am J Trop Med Hyg, 1995. **52(1)**: p. 81-8.
50. Tanabe, K., et al., *High frequency of recombination-driven allelic diversity and temporal variation of Plasmodium falciparum msp1 in Tanzania*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **76(6)**: p. 1037-45.
51. Issifou, S., et al., *Complexity and genetic diversity of Plasmodium falciparum infections in young children living in urban areas of Central and West Africa*. Parasitol Res, 2003. **90(5)**: p. 423-8.
52. Konate, L., et al., *Variation of Plasmodium falciparum msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1999. **93 Suppl 1**: p. 21-8.
53. Paul, R.E., et al., *Mating patterns in malaria parasite populations of Papua New Guinea*. Science, 1995. **269(5231)**: p. 1709-11.
54. Peyerl-Hoffmann, G., et al., *Genetic diversity of Plasmodium falciparum and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda*. Trop Med Int Health, 2001. **6(8)**: p. 607-13.
55. Zwetyenga, J., et al., *A cohort study of Plasmodium falciparum diversity during the dry season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1999. **93(4)**: p. 375-80.

56. Arnot, D., *Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of Plasmodium falciparum infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1998. **92**(6): p. 580-5.
57. Paul, R.E., et al., *Transmission intensity and Plasmodium falciparum diversity on the northwestern border of Thailand.* Am J Trop Med Hyg, 1998. **58**(2): p. 195-203.
58. Ariey, F., et al., *Plasmodium falciparum parasites in French Guiana: limited genetic diversity and high selfing rate.* Am J Trop Med Hyg, 1999. **61**(6): p. 978-85.
59. Haddad, D., et al., *Limited genetic diversity of Plasmodium falciparum in field isolates from Honduras.* Am J Trop Med Hyg, 1999. **60**(1): p. 30-4.
60. Babiker, H.A., L.C. Ranford-Cartwright, and D. Walliker, *Genetic structure and dynamics of Plasmodium falciparum infections in the Kilombero region of Tanzania.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1999. **93 Suppl 1**: p. 11-4.
61. Gentilini, M., *Médecine Tropicale.* Médecine et Sciences, 1993.
62. (ANOFEL), A.F.d.E.d.P.e.M., *Paludisme.* 1996-1997.
63. Newton, C.R. and S. Krishna, *Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment.* Pharmacol Ther, 1998. **79**(1): p. 1-53.
64. Le Hesran, J.Y., *[The particularities of malaria in the child].* Med Trop (Mars), 2000. **60**(1): p. 92-8.
65. Rowe, A., et al., *Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya.* Infect Immun, 1995. **63**(6): p. 2323-6.
66. Rowe, J.A., et al., *P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1.* Nature, 1997. **388**(6639): p. 292-5.
67. Laurent<sup>1</sup>, V. and P.B.-. , S. Jauréguiberry<sup>3, 4, 6</sup>, F. Bruneel., *Physiopathologie du paludisme à Plasmodium falciparum: principaux mécanismes et avancées récentes.* La Lettre de l'Infectiologue • Tome XXVII - n°6 - novembre-décembre 2012, 2017.
68. WHO, *Seasonal Malaria Chemoprevention (SMC) for Plasmodium falciparum malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-region in Africa. Policy Recommendation.* 2012.
69. OMS. *Mise en oeuvre de la réforme de l'OMS, 2012: Rapport du Directeur général.* 2013; 16]. Available from: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB132/B132\\_5Add8-fr.pdf?ua=1](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB132/B132_5Add8-fr.pdf?ua=1) (consulté le 01/08/2017).



