



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

DOMAINE : SCIENCES ET TECHNOLOGIE

MENTION : BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

PARCOURS : BIOCHIMIE, BIODIVERSITE ET SANTE

MEMOIRE POUR L'OBTENTION

DU DIPLOME DE MASTER

**DIVERSITE GENETIQUE DE POPULATION DE
Plasmodium falciparum BASEE SUR LES
GENES *msp-1* et *msp-2*
DANS LA COMMUNE RURALE
D'ANTSIRASIRA,
DISTRICT DE BESALAMPY, REGION MELAKY**

Présenté publiquement le 29 décembre 2020 par :

RABEARIMANANA Maminirina Stéphane

Titulaire de Licence en Biochimie et Biologie Moléculaire

Devant la commission de jury composée de :

Président : Professeur RANDRIANARIVO Ranjàna

Rapporteurs : Docteur RAZAFIARIMANGA Zara Nomentsoa

Professeur RATSIMBASOA Claude Arsène

Examineurs : Docteur RAMAROSON Roseline

Docteur RANDRIAMAMPIANINA Lovarintsoa Judicaël



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

DOMAINE : SCIENCES ET TECHNOLOGIE

MENTION : BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

PARCOURS : BIOCHIMIE, BIODIVERSITE ET SANTE

MEMOIRE POUR L'OBTENTION

DU DIPLOME DE MASTER

**DIVERSITE GENETIQUE DE POPULATION DE
Plasmodium falciparum BASEE SUR LES
GENES *msp-1* et *msp-2*
DANS LA COMMUNE RURALE
D'ANTSIRASIRA,
DISTRICT DE BESALAMPY, REGION MELAKY**

Présenté publiquement le 29 décembre 2020 par :

RABEARIMANANA Maminirina Stéphane

Titulaire de Licence en Biochimie et Biologie Moléculaire

Devant la commission de jury composée de :

Président : Professeur RANDRIANARIVO Ranjàna

Rapporteurs : Docteur RAZAFIARIMANGA Zara Nomentsoa

Professeur RATSIMBASOA Claude Arsène

Examineurs : Docteur RAMAROSON Roseline

Docteur RANDRIAMAMPIANINA Lovarintsoa Judicaël

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	i
DEDICACE.....	iii
REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
GLOSSAIRE.....	viii
INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. BIOLOGIE DU PALUDISME	3
I.1. Agent pathogène	3
I.2. Cycle évolutif	3
I.2.1 Cycle asexué chez l’homme.....	4
I.2.2. Cycle sexué chez les moustiques	5
I.3 Diagnostic biologique du paludisme	6
I.3.1 Test de diagnostic rapide (TDR).....	6
I.3.2. Diagnostic microscopique	7
I.3.3. Diagnostic moléculaire par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	8
II. LE PALUDISME A MADAGASCAR	8
II.1. Historique	8
II.2. Contexte	9
II.3. Faciès épidémiologique du paludisme à Madagascar	10
III. STRUCTURE MOLECULAIRE ET DIVERSITE GENETIQUE DE <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i>	12
III.1. Structure des gènes	12
III.2. Gène <i>merozoite surface protein-1 (msp-1)</i>	12
III.3. Gène <i>merozoite surface protein-2 (msp-2)</i>	13
MATERIELS ET METHODES	15
II.1 MATERIELS	15
II.1.1. Sites d’étude	15
II.1.1.1. Commune rurale d’Antsirrasira	15
II.1.1.2. Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP).....	16
II.1.2. Population d’étude	16

II.1.2.1. Estimation de la taille d'échantillon	16
II.1.2.2 Critères d'inclusion.....	16
II.1.3. Collecte de données.....	16
II.1.3.1. Prélèvements.....	16
II.1.3.2. Réactifs	16
II.1.3.3 Equipements de laboratoire	17
II.2. METHODOLOGIE.....	17
II.2.1. Test de diagnostic rapide (TDR)	17
II.2.2. Examen microscopique des parasites	18
II.2.3. Techniques d'analyse moléculaire : <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	19
II.2.3.1. Méthode d'extraction par <i>QIAGEN</i>	19
II.2.3.2. Confirmation du diagnostic d'espèce par PCR nichée	21
II.2.3.2. Détermination de la diversité génétique de populations de <i>P. falciparum</i>	24
III.1. RESULTATS	28
III.1.1. RESULTATS DES TDR (SUR TERRAIN)	28
III.1.2. PREVALENCE DES ESPECES PLASMODIALES PAR DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE.....	28
III.1.3. PREVALENCE DES ESPECES DE <i>PLASMODIUM</i> PAR DIAGNOSTIC MOLECULAIRE.....	28
III.1.4. DIVERSITE GENETIQUE DE <i>P. falciparum</i>	30
III.1.4.1. Sensibilité et reproductibilité de la technique d'amplification par PCR.....	30
III.1.4.2. Génotypage des gènes <i>msh-1</i> et <i>msh-2</i>	30
III.1.4.2.1 Fréquence des familles alléliques.....	30
III.1.4.2.2. Diversité allélique (Distribution des allèles individuels <i>msh-1</i> et <i>msh-2</i>)	30
III.1.4.2.3 Polyclonalité de l'infection	33
III.2 DISCUSSIONS	35
III.2.1. EXTRACTION D'ADN	35
III.2.2. ESPECES PLASMODIALES	35
III.2.3. LES GENES <i>MSP-1</i> ET <i>MSP-2</i> de <i>P. falciparum</i>	35
III.2.4. DIVERSITE DES GENES <i>MSP-1</i> ET <i>MSP-2</i> DE <i>P. falciparum</i>	36
III.2.5. MULTIPLICITE DE L'INFECTION A <i>P. falciparum</i>	36
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	38
REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES.....	39
ANNEXES	I

« Invoque-moi, et je te répondrai ; Je t'annoncerai de grandes choses, des choses cachées, que tu ne connais pas. Car ainsi parle l'Éternel »

Jeremiah 33 : 3,4a

DEDICACE

Je dédie ce mémoire :

A Dieu tout puissant : qui m'a accordé sa bénédiction en me donnant la santé et la force chaque jour pour accomplir ce travail. « Mais grâces soient rendues à Dieu, qui nous donne la victoire par notre Seigneur Jésus Christ ! » 1 Corinthiens 15 : 57.

A mes chers parents : qui ont ménagé tant d'efforts, de sacrifices pour pouvoir éduquer leur fils et qui ont apporté leur soutien durant toutes ces années. Par ce travail, je témoigne ici toute ma gratitude et mon profond respect. Que notre Dieu puisse vous bénir chaque jour de votre vie.

A Raharimalala, Andriantseho, Lanja Andraina et Harena : pour vos encouragements, pour vos compréhensions : merci infiniment !

A mes frères et mes sœurs : pour m'avoir soutenu, pour vos encouragements, puisse Dieu vous donner à vos tours tous ce que vous méritez

REMERCIEMENTS

Le présent mémoire n'aurait pas vu le jour sans l'aide bienveillante, la compréhension et le dévouement d'un certain nombre de personnes.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements au Professeur RANDRIANARIVO Ranjàna, responsable de la Mention de Biochimie Fondamentale et Appliquée qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire, ainsi qu'au Docteur RAMAROSON Roseline et au Docteur RANDRIAMAMPIANINA Lovarintsoa Judicaël, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Docteur RAZAFIARIMANGA Zara Nomentsoa, responsable du parcours Biochimie Biodiversité et Santé et au Professeur RATSIMBASOA Claude Arsène de m'avoir soutenu et prodigué ses conseils tout au long de mon travail. Je tiens également à les remercier d'avoir accepté la responsabilité de rapporter ce mémoire.

J'adresse ma profonde gratitude au Docteur Didier MENARD, consultant International et au Docteur Valérie ANDRIANTSOANIRINA ainsi qu'au Docteur Remy DURAND, qui ont dirigé mes travaux et ont aiguisé mon esprit scientifique en me donnant de précieux conseils pour réaliser ce travail. Je les remercie de m'avoir accompagné dans l'accomplissement de ce mémoire.

Je tiens à remercier également tout le corps des enseignants de la Faculté des Sciences pour toutes les connaissances scientifiques qu'ils m'ont fait part au cours de l'étude universitaire.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également :

- A toute l'équipe de riposte épidémique en 2017 pour leurs sacrifices durant la descente dans cet endroit reculé et enclavé.
- Au Docteur RAOBELA Omega pour son conseil et aux personnels de laboratoire du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) pour l'organisation et leurs bonnes attitudes durant les manipulations.
- A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, dans la réalisation de ce mémoire

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde depuis l'année 2000	3
Figure 2 : Cycle évolutif du <i>Plasmodium</i>	4
Figure 3 : <i>Anophèles sp. femelle</i>	5
Figure 4 : Faciès épidémiologique du paludisme à Madagascar.....	11
Figure 5 : Représentation schématique du gène <i>m_{sp}-1</i> de <i>P. falciparum</i> montrant les 17 domaines.....	13
Figure 6 : Représentation de la structure des deux familles alléliques du gène <i>m_{sp}-2</i>	14
Figure 7 : Carte de la commune d'Antsirasira et les Fokontany d'intervention	15
Figure 8 : Déroulement de l'extraction d'ADN génomique par la méthode <i>QIAGEN</i>	19
Figure 9 : Schéma du cycle de la PCR.....	21
Figure 10 : Produit d'amplification pour la détection des espèces plasmodiales après révélation sur Gelscan dans le Fokontany d'Ambonarabe.....	29
Figure 11 : Produit d'amplification pour la détection des espèces plasmodiales après révélation sur Gelscan dans le Fokontany d'Antsirasira.....	29
Figure 12 : Produit d'amplification de l'allèle MAD 20 dans le Fokontany d'Antsiradrano .	31
Figure 13 : Produit d'amplification de l'allèle RO33 du gène <i>m_{sp}-1</i> dans le Fokontany d'Andrafiava.....	31
Figure 14 : Produit d'amplification de l'allèle K1 du gène <i>m_{sp}-1</i> dans le Fokontany d'Ambonarabe	32
Figure 15 : Produit d'amplification de l'allèle FC27 du gène <i>m_{sp}-2</i> dans le Fokontany d'Andrafiabe.....	32
Figure 16 : Produit d'amplification de l'allèle 3D7 du gène <i>m_{sp}-2</i> dans le Fokontany d'Antsirasira	32
Figure 17 : Polyclonalité de l'infection du gène <i>m_{sp}-1</i> selon l'âge et la localisation géographique	34
Figure 18 : Polyclonalité de l'infection du gène <i>m_{sp}-2</i> selon l'âge et la localisation géographique	34
Figure 19 : <i>COI</i> en fonction de l'âge	34

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ACT	: Combinaison thérapeutique à base d'Artémisinine
ADN	: Acide Désoxyribo-Nucléique
Ag	: Antigène
ARN	: Acide Ribo-Nucléique
BET	: Bromure d'éthidium
COI	: <i>Complexity of infection</i>
DLP	: Direction de Lutte contre le Paludisme
dNTP	: Désoxynucléosides-triphosphates
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra-Acétique
HRP2	: <i>Histidine rich protein 2</i>
LNLMTV	: Laboratoire National de Lutte contre les Maladies à Transmission Vectorielle
mM	: millimoles/litre
MOI	: <i>Multiple of infection</i>
Msp	: <i>Merozoites surface protéine</i>
OMD	: Objectifs du Millénaire pour le Développement
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
<i>P. falciparum</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	: <i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. malariae</i>	: <i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	: <i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	: <i>Plasmodium vivax</i>
Pb	: Paire de base
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
pLDH	: <i>Parasite lactate deshydrogenase</i>
PNLP	: Programme National de Lutte contre le Paludisme
RT-PCR	: <i>Reverse transcriptase PCR</i>
TBE	: Tris Borate
UV	: Ultra-violet
WHO	: <i>World Health Organisation</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résultats des TDR par tranche d'âge.....	28
Tableau 2 : Répartition des espèces plasmodiales par Fokontany	29
Tableau 3 : Distribution des allèles.....	30
Tableau 4 : Infections multiples.....	33

GLOSSAIRE

Allèles	: versions alternatives d'un même gène
Anticorps	: protéines de type gamma-globuline produites par l'organisme au contact d'un antigène.
Antigène	: substance capable de provoquer la formation d'un anticorps spécifique par l'organisme dans lequel elle s'est introduite.
Chromosome	: structures filamenteuses auxquelles est associé le matériel génétique des cellules et des virus.
Clone	: population de cellules issues d'une même cellule mère ou ancêtre
Complexité de l'infection	: nombre moyen de clones ou souches de <i>P. falciparum</i> chez un individu infecté.
Electrophorèse	: technique de séparation des molécules (ADN, ARN, protéines) en fonction de leur taille et de leur charge en utilisant un courant électrique.
Gène	: segment de chromosome qui code pour un produit fonctionnant (ARN, un polypeptide).
Génome	: ensemble des gènes situés sur les chromosomes
Génotype	: constitution génétique d'un organisme (par opposition à son aspect physique ou phénotype).
Infections multiples	: proportion des sujets ayant plus d'un fragment ou clone ou souche.
Nucléotide	: élément constitutif d'un acide nucléique comprenant une base azotée, un pentose et un phosphate.
Polymerase Chain Reaction	: technique enzymatique permettant l'amplification spécifique (in vitro) d'une séquence nucléotidique précise que l'on désire rechercher ou étudier.
Polymorphisme allélique	: présence simultanée de plusieurs allèles d'un gène homologue.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le paludisme ou malaria est une maladie infectieuse potentiellement mortelle causée par un parasite du genre *Plasmodium* appartenant au *phylum* des *Apicomplexa*. Cette maladie est transmise à l'homme lors d'un repas sanguin par une pique de moustiques infectés du genre *Anopheles*. En effet, ce parasite est à l'origine de plusieurs centaines de millions d'infections. Sur la planète, 1 à 2 millions de morts chaque année sont répertoriés (OMS, 2016).

Le nombre de cas enregistrés est estimé à 219 millions en 2017 contre 217 millions en 2016 (OMS, 2018). Le nombre de décès atteint jusqu' à 438 millions dont 395 millions en Afrique (OMS, 2015).

La résistance aux antipaludiques comme la chloroquine et la sulfadoxine-pyriméthamine (Mita *et al.*, 2009) est un problème récurrent, et a eu pour conséquence à l'anéantissement des efforts de lutte et une augmentation dramatique de la morbidité et de la mortalité palustres, essentiellement en Afrique sub-saharienne (Trape *et al.*, 2002). Depuis 2008, l'efficacité des Combinaison Thérapeutique à base d'Artemisinine(ACT) dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* a diminué en Asie du Sud-Est (Dondorp *et al.*, 2009). Ceci se traduit par une réduction importante de la vitesse d'élimination des parasites chez les patients traités (demi-vie de clairance parasitaire) (Flegg *et al.*, 2011).

Ainsi, conscient de ces fléaux, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise une surveillance systématique de la résistance aux médicaments antipaludiques ainsi que les études des différents marqueurs pour avancer et évaluer l'impact de lutte contre le paludisme et ensuite aider les pays à renforcer leurs efforts dans ces domaines importants.

L'étude de la diversité génétique est un des moyens pour évaluer l'impact et l'efficacité thérapeutique des antipaludiques. A Madagascar, *P. falciparum* représente à lui seul 96 % des infections palustres. L'une de ses caractéristiques est son polymorphisme génétique et antigénique. Il est responsable du neuro-paludisme et de l'anémie sévère. En Afrique, des données sont disponibles sur la diversité génétique de *P.falciparum*. Cependant à Madagascar, les données concernant la diversité génétique de cette espèce restent encore limitées. Par conséquent, la présente étude a été réalisée pour enrichir les informations sur le polymorphisme de *P. falciparum* en analysant les gènes *msh-1* et *msh-2* parmi les isolats récoltés dans la commune rurale d'Antsirasira (Figure 7, p.15), district de Besalampy, région Melaky appartenant au faciès Tropical (Figure 4, p.11) au Nord-Ouest de Madagascar, lors d'une riposte épidémique en février et mars 2017.

Le paludisme est la huitième cause de mortalité et morbidité à Madagascar qui reste encore un pays endémique à plus de 90% (EIPM 2016). En décembre 2017, une augmentation significative du nombre de cas de mortalité suspecté du paludisme a été identifiée dans la commune rurale d'Antsirasira qui sujette chaque année à des épidémies. En réponse à cette épidémie, une descente a été réalisée par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) pour maîtriser la situation. Un dépistage actif suivi des traitements appropriés et une aspersion domiciliaire ont été effectués pour répondre à cette alerte. Le but de cette étude était de caractériser la diversité génétique, la distribution allélique aussi bien que la complexité des infections dans les isolats provenant de cette zone durant l'alerte épidémique.

Ce travail a pour objectifs de :

- (i) Déterminer et/ou confirmer les espèces plasmodiales dans cette zone par la microscopie et par méthode moléculaire,
- (ii) Collecter des données sur la diversité génétique de la population de *Plasmodium falciparum* en amplifiant les gènes *msp-1* et *msp-2*.

La première partie de ce travail sera consacrée à la synthèse bibliographique, et la seconde partie aux différentes techniques utilisées suivies des résultats obtenus avec leurs interprétations et de la discussion.

Partie I :
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. BIOLOGIE DU PALUDISME

A l'échelle mondiale, le paludisme constitue un risque majeur pour environ 3,2 milliards de personnes et 50% des populations à risque sont des enfants d'âge scolaire. L'Asie, l'Amérique latine, et l'Afrique subsaharienne y compris Madagascar, figurent parmi les zones les plus touchées (OMS, 2016) (Figure 1).

