

## SOMMAIRE

|   | Pages |
|---|-------|
| I. INTRODUCTION .....   | 1     |
| II. RAPPEL SUR LE PALUDISME .....   | 2     |
| II.1. CYCLE DE <i>PLASMODIUM</i> .....  | 2     |
| II.2. PALUDISME A MADAGASCAR .....  | 4     |
| III. MATERIELS ET METHODES .....  | 8     |
| III.1. SITES D'ETUDE ET COLLECTE DE DONNEES .....   | 8     |
| III.2. REACTIFS ET MATERIELS .....  | 9     |
| III.3. TEST DE DIAGNOSTIC RAPIDE (TDR) DU PALUDISME .....                                 | 10    |
| III.4. MICROSCOPIE .....  | 12    |
| III.5. POLYMERASE CHAIN REACTION EN TEMPS REEL OU RT-PCR .....                            | 13    |
| III.6. ASSEMBLAGES DES ESPECES PARASITAIRES .....   | 21    |
| IV. RESULTATS ET INTERPRETATION .....   | 22    |
| IV.1 DESCRIPTIF DES ECHANTILLONS ANALYSES .....   | 22    |
| IV.2 DETECTION DE <i>PLASMODIUM SP</i> PAR TDR, MICROSCOPIE ET PCR en<br>temps réel ..... | 23    |
| IV.3 REPARTITION DES ESPECES PLASMODIALES.....  | 25    |
| IV.4 ASSEMBLAGE DES ESPECES PLASMODIALES PAR PCR .....                                    | 26    |
| V. DISCUSSION.....  | 28    |
| CONCLUSION .....  | 30    |
| BIBLIOGRAPHIES .....  | 31    |
| ANNEXES .....   | 33    |

## LISTE DES TABLEAUX

|   | Pages |
|---|-------|
| Tableau I : Liste des matériels et réactifs pour le diagnostic du paludisme selon le test ..... | 9     |
| Tableau II : Composition du mélange réactionnel ou MasterMix pour la PCR .....                  | 17    |
| Tableau III : Les étapes de la réaction PCR en temps réel .....                                 | 18    |
| Tableau IV: Population d'étude selon la région, le sexe et la tranche d'âge .....               | 22    |
| Tableau V : Détection de <i>Plasmodium sp</i> selon les outils de diagnostic .....              | 23    |
| Tableau VI: Répartition des cas de paludisme selon la région et l'outil de diagnostic .....     | 24    |
| Tableau VII: Les espèces plasmodiales selon la microscopie et la PCR.....                       | 25    |
| Tableau VIII: Assemblage des espèces plasmodiales par PCR .....                                 | 26    |
| Tableau IX: Assemblage des espèces plasmodiales unique ou multiples par PCR .....               | 27    |

## LISTE DES FIGURES

|  | Pages |
|--|-------|
| Figure 1 : Le cycle parasitaire du paludisme .....   | 4     |
| Figure 2 : Répartition des espèces plasmodiales à Madagascar.....  | 5     |
| Figure 3: La Chronologie des étapes importantes dans la politique contre le paludisme, le financement, la planification et la mise en œuvre à Madagascar 2000 – 2014 ..... | 7     |
| Figure 4: Sites d'étude et taille d'échantillon de chaque site.....  | 8     |
| Figure 5 : Principe du test de diagnostic rapide du paludisme.....   | 11    |
| Figure 6 : Résultat du test de diagnostic rapide du paludisme.....   | 12    |
| Figure 7 : Cinétique de la réaction PCR en temps réel et Exemple de courbe de fusion .....   | 14    |
| Figure 8: Procédure d'extraction d'ADN avec l'Instagène matrix .....   | 16    |
| Figure 9 : Les 4 couples d'amorces.....  | 17    |
| Figure 10 : Les amorces spécifiques des 4 espèces.....   | 19    |
| Figure 11:Types de résultat des espèces sur PCR en Temps Réel .....  | 20    |

## ANNEXES

|   | Pages |
|---|-------|
| Annexe 1 : Identification des espèces plasmodiales à la microscopie ..... | 33    |
| Annexe 2 : Les Artefacts (faux parasites) à la microscopie .....          | 34    |

## LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SIGLES

|                    |   |
|--------------------|---|
| AC                 | : Agent communautaire                               |
| ACT                | : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine   |
| AS                 | : Agent de Santé                                    |
| CAID               | : Campagne d'Aspersion Intra-Domiciliaire           |
| CSB                | : Centre de Santé de Base                           |
| DLP                | : Direction de Lutte contre le Paludisme            |
| GE                 | : Goutte épaisse                                    |
| HRP2               | : Histidin Rich Protein 2                           |
| LLINs              | : Long-Lasting Insecticidal Nets                    |
| MID                | : Moustiquaire à Impregnation Durable               |
| MILDA              | : Moustiquaires Imprégnées de Longue Durée d'Action |
| MIS                | : Malaria Indicator Survey                          |
| MSANP              | : Ministère de la Santé Publique de Madagascar      |
| OMS                | : Organisation Mondiale de la Santé                 |
| PCR                | : Polymérase Chaine Reaction                        |
| pLDH               | : <i>Plasmodium</i> lactate deshydrogenase          |
| PMI                | : President Malaria Initiative                      |
| PSN                | : Plans Stratégiques Nationaux                      |
| RBM                | : Roll Back Malaria                                 |
| TDR                | : Test de Diagnostic Rapide du paludisme            |
| TDR-               | : TDR négatif                                       |
| TDR+               | : TDR positif                                       |
| TPI                | : Traitement Preventif Intermittent                 |
| 95% Conf. Interval | : Intervalle de confiance à 95%                     |
| %                  | : Pourcentage                                       |
| <                  | : Inférieur à                                       |
| >                  | : Supérieur à                                       |
| ≤                  | : Inférieur ou égal à                               |
| ≥                  | : Supérieur ou égal à                               |

## I. INTRODUCTION

Avec près de 200 millions de cas recensés annuellement dans le monde, le paludisme représente un des plus grands problèmes de santé actuels. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) le classe parmi les pathologies prioritaires en termes d'intervention, avec la tuberculose et le VIH/SIDA (Committee and Secretariat 2015).

Madagascar représente un lieu de métissage unique au monde, composé d'une mosaïque de sujets d'origine variée (Afrique, Indonésie, Europe, Inde et Chine). L'histoire du paludisme est ainsi étroitement liée à ces mouvements de population. D'après les écrits, en 1500, l'équipage de Diego Diaz fut les premières victimes de la fièvre (Mouchet 2004). Cinq faciès épidémiologiques sont décrits à Madagascar : Sud, plateau, tropicale, équatoriale, hautes montagnes sans paludisme. Le climat et le relief influencent considérablement le rythme et l'intensité de la transmission du paludisme (Carlton *et al.*, 2008).

Les données des dernières enquêtes ont montré une prédominance à plus de 90% du *Plasmodium falciparum* (MIS, 2016). Cependant, la répartition des espèces plasmodiales est dépendante de l'outil de diagnostic utilisé. Ces 2 dernières décennies, le développement de la PCR (Polymerase Chain Reaction) pour le diagnostic du paludisme a permis la détection des infections infra-microscopiques, de faible parasitémie ( $< 50$  parasites/ $\mu$ l). Alors que ces infections jouent un rôle important dans le contrôle et l'élimination du paludisme, elles servent de réservoir de la transmission. Dans le cas d'une infection mixte, l'autre espèce à plus faible parasitémie peut être masquée par l'espèce prédominante comme *P. falciparum*. Ainsi, sur le plan épidémiologique, le diagnostic basé sur la microscopie sous-estimerait l'importance des infections mixtes et donc des espèces minoritaires comme *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. Ainsi, notre objectif est d'évaluer l'importance épidémiologique des infections infra-microscopiques et des infections mixtes, dans une zone de forte transmission et modérée du paludisme, en utilisant la technique de PCR basée sur l'amplification du gène cytochrome b.

Dans la première partie du manuscrit, nous allons présenter les généralités sur le paludisme. Les différentes techniques utilisées pour atteindre l'objectif seront décrites dans la deuxième partie. Enfin, dans la troisième partie, nous présenterons les résultats obtenus, leurs interprétations et la discussion. Une conclusion suivie de perspectives terminera ce manuscrit.

Rapport-Gratuit.com

Partie I :

Rappels sur le paludisme

## II. RAPPEL SUR LE PALUDISME

### II.1. CYCLE DE PLASMODIUM

Le *Plasmodium* est un parasite intracellulaire ayant un cycle biologique complexe (figure 1), caractérisé par une multiplication asexuée dans l'organisme humain et une reproduction sexuée chez l'anophèle femelle (Menard 2005).

Chez l'homme, le cycle est lui-même divisé en 2 phases :

- la phase hépatique ou pré-érythrocytaire (= exo-érythrocytaire) correspondant à la phase d'incubation, cliniquement asymptomatique.
- la phase sanguine ou érythrocytaire correspondant à la phase clinique de la maladie.

#### ❖ Cycle chez l'anophèle :

Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes. Ceux-ci migrent vers l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Les gamètes femelles sont fécondés par un processus d'exflagellation du gamète mâle et il en résulte un zygote appelé ookinète.

Ce dernier s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste. Suite à une division méiotique suivie par plusieurs mitoses, les sporozoïtes sont générés. Ils se libèrent après éclatement de l'oocyste pour se concentrer au niveau des glandes salivaires en attendant la prochaine piqûre infectante. Ce cycle se déroule en 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et les espèces en cause.

#### ❖ Cycle chez l'homme :

- Schizogonie pré-érythrocytaire :

Lors de son repas sanguin, l'anophèle femelle inocule des sporozoïtes qui restent au maximum pendant une trentaine de minutes dans la peau, la lymphe et le sang. Plusieurs d'entre ces sporozoïtes seront détruits par les macrophages mais certains parviendront à gagner les hépatocytes. Ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires ou « corps bleus » (formes multinucléées) qui, après 7 à 15 jours de maturation, éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes dans le sang (10.000 à 30.000 mérozoïtes en fonction des espèces). La cellule hépatique ne pouvant être infectée que par des sporozoïtes, la schizogonie hépatique est unique dans le cycle.



Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, certains sporozoïtes intra-hépatiques restent quiescents (hypnozoïtes) et sont responsables d'une schizogonie hépatique retardée entraînant plusieurs mois après la piqûre du moustique la libération dans le sang de mérozoïtes. Ceci explique les reviviscences tardives observées avec ces deux espèces. Les hypnozoïtes n'existent pas dans l'infection à *P. falciparum* (pas de rechute) et ils n'ont pas été mis en évidence non plus dans l'infection à *P. malariae*, malgré l'existence de rechutes tardives, ni-semble-t-il pour *P. knowlesi*.