70. Bojang, K.A., et al., *Two strategies for the delivery of IPTc in an area of seasonal malaria transmission in the Gambia: a randomised controlled trial*. PLoS Med, 2011. **8**(2): p. e1000409.
71. Greenwood, B., *Review: Intermittent preventive treatment--a new approach to the prevention of malaria in children in areas with seasonal malaria transmission*. Trop Med Int Health, 2006. **11**(7): p. 983-91.
72. **WHO**. *policy recommendation: Seasonal malaria chemoprevention (SMC) for Plasmodium falciparum malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-region in Africa* March 2012. 2012; Available from: [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who\\_smc\\_policy\\_recommendation/en/](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_smc_policy_recommendation/en/) (consulté le 28/09/2017).
73. Konate, A.T., et al., *Intermittent preventive treatment of malaria provides substantial protection against malaria in children already protected by an insecticide-treated bednet in Burkina Faso: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. PLoS Med, 2011. **8**(2): p. e1000408.
74. Cisse, B., et al., *Seasonal intermittent preventive treatment with artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial*. Lancet, 2006. **367**(9511): p. 659-67.
75. OMS. *Points essentiels: Rapport sur le paludisme dans le monde*. paludisme 2017; Available from: <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/fr/> (12/01/2018).
76. Druetz, T., et al., *Impact Evaluation of Seasonal Malaria Chemoprevention under Routine Program Implementation: A Quasi-Experimental Study in Burkina Faso*. Am J Trop Med Hyg, 2018. **98**(2): p. 524-533.
77. Crompton, P.D., et al., *Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria*. J Infect Dis, 2008. **198**(9): p. 1265-75.
78. Higgins, T.N., A. Khajuria, and M. Mack, *Quantification of HbA(2) in patients with and without beta-thalassemia and in the presence of HbS, HbC, HbE, and HbD Punjab hemoglobin variants: comparison of two systems*. Am J Clin Pathol, 2009. **131**(3): p. 357-62.
79. Munoz, M., et al., *Utility of point-of-care haemoglobin measurement in the HemoCue-B haemoglobin for the initial diagnosis of anaemia*. Clin Lab Haematol, 2005. **27**(2): p. 99-104.

80. Wampfler, R., et al., *Novel genotyping tools for investigating transmission dynamics of Plasmodium falciparum*. J Infect Dis. **210**(8): p. 1188-97.
81. Fry, A.E., et al., *Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe Plasmodium falciparum malaria*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(4): p. 567-76.
82. Ntoumi, F., et al., *Site-based study on polymorphism of Plasmodium falciparum MSP-1 and MSP-2 genes in isolates from two villages in Central Africa*. Parasitologia, 2000. **42**(3-4): p. 197-203.
83. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers*. Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 725-32.
84. Smith, D.L., et al., *Standardizing estimates of the Plasmodium falciparum parasite rate*. Malar J, 2007. **6**: p. 131.
85. Cohen, S., G.I. Mc, and S. Carrington, *Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria*. Nature, 1961. **192**: p. 733-7.
86. Le Port A, C.M., Etard JF, Gaye O, Migot-Nabias F, Garcia A., *Relation between Plasmodium falciparum asymptomatic infection and malaria attacks in a cohort of Senegalese children*. Malar J., 2008.
87. Males S, G.O., Garcia A., *Long-term asymptomatic carriage of Plasmodium falciparum protects from malaria attacks: a prospective study among Senegalese children*. Clin Infect Dis., 2008. **46**(4): p. 516-22.
88. Roucher, C., et al., *Changing malaria epidemiology and diagnostic criteria for Plasmodium falciparum clinical malaria*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e46188.
89. Hofmann N, M.F., Shekalaghe S, Robinson LJ, Mueller I, Felger I. , *Ultra-sensitive detection of Plasmodium falciparum by amplification of multi-copy subtelomeric targets*. . PLoS Med., 2015. **12**(3)(e1001788.).
90. Pemberton-Ross P, S.T., Hodel EM, Kay K, Penny MA., *Age-shifting in malaria incidence as a result of induced immunological deficit: . a simulation study*. Malar. J, 2015. **14**:287.
91. ME., W., *Patterns in parasite epidemiology: the peak shift*. Parasitol Today., 1998. **14**(10): p.:428-34.
92. Cernetich, A., et al., *Involvement of gonadal steroids and gamma interferon in sex differences in response to blood-stage malaria infection*. Infect Immun, 2006. **74**(6): p. 3190-203.

93. Daniels, R., et al., *A general SNP-based molecular barcode for Plasmodium falciparum identification and tracking*. Malar J, 2008. **7**: p. 223.
94. Daniels, R.F., et al., *Modeling malaria genomics reveals transmission decline and rebound in Senegal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(22): p. 7067-72.
95. Bei, A.K., et al., *Immune characterization of Plasmodium falciparum parasites with a shared genetic signature in a region of decreasing transmission*. Infect Immun, 2015. **83**(1): p. 276-85.
96. Liljander, A., et al., *Influences of intermittent preventive treatment and persistent multiclonal Plasmodium falciparum infections on clinical malaria risk*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13649.
97. Crompton, P.D., et al., *In vitro growth-inhibitory activity and malaria risk in a cohort study in mali*. Infect Immun, 2010. **78**(2): p. 737-45.