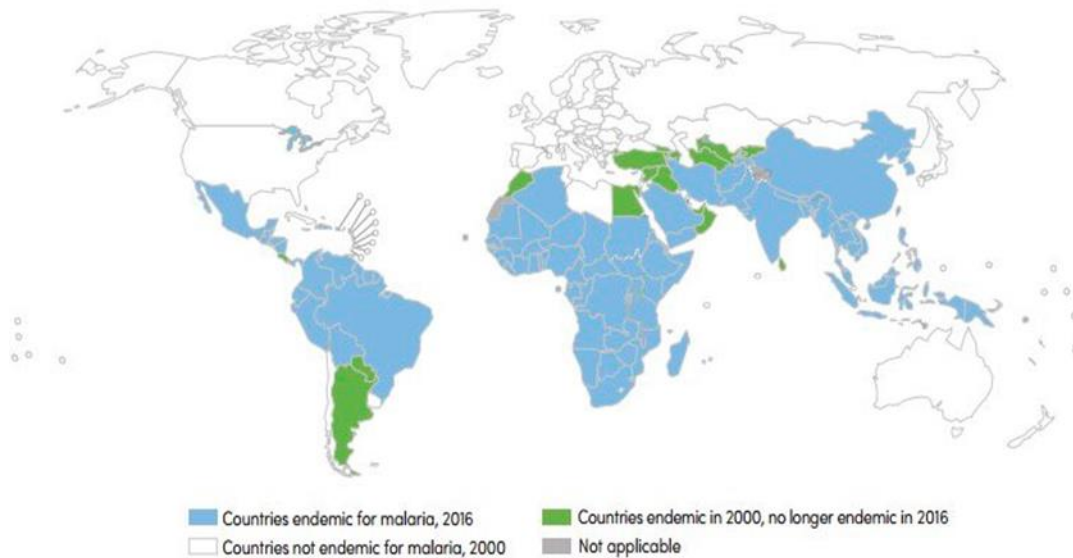


Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde depuis l'année 2000 (OMS, 2016).

I.1. Agent pathogène

Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (plus de 140), touchant diverses espèces animales, mais seulement cinq de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine : *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* et *P. knowlesii* (Craweley *et al.*, 2010 ; Barber *et al.*, 2011).

I.2. Cycle évolutif

Le cycle parasitaire de *Plasmodium* est dixène, c'est-à-dire, composé de deux hôtes, le moustique *Anopheles* est l'hôte définitif et l'hôte intermédiaire est l'homme.

Le cycle de *Plasmodium* se déroule en deux principales phases : la multiplication asexuée chez l'homme et la reproduction sexuée chez le moustique *Anopheles* (Figure 2, p.4).

La multiplication du parasite chez l'homme est divisée en deux phases :

- la phase hépatique ou pré-érythrocytaire (exo-érythrocytaire) : la phase d'incubation du parasite dans les cellules du foie ou hépatocytes, stade cliniquement asymptomatique.

- la phase sanguine ou érythrocytaire : l'invasion du parasite dans les globules rouges et est responsable des symptômes cliniques du paludisme après libération des hemozoin.

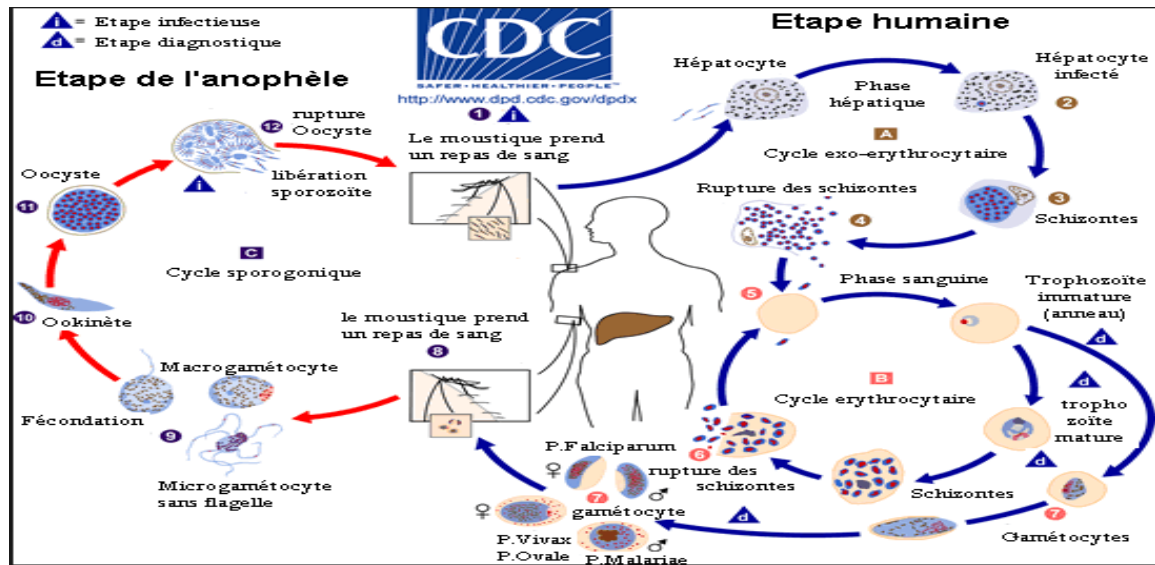


Figure 2 : Cycle évolutif du *Plasmodium* (www.cdc.gov/malaria/about/biology/)

I.2.1 Cycle asexué chez l'homme

I.2.1.1. Cycle hépatique ou exo-érythrocytaire

Les sporozoïtes sont les premières formes infestantes de *Plasmodium* injectés par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin. Ces formes parasitaires restent quelques heures dans la peau, la lymphe et le sang avant d'atteindre le foie. Ils se transforment ensuite en schizontes ou « corps bleus » qui sont formés par plusieurs noyaux. Après 7 à 15 jours, les schizontes deviennent matures et se multiplient dans les cellules hépatiques. S'ensuit la rupture des schizontes pour libérer des milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine (Figure 2, étape 4) (AFEPM, 2014).

Contrairement à *P. falciparum* et *P. malariae*, *P. vivax* et *P. ovale* présentent des sporozoïtes intra-hépatiques dans un état dormant appelés hypnozoïtes. Ils sont responsables d'une schizogonie hépatique retardée qui entraîne à nouveau la libération de mérozoïtes dans le sang plusieurs mois à quelques années après la piqûre du moustique. Ces formes vont être à l'origine d'accès de reviviscence du paludisme à *P. vivax* et à *P. ovale*.

I.2.1.2 Cycle sanguin ou érythrocytaire

Après libération des mérozoïtes, ces formes parasitaires envahissent les globules rouges grâce aux protéines de surface des mérozoïtes. Des interactions spécifiques entre le parasite et la surface de la membrane du globule rouge permettent la pénétration du parasite dans les érythrocytes. Ensuite, les parasites se transforment en trophozoïtes présentant des formes en anneaux. Les trophozoïtes vont se développer en schizontes qui conduisent à la destruction du

globule rouge et à une nouvelle libération de mérozoïtes. Toutes ces transformations varient de 24 à 72 heures, en fonction des espèces plasmodiales.

La libération de mérozoïtes dans le sang entraîne une augmentation de la parasitémie chez l'homme. Le sujet devient alors fébrile avec des symptômes cliniques comme la fatigue et la fièvre caractéristiques d'un accès palustre simple. Les cas de paludisme grave causés par *P. falciparum* sont caractérisés par des symptômes sévères (anémie, détresse respiratoire, hypoglycémie, insuffisance rénale) résultant de la propriété de *P. falciparum* de se séquestrer dans les organes nobles tels que le cerveau, poumons, reins et dans le placenta.

Après un certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes subissent une maturation accompagnée d'une différenciation sexuée, pour se transformer en gamétocytes mâle ou femelle (Figure 2, étape 7, p. 4). Ces gamétocytes sont ingérés par le moustique lors d'un nouveau repas sanguin pour générer la reproduction du parasite (Figure 2, étape 8, p. 4).

I.2.2. Cycle sexué chez les moustiques

Le cycle sexué chez le moustique *Anophèles* (Figure 3) débute par l'évolution des gamétocytes ingérés en gamètes dans la lumière de l'estomac de l'anophèle (Figure 2, étape 9, p. 4). Les gamètes se différencient en macrogamète femelles et en microgamète mâles après un processus de division et d'exflagellation. Puis, se produit la fécondation qui conduit à la formation d'un zygote mobile diploïde ou ookinète. Ce dernier va traverser la paroi stomacale du moustique et devenir un oocyste après division méiotique. Les cellules dans l'oocyste vont prendre une forme allongée et se transforment en sporoblastes puis en sporozoïtes (Figure 2, étape 12, p. 4). Après rupture de la paroi de l'oocyste, les sporozoïtes sont libérés dans la cavité générale où ils migrent vers les glandes salivaires du moustique pour être injectés à l'hôte humain lors d'un prochain repas sanguin (Figure 2, étape 1, p. 4). La durée du développement sporogonique des *Plasmodium* varie en fonction des conditions climatiques : entre 9 et 20 jours pour *P. falciparum* (entre, respectivement, 30 °C et 20 °C) (AFEIM, 2014).

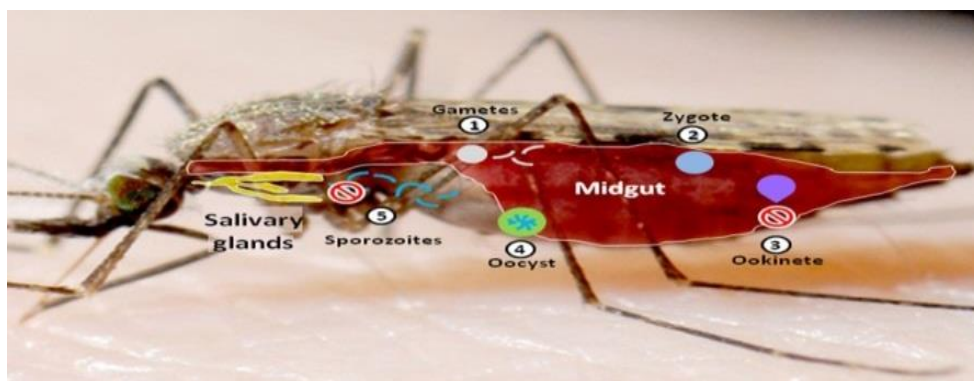


Figure 3 : *Anophèles sp. femelle*.

I.3 Diagnostic biologique du paludisme

Le diagnostic du paludisme est une urgence, tout accès palustre survenant chez un sujet non prémuni (cas du paludisme d'importation) pouvant évoluer en quelques heures vers un paludisme grave potentiellement mortel. Un diagnostic rapide et précis mène à une bonne prise en charge du patient.

Les outils de diagnostic sont utilisés pour déterminer la présence ou non de parasites dans le sang du sujet suspecté. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour diagnostiquer le paludisme : les tests de diagnostic rapide (TDR), l'examen parasitologique par microscopie et le diagnostic moléculaire par PCR.

I.3.1 Test de diagnostic rapide (TDR)

Il existe plusieurs types de TDR vendus par les fournisseurs sur le marché depuis 1990 (*Parasight, ICT Malaria P.f Test, OptiMal (Flow), CARE start, SD bioline...*). Ainsi, l'OMS a développé un système de contrôle de qualité afin de guider les utilisateurs mais aussi d'inciter les fabricants à suivre la norme « ISO-13485 : Dispositifs médicaux - Systèmes de management de la qualité - Exigences à des fins réglementaires ».

Basés sur leurs propres spécificités et leurs sensibilités, ces TDR sont des tests immunochromatographiques sur membrane de nitrocellulose qui reposent sur la détection des antigènes spécifiques aux espèces plasmodiales.

Le sang total prélevé au niveau de la pulpe du doigt (environ 5 µl), est déposé sur la membrane de nitrocellulose qui compose le TDR. L'addition d'un tampon de lyse permet aux complexes antigènes-anticorps de migrer par capillarité. Les complexes sont arrêtés par un deuxième anticorps révélateur fixé à la membrane.

S'il y a présence d'antigènes d'espèces plasmodiales dans le sang, le ou les antigènes détectés s'attachent aux anticorps monoclonaux spécifiques marqués d'un chromogène le plus souvent à l'or colloïdal. Le TDR détecte principalement trois types d'antigène spécifiques aux espèces plasmodiales :

- l'*HRP2* ou *Histidin Rich Protein 2*, une protéine spécifique de *P. falciparum* sécrétée au cours du stade asexué et par le jeune gamétocyte. Elle peut se trouver dans la circulation sanguine pendant quelques semaines après le traitement efficace des parasites (Laferi *et al.*, 1997) ;
- le *pLDH* ou parasite lactate deshydrogenase, une protéine pan-spécifique des cinq espèces plasmodiales ou encore spécifique au *P. falciparum* (*PfLDH*), ou spécifique au *P. vivax* (*PvLDH*) ;

- l'aldolase, une protéine de l'antigène pan-spécifique commune pour toutes les espèces plasmodiales exceptée *P. knowlesi*.

Le TDR possède plusieurs avantages. Son utilisation ne nécessite pas de compétence ni de formation particulière. Il est réalisable dans la majeure partie des zones d'études incluant les zones enclavées ; de plus, les résultats sont obtenus après 15 à 20 minutes. En raison de ces critères, en plus du diagnostic microscopique, l'OMS recommande fortement l'emploi du TDR en cas de suspicion palustre (Perkins *et al.*, 2008 ; Mawili-Mboumba *et al.*, 2013 ; Aubry *et al.*, 2015).

Le seuil de détection est d'environ 100 à 200 parasites/ μ l, en dessous de ce taux, le test est déclaré négatif. Cependant, il ne permet pas de quantifier les parasites ni de distinguer les espèces plasmodiales.

Par comparaison avec le diagnostic microscopique, le TDR peut mener à des résultats discordants sur la positivité et l'identification d'un accès palustre. Un TDR est qualifié de faux négatif lorsque la parasitémie est basse, inférieure au seuil de détection du TDR utilisé. De même, un diagnostic faux positif peut être obtenu jusqu'à 3 à 4 semaines après élimination du paludisme par l'ACT.

1.3.2. Diagnostic microscopique

Le diagnostic microscopique est réalisé à partir de deux préparations d'étalement du sang capillaire (ou veineux) sur une même lame : la goutte épaisse et le frottis mince, après coloration au GIEMSA ou *May Grundwald Giemsa*. La détection et l'identification des parasites se font par la reconnaissance de la morphologie propre aux différents stades de développement de l'espèce plasmodiale et les globules rouges parasités à l'aide d'un microscope optique. En outre, la charge ou la densité parasitaire peut être estimée. La microscopie est un paramètre utile pour évaluer l'évolution de la réponse parasitologique lors des études d'efficacité thérapeutique d'un antipaludique et la clairance parasitaire pour contrôler le traitement d'un patient impaludé après l'administration d'un antipaludique. Elle permet de confirmer ou réaffirmer l'espèce plasmodiale lors d'une étude du profil épidémiologique. La sensibilité de détection de la goutte épaisse est de l'ordre de 10 à 20 parasites/ μ l de sang (Pina *et al.*, 2007) pour un personnel qualifié.

Cette technique est peu coûteuse en moyen, en réactifs et nécessite un personnel formé (Canier *et al.*, 2013) ainsi que des infrastructures de proximité. Si le frottis sanguin est de mauvaise qualité ou mal coloré, l'identification des espèces plasmodiales ainsi que la quantification sont difficiles à réaliser (Scolpel *et al.*, 2004 ; Bejon *et al.*, 2006). Les limites de la microscopie sont aussi liées aux faibles parasitémies et à l'expérience du microscopiste à identifier les parasites (Mbakilwa *et al.*, 2012 ; Ohrt *et al.*, 2002 ; McKenzie *et al.*, 2003).

Malgré ces limites, la microscopie reste la méthode de référence (*Gold Standard*) pour la détection du *Plasmodium*.

I.3.3. Diagnostic moléculaire par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est une technique élaborée à la fin des années 1980 par Pr. K.B. Mullis, qui a reçu pour ses recherches le Prix Nobel de Chimie en 1993. La réaction de PCR consiste à amplifier une région spécifique d'un génome par répllication *in vitro* afin d'obtenir de multiples copies d'un fragment d'ADN cible d'un ADN matriciel génomique.

Dans les années 1999, la PCR a été exploitée pour obtenir un diagnostic moléculaire des espèces plasmodiales présentes dans le sang. C'est à partir d'une succession de PCRs conventionnelles, qu'une méthode appelée PCR nichée a été développée par Snounou et collaborateurs pour le diagnostic moléculaire du paludisme. Cette réaction de PCR a pour gène-cible le gène codant pour la petite sous-unité 18S de l'ARN ribosomal (Snounou et Singh, 1993).

Par comparaison au diagnostic microscopique et le TDR, la PCR possède un seuil de détection plus élevé, pouvant détecter 1 à 10 parasites par microlitre de sang. Des études épidémiologiques ont mis en évidence une sensibilité et spécificité du diagnostic par PCR plus élevées que le diagnostic microscopique et le TDR. De plus, la PCR nichée permet de diagnostiquer les infections mixtes (Singh *et al.*, 1996 ; Comores *et al.*, 2016).

En revanche, le diagnostic moléculaire par PCR nécessite une infrastructure adéquate, des réactifs et des équipements adaptés et coûteux ainsi qu'une expertise technique. Par conséquent, le diagnostic moléculaire est difficilement réalisable pour la confirmation de cas palustres pour tous les centres de santé dans les zones endémiques ou lors des épidémies.

II. LE PALUDISME A MADAGASCAR

II.1. Historique

La première description du paludisme fut donnée vers les années 2700 avant Jésus-Christ (Bertrand *et al.*, 2004). A Madagascar, le paludisme figure parmi les maladies infectieuses endémiques et son histoire sur cette île est liée à celle de sa population humaine. Rattaché au continent Africain avant de s'en détacher durant l'ère secondaire, Madagascar serait inhabité jusqu'à la période historique. Les parasites et les vecteurs du paludisme furent importés par des populations venues de différents pays (Julvez, 1995). Lorsque Diego Diaz débarqua en 1500, son équipage fut décimé par les fièvres, et son récit fut la première mention concernant les fièvres de Madagascar (Mouchet, 2004).

La création du premier service de lutte contre le paludisme, accompagnée d'études épidémiologiques n'a été réalisée qu'à partir de 1921 (Rakotonjanabelo, 1995). La surveillance épidémiologique menée en 1938 a montré que la proportion respective de *P. vivax* et *P. falciparum* était du même ordre de grandeur tant chez les colons que chez les indigènes (Société des Nations, 1939). Une agressivité particulière de *P. vivax* a été notée à cette époque. Plus tard, après l'introduction de la chloroquine, l'incidence à *P. vivax* (5%) se situait après *P. falciparum* et *P. malariae* (Wilson, 1947). Dans les années 1950, la littérature montre que sur les hautes terres centrales, *P. falciparum* et *P. vivax* avaient presque la même prévalence (Joncour, 1956). En 1993, dans ces régions, les proportions du paludisme à *P. falciparum* étaient de 80% contre 20% à *P. vivax* (Blanchy *et al.*, 1993). L'enquête nationale sur les indicateurs du paludisme à Madagascar en 2013 montre 0,25% de cas d'infection à *P. vivax* détectés par la PCR en temps réel (EIPMD, 2013).