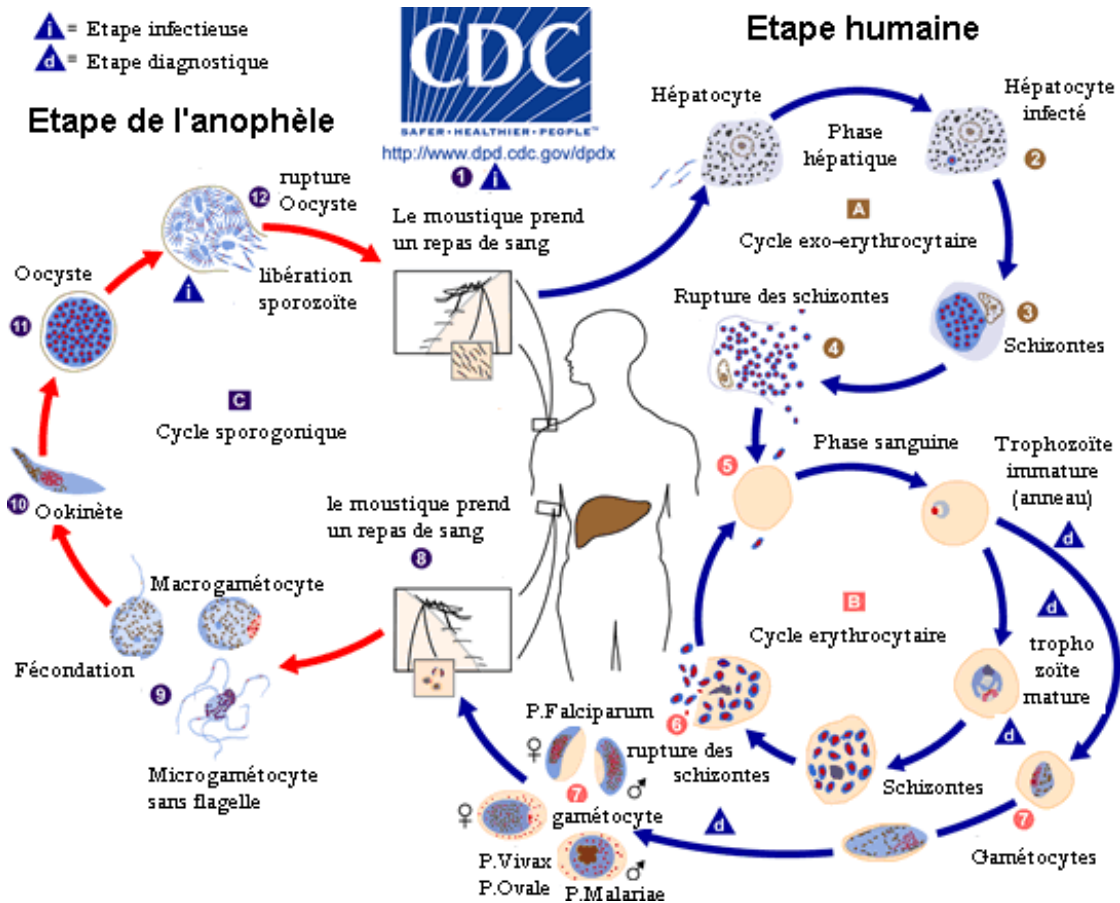
Le cycle pré-érythrocytaire dure en moyenne 6 jours pour *P. falciparum*, 8 jours pour *P. vivax*, 8-9 jours pour *P. knowlesi*, 9 jours pour *P. ovale* et 13 jours pour *P. malariae*.

- Schizogonie érythrocytaire

Au cours de cette phase, les mérozoïtes envahissent les érythrocytes et se transforment en trophozoïtes puis en schizontes érythrocytaires. Ceux-ci sont détruits afin de libérer plusieurs mérozoïtes qui vont aller parasiter de nouvelles hématies et perpétuer ainsi le cycle érythrocytaire.

Tous les schizontes érythrocytaires arrivent à maturation au même moment, entraînant la destruction d'un grand nombre de globules rouges de manière périodique, soit toutes les 24 heures (pour *P. knowlesi*), 48 heures (fièvre tierce de *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. ovale*) ou toutes les 72 heures (fièvre quarte de *P. malariae*). En pratique, on observe que la fièvre tierce due à *P. falciparum* est rarement synchrone.

Après plusieurs cycles schizogoniques, certains trophozoïtes formeront les gamétocytes, première étape d'une phase sexuée chez l'hématozoaire. Les gamétocytes continueront leur développement s'ils sont absorbés par un anophèle femelle lors de son repas sanguin pour continuer le cycle (Good and Doolan 2010).



**Figure 1 :** Le cycle parasitaire du paludisme

**Source:** CDC. Malaria 2016 [updated May 3, 2016. Available from:

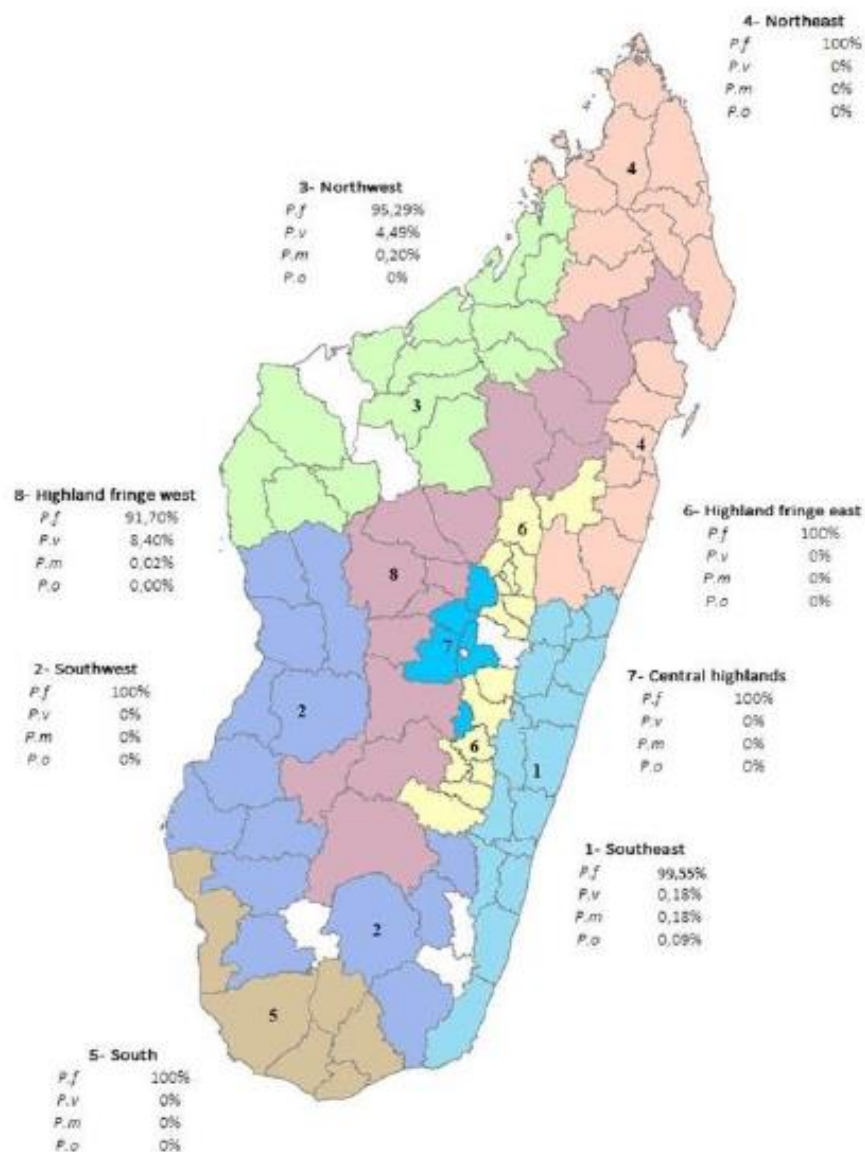
<https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>. Consulter le 4 Septembre 2017(CDC 2016).

## **II.2. PALUDISME A MADAGASCAR**

A Madagascar, le paludisme figure parmi les maladies infectieuses endémiques. Quatre des cinq espèces plasmodiales responsables de l'infection humaine sont présentes à Madagascar : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (Lepers *et al.*, 1988). En 2016, selon les données de la Direction de la Lutte contre le Paludisme (DLP), le paludisme représentait la cinquième cause de mortalité hospitalière et la quatrième cause de morbidité pour les enfants de moins de cinq ans et il demeure l'endémie majeure dans les groupes les plus vulnérables : les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. Les données des formations sanitaires révèlent que la part de la morbidité due au paludisme confirmé était de 6,5 % en 2016.

## II.2.1. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE

*Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus répandue à Madagascar et représente plus de 90% des cas de paludisme (NMCP 2016). Puis il s'en suit *P. vivax*, qui est présent surtout dans la partie Nord-Ouest et le faciès marge Ouest des Hauts Plateaux (figure 2).



**Figure 2 :** Répartition des espèces plasmodiales à Madagascar

**Source :** Plan Stratégique National de lutte contre le paludisme 2018 – 2022 : « Elimination progressive du paludisme à Madagascar »(NMCP).

## II.2.2. LUTTE CONTRE LE PALUDISME A MADAGASCAR

Le paludisme est une maladie parasitaire qui affecte l'homme et sévit à Madagascar depuis 1800 (Madagascar 2015).

En 1998, Madagascar a réintroduit le programme national de lutte contre le paludisme et a élaboré une politique nationale de lutte contre cette affection (Howes *et al.*, 2016).

### - Prévention

Des mesures préventives ont été réalisées à Madagascar telle la distribution des Moustiquaires Impregnées de Longue Durée d'Action (MILDA) réalisée depuis 2007, les Campagnes d'Aspersion Intra-Domiciliaire (CAID) réalisées dans les Hautes Terres en 2009. A partir de 2014, des CAID ont été aussi effectuées dans les zones endémiques prédisposées des districts de la Côte Est.

### - Prise en charge

Avant l'année 2005, tous les cas présumés et confirmés ont bénéficié d'un traitement par la chloroquine mais à partir de cette année un nouveau médicament antipaludique a été introduit à Madagascar. Il s'agit d'une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (ACT).

### - Le plan stratégique national

A partir de 2008, après une révision du Plan stratégique national (PSN) précédent, deux PSN ont été élaborés : le PSN 2008-2012 et le PSN 2013-2017.

#### ❖ Etude des indicateurs du paludisme

En 2011, pour la première fois, une étude des indicateurs du paludisme (MIS : Malaria Indicator Survey) a été réalisée.

