



REPUBLIQUE DU MALI

**Un Peuple-Un But-Une Foi**

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020-2021

N° \_\_\_\_\_/

EVALUATION DE LA PET-PCR COMPAREE A LA GOUTTE  
EPAISSE COMME OUTIL DE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE  
DE L'INFECTION PALUSTRE

THESE

Présentée et soutenue publiquement le \_\_/\_\_/\_\_ devant la Faculté de Pharmacie,  
pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN PHARMACIE**

**(DIPLOME D'ETAT)**

Par Zaynab TOURE

JURY

Président du jury :           Professeur Mouctar DIALLO  
Membres :                        Docteur Issa DIARRA  
  Docteur Modibo TELLY  
Co-directeur de thèse :       Docteur Youssouf DIARRA  
Directeur de thèse :           Professeur Ousmane KOITA

**LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2020-2021**

**ADMINISTRATION**

**Doyen** : Boubacar TRAORE / Professeur

**Vice-doyen** : Sékou BAH / Maître de Conférences

**Secrétaire principal** : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

**Agent comptable** : Ismaël CISSE, Contrôleur des finances.

**PROFESSEURS HONORAIRES**

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Mahamadou	CISSE	Biologie
4	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
5	Souleymane	DIALLO	Bactériologie-virologie
6	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
7	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
8	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
9	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
10	Alou A.	KEÏTA	Galénique
11	Mamadou	KONE	Physiologie
12	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
13	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
14	Abdourahamane S	MAÏGA	Parasitologie
15	Saibou	MAÏGA	Législation
16	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
17	Sékou Fantamady	TRAORE	Zoologie

## **DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MÉDICALES**

### **1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRÉNOMS</b>	<b>NOMS</b>	<b>SPÉCIALITÉS</b>
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie-parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique
6	Abdoulaye	DJIMDE	Biologie / Parasitologie
7	Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
8	Akory Ag	IKNANE	Santé publique/ Nutrition
9	Ousmane	KOÏTA	Biologie-Moléculaire
10	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

### **2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRENOMS</b>	<b>NOMS</b>	<b>SPÉCIALITÉS</b>
1	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
2	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/Bio-statistique
3	Bourèma	KOURIBA	Immunologie chef de DER
4	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
5	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
6	Ousmane	TOURE	Santé publique/ Santé environnement

### **3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGES DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRÉNOMS</b>	<b>NOMS</b>	<b>SPÉCIALITÉS</b>
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie Clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biologie Clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biologie Clinique
6	Antoine	DARA	Biologie Moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie

8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
10	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
11	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOITA	Biologie Clinique
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé Publique
16	Almoustapha Issiaka	MAIGA	Bactériologie-Virologie
17	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
18	Fanta	SANGHO	Santé publique/Santé communautaire
19	Oumar	SANGHO	Epidémiologie

#### **4. ASSISTANTS / ATTACHES DE RECHERCHE**

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/ Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Falaye	KEITA	Santé publique/Santé environnement
6	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
7	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
8	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

#### **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

##### **1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE**

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

## **2. MAITRES DE CONFÉRENCES / MAITRES DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRÉNOMS</b>	<b>NOM</b>	<b>SPÉCIALITÉS</b>
	- Néant - -		

## **3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGÉS DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRÉNOMS</b>	<b>NOMS</b>	<b>SPÉCIALITÉS</b>
<b>1</b>	Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière
<b>2</b>	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
<b>3</b>	Yaya	COULIBALY	Législation
<b>4</b>	Issa	COULIBALY	Gestion
<b>5</b>	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
<b>6</b>	Mahamane	HAIDARA	Pharmacognosie
<b>7</b>	Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
<b>8</b>	Moussa	SANOGO	Gestion
<b>9</b>	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

## **4. ASSISTANTS / ATTACHÉS DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRÉNOMS</b>	<b>NOMS</b>	<b>SPÉCIALITÉS</b>
<b>1</b>	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
<b>2</b>	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
<b>3</b>	Adama	DENOU	Pharmacognosie
<b>4</b>	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
<b>5</b>	Assitan	KALOGA	Législation
<b>6</b>	Ahmed	MAÏGA	Législation
<b>7</b>	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique
<b>8</b>	Aboubacar	SANGHO	Législation
<b>9</b>	Bourama	TRAORE	Législation
<b>10</b>	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutique
<b>11</b>	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
<b>12</b>	Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
<b>13</b>	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

## **DER : SCIENCES DU MEDICAMENT**

### **1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRÉNOMS</b>	<b>NOMS</b>	<b>SPÉCIALITÉS</b>
1	Benoit Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

### **2. MAITRES DE CONFÉRENCES / MAITRES DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRÉNOMS</b>	<b>NOM</b>	<b>SPÉCIALITÉS</b>
1	Sékou	BAH	Pharmacologie, Chef de DER

### **3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGES DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRÉNOMS</b>	<b>NOM</b>	<b>SPÉCIALITÉS</b>
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
2	Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
6	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

### **4. ASSISTANTS / ATTACHÉS DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRÉNOMS</b>	<b>NOMS</b>	<b>SPÉCIALITÉS</b>
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

## **DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

### **1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
2	Mahamadou	TRAORE	Génétique

### **2. MAITRES DE CONFERENCE / MAITRES DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITES
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliqué

### **3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGES DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
2	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
3	Boureima	KELLY	Physiologie Médicale

### **4. ASSISTANTS / ATTACHES DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

### **5. CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba	COULIBALY	Droit commercial
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Moussa I	DIARRA	Biophysique
7	Babacar	DIOP	Chimie
8	Aboubacary	MAIGA	Chimie organique

<b>9</b>	Massambou	SACKO	SCMP/SIM
<b>10</b>	Modibo	SANGARE	Anglais
<b>11</b>	Satigui	SIDIBE	Pharmacie Vétérinaire
<b>12</b>	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
<b>13</b>	Fana	TANGARA	Mathématiques
<b>14</b>	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
<b>15</b>	Mamadou B	TRAORE	Physiologie
<b>16</b>	Boubacar	ZIBEIROU	Physique



## **DEDICACES**

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux, À son prophète Mohamed (Paix et salut sur lui).

Je dédie ce travail

### **- A l'âme de mon très cher père Feu Mamadou Lamine Touré :**

Tu as été un fort repère pour moi depuis ma tendre enfance. Un être exceptionnel par ta piété, ton intelligence et ta générosité ; un être magnifique, le meilleur des pères. Merci de m'avoir montré le chemin, ce que tu m'as appris restera pour moi un héritage précieux toute ma vie ; ton soutien fut une lumière pour tout mon parcours. Merci pour ton amour et ta confiance. Je te dois tout ce que je suis aujourd'hui et tout ce que je serai demain ; je ferais toujours de mon mieux pour rester ta fierté et de pouvoir enfin réaliser, ce que tu as tant espéré et attendu de moi. Ce modeste travail est sans doute le résultat de tes multiples sacrifices. Ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, tes efforts et ton soutien indéfectible. Tu mérites que j'invoque pour toi à chacune de mes prières. La mort n'arrête pas l'amour ; je t'aimerais toujours. Que le Miséricordieux te pardonne et te gratifie de sa bonté inestimable dans l'au-delà ! Amîn

### **- À ma chère mère Aichatou Bah :** si Allah a mis le paradis sous les pieds des mères, ce n'est pas pour rien.

Affable, aimable, honorable, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a cessé de m'encourager. Tes prières et bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon profond respect, mon amour éternel et ma considération pour tous les sacrifices consentis pour mon éducation et mon bien être.

Je te remercie pour tout l'amour et pour tout le soutien que tu m'as apportés depuis mon enfance et j'espère que tes bénédictions m'accompagneront toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes vœux tant formulés et le fruit de tes innombrables sacrifices.

Puisse Allah le très haut t'accorder santé, bonheur et une longue vie. Amîn

### **- A mon mari Aboubakr Sadik Koné :** mon amour, mon ami et mon confident merci pour tes conseils, ta patience et ton amour. Cet amour m'a donné de la force dans les moments difficiles de ma vie et je t'en **remercie** profondément.

Merci d'être une réponse à chacune de mes prières.

Je n'ai pas peur de ce que l'avenir nous réserve, car tu es à mes côtés. Merci d'être mon courage, ma confiance ; et aussi pour toutes les petites attentions et pour tout le bonheur que tu apportes dans ma vie. Tu représentes le monde pour moi et je suis reconnaissante pour chaque moment. Je t'aime. Que le Tout Puissant nous garde unis pour l'éternité. Amîn

- **À mon beau-père Sékou Abba Koné** : tu es pour moi un second père merci pour tout ton soutien tes conseils et tes Douas. Puisse Allah te préserver encore longtemps.
- **À ma grand-mère Feue Fatoumata Barro** : tes sages conseils avisés tout au long de notre vie nous ont permis de connaître de qui nous tenons et de qui nous sommes. De par tes actes au cours de ta vie, tu nous as appris l'intégrité, la fidélité, l'honneur, à ne pas tomber dans la facilité et à toujours faire les choses bien comme il le faut. Que le Miséricordieux vous pardonne et vous gratifie de sa bonté inestimable dans l'au-delà !
- **À ma tante Oumou Bah** : merci d'être une seconde mère pour nous et pour tous tes efforts. Seul Allah azawadjal pourra te récompenser.
- **À mes tantes Fadima Touré, Mariam Touré, Awa Bah Aicha Bah, Awa Touré, Assan Diaby** : vous avez été sans cesse là pour nous et vous n'avez ménagé aucun effort pour notre bien-être. Ce travail est l'occasion de vous témoigner mon immense gratitude.
- **À ma sœur Fatimat** : ma confiance, mon audace et ma témérité sont sans doute du fait que j'ai conscience que tu es et sera toujours derrière moi pour m'accompagner dans tous mes projets. Je remercie Allah d'avoir une sœur comme toi.
- **À mes grands frères Abdoul Karime Touré, Mamadou Lamine Touré, Abdoul Majid Touré Mohamed Tounkara** :

Merci d'être de façon inconditionnelle toujours là pour moi et pour vos encouragements ; je vous souhaite tout le bonheur et la réussite.

En témoignage de votre amour et de votre affection dont vous avez toujours fait preuve.

Qu'Allah vous garde.

- **À toute la famille Touré** : Merci pour votre soutien et votre considération, recevez ma profonde gratitude.
- **À mon amie Fatoumata Sow** : ton humanisme, ta capacité à pouvoir te mettre à la place de l'autre font de toi une personne formidable et une amie exceptionnelle. Merci de partager mes moments de joie ainsi que de peines et surtout merci de m'avoir aidé à traverser le moment le plus difficile de ma vie.

- **À Mamoudou Kouma** : tu m'as accompagné tout au long de mes études merci d'être ce soutien moral et financier ; reçois ma profonde gratitude.
- **À mes amies Assetou Coulibaly, Salmaye Coulibaly, Kamissa Nandy Diakite, Mariam Coulibaly, Hawa Traore, Astou Diallo, Rabiadou Aminou** : je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées. Vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.
- **À Docteur Youssouf Diarra** : ce travail est aussi le tien je n'aurais jamais pu le réaliser sans ton soutien. C'est quand on est dans la difficulté que l'on reconnaît les vrais amis ; les amis sur lesquels on peut compter quels que soient la situation et le moment. Je voudrais te dire que tu fais partie de ces amis sincères et fidèles sur lesquels je peux compter et qui comptent énormément pour moi. Merci d'être cet ami généreux et toujours disponible pour moi. J'espère qu'Allah te récompensera au centuple. Tes qualités personnelles font que tu mérites le meilleur.
- **À Docteur Feu Oumar kalifa** : nous nous sommes aimés malgré le peu de temps que nous avons passé ensemble. Tu étais un homme de grande foi, généreux et surtout d'une grande ténacité morale. Merci pour tous tes conseils, ton affection ainsi que tous les bons moments passés ensemble. Que le Miséricordieux vous pardonne et vous gratifie de sa bonté inestimable dans l'au-delà !

## REMERCIEMENTS

- **Au Professeur Ousmane Koita** : vous avez été un modèle pour moi jadis, vous l'êtes encore aujourd'hui et vous le demeurerez longtemps encore inshaAllah. Ce modèle qui, m'a accueilli à bras ouverts et qui a eu confiance en moi en me confiant 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 une longue vie.
- **À toute l'équipe du LBMA** : Dr Modibo Telly, Dr Nouhoum Thiam, Dr Saly Ibrahim Keita, Ibrahim Traore, Mariam Traore ainsi que tous les autres ; sans vous, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. 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.
- **À mes amis** : Abdoulaye Camara, Souleymane Kaba, Lassine Diallo, Nana Togola, Fousseyni Kané, B, Amadi Sow, Mohamed Emile Dembelé, Aissata Touré, Almadane Goita, Mohamed Boubacar Mohamed ; vous avez été des guides et des éclaireurs pour moi, vous avez toujours répondu à mes attentes. Je ne saurai vous remercier assez mais j'implore le tout puissant qu'il exauce nos vœux de bonheurs et renforce d'avantage nos liens d'amitié.
- À la 11<sup>ème</sup> promotion du Numerus clausus « Feu MOUSSA Arama »
- A tous les enseignants, personnels, et étudiants de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie de Bamako
- À la Famille Koné : Mouhamad Koné, Fatimat Koné, Kadidiatou Sy, Zeinab Koné, Awa Koné, mes sincères remerciement pour votre soutien et votre accueil chaleureux dans votre famille quant à Feu Diaba Diawara et feu Khadidjatou je n'ai pas eu la chance de vous connaître qu'Allah vous pardonne et vous accueille dans son vaste paradis. Amîn
- À la famille Coulibaly : Feu Sekou , Lassana , Malick , Wassa Diarra
- À Madama Bouare
- À Alima Traore
- À tous les enseignants et anciens élèves de l'école privée LAHIDU
- À tous les enseignants et élèves du lycée notre dame du Niger
- À mes amis d'enfance et à tous ceux qui m'ont aidé

## **HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY**

### **À notre Maître et membre du Jury**

#### **Professeur Mouctar DIALLO**

- ✓ Titulaire d'un PhD en Parasitologie-Entomologie médicale
- ✓ Professeur de Parasitologie/ Mycologie à la FAPH
- ✓ Responsable de l'Unité de Diagnostic Parasitaire au MRTC/FMPOS
- ✓ Chef de D.E.R des Sciences Fondamentales de la FAPH
- ✓ Président de l'association des biologistes techniciens de laboratoire du Mali

Cher maître, vous nous avez fait un grand honneur en acceptant de présider le Jury de cette thèse. Veuillez Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Puisse Allah vous donner une longue et heureuse vie !

### **À notre Maître et membre du Jury**

#### **Docteur Issa DIARRA,**

- ✓ Pharmacien, Attaché de recherche, FAPH

C.E.S de Parasitologie-mycologie

- ✓ Master Immunologie et Infection
- ✓ Docteur d'Université Maladies Infectieuses, Aix Marseille Université
- ✓ Chef d'unité de parasitologie ; Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de l'USTTB

Chers Maître,

Vous avez accepté de nous guider et aider dans la réalisation ce travail, qui d'ailleurs est le vôtre.

Vôtre accessibilité du début à la fin du travail n'a pas créé défaut, votre rigueur scientifique et votre amour pour un travail bien fait, font vous un homme de qualité.

Trouvez ici l'expression de nos remerciements et nos reconnaissances les plus sincères.

Qu'ALLAH vous protège et vous assiste dans tous vos projets, Amine !

**À notre Maître et membre du Jury**

**Docteur Modibo TELLY**

- ✓ Pharmacien
- ✓ Titulaire d'un master en Épidémiologie
- ✓ Attaché de recherche au LBMA

Cher maître, vous avez accepté de faire partie de ce Jury et de donner votre appréciation sur cette Thèse. Nous vous prions de recevoir ici nos remerciements les plus sincères.

Qu'Allah vous donne une longue et heureuse vie !

**À notre Maître et co-directeur de thèse**

**Docteur Youssouf DIARRA**

- ✓ Pharmacien
- ✓ Titulaire d'un master en Épidémiologie
- ✓ Chef d'unité de parasitologie au LBMA

Cher Maître,

Votre disponibilité, votre bienveillance, votre rigueur scientifique ont accompagné tous ces moments d'échanges particulièrement enrichissants au cours de cette thèse. Veuillez accepter nos sincères remerciements et nos humbles reconnaissances pour ses connaissances acquises en biologie moléculaire et le partage de ses belles expériences.

Qu'Allah vous donne une longue et heureuse vie !

**À notre Maître et directeur de thèse**

**Professeur Ousmane KOITA**

- ✓ Pharmacien Biologiste (PharmD, PhD)
- ✓ Professeur Titulaire en Biologie moléculaire
- ✓ Responsable de l'enseignement de Biologie cellulaire et moléculaire à la FAPH
- ✓ Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée

Cher Maître,

Nous avons été très séduits par votre conviction pour la recherche, votre disponibilité et la qualité de votre enseignement. Ce fut un honneur pour nous d'être comptés parmi vos élèves.

Votre modestie et votre ouverture au monde des apprenants vous procurent respect et considération. Soyez-en félicité pour ce caractère !!!!