Parmi les dates importantes de la lutte contre le paludisme à Madagascar, le Programme National de Lutte contre le Paludisme(PNLP) a été fondé en 1998. Après plus de cinquante ans d'utilisation de la chloroquine, et vu l'échec thérapeutique vis-à-vis de ce médicament, le traitement du paludisme simple a basculé vers l'utilisation de la combinaison thérapeutique à base d'artémisinine en 2005. L'utilisation des TDR du paludisme au niveau des centres de santé de base a été adoptée au niveau national en 2007. Selon la disponibilité des fonds, la distribution des Moustiquaires Imprégnées de Longue Durée d'Action (MILDA) et les Campagnes d'Aspiration Intra-Domiciliaire (CAID) ont été effectuées selon les zones d'intervention définies par le plan stratégique de lutte contre le paludisme à Madagascar.

II.2. Contexte

Madagascar est une île de l'Afrique Subsaharienne située dans la zone tropicale dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien, entre 11°57' et 25°30' de latitude Sud et 43°14' et 50°27' de longitude Est à 400 km des côtes orientales africaines du Mozambique. Avec une population totale estimée à 25,6 millions en 2017, Madagascar possède une superficie de 590 000 km² avec 5 000 kilomètres de côtes. Les parties côtières sont de basse altitude par rapport au centre du pays caractérisé par les hautes terres centrales avec une altitude de plus de 1500 m.

Deux saisons climatiques bien distinctes sont observées dans les hautes terres centrales, caractérisées par un été chaud et pluvieux et un hiver frais et sec. Contrairement au climat des hautes terres centrales, le climat sur les côtes est plutôt chaud toute l'année et mais également pluvieux sur la côte Est de l'île. A l'exception, le Sud de Madagascar présente un climat semi-aride voire sec presque toute l'année.

Le paludisme reste un problème majeur de santé publique dans la grande île. Il représente la huitième cause de morbidité surtout chez les enfants et les femmes enceintes, ces deux sous-populations possédant un système immunitaire faible (Plan Stratégique National de Lutte Contre le Paludisme, 2013-2017).

Le paludisme à *P. falciparum* est le plus fréquent dans toute l'île avec un taux de prévalence de 95%. Chez les patients à faible immunité, *P. falciparum* provoque des infections aiguës pouvant entraîner la mort si une prise en charge adéquate n'est pas donnée rapidement.

De façon générale, *P. vivax* a longtemps été négligé dans le monde. En 2010, une étude épidémiologique réalisée à Madagascar a montré une prévalence de *P. vivax* non négligeable de 8,8%, notamment dans la région Ouest en marge des hautes terres centrales dans les régions de Tsiroanomandidy et Maevatanana (Menard *et al.*, 2010).

Les principaux vecteurs sont *Anopheles funestus*, *Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis* (OMS 2018).

II.3. Faciès épidémiologique du paludisme à Madagascar

En fonction des conditions climatiques et de la capacité vectorielle des moustiques *Anopheles* à Madagascar, 4 faciès épidémiologiques de paludisme ont été définis (Mouchet *et al.*, 1995 ; EIPM, 2016) :

- le faciès équatorial sur la côte-Est avec une forte transmission pérenne. Les principaux vecteurs sont *Anopheles gambiae ss* et *Anopheles funestus* ;
- le faciès tropical sur la côte-Ouest avec un paludisme saisonnier d'environ six mois entre octobre et avril (haute transmission). Trois espèces de vecteurs sont présentes : *Anopheles gambiae ss*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles funestus* ;
- le faciès subdésertique dans le sud avec une transmission épisodique et courte (basse transmission, à risque épidémique). *Anopheles arabiensis* est le seul vecteur ;
- le faciès des hauts plateaux avec un paludisme instable entre janvier et avril avec comme vecteurs : *Anopheles arabiensis* et *Anopheles funestus*.

La répartition du paludisme à Madagascar est caractérisée par son hétérogénéité, conséquence des variations régionales en termes de pluviométrie, de température et d'altitude.

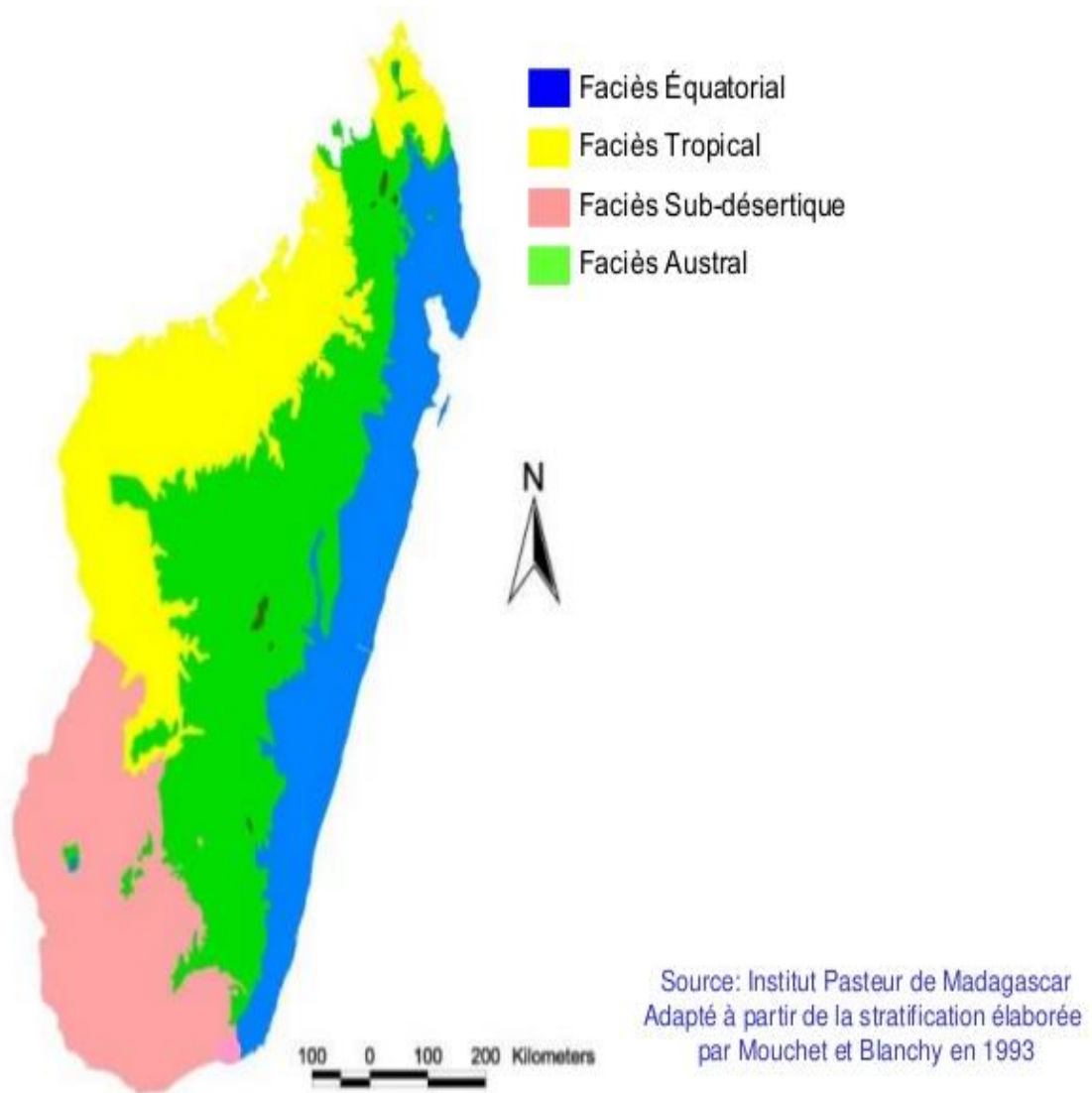


Figure 4 : Faciès épidémiologique du paludisme à Madagascar

De ces quatre faciès, résultent des types de transmission variables dans le pays, avec des régions endémiques au paludisme et autres régions subissant des épidémies :

- sur les côtes Est et Ouest du pays, le paludisme est stable avec une transmission élevée et régulière. La morbidité et la mortalité sont concentrées chez les jeunes enfants âgés de moins de 15 ans ;
- dans la région Sud et Hautes terres centrales (HTC), le paludisme est instable. Notamment, la transmission dans les hautes terres reste très basse ayant été interrompue pendant plusieurs années. Contrairement aux HTC, la région du Sud-Ouest subit des épidémies tous les ans.

A la limite des faciès HTC et subdésertique se trouve un 5^{ème} faciès appelé faciès marge (EIPM, 2016).

III. STRUCTURE MOLECULAIRE ET DIVERSITE GENETIQUE DE

Plasmodium falciparum

III.1. Structure des gènes

En 1996, un effort concerté de la communauté scientifique internationale a permis de réaliser le projet de séquençage et d'annotation du génome du clone 3D7 de *P. falciparum* (Hoffman *et al.*, 1997). Entre 1998 et 1999, les chromosomes 2 et 3 ont été entièrement séquencés (Gardner *et al.*, 1998 ; Bowman *et al.* 1999) et il fallait attendre la fin de l'année 2002 pour la publication du génome complet. La totalité des séquences sont en libre accès avec néanmoins quelques parties à compléter (Gardner *et al.*, 2002).

Le génome du *P. falciparum* est composé de 22,8 mégabases (Mb) repartis en 14 chromosomes linéaires. Ces chromosomes représentent un total de 25 à 30 mégabases d'ADN, soit approximativement 5000 gènes.

Les plus polymorphiques de ces gènes, entre autres les gènes de surface des merozoïtes, sont largement utilisés comme marqueurs génétiques dans les enquêtes épidémiologiques investiguant sur la diversité génétique des souches de *P. falciparum* (Babiker *et al.* 1997 ; Snounou et Beck 1998). Ce sont particulièrement les gènes codant pour des protéines du même nom : *merozoïte surface protein-1 (msp-1)*, *merozoïte surface protein-2 (msp-2)*, *merozoïte surface protein 3 (msp-3)*, le *glutamate-rich protein (glurp)*, *circumsporozoïte protein (csp)*, *erythrocyte binding antigen-175 (eba-175)*, *apical membran antigen 1 (ama-1)*. Plusieurs mécanismes sont évoqués dans le polymorphisme génétique de *P. falciparum* : la duplication génique, la conversion, la translocation, les délétions et les insertions géniques (Kemp, 1992 ; Deitsch *et al.*, 1997). Aussi, les recombinaisons intragéniques qui se produisent généralement dans les segments répétitifs du gène conduisent à des motifs différents par leur taille et ceci, d'une souche plasmodiale à une autre (Meyer *et al.*, 2002). Ce polymorphisme a comme conséquence que les individus au sein de l'espèce soient différents les uns des autres.

III.2. Gène *merozoïte surface protein-1 (msp-1)*

Le gène *merozoïte surface protein-1 (msp-1)* situé sur le chromosome 9 de *P. falciparum* (Triglia *et al.*, 1992) peut être divisé en 17 blocs plus ou moins conservés entre les souches de *P. falciparum* (Marcelo *et al.*, 2003). Le bloc 2 constitue une exception au dimorphisme car en plus des familles alléliques K1 et MAD20, est fréquemment trouvée dans ce bloc une troisième famille d'allèles nommée RO33 (Figure 5, p. 13). Ce gène code pour la synthèse d'une protéine

mérozoïtique de surface de grande taille (185-200 KDa) fortement impliquée dans l'invasion de l'érythrocyte.

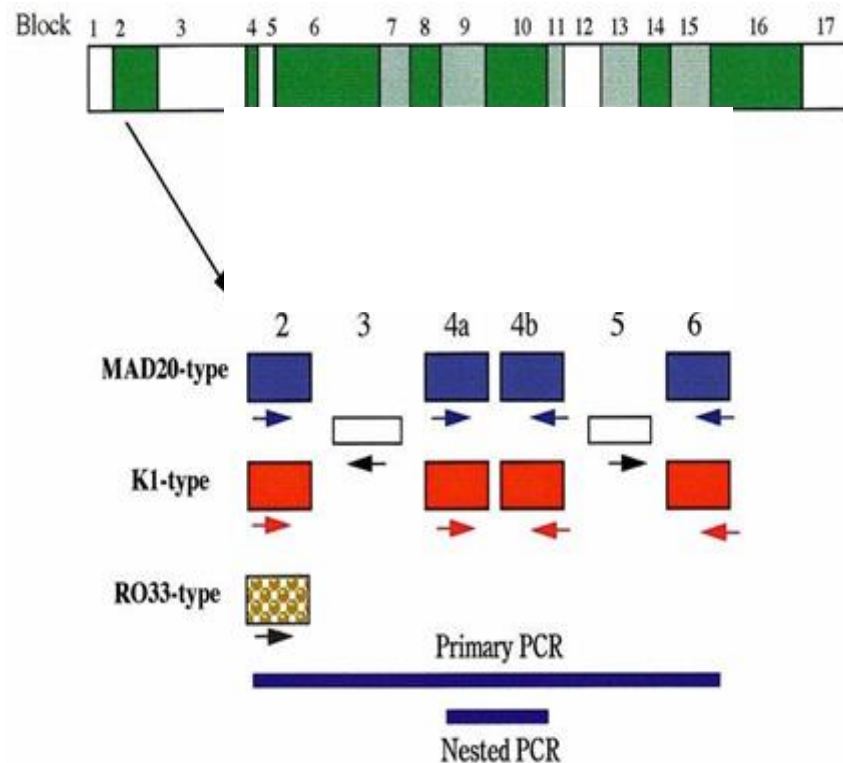


Figure 5 : Représentation schématique du gène *msp-1* de *P. falciparum* montrant les 17 domaines (Tanabe *et al.*, 1999)

III.3. Gène *merozoïte surface protein-2* (*msp-2*)

Le gène *merozoïte surface protein 2* (*msp-2*), présent sur le chromosome 2, a été isolé et séquencé (Thomas *et al.*, 1990 ; Fenton *et al.* 1991 ; Smyth *et al.*, 1991 ; Marshall *et al.*, 1994) à partir de plusieurs souches de *P. falciparum*. Ce gène, très polymorphe, code pour la synthèse d'une protéine du même nom située à la surface du mérozoïte (Abu Bakar., 1997).

Le gène est divisé en cinq blocs dont les blocs 1,2, 4 et 5 situés aux extrémités sont conservés ou semi- conservés. Le bloc 3 de ce chromosome est très variable et comporte les allèles 3D7 et F27 qui permettent de différencier les clones du parasite (Ferreira et Harlt, 2007 ; Kanunfre *et al.*, 2003 ; Low *et al.*, 2007 ; Boyle *et al.*, 2013). La figure 6 (p. 14) présente une description de la structure du gène *msp-2*, mettant en évidence la différence entre les deux familles alléliques.

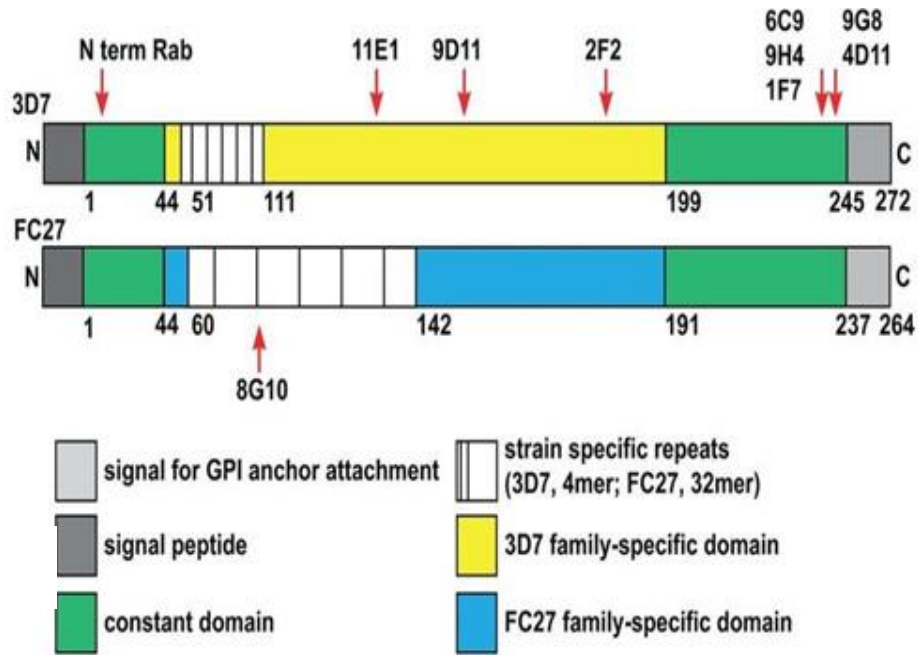


Figure 6 : Représentation de la structure des deux familles alléliques du gène *msp-2*

(Boyele *et al.*, 2013)

Partie II :
MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

II.1 MATERIELS

II.1.1. Sites d'étude

II.1.1.1. Commune rurale d'Antsirasira

Les données de cette étude ont été collectées chez les villageois vivant dans différents villages de la commune rurale d'Antsirasira qui se situe dans la région du Melaky (Nord-ouest de Madagascar), district de Besalampy limitrophe entre le District de Besalampy (à 250 km) et celui d'Ambatomainty (à 100 km) (Figure 7). Cette zone se trouve dans le faciès tropical. Avec une superficie de 1012 km², la commune d'Antsirasira est répartie en six Fokontany dont la plupart sont enclavés. Sa population est estimée à 3640.