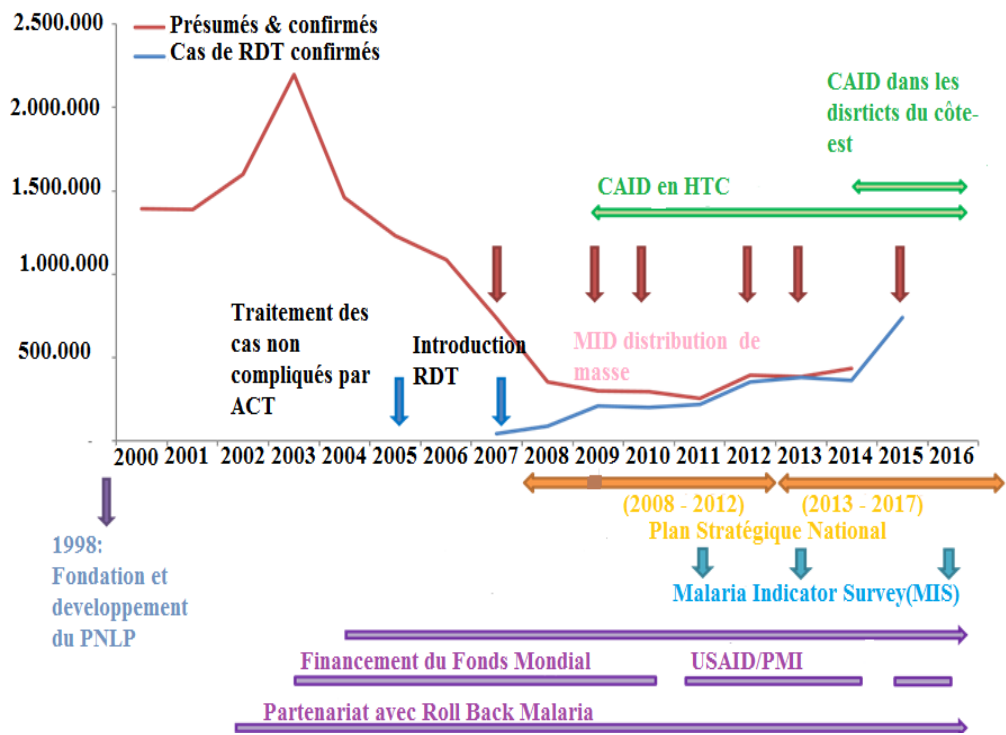
#### ❖ Les partenaires financiers

En 2002, Madagascar adhère au mouvement du Roll Back Malaria.

Madagascar a été exclu de la communauté internationale jusqu'en Mai 2014.

Des bailleurs de fonds interviennent dans le financement de la lutte contre le paludisme à Madagascar mais les plus importants sont le Fonds mondial de lutte contre le sida la tuberculose et le paludisme (FMSTP), et l'Initiative Présidentielle Américaine contre le Paludisme (PMI).

Depuis 2003, le FMSTP contribue dans le financement de la lutte tandis que le PMI en 2004 (Figure 1). (Howes *et al.*, 2016)



**Figure 3:** La Chronologie des étapes importantes dans la politique contre le paludisme, le financement, la planification et la mise en œuvre à Madagascar 2000 – 2014

**Source :** Howes RE, Mioramalala SA, Ramiranirina B, Franchard T, Rakotorahalahy AJ, Bisanzio D, *et al.* Contemporary epidemiological overview of malaria in Madagascar : operational utility of reported routine case data for malaria control planning. *Malar J.* 2016 ;15(1) :502.(Howes *et al.*, 2016).

Partie II :

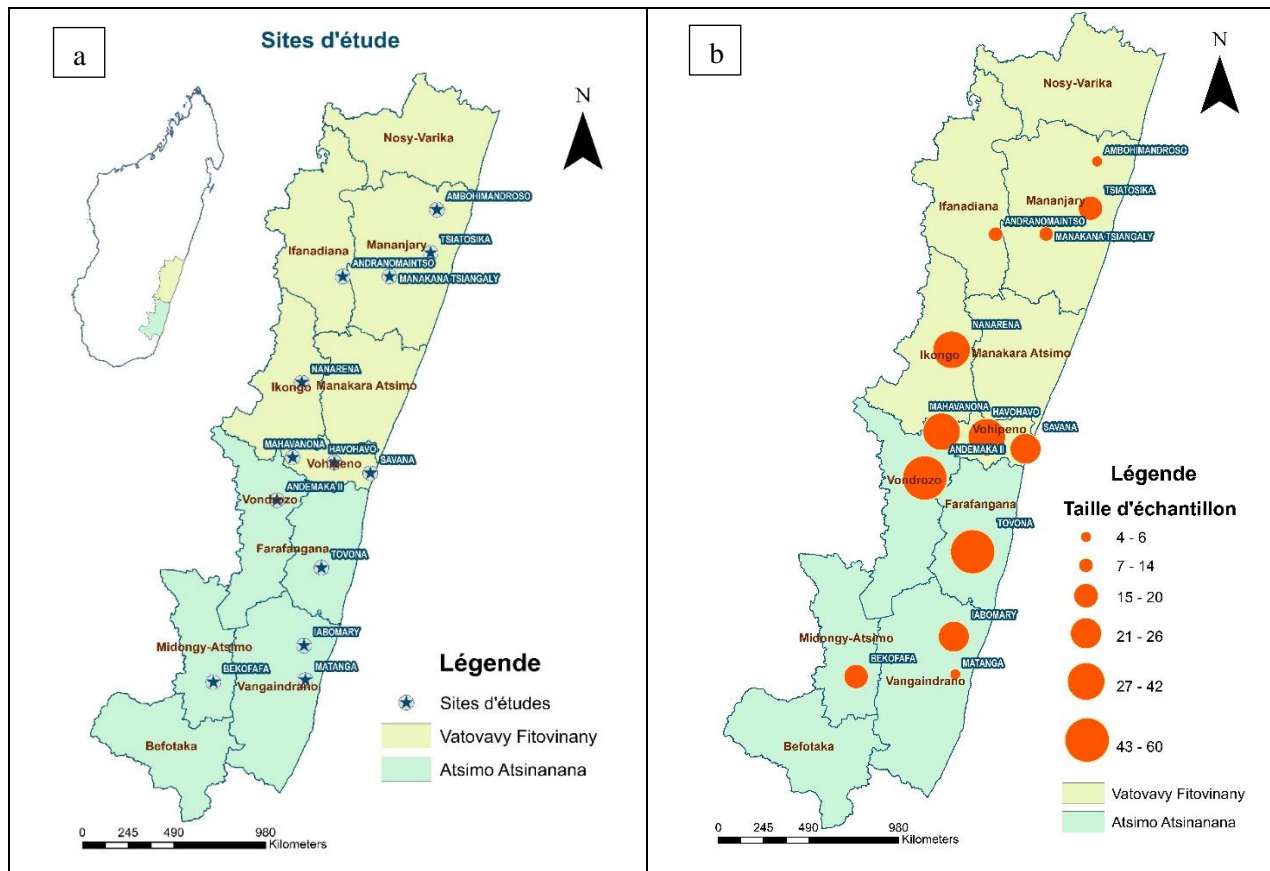
Matériels et méthodes

### III. MATERIELS ET METHODES

#### III.1. SITES D'ETUDE ET COLLECTE DE DONNEES

Cette étude a été réalisée au niveau de 2 régions endémiques du paludisme à Madagascar, la région Vatovavy Fitovinany et la région Atsimo Atsinanana.

La collecte des données a été réalisée en Novembre et Décembre 2016, en parallèle avec une étude concernant la Filariose Lymphatique et la Schistosomiase dans ces régions. Les communes tirées au sort pour ces études sont représentées dans la figure 4a et la taille d'échantillon de chaque village représenté dans la figure 4b. Les coordonnées géographiques de chaque village (GPS) ont été enregistrées pendant l'étude. Pour chaque individu, le TDR du paludisme a été réalisé. Des frottis sanguins goutte épaisse (GE) et frottis mince (FM) ont été confectionnés pour le diagnostic microscopique et des gouttes de sang ont été collectées sur papier buvard pour le diagnostic par PCR.



**Figure 4:** Sites d'étude et taille d'échantillon de chaque site

### III.2. REACTIFS ET MATERIELS

Les matériels et réactifs utilisés lors des manipulations sont listés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau I** : Liste des matériels et réactifs pour le diagnostic du paludisme selon le test

| Manipulation                           | Matériels   | Réactifs   |
|--|---|--|
| Test de diagnostic rapide du paludisme | SD Bioline Malaria Ag P.f/<br>Pan   | Kit avec le TDR  |
| Microscopie                            | Lame porte-objet<br>Lamelle<br>Cuve à coloration<br>Microscope  | Solution de GIEMSA<br>Méthanol<br>Eau tamponnée<br>Alcool 70°<br>Huile à immersion   |
| Extraction                             | Centrifugeuse<br>Tube centrifugeuse<br>Agitateur de plaque<br>Vortex<br>Balance de précision<br>Bain marie à 100°C<br>Incubateur  | Instagène matrix<br>5 x HOT FIREPol®<br>EvaGreen® qPCR<br>Mix Plus (Rox)<br>Saponine 0,5%<br>Amorce ou Primers<br>EDS<br>QIAamp 96 DNA Blood kit<br>(12)<br>Ethanol<br>Cuve Sterile<br>Combitips 10ul<br>P200 aerosoltips<br>(bloodtransfer)<br>Gants                                      |
| PCR                                    | Portoirs microtubes<br>Microtubes PCR 2µl<br>Microtubes stériles 1,5 ml<br>Microcentrifugeuse Galaxi<br>Mini VWR<br>Tube centrifuge<br>Plaque centrifuge<br>Real Time thermocycler Bio<br>Rad CFX96<br>Balance précision<br>Seau à glace<br>Plateau PCR | Eau biologie moléculaire<br>PCR buffer<br>TBE buffer 1x<br>Bromure d'Ethidium (BEt)<br>5x EvagreenqPCR mix<br>PCR primers :<br>- RTPCR screening 2_F<br>- RTPCR screening<br>2_R<br>Poudre d'agarose<br>Bleu de charge<br>DNA marker<br>Papier film<br>Chargement du tampon de<br>colorant |



### **III.3. TEST DE DIAGNOSTIC RAPIDE (TDR) DU PALUDISME**

#### **III.3.1. PRINCIPE**

Les TDR du paludisme sont basés sur la capture et la détection d'un antigène parasitaire présent dans le sang du patient à l'aide d'anticorps monoclonaux. La détection est faite en sandwich. Un premier anticorps dit « de capture » fixe l'antigène cible et un anticorps secondaire (phase mobile), marqué le plus souvent à l'or colloïdal, sert à la révélation. En présence d'antigène plasmodial, le complexe anticorps de révélation-antigène cible migre le long de la membrane nitrocellulose. Le complexe se lie ensuite à l'anticorps de capture immobilisé sur la membrane, et l'antigène se trouve ainsi pris en sandwich entre les deux anticorps. Une réaction positive se traduit par une coloration visible à l'œil nu. L'excès d'anticorps de révélation continue à migrer pour être finalement immobilisé par un anti anticorps fixé sur la ligne contrôle (figure 6). La validité des TDR dépend de l'apparition d'une bande visible sur cette ligne. Le résultat est disponible entre 15 à 20 minutes et facilement interprétable. L'utilisation ne nécessite pas de formation spécifique, ni d'équipement particulier.