Que le Tout Puissant vous accorde santé et longue vie afin que d'autres générations d'apprenants puissent bénéficier de la qualité de votre enseignement. Amîn

## Liste des sigles et Abréviations

<b>ADN</b>	Acide desoxyribonucleique
<b>AL</b>	Artémether+ Luméfantrine
<b>AQ</b>	amodiaquine
<b>ARN</b>	Acide ribonucleique
<b>ASAQ</b>	artesunate-amodiaquine
<b>CPN</b>	Consultation prénatale
<b>CPS</b>	Chimioprévention du Paludisme Saisonnier
<b>CSP</b>	Circum Sporozoite Protein ou Protéine majeure de la surface du sporozoïte
<b>CT</b>	Cycle Treshold
<b>CTA</b>	Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
<b>DHFR</b>	Dihydrofolate reductase
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>GE</b>	Goutte épaisse
<b>HRP2</b>	<i>Histidin Rich Protein 2</i>
<b>IFI</b>	immunofluorescence
<b>LAMP</b>	Loop-mediated isothermal amplification
<b>LBMA</b>	Laboratoire de biologie moléculaire appliquée
<b>MGG</b>	May Grundwald Giemsa
<b>MSP1</b>	merozoïte surface protein 1
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la Santé
<b><i>P.falciparum</i></b>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<b><i>P. knowelsie</i></b>	<i>Plasmodium knowelsie</i>
<b><i>P. malariae</i></b>	<i>Plasmodium malariae</i>
<b><i>P. ovalae</i></b>	<i>Plasmodium ovalae</i>
<b><i>P. vivax</i></b>	<i>Plasmodium vivax</i>
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction ou réaction de polymérisation en chaîne
<b>PET</b>	Photo-induced electron transfer
<b>pLDH</b>	Plasmodium lactate deshydrogenase
<b>PNLP</b>	Programme National de Lutte contre le Paludisme
<b>QBC</b>	Quantitative Buffy Coat
<b>RBP2</b>	Reticulocyte binding proteine 2
<b>SP</b>	sulfadoxine pyriméthamine
<b>TDR</b>	Tests de Diagnostic Rapides
<b>TES</b>	Therapeutic Efficacy Study



## Liste des tableaux

Tableau I : Zones épidémiologiques .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Tableau II : Plan de suivi des patients pendant 42 jours. ....	- 27 -
Tableau III : Préparation du mélange réactionnel pour un volume total de 20 $\mu$ L : .....	- 30 -
Tableau IV : Les conditions de cycling.....	- 30 -
Tableau V : Répartition des échantillons des femmes enceintes selon la résidence (N=181) .....	- 31 -
Tableau VI : Répartition des femmes enceintes selon la tranche d'âge (N=181) .....	- 31 -
Tableau VII : Répartition des échantillons des enfants de moins de 5 ans selon la résidence (N=181) .....	- 32 -
Tableau VIII : Répartition des enfants de moins de 5 ans selon la tranche d'âge (N=373) .....	- 32 -
Tableau IX : Répartition des patients en fonction du résultat de la goutte épaisse (N=554) ..	- 34 -
-	
Tableau X : Répartition des résultats de la PET PCR (N=554) .....	- 34 -
Tableau XI : Répartition des résultats de la PET PCR en fonction des résultats de la goutte épaisse (N=552).....	- 35 -
Tableau XII : Modalité de calcul des paramètres de validité .....	- 35 -
Tableau XIII : Disposition des données pour le calcul des paramètres de validité.....	- 35 -
Tableau XIV : Modalité de calcul des paramètres de validité .....	- 36 -
Tableau XV : Disposition des données pour le calcul des valeurs prédictives .....	- 36 -

## **Liste des figures**

Figure 1: Cycle de développement du Plasmodium.....	- 9 -
Figure 2 : Mécanismes d'induction de la fièvre palustre .....	- 12 -
Figure 3: Phénotypes d'adhérence impliqués dans le phénomène de séquestration parasitaire .-	14 -
Figure 4 : Confection de la goutte épaisse .....	- 17 -
Figure 5 : Confection du frottis mince .....	- 18 -
Figure 6 : Carte sanitaire de la zone de Sélingué (Source thèse de pharmacie Amadou Bouare) .....	- 23 -
Figure 7 : Plan du LBMA.....	- 25 -

## Table des matières

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>2</b>	<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>2.1</b>	<b>Objectif général :</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>2.2</b>	<b>Objectifs spécifiques :</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>3</b>	<b>GENERALITES</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Historique</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>3.2</b>	<b>Épidémiologie du paludisme</b> .....	<b>- 5 -</b>
3.2.1	Situation du paludisme dans le monde .....	- 5 -
3.2.2	Situation du paludisme en Afrique .....	- 5 -
3.2.3	Situation du paludisme au Mali .....	- 6 -
<b>3.3</b>	<b>Transmission du paludisme</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>3.4</b>	<b>Immunité contre le paludisme</b> .....	<b>- 7 -</b>
3.4.1	L'immunité naturelle .....	- 7 -
3.4.2	L'immunité acquise .....	- 8 -
<b>3.5</b>	<b>Agent pathogène</b> .....	<b>- 8 -</b>
<b>3.6</b>	<b>Hôte humain et cycle du paludisme</b> .....	<b>- 8 -</b>
3.6.1	Chez l'homme .....	- 8 -
3.6.2	Chez l'anophèle femelle .....	- 9 -
<b>3.7</b>	<b>Diagnostic du paludisme</b> .....	<b>- 15 -</b>
3.7.1	Diagnostic clinique .....	- 15 -
3.7.2	Diagnostic biologique .....	- 16 -
3.7.3	Diagnostic immunologique : ELISA et IFI .....	- 19 -
3.7.4	Diagnostic moléculaire .....	- 19 -
<b>4</b>	<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>- 22 -</b>
<b>4.1</b>	<b>Lieux d'étude</b> .....	<b>- 22 -</b>
4.1.1	Présentation du LBMA .....	- 24 -
<b>4.2</b>	<b>Période et type d'étude</b> .....	<b>- 25 -</b>
<b>4.3</b>	<b>Enrôlement et suivi des patients dans le test d'efficacité des CTAs</b> .....	<b>- 25 -</b>
4.3.1	Critères d'inclusion .....	- 25 -
4.3.2	Critères de non-inclusion : .....	- 26 -
<b>4.4</b>	<b>Enrôlement des patients</b> .....	<b>- 26 -</b>
4.4.1	Suivi des patients (enfants de moins de cinq ans) .....	- 27 -
4.4.2	Plan de suivi des patients .....	- 27 -
<b>4.5</b>	<b>Collectes et traitement des échantillons :</b> .....	<b>- 27 -</b>
<b>4.6</b>	<b>Collecte des échantillons lors de la surveillance moléculaire des molécules de la CPS</b> .....	<b>- 28 -</b>
4.6.1	Collecte des échantillons chez les enfants de moins de 5 ans : .....	- 28 -
4.6.2	Collecte des échantillons chez les femmes enceintes : .....	- 29 -
<b>4.7</b>	<b>Traitement des échantillons dans le Laboratoire</b> .....	<b>- 29 -</b>
4.7.1	Extraction d'ADN et Génotypage des échantillons : .....	- 29 -
4.7.2	PET-PCR (Photo Induced Electron Transfer- PCR) .....	- 29 -
<b>4.8</b>	<b>Analyse des résultats :</b> .....	<b>- 30 -</b>
<b>5</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>- 31 -</b>

<b>5.1</b>	<b>Caractéristiques Sociodémographiques des patients .....</b>	<b>- 31 -</b>
<b>5.2</b>	<b>Résultats de la Goutte épaisse et la PET-PCR.....</b>	<b>- 34 -</b>
<b>5.3</b>	<b>Calcul des paramètres de validité .....</b>	<b>- 35 -</b>
5.2.1	Sensibilité .....	- 35 -
5.2.2	Spécificité.....	- 36 -
<b>5.4</b>	<b>Calcul des Valeurs prédictives .....</b>	<b>- 36 -</b>
5.2.3	Valeur Prédictive Positive (VPP) .....	- 36 -
5.2.4	Valeur Prédictive Négative (VPN).....	- 36 -
<b>6</b>	<b><i>COMMENTAIRES ET DISCUSSION</i> .....</b>	<b>- 37 -</b>
<b>7</b>	<b><i>CONCLUSION</i> :.....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>8</b>	<b><i>RECOMMANDATIONS</i>.....</b>	<b>- 42 -</b>
<b>9</b>	<b><i>REFERENCES</i> .....</b>	<b>- 43 -</b>
<b>10</b>	<b><i>ANNEXES</i> .....</b>	<b>X</b>

# 1 INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante dû à un parasite du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre infestante d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Même si d'énormes progrès ont été réalisés, le paludisme reste toutefois un véritable problème de santé publique, particulièrement en Afrique sub-saharienne. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les estimations à l'échelle mondiale en 2019 faisaient état de 229 millions de cas de paludisme dans 91 pays avec 409 000 cas de décès, cependant 90% de ces cas de paludisme et de décès associés ont été enregistrés en Afrique où les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes sont les plus à risque (1).

Au Mali, selon l'annuaire statistique du Système Local d'Information Sanitaire (SLIS) en 2015, les structures sanitaires ont enregistré 3 457 267 cas de paludisme dont 686 017 cas graves. Cependant, 797 322 cas ont été observés chez les enfants de moins de 5 ans et 117 002 cas chez les femmes enceintes (2). Le taux de létalité palustre estimé sur la même période est de 1,33‰, soit 1001 décès sur 244 533 cas graves confirmés dont 34,32% des cas confirmés étaient les enfants de moins de 5 ans (PNLP ; 2019). La quasi-totalité de ces infections étaient dues à *Plasmodium falciparum* qui est l'espèce la plus pathogène et responsable des cas mortels.

Cependant, un diagnostic de qualité pourrait contribuer grandement à une meilleure prise en charge du paludisme.

Pendant des décennies, le diagnostic du paludisme a reposé sur l'observation clinique.

Actuellement L'OMS recommande la microscopie optique et les tests de diagnostic rapide (TDR) pour établir le diagnostic et guider la prise en charge clinique du paludisme (3).

Dans les pays d'endémie palustre, les TDR sont de plus en plus utilisés pour confirmer les cas suspects et mener des enquêtes auprès de population afin de suivre l'évolution de la transmission.

La goutte épaisse (GE) par la microscopie et les TDR sont deux tests qui certes, contribuent efficacement à diagnostiquer le paludisme mais peuvent être limités d'une part par l'habileté et l'appréhension du technicien et d'autre part la sensibilité et la charge parasitaire, d'où la nécessité de méthodes plus sensible et fiables telles que les techniques d'amplification génique, dont la sensibilité est plusieurs fois supérieure à la microscopie et aux TDR.

Ces techniques de PCR pour la plupart sont quantitatives et permettent non seulement de déterminer si un patient est positif à *Plasmodium falciparum* mais aussi de quantifier les

parasites présents au moment du prélèvement. Elles peuvent aussi être utilisées pour la détection de certaines espèces de *Plasmodium* tout comme certains génotypes d'un intérêt particulier (4). Récemment, un test de PCR en temps réel connu sous le nom de transfert d'électrons photo-induit (PET-PCR) qui repose sur des amorces d'auto-extinction pour la détection de *Plasmodium* spp. a été décrit (5). Selon ces auteurs, la PET-PCR s'est avérée robuste et plus facile à utiliser par rapport aux méthodes classique de PCR et de PCR en temps réel actuellement disponibles (5).

La mise au point et la fonctionnalité des techniques comme la PET-PCR, adaptées aux conditions de nos pays où des plateformes de PCR en temps réel peuvent être installées sont nécessaires afin d'améliorer le diagnostic du paludisme (6). Face à ces fluctuations de résultats de la microscopie et du diagnostic du paludisme de façon globale, nous avons initié cette étude dans le but de confirmer le diagnostic posé lors de la collecte des échantillons au cours de différentes études menées au laboratoire de biologie moléculaire appliquée (LBMA).

Cette étude va nous permettre d'évaluer la sensibilité de la PET-PCR comparativement aux méthodes conventionnelles permettant de détecter tant des infections sub-microscopiques que des infections mixtes à *Plasmodium* spp.

## **2 OBJECTIFS**

### **2.1 Objectif général :**

Estimer la sensibilité et la spécificité de la technique de la PET-PCR dans la détection des infections palustres à *Plasmodium falciparum* avec la goutte épaisse comme test de référence.

### **2.2 Objectifs spécifiques :**

- Déterminer la capacité de la PET-PCR à discriminer les différentes espèces de *Plasmodium* ;
- Déterminer les paramètres de validation de la PET-PCR avec la goutte épaisse comme test de référence ;
- Déterminer la capacité de la PET-PCR à détecter les parasitémies submicroscopiques.

### 3 GENERALITES

Le paludisme est l'une des maladies infectieuses les plus importantes au monde et son histoire date depuis l'antiquité. Il est dû à une infection des hématies par des protozoaires du genre *Plasmodium* qui sont transmis à l'homme par l'anophèle femelle lors d'un repas sanguin (7,8). Sur 172 espèces de *Plasmodium*, cinq espèces causent la maladie à l'homme. Il s'agit de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi* (9). Parmi ces cinq, le *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus virulente car 90% des décès liés au paludisme lui sont attribués (10).

#### 3.1 Historique

Le paludisme ou malaria est connu en Europe depuis l'Antiquité. Pendant longtemps, il y fait des ravages et à partir du XVI<sup>e</sup> siècle, il se diffuse aux Amériques avec le développement du commerce d'esclave.

En 1630, Don Francisco Lopez rapporte du Pérou en Europe le premier remède contre le paludisme : la « poudre des jésuites », issue de l'écorce d'un arbre, le quinquina. Jusqu'à la mise au point de traitements antipaludéens de synthèse, la quinine resta le seul traitement contre cette maladie. Le paludisme (malaria) est une des plus vieilles maladies de l'homme dont les manifestations cliniques sont décrites par les premières civilisations : les médecins de l'Inde védique et brahmanique distinguaient déjà, 1000 ans avant JC, des fièvres intermittentes caractéristiques. Ainsi, Hippocrate décrivait longuement des fièvres tierce et quarte. Les principaux événements ayant marqué l'évolution du paludisme sont :

1630 : Emploi de l'écorce de quinquina contre les « fièvres des marais » ;

1820 : Découverte de la quinine par Pelletier et Caventou ;

1880 : Découverte du parasite par Laveran ;

1885-90 : Découverte de trois premières espèces parasites de l'homme *P. vivax*, *P. malariae* et *P. falciparum* par Marchiafava et Celli ;

1897 : Découverte du rôle des moustiques dans la transmission du paludisme par Ross ;

1922 : Découverte de *P. ovale* par Stephens ;

1940 : Découverte des antimalariques de synthèse (Nivaquine) ;

1948 : Découverte du stade hépatique ;

1957 : L'OMS entreprit l'éradication de paludisme ;

1960 : Apparition des premiers cas de chloroquinorésistance, en Colombie, puis en Asie du Sud-Est ;

1968 : L'OMS renonça à l'éradication et entreprit la lutte contre le paludisme ;



1976 : Culture in vitro de *P.falciparum* ;(6)

1980 : Mise en évidence des hypnozoïtes ;

1983 : Premières tentatives de vaccination antipalustre ;

1990 : chloroquinorésistance a été décelée dans tous les pays tropicaux (3,4,5,6,7)

## **3.2 Épidémiologie du paludisme**

### **3.2.1 Situation du paludisme dans le monde**

Le paludisme reste l'une des principale cause de mortalité dans le monde. C'est la maladie la plus répandue en Afrique et en Asie, avec le plus grand nombre de cas indigène tandis que dans les pays développés, les cas de paludisme sont importés des zones d'endémies palustres. De façon globale, le taux de mortalité dû au paludisme varie de 0,3 à 2,2% et de 11 à 33% dans les cas de formes sévères de paludisme dans les régions à climat tropical (9). On estime à 229 millions, le nombre de cas de paludisme produits dans le monde en 2019 et à 409 000 le nombre de décès associés. La plupart de ces cas (94%) ont été enregistrés en Afrique suivie de l'Asie du Sud Est (3%), de la Méditerranée orientale et du Pacifique occidental. Les enfants de moins de 5 ans sont les plus vulnérables représentant 67 % (soit 274 000 cas) des décès survenus dans le monde en 2019 (11).

Dans la période allant de 2000 à 2019, l'incidence du paludisme a reculé sur le plan mondial, passant de 80 à 57 cas pour 1000 personnes à risque. Aussi, le taux d'incidence a considérablement ralenti entre 2015 et 2019, tombant à 2% en 2015 et demeurant ainsi jusqu'à nos jours (11).