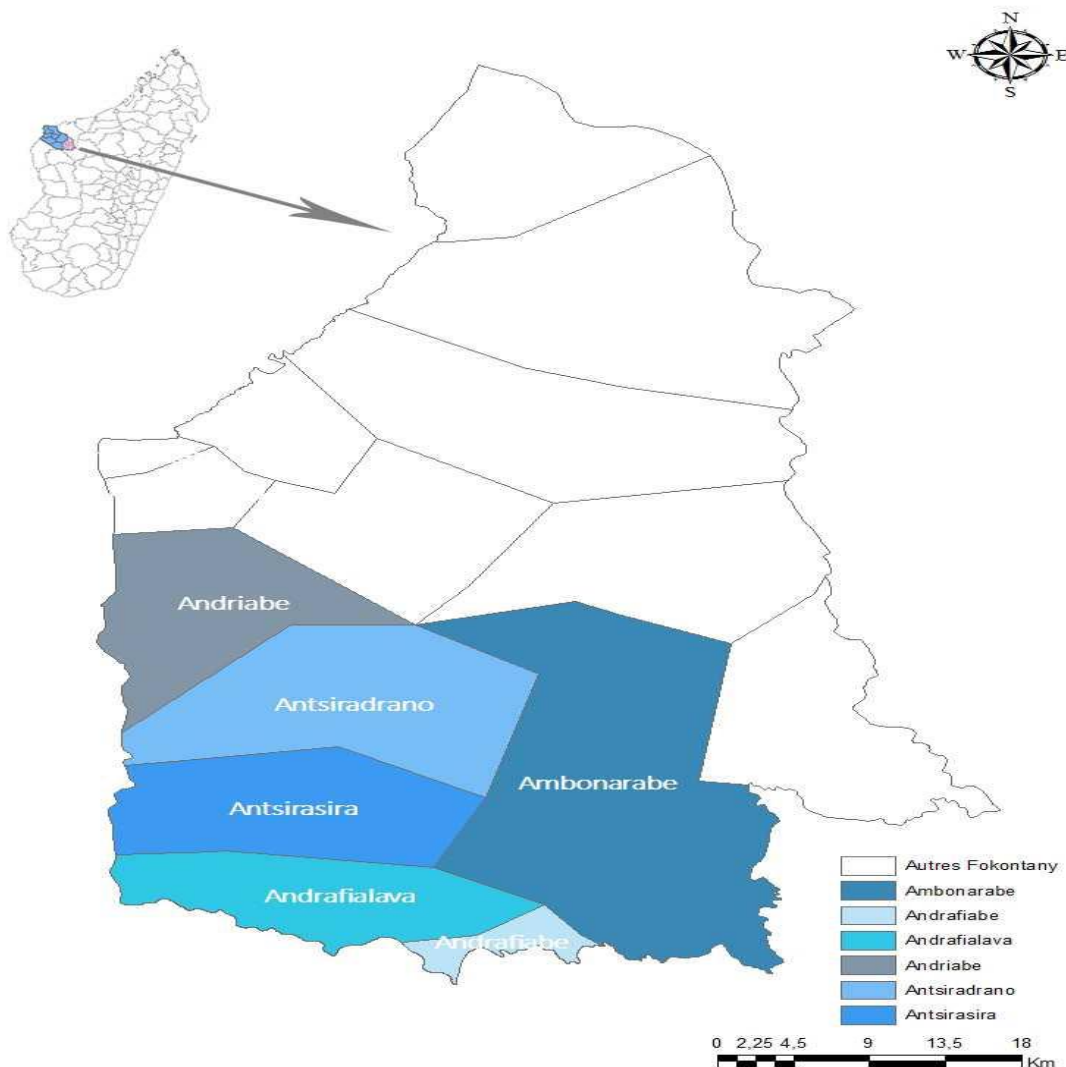


Figure 7 : Carte de la commune d'Antsirasira et les Fokontany d'intervention

Source : Cartographie des ripostes épidémiques, DLP (2018)

II.1.1.2. Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP)

Le PNL, spécialisé dans la surveillance du paludisme comprend en son sein, outre l'administration, plusieurs services dont le Laboratoire National de Lutte contre les Maladies à Transmission Vectorielle (LNLMTV) où les échantillons prélevés ont été traités et analysés.

II.1.2. Population d'étude

II.1.2.1. Estimation de la taille d'échantillon

Pour évaluer la diversité génétique, 220 échantillons seraient supposés suffisants pour collecter des données exploitables de la diversité génétique de population de *P. falciparum* dans une commune dans le cadre d'une riposte épidémique.

II.1.2.2 Critères d'inclusion

- Les sujets prélevés étaient les villageois habitants, présents lors de la descente et âgés d'au moins six mois,
- Seuls les échantillons positifs à *P. falciparum* par PCR font l'objet de la diversité génétique en se basant sur les gènes *msp-1* et *msp-2*.

II.1.3. Collecte de données

II.1.3.1. Prélèvements

Les échantillons ont été obtenus par prélèvements sanguins (lames : goutte épaisse-frottis minces et confettis) effectués à la pulpe du doigt (prélèvements capillaire) lors de la descente. Les étalements sur lames porte-objets ont servi au diagnostic microscopique et les prélèvements effectués sur papier filtre (spots de sang) ont été utilisés pour le diagnostic moléculaire (diagnostic d'espèces plasmodiales et étude de la diversité génétique de *P. falciparum*).

II.1.3.2. Réactifs

II.1.3.2.1. Kit QIAamp DNA Blood (Qiagen)

Le kit *QIAamp DNA Mini Kit (250) QIAGEN (GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY)* a été utilisé pour extraire l'ADN parasitaire (génomique, mitochondrial, et pathogène) provenant d'une variété d'échantillons frais ou congelé. Le kit comprend une colonne de silice, un tube collecteur, un tampon de lyse, deux tampons de lavage, et une enzyme protéase.

II.1.3.2.2 Amorces pour PCR

Les amorces ont été fournies sous forme de lyophilisat et ont été reconstituées avec de l'eau distillée stérile (EDS) pour avoir une solution de stock de concentration 100 µM. Cette dernière

a été diluée au dixième pour avoir une solution de travail de 10 μ M et conservée à -20°C jusqu'à son utilisation.

Cinq couples d'amorces différentes ont été utilisés pour la détection des espèces de *Plasmodium* (Annexe 3, p. IV) et 7 autres pour le typage de *msp-1* et *msp-2* (Annexe 4, p. IV)

II.1.3.3 Equipements de laboratoire

Plusieurs équipements ont été utilisés pour effectuer les manipulations dans ce travail.

➤ Thermocycleur

Le thermocycleur permet l'amplification de la matrice d'ADN. Cet appareil est conçu pour la réalisation de la technique de PCR, il comporte une enceinte où sont déposés les tubes ou les plaques contenant le mélange réactionnel. Dans ce compartiment, la température peut varier de 0 à 100°C. L'appareil permet la programmation de la variation de température, de la durée et de la succession des cycles ou l'automatisation de la réaction de PCR (Annexe 10, p. VIII).

➤ Appareil pour l'électrophorèse

Ces appareils (Cuve, générateur et circuit d'électrophorèse) permettent la migration et la séparation des acides nucléiques selon leur poids moléculaires (Annexe 11, p. VIII).

➤ Gel scan

Le *Gel Scan (Bio-Rad)* (Annexe 12, p. IX), branché à un ordinateur, permet de visualiser les produits de PCR sur gel d'agarose en utilisant un agent intercalant (le bromure d'éthidium) et photographier les gels d'électrophorèse (Annexe 11, p. VIII).

➤ Autres matériels

La liste des matériels et consommables est présentée sur l'annexe 1 (p. I).

II.2. METHODOLOGIE

II.2.1. Test de diagnostic rapide (TDR)

Sur terrain au moment du dépistage, avant tout traitement, le test de diagnostic rapide a été effectué avec le test *SD BIOLINE Malaria Ag Pf/Pan (SD Bioline, 05FK63)*. Ce TDR permet la détection de l'antigène *HRP2* spécifique de *P. falciparum* et de pan *pLDH* commune aux 4 espèces plasmodiales (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*). Après désinfection, 5 μ l de sang capillaire sont prélevés et déposés sur l'alvéole S. Trois gouttes de la solution tampon sont ensuite déposées dans l'alvéole A, permettant la lyse des hématies et la migration des lysats. Le résultat doit être interprété dans un délai de 20 min pour les tests valides.

Le test est positif lorsque la bande *pfHRP2* et la bande pan *pLDH* sont visibles simultanément ou une à une avec la présence de la bande de contrôle. Le test est négatif lorsque seule la bande de contrôle est visible. Le TDR invalide (lorsque la bande de contrôle ne s'affiche pas) est systématiquement refait.

II.2.2. Examen microscopique des parasites

(Manuel de formation sur le diagnostic microscopique du paludisme, DLP 2016, OMS 2009)

Pour l'examen parasitologique, une goutte épaisse (environ 5µl de sang) et un frottis mince (environ 3µl de sang) ont été étalées sur une même lame bien dégraissée et codée lors du dépistage. Après séchage, le frottis a été fixé au méthanol. Les lames ont ensuite été colorées au GIEMSA 10% pendant 10 minutes, puis séchées et lues à l'objectif X100 sous microscope optique en utilisant une huile à immersion.

Les densités parasitaires (DP) pour *P.falciparum*, exprimées en nombre de parasites par microlitre (µl) de sang ont été calculées à partir de la lecture des gouttes épaisses selon la méthode suivante : le nombre de parasites par µl de sang dans une goutte épaisse est établi par rapport au nombre de leucocytes, fixé à 8000 par microlitre de sang.

Un compteur manuel à double touche a été utilisé pour compter les parasites et les leucocytes. Pour calculer le nombre de parasites par microlitre (ou DP), le nombre "N" de parasites et le nombre "X" de leucocytes sont comptés en même temps, selon la formule suivante :

$$DP = (\text{nombre parasites comptés } N \times 8000) / X.$$

Si le nombre de parasites N est ≥ 100 dans 200 leucocytes, la formule ci-dessous est appliquée :

$$DP = N \times 8000 / 200 = N \times 40$$

Si le nombre de parasites N est < 100 pour 200 leucocytes, la lecture continue jusqu'à 500 leucocytes et la densité parasitaire sera :

$$DP = N \times 8000 / 500 = N \times 16$$

Les lames dont la goutte épaisse est défectueuse, ont été examinées seulement au niveau du frottis mince et la densité parasitaire est calculée à partir du frottis.

En estimant à 200 en moyenne le nombre de globules rouges (GR) par champ microscopique et à 4 500 000 le nombre d'hématies par microlitre de sang, l'expression de la DP est la suivante :

$$DP = \text{Nombre de GR parasités} \times 4\,500\,000 / \text{Nombre de sang examiné} \times 200$$

Le frottis a servi par ailleurs à l'identification de l'espèce plasmodiale, du stade parasitaire et la DP dans le cas où la goutte épaisse était illisible (Fixée par le méthanol ou détachée).

La lame est déclarée négative si aucun parasite asexué n'est trouvé sur toute la goutte ou le frottis.

II.2.3. Techniques d'analyse moléculaire : *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

La réalisation de diagnostic moléculaire par PCR nichée dans cette étude comprend quatre étapes :

- la confection des confettis sanguins (*Blood spot* à 4 puits d'environ 30 à 50 µl de sang de chaque) sur terrain ;
- l'extraction d'ADN à partir des confettis ;
- l'amplification du gène-cible des espèces *plasmodiales* par PCR nichée ;
- l'amplification du gène cible de polymorphisme par PCR nichée.

II.2.3.1. Méthode d'extraction par *QIAGEN*

Principe :

L'ADN plasmodial a été extrait à partir des échantillons de sang collectés sur des confettis en utilisant la *QIAamp DNA Mini Kit*.

La méthode d'extraction d'ADN par la méthode *QIAGEN* comprend 5 étapes :

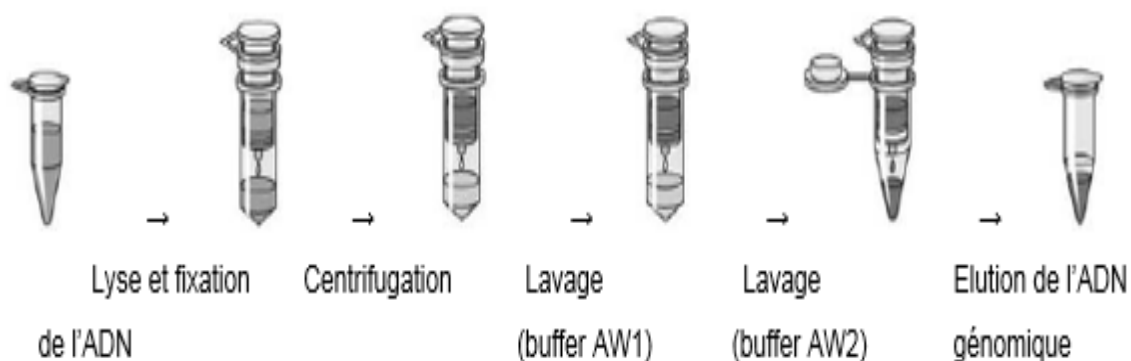


Figure 8 : Déroulement de l'extraction d'ADN génomique par la méthode *QIAGEN*

➤ **découpage des confettis sanguins**

Les confettis sont découpés en petits morceaux à l'aide de ciseaux (nettoyés avec du *DNAse*, de l'eau et de l'alcool 70°C pour chaque échantillon) et déposés dans un tube *ependorf* stérile préalablement identifié.

➤ **lyse des cellules sanguines**

Une solution tampon ATL 180 µl fournie dans le kit est ajoutée dans l'*ependorff* contenant les confettis découpés. Les tubes sont ensuite incubés à 85°C pendant 10 minutes au bain marie pour procéder à la première lyse thermique de la membrane des cellules sanguines. Puis les tubes sont centrifugés à 8000 tours/minute pendant 30 à 45 secondes pour éliminer les gouttelettes accumulées à l'intérieur du capuchon. Après cette incubation, une lyse de type chimique est réalisée en additionnant 20 µl de protéinase K dans chaque tube, qui est une étape très importante dans l'extraction des acides nucléiques. Une seconde lyse thermique est effectuée en mettant les tubes à 56°C au bain marie pendant 1 heure au minimum. Les tubes sont de nouveau centrifugés à 8000 tours/minute pendant 30 à 45 secondes. Enfin, l'ajout des 200 µl de tampon AL (fourni dans le kit) dans les tubes provoque une lyse totale de la membrane des cellules sanguines. La solution dans les tubes est mélangée immédiatement pendant 10 à 15 secondes au moyen d'impulsions au vortex.

➤ **séparation de l'ADN génomique du lysat cellulaire sur la membrane d'une colonne *QIAamp*.**

Afin de fixer l'ADN sur la membrane de la colonne *QIAamp* (délivrée dans le kit), 200 µl d'éthanol sont ajoutés à la solution obtenue après lyse complète. Les tubes sont ensuite vortexés pendant 10 à 15 secondes et centrifugés à 8000 tours/minute pendant 60 secondes. Puis le volume total obtenu depuis l'étape de lyse jusqu'à l'étape de séparation de l'ADN génomique (environ 600 µl), sont retirés du tube *ependorf* et transférés dans la colonne *QIAamp* préalablement identifiée. L'ADN génomique est alors adsorbé sur la membrane de la colonne *QIAamp* et séparé des lysats cellulaires qui sont élués à travers la membrane sous l'effet de la force centrifuge à 8000 tours/minute pendant une minute (Figure 8, p. 20).

➤ **lavage de la membrane de la colonne *QIAamp***

L'étape de lavage consiste à éluer les restes des lysats cellulaires à travers la membrane de la colonne *QIAamp*. 500 µl de premier tampon de lavage AW1 (fourni dans le kit) sont ajoutés dans la colonne *QIAamp*. La colonne est ensuite centrifugée à 8000 tours/minute pendant une minute. Le lavage de la membrane est poursuivi en additionnant 500 µl d'un deuxième tampon de lavage AW2. Puis, une nouvelle centrifugation à 14000 tours/minute est réalisée pendant trois minutes.

Enfin, la colonne est centrifugée à vide à 14000 tours/minute pour maximiser l'élimination des lysats cellulaires à travers la membrane *QIAamp* (figure 11, p. 20).

➤ **élution de l'ADN génomique à partir de la membrane *QIAamp***

La colonne *QIAamp* est déposée dans un nouveau tube eppendorf stérile bien identifié. Puis, 150 µl d'AE (fournit dans le Kit) ou d'eau distillée stérile dénuée de toute *DNase* et *RNase* sont ajoutés dans la colonne pour éluer l'ADN à travers la membrane. Enfin, une centrifugation des tubes à 14 000 tours/minute durant une minute est effectuée pour maximiser l'élution de l'ADN (Figure 11, p. 20). L'ADN est récupéré et puis conservé dans un congélateur à - 20°C jusqu'à son utilisation.

II.2.3.2. Confirmation du diagnostic d'espèce par PCR nichée

a) Méthodologie

Après l'extraction de l'ADN, une PCR de diagnostic d'espèce est nécessaire pour confirmer la présence de l'ADN parasitaire et pour déterminer l'espèce plasmodiale avant d'effectuer le polymorphisme. Le protocole utilisé est la PCR nichée utilisée par Snounou et collaborateur qui cible le gène ARNr 18S (Snounou *et al.*, 1993). Elle est constituée de deux PCR successives : la première PCR (PCR1) permet de déterminer le genre *Plasmodium* et la deuxième PCR (PCR2) nichée permet d'identifier les espèces de *Plasmodium*. Les fragments d'ADN cibles sont amplifiés à partir d'un couple d'amorces qui délimitent la séquence sélectionnée du gène de l'ARNr 18S. La réaction d'amplification se fait de façon cyclique, chaque cycle étant composé de trois étapes (Figure 9, p. 22) : dénaturation de l'ADN matriciel (étape 1, Figure 9, p. 22), hybridation des amorces (étape 2 Figure 9, p. 22) et élongation des ADN nouvellement synthétisés (Étape 3, Figure 9, p. 22).