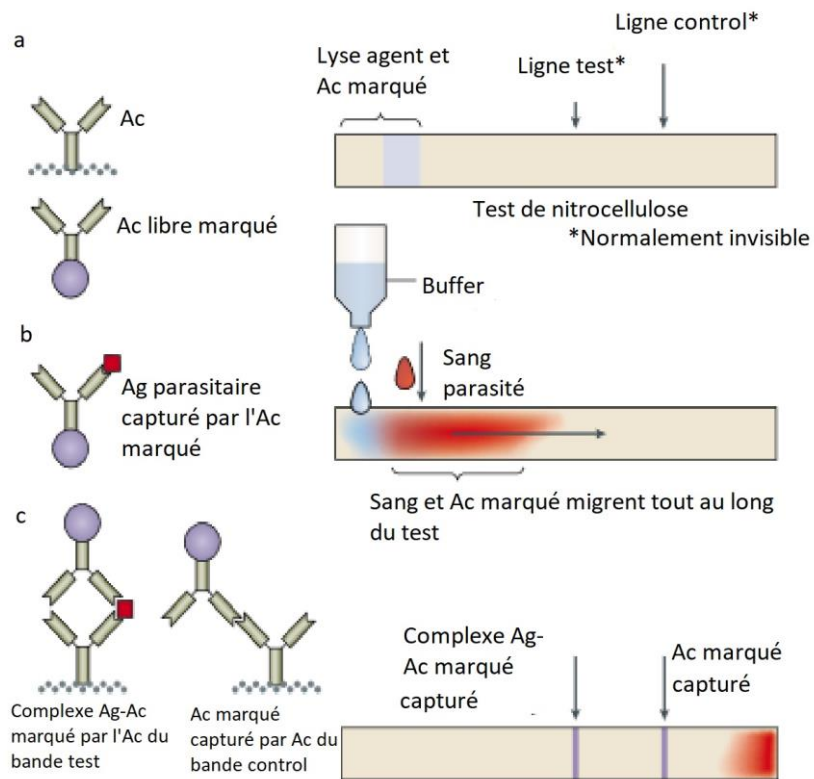
Les tests les plus utilisés visent la détection l'antigène Pf HRP2 (Histidine Rich Protein 2) spécifique de *P. falciparum* et des antigènes pLDH (Lactate Deshydrogenase) ou aldolase retrouvées chez *P. falciparum* mais également chez les autres espèces (détection pan spécifique).

### III.3.2. MODE OPERATOIRE

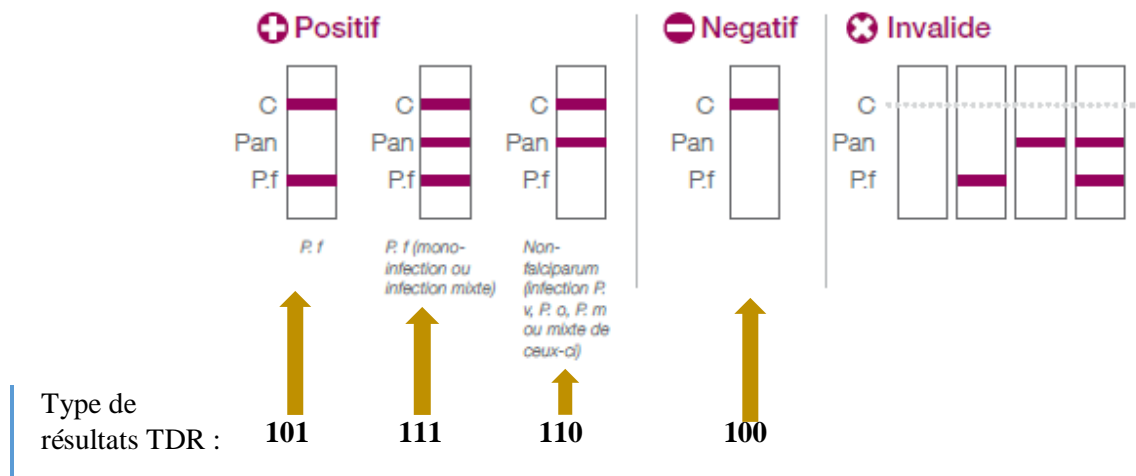
Pendant notre étude, le test SD BIOLINE Malaria Ag P.f/Pan a été utilisé permettant la détection de l'antigène HRP2 spécifique de *Plasmodium falciparum* et de pLDH commune aux espèces plasmodiales

Selon la recommandation du fabricant, 5 µl de sang capillaire sont déposés sur le puits. Trois gouttes de la solution tampon sont ensuite déposées dans le puits 2 permettant la lyse des hématies et la migration des lysats. Le résultat doit être interprété dans un délai de 20 minutes. Pour les tests valides (figure 6) :

- le test est positif avec présence de *P. falciparum* lorsque la bande pf HRP2 est visible seule ou avec la bande pLDH ;
- le test est positif avec la présence d'espèces plasmodiales non *P. falciparum* lorsque la bande de détection de pLDH est visible sans la bande de détection de pf HRP2 ;
- le test est négatif lorsque seule la bande de contrôle est visible. Le TDR invalide (sans bande de contrôle) est systématiquement refait avec un autre TDR.



**Figure 5 :** Principe du test de diagnostic rapide du paludisme



**Figure 6 :** Résultat du test de diagnostic rapide du paludisme

### III.4. MICROSCOPIE

#### III.4.1. PRINCIPE

L'examen microscopique a pour objectif de déterminer l'espèce plasmodiale responsable de l'infection et d'estimer la charge parasitaire en utilisant le colorant de GIEMSA.

#### III.4.2. MODE OPERATOIRE

Le sang a été recueilli à partir d'un prélèvement capillaire par piqûre au bout du doigt. Une goutte épaisse (GE) et frottis mince (FM) ont été préparés sur une même lame porte-objet. Le FM a été fixé après immersion dans le méthanol pendant 3 secondes. Les frottis ont été séchés à l'air libre en position verticale (GE en haut et FM vers le bas), puis placés dans une cuve pour une coloration avec une solution de GIEMSA à 10% pendant 10 minutes et rincés à l'eau propre. Pendant l'observation microscopique, magnitude 100, le diagnostic du paludisme (présence ou absence de *Plasmodium*) et la quantification de la parasitémie ont été effectués à partir de la goutte épaisse, et le frottis mince a permis l'identification de l'espèce. La parasitémie ou la gamétoctémie, exprimée en parasites par microlitre de sang, est évaluée sur goutte épaisse en comptant 500 leucocytes en estimant que la densité leucocytaire est de l'ordre de 8000/ $\mu$ l de sang. La recherche de *Plasmodium* est déclarée négative si aucun parasite n'est trouvé pour 2500 leucocytes comptés soit 100 champs microscopiques examinés.

### **III.5. POLYMERASE CHAIN REACTION EN TEMPS REEL OU RT-PCR**

#### **III.5.1. PRINCIPE**

Les étapes de la PCR en temps réel sont identiques à celles d'une PCR classique : une phase de dénaturation initiale de l'ADN double brin puis une phase d'amplification décomposée en une phase de dénaturation, une phase d'hybridation des amorces sur l'ADN cible et une phase d'élongation pour chaque cycle. Lors d'une réaction PCR classique, l'analyse des produits d'amplification est effectuée à la fin de l'amplification par une migration sur un gel d'agarose alors que l'analyse des produits d'amplification d'une réaction PCR en temps réel est réalisée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle par la détermination du signal fluorescent émis. Aussi, après la phase d'amplification est ajoutée une phase de " melting " qui permet de déterminer la température de fusion spécifique des produits de PCR amplifiés.

Le principe de la réaction repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification. Aussi, en utilisant l'EvaGreen (agent intercalant sur les ADN double brins), le procédé ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur les amorces. EvaGreen, libre en solution exhibe peu de fluorescence. Lors de l'étape d'hybridation et élongation, l'EvaGreen se lie à l'ADN double brin. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité d'EvaGreen fixé à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. Suivie en temps réel, la fluorescence émise augmente proportionnellement au nombre de produits amplifiés formés et l'émission de fluorescence décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. L'émission de fluorescence est enregistrée et mesurée à la fin de chaque étape d'élongation par un système de lecture intégré à l'appareil (Bustin 2000). Cependant, la fluorescence, contrairement à celle d'une sonde spécifique du fragment à amplifier, peut provenir d'un produit non spécifique (Higuchi *et al.*, 1992). Pour vérifier la spécificité des amplicons, on étudie la courbe de fusion. (Figure 7). En effet, chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion spécifique, définie comme la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme double brin, l'autre moitié sous forme simple brin. La courbe de fusion est obtenue en traçant la dérivée première de la fluorescence de la température et la température de fusion d'un ADN double brin correspond à un pic sur cette courbe (Couplier).