### **3.2.2 Situation du paludisme en Afrique**

L'Afrique est la région de l'OMS la plus touchée avec 215 millions de cas enregistrés en 2019, soit 94% de la charge mondiale. Durant la même année, le nombre de décès associé à la maladie était de 384 000 cas, soit une baisse de 44% par rapport au chiffre de l'année 2000 (10). La quasi-totalité de ces infections était due à *Plasmodium falciparum*. Sur les 29 pays les plus touchés, cinq pays de cette région à eux seuls, ont représenté plus de la moitié des cas de paludisme survenus dans le monde : le Nigéria (27 %), la République démocratique du Congo (12 %), l'Ouganda (5 %), le Mozambique (4%) et le Niger (3 %). Cependant, de 2000 et 2019, l'incidence du paludisme a baissé dans cette région passant de 363 à 225 cas sur 1000 personnes à risque(11).

Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes courent un risque beaucoup plus élevé que d'autres de contracter le paludisme et d'être gravement atteints. En 2019, près de 12

millions de femmes enceintes auraient été exposées à une infection palustre dans 33 pays de cette région où la transmission du paludisme est modérée à s'élever (11). Durant cette même année, la prévalence de l'exposition au paludisme pendant la grossesse a été plus forte dans la sous-région Afrique centrale (40%) suivie de près par la sous-région Afrique de l'Ouest (39%) tandis que dans les sous-régions de l'Afrique de l'Est et du Sud, la prévalence était de 24% (11).

### **3.2.3 Situation du paludisme au Mali**

Au Mali, le paludisme est la première cause de consultation, d'hospitalisation et de mortalité dans les différentes structures sanitaires. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes paient chaque année le plus lourd tribut de cette maladie (12). Selon le rapport du programme national de lutte contre le paludisme (PNLP), en 2018, les formations sanitaires ainsi que les agents de santé communautaire ont répertorié 3 457 267 cas suspects de paludisme parmi lesquels 2 345 481 cas ont été confirmés. Le taux de létalité palustre estimé sur la même période est de 1,33%, soit 1001 décès sur 244 533 cas graves confirmés ; 34,32% des cas confirmés étaient les enfants de moins de 5 ans (13).

### **3.3 Transmission du paludisme**

Le mode de transmission le plus fréquent du paludisme est la piqûre de moustique femelle infecté du genre *Anophèles* cependant, d'autres voies de transmission sont possibles selon la phase sanguine du cycle de développement tels que la transmission congénitale, transfusionnelle, par greffe d'organe ou transmission accidentelle chez le personnel de santé par manipulation du sang contaminé. En pratique, ces transmissions sont tout à fait exceptionnelles et n'influencent pas l'épidémiologie de la maladie (14). La transmission du paludisme nécessite des conditions climatiques, telles que le régime de précipitations, la température et l'humidité (température > 18°C pour *P. falciparum* et > 16° pour *P. vivax*) et l'altitude (< 1500 m en Afrique) (15).

Schématiquement, il existe 5 faciès épidémiologiques de paludisme en Afrique dont le Mali est situé dans le faciès sahélien des savanes sèches et des steppes où la transmission saisonnière est courte < 6 mois (Paludisme instable) (16).

### **Zones épidémiologiques et indices**

#### **Zones épidémiologiques**

La variation de transmission du paludisme d'une région à l'autre permet de définir les zones épidémiologiques.

**Tableau I : Zones épidémiologiques**

Zones	Transmission	Immunité chez l'adulte	Type de paludisme
Holoendémique	Intense toute l'année	Solide	Paludisme stable
Hyperendémique	Intense avec variation saisonnière	Significative	Paludisme stable
Mesoendémique	Variable	Non significative	Paludisme instable
Hypoendémique	Faible	Nulle	Paludisme instable

- **Indices paludométriques**

Ces indices sont des outils permettant aux épidémiologistes d'évaluer le niveau d'endémicité d'une région donnée.

- **Indice plasmodique (IP)** : c'est le pourcentage des patients examinés ayant des hématozoaires dans le sang.
- **Indice splénique (IS)** : c'est le nombre de sujets présentant une splénomégalie par rapport à 100 sujets examinés.
- **Enquêtes séro-immunologiques** : elles consistent à évaluer les taux d'anticorps par classe d'âge et de suivre leurs variations saisonnières. Leur valeur est plus grande que celle de l'indice splénique car les étiologies de splénomégalies tropicales sont multiples.
- **Indice sporozoïtique et oocystique** : c'est le pourcentage des anophèles femelles présentant respectivement des sporozoïtes dans les glandes salivaires et des oocystes sur la paroi externe de l'estomac. Elle peut refléter l'anthropophilie du moustique.

### 3.4 Immunité contre le paludisme

L'immunité contre le paludisme est un facteur extrêmement important qui soulève de nombreuses questions. Elle est complexe et peut être répartie en deux : l'immunité naturelle et acquise (14,15).

#### 3.4.1 L'immunité naturelle

Bien qu'encore imparfaitement connue, il existe des facteurs génétiques conférant probablement une immunité naturelle ou partielle chez certains sujets. Des facteurs érythrocytaires (le trait drépanocytaire (AS), le groupe sanguin Duffy négatif) ou non

érythrocytaires (le groupe HLA, le polymorphisme de la réponse immune et les facteurs ethniques) ont été évoqués comme étant impliqués dans l'établissement de cette immunité.

### **3.4.2 L'immunité acquise**

Elle s'acquiert progressivement en réponse à une situation d'exposition continue. Cette immunité n'est pas stérilisante et ne permet pas d'éliminer totalement le parasite. Ce qui explique qu'en zone de transmission intense, les enfants payent un lourd tribut à cette maladie, à partir de leur jeune âge (4 à 6 mois) lorsque la protection maternelle transmise devient moins importante et jusqu'à l'âge de 4 à 6 ans. Progressivement une tolérance du sujet s'établit face à des parasitémies de plus en plus importantes. En zone de transmission intense, il est exceptionnel qu'un sujet adulte fasse un accès grave. Les caractéristiques de cette protection, lui valent la désignation « état de prémunition » au lieu de l'immunité.

### **3.5 Agent pathogène**

Le paludisme est causé par des protozoaires appartenant à l'embranchement des Apicomplexa et au genre *Plasmodium* (18). Environ 250 espèces de *Plasmodium* sont actuellement considérées comme parasites de mammifères, d'oiseaux et de reptiles dont plus d'une trentaine ont été signalées chez les primates non humains (Singes et Gibbons) (19). Parmi ces espèces, cinq sont connues pour infecter et induire significativement le paludisme chez l'homme. Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* (10). Ces espèces diffèrent de par leurs critères biologiques, cliniques, leur répartition géographique et leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques. Dans la suite de ce travail, nous ne nous intéresserons qu'au *Plasmodium falciparum* car il est celui qui crée le plus de résistances aux antipaludiques et est responsable des formes sévères de cette maladie (14)

### **3.6 Hôte humain et cycle du paludisme**

Le cycle de développement du *Plasmodium* est « dixène », c'est-à-dire nécessite deux hôtes : chez l'homme, l'hôte intermédiaire, se déroule la phase asexuée alors que chez le moustique femelle (hôte définitif) a eu lieu la phase sexuée.

#### **3.6.1 Chez l'homme**

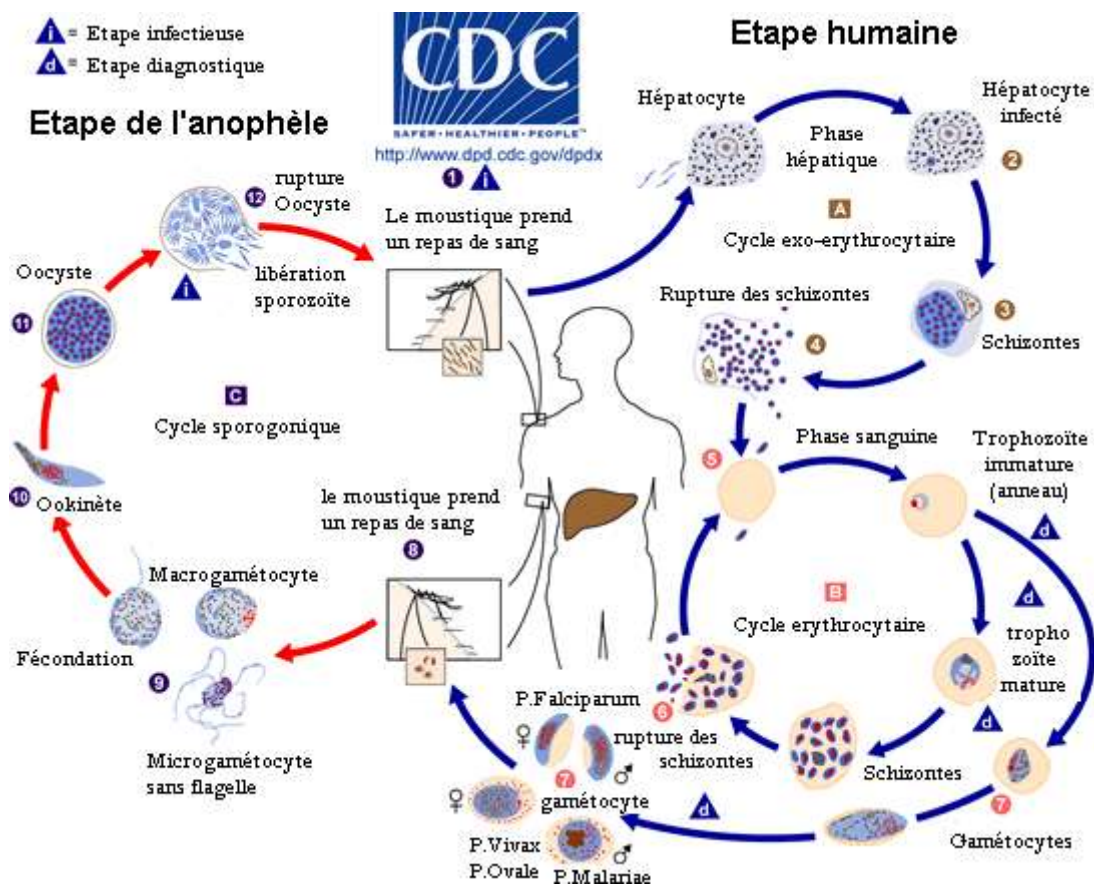
Lors d'un repas sanguin, l'anophèle femelle infecté inocule des sporozoïtes qui après une trentaine de minutes maximum dans la peau, la lymphe et le sang ; seuls quelques-uns parviennent à gagner les hépatocytes. Une fois à l'intérieure de celles-ci, ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires ou « corps bleus » qui par la suite s'éclatent et libèrent des

milliers de mérozoïtes dans le sang (de l'ordre 10 000 à 30 000 mérozoïtes) après une maturation de 7 à 15 jours.

Les mérozoïtes ainsi libérés à leur tour envahissent les érythrocytes, à l'intérieur desquels ils subissent une maturation en trophozoïtes puis en schizontes. Cette étape correspond à la phase symptomatique de l'infection et dure 24, 48 ou 72 heures selon les espèces. Après un certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes se différencient en gamétocytes mâle ou femelle qui vont rester dans le sang pendant 10 à 15 jours.

### 3.6.2 Chez l'anophèle femelle

Les gamétocytes (mâles et femelles) ingérés lors de son repas sanguin sur un sujet infecté, se fusionnent en un œuf libre, mobile appelé ookinète qui se transforme dans le tractus digestif en oocyste après s'être fixé à la paroi externe de l'estomac. A l'intérieur de ce dernier, se multiplient les cellules parasitaires qui vont donner naissance à des centaines de sporozoïtes. Ces sporozoïtes sont ensuite inoculés avec la salive du moustique, lors de son prochain repas sanguin (14).



**Figure 1: Cycle de développement du Plasmodium**

Source : <https://www.pnlp.sn/wp-content/uploads/2018/02/GUIDE-NATIONAL-DE-DIAGNOSTIC-BIOLOGIQUE-DU-PALUDISME.pdf>

### **Signes cliniques du paludisme**

Les symptômes du paludisme apparaissent généralement au bout d'une dizaine de jours chez les sujets non immunisés après une piqûre infestante de moustique, mais peuvent être beaucoup plus longue chez les personnes ayant acquis un certain degré d'immunité. La sévérité de ces manifestations dépend des interactions complexes entre l'hôte, le parasite et les facteurs environnementaux (20,21).

### **Les formes simples du paludisme**

#### **Paludisme asymptomatique**

Comme son nom l'indique, cette forme de paludisme se produit sans symptômes manifestes, de ce fait, elle représente un vaste réservoir caché d'infection active permettant une persistance du parasite et sa propagation éventuelle à d'autres hôtes humains. Il n'y a pas de définition standard par rapport à la parasitémie asymptomatique car son impact clinique, ou seuil pyrogénique est en fonction du niveau et de la fréquence d'exposition antérieure au parasite et de l'âge de l'individu (21,22).

Le paludisme asymptomatique est plus fréquent chez les populations vivant dans les zones à moyenne et forte transmission du paludisme. Ces personnes développent une immunité contre la maladie et le parasite qui se caractérise non seulement par une faible parasitémie mais aussi par une diminution de l'apparition des symptômes ainsi que de leur sévérité. D'autres facteurs tels que l'état de santé général, la prédisposition génétique de l'hôte, et les facteurs parasitaires associés à la virulence de l'infection peuvent favoriser la progression de l'infection palustre vers une forme asymptomatique (22).

Cependant, on sait peu de choses sur les conséquences silencieuses ou à long terme des infections asymptomatiques sur la santé. Une étude menée en Indonésie dans la région de Sumba, a révélé chez les personnes atteintes d'infections asymptomatiques, des niveaux plus élevés de marqueurs inflammatoire, du facteur de von Willebrand et du facteur plaquettaire 4 mais aussi une numération plaquettaire et un taux d'hémoglobine plus faibles contrairement aux individus non infectés (21).

#### **Paludisme symptomatique**

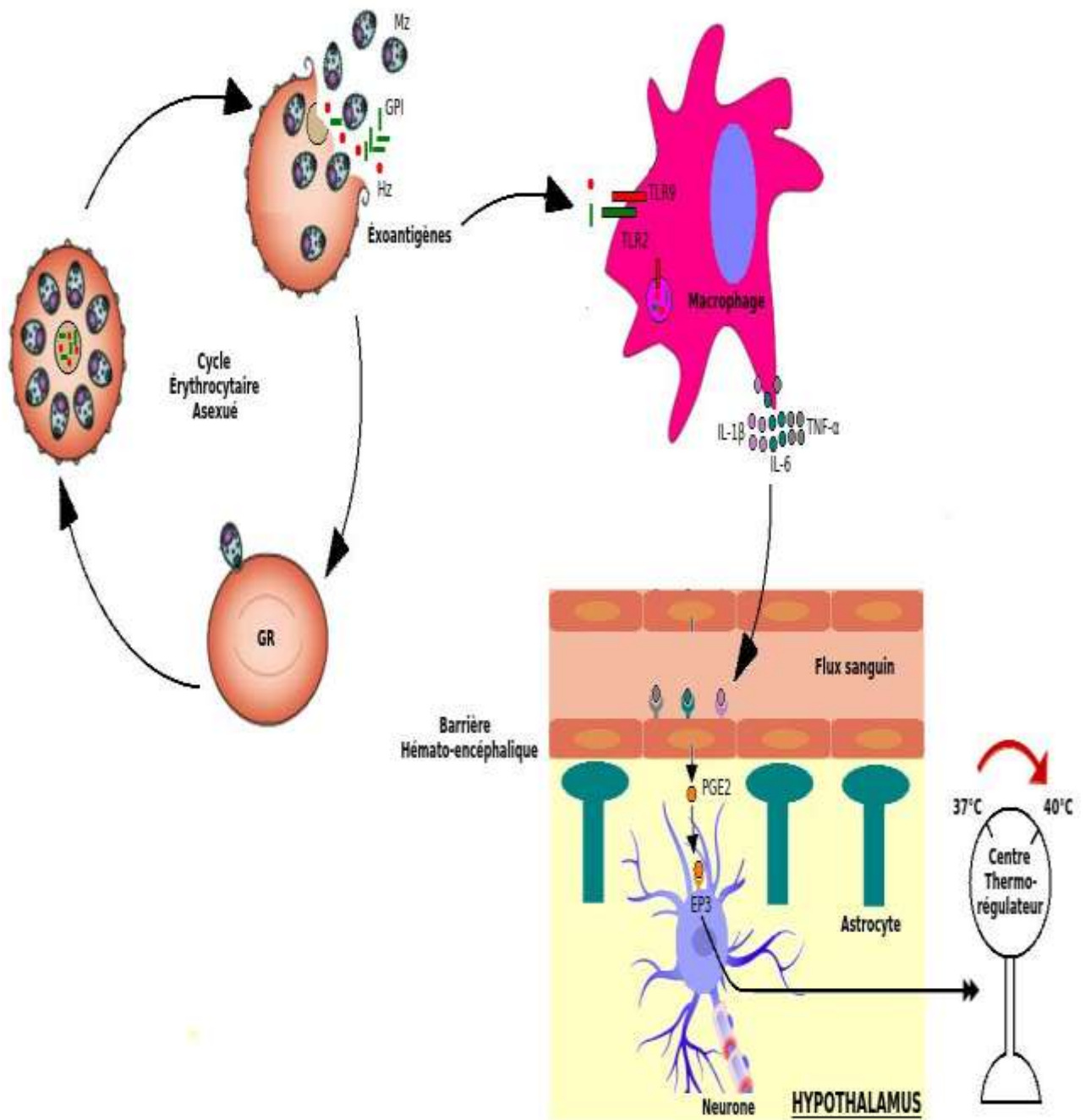
Les manifestations cliniques sont diverses dans leur expression et leur gravité et dépendent à la fois de l'espèce plasmodiale et de son hôte. Les symptômes d'un accès palustre simple sont peu spécifiques et similaires pour toutes les espèces, et correspondent à celui d'un syndrome pseudo

grippal, ce qui rend le seul diagnostic peu fiable : fièvre, maux de tête, douleurs musculaires, affaiblissement, vomissements, diarrhées, toux (18,23).