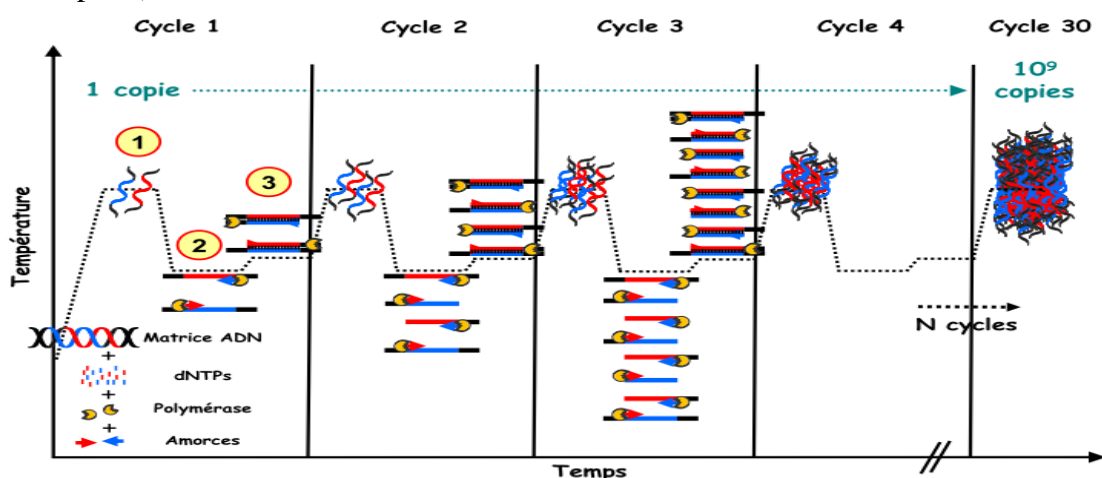


Figure 9 : Schéma du cycle de la PCR

Source : Manuel de diagnostic d'espèces de *Plasmodium*, Laboratoire PNLP (2013).

- **Etape 1 :** la dénaturation de l'ADN, consiste à séparer l'ADN double brins en deux ADN simple brin par chauffage à haute température supérieure à 94°C (Etape 1, figure 9).
- **Etape 2 :** l'hybridation des amorces qui impliquent l'utilisation d'amorces sens et anti-sens de la séquence à cibler et caractéristique du genre *Plasmodium* pour la PCR1. Pour la PCR2, de nouvelles amorces sens et anti-sens spécifiques de la séquence cible à chaque espèce plasmodiale sont utilisées. La température d'hybridation dépend étroitement des amorces utilisées lors de la PCR1 et de la PCR2, et se trouve généralement entre 45°C et 65°C. Elle est optimisée afin d'obtenir une fixation maximale des amorces sur la séquence d'ADN à cibler (Etape 2, figure 9).

Les amorces caractéristiques du genre *Plasmodium* et les espèces utilisées dans le protocole de PCR ciblant l'ARNr 18S sont illustrées dans l'annexe 3 (p. IV).

- **Etape 3 :** l'élongation qui requiert spécifiquement l'utilisation d'une enzyme polymérase appelée Taq polymérase. La Taq polymérase est clonée et exprimée dans une bactérie thermophile appelée *Thermus aquaticus*. Elle est utilisée en raison de sa propriété de résister à des hautes températures de l'ordre de 100°C (Etape 3, figure 9). Quel que soit l'enzyme Taq utilisée, une température de 72°C est généralement fixée pour cette étape d'élongation.

b) Préparation du mélange réactionnel pour les PCR

La préparation du mélange réactionnel est la première étape pour effectuer une PCR. Le mélange réactionnel est la composition de plusieurs réactifs dont les amorces, la Taq polymérase, le dichlorure de magnésium ($MgCl_2$), les désoxynucléoside-triphosphate (dNTPs) et le tampon. Afin de travailler dans un environnement le plus stérile possible, la hotte est mise sous radiation UV pendant 30 minutes. Tous les matériels utilisés sont nettoyés avec de la *DNAse* et de l'alcool avant et après chaque manipulation.

Les réactifs sont décongelés avant la manipulation. Les volumes des réactifs pour un échantillon sont indiqués dans l'annexe 5 pour la PCR1 et dans l'annexe 6 pour la PCR 2. Sous la hotte, le mélange réactionnel est préparé en fonction du nombre "n" d'échantillons à tester plus trois afin d'assurer le volume exact de mix pour le nombre "n" d'échantillons en cas d'erreur de pipetage. Puis 22 μl du mélange réactionnel sont ajoutés dans chaque microtube PCR numéroté et daté. Le mélange réactionnel pour la PCR2 est sensiblement identique à celui de la PCR1 en modifiant les amorces qui sont spécifiques de chaque espèce plasmodiale.

c) Amplification d'ADN

Pour la préparation de la solution du mélange réactionnel, tous les matériels utilisés sont nettoyés avec de la *DNAse*, puis à l'alcool et la hotte est irradiée aux UV pendant 30 minutes avant de procéder à l'ajout d'ADN dans les microtubes de PCR contenant chacun 22 μl du

mélange réactionnel. Ensuite 3 µl d'extrait d'ADN et de témoins (ADN positif et de l'eau stérile pour le témoin négatif) sont alors ajoutés dans les microtubes PCR.

Puis, les microtubes PCR sont centrifugés brièvement pour enlever toute bulle d'air résiduelle et placés dans le thermocycleur. Les programmes PCR utilisés pour la PCR1 et la PCR2 avec leurs profils thermiques respectifs sont présentés dans l'annexe 9 (p. VII).

Les produits issus de la PCR1 appelés amplicons servent de matrice ADN pour la deuxième amplification (PCR2) caractéristique des espèces de *Plasmodium* (multiplex). Les différences entre les deux PCR reposent sur les amorces utilisées et la température d'hybridation des amorces.

d) Electrophorèse des produits amplifiés

- Principe :

La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée pour séparer les ADN selon leur poids moléculaire. La séparation des ADN dépend de deux variables : la charge et la masse. Les molécules repoussées d'un côté par un courant électrique produit par une électrode sont attirées simultanément par le courant produit par l'autre électrode. Les produits finaux des PCR sont déposés dans les puits du gel d'agarose du côté de la cathode et migrent vers l'anode en raison de la charge négative des ADN présents (ou pas) dans les amplicons. La force de friction des matériaux composant du gel joue le rôle de « tamis moléculaire » et sépare les molécules en fonction de leur taille. La vitesse de migration à travers le gel dépend de leur poids moléculaire ; plus la molécule est de petite taille, plus sa migration est rapide. Enfin, la concentration du gel d'agarose préparée pour l'analyse des ADN obtenus par PCR dépendra de la taille des fragments d'ADN cibles.

- Préparation du gel d'agarose :

La quantité appropriée d'agarose a été pesée sur une balance de précision. Dans cette étude, le gel utilisé contient 1,5 à 2 % d'agarose et est préparé avec 1,5 g d'agarose dissous dans 100 ml de TBE 1X.

Le mélange est chauffé au four micro-onde pendant environ 3 minutes 30 secondes à 4 minutes 30 secondes, puis après une douce agitation, 4 µl de bromure d'éthidium (BET) est ajouté à la solution d'agarose. Le BET est un agent intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence quand il est excité à une longueur d'ondes entre 254 et 365 nm dans l'ultra-violet (UV). Cette fluorescence permet la révélation des fragments d'ADN sur le gel. Enfin le gel d'agarose prêt à l'emploi est obtenu après écoulement de la solution d'agarose dans un moule contenant un ou des peignes à puits (selon la dimension du cuve) avant polymérisation de la solution.

- Dépôt et migration des produits de la PCR 2 :

Le gel est prêt à utiliser quand il devient solide. Pour chaque amplicon à analyser, 5 µl de l'amplicon sont mélangés avec 3 µl de bleu de charge qui permet de pousser les ADN au fond du puits et de suivre la migration sur gel au cours du temps. Après dépôt du gel dans la cuve électrophorétique contenant le tampon de migration (TBE 1X), 8 µl de mélange (amplicon + bleu de charge) sont chargés dans les puits du gel. Huit microlitres (8 µl) du marqueur de poids moléculaire « DNA ladder 100 bp » sont ajoutés dans le premier et le dernier puits.

Les paramètres de migration sont de 120 volts pendant une heure (Annexe 11, p.VIII).

e) Visualisation des bandes après migration

Pour visualiser les bandes d'ADN après migration sur gel, le gel d'agarose est placé sous lumière UV puis photographié à l'aide de l'appareil *Gelscan Biorad (Biorad refer)* en utilisant le logiciel *Image Lab*.

La réaction de PCR nichée est considérée comme positive si le témoin positif présente une bande correspondante au poids moléculaire du fragment d'ADN attendu après la PCR2. De plus, il est important qu'aucune bande ne soit observée pour le témoin négatif. La présence d'une bande pour ce témoin négatif indique la présence de contamination au cours de la PCR.

La taille des produits de PCR attendus pour le protocole de PCR ciblant l'ARN 18S (Snounou *et al.*, 1996) est de 205 pb pour *P. falciparum*, de 121 pb pour *P. vivax*, de 145 pb pour *P. malariae* et de 787 pb pour *P. ovale*.

Les échantillons analysés qui présentent des bandes de taille proche de la taille attendue sont considérés alors comme positifs.

II.2.3.2. Détermination de la diversité génétique de populations de *P. falciparum* : typage des gènes *msp-1* et *msp-2* par PCR nichée

Seuls, les échantillons positifs à *P. falciparum* sont utilisés pour la diversité génétique.

a) Principe

Les régions polymorphiques répétitives du bloc de 2 *msp-1*, du bloc 3 de *msp-2* ont été amplifiées par une nested PCR pour étudier le polymorphisme de *P. falciparum* (Viriyakosol *et al.*, 1995) et estimer la multiplicité de l'infection.

Au cours d'une première amplification du gène cible, un premier couple d'amorces (*MSP1-F/MSP1-R* pour *msp-1* et *MSP2-F/MSP2-R* pour *msp-2*) amplifie le segment du gène comprenant la région de polymorphisme (taille en pb). Puis, des couples d'amorces spécifiques

aux différentes familles alléliques des gènes *msp-1* (K1, MAD20 et RO33) et *msp-2* (FC27 et 3D7) sont utilisés pour une seconde amplification.

b) Typage du gène *msp-1*

Le couple d'amorce *MSP1*-PCR-F [5'-CAC ATG AAA GTT ATC AAG AAC TTG TC-3'] et *MSP1*-PCR-R [5'-GTA CCG CTA ATT CAT ATT CTA TTG CTA G-3'] permettant d'avoir un produit de taille 633 pb, est utilisé pour la première PCR. La composition du mélange réactionnel est présentée dans l'annexe 7 (p. V). Le programme d'amplification est composé : d'une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, d'un cycle correspondant à une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 55°C pendant 40 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 minute répété 30 fois et d'une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

Le produit d'amplification issu de la première PCR a été réamplifié en utilisant trois autres couples d'amorces spécifiques des trois familles alléliques de *msp-1* : MAD20, K1, et RO33 (Annexe 4, p. IV). Le programme d'amplification était le même que celui de la première PCR sauf la température d'hybridation : une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, un cycle correspondant à une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 60°C (sauf pour *K1* qui est de 62°C) pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 40 secondes répété 30 fois et une élongation finale 72°C pendant 5 minutes.

c) Typage du gène *msp-2*

Le couple d'amorce spécifique du gène *Msp2* : *MSP2*-F [5'- ATG AAG GTA ATT AAA ACA TTG TCT ATT AAT- 3'] et *MSP2*-R [5'- ATA TGG CAA AAG ATA AAA CAA GTG TTG CTG- 3'] utilisé lors de la première PCR a permis d'avoir un produit de taille de 811 pb. La composition de mélange réactionnel est présentée dans l'annexe 7 (p. V).

Le programme de l'amplification consiste en une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, un cycle correspondant à une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 55°C pendant 40 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 minutes répétée 30 fois et une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

Le produit d'amplification issu de la première PCR a été réamplifié en utilisant deux autres couples d'amorces spécifiques de deux familles alléliques de *Msp2* : 3D7 et FC27 (Annexe 4, p. IV).

Le programme d'amplification est détaillé en annexe 9 (p. VII).

d) Electrophorèse des extraits amplifiés

Similaire aux diagnostics d'espèces, les fragments d'ADN obtenus par la PCR sont en quantité telle qu'il est possible de les révéler directement par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pendant 1 h à 1h 30 minutes à 120 Volts en utilisant du bromure d'éthidium (BET) comme agent intercalant.

La vitesse de migration étant dépendante de la masse moléculaire, les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille exprimée en paires de bases. Leur identification est facilitée par l'utilisation de marqueur de poids moléculaire (Figure 14). La révélation de l'électrophorèse a été faite sous UV en utilisant un système de documentation des images couplé à l'ordinateur donnant la possibilité d'estimer avec précision la taille exacte des bandes d'ADN.

e) Contrôle de qualité et interprétation des résultats

Des souches de *P. falciparum* en culture provenant de l'Institut Pasteur de Paris (PfDd2, PfD10 et PfNF54) ont été utilisées comme contrôles positifs en PCR pour les gènes *msp-1* et *msp-2*, dont la taille des bandes attendues est connue.

Un fragment de gènes amplifié se traduit par la présence de bandes correspondant soit à un intervalle de taille en pb couvrant les tailles des fragments appartenant aux fragments amplifiés (Annexe 9, p. VII), correspondant à une taille bien précise (Annexe 3 et 4, p. IV).

La polyclonalité se traduit par la présence simultanée dans le même échantillon des bandes de tailles différentes. Chaque bande représente un clone ou un allèle. Pour chaque patient, les résultats de l'amplification sont analysés et interprétés en fonction de chaque marqueur de polymorphisme (*msp-1*, *msp-2*).

Dans la littérature, il a été défini en ce qui concerne les gènes *msp-1* et *msp-2* que deux allèles *msp-1* ou *msp-2* sont considérés identiques lorsqu'ils diffèrent de seulement 10 paires de base (Cattamanchi *et al.*, 2003).

f) Analyse des données

Les données ont été saisies et validées sur Excel 2016.

Pour l'analyse de la diversité, les données sur la population allélique ont été analysées en comptant les nombres des allèles suivants leurs tailles.

Pour permettre une analyse comparative de la fréquence des allèles entre les six Fokontany, les données des six villages ont été regroupées par âge et par Fokontany.

L'analyse statistique a été faite avec le logiciel *MedCalc*.

Partie III :
RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

Les données sociodémographiques (l'âge, le sexe, la température et la notion de voyage) de tous les sujets ont été enregistrées lors de la consultation. Ensuite, tous les résultats d'analyses sont transcrits dans une base de données contenant le TDR, la microscopie, le diagnostic d'espèces et le polymorphisme.

III.1.1. RESULTATS DES TDR (SUR TERRAIN)

Parmi les 2691 sujets dépistés sur terrain, 1401 (52%) sont positifs aux TDR (Tableau 1).

Tableau 1 : Résultats des TDR par tranche d'âge

Tranche d'âge	2-11 mois	1-5 ans	6-13 ans	14 ans et plus	Total
Nombre de CE	129	740	679	1143	2691
TDR (+)	55	550	486	318	1409
Taux de positivité (%)	42,63	74,32	71,56	27,82	52,36

III.1.2. PREVALENCE DES ESPECES PLASMODIALES PAR DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE

Pour le diagnostic microscopique, 263 lames ont été effectuées dont 181 présentent des formes asexuées de parasites, 19 ont des gamétocytes de *P. falciparum* et 63 lames sont négatives. La densité parasitaire varie de 48 à 194 565 parasites/µl de sang. La densité parasitaire moyenne est de 2800 parasites/µl de sang. Quatre échantillons présentent une infection mixte dont 2 *P. falciparum* + *P. malariae* et 2 autres *P. falciparum* + *P. ovale*. Par contre, aucun *P. vivax* n'est observé.

III.1.3. PREVALENCE DES ESPECES DE *PLASMODIUM* PAR DIAGNOSTIC MOLECULAIRE

Parmi les 263 confettis réalisés, 220 échantillons ont été testés pour l'analyse moléculaire. Deux cent sur deux cent vingt (200/220) échantillons sont positifs à *P. falciparum*, 13 mixtes dont 10 *P. falciparum* + *P. malariae* et trois *P. falciparum* + *P. ovale* (Tableau 2, p. 29). Aucun *P. vivax* n'est détecté dans les échantillons. Les figures 13 (p. 31) et 14 (p. 32) montrent des résultats de diagnostic d'espèces après révélation sur gel.

Tableau 2 : Répartition des espèces plasmodiales par Fokontany

Fokontany	Andrafialava	Antsirasira	Ambonarabe	Andrafiabe	Antsiradrano	Total
ADNs extraits	22	39	50	69	40	220
<i>P. falciparum</i>	22	36	36	62	31	187
<i>P. vivax</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. f/P. malariae</i>	0	2	4	4	0	10
<i>P. f/P. ovale</i>	0	1	0	1	1	3

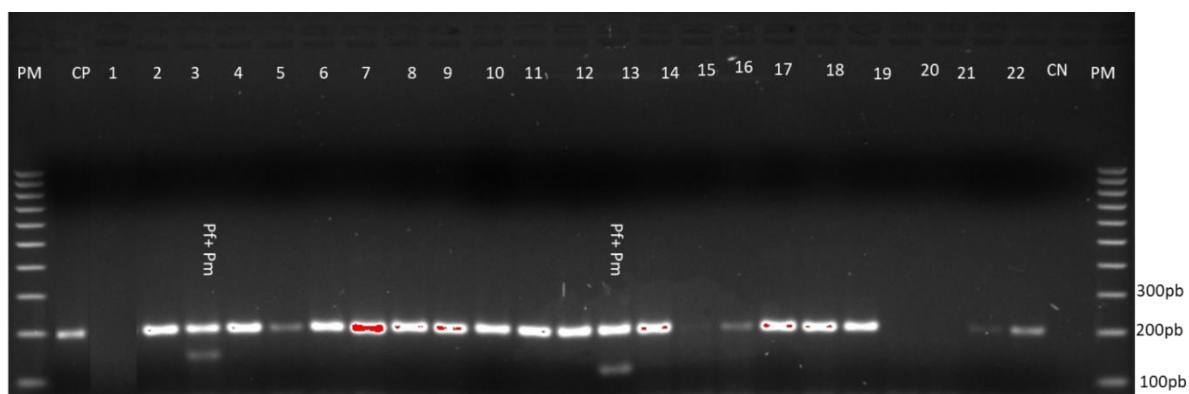


Figure 10 : Produit d'amplification pour la détection des espèces plasmodiales après révélation sur Gel scan dans le Fokontany d'Ambonarabe

PM : Poids moleculaire ; **CP** : control positif (*P. falciparum*), **CN** : control négatif, **1 à 22** : ADN des sujets à Ambonarabe ; **Pf+Pm** : *P. falciparum* + *P. malariae*.