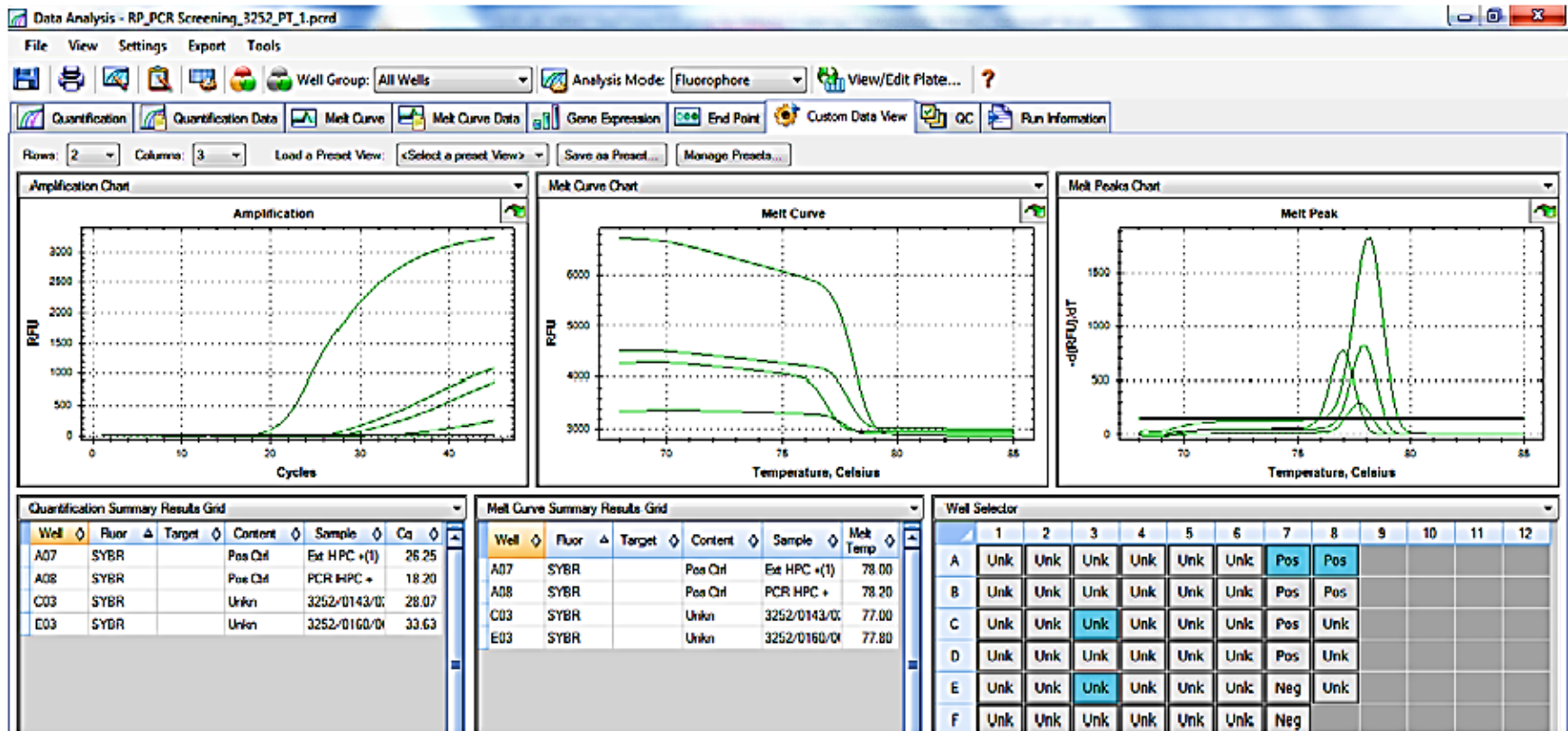
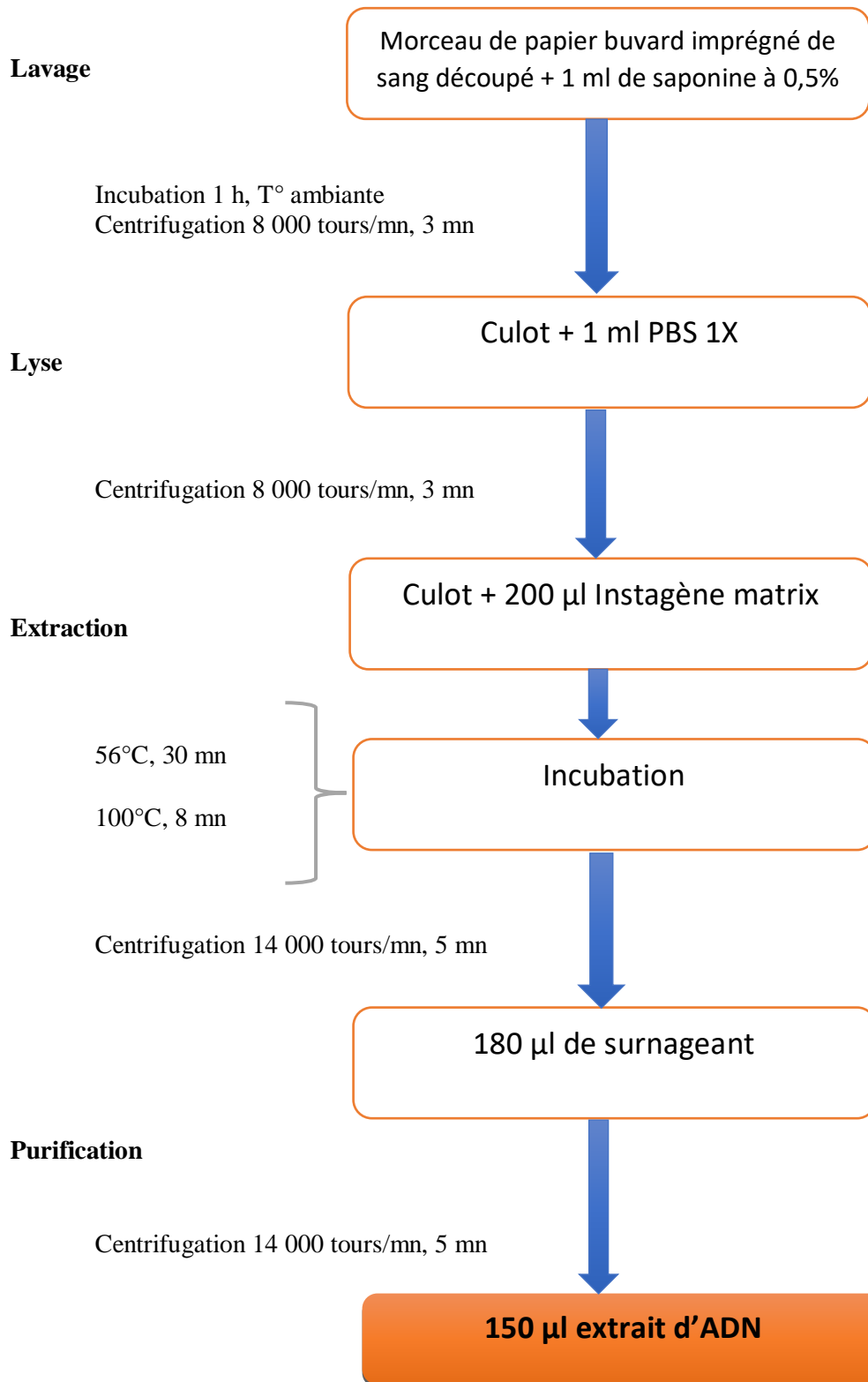


Figure 7 : Cinétique de la réaction PCR en temps réel et Exemple de courbe de fusion

### III.5.2. MODE OPERATOIRE

#### *a. Extraction d'ADN parasitaire avec l'Instagène matrix©*

C'est une méthode d'extraction par une résine chélatrice d'ADN. Les morceaux de papier buvard Whatmann imprégnés de sang ont été découpés et incubés dans 1 ml de saponine à 0,5% pour la lyse des cellules pendant 1 heure à la température ambiante et en agitant après 15 minutes et à la fin d'incubation. Après une centrifugation à 8000 tours par minute pendant 3 minutes, le surnageant est rejeté et 1 ml de tampon PBS a été ajouté au culot. Le culot récupéré, après une deuxième centrifugation à 8000 tours par minute pendant 3 minutes, a ensuite été mélangé avec 200 µl de résine " Instagène matrix© ". Le mélange a été incubé pendant 30 minutes à 56°C en agitant vigoureusement au milieu et à la fin de l'incubation. Le mélange a été transféré dans un bain-marie à 100°C pendant 8 minutes, puis après une centrifugation à 14000 tours par minute pendant 3 minutes, environ 180 µl de surnageant ont été prélevés et transférés dans un nouveau tube stérile. Tout en évitant de remettre en suspension le culot blanchâtre inhibiteur de la PCR, le surnageant obtenu a été centrifugé de nouveau à 14 000 tours par minute pendant 3 minutes. Les 150 µl du surnageant obtenu après cette dernière centrifugation, contenant les extraits d'ADN plasmodiaux ont été transférés dans un nouveau tube et ont été conservés à - 20°C jusqu'à leur utilisation.



**Figure 8:** Procédure d'extraction d'ADN avec l'Instagène matrix

**b. Détection présence/absence de Plasmodium sp**

La présence ou l'absence de *Plasmodium* a été réalisée par la PCR en temps réel en amplifiant le gène cytochrome b avec l'appareil Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sidney, Australie) en utilisant un agent intercalant, "EvaGreen" comme marqueur de fluorescence et un couple d'amorce permettant de détecter les quatre espèces simultanément (RTPCR screening 2\_F et RTPCR screening 2\_R).

| Target gene                 | Assay       | Primer name       | Sequence (5'-3')                   | Hybridation T°C | Melt cuve °C  | Size of PCR products |
|-----------------------------|-------------|-------------------|------------------------------------|-----------------|---------------|----------------------|
| Plasmodium CYTB all species | Primary PCR | RTPCRScreening2_F | TGGAGTGGATGGTGTITTAGA              | 58              | N/A           | 400 bp               |
|                             |             | RTPCRScreening3_R | ACCOCTAAAGGATTTGTGCTACC            |                 |               |                      |
| Pf_CYTb                     | HRM         | Pf_RTPCR_F        | ATGGATATCTGGATTGATTTTATTATGA       | 62              | 78.80 – 79.60 | 154 bp               |
|                             |             | Pf_RTPCR_R        | TCCTCCACATATCCAAATTACTGC           |                 |               |                      |
| Pv_CYTb/Pv_CYTb             | HRM         | Pv_RTPCR_F        | TGCTACAGGTGCATCTCTGTATTG           | 62              | 75.20-75.80   | 165 bp               |
|                             |             | Pv_RTPCR_R        | ATTGTCCCAAGGTAACG                  |                 |               |                      |
| Pm_CYTb                     | HRM         | Pm_RTPCR_F        | ACAGGTGCATCAGTGTATTTTTC            | 62              | 75.80-76.20   | 213 bp               |
|                             |             | Pm_RTPCR_R        | TGCTGGAATTGAAGATAATAAATTAGTAATAACT |                 |               |                      |
| Po_CYTb                     | HRM         | Po_RTPCR_F        | GTTATATGGTTATGTGGAGGATATACTGT      | 62              | 73.40-73.60   | 82 bp                |
|                             |             | Po_RTPCR_R        | CGAATGGAAGAATAAAATGTAGTACG         |                 |               |                      |

**Figure 9 :** Les 4 couples d'amorces

Pour éviter toute contamination, la règle du sens unique a été respectée pendant les manipulations.

La réaction PCR a été réalisée dans des microtubes de 0.1 ml, dans un volume réactionnel de 25 µl (tableau IV). La concentration de l'ADN des échantillons à tester a été ramenée à 1ng/µl. La programmation de l'appareil pendant l'amplification est décrite dans le tableau V.

**Tableau II :** Composition du mélange réactionnel ou MasterMix pour la PCR

| Réactifs                             | Volume par tube |
|--------------------------------------|-----------------|
| Eau distillée (EDS)                  | 4,5 µL          |
| 5x EvaGreen qPCR mastermix           | 12,5 µL         |
| Amorce sens RTPCR screening 2_F      | 1,5 µL          |
| Amorce anti-sens RTPCR screening 2_R | 1,5 µL          |
| ADN 1ng/µL                           | 5 µL            |



Chaque expérience comporte :

- Un blanc (EDS) ;
- Un ADN humain négatif servant de témoin négatif ;
- 4 ADN pour contrôles positifs représentant les quatre espèces plasmodiales : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* ;
- Les échantillons à tester de concentration 1ng/μl ;

**Tableau III** : Les étapes de la réaction PCR en temps réel

|                | Température en °C | Durée en seconde |
|----------------|-------------------|------------------|
| Pré-incubation |                   |                  |
| Hold 1         | 50                | 120              |
| Hold 2         | 95                | 600              |
| Amplification  |                   |                  |
| Dénaturation   | 95                | 30               |
| Hybridation    | 56                | 30               |
| Elongation     | 65                | 60               |
| Melting        |                   |                  |
| Etape 1        | 65                | 60               |
| Etape 2        | 0,5               | 5                |
| Etape 3        | 90                | 0                |
| Cooling        | 35                | 600              |

*c. Identification des espèces plasmodiales*

Pour l'identification des espèces plasmodiales, quatre couples d'amorces spécifiques de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* ont été utilisés (Figure 10). Ainsi, les produits d'amplification des échantillons positifs à l'étape de la détection ont été re-amplifiés.