Ces accès palustres sont caractérisés par une succession de frissons, de sueurs et de fièvre, synchronisés avec le cycle de développement et l'éclatement des globules rouges. La périodicité de ces accès fébriles varie selon les espèces : toutes les 24 heures pour *P. Knowlesi* (fièvre quotidienne), toutes les 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* (fièvre tierce) et toutes les 72 heures pour *P. malaria* (fièvre quarte).

En effet, les accès fébriles résultent de la libération des exo antigènes parasitaires tels que l'hémozoïne et le glycosylphosphatidylinositol (GPI) après destruction des érythrocytes infectés. Ces exo antigènes sont ensuite reconnus par les récepteurs de type Toll-like (TLR), exprimés sur les cellules du système immunitaire inné (macrophages et cellules dendritiques), dont l'activation stimule une production de cytokines et médiateurs pro-inflammatoires pyrogénique. Ainsi, une reconnaissance du GPI par le récepteur TLR2 et celle de l'hémozoïne par le TLR9 entraîne une production de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , et d'IL-6 par les macrophages. Ces cytokines pyrogènes, qui jouent un rôle majeur dans le contrôle de la multiplication parasitaire, atteindront les régions thermorégulatrices de l'hypothalamus où elles induisent une augmentation de la température (21,24).

Au fur et à mesure que la parasitémie augmente, la quantité d'exo antigènes parasitaires et de cytokines pro-inflammatoire augmente aussi, ce qui entraîne une élévation de la température corporelle. Ainsi la parasitémie minimale requise pour déclencher la fièvre permet de définir le seuil pyrogénique. Ce seuil varie avec l'âge chez les individus continuellement exposés au paludisme. En outre, des différences significatives ont été observées entre les seuils pyrogéniques selon différentes souches de *P. falciparum*, qui s'expliquent par une variation du niveau de virulence de celles-ci dans l'induction d'une réponse inflammatoire.



**Figure 2 : Mécanismes d'induction de la fièvre palustre**

**Paludisme grave ( Oakleyetal.,2011)**

Le paludisme grave est défini selon l’OMS par la détection de formes asexuées du parasite sur un frottis sanguin et l’identification d’au moins un des critères suivants : en clinique (prostration, troubles de la conscience, détresse respiratoire, convulsions répétées, collapsus pulmonaire, saignements anormaux, ictère, hémoglobinurie) et en laboratoire (anémie sévère, hypoglycémie, acidose, insuffisance rénale, hyperlactémie, hyperparasitémie). La plupart des cas graves de paludisme sont observés avec l’espèce *P. falciparum* et dans une moindre mesure avec l’infection à *P. vivax* et *P. knowlesi*.



## Neuropaludisme

Le neuropaludisme ou « accès pernicieux » regroupe toutes les manifestations neurologiques qui font suite à une atteinte du système nerveux central lors d'un accès palustre. Cette forme clinique est généralement observée chez les patients non immunisés, surtout les enfants de moins de 5ans mais aussi chez les voyageurs dans le cadre du paludisme d'importation. Il se caractérise par l'apparition progressive de troubles de la conscience, d'une prostration ou de tous autres signes de dysfonctionnements neurologiques associés à une fièvre élevée et à un syndrome pseudo-grippal (24).

Deux mécanismes majeurs, interdépendants, contribuent à la pathogenèse du neuropaludisme : l'obstruction des micro-vaisseaux cérébraux suite à la séquestration des érythrocytes infectés et l'induction d'une réponse pro-inflammatoire exacerbée et l'activation des cellules endothéliales (21).

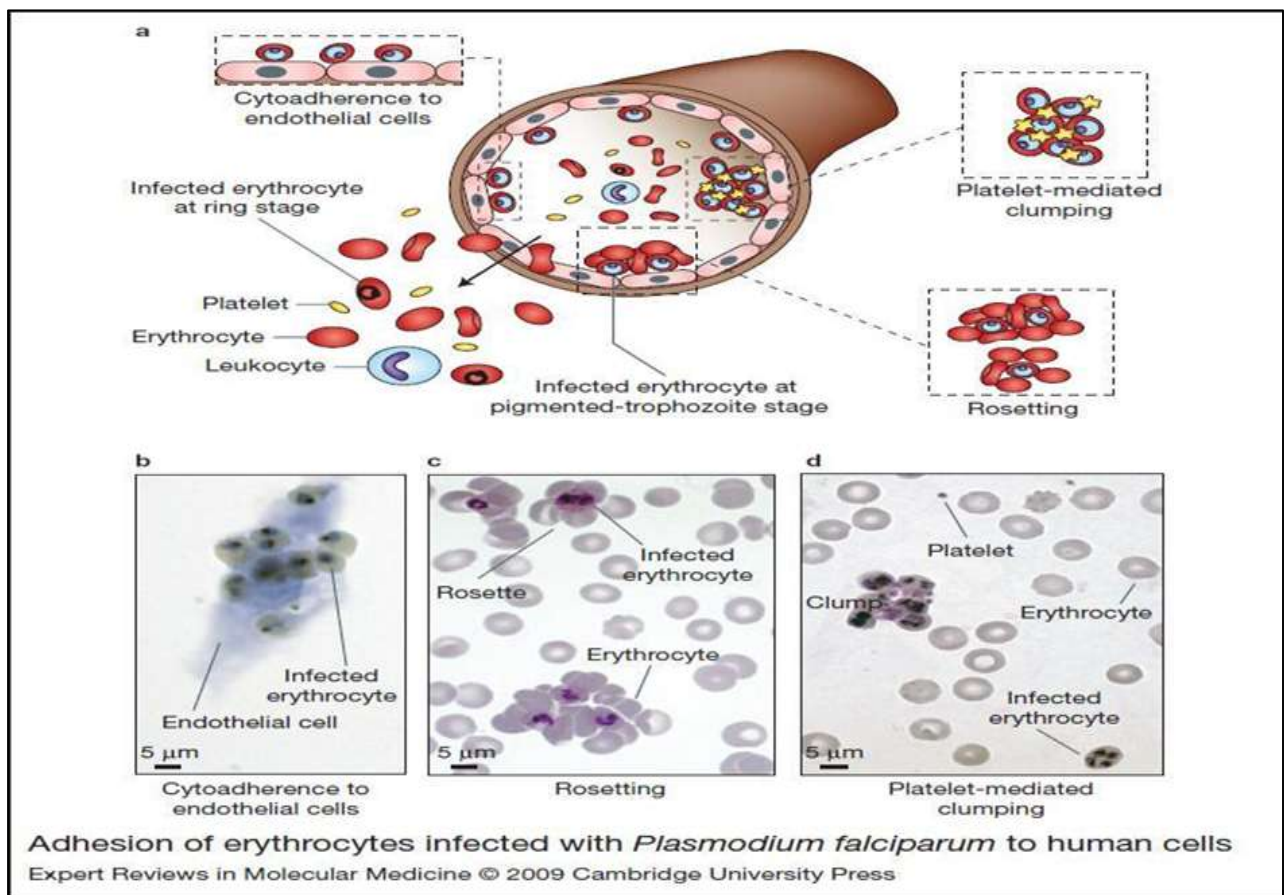
La séquestration parasitaire est l'un des principaux mécanismes physiopathologiques de l'accès palustre grave à l'origine de l'atteinte cérébrale et du paludisme gestationnel. Elle repose sur l'adhésion des globules rouges parasités à la surface des cellules endothéliales vasculaires de l'hôte et à la capacité des globules rouges parasités de s'agglutiner avec les globules rouges non parasités (rosetting) et parasités par les plaquettes (clumping) via des protubérances à la surface de la membrane du GR appelées knobs. Ces protubérances constituent le site de contact entre les cellules endothéliales et les protéines palustres exprimées à la surface des globules rouges infectés, notamment *PfEMP1* (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1) (24).

La séquestration permet aux formes matures asexuées de *Plasmodium falciparum* (trophozoïtes âgés et schizontes) de pouvoir échapper à la clairance splénique de l'hôte ainsi favorisant l'augmentation de la biomasse parasitaire par une multiplication facilitée dans l'environnement anaérobique des veinules postcapillaires.

L'autre mécanisme à l'origine du neuropaludisme est l'induction d'une réponse pro-inflammatoire exacerbée et l'activation des cellules endothéliales. En effet, les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, LT $\alpha$ ), produites après libération des exo antigènes parasitaires activent les cellules endothéliales qui vont augmenter l'expression des molécules d'adhésion telles que CD36, ICAM1 et LFA1 à leur surface, exacerbant ainsi le phénomène de séquestration des globules rouges infectés, des plaquettes et des leucocytes. Après cela, elles pourront sécréter à leur tour des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines (MCP-1) contribuant aussi à l'inflammation locale, et au recrutement des leucocytes (monocytes,

macrophages, neutrophiles et les lymphocytes). Par conséquent, l'inflammation locale et l'activation endothéliale pourraient être exacerbées.

Les principales conséquences de cette hyperactivité sont une majoration de la symptomatologie clinique, une dysrégularisation de certains mécanismes cellulaires mais également une déstabilisation de la réaction immunitaire nécessaire au contrôle du parasite par une régulation positive ou négative de chimiokines et cytokines pro- et anti-inflammatoires (24).



**Figure 3: Phénotypes d'adhérence impliqués dans le phénomène de séquestration parasitaire** ( Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M (2009) Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. Expert Rev Mol Med 11: )

### L'anémie sévère

L'anémie sévère palustre, caractérisée par un taux d'hémoglobine inférieur à 5g/dl repose sur une élimination excessive des globules rouges infectés et sains et aussi à une anomalie de la production des érythrocytes (dysérythropoïèse). Elle est due à deux processus, à savoir la rupture des hématies parasitées et la clairance splénique au cours desquels, les globules rouges infectés ou non sont soit phagocytés par les macrophages ou soit séquestrés dans la rate. La particularité dans cette forme d'anémie palustre, est l'élimination des globules rouges non

parasités par phagocytose en exploitant le processus de Rosseting, ce qui provoque ainsi leur séquestration dans la rate (21,22).

Dans les conditions physiologiques, l'érythropoïèse est le processus permettant le renouvellement des globules rouges. Il s'est avéré que ce processus est perturbé lors des infections palustres entre autres par une diminution de la synthèse de l'érythropoïétine (EPO) et par l'inhibition de la réponse des progéniteurs érythrocytaires à l'EPO en raison d'un déséquilibre de la balance de cytokine pro- et anti-inflammatoire. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence qu'une libération excessive d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , associée au NO (oxyde nitrique), contribuent à une dysérythropoïèse et une érythrophagocytose (21).

### **Détresse respiratoire**

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est l'une des complications les plus redoutables du paludisme. Il se caractérise par l'incapacité des poumons à fonctionner correctement provoquant ainsi une augmentation de la fréquence respiratoire et une dyspnée et peut rapidement progresser vers un décès. La physiopathologie de ce syndrome reste mal connue mais il est probablement lié à une lésion de l'endothélium des capillaires pulmonaires. Tout comme dans le neuropaludisme, il a été démontré que la réponse inflammatoire exacerbée est impliquée dans le développement du SDRA (21).

## **3.7 Diagnostic du paludisme**

Les techniques de diagnostic du paludisme utilisées à ce jour sont nombreuses. Nous en faisons un rappel succinct ci-dessous mais en consacrant une attention particulière au diagnostic moléculaire.

### **3.7.1 Diagnostic clinique**

C'est la plus commune et moins coûteuse de toutes les techniques de diagnostic (Réf). L'accès palustre sans signe de gravité se déroule suivant la triade « frissons, chaleur, sueurs » survenant tous les deux à trois jours suivant l'espèce de parasite. Il fait suite à un stade de primo invasion non traité, qualifié « d'embarras gastrique fébrile ». Le premier stade de l'accès palustre est caractérisé par des frissons violents pendant environ 1 h suivis d'une forte fièvre à 40°C avec des céphalées et des douleurs abdominales durant 3 à 4 h. La crise se termine par des sueurs profuses, une émission d'urine foncée et un effondrement brusque de la température ; ce stade dure entre 2 et 4 heures. Chez un sujet non prémuni, tout accès palustre peut s'aggraver en quelques heures sous la forme d'un paludisme potentiellement mortel. L'accès palustre grave peut prendre plusieurs formes cliniques dont la plus importante est le neuropaludisme. Cette atteinte cérébrale se caractérise par des troubles de la conscience, une prostration et des

convulsions. Le diagnostic du paludisme est donc une urgence vitale : le malade doit être immédiatement hospitalisé dès l'observation de tout symptôme neurologique. En 2014, les directives de l'OMS soulignent qu'il est important de confirmer une suspicion de cas de paludisme en procédant, si possible, à un diagnostic de certitude en laboratoire avant de délivrer un traitement antipaludique adapté. Une thérapie dispensée uniquement pour donner suite à une suspicion clinique ne doit être envisagée que lorsque les techniques de diagnostic parasitologique ne sont pas accessibles.

### **3.7.2 Diagnostic biologique**

#### **La Microscopie**

Le diagnostic microscopique repose sur deux techniques qui sont différentes mais complémentaires : la goutte épaisse et le frottis mince. C'est un diagnostic de certitude qui met en évidence les formes érythrocytaires de *Plasmodium* par l'observation microscopique d'un prélèvement de sang périphérique du patient. La réalisation de ce test ne requiert pas de matériel compliqué mais plutôt une formation adéquate pour la coloration et la lecture des lames (particulièrement pour identifier les espèces en cas de faible parasitémie ou d'infections mixtes) et un temps conséquent pour obtenir les résultats.

#### **La goutte épaisse**

Cette technique, considérée comme la technique de référence, est une observation, après hémolyse et coloration au Giemsa, de quelques microlitres de sang sur une lame de microscope. Le dénombrement de parasites pour 300 leucocytes doit être effectué par un manipulateur expérimenté, car la lecture des lames reste assez délicate. Le diagnostic d'espèce n'est pas toujours possible. Du fait de la superposition de plusieurs couches de globules rouges, cette méthode permet à l'examineur d'observer davantage d'érythrocytes afin de déceler des parasites, ce qui permet d'identifier les faibles parasitémies plus facilement qu'avec un frottis sanguin.

La réalisation de ce test ne requiert pas de matériel compliqué mais plutôt une formation adéquate pour la coloration et la lecture des lames (particulièrement pour identifier les espèces en cas de faible parasitémie ou d'infections mixte).

## Confection de la goutte épaisse

**Piqûre au bout du doigt** (avec une lancette stérile, à usage unique)



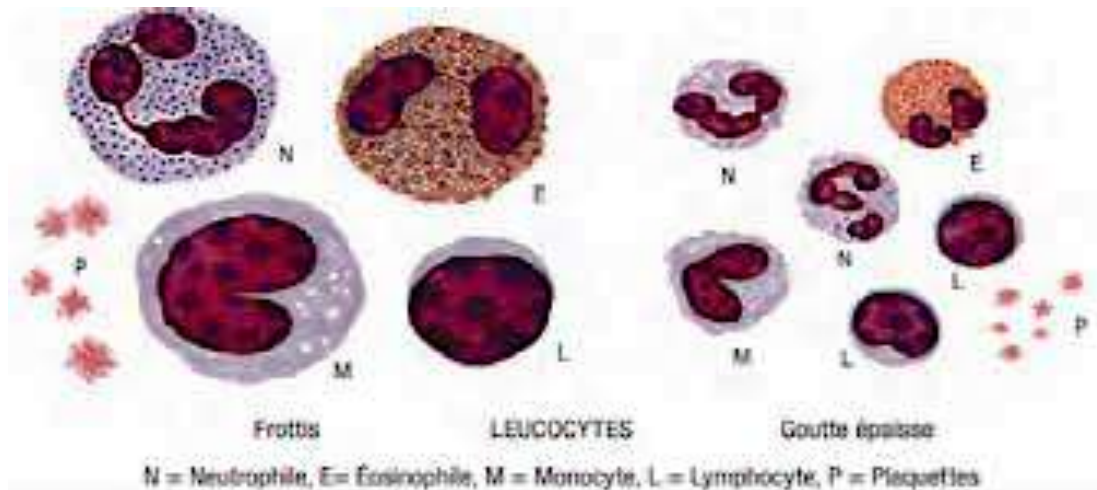
**Confection d'une goutte épaisse**



**Figure 4 :** Confection de la goutte épaisse (7<sup>ème</sup> édition du cours international atelier paludisme 29 mars 2009 institut - Pasteur de Madagascar)

### **Le frottis mince**

Le frottis mince est effectué en étalant quelques microlitres de sang sur une lame de microscope. Après séchage, on effectue une coloration avec la méthode May-Grünwald Giemsa (MGG) ou par Giemsa après fixation à l'alcool. Les parasites sont alors colorés en rouge (noyau) et en bleu (cytoplasme) et observés au microscope. Cette méthode est la plus adaptée à l'identification du stade et de l'espèce du parasite.