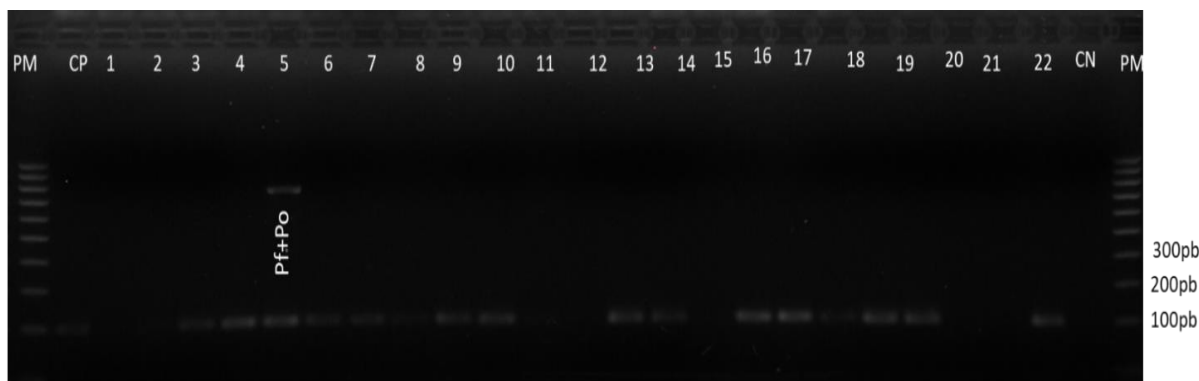


Figure 11 : Produit d'amplification pour la détection des espèces plasmodiales après révélation sur Gel scan dans le Fokontany d'Antsirasira

PM : poids moleculaire ; **CP** : control positif (*P. falciparum*), **CN** : control négatif, **1 à 22** : ADN des sujets à Antsirasira ; **Pf+Po** : *P. falciparum* + *P. ovale*

III.1.4. DIVERSITE GENETIQUE DE *P. falciparum* : DIVERSITE DES GENES

MSP-1 ET *MSP-2*

III.1.4.1. Sensibilité et reproductibilité de la technique d'amplification par PCR

Parmi les 220 échantillons, 200 ont été positifs par PCR à *P. falciparum* et ont été analysés par PCR en *mSP-1* et *mSP-2*. Les échantillons sortis négatifs ont été testés de nouveau. Très peu d'échantillons ont été négatifs pour les allèles des gènes *mSP-1* et *mSP-2*. Ainsi, au total, 200 échantillons d'ADN de parasites ont été analysés dans les cinq Fokontany concernés.

Les gènes *mSP-1* et *mSP-2* ont été amplifiés avec succès. Le taux d'amplification était de 93% (186/200) pour le gène *mSP-1* et de 75,59% (151/200) pour le gène *mSP-2*.

III.1.4.2. Génotypage des gènes *mSP-1* et *mSP-2*

III.1.4.2.1 Fréquence des familles alléliques

La distribution des différentes familles alléliques des gènes *mSP-1* et *mSP-2* est présentée dans le tableau 3. Dans les deux domaines, les allèles de type K1 et les allèles de type 3D7 étaient les plus fréquents.

Tableau 3 : Distribution des allèles

Tranche d'âge		< 5 ans	> 5-15 ans	> 15 ans	Total	Pourcentage
Nombre d'ADN		77	88	35	200	
MSP1	MAD20	13	15	4	32	17,20%
	RO33	5	6	1	12	6,45%
	K1	21	16	6	43	23,12%
	MAD20/K1	14	11	8	33	17,74%
	MAD20/RO33	12	2	2	16	8,60%
	K1/RO33	12	6	3	21	11,29%
	MAD20/RO33/K1	13	10	5	28	15,05%
MSP2	3D7	23	17	8	48	31,79%
	FC27	22	15	4	41	27,15%
	3D7/FC27	32	19	12	63	41,72%

III.1.4.2.2. Diversité allélique (Distribution des allèles individuels *mSP-1* et *mSP-2*)

Tous les allèles identifiés ont été classés selon leur taille en paire de base (pb). Au total, 39 allèles individuels ont été identifiés dans les deux gènes et dans les cinq Fokontany.

L'analyse du gène *msh-1* a montré que 9 allèles de type K1 d'une taille allant de 160 à 300 pb, 8 allèles de type Mad20 (120 à 250 pb) et une taille unique de type RO33 (160 pb) ont été identifiés dans des isolats de *P. falciparum*.

Sur la base de l'analyse du gène *msh-2*, 10 allèles de type 3D7 d'une taille allant de 150 à 350 pb et 11 allèles de type FC27 (300 à 600 pb) ont été détectés.

L'analyse des allèles K1 du gène *msh-1* a permis d'observer trois allèles les plus dominants (180pb, 200 bp et 240 bp), 160 pb (taille unique) pour l'allèle RO33 et présence de 3 allèles dominants (180 pb, 200pb et 220 pb) pour MAD20.

L'allèle 380 pb suivi de l'allèle 300 étaient le plus dominants pour les allèles 3D7. Pour les allèles FC27, les allèles 420 pb et 460 pb sont les plus infectants.

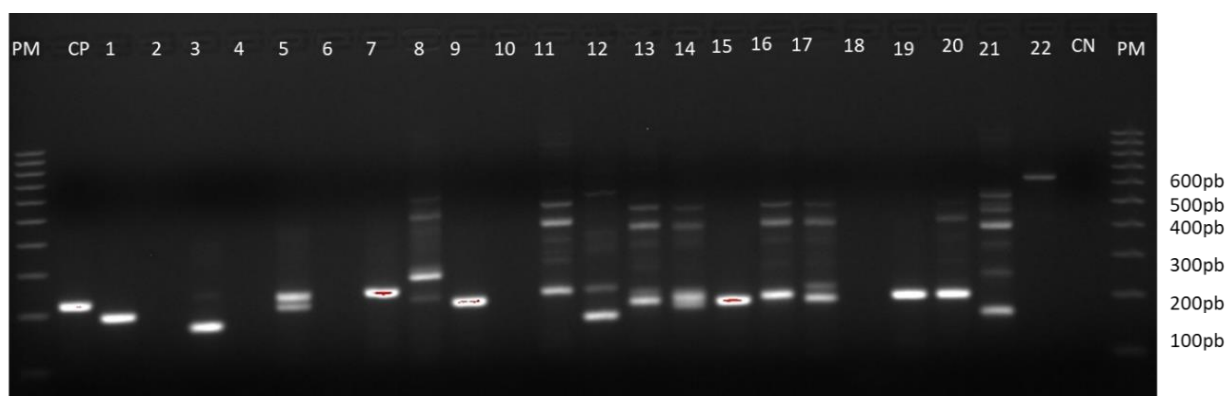


Figure 12 : Produit d'amplification de l'allèle MAD 20 dans le Fokontany d'Antsiradrano

PM : poids moléculaire ; **CP** : control positif MAD 20, **CN** : control négatif, **1 à 22** : ADN des sujets à Antsiradrano

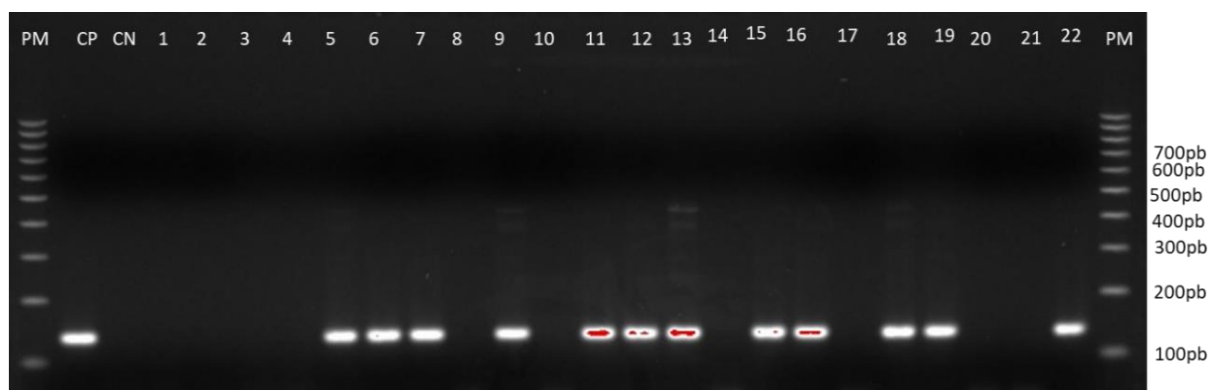


Figure 13 : Produit d'amplification de l'allèle RO33 du gène *msh-1* dans le Fokontany d'Andrafialava

PM : poids moléculaire ; **CP** : control positif RO33, **CN** : control négatif, **1 à 22** : ADN des sujets à Andrafialava

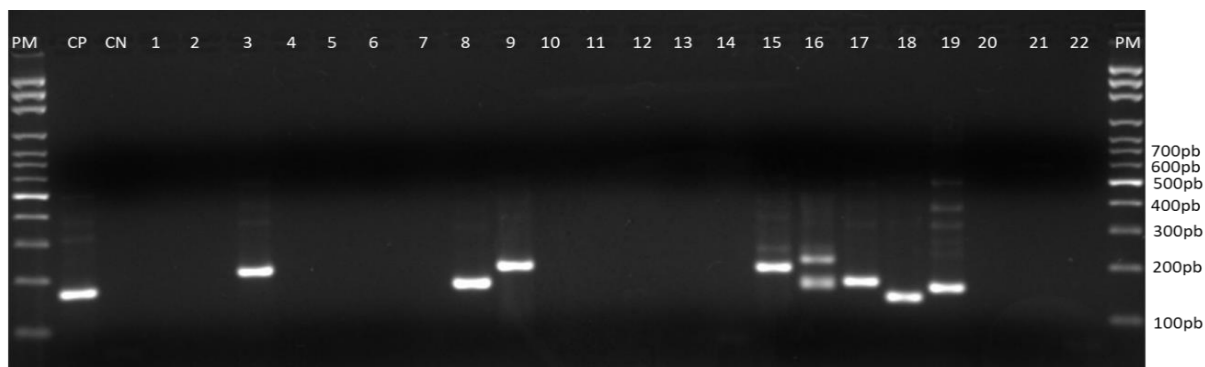


Figure 14 : Produit d'amplification de l'allèle K1 du gène *msp-1* dans le Fokontany d'Ambonarabe
PM : poids moléculaire ; **CP** : control positif K1, **CN** : control négatif, **1 à 22** : ADN des sujets à Ambonarabe

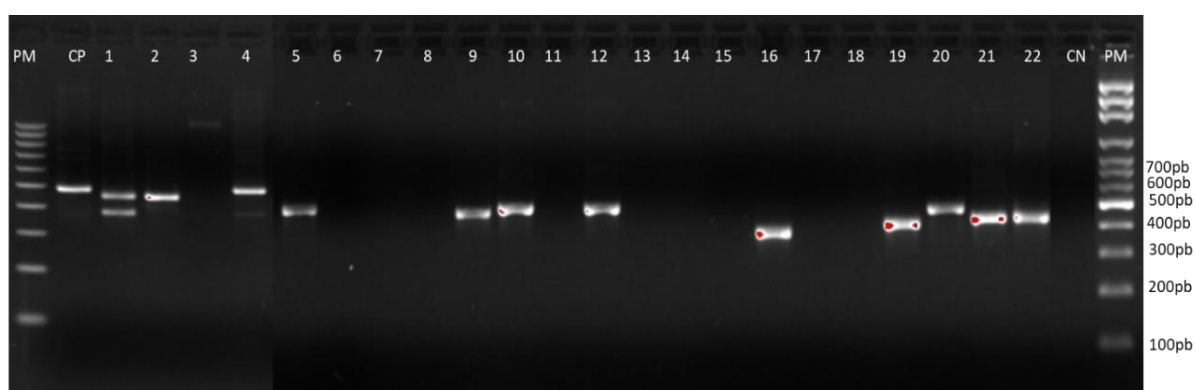


Figure 15 : Produit d'amplification de l'allèle FC27 du gène *msp-2* dans le Fokontany d'Andrafiabe
PM : poids moléculaire ; **CP** : control positif FC27, **CN** : control négatif, **1 à 22** : ADN des sujets à Andrafialava

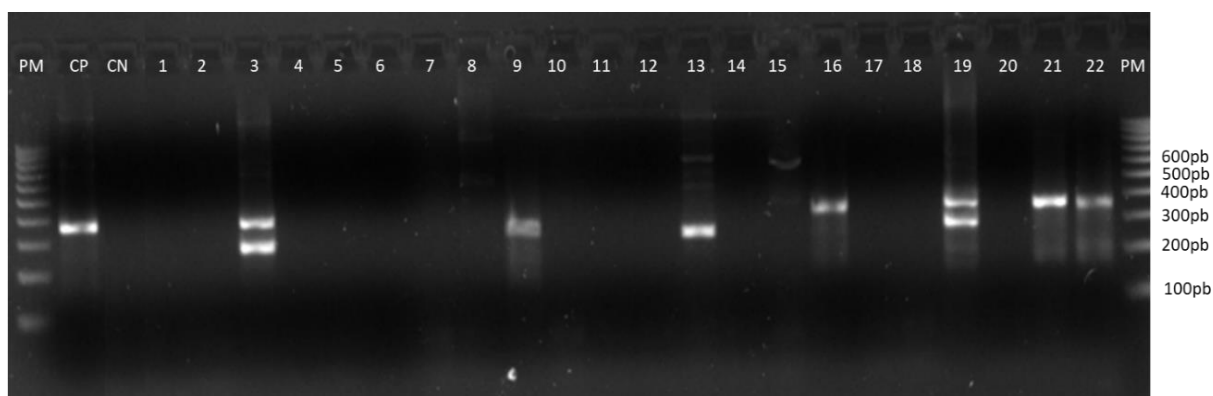


Figure 16 : Produit d'amplification de l'allèle 3D7 du gène *msp-2* dans le Fokontany d'Antsirasira
PM : poids moleculaire ; **CP** : control positif 3D7, **CN** : control négatif, **1 à 22** : ADN des sujets à Andrafialava

III.1.4.2.3 Polyclonalité de l'infection

Le nombre de génotypes par isolat était de 1 à 4 pour le gène *msp-1*. Pour le gène *msp-2*, il y avait 1 à 5 génotypes par isolat.

Pour le gène *msp-1*, la proportion globale d'infections multiples (IM) était de 52,69%. Les distributions de l'IM et de la complexité de l'infection (*COI*) selon l'âge des patients ont été présentées dans le tableau 4 .

Selon les tranches d'âges, la *COI* sont respectivement : 1,93 ; 1,89 et 1,75 pour moins de 5 ans, entre 5 à quinze ans et au-delà de 15 ans (Tableau 4). Les polyclonalités de l'infection définie comme étant la proportion des sujets ayant plus d'un clone de *P. falciparum* sont représentée sur les figures 17 et 18 (p. 36). Ainsi quel que soit l'âge, plus de 40 % (52,69% pour *msp-1* et 41,72% pour *msp-2*) des patients de l'échantillon étaient parasités par plus d'un clone de *P. falciparum* (Tableau 4).

Tableau 4 : Infections multiples

Tranche d'âge		< 5ans	>5-15 ans	>15ans	total	%
Nombre d'ADN		78	91	35	200	
<i>MSP1</i>	Monoclonale	40	37	11	88	47,31%
	Multiclonale	51	29	18	98	52,69%
	Total MSP1	91	66	29	186	100,00%
<i>MSP2</i>	Monoclonale	45	32	12	89	58,94%
	Multiclonale	32	19	12	63	41,72%
	Total MSP2	76	51	24	151	100,00%
<i>COI</i>		1,93	1,892	1,752	1,858	

D'une façon générale, la polyclonalité de l'infection en *msp-1* est maximale pour les sujets moins de 5 ans dans le Fokontany d'Andrafiabe alors qu'elle est faible dans le Fokontany d'Andrafiava (plus de 15 ans) (Figure 17, p. 34). Et de même dans ce Fokontany, les infections monoclonales sont élevées dans la tranche d'âge entre 5 et 15 ans.