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Pf (cytb)      TTAGCAAGTCGATATACACCAGATGTTTCATATGCATATTATAGTATACAACACATTTTTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTGTTTTAGATACATGCACG
Pv SaI-1 mitochondrion TTAGCAAGTCGTTATACTCCAGAAATATCTTATGCATATTATAGTATACAACATTTTTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTGTTTTAGATATATGCATG
Pm cytB      TTAGCTAGTCGTTATACTCCAGATATATCATATGCATATTATAGTATTCAACACATTTTTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTGTTTTAGATATATGCATG
Po (cox3cox1 and cytb) TTAGCAAGTCGTTATACTCCTGAAATATCTTACGCATATTATAGTATACAACATATATTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTGTTTTAGATATATGCATG
Pk (Cytb)     TTAGCTAGTCGTTATACTCCAGAAATTTCTTACGCATACACAGTATACAACATTTTTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTGTTTTAGATATATGCATG

          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Pf (cytb)      CAACAGGTGCTTCTYTTGTATTTTTATTAACATATYTTCATATTTTAAGAGGATTAATAACTYATATATGTATTTACCATTATCATGGATATYTGGAAT
Pv SaI-1 mitochondrion CTACAGGTGCATCTCTTGTAATTTATTAACCTATTTACACATTTTAAGAGGATTAATAATTATTCATATTTATATTTACCATTATCATGGATATCAGGATT
Pm cytB      CAACAGGTGCATCACTTGATTTTTTCTAACCTATTTACATATTTTAAGAGGATTAATAATTATTCCTTATTTATATTTACCATTATCATGGATATCAGGATT
Po (cox3cox1 and cytb) CAACTGGTGCATCATTAGTATTTTTCTAACCTATCTACATATTTTAAGAGGATTAATAATTATTCCTTATTTATATTTACCTTTATCATGGATATCAGGTTT
Pk (Cytb)     CTACAGGTGCATCTCTTGTAATTTTTATTAACCTATTTACATATTTTAAGAGGATTAATAATTATTCATATTTATATCTACCATTATCATGGATATCAGGATT

          210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Pf (cytb)      GATTTTATTTATGATATTTATTGTAACCTGCTTTCGTTGGTTATGTCTTACCATGGGGTCAAATGAGTTATTGGGGTGCAACTGTAATTAACCTGTTA
Pv SaI-1 mitochondrion AATCATATTTGCATTATTTATAGTTACAGCTTTTATAGGTTACGTTTTACCTTGGGGACAAATGAGTTATTGGGGTGCAACTGTTATAACTAATTTATTA
Pm cytB      AATTATATTTGCATTATTTATAGTTACAGCTTTTATAGGTTATGTTTTACCATGGGGACAAATGAGTTATTGGGGTGCAACTGTTATTAACCTAATTTATTA
Po (cox3cox1 and cytb) AATTATATTTGCATTATTTATAGTTAACCTGCAATTTATTGGTTATGTATTACCTTGGGGACAAATGAGCTATTGGGGTGCAACTGTTATTAACCTAATTTATTA
Pk (Cytb)     AATTATATTTGCATTATTTATAGTTACAGCTTTTATAGGTTATGTTTTACCTTGGGGACAAATGAGTTATTGGGGTGCAACTGTCATAACTAATTTATTA

          310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Pf (cytb)      TCCTYTTATCCAGTAGCAGTAATTTGGATATGTGGAGGATATACTGTGAGTGATCCTACAATAARACGATTTTTTGTACTACATTTTATCTTACCATTTA
Pv SaI-1 mitochondrion TCTTCAATTCAGTATTAGTAATTTGGTTATGTGGAGGATATACTGTAAGTGATCCTACAATAAAAAGATTTTTTGTATTACATTTTATACTTCCTTTTG
Pm cytB      TCTTCAATTCAGCACTTGTTATTTGGTTATGTGGAGGATATACTGTAAGTGATCCAACATAAAAAAGATTTTTTGTATTACATTTTATACTTCCATTTG
Po (cox3cox1 and cytb) TCTTCAATTCAGCCTTAGTTATATGGTTATGTGGAGGATATACTGTTAGTGATCCTACTATTA AAAAGATTTTTTGTACTACATTTTATCTTCCATTCG
Pk (Cytb)     TCTTCAATTCAGTATTAGTCATTTGGTTATGTGGAGGATATACAGTAAGTGATCCAACAATAAAAAGATTTTTTGTATTACATTTTATACTTCCTTTTG

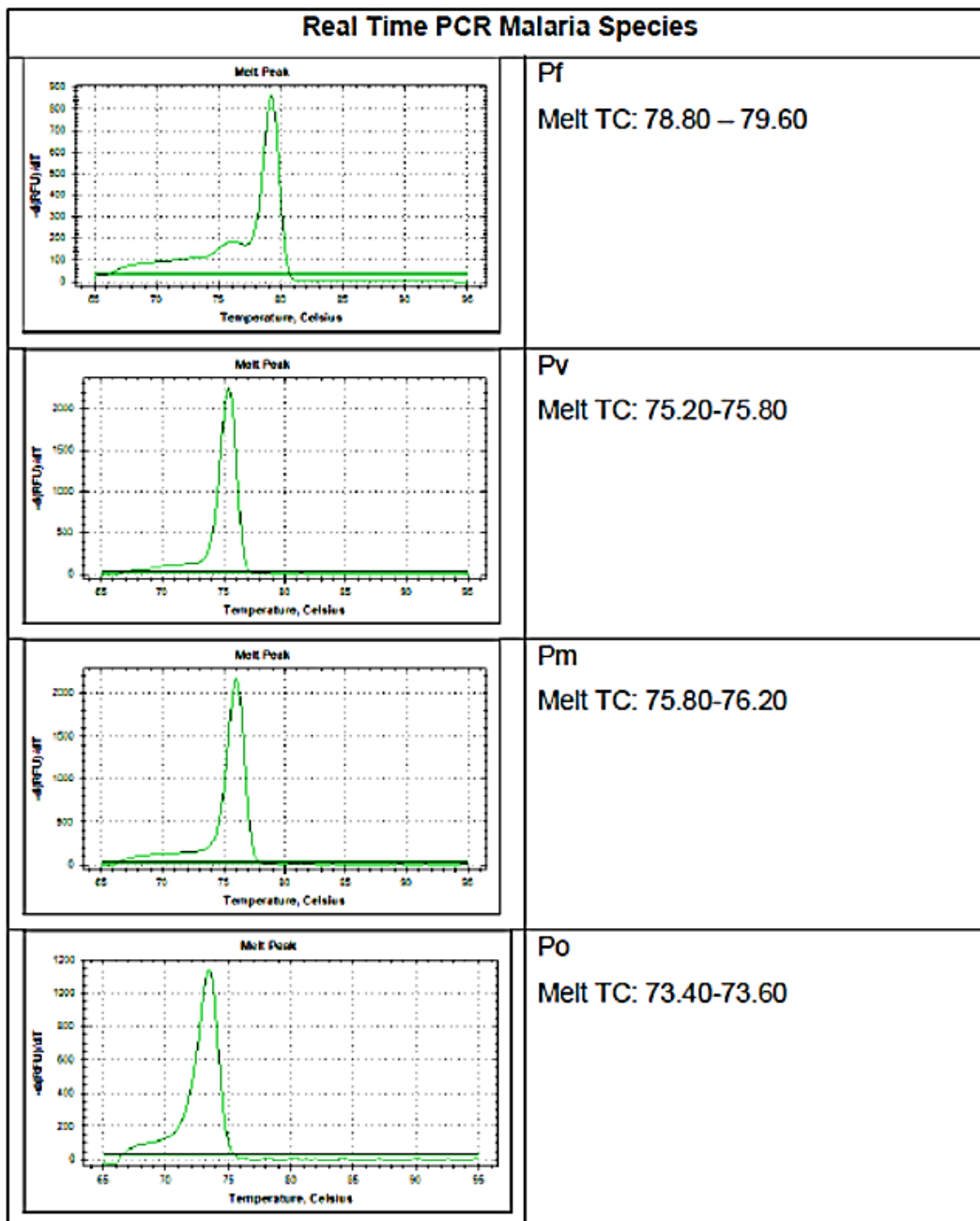
          410     420     430
Pf (cytb)      TTGGATTATGTATTGYATTTATACATATATTTTTYTT
Pv SaI-1 mitochondrion TAGCATTATGTATTGTATTTATACATATATTTCTTTT
Pm cytB      TTGCATTATGTATTGTATTTATACATATATTTCTTTT
Po (cox3cox1 and cytb) TTGCATTATGTATTGTATTTATACATATATTTCTTCT
Pk (Cytb)     TAGCATTATGTATTGTATTTATACATATATTTCTTTT