**Figure 5 :** Confection du frottis mince

Source : <https://www.pnlp.sn/wp-content/uploads/2018/02/GUIDE-NATIONAL-DE-DIAGNOSTIC-BIOLOGIQUE-DU-PALUDISME.pdf>

### **Quantitative Buffy Coat (QBC) test**

Le principe de ces tests est la détection de protéines spécifiques de *Plasmodium* (antigènes ou enzymes), en chromatographie sur un support solide. Certains de ces tests permettent maintenant d'affirmer un diagnostic positif (présence de *Plasmodium*) et d'orienter le diagnostic d'espèce : *P. falciparum* et/ou autre espèce. Ces tests rapides, très simples d'utilisation et conditionnés en emballages unitaires, sont très pratiques et ont une bonne sensibilité (surtout pour *P. falciparum*). En France, ils doivent être considérés comme une aide au diagnostic mais ne doivent pas supplanter, à l'heure actuelle, les techniques classiques basées sur la coloration. L'intérêt de leur utilisation à large échelle en zone d'endémie est actuellement en discussion mais leur coût unitaire élevé reste un obstacle.

### **Les Tests de Diagnostic Rapides (TDR)**

La détection des antigènes du paludisme par immunochromatographie : les tests de diagnostic rapide (TDR). Plusieurs TDR par immunochromatographie sont disponibles, classés en fonction du nombre d'antigènes détectés. La plupart, à l'exception de la série OptiMalt, permettent la mise en évidence de l'HRP2 (Histidin Rich Protein 2), spécifique de *P. falciparum* ; certains permettent la mise en évidence de la pLDH (*Plasmodium* lactate deshydrogenase) : Pf pour *P. falciparum*, Pv pour *P. vivax* ; Pan-LDH commune aux quatre espèces plasmodiales. La sensibilité et la spécificité revendiquées par les constructeurs de ces tests sont comparables.

### **3.7.3 Diagnostic immunologique : ELISA et IFI**

Ces méthodes constituent le diagnostic indirect du paludisme.

Le principe d'IFI consiste à mettre en contact, un antigène figuré de parasite sur goutte épaisse et/ou sur frottis sanguin, et un sérum animal ou humain. Si ce sérum contient des anticorps spécifiques contre cet antigène le complexe immun persistera après le lavage, et sera fluorescent en lumière ultra-violet grâce au fluorochrome associé aux anticorps. Quant au principe d'ELISA, il consiste à fixer sur un support solide des éléments contenus dans le liquide biologique. Ensuite, les antigènes solubles sont détectés à l'aide d'un complexe immun marqué par l'enzyme, et sera révélé par addition d'un substrat spécifique de l'enzyme. Ces techniques apportent des informations précieuses qui permettent de confirmer le paludisme, lorsque la parasitémie a été réduite par exemple par un traitement anti palustre. Elles permettent également de suivre la guérison par la décroissance du taux des anticorps, et ont aussi un intérêt en zone d'endémie. Le diagnostic immunologique ne peut remplacer le diagnostic parasitologique direct, du fait que les anticorps apparaissent avec un retard de plusieurs jours sur la parasitémie et disparaissent plus tard. Ne peuvent être utilisés pour un diagnostic de routine, mais surtout plus à des fins de recherches.

#### **Diagnostic biologique indirect**

La sérologie n'est d'aucun apport pour le diagnostic d'urgence de l'accès palustre ; une sérologie positive signe uniquement un contact préalable avec le parasite.

### **3.7.4 Diagnostic moléculaire**

L'essor de la biologie moléculaire a permis de développer de nouvelles techniques fondées sur l'identification de l'ADN plasmodial amplifié par polymérase chain reaction (PCR). Réaction de polymérisation en chaîne Dénommée PCR, c'est une technique de biologie moléculaire, basée sur la sélection puis l'amplification d'un gène spécifique du parasite à partir d'amorces spécifiques de ce gène. Elle a l'avantage de pouvoir détecter une souche spécifique du parasite par des gènes spécifiques ou après digestion du produit de PCR avec des enzymes de restriction spécifiques. Elle permet la détection des parasitémies très faibles. Elle est utilisée pour le diagnostic du paludisme et en enquête de masse. Cependant, si son utilisation ne nécessite pas une ponction veineuse, elle n'est réalisable que dans des laboratoires spécialisés et son coût est très élevé.

Grâce à des courtes séquences nucléotidiques qui s'apparient au génome du Plasmodium de part et d'autre de la portion d'intérêt (amorces) et surtout à l'utilisation d'une enzyme thermostable, la Taq polymérase, l'ADN est multiplié de manière exponentielle jusqu'à devenir

délectable soit par sa visualisation sous lumière UV (dans la PCR classique), soit par détection d'une fluorescence à chaque duplication par des sondes fluorescentes (25) ou par technologie SYBR Green (dans la PCR en temps réel). Cette approche moléculaire permet de détecter de très faibles concentrations parasitaires et de distinguer les différentes espèces infectantes même si elles sont présentes simultanément chez le même individu (infections mixtes).

Les premières descriptions de techniques moléculaires de détection de *P. falciparum* dans la littérature remontent aux années 90s avec les travaux de Barker et al (26) Une des techniques qui a connu un grand succès est celle mise au point par Snounou et al. qui, contrairement aux précédentes qui ne détectaient qu'une seule espèce plasmodiale (*P. falciparum*), permettait la détection des 4 espèces de Plasmodiums humains par PCR classique, grâce à des amorces spécifiques à 23 chacune des espèces (27). La sensibilité de cette technique a été améliorée quelques temps plus tard par ses concepteurs en ajoutant une seconde PCR à la première (28). Cette technique est appelée PCR nichée (voir Figure 14). Cette dernière technique a connu un large succès dans la communauté scientifique et est toujours considérée à ce jour comme référence, citée par 568 publications à ce jour.

De nombreuses autres techniques, utilisant différentes amorces et sondes (pour la PCR en temps réel), ont été développées ou modifiées en vue d'accroître la sensibilité et la spécificité mais aussi de réduire le temps de réalisation. C'est ainsi qu'à titre d'exemple nous pouvons citer la technique mise au point par Rougemont et al (27) et améliorée par Cnops et al. pouvant atteindre des seuils de détection de l'ordre de 0,006 parasites/ $\mu$ l (27), ou encore celle mise au point par Tran et al, combinant PCR classique et PCR en temps réel (nested qPCR) pour arriver à un seuil de 0,5 parasite/ $\mu$ l, pour des prélèvements effectués sur papiers filtres. Kamau et al. ont atteint une limite de détection de  $3,62 \cdot 10^{-4}$  parasites/ $\mu$ l en utilisant une reverse transcriptase real-time (29).

La plupart de ces techniques de PCR ont été élaborées en ciblant le gène codant la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (18S rRNA). En effet ce gène que l'on retrouve chez tous les eucaryotes, contient des régions à la fois hautement conservées et variables, et il a été le plus étudié chez le Plasmodium. Cinq copies de ce gène sont dispersées sur des chromosomes différents du génome parasitaire (30). Néanmoins d'autres gènes ont aussi été utilisés, mais moins fréquemment, comme cibles pour l'identification moléculaire des Plasmodiums. Nous pouvons citer à titre d'exemple le gène cytochrome b (cytb), qui lui aussi possède une région hautement conservée (31), le gène codant pour la protéine circumsporozoïte (csp), qui a été utilisée pour identifier *P. falciparum* et *P. vivax*, le dihydrofolate reductase (dhfr) [72], le ring-



infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA), le merozoite surface protein-1 (msp-1) et le reticulocyte binding protein 2 27 (rbp2). Ces techniques sont conçues en monoplex (amplifiant une cible unique) ou en multiplex (amplifiant une ou plusieurs cibles). A titre d'illustration, Chew et al. ont mis au point une PCR hexaplex capable d'identifier simultanément six espèces plasmodiales infectant l'humain. La précision de ces techniques a permis de discriminer les différentes espèces lors des infections mixtes mais aussi de différencier les deux sous-espèces de *P. ovale* (*P. ovale walikeri* et *P. ovale curtisi*), longtemps méconnues (32). Beaucoup de facteurs peuvent expliquer les différences de sensibilités de ces différentes techniques, entre autres : le type de réactifs employés, les standards utilisés pour la quantification, les dilutions effectuées, les types de thermocycleurs, les méthodes d'analyses et d'interprétation des données (33). En regard à ces divergences, Bustin et al. ont proposé des lignes directrices pour la publication des expériences de PCR quantitative en temps réel (MIQE guidelines), en vue d'aider à assurer l'intégrité de la littérature scientifique, de promouvoir la cohérence entre les laboratoires, et d'accroître la transparence expérimentale (25). Outre l'identification moléculaire des Plasmodiums réalisée généralement sur du matériel sanguin soit liquide, soit séché sur papier-filtre, soit déposé et coloré sur lame, ou encore provenant des TDR (34). L'utilisation d'autres fluides organiques est néanmoins décrite dans la littérature. Mharakurwa et al. (35) ont rapporté dans leurs travaux respectifs des preuves de détection possible par PCR de Plasmodium dans la salive et l'urine. Cependant, Liu et al. ont pu détecter *P. falciparum* dans les fèces de grands primates africains.

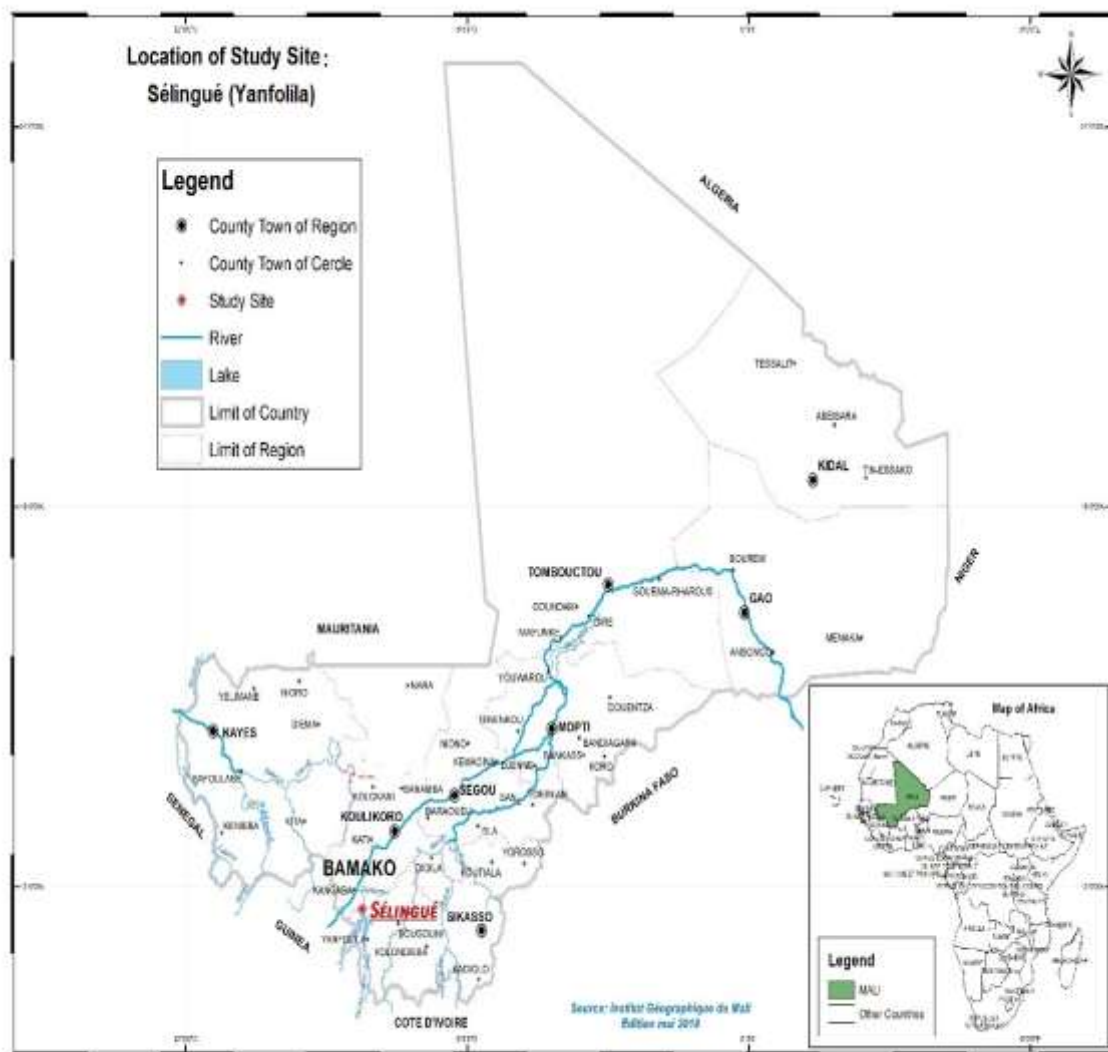
## **4 MATERIEL ET METHODES**

### **4.1 Lieux d'étude**

La population de la zone de Sélingué est estimée à 111 469 habitants. Du point de vue géographique, la zone de Sélingué est définie comme étant la superficie territoriale qui subit les influences directes du lac de retenue d'eau occasionné par le barrage hydroélectrique. Elle est traversée par trois grands cours d'eau à savoir : le Sankarani, le Baoulé et le Wassoulouballé. Elle est liée à Bamako par une route bitumée d'environ 150 Km au Sud-ouest. Le climat est de type soudanien humide. Il est caractérisé par une pluviométrie abondante avec une précipitation annuelle atteignant 1200 mm d'eau. On y distingue deux saisons : une saison pluvieuse (juin-octobre) et une saison sèche qui se divise en une sèche fraîche (Novembre-Février) et une sèche chaude de mars à mai. La végétation est dominée par une savane herbacée et arbustive parsemée de forêt galerie en bordure d'eau. On y trouve des arbres tels le Karité, le Cailcedrat, le So, le Lenké, le Kele-zaba, le Tabacouba etc. Le relief est accidenté en quelques endroits avec la proximité de la zone guinéenne caractérisée par des massifs montagneux, des plateaux et des collines. La construction du Barrage hydroélectrique de Sélingué qui produit annuellement plus de 180 Mégawatts sur le Sankarani a suscité la création d'un lac de retenue d'eau d'une superficie de 4900 Ha qui constitue un grand potentiel de culture irriguée et de pêche. Différentes ethnies sont présentes à Sélingué mais les Malinkés et les Bozos pratiquant respectivement l'agriculture et la pêche sont les ethnies dominantes. On y trouve aussi des bambaras, des peulhs et d'autres ethnies du Mali. On y rencontre des musulmans, des chrétiens et des animistes. Des populations qui pratiquent essentiellement l'agriculture et la pêche s'y sont installées. La zone est pratiquement urbaine par zone notamment à Kangaré chef-lieu de la sous-préfecture. Elle devient rurale progressivement en s'éloignant. En plus de l'agriculture, la pêche, l'élevage, le commerce, l'orpillage traditionnel y est pratiqué.

Infrastructure socio-sanitaire : Le Centre de Santé de Référence (CSRéf) de Sélingué est dirigé par un médecin chef au côté duquel travaillent les autres agents du centre. Il est situé à l'ouest de l'école fondamentale à Kangaré chef-lieu de la sous-préfecture. Des médecins généralistes, des sages-femmes, des infirmiers diplômés d'état, des matrones, des étudiants en médecine et pharmacie, des techniciens de laboratoire, des infirmiers stagiaires, les gérants de pharmacie, les manœuvres concourent au bon fonctionnement du centre aux côtés du médecin chef. Les différentes structures fonctionnelles du centre de santé sont constituées en unités dirigées chacune par un responsable désigné par le médecin chef. Le personnel travaillant dans une unité donnée est placé sous la responsabilité directe du responsable de l'unité. Le CSRéf est géré par

un conseil de gestion qui se réunit tous les trois mois. Il est composé par un président (le Président du conseil de cercle), le médecin chef du CSRéf, les maires des communes rurales, le sous-préfet, le chef de service du développement sociale et de l'économie solidaire, le président de la FELASCOM (fédération locale des associations de santé communautaire) et les présidents des Associations de santé communautaire. Le CSRéf assure les activités de 2<sup>ème</sup> niveau de référence à savoir les consultations externes, les consultations prénatales, des accouchements, la planification familiale, des interventions chirurgicales, des activités de laboratoire d'analyse, des activités d'ophtalmologie, d'odontostomatologie et de formation continue.