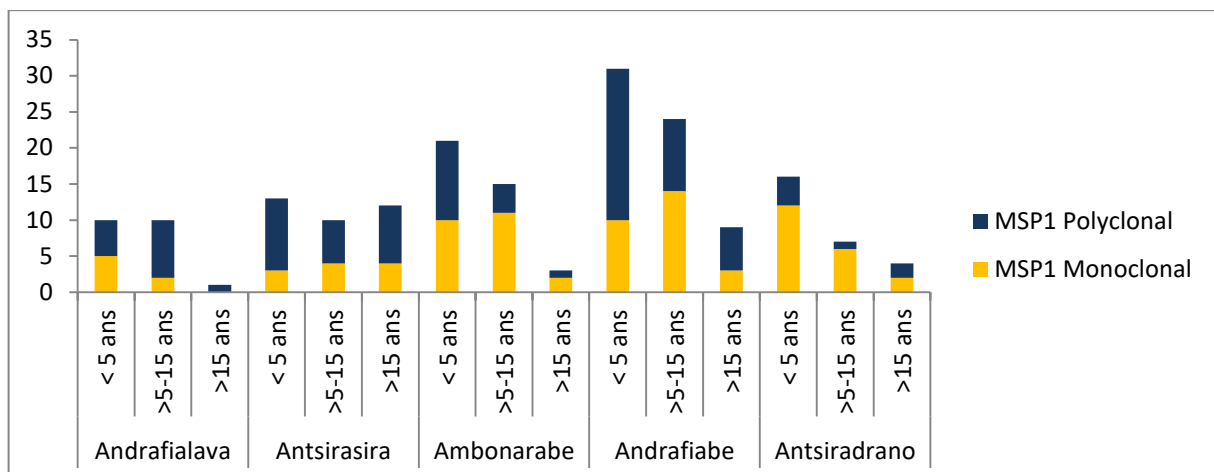


Figure 17 : Polyclonalité de l'infection du gène *msp-1* selon l'âge et la localisation géographique

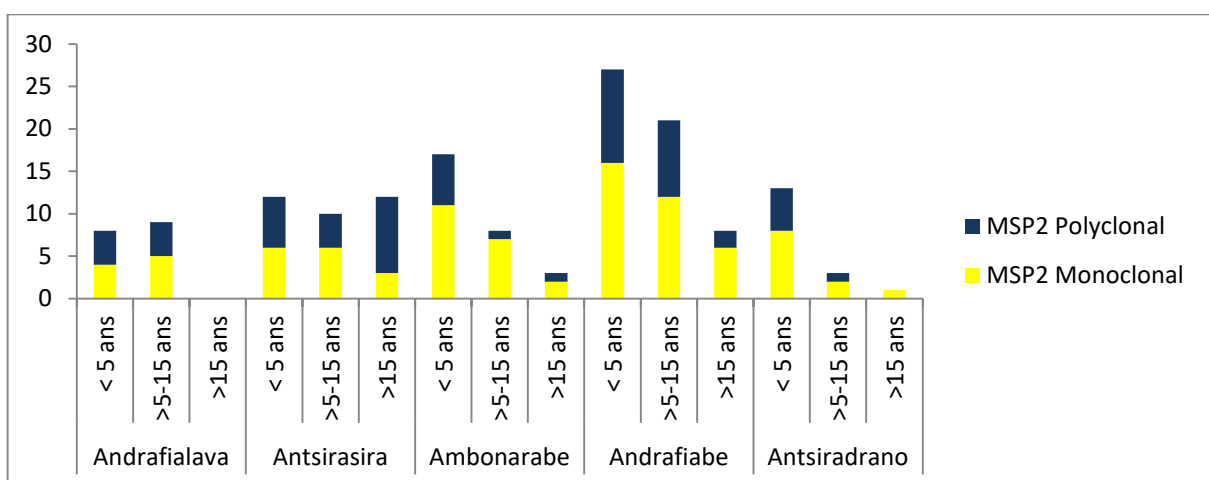


Figure 18 : Polyclonalité de l'infection du gène *msp-2* selon l'âge et la localisation géographique

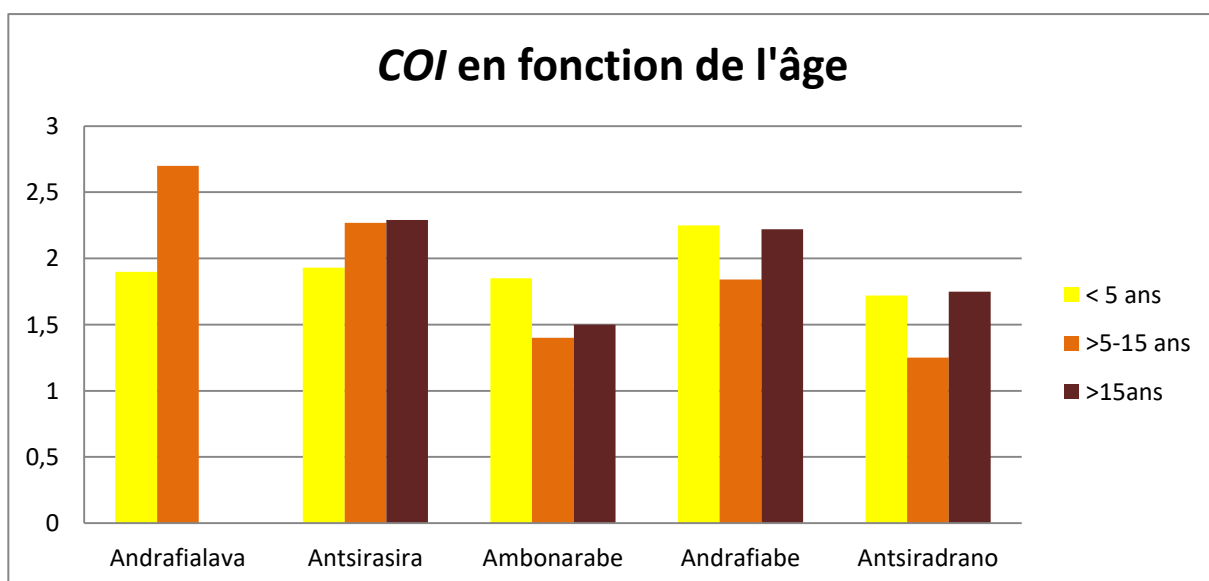


Figure 19 : COI en fonction de l'âge et localisation géographique

La COI dans le Fokontany d'Andrafiava atteint jusqu'à 2,7 sur la tranche d'âge de 5 à 15 ans.

III.2 DISCUSSIONS

III.2.1. EXTRACTION D'ADN

Il existe plusieurs types d'extraction d'ADN décrites dans la littérature. L'extraction par *Instagene Matrix* et l'extraction par les kits *Qiagen QIAamp* sont les deux principales méthodes d'extraction d'ADN utilisées dans le laboratoire du PNLP.

Dans cette étude, le kit *QIAamp Qiagen* a été utilisé pour extraire les ADN_s de parasites dans les confettis. Deux cent-vingt (220) prélèvements parmi les deux cent soixante (263) recueillis ont été analysés.

L'extraction est un succès parce que 90% (200/220) des échantillons sont sortis positifs lors du diagnostic d'espèces. Quatre échantillons qui étaient négatifs sur terrain avec le TDR sont positifs à *P. falciparum* lors du diagnostic moléculaire.

En outre, dans le but d'élargir les connaissances et les compétences dans le domaine de la biologie moléculaire, les 2 différentes techniques d'extraction de l'ADN parasitaire déjà décrites dans la littérature (extraction par la technique d'Instagene et extraction par les kits *Qiagen*) ont pu comparer. L'application de ces 2 différentes méthodes d'extraction a permis d'apprécier le rendement d'extraction beaucoup plus important avec le kit *Qiagen* comparés à la technique d'Instagene. Pour les amplifications avec les ADN extraits à l'aide d'Instagène, 5 µl d'ADN doit être utilisés alors que pour les ADN extraits à partir du Kit *QIAamp*, 3 µl d'ADN suffit. De plus, macroscopiquement, les ADN extraits selon le kit *QIAamp* est d'autant plus limpide que la méthode d'Instagène.

III.2.2. ESPECES PLASMODIALES

Le résultat des TDR réalisé sur terrain dans cette étude montre un taux de positivité élevé : 52%. Les résultats de la microscopie et la PCR nichée révèlent l'existence d'autres espèces autres que *P. falciparum* à savoir : *P. malariae* et *P. ovalae* dans la zone d'intervention (tableau 1, p.30). Aucun *P. vivax* n'est détecté. Ce résultat peut contribuer à la mise à jour du profil épidémiologique des espèces de *Plasmodium* à Madagascar.

III.2.3. LES GENES *MSP-1* ET *MSP-2* de *P. falciparum*

Pour caractériser la diversité génétique, 2 différents gènes ont été étudiés (*mSP-1* et *mSP-2*) qui codent pour des antigènes de surface, assumant différentes fonctions spécifiques dans le cycle de développement du parasite. Le choix de ces gènes se justifie par la volonté d'associer des gènes extrêmement polymorphiques. Les gènes *mSP-1* et *mSP-2* de *P. falciparum* sont actuellement recommandés dans les essais cliniques antipaludiques comme marqueurs standard pour distinguer les recrudescences des parasites et les nouvelles infections. En outre,

l'information sur la source de l'infection peut aussi être connue grâce à l'étude de ces 2 gènes. Cependant, d'après la littérature, très peu d'études ont été effectuées sur la diversité génétique de *P. falciparum* en amplifiant le gène *msp-1* et *msp-2* circulant dans de nombreux pays d'endémie. La présente étude vise à évaluer la diversité génétique et la fréquence allélique de *msp-1* et *msp-2* chez les parasites isolés de patients à Antsirasa.

III.2.4. DIVERSITE DES GENES *MSP-1* ET *MSP-2* DE *P. falciparum*

Pour le gène *msp-1*, d'une manière générale, les résultats (Tableau 2, p. 31) ont montré que les allèles appartenant aux trois familles K1, MAD20 et RO33 du gène *msp-1* étaient qualitativement présents dans tous les Fokontany. Cependant, la distribution semble être quantitativement différente. Ainsi, il a été noté une prédominance des allèles K1 du gène *msp-1* comparés aux allèles RO33 et MAD20 dans tous les Fokontany (Tableau 2, p. 31).

Ce résultat de distribution des allèles K1 du gène *msp-1* est soutenu par des études antérieures réalisées au Gabon (Missinou *et al.*, 2001 ; Aubouy *et al.*, 2003) et même au Honduras en Amérique (Haddad *et al.*, 1999).

En outre en analysant de façon plus détaillée, la fréquence des allèles individuels, nous avons noté une fréquence élevée des allèles K1 200 bp. La présence d'une taille unique d'allèle RO33 a été constatée.

L'analyse des familles alléliques du gène *msp-2* a montré une prédominance de sujets porteurs d'allèle 3D7. Cela a également été rapporté dans des études antérieures menées au Bénin (Issifou S. *et al.*, 2002). En analysant individuellement les allèles 3D7, l'allèle 350 pb avait la plus représentée.

III.2.5. MULTIPLICITE DE L'INFECTION A *P. falciparum*

La détection d'un seul fragment de PCR pour chaque locus a été classée comme une infection avec un génotype de parasite. La détection de plus d'un fragment PCR pour les locus *msp-1* ou *msp-2* (c'est-à-dire, une infection avec plus d'un génotype parasitaire) a été définie comme une infection multiple à *P. falciparum*. Le nombre de patients avec plus d'un génotype de parasite sur le nombre de population infectée a été défini comme la fréquence des infections multiples (IM). La complexité a été définie comme le nombre moyen de génotypes parasitaires par patient infecté (Peyerl-Hoffmann G. *et al.*, 2001).

Dans la présente étude, quel que soit l'âge, plus de 40 % (52,69% pour *msp-1* et 41,72% pour *msp-2*) des patients étaient parasités par plus d'un clone de *P. falciparum*.

D'après les résultats aucune différence significative n'a été notée au niveau de la complexité des infections entre les six Fokontany.

Le nombre de génotypes de *P. falciparum* varie de 1 à 5 par personne. L'absence de différence de la fréquence des infections multiples entre les 6 Fokontany pourrait s'expliquer par le niveau d'endémicité élevé lié à un taux d'inoculation assez élevé (zone endémique).

La présence élevée d'infections multiples constatées a été aussi décrite par Smith *et al.* (1999), qui ont rapporté en Tanzanie jusqu'à 5 génotypes différentes de *P. falciparum* par personne. Cependant, la fréquence élevée de génotypes multiples de *P. falciparum* dans cette zone contraste avec des études effectuées en Papouasie-Nouvelle-Guinée (PNG) où Felger *et al.* (1994), Engelbrecht *et al.* (1995), ont noté seulement un génotype par personne, rarement deux. Cette faible fréquence de génotypes multiples, s'expliquerait par le bas niveau de transmission du paludisme dans cette région (Engelbrecht *et al.*, 2000).

La limite de cette étude est que les fréquences alléliques et la diversité génétique rapportées peuvent avoir été estimées de manière incorrecte en raison de la limite de détection de la technique de PCR utilisée. Les allèles avec de courtes différences de longueur (moins de 10 pb) pourraient ne pas être clairement distingués comme des allèles séparés sur gel d'agarose, ce qui pourrait conduire à une mauvaise classification du génotype. De plus, un seul prélèvement sanguin peut ne pas être suffisant pour montrer toute la diversité des parasites portés par un individu, car les génotypes peuvent apparaître et disparaître en très peu de temps (Jafari-Guemouri S. *et al.*, 2006).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, le test de diagnostic rapide sur terrain, puis la microscopie et la PCR ont été réalisés pour confirmer la positivité et les espèces plasmodiales présentes dans les isolats avant d'entamer le polymorphisme. Cette étude représente les premières données effectuées sur la diversité génétique de population de *Plasmodium* dans la commune rurale d'Antsirasira, district de Besalampy de la région du Melaky appartenant au faciès tropical.

Les résultats obtenus démontrent la présence d'autres espèces de *Plasmodium* et une grande diversité de *P. falciparum* après l'amplification des gènes *msp-1* et *msp-2* chez les villageois d'Antsirasira et méritent d'être pris en compte pour évaluer les efforts dans la lutte contre le paludisme ultérieurement.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont la conséquence d'une utilisation rigoureuse de protocoles et techniques de travail établis. Cependant, il est important de rester continuellement informés au regard de l'évolution actuelle de nouvelles technologies. En effet, les méthodes de séquençage et des microsatellites, bien que coûteuses, offrent aujourd'hui d'énormes possibilités (Ndong Ngomo *et al.*, 2017) pour affiner les résultats de génotypage. Ces nouveaux outils constituent d'autres opportunités d'apprendre d'avantage en vue de répondre favorablement aux exigences scientifiques actuelles.

Nos perspectives seraient de :

- constituer une banque d'ADN au Laboratoire National de Lutte contre le paludisme,
- constituer une banque de données sur la diversité génétique du parasite du paludisme en poursuivant dans la limite des moyens disponibles la cartographie des gènes de polymorphisme,
- contribuer de façon efficace à la surveillance de la résistance du parasite aux antipaludiques par outil moléculaire,
- intégrer de nouveaux outils moléculaires comme le séquençage ou d'autres marqueurs génétiques comme les microsatellites, ce qui pourrait apporter plus de précision dans les méthodes utilisées,

REFERENCES BIBIOPGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abu Bakar S. (1997). Immunological and function properties of non-repeat region in *Plasmodium falciparum* antigen. Thèse, Stockholm : 41p.
2. AFEPM. (2014). Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie.
3. Aubouy A., Bakary M., Keundjian A., Mbomat B., Makita JR., Migot-Nabias F. Cot M., LE Bras J et Deloron P. (2003). "Combination of drug level measurement and parasite genotyping data for improved assessment of amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine efficacies in treating *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children." *Antimicrob Agents Chemother* 47(1) : 231-7.
4. Aubry P. (2014). Tests de diagnostic rapide par immunochromatographie en zones tropicales. *Médecine Tropicale*: 2-7.
5. Babiker H., Lines J., Hill WG et Walliker D. (1997). " Population structure of *Plasmodium falciparum* in village with different malaria endemicity in east Africa." *Am J Trop Med Hyg* 56 : 141-147.
6. Barber B.E., William T., Jikal M., Jilip J., Dhararaj P., Menon J. (2011). *Plasmodium knowlesi* malaria in children. *Emerg. Infect. Dis.* 17(5) :814.
7. Bejon P., Laura A., Hunt-Cooke A., Sanderson F., Gilbert S.C. And Adrian VS H. (2006). Thick blood film examination for *Plasmodium falciparum* malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density *Malaria Journal* 5 : 104.
8. Blanchy S., Rakotonjanambelo A., Ranaivoson, G., and Rajaonarivelo,V. (1993). Epidémiologie du paludisme sur les hautes terres malgaches depuis 1878. *Cahiers santé* 3 : 155-161.
9. Bowman S., Lawson D., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Churcher CM., Craig A., Davies RM., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Gwilliam R., Hamlin N., Harris D., Holroyd S., Hornsby T., Horrocks P., Jagels K., Jassal B., Kyes S., McLean J., Moule S., Mungall K., Murphy L., Oliver K., Quail MA., Rajandream MA., Rutter S., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston JE., Whitehead S., Woodward JR., Newbold C et Barrell BG. (1999). "The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*." *Nature* 400 : 532.
10. Boyle, M.J., Langer, C., Chan, J.A., Hodder, A.N., Coppel, R.L., Anders, R.F., Beeson, J.G. (2013). Sequential processing of Merozoite Surface Proteins during and after Erythrocyte Invasion by *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun*, 82 (3), 924-936.

11. Canier L, Khim N, Kim S, Sluydts V, Heng S, Dourng D, Eam R, Chy S, Khean C, Loch K, Ken M, Lim H, Siv S, Tho S, Masse-Navette P, Gryseels C, Uk S, Roey K V, Grietens K P, Sokny M, Thavrin B, Chuor C M, Deubel V, Durnez L, Coosemans M and Ménard D. (2013). An innovative tool for moving malaria PCR detection of parasite reservoir into the field. *Malaria Journal* 12 : 1-12.)
12. Craweley J, Chu C, Mtove G, Nosten F, (2010). Malaria in children. *Lancet* 375 : 1468-81.
13. Deitsch KW., Moxon ER et Wellems TE. (1997). "Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections." *Microbiology and_molecular Biology Reviews* 61 : 281-293.
14. Dondorp AM, Nosten F, Yi P. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2009 ; 361 : 455–467.
15. EIPM. (2016) : Enquête sur les Indicateurs du Paludisme à Madagascar.
16. EIPMD. (2013). Madagascar : Enquête sur les Indicateurs du Paludisme (MIS 2013), pp.33–45.
17. Engelbrecht F., Felger I., Genton B., Alpers M et Beck HP. (1995). "*Plasmodium falciparum*: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes." *Experimental Parasitology* 81 : 90-96.
18. Engelbrecht F., Tögel, E., Beck HP., Enwezor F., Oettli A et Felger I. (2000). "Analysis of *P.falciparum* infections in a village community in Northern Nigeria: determination of msp2 genotypes and parasites-specific IgG responses." *Acta Tropica* 74 : 63-71.
19. Felger I., Smith T., Edoh D., Kitua A., Alonso P., Tanner M and Beck H-P. (1999). "Multiple *Plasmodium falciparum* infection in Tanzanian infants." *Trans R Soc Trop_Med Hyg suppl* 1,93 : S1/29-S1/34.
20. Fenton B., Clark JT., Anjam Khan CM., Robinson JV., Walliker D., Ridley R., Scaife G et McBride JS (1991). " Structural and antigenic polymorphism of the 35 to 48 kilo Dalton merozoite surface protein (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Molecular and Cell Biology* 11 : 963-974.
21. Ferreira, M.U., Hartl, D.L. (2007). *Plasmodium falciparum* : worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2). *Exp Parasitol*, 115 :32–40.