Y= C or T

```

Figure 10 : Les amorces spécifiques des 4 espèces

La courbe de fusion qui est la dérivée première de la courbe de fluorescence a été analysée. Ainsi, différentes valeurs de température de fusion ( $T_m$ ) spécifique de l'ADN correspondant aux pics sur la courbe de fusion, ont pu être déterminées. Ces pics sur la courbe de fusion représentent chaque espèce plasmodiale (Figure 11).



**Figure 11:**Types de résultat des espèces sur PCR en Temps Réel

### **III.6. ASSEMBLAGES DES ESPECES PARASITAIRES**

La comparaison des assemblages de parasite a pour but de déterminer si la distribution des espèces plasmodiales n'étaient pas dues au hasard dans la population d'étude. Nous avons analysé les assemblages de parasite en utilisant le model Multiple-Kind Lottery (Janovy *et al.*, 1992, Mehlotra *et al.*, 2000, Mehlotra *et al.*, 2002).

Partie III :

Résultats et discussions

#### IV. RESULTATS ET INTERPRETATION

##### IV.1 DESCRIPTIF DES ECHANTILLONS ANALYSES

Au total, 346 individus ont été inclus dans cette étude. L'âge médian a été de 35 ans [extrema : 5 – 80 ans] et une sex-ratio de 0,92.

**Tableau IV:** Population d'étude selon la région, le sexe et la tranche d'âge

| Variables       | Régions    |            | Effectifs  |
|-----------------|------------|------------|------------|
|                 | ATSIMO     | VATOVAVY   |            |
|                 | ATSINANANA | FITOVINANY |            |
| <b>Féminin</b>  | <b>84</b>  | <b>96</b>  | <b>180</b> |
| ≤ 5 ans         | 2          | 0          | 2          |
| 6 – 13 ans      | 8          | 0          | 8          |
| 14 ans et plus  | 74         | 96         | 170        |
| <b>Masculin</b> | <b>76</b>  | <b>90</b>  | <b>166</b> |
| ≤ 5 ans         | 2          | 0          | 2          |
| 5 – 13 ans      | 10         | 2          | 12         |
| 14 ans et plus  | 64         | 88         | 152        |
| <b>Total</b>    | <b>160</b> | <b>186</b> | <b>346</b> |

## **IV.2 DETECTION DE *PLASMODIUM* SP PAR TDR, MICROSCOPIE ET PCR en temps réel**

### **IV.2.1. DIAGNOSTIC DU PALUDISME**

Sur les 346 échantillons analysés, 22 (6,4%) cas de paludisme ont été confirmés par TDR, 16 (4,6%) par la microscopie et 104 (30,1%) par la PCR en temps réel. En raison de la plus grande sensibilité de la PCR en temps réel, le taux d'infection plasmodiale était significativement plus élevé (6,5 fois plus) avec cette méthode qu'avec la microscopie (Tableau VIII).

**Tableau V** : Détection de *Plasmodium* sp selon les outils de diagnostic

| Outils diagnostiques | Négatif     | Positif     | Rapport | IC à 95%     |
|----------------------|-------------|-------------|---------|--------------|
| TDR                  | 324 (93,64) | 22 (6,36)   | 1       |              |
| Microscopie          | 330 (95,38) | 16 (4,62)   | 0,71    | 0,37 – 1,38  |
| PCR en temps réel    | 242 (69,94) | 104 (30,06) | 6,33    | 3,88 – 10,32 |

### **IV.2.2. DISTRIBUTION DES CAS DE PALUDISME SELON L'OUTIL DE DIAGNOSTIC**

La répartition des cas de paludisme selon l'outil de diagnostic est représentée dans le tableau VI. Selon les districts, le taux d'infection plasmodiale varie de 10% à 50%.

**Tableau VI:** Répartition des cas de paludisme selon la région et l’outil de diagnostic

| Régions<br>Districts | TDR        |           | Microscopie |           | PCR        |            | Total<br>N |
|----------------------|------------|-----------|-------------|-----------|------------|------------|------------|
|                      | Négatif    | Positif   | Négative    | Positive  | Négatif    | Positif    |            |
| <b>ATSIMO</b>        | <b>148</b> | <b>12</b> | <b>151</b>  | <b>9</b>  | <b>102</b> | <b>58</b>  | <b>160</b> |
| <b>ATSINANANA</b>    |            |           |             |           |            |            |            |
| Farafangana          | 55         | 5         | 54          | 6         | 33         | 27         | <b>60</b>  |
| Midongy atsimo       | 20         | 0         | 20          | 0         | 18         | 2          | <b>20</b>  |
| Vangaindrano         | 29         | 1         | 29          | 1         | 26         | 4          | <b>30</b>  |
| Vondrozo             | 44         | 6         | 48          | 2         | 25         | 25         | <b>50</b>  |
| <b>VATOVAVY</b>      | <b>176</b> | <b>10</b> | <b>179</b>  | <b>7</b>  | <b>140</b> | <b>46</b>  | <b>186</b> |
| <b>FITOVINANY</b>    |            |           |             |           |            |            |            |
| Ifanadiana           | 10         | 0         | 10          | 0         | 6          | 4          | <b>10</b>  |
| Ikongo               | 33         | 1         | 33          | 1         | 24         | 10         | <b>34</b>  |
| Mananjary            | 34         | 2         | 35          | 1         | 29         | 7          | <b>36</b>  |
| Vohipeno             | 99         | 7         | 101         | 5         | 81         | 25         | <b>106</b> |
| <b>Total</b>         | <b>324</b> | <b>22</b> | <b>330</b>  | <b>16</b> | <b>242</b> | <b>104</b> | <b>346</b> |



### IV.3 REPARTITION DES ESPECES PLASMODIALES

D'après le tableau ci-dessous, le diagnostic microscopique a confirmé uniquement une infection à *P. falciparum* alors que sur les 104 cas positifs détectés par la PCR en temps réel, 63,5% sont dus à *P. falciparum* en mono-infection. L'infection à *P. malariae* seule ou en co-infection avec *P. falciparum* et *P. ovale* était de 27%.

**Tableau VII:** Les espèces plasmodiales selon la microscopie et la PCR

| Espèces   | n Positif/ N Total | %    |
|---|--------------------|------|
| Microscopie   |                    |      |
| <i>P. falciparum</i>  | 16/16              | 100  |
| PCR   |                    |      |
| <i>P. falciparum</i>  | 66/104             | 63,5 |
| <i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i>                   | 14/104             | 13,5 |
| <i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i> + <i>P. ovale</i> | 3/104              | 2,9  |
| <i>P. falciparum</i> + <i>P. ovale</i>                      | 2/104              | 1,9  |
| <i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i> + <i>P. ovale</i>    | 1/104              | 1,0  |
| <i>P. malariae</i>  | 10/104             | 9,6  |
| <i>P. malariae</i> + <i>P. ovale</i>                        | 1/104              | 1    |
| <i>P. ovale</i>   | 4/104              | 3,8  |
| <i>P. vivax</i>   | 3/104              | 2,9  |

#### IV.4 ASSEMBLAGE DES ESPECES PLASMODIALES PAR PCR

**Tableau VIII:** Assemblage des espèces plasmodiales par PCR

| Espèces   |                 | Observée   | Attendue      | Chi <sup>2</sup> | p           |
|---|-----------------|------------|---------------|------------------|-------------|
| <i>P. falciparum</i>  | <i>Pf</i>       | 66         | 75,64         | 1,23             | 0,995       |
| <i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i>                   | <i>Pf/Pm</i>    | 14         | 6,66          | 8,09             | 0,2         |
| <i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i> + <i>P. ovale</i> | <i>Pf/Pm/Po</i> | 3          | 0,22          | 35,37            | 0,0001*     |
| <i>P. falciparum</i> + <i>P. ovale</i>                      | <i>Pf/Po</i>    | 2          | 2,48          | 0,09             | 0,999       |
| <i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i> + <i>P. ovale</i>    | <i>Pf/Pv/Po</i> | 1          | 0,03          | 32,45            | 0,0001*     |
| <i>P. malariae</i>  | <i>Pm</i>       | 10         | 20,14         | 5,10             | 0,8         |
| <i>P. malariae</i> + <i>P. ovale</i>                        | <i>Pm/Po</i>    | 1          | 0,66          | 0,17             | 0,999       |
| <i>P. ovale</i>   | <i>Po</i>       | 4          | 7,51          | 1,64             | 0,995       |
| <i>P. vivax</i>   | <i>Pv</i>       | 3          | 2,67          | 0,04             | 1           |
| Non Infectée  | Non             | 242        | 228,69        | 0,77             | 0,999       |
|   | Infectée        |            |               |                  |             |
| <b>Total</b>  |                 | <b>346</b> | <b>344,70</b> | <b>0,00</b>      | <b>1,00</b> |

DDL=9

Le résultat dans le tableau VIII nous montre que la combinaison *Pf/Pm/Po* (0,87% versus 0,06%, p<00001) et *Pf/Pv/Po* (0,29% versus 0,01%, p<00001) a été beaucoup plus élevée par rapport à la valeur attendue.

**Tableau IX:** Assemblage des espèces plasmodiales unique ou multiples par PCR

| <b>Espèces</b>    | <b>Observée</b> | <b>Attendue</b> | <b>Chi<sup>2</sup></b> | <b>p</b>    |
|-------------------|-----------------|-----------------|------------------------|-------------|
| Espèces unique    | 83              | 105,96          | 4,98                   | <0,05*      |
| Espèces multiples | 21              | 10,05           | 11,92                  | <0,01*      |
| Non Infectée      | 242             | 228,69          | 0,77                   | 0,999       |
| <b>Total</b>      | <b>346</b>      | <b>344,70</b>   | <b>0,00</b>            | <b>1,00</b> |

Chi<sup>2</sup>=7,026

ddl=2

p<0,05\*

Il existe une différence significative entre les valeurs observées et les valeurs attendues quand les espèces ont été groupées en infection à espèces unique ou multiples.

Les espèces uniques ont été observées à une valeur beaucoup moindre que par rapport à la valeur attendue (23,99% versus 30,74%, p<0,05) ; et les espèces multiples ont été beaucoup plus élevées par rapport à la valeur attendue (6,07% versus 2,92%, p<0,05).

## V. DISCUSSION

- Acquisition de technique et validation de la technique PCR Cyt B en routine à la DLP

La détection des espèces plasmodiales à très faible parasitémie est difficile et nécessite une approche moléculaire. Par rapport au typage PCR bien établi du gène ARNr 18S pour la détection des espèces, la méthode utilisant l'amplification d'un fragment du gène du cytochrome b est plus fiable, sensible (nombre de copies multiples du gène du cytochrome b), spécifique et rapide et donne la possibilité d'amplifier un grand nombre d'espèces (White 2008).

- Présence d'autres espèces détectées par la PCR en temps réel

En comparant les résultats de la PCR en temps réel avec ceux de la microscopie, une différence significative a été observée sur la détection des infections mixtes (Tableau VIII). En effet, 6,1% des infections palustres confirmées dans cette enquête comprenaient plus d'une espèce plasmodiale. Ce qui conforte l'importance de l'utilisation d'un test de diagnostic sensible basé sur la PCR en temps réel dans les études sur les interactions mixtes des espèces de *Plasmodium*. Comme dans les études antérieures menées en PNG (Mehlotra *et al.*, 2000, Mehlotra *et al.*, 2002, Kasehagen *et al.*, 2006) et ailleurs (Mayxay *et al.*, 2004, Snounou and White 2004, Kasehagen *et al.*, 2006), les co-infections ont été observées plus fréquemment par des tests basés sur le diagnostic par la PCR que par la microscopie.(Kasehagen *et al.*, 2006). Ces associations d'infection pourrait être attribuée à l'immunité croisée qui détermine la sensibilité aux infections (Gilles and Hendrickse 1960) ou à l'exposition à des piqûres infectieuses de vecteurs communs qui transmettent les espèces plasmodiales.