**Figure 6 : Carte sanitaire de la zone de Sélingué**

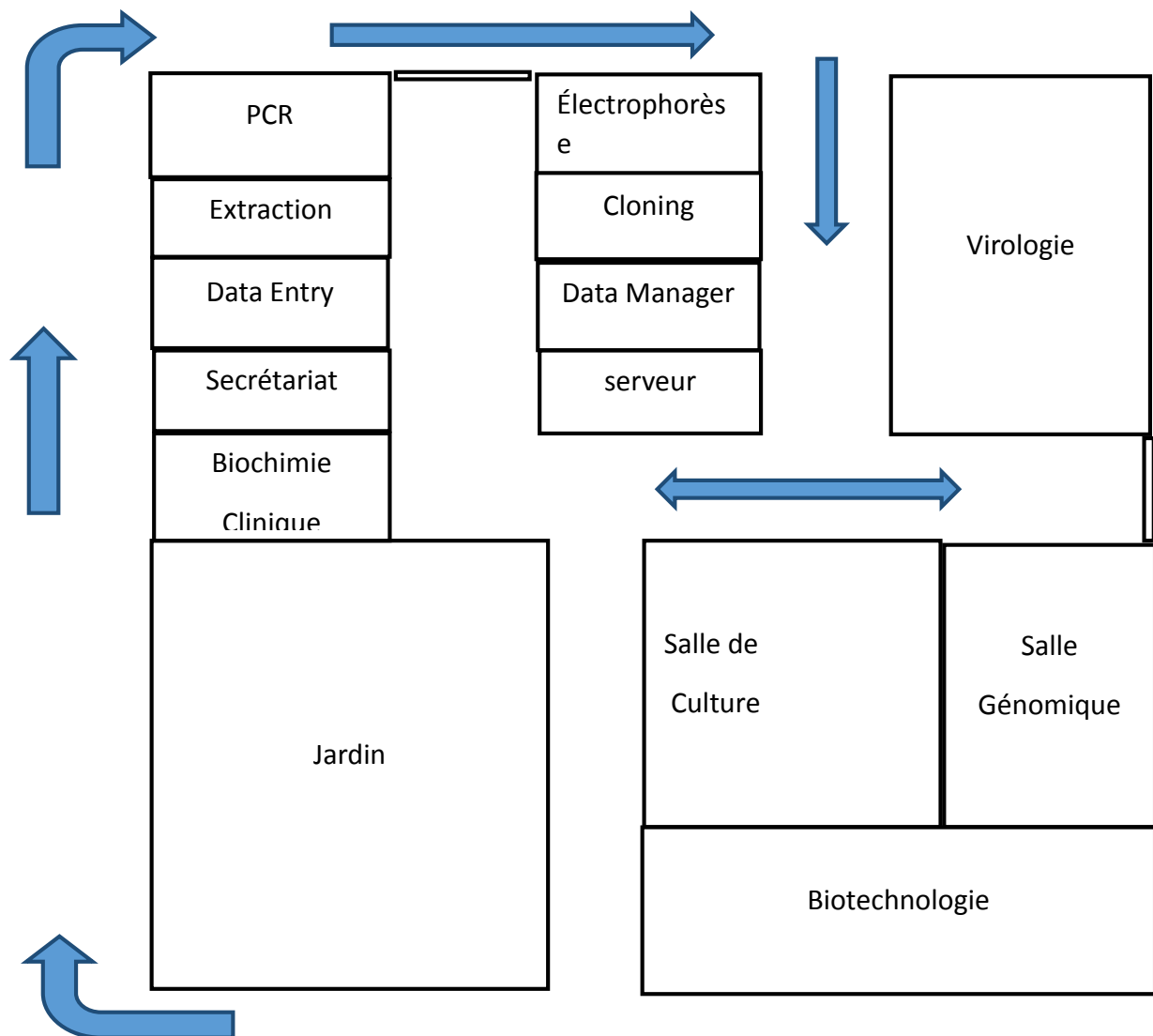
*Source : Institut National Géographique du Mali, Mai 2018*

#### **4.1.1 Présentation du LBMA**

Le laboratoire de biologie moléculaire appliquée (LBMA) est une structure de recherche publique à caractère académique située dans l'enceinte de la faculté des sciences et technique (FST) de l'université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako (USTTB) sur la colline de Badalabougou.

Le laboratoire a pour mission de promouvoir la recherche sur les pathologies comme le paludisme, le VIH-SIDA et les zoonoses à partir des outils de biologie moléculaire et de la biotechnologie dans le domaine des productions végétales et animales.

Le LBMA est composé de plusieurs unités de recherches dont : une unité de parasitologie, une unité de biotechnologie végétale/animale, une unité de virologie, une unité de zoonose, une unité d'entomologie médicale et une unité de biologie clinique.



**Figure 7 : Plan du LBMA**

## 4.2 Période et type d'étude

Nous avons conduit une étude prospective à Sélingué qui s'est déroulée sur deux périodes à savoir entre octobre 2015 et janvier 2017 et octobre 2018 à juin 2019. Les échantillons collectés dans la période allant d'octobre 2015 à janvier 2017 étaient collectés dans le cadre du test d'efficacité des CTAs (AL et ASAQ) pendant que ceux de 2018-2019 ont été collectés dans le cadre de la surveillance moléculaire des molécules utilisés dans la chimioprévention.

## 4.3 Enrôlement et suivi des patients dans le test d'efficacité des CTAs

### 4.3.1 Critères d'inclusion

- Lame positive à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 2000 et 199 999 Tf/  $\mu\text{L}$ ,
- Patients vivant dans un rayon de 5 km,

- Patients âgés de 6 à 59 mois,
- Diagnostic d'accès palustre simple (pas d'évidence de paludisme sévère ou de paludisme cérébral)
- Sujets pouvant rester dans l'étude jusqu'à J28,
- Assentiment des parents ou tuteurs car l'ensemble de nos patients étaient âgés de 6 à 59 mois.

#### **4.3.2 Critères de non-inclusion :**

- Prise antérieure d'antipaludiques dans les 4 jours précédents,
- Patients vivants dans un rayon supérieur à 5 km,
- Évidence de paludisme sévère (glycémie  $\leq 2,2$  mM, Hb  $< 5$  g/dl, densité parasitaire  $\geq 200\ 000$  par  $\mu\text{L}$ , signes de perte de mémoire durant les dernières 24 heures),
- Co-infection avec d'autres espèces plasmodiales,
- Antécédents d'hypersensibilité des patients aux molécules tels que l'artéméther, la luméfantrine, l'artésunate et l'amodiaquine,
- Incapacité pour le patient d'avaler les médicaments par la voie orale et vomissement de la première dose administrée à 30 min d'intervalle,
- Autres maladies telles que la pneumonie, la malnutrition sévère, l'insuffisance cardiaque ou rénale chroniques, et maladie chronique compromettant la vie.

#### **4.4 Enrôlement des patients**

D'abord avant le démarrage de l'étude, une autorisation a été obtenue auprès de la direction régionale de la santé, des chefs de village, et les autorités communautaires et administratives. Ensuite, nous avons procédé à l'inclusion dans l'étude des sujets de tous sexes âgés de 6 à 59 mois qui se présentaient avec un accès palustre simple. À leur arrivée au centre de santé, les enfants étaient soumis à un examen clinique puis à un test de diagnostic rapide (TDR) et par finir, une goutte épaisse / frottis mince pour la confirmation de l'accès palustre simple à *Plasmodium falciparum*. Après l'obtention de l'assentiment de l'accompagnant du malade ou des parents du malade, un prélèvement veineux était effectué pour différents tests moléculaires notamment la recherche des marqueurs de résistance et le génotypage. Pour chaque cas confirmé de paludisme, une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine était administrée pour la prise en charge des accès palustres simples et la quinine en injectable, en cas d'accès palustre grave ou en cas d'échec thérapeutique lors du suivi. En cas d'une éventuelle

complication nécessitant des actions thérapeutiques particulières, les patients étaient référés vers des services spécialisés.

#### 4.4.1 Suivi des patients (enfants de moins de cinq ans)

Les patients enrôlés dans notre étude ont été suivis pendant 42 jours. Pendant les 42 jours, ils venaient au centre selon les jours suivants J0 ; J1 ; J2 ; J3 ; J7 ; J14 ; J21 ; J28 ; J35 et J42 soit 10 visites au total.

Durant les trois premiers jours de la visite à savoir J0 ; J1 ; J2 les enfants recevaient leurs doses d'artemether-lumefantrine (Coartem®) ou d'artesunate-amodiaquine (ASAQ-Denk) conformément au protocole thérapeutique et subissaient des examens cliniques ainsi que des prélèvements sanguins (cf Tableau II).

#### 4.4.2 Plan de suivi des patients

Le tableau ci-dessous illustre les différents examens effectués lors des jours de suivi.

**Tableau III : Plan de suivi des patients pendant 42 jours.**

Tests réalisés	Jours de suivi										
	0	1	2	3	7	14	21	28	35	42	Jour x
TDR	X										
GE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	(X)
Hémoglobine	X									X	(X)
Confettis	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	(X)

Jour x : suivis non prévus

#### 4.5 Collectes et traitement des échantillons :

Les lames des gouttes épaisses et des frottis minces étaient lues par deux lecteurs différents et un troisième lorsque l'écart entre les parasitémiés trouvées par les deux premiers lecteurs valait 20%. Après la lecture, les lames sont arrangées dans des boîtes afin de faciliter le transport de celles-ci au laboratoire de biologie moléculaire appliquée (LBMA) pour une relecture et leur conservation. Au bout de chaque lame se trouvait les informations de chaque patient (l'identifiant, le jour de suivi et la date) écrites avec un marqueur indélébile.

Comme observé précédemment dans le Tableau IV, un confetti se faisait à chaque visite. Sur ce dernier, se trouvaient également les informations suivantes : l'identifiant, le numéro de suivi, et la date. Après le dépôt des gouttes de sang dans les cercles, on laissait sécher les confettis à

l'abri de la poussière et des mouches avant de les introduire dans des enveloppes contenant des dessiccants afin de les protéger contre l'humidité. Nous faisons au minimum trois (03) spots par confetti et par patient.

Quant aux cassettes des TDRs, on écrivait les identifiants des patients les dessus puis on les conservait dans une boîte.

#### **4.6 Collecte des échantillons lors de la surveillance moléculaire des molécules de la CPS**

La surveillance moléculaire était faite à partir des échantillons collectés chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes comme contrôles à ceux collectés chez les enfants.

##### **4.6.1 Collecte des échantillons chez les enfants de moins de 5 ans :**

L'étude a porté sur tous les enfants de 3 à 59 mois se présentant au centre de santé des différents sites et ayant reçus des doses de SP/AQ au cours de la campagne de CPS en 2018 qui ont répondu aux critères d'éligibilité.

Une fois au centre de santé des différents sites, les enfants sont soumis à un examen clinique puis un examen biologique notamment le Test de Diagnostic Rapide (TDR) et la goutte épaisse pour la confirmation de l'accès palustre à *P. falciparum*.

Avant l'implémentation de cette étude, un recensement des enfants de la même tranche d'âge avait été effectué par l'équipe du LBMA. Ce recensement avait porté sur plus de 8.000 enfants. Après le recensement, les enfants ont été suivis de façon passive dans les différents centres de santé après avoir reçu les doses de CPS. Ainsi, suivant les critères d'inclusion (ci-dessous) nous avons enrôlé 335 enfants tous âgés de 3 à 59 mois sur un total de 585 enfants dépistés.

- **Critères d'inclusion**

Les enfants qui répondaient à ces critères ci-dessous ont été inclus dans notre étude.

- Les enfants de 3 à 59 mois ;
- Être résidant dans un des trois sites d'étude ;
- Goutte épaisse (GE) positive à *P. falciparum* ;
- Consentement/Assentiment des parents ou tuteurs.

- **Critères de non-inclusion**

Les enfants qui répondaient à ces critères ci-dessous n'ont pas été inclus dans notre étude.

- Être âgé de plus de 59 mois ;
- Une goutte épaisse (GE) négative ;
- Patient ayant une malnutrition aigüe sévère ;
- Patient présentant des signes cliniques de paludisme sévère ;
- Refus d'adhérer à l'étude.



#### **4.6.2 Collecte des échantillons chez les femmes enceintes :**

Les femmes enceintes qui venaient au centre de santé pour leurs consultations prénatales étaient systématiquement incluses dans l'étude une fois le consentement obtenu. Ainsi les confettis étaient faits quel qu'en soit le résultat de la goutte épaisse.

#### **Le Test de Diagnostic Rapide (TDR)**

Les tests de diagnostic rapide utilisés étaient des cassettes de la firme SD BIOLINE. C'est un test de diagnostic rapide pour la détection qualitative et différentielle de la HRP-II (Protéine riche en Histidine II) spécifique à *P. falciparum*. Ce test est sensible à 99,7% avec une spécificité de 99,5%. Ces tests étaient utilisés uniquement lors de l'inclusion des enfants de moins de cinq ans dans l'étude de TES.

#### **4.7 Traitement des échantillons dans le Laboratoire**

##### **4.7.1 Extraction d'ADN et Géotypage des échantillons :**

Le matériel génétique des souches de *P. falciparum* a été extrait à partir des papiers confettis (Whatmann® 901) avec le kit commercial Qiagen (QIAGEN GmbH, QIAGEN Strosse 1, 40724 Hilden, GERMANY). Ce kit reconnu pour sa sensibilité et la pureté de l'ADN obtenu, a été utilisé pour l'extraction de nos échantillons conformément aux instructions du fabricant (cf Annexes).

##### **4.7.2 PET-PCR (Photo Induced Electron Transfer- PCR)**

**Principe :** Cette technique est utilisée pour la détection de l'amplification de la molécule d'ADN à travers la fluorescence émise par les agents fluorophores qui sont attachés aux amorces. Les agents fluorophores que nous utilisons sont : FAM et HEX

**Protocole :** Toutes les solutions de travail des amorces étaient préparées à la concentration de 10µM à l'exception de l'amorce *P.falciparum* HEX qui était à la concentration de 5µM. Puisque les échantillons traités provenaient tous d'une localité où l'espèce de *Plasmodium* la plus fréquente est *falciparum*, la première PCR que nous faisons était faite pour le genre *Plasmodium* qui est détecté par FAM et l'espèce *falciparum* par VIC.

**Tableau V : Préparation du Master Mix pour un volume total de 20µL :**

[Conc initiale]	Réactifs	Volume (µL)	[Conc Finale]
	ddH <sub>2</sub> O	3	
2X	ABI TaqMan Buffer	10	1X
10uM	Genus Forw primer	0.5	
10uM	FAM-genus Rev primer	0.5	
10uM	<i>P.falciparum</i> Forw primer	0.5	
10uM	HEX- <i>P.falciparum</i> Rev primer	0.25	
Total volume		15	
Template DNA		5	
TOTAL		20	

**PCR proprement dite** : Il faut s'assurer que les deux dyes à savoir FAM et HEX (VIC avec StepOnePlus) ont été correctement utilisés et sélectionner FAM pour le genre *Plasmodium* et HEX pour l'espèce *P.falciparum*.

**Tableau VI : Les conditions de amplification par la technique de PCR.**

Température	Temps	Nombre de fois
1) 95°C	15 minutes	1 X
2) 95°C	20 Secondes	45 X
3) 63°C	40 secondes	
4) 72°C	30 secondes	

#### 4.8 Analyse des résultats :

Il faut s'assurer que les contrôles ont donné comme il se doit :

- Contrôle Négatif = No CT
- Contrôle positif = valeur de CT inférieur à 40 (généralement inférieure à 20 car ce contrôle est riche en matériel génétique)

Les échantillons avec une valeur de CT supérieure à 40 étaient considérés comme négatifs à la PET-PCR

## 5 RESULTATS

### 5.1 Caractéristiques Sociodémographiques des patients

**Tableau VII : Répartition des femmes enceintes selon le district sanitaire de Selingue(N=181)**

Résidence	Effectif	Pourcentage
Bougoudani	5	2.8
Bozola	3	1.7
Carrière	41	22.7
Dalaba	9	5.0
Dalabakoro	2	1.1
<b>Dalabala</b>	<b>42</b>	<b>23.2</b>
Kangare	23	12.7
Kibarou	4	2.2
Lafiabougou	31	17.1
Linguetou	4	2.2
Sanankoroni	11	6.1
Wassolokin	4	2.2
Welessebougou	2	1.2
<b>Total</b>	<b>181</b>	<b>100.0</b>

La majorité des femmes enceintes inclus dans cette étude provenaient de Dalabala 23,2% (n=42) et de Carrière (22,7%) (n=41).

**Tableau VIII : Répartition des femmes enceintes selon la tranche d'âge (N=181)**

Tranches d'âge	Effectif	Pourcentage
Moins de 20 ans	62	34.3
<b>20-29 ans</b>	<b>82</b>	<b>45.3</b>
30-39 ans	36	19.9
40 ans et plus	1	0.6
<b>Total</b>	<b>181</b>	<b>100.0</b>

La majorité soit 45,3% (n=82) des femmes enceintes étaient de la tranche d'âge 20-29 ans.