La co-infection par *P. falciparum* et *P. malariae* était plus fréquente que prévu. Le diagnostic microscopique de *P. malariae* est souvent difficile même pour un microscopiste expérimenté en raison de la faible parasitémie et sa morphologie presque identique à *P. falciparum* en l'absence de la bande équatoriale caractéristique de cette espèce. Notre étude permettait de mettre en évidence que la prévalence réelle de *P. malariae* est sous-estimée en utilisant la microscopie et/ou la TDR.

- Dynamique de la transmission plasmodiale

Chez les groupes plus âgés, il est possible que l'immunité acquise favorise le maintien des infections asymptomatiques infra-microscopiques alors que ces porteurs asymptomatiques représentent un défi important pour les programmes de lutte contre le paludisme. Ces personnes ne chercheront pas de traitement et même si elles étaient incluses dans une campagne de dépistage et de traitement de masse, leur parasitémie est non détectable par la microscopie ou aux tests de diagnostic rapide. De plus, les densités infra-microscopiques de gamétocytes de *P. falciparum* peuvent contribuer de manière importante aux infections des moustiques et donc au maintien de la transmission (White 2008). Afin d'avoir un impact majeur sur la transmission du paludisme, les campagnes de dépistage de masse et de traitement peuvent nécessiter l'utilisation de techniques de dépistage moléculaire capables d'identifier la parasitémie infra-microscopique.

Nos résultats ont montré l'hétérogénéité de la distribution des infections à *Plasmodium* sp dans les ces zones endémiques. Egalement, la fréquence des co-infections observées est élevée par rapport aux valeurs attendues, suggérant une modification de la distribution des espèces autres que *P. falciparum* sur le versant Sud-Est de Madagascar.

Les résultats de l'étude ne pourront pas être généralisés pour tout Madagascar. Toutefois, comme l'étude a été menée au niveau des districts endémiques, les résultats constitueront une base de suggestions permettant d'améliorer les approches actuelles et futures, en matière de lutte contre le paludisme à Madagascar.

## CONCLUSION

Le diagnostic et le traitement des cas de paludisme, combinés à la lutte anti-vectorielle, sont la pierre angulaire de la stratégie de lutte contre le paludisme à Madagascar. Un taux élevé d'infection infra-microscopique et la présence des autres espèces plasmodiales telles que *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* ont été sous-estimés dans la région Vatovavy Fitovinany et Atsimo Atsinanana, due à la faible sensibilité des techniques utilisées. De telles infections peuvent entraver les efforts d'élimination, car elles sont asymptomatiques et ne seraient pas détectées efficacement par des méthodes de diagnostic conventionnelles, c'est-à-dire par microscopie ou tests de diagnostic rapide.

Dans le contexte de l'élimination du paludisme, (i) il est nécessaire d'adopter une technique plus sensible en utilisant les outils moléculaires comme la PCR en temps réel pour le diagnostic du paludisme et (ii) d'actualiser la cartographie des espèces plasmodiales circulantes afin d'apprécier la dynamique de la transmission du paludisme à Madagascar.

## BIBLIOGRAPHIES






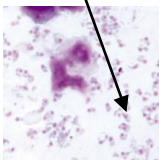




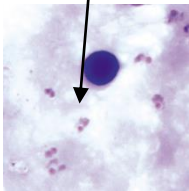






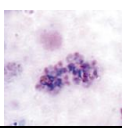




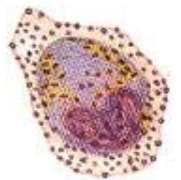
1. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25(2):169-93.
2. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, *et al.* Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature.* 2008;455(7214):757-63.
3. CDC. Malaria 2016 [updated May 3, 2016. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>. Consulté le 4 Septembre 2017.
4. Committee WHOMPA, Secretariat. Malaria Policy Advisory Committee to the WHO: conclusions and recommendations of seventh biannual meeting (March 2015). *Malar J.* 2015;14:295.
5. Couplier F. La PCR en temps réel quantitative [Available from: [www.transcriptome.ens.fr](http://www.transcriptome.ens.fr) enregistré le 04 avril 2008.
6. Gilles HM, Hendrickse RG. Possible aetiological role of *Plasmodium malariae* in "nephrotic syndrome" in Nigerian children. *Lancet.* 1960;1(7128):806-7.
7. Good MF, Doolan DL. Malaria vaccine design: immunological considerations. *Immunity.* 2010;33(4):555-66.
8. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992;10(4):413-7.
9. Howes RE, Mioramalala SA, Ramiranirina B, Franchard T, Rakotorahalahy AJ, Bisanzio D, . Contemporary epidemiological overview of malaria in Madagascar: operational utility of reported routine case data for malaria control planning. *Malar J.* 2016;15(1):502.
10. Janovy J, Jr., Clopton RE, Percival TJ. The roles of ecological and evolutionary influences in providing structure to parasite species assemblages. *J Parasitol.* 1992;78(4):630-40.

11. Kasehagen LJ, Mueller I, McNamara DT, Bockarie MJ, Kiniboro B, Rare L. Changing patterns of *Plasmodium* blood-stage infections in the Wosera region of Papua New Guinea monitored by light microscopy and high throughput PCR diagnosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(4):588-96.
12. Lepers JP, Ramanamirija JA, Andriamangotiana-Rason MD, Coulanges P. [Recent findings on the epidemiology of malaria and on the distribution of plasmodial species in Madagascar in 1987]. *Arch Inst Pasteur Madagascar.* 1988;54(1):151-67.
13. Madagascar. National strategic plan for malaria control in Madagascar 2013–2017: consolidating the gains with a view to elimination of malaria from Madagascar, 2015–2017 revision. In: NMCP, editor. 2015.
14. Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton PN, White NJ. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol.* 2004;20(5):233-40.
15. Mehlotra RK, Kasehagen LJ, Baisor M, Lorry K, Kazura JW, Bockarie MJ. Malaria infections are randomly distributed in diverse holoendemic areas of Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67(6):555-62.
16. Mehlotra RK, Lorry K, Kastens W, Miller SM, Alpers MP, Bockarie M. Random distribution of mixed species malaria infections in Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(2):225-31.
17. Menard R. Medicine: knockout malaria vaccine? *Nature.* 2005;433(7022):113-4.
18. NMCP Database. 2016.
19. NMCP. Madagascar National Strategic Plan 2018 - 2022.
20. Snounou G, White NJ. The co-existence of *Plasmodium*: sidelights from falciparum and vivax malaria in Thailand. *Trends Parasitol.* 2004;20(7):333-9.
21. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):172-3.



## ANNEXES

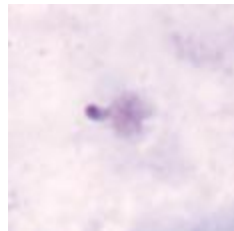
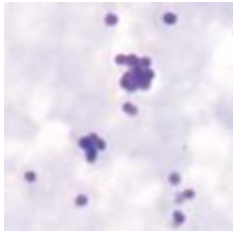
### Annexe 1 : Identification des espèces plasmodiales à la microscopie

|   |  |   |  |  |
|---|--|---|--|--|
| Diamètre et affinités tinctoriales de l'hématie parasitée | <br>normal normochrome  | <br>Grande hématie chromatophile | <br>Hématie contractée normochrome   |                         |
| TROPHOZOÏTE OU SCHIZONTE JEUNE                            | <br>                                 | <br>Grains de Schüffner          |    | <br>Grains de Schüffner |
| SCHIZONTE AGÉ   | <br><br>Des capillaires viscéraux | <br>Pigment fin                 | <br>Bande équatoriale, pigment gros   | <br>Pigment assez gros |
| CORPS EN ROSACE   |   |                                | <br> | <br>10 mérozoïtes     |
| GAMETOCYTE  |   |                                |    |                       |
| Espèces   | <i>P. falciparum</i>   | <i>P. vivax</i>   | <i>P. malariae</i>   | <i>P. ovale</i>  |

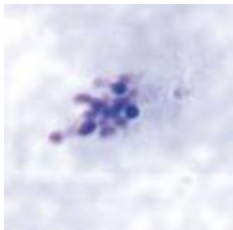
## **Annexe 2 : Les Artefacts (faux parasites) à la microscopie**

Ressemblent à des parasites par leur forme, mais n'en ont pas les deux caractéristiques obligatoires : le noyau rouge et le cytoplasme bleu

\* Faux trophozoites: ni noyau rouge, ni cytoplasme bleu!



\* Faux schizonte: pas de pigment!



\* Faux gamétocyte: pas de pigment!



**Author:** MIORAMALALA Sedera Aurélien

**Title of the thesis:** «Detection of plasmodial infection in Atsimo Atsinanana and Vatovavy Fitovinany, Madagascar »

### **ABSTRACT**

Conventional diagnostic such as microscopy and RDT may lead to missed asymptomatic sub-microscopic parasitemia, a potential reservoir for infection. Similarly, mixed infections and interactions between *Plasmodium* species may be missed. The objective is to investigate the epidemiological importance of sub-microscopic and mixed infections in Atsimo Atsinanana and Vatovavy Fitovinany, Madagascar, region of high transmission of malaria. A cross-sectional study was done between November and December 2016. Malaria diagnosis was assessed by RDT, microscopy and PCR real time of the cytochrome b genes. The positivity rate of malaria by RDT, microscopy and PCR was respectively 6%, 5% and 30%. Real time PCR detected 6 higher much more species more than microscopy. *Plasmodium falciparum* is the most common species. The mixed species infection is 6% by PCR real time. Single species were observed much lower than the expected value (24 % versus 31%,  $p < 0.05$ ); and the multiple species were much higher compared to the expected value (6% versus 3%,  $p < 0.05$ ). In the context of malaria elimination, it is important to adopt a sensitive tool for malaria diagnostic such as real-time PCR to appreciate the dynamic of malaria transmission in Madagascar.

**Keywords:** High endemicity area, Madagascar, Malaria, Mixed infection, PCR real time

**Advisor :** Professeur Arsene C. RATSIMBASOA

Professeur Ranjàna RANDRIANARIVO

**Nom et Prénoms :** MIORAMALALA Sedera Aurélien

**Titre de la mémoire :** « Detection de l'infection plasmodiale dans la région d'Atsimo Atsinanana et Vatovavy Fitovinany, Madagascar »

### **RESUME**

Les méthodes de diagnostic conventionnelles comme la microscopie et le TDR sous-estiment les cas asymptomatiques du paludisme, réservoir potentiel de l'infection. Également, les infections mixtes et les interactions entre les diverses espèces plasmodiales peuvent être sous-diagnostiquées. L'objectif est d'évaluer l'importance épidémiologique de ces infections infra-microscopiques et d'infections mixtes à Atsimo Atsinanana et Vatovavy Fitovinany, Madagascar, zones de forte transmission du paludisme. Une enquête transversale a été effectuée entre novembre et décembre 2016. Le diagnostic biologique du paludisme a été évalué par TDR, microscopie et PCR en temps réel amplifiant le gène cytochrome b. Le taux de positivité du paludisme par TDR, microscopie et PCR était respectivement de 6%, 5% et 30%. La PCR en temps réel a permis de détecter 6 fois plus d'infections plasmodiales comparée à la microscopie. *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus prédominante. Le taux d'infection mixte est de 6% par PCR en temps réel. La valeur observée de mono-infection a été plus basse que la valeur attendue (24% contre 31%,  $p < 0,05$ ); tandis que le taux d'infection mixte était beaucoup plus élevé par rapport à la valeur attendue (6% contre 3%,  $p < 0,05$ ). Dans le contexte de l'élimination du paludisme, nos résultats ont montré l'importance de l'utilisation d'un test de diagnostic sensible basé sur la PCR en temps réel pour mieux apprécier la dynamique de la transmission du paludisme à Madagascar.

**Mots clés :** Infection mixte, Madagascar, Paludisme, PCR en temps réel, Zone de forte transmission

**Encadreurs :** Professeur Arsène C. RATSIMBASOA

Professeur Ranjàna RANDRIANARIVO