**Tableau IX : Répartition des enfants de moins de 5 ans selon la résidence (N=181)**

Résidence	Effectif	Pourcentage
Binko	10	2.7
Bougoudani	7	1.9
Bozola	18	4.8
<b>Carrière</b>	<b>211</b>	<b>56.6</b>
Dalaba	2	0.5
Dalabala	46	12.3
Farabakoura	2	0.5
Kangare	5	1.3
Kibarou	12	3.2
Kondjiguila	1	0.3
Lafiabougou	56	15.0
Sanankoroni	1	0.3
Selinkegny	2	0.5
<b>Total</b>	<b>373</b>	<b>100.0</b>

La majorité 56,6% (n=211) des enfants de moins de cinq ans inclus dans l'étude provenaient de Carrière.

**Tableau X : Répartition des enfants de moins de 5 ans selon la tranche d'âge (N=373)**

Tranches d'âge	Effectif	Pourcentage
6-12 mois	40	10.7
1-2 ans	78	20.9
<b>2-3 ans</b>	<b>103</b>	<b>27.6</b>
3-4 ans	99	26.5
4-5 ans	53	14.2
<b>Total</b>	<b>373</b>	<b>100.0</b>

La tranche d'âge la plus représentée était 2-3 ans avec un pourcentage de 27,6% (n=103) suivie de celle de 3-4 ans avec un pourcentage de 26.5% (n=99).

**Tableau xx:** Repartition des patients par tranches de parasitémie

<b>Tranches de parasitémies</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage</b>
<100Tf/uL	9	2%
>=100Tf/uL	386	98%

Un total de 9 patients (2%) avait des parasitémies inférieures à 100Tf/uL de sang

**Tableau xx:** Résultats de la PET-PCR chez les patients à faible parasitémies

<b>Résultat PET-PCR</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage</b>
Positif	9	100%
Négatif	0	0%

La PET-PCR était positive chez tous les patients qui avaient de faibles parasitémies.

## 5.2 Résultats de la Goutte épaisse et la PET-PCR

**Tableau XI : Répartition des patients en fonction du résultat de la goutte épaisse (N=554)**

Goutte Épaisse	Fréquences	Pourcentages
Femmes Enceintes (N=181)		
Négative	137	75,7
<b>Positive</b>	<b>44</b>	<b>24,3</b>
Enfants de moins de 5 ans (N=373)		
Négative	28	7,5
<b>Positive</b>	<b>345</b>	<b>92,5</b>

Sur les 181 échantillons des femmes enceintes analysés, 24,3% étaient positifs à la goutte épaisse pendant que 92,5% des 373 échantillons des enfants étaient positifs.

**Tableau XII : Répartition des résultats de la PET-PCR (N=554)**

PET PCR	Fréquences	Pourcentages
Femmes Enceintes (N=181)		
Négative	137	75.7
<b>Positive</b>	<b>44</b>	<b>24.3</b>
Enfants de moins de 5 ans (N=373)		
Négative	15	4
<b>Positive</b>	<b>358</b>	<b>96</b>

Un total de 96% des 373 échantillons des enfants étaient positifs à la PET-PCR pendant que 24,3% des échantillons des femmes enceintes étaient positifs.

**Tableau XIII : Répartition des résultats de la PET-PCR en fonction des résultats de la goutte épaisse (N=552)**

PET-PCR	Goutte Épaisse		Total n(%)
	Négative	Positive	
	n(%)	n(%)	
Négative	145 (88.4)	4 (1.0)	149 (27.0)
Positive	19 (11.6)	384 (99.0)	403 (73.0)
<b>Total</b>	<b>164 (100)</b>	<b>388 (100)</b>	<b>552 (100)</b>

Pour un total de 552 échantillons analysés, 388 (72,3%) échantillons étaient positifs à la goutte épaisse pour 403 (73%) positifs à la PET-PCR.

### 5.3 Calcul des paramètres de validité

**Tableau XIV : Modalité de calcul des paramètres de validité**

PET-PCR	Goutte Épaisse (Standard)		Total
	Positive	Négative	
Positive	A	B	A+B
Négative	C	D	C+D
<b>Total</b>	<b>A+C</b>	<b>B+D</b>	<b>A+B+C+D</b>

**Tableau XV : Disposition des données pour le calcul des paramètres de validité**

PET-PCR	Goutte Épaisse (Standard)		Total
	Positive	Négative	
Positive	384	19	403
Négative	4	145	149
<b>Total</b>	<b>388</b>	<b>164</b>	<b>552</b>

#### 5.2.1 Sensibilité

$$\text{Sensibilité} = \frac{A}{A+C} = \frac{384}{388} = 0.9896 \text{ Sensibilité} = 98,96\%$$

La sensibilité de la PET-PCR était estimée à 98,96%.

### 5.2.2 Spécificité

$$\text{Spécificité} = \frac{D}{B+D} = \frac{145}{164} = 0.8841 \text{ Spécificité} = 88,41\%$$

La spécificité de la PET-PCR était estimée à 88,41%.

### 5.4 Calcul des Valeurs prédictives

**Tableau XVI : Modalité de calcul des paramètres de validité**

PET-PCR	Goutte Épaisse (Standard)		Total
	Positive	Négative	
Positive	A	B	A+B
Négative	C	D	C+D
<b>Total</b>	<b>A+C</b>	<b>B+D</b>	<b>A+B+C+D</b>

**Tableau XVII : Disposition des données pour le calcul des valeurs prédictives**

PET-PCR	Goutte Épaisse		Total
	Positive	Négative	
Positive	384	19	403
Négative	4	145	149
<b>Total</b>	<b>388</b>	<b>164</b>	<b>552</b>

### 5.2.3 Valeur Prédictive Positive (VPP)

$$\text{Valeur Prédictive Positive} = \frac{A}{A+B} = \frac{384}{403} = 0.9528 \quad \text{VPP} = 95,28\%$$

La valeur prédictive positive de la PET-PCR était de 95,28%.

### 5.2.4 Valeur Prédictive Négative (VPN)

$$\text{Valeur Prédictive Négative} = \frac{D}{C+D} = \frac{145}{149} = 0.9731 \quad \text{VPN} = 97,31\%$$

La valeur prédictive négative de la PET-PCR était de 97,31%.



## 6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Nous avons fait une étude dans le but d'évaluer la capacité de la PET-PCR à diagnostiquer le paludisme au même titre que la goutte épaisse dans la localité de Sélingué au Mali. L'étude a été faite dans le contexte d'une étude d'efficacité thérapeutique des CTAs et de résistance de la SP.

La zone de Sélingué est l'un des 3 sites d'études qui ont été choisis pour les études de TES et de résistance à la SP car les faciès de transmission varient d'une localité à l'autre (35). À Sélingué, le faciès de transmission du paludisme correspond aux faciès des Barrages (Sélingué, Manantali et Markala) avec comme caractéristique, une anémie palustre élevée chez les moins de 9 ans. La transmission du paludisme y est bimodale (plurimodale). La pluviométrie élevée et la présence du barrage hydroélectrique à Sélingué créent les conditions propices à la circulation du parasite du paludisme (*Plasmodium*) et au développement de son vecteur (l'anophèle) à cause des retenues d'eau.

Les échantillons sur lesquels a porté la présente étude ont été sélectionnés et traités au LBMA qui est doté d'une plateforme de PCR en temps réel de type OneStepPlus®. Cette plateforme est dotée d'agents fluorochromes, notamment les tests TaqMan® MGB à base de sondes marquées aux colorants comme ROX, FAM, JOE, TAMRA et VIC®, et le colorant standard SYBR® Green I. Cette plateforme avec la possibilité de labélisation des amorces avec des sondes spécifiques offre une spécificité et une sensibilité exceptionnelles lors du diagnostic moléculaire. Au cours de notre étude, les colorants utilisés étaient essentiellement FAM pour le genre *Plasmodium* et HEX pour les autres espèces. Le fluorochrome HEX utilisé pour la détection des espèces a une longueur d'onde de détection de 554 nm qui est très proche de celle de VIC (549 nm) (Réf : manuel d'utilisation OnestepPlus). Ceci a permis d'utiliser les filtres du colorant VIC pour la détection de la lumière émise par HEX dans le but d'identifier les espèces des parasites. Aussi, cette plateforme offre l'option du SYBR Green I comme alternative économique pour l'identification des cibles, essentiellement pour les tests de dépistage ou les tests qui ne nécessitent plusieurs réactions en même temps pour poser le diagnostic.

Notre approche a consisté en la sélection des échantillons qui étaient soit destinés au génotypage, soit au séquençage. Pour cela, les échantillons positifs à la goutte épaisse ont été sélectionnés parmi ceux des enfants inclus dans l'étude de TES ou des femmes enceintes qui ont été incluses dans l'étude de résistance à la SP. Pour les échantillons négatifs à la goutte épaisse, les échantillons ont été sélectionnés parmi ceux du dépistage de l'étude TES et les

femmes enceintes incluses dans l'étude de résistance à la SP aussi. Cette méthode nous a permis d'avoir un nombre important d'échantillons positifs à la goutte épaisse tout comme négatifs.

La goutte épaisse a été utilisée comme test de référence dans la présente étude. Pour une meilleure précision des résultats de la goutte épaisse, la lecture des lames des gouttes épaisses et de frottis minces se faisait deux fois sur le site d'étude. Les lames étaient d'abord lues par un technicien de laboratoire, puis une deuxième fois par un pharmacien biologiste et en fin une dernière lecture par un parasitologue au LBMA. Ces lectures répétées des lames limitent le nombre de cas de faux positifs et de faux négatifs.

Les prélèvements de sang veineux après obtention de l'assentiment des parents ou tuteurs se faisaient dans le but de pouvoir continuer les tests *in vitro* au laboratoire à Bamako. Les papiers confettis ont été faits avec le sang total, séchés à la température ambiante à l'abri des mouches et du soleil suivant les recommandations de l'OMS (36). Ensuite les papiers confettis ont été rangés dans des sachets secs avec des desséchants pour une meilleure conservation avant l'extraction de l'ADN à Bamako. Ces desséchants ont été utilisés dans le but de prévenir le développement des moisissures sur ces papiers filtres (36).

Le kit Qiagen a été utilisé pour l'extraction de l'ADN. Ce kit permet d'avoir de l'ADN purifié, débarrassé de toutes impuretés comme l'hémoglobine pouvant inhiber la PCR. Ce kit a aussi l'avantage de pouvoir extraire des fragments d'ADN plus long même si les fragments d'ADN amplifiés lors de notre étude étaient inférieurs à 800 pb (37).

Notre étude a porté sur une population de 373 enfants, tous âgés de 6 à 59 mois et 181 femmes enceintes qui ont fait l'objet de dépistage du paludisme. Pour les enfants de moins de cinq ans qui ont été pris pour cible de l'étude mère (TES), cette couche comporte le plus grand pourcentage de la population Malienne selon la Pyramide des âges (38). Selon la cinquième enquête démographique et sanitaire du Mali, les enfants de moins de cinq ans représentent 17% de la population malienne (39). Pour les femmes enceintes, elles étaient prises pour constituer les échantillons contrôles pour l'étude de la résistance à la SP. Ceci se justifie par le fait que ces femmes enceintes ne reçoivent pas d'amodiaquine lors de la chimio prophylaxie des CPN comme les enfants le reçoivent lors de la CPS. Ainsi, la présence des mutations chez les enfants et absentes chez les femmes enceintes suggérerait que l'amodiaquine est la molécule responsable.

Sur les 181 échantillons des femmes enceintes analysés, 24,3% étaient positifs à la goutte épaisse pendant que 92,5% des 373 échantillons des enfants étaient positifs. Ce taux élevé de positivité de la goutte épaisse chez les enfants est dû aux échantillons sélectionnés pour mener

cette étude sur la PET-PCR. Dans un souci de confirmer la positivité des échantillons de J0 pour les enfants inclus dans l'étude, la PET-PCR a été réalisée chez tous les enfants qui étaient déclarés positifs par la goutte épaisse. Les échantillons négatifs sont ceux qui ont été collectés au cours des différents jours de suivi. Pour la plupart des échantillons qui ont été collectés après J3, ils étaient négatifs à la goutte épaisse car la clairance avait déjà été faite par ces patients par suite de la prise des médicaments.

Le taux de positivité chez les femmes enceintes était plus faible comparativement à celui des enfants. Ceci pourrait être dû au fait que les critères d'inclusion des femmes enceintes dans l'étude de résistance à la SP ne tenait pas compte de la positivité de la goutte épaisse au préalable. Ces cas positifs à la goutte épaisse (24,3%) étaient utilisés comme contrôles pour les échantillons des enfants dans l'étude de résistance à la SP. Le choix de ces échantillons comme contrôles pour les échantillons des enfants de moins de cinq ans dans l'étude de résistance à la SP s'explique par le fait que les femmes enceintes reçoivent uniquement la SP lors des visites prénatales. Ainsi des modifications génétiques présentes uniquement chez les enfants pourront être attribuées au médicament partenaire (Amodiaquine) de la SP utilisé depuis 2013 lors des campagnes de CPS.

Les résultats de la PET-PCR ont montré qu'un total de 96% des 373 échantillons des enfants étaient positifs. Ce taux de positivité était supérieur à celui de la goutte épaisse qui était de 92,5% des échantillons. Toutefois, le taux de positivité des échantillons des femmes enceintes selon la PET-PCR était égal à celui de la goutte épaisse (24,3%) (Objectif spécifique 1).

Lorsque les échantillons sont combinés (N=552), le taux de positivité selon la goutte épaisse (72,3% ; n=388) était légèrement inférieur à celui de la PET-PCR (73% ; n=403) (Objectif spécifique 1). Ces résultats ont permis d'estimer la sensibilité de la PET-PCR selon la présente étude à 98,96% et la spécificité à 88,41% (Objectif spécifique 2). Cette forte sensibilité de la PET-PCR s'expliquerait par le fait que cette méthode soit basée sur la détection du matériel génétique du parasite par PCR (37). Cette sensibilité est similaire à celle de la technique LAMP décrite par Ndiaye et al. (2018) qui est aussi une technique moléculaire.

Notre étude montre que sur un total de 388 échantillons positifs à la goutte épaisse, seulement 4 échantillons (1,03%) étaient négatifs à la PET-PCR (Objectif spécifique 2). Ceci est un taux de discordance très faible qui suggère bien que les résultats de la goutte épaisse soient lecteur-dépendant, ces derniers sont interposables à ceux de la PET-PCR (Objectif spécifique 1); la PET-PCR peut s'avérer un outil efficace pour le diagnostic du paludisme dans des contextes tels que le nôtre. Bien que les TDR constituent le test le plus utilisé dans le diagnostic du

paludisme au Mali à ce jour, le taux de discordance entre la goutte épaisse et les TDR en termes de positivité sont généralement supérieurs aux 1,03% enregistrés dans notre étude avec la PET-PCR (40).

Aussi, sur un total de 164 échantillons classifiés comme négatifs selon la goutte épaisse, 19 échantillons représentant 11,59% ont été reportés comme positifs à la PET-PCR (Objectif spécifique 1). Ce taux de discordance faisant une spécificité de 88,41% pour la PET-PCR pourrait s'expliquer par les parasitemies très faibles qui peuvent souvent donner des gouttes épaisses négatives dues à la qualité de la goutte épaisse mais aussi de la lecture (en termes de qualification du lecteur et du temps accordé pour une lame). Cette discordance pourrait quelque part s'expliquer aussi par la positivité de la PET-PCR pour des échantillons dont le CT se situe dans la plage 35-39 cycles. Comme pour la PCR en temps réel de façon générale, les échantillons dont la positivité est caractérisée par ces CT très élevés sont généralement très faiblement positifs. Ceci s'observe aussi dans les cas de parasitemies submicroscopiques (<10<sup>4</sup>/uL) qui sont en pratique indétectables à la lecture microscopique (Objectif spécifique 3). Dans une étude menée en Ouganda par Rek et al. (2016) sur la technique LAMP qui est similaire à la PET-PCR, il avait été rapporté que la technique LAMP avait la capacité à détecter les parasitemies submicroscopiques (41).

La valeur prédictive positive de la PET-PCR qui était de 95,28% dans la présente étude montre que plus de 95% des patients diagnostiqués par la PET-PCR avaient le paludisme. Cette valeur prédictive élevée fait de la PET-PCR un bon test pour la prise en charge adéquate des cas de paludisme et ainsi pour la réduction des réservoirs qui contribuent significativement au maintien du paludisme dans les localités où le vecteur sévit. Cette prise en charge ciblée des cas de paludisme augmente les chances de contrôle du paludisme dans un contexte endémique.

La valeur prédictive négative de la PET-PCR était estimée à 97,31% et suggère que le taux de faux négatifs générés par cette technique est très faible. Les faux négatifs constituent des réservoirs potentiels qui constituent un handicap pour l'élimination d'une endémie comme le paludisme. Pour la plupart des tests utilisés dans le diagnostic du paludisme, leurs VPN sont inférieures à celle de la PET-PCR (42).

## **7 CONCLUSION :**

La présente étude qui a porté sur l'évaluation de la PET-PCR dans notre contexte permet de conclure que la PET-PCR a une grande capacité à détecter les cas positifs de paludisme avec une sensibilité de plus de 97% et une spécificité de plus de 88%. Vu le principe de la PET-PCR qui est basé sur la détection du matériel génétique du parasite, les 11% des échantillons positifs qui d'après la goutte épaisse étaient négatives pourraient être des cas de parasitémies submicroscopiques et nécessiteraient l'utilisation d'une autre technique.

## 8 RECOMMANDATIONS

---

- **Aux autorités Maliennes :**

- De financer la recherche et de développer des politiques pouvant intéresser les générations futures dans le but de contribuer plus efficacement dans la lutte contre le paludisme dans notre pays.

- **Aux chercheurs :**

- D'entreprendre d'autres études afin d'évaluer la sensibilité de la PET PCR
- De réfléchir sur de nouvelles méthodes plus simplifiées et plus efficaces pour le diagnostic du paludisme

- **Aux populations des sites d'étude :**

- De renforcer leur coopération pour les activités de recherche.

## 9 REFERENCES

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WORLD MALARIA REPORT 2019. S.I.: WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2019.
2. PNLN. POLITIQUE NATIONALE DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME [Internet]. Ministère de la sante - MALI; [cited 2018 Feb 4]. Available from: <http://mail.cnom.sante.gov.ml/docs/pdf/politiquepnl.pdf>
3. guide de l'oms. Accès universel aux tests diagnostiques du paludisme [Internet]. Bibliothèque de l'OMS; [cited 2108 Mar 23]. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78877/9789242502091\\_fre.pdf;jsessionid=FC516D23A99E05657F1C17B0D565E570?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78877/9789242502091_fre.pdf;jsessionid=FC516D23A99E05657F1C17B0D565E570?sequence=1)
4. Bellgard MI, Moolhuijzen PM, Guerrero FD, Schibeci D, Rodriguez-Valle M, Peterson DG, et al. CattleTickBase: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *International Journal for Parasitology*. 2012 Feb;42(2):161–9.
5. Ebong C, Sserwanga A, Namuganga J, Kapisi J, Mpimbaza A, Gonahasa S, et al. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria and prevalence of molecular markers associated with artemisinin and partner drug resistance in Uganda. *Malaria Journal*. 2021 décembre;20.
6. malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics. A research agenda for malaria eradication: diagnoses and diagnostics. *PLoS Med*. 2011 Jan 25;8(1):e1000396.
7. Cox FEG. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Oct;15(4):595–612.
8. Lix M. Étude descriptive du paludisme d'importation pour une approche diagnostique adaptée à l'enfant en médecine générale. A propos de 282 cas à l'Hôpital Robert Debré (75). 2017 Sep 20;70.
9. Talapko, Škrlec, Alebić, Jukić, Včev. *Malaria: The Past and the Present*. *Microorganisms*. 2019 Jun 21;7(6):179.
10. Lekana-Douki JB, Boundenga L. Genotyping for *Plasmodium* spp.: Diagnosis and Monitoring of Antimalarial Drug Resistance. *Genotyping* [Internet]. 2018 Nov 5 [cited 2020 Feb 16]; Available from: <https://www.intechopen.com/books/genotyping/genotyping-for-plasmodium-spp-diagnosis-and-monitoring-of-antimalarial-drug-resistance>
11. OMS. Rapport 2020 sur le paludisme dans le monde [Internet]. 2020 Nov [cited 2020 Dec 15] p. 19. Report No.: ISBN 978-92-4-001579-1. Available from: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020>
12. PNLN-Mali. Enquête sur les Indicateurs du Paludisme (EIPM) 2015 [Internet]. 07/16 [cited 2019 Sep 6]. Available from: <https://www.dhsprogram.com/pubs/pdf/MIS24/MIS24.pdf>

13. PNLP-Mali. Canevas de synthèse des rapports d'activités 2018 et de programmation 2020 pour les journées d'évaluation des structures centrales. 2018.
14. ANOFEL. Paludisme [Internet]. Université Médicale Virtuelle Francophone. 2015 [cited 2021 Jul 18]. Available from: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/1.html>
15. Paludisme [Internet]. Medecine tropicale; 2020 [cited 2021 Jul 18]. Available from: <http://medecinetropicale.free.fr/cours/paludisme.pdf>
16. Diallo MLP. Etudiants subsahariens à Toulouse et prévention du paludisme d'importation [Internet] [exercice]. Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2018 [cited 2021 Jan 25]. Available from: <http://thesesante.ups-tlse.fr/2140/>
17. Diahara DT, Danaya DK. Note d'information stratégique et politique sur la prévention du paludisme au Mali. :28.
18. Duru V. Etudes des mécanismes cellulaires et moléculaires de Plasmodium falciparum impliqués dans les résistances aux combinaisons à bases de dérivés de l'artémisinine [Internet] [phdthesis]. Université Montpellier; 2016 [cited 2021 Jan 25]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01615022>
19. Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, Zaramella M, Caputo A, Garavelli PL. Climate, environment and transmission of malaria. Infez Med. 2016 Jun 1;24(2):93–104.
20. OMS. Paludisme [Internet]. Organisation mondiale de la santé. 2020 [cited 2019 Sep 6]. Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
21. Baaklini S. Compréhension de la résistance humaine au paludisme : des études génétiques aux approches fonctionnelles [Internet] [These de doctorat]. Aix-Marseille; 2017 [cited 2021 Jan 7]. Available from: <https://www.theses.fr/2017AIXM0384>
22. Sanka M. Compréhension des mécanismes moléculaires et des facteurs génétiques impliqués dans le paludisme sévère : analyse des profils transcriptomiques et processus biologiques caractéristiques du neuropaludisme et méta-analyse sur des gènes associés à la résistance au paludisme [Internet] [These de doctorat]. Aix-Marseille; 2018 [cited 2021 Jan 7]. Available from: <https://www.theses.fr/2018AIXM0615>
23. GHARBI (Myriam). Paludisme des voyageurs : évaluation du rôle sentinelle dans la résistance aux antipaludiques [Internet] [phdthesis]. Université Pierre et Marie Curie; 2013. Available from: <https://documentation.ehesp.fr/memoires/theses/gharbi.pdf>
24. Argy N. Analyse des facteurs d'hôte et facteurs parasitaires dans le paludisme grave d'importation [Internet] [phdthesis]. Université Sorbonne Paris Cité; 2015 [cited 2021 Jan 25]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01535631>
25. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, V J, et al. Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.
26. Barker RH, Suebsaeng L, Rooney W, Wirth DF. Detection of Plasmodium falciparum infection in human patients: a comparison of the DNA probe method to microscopic diagnosis. Am J Trop Med Hyg. 1989 Sep;41(3):266–72.



27. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5636–43.
28. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Oct;61(2):315–20.
29. Kamau E, Tolbert LS, Kortepeter L, Pratt M, Nyakoe N, Muringo L, et al. Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of plasmodium by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 2011 Aug;49(8):2946–53.
30. Rooney AP. Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in Apicomplexans. *Mol Biol Evol*. 2004 Sep;21(9):1704–11.
31. Farrugia C, Cabaret O, Botterel F, Bories C, Foulet F, Costa J-M, et al. Cytochrome b Gene Quantitative PCR for Diagnosing *Plasmodium falciparum* Infection in Travelers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011 Jun;49(6):2191.
32. A New Real-Time PCR for the Detection of *Plasmodium ovale wallikeri* [Internet]. [cited 2022 Feb 4]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048033>
33. Singh N, Shukla MM, Shukla MK, Mehra RK, Sharma S, Bharti PK, et al. Field and laboratory comparative evaluation of rapid malaria diagnostic tests versus traditional and molecular techniques in India. *Malar J*. 2010 Jul 5;9:191.
34. Rapid diagnostic tests as a source of DNA for *Plasmodium* species-specific real-time PCR [Internet]. [cited 2022 Feb 4]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3075219/>
35. Koita OA, Sangaré L, Sango HA, Dao S, Keita N, Maiga M, et al. Effect of Seasonality and Ecological Factors on the Prevalence of the Four Malaria Parasite Species in Northern Mali. *Journal of Tropical Medicine* [Internet]. 2012 [cited 2018 May 30];2012:1–9. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/367160/>
36. Mei JV, Zobel SD, Hall EM, De Jesús VR, Adam BW, Hannon WH. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. *Bioanalysis* [Internet]. 2010 Aug [cited 2018 Jun 4];2(8):1397–403. Available from: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.10.73>
37. Lucchi NW, Karell MA, Journal I, Rogier E, Goldman I, Ljolje D, et al. PET-PCR method for the molecular detection of malaria parasites in a national malaria surveillance study in Haiti, 2011. *Malaria Journal*. 2014 Nov 26;13(1):462.
38. Pyramide des âges -Mali - [Internet]. [cited 2018 Jun 4]. Available from: <http://perspective.usherbrooke.ca/bilan/servlet/BMPagePyramide?codePays=MLI&annee=2015>

39. Cellule de Planification et de Statistiques (CPS/SSDSPF), Institut National de la Statistique (INSTAT), Centre d'Études et d'Information Statistiques (INFO-STAT). Mali Enquête Démographique et de Santé (EDSM-V) 2012-2013 [Internet]. Bamako, Mali; 2014 May [cited 2018 Jun 9] p. 577. Available from: <http://mail.cnom.sante.gov.ml/docs/FR286.pdf>
40. Parr JB, Kieto E, Phanzu F, Mansiangi P, Mwandagalirwa K, Mvuama N, et al. Analysis of false-negative rapid diagnostic tests for symptomatic malaria in the Democratic Republic of the Congo. *Sci Rep.* 2021 Mar 22;11(1):6495.
41. Rek J, Katrak S, Obasi H, Nayebare P, Katureebe A, Kakande E, et al. Characterizing microscopic and submicroscopic malaria parasitaemia at three sites with varied transmission intensity in Uganda. *Malaria Journal.* 2016 Sep 15;15(1):470.
42. Pascal DELAUNAY Christelle ESTRAN-POMARES Pierre MARTY. Diagnostic du paludisme Frottis sanguin Goutte épaisse Tests antigéniques [Internet]. 2008. Available from: <https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/JNI/JNI08/Inf/PALU-%20IDE2008-delaunay.pdf>

# ANNEXES

## 10 ANNEXES

### Protocole d'extraction de l'ADN avec Qiagen

Il faut disposer de : au moins 3 bains-Marie, portoir de tube 1.5ml, portoir de tube 1.5ml pour le bain-Marie, vortexeuses, Éthanol 96-100%, pipettes de [20, 200,1000 $\mu$ L], centrifugeuse de tube 1,5mL Toutes les étapes de centrifugation doivent se faire à la température ambiante (15- 20°C)

Avant de commencer, s'assurer que :

- Mettre le buffer AE ou l'eau distillée à la température ambiante pour l'élution, l'étape 10 ;
- S'assurer que les buffers AW1 et AW2 ont été préparés avec l'alcool comme indiqué dans le guide du kit d'extraction ;
- S'assurer que les buffers AL et ATL ne contiennent pas de précipités, sinon les faire dissoudre en les incubant à 56°C.

### Procédure

1. Dans les tubes de 1.5mL contenant les 3 spots de sang déjà découpés, ajouter 180 $\mu$ L de buffer ATL ;
2. Incuber à 85°C pendant 10 minutes puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube ;
3. Ajouter 20 $\mu$ L de Protéinase K de la solution de stock. Vortexer, puis incuber à 56°C pendant 1 heure. Centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube, A noter que l'ajout de la protéinase K est essentiel ;
4. Ajouter 200 $\mu$ L de buffer AL aux échantillons. Centrifuger bien, et incuber à 70°C pendant 10 minutes puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube. Pour assurer une bonne lyse, il est essentiel d'ajouter le buffer AL et vortexer immédiatement. Il ne faut pas ajouter la protéinase K directement au buffer AL. Après l'ajout du buffer AL, il est possible que des précipités blancs se forment. Dans la plupart des cas, ces précipités disparaissent après l'incubation ;
5. Ajouter 200 $\mu$ L d'éthanol (96-100%) aux échantillons, bien vortexer puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube, Il est essentiel que l'éthanol et les échantillons soient bien vortexés ;
6. Soigneusement transférer la solution de l'étape 5 dans les colonnes. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1 minute. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de

collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat. Bien fermer les colonnes pour éviter la formation des aérosols lors de la centrifugation ;

7. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 $\mu$ L du buffer AW1. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1 minute. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat ;
8. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 $\mu$ L du buffer AW2. Fermer les colonnes puis centrifuger à 14000rpm pendant 3 minutes ;
9. Recommandé : Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat puis centrifuger à haute vitesse pendant 1 minute. Cette étape aide à éliminer le restant de la solution du buffer AW2 restant après l'étape précédente ;

Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes 1.5mL stériles puis jeter les tubes de collection qui peuvent contenir encore du filtrat. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 150 $\mu$ L du buffer AE ou d'eau distillée. Incuber à la température ambiante (15-20°C) pendant 1 minute puis centrifuger à 8000rpm pendant 1 minute. Le volume d'ADN dissout utilisé lors de la PCR ne doit pas excéder les 10%, par exemple pour une PCR de 50 $\mu$ L, il ne faut pas ajouter plus de 5 $\mu$ L d'ADN. L'ADN ainsi obtenu est conservé à -20°C.

## FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom :** TOURE

**Prénom :** Zaynab

**Tel :** (00223) 73 25 10 66

**E-mail :** [zaynabkakashi@gmail.com](mailto:zaynabkakashi@gmail.com)

**Titre de la thèse :** Diagnostic du paludisme : utilisation de la PET-PCR comme outil de diagnostic moléculaire de l'infection palustre

**Nationalité :** Malienne

**Année Universitaire :** 2021-2022

**Ville de soutenance :** Bamako-Mali

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie.

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

### RESUME

Malgré les progrès réalisés dans le cadre de la lutte contre le paludisme, il reste toutefois un véritable problème de santé publique, particulièrement en Afrique sub-saharienne. Ceci concerne aussi le diagnostic du paludisme qui devient de plus en plus un véritable défi du fait de la qualité des microscopistes et aussi des parasitémies submicroscopiques. Nous avons mené une étude dans le cadre du diagnostic du paludisme visant à estimer la sensibilité et la spécificité de la technique de la PET-PCR dans la détection des infections palustres à *Plasmodium falciparum* avec la goutte épaisse comme test de référence. L'étude a porté sur une population de 373 enfants, tous âgés de 6 à 59 mois et 181 femmes enceintes qui ont fait l'objet de dépistage du paludisme dans la localité de Sélingué. Notre étude montre que sur un total de 388 échantillons positifs à la goutte épaisse, seulement 4 échantillons (1,03%) étaient négatifs à la PET-PCR. Aussi, sur un total de 164 échantillons classifiés comme négatifs selon la goutte épaisse, 19 échantillons représentant 11,59% ont été reportés comme positifs à la PET-PCR conférant ainsi à cette méthode une spécificité de 88,41% vs 98,96% pour la sensibilité. La valeur prédictive positive de la PET-PCR était de 95,28% pour une valeur prédictive négative de la PET-PCR était estimée à 97,31%. La PET-PCR peut s'avérer un outil efficace pour le diagnostic du paludisme dans des contextes tels que le nôtre et la détection des parasitémies submicroscopiques pour une étape de préélimination du paludisme.

**Mots clés :** *Plasmodium*, PET-PCR, goutte épaisse

## IDENTIFICATION SHEET

**Last Name:** TOURE

**First Name:** Zaynab

**TEL :** (00223) 73 25 10 66

**E-mail:** [zaynabkakashi@gmail.com](mailto:zaynabkakashi@gmail.com)

**Title:** Malaria diagnosis: use of PET-PCR as a molecular diagnostic tool for malaria infection

**Academic Year:** 2021-2022

**City of defense:** Bamako-Mali

**Place of deposit:** Library of Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology

**Focus area:** Epidemiology, Parasitology and Biology

### ABSTRACT

Despite the progress made in the fight against malaria, it remains a real public health problem, particularly in sub-Saharan Africa. This also concerns the diagnosis of malaria which is becoming more and more a real challenge due to the quality of the microscopists and also the submicroscopic parasitaemia. We conducted a study in the context of malaria diagnosis to estimate the sensitivity and specificity of the PET-PCR technique for the detection of *Plasmodium falciparum* malaria infections with the thick smear as reference test. The study included a population of 373 children, all aged 6 to 59 months, and 181 pregnant women who were screened for malaria in the locality of Sélingué. Our study shows that out of a total of 388 thick smear positive samples, only 4 samples (1.03%) were PET-PCR negative. Also, out of a total of 164 samples classified as thick smear negative, 19 samples representing 11.59% were reported as PET-PCR positive, giving this method a specificity of 88.41% vs 98.96% for sensitivity. The positive predictive value of PET-PCR was 95.28% and the negative predictive value of PET-PCR was estimated at 97.31%. PET-PCR can be an effective tool for malaria diagnosis in contexts such as ours and detection of submicroscopic parasitaemia for a pre-elimination stage of malaria.

**Key words:** *Plasmodium*, PET-PCR, thick smear

## SERMENT DE GALIEN



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens, et de mes condisciples :

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

D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du

désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine,

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

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

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

**Je le jure !**