22. Flegg JA, Guerin PJ, White NJ, Stepniewska K. (2011). Standardizing the measurement of parasite clearance in *falciparum* malaria : the parasite clearance estimator. *Malar J* ; 10 : 339.
23. Gardner JM., Neil Hall, Eula F., Owen W., Matthew B., Richard WH., Jane MC., Arnab P., Karen EN., Sharen B., Ian TP., Keith J., Jonathan AE., Kim R., Steven LS., Alister C., Sue K., Man-Suen C., Vishvanath N., Shamira JS., Bernard S., Jeremy P., Sam A., Mihaela P., Jonathan A., Jeremy S., Daniel H., Michael WM., Akhil BV., David Martin MA., Alan HF., Martin JF., David SR., Stuart AR., Geoffrey IM., Leda MC., Mani Subramanian G., Chris Mungall., Craig VJ., Daniel JC., Hoffman SL, Chris N., Ronald WD., Fraser CM et Bart B. (2002). "Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Nature* 419 : 498-511.
24. Gardner MJ., Tettelin H., Carucci DJ., Cummings LM., Aravind L., Koonin EV., Shallom S. Mason T., Yu K., Fujii C., Pederson J., Shen K., Jing J., Aston C., Lai Z., Schwartz DC., Pertea M., Salzberg S., Zhou L., Sutton GG., Clayton R., White O., Smith HO., Fraser CM., Adams MD., Venter JC et Hoffman SL. (1998). "Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Science* 282 : 1126-1132.
25. Haddad D., Snounou G., Mattei D., Enamorado IG., Figueroa J., Stahl S et Berzins K. (1999). Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras. *Am J Trop Med Hyg* 60(1) : 30-4.
26. Hoffman SL., Bancroft WH., Gottlieb M., James SL., Burroughs EC., Stephenson JR et Morgan MJ. (1997). "Funding for malaria genome sequencing." *Nature*: 387: 647.
27. Issifou, S. Djikou, A. Sanni, F. Lekoulou, and F. Ntoumi, "Pas d'influence de la saison de transmission ni de l'âge des patients sur la complexité et la diversité génétique des infections dues à *Plasmodium falciparum* à Cotonou (Bénin)," *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, vol. 94, no. 2, pp. 195–198. (2001). View at: Google Scholar
28. Jafari-Guemouri, C. Boudin, N. Fievet, P. Ndiaye, and P. Deloron. (2006). "*Plasmodium falciparum* genotype population dynamics in asymptomatic children from Senegal," *Microbes and Infection*, vol. 8, no. 7, pp. 1663–1670.
29. Joncour G. (1956) The fight against malaria in Madagascar (in French). *BullWorld Health Organ*.15 :711–23.
30. Julvez, J. (1995). Historique du paludisme insulaire dans l'océan Indien (partie sud-ouest) Une approche éco-épidémiologique. *Cahiers d'études et de recherches francophones / Santé*, 5(6), pp.353–358.

31. Kanunfre, K.A., Léoratti, F.M.S., Hoffmann, E.H.E., Durlacher, R.R., Ferreira, A.W., Moraes Avila, S.L., Ferreira, M.U. (2003). Differential Recognition of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 2 Variants by Antibodies from Malaria Patients in Brazil. *Brazilian Society for Microbiology*, Vol 10 (5), 973-976.
32. Kemp D. (1992). "Antigen diversity and variation in blood stages of *P. falciparum*." *Immunology and Cell Biology* 70 : 201-207.
33. Laferi H, Kandel K, Pichler H. (1997). False-positive dipstick tests for malaria. *N Engl J Med* 337 :1635–6.
34. Manuel de formation sur le diagnostic microscopique du paludisme, DLP (2016), OMS (2009)
35. Marcelo U., Weber LR., Angela PT., Fumihiko K et Stephen MR. (2003). "Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*." *Gene* 304 : 65-75.
36. Marshall V., Anthony RL., Bangs PMJ., Anders RF et Coppel RL. (1994). "Allelic variants of *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2 (MSP-2) in geographically restricted area of Irian Java." *Molecular and Biochemical Parasitology* 63 : 13-21.
37. Mawili-Mboumba D P., Bouyou-Akotet M K., Mbouoronde C O and Kombila M. (2013). Analysis of malaria diagnosis discrepancies between RDTs and microscopy by nested PCR. *J. Biomedical Science and Engineering* 6: 967-972.
38. Mbakilwa H., Manga C., Kibona S., Mtei F., Meta J., Shoo A. (2012) *et al.* Quality of malaria microscopy in 12 district hospital laboratories in Tanzania. *Pathog Glob Health*. 106 :330–4.
39. McKenzie FE., Sirichaisinthop J., Miller RS., Gasser RA Jr., Wongsrichanalai C. (2003). Dependence of malaria detection and species diagnosis by microscopy on parasite density. *Am J Trop Med Hyg.* 69 :372-6.
40. Ménard, D., Barnadas, C., Bouchier, C., Henry-Halldin, C., Gray, L.R., Ratsimbao, A., Thonier, V., Carod, J.-F., Domarle, O., Colin, Y., Bertrand, O., Picot, J., King, C.L., Grimberg, B.T., Mercereau-Puijalon, O., and Zimmerman, P.A. (2010). *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13), pp.5967–71.
41. Meyer CG., May J., Arez AP., Gil JP et Rosario V. (2002). "Genetic diversity of *P. falciparum*: asexual stages." *Tropical medicine and International Health*, 7: 395-408.

42. Miller LH., Roberts T., Shahabuddin M. et McCutchan TF. (1993). "Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1)." *Molecular and Biochemical Parasitology* 59: 1-4.
43. Missinou M., Kun JF., Lell B et Kremsner PG. (2001). Change in *Plasmodium falciparum* genotype during successive malaria episodes in Gabonese children. *Parasitol Res* 87(12): 1020-3.
44. Mita T, Tanabe K, Kita K. (2009) Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int* ; 58 : 201–209.
45. Mouchet J. (1996). L'écologie du paludisme, pp.253-269, Populations et environnement dans le pays du sud.KARTHALA.CEPED, Paris. 31. Mouchet J. and Blanchy S. (1995). Particularities and stratification of malaria in Madagascar. *Santé Nov-Dec* 5(6) : 386-388.
46. Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard Lenoble D., and Sircoulon J. (2004). Biodiversity of malaria worldwide, John Libbey Eurotext, Paris pp. 428.
47. Ohrt C., Purnomo Sutamihardja M.A., tang D., Kain C. (1998). Impact of microscopy error on estimates of protective efficacy in malaria-prevention trials ; *J Infect Dis* . 186:540-6.
48. OMS (2016). Rapport sur le paludisme dans le monde.
49. OMS (2018). Rapport sur le paludisme dans le monde.
50. Oyebola M. K., Idowu E. T., Olukosi Y. A. (2014). "Genetic diversity and complexity of *Plasmodium falciparum* infections in Lagos, Nigeria," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 4, supplement 1, pp. S87–S91.
51. Perkins M D and Bell D R. 2008. Working without a blindfold: the critical role of diagnostics in malaria control. *Malaria Journal* 7 : 5.
52. Pina J.J., Garnotel E., Hance P., Vedy S., Rogier C., Morillon M. (2007). :Diagnosis of imported malaria in France. *Medecine et Maladies infectieuses* 37 710-715
53. Plan Stratégique National de Lutte Contre le paludisme, 2013-2017.Rakotonjanabelo, L.A., 1995.
54. Répartition géographique du paludisme dans le monde depuis l'année 2000 (OMS, 2015)
55. Scolpel KKG., Fontes CJF., Nunes AC., Horta MdF., Braga EM. (2004).: Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malar Journal*, 3 : 8.

56. Singh B, Cox-Singh J, Miller A O, Abdullah M S, Snounou G and Rahman H A. (1996). Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter-paper. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 519-521.
57. Situation du paludisme à Madagascar. *Cahiers d'études et de recherches francophones / Santé*, 5(6), pp.358–362.
58. Smyth J., Coppel RL., Dary KP., Martin RK., Oduola AMJ., Kemp DJ et Anders RF. (1991). Structure diversity in the *P. falciparum* merozoite surface antigen 2. *Proc. Natl. Acad. Science* 88 : 1751-1755.
59. Snewin V., Herrera M., Sanchez G., Scherf A., Langsley G et Herrera S. (1991). "Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in *Plasmodium falciparum* wild isolates from Colombia." *Molecular and Biochemical Parasitology* 49: 265-276.
60. Snounou G et Beck HP. (1998). The Use of PCR Genotyping in the Assessment of Recrudescence or Reinfection after Antimalarial Drug Treatment. *Parasitology Today* 14 (11) : 462-467.
61. Snounou G., Viriyakosol S., Zhu XP., Jarra W., Pinheiro L., do Rosario VE., Thaithong S., Brown KN. (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 61 : 315-320.
62. Societe des Nations. (1939). *Le Paludisme en Afrique Madagascar*.
63. Somé T., Bazié T., Zongo I., Yerbanga, R.S., Nikiéma, F., Neya, C., Taho, L.K., Ouédraogo, J.B. (2018). *Plasmodium falciparum Msp1 and Msp2*, genetic diversity and allele frequencies in parasites isolated from symptomatic malaria patients in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso p 3.
64. Tanabe, K., Sakihama, N., Kaneko, O., Saito-Ito, A., Kimura, M. (1999). A PCR Method for Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* MSP-1. *Tokai ExpClinMed.*, Vol. 23 (6), 375-381.
65. Thomas A., Carr DA., Carter JM et Lyon JA. (1990). Sequence comparison of allelic forms of the *P. falciparum* merozoite surface antigen MSA-2. *Molecular and Biochemical Parasitology* 43 : 211-220.
66. Trape JF, Pison G, Spiegel A. (2020). Combating malaria in Africa. *Trends Parasitol* ; 18 : 224–230.
67. Triglia T., Wellems TE et Kemp DJ. (1992). Towards a high resolution map of the *P. falciparum* genome. *Parasitology Today* 8: 225-229.

68. Wilson, D.B. (1947). Malaria in Madagascar. East African medical journal, 24(4), pp.171–6.
69. World Health Organization. World malaria report 2013. Geneva : OMS (2014).

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

1. <https://www.who.int/campaigns/world-health-day/2018/key-messages/fr/>
2. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
3. www.cdc.gov/malaria/about/biology/

ANNEXES

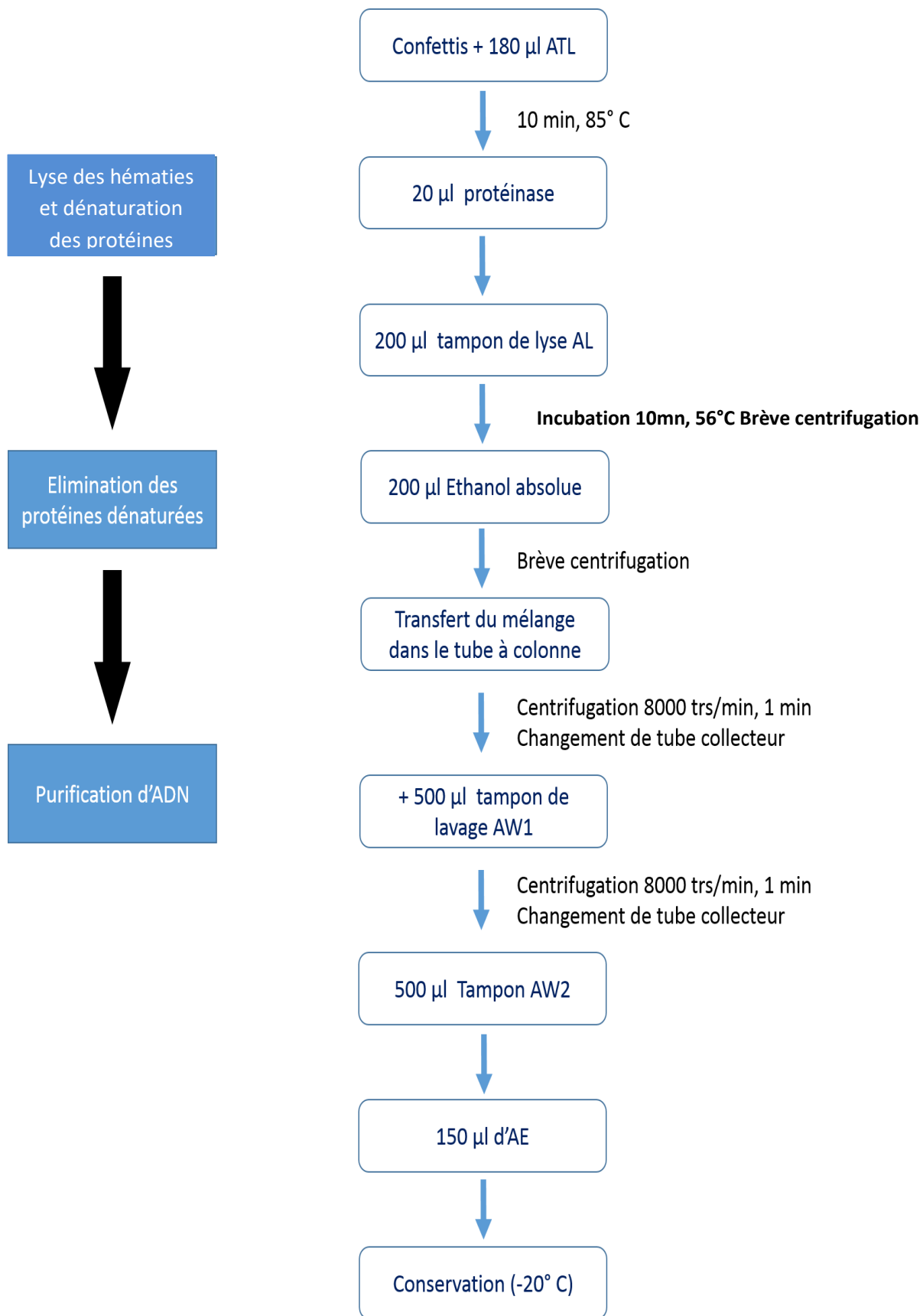
ANNEXES

Annexe 1 : Liste de matériels, consommables pour PCR

SALLE	Matériels/Equipements	Consommables et réactifs
Extraction	<ul style="list-style-type: none"> - Congélateur - 20°C - Hotte munie de lumière blanche et de lumière ultra- violet - Centrifugeuse - Portoir - Pipettes à piston : P2, P10, P20, P100, P200 et P1000 - Vortex - Poubelle de table sèche - 4 Stylos feutre permanent de couleurs différentes 	<ul style="list-style-type: none"> - Gants - microtubes treff 1.5 ml stériles - Microtubes individuels assorties 200µl - Pissette d'eau de javel - Pissette d'alcool 70° - Cônes à filtres stériles - DNA Away - KIT qIAGEN
Mix	<ul style="list-style-type: none"> - Petit Congélateur - 20°C - Hotte munie de lumière blanche et de lumière ultra- violet - Portoir - Micropipettes à piston : P10, P20, P100, P200 et P1000 - Vortex - Microcentrifugeuse à rotor compatible avec les tubes 1.5 ml et 2ml - Microcentrifugeuse équipée d'un rotor compatible avec les microtubes en barrettes 	<ul style="list-style-type: none"> - Tubes treff 1.5 ml stériles - Poubelle de table sèche - Cônes à filtres stériles - Microtubes en barrettes - Pissette d'eau de javel - Pissette d'alcool 70% - Papier essuie- tout - Eau distillée - MgCl₂ 25 mM - dNTP 10 µM - Tampon Buffer PCR 10X - Amorces - <i>Taq polymerase</i> 5U/µl - DNA Away
Amplification	<ul style="list-style-type: none"> - Congélateur - 20°C - Hotte munie de lumière blanche et de lumière ultra- violet - Thermocycleur 	<ul style="list-style-type: none"> - Tubes treff 1.5 ml stériles - Gants - 4 Stylos feutre permanent de couleurs différentes

	<ul style="list-style-type: none"> - Portoir - Micropipettes à piston : P10, P20, P100, P200 et P1000 - Micropipette multicanaux - Vortex - Centrifugeuse à rotor compatible avec les tubes 1.5 ml et 2 ml - Poubelle de table sèche 	<ul style="list-style-type: none"> - Cônes à filtres stériles - <i>DNA Away</i> - Pissette d'eau de javel - Pissette d'alcool 70%
Electrophorèse	<ul style="list-style-type: none"> - Gel Scan - Ordinateur - Cuve à électrophorèse - Générateur de tension et câbles de connexion à la cuve - Masque et lunette - Supports de gel et peignes - Cuillère pour pesage - Balance de précision - Four à micro-ondes - Portoir - Pipettes à piston : P2, P10, P20, P100, P200 et P1000. - Vortex - Eprouvettes graduées : 10ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml, 2000ml. - Becher - Scalpel - Extracteur d'air. 	<ul style="list-style-type: none"> - Gants nitrile - Pissette d'alcool 70% - Papier essuie-tout - Papier Aluminium - Parafilm - Pointes sans filtres stériles - Pointes à filtres stériles - Poubelle de table sèche - <i>DNA away</i> - Amplicons - Eau distillée - Tampon Tris Borate <i>EDTA</i> Buffer 10x - Poudre d'Agarose - Bromure d'ethyidium 10 mg/ml - Bromophenol Blue sodium salt (poudre) ou 6x Gel Loading Buffer w/30mM EDTA (pret a l'emploi) - Marqueur de Poids moléculaire

Annexe 2 : Extraction d'ADN selon QIAamp Qiagen



Annexe 3 : Caractéristiques des amorces utilisées pour la détection des espèces plasmodiales

Cinq couples d'amorces ont été utilisés pour la détection d'espèces plasmodiales. Le premier couple d'amorce (RPlu5/RPlu6) utilisé est un couple d'amorce commun aux quatre espèces plasmodiales, tandis que *Rfal1/rafal2*, *Rmal1/Rmal2*, *Rov1/Rov2* et *Rviv1 et Rviv2* sont spécifiques à chaque espèce.

Objectif : diagnostic d'espèce plasmodiale par amplification suivi d'une nested PCR d'un fragment du gène *18S rRNA*

Amorces	Séquences	Taille attendue (pb)
RPLU5	5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTCC-3'	800
RPLU6	5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'	
RFAL1	5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATAT-3'	205
RFAL2	5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCC-3'	
RVIV1	5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGA-3'	117
RVIV2	5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTC-3'	
RMAL1	5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAAC-3'	144
RMAL2	5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATAC-3'	
ROVA1	5'-ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGA-3'	787
ROVA2	5'-GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTA-3'	

Annexe 4 : Amorces pour la détermination des allèles sur la diversité génétique de Pf des gènes *msp-1* et *msp-2*

Objectif : étude de polymorphisme de *P. falciparum* par PCR-nested des gènes *MSP1* et *MSP2* (pour distinguer la recrudescence d'une nouvelle infection et diversité génétique de *P. falciparum*)

Amorces	Séquences	Taille attendue (pb)
MSP1-F	5'-CACATGAAAGTTATCAAGAACTTGTC-3'	633
MSP1-R	5'-GTACGTCTAATTCATTTGCACG-3'	
K1-F	5'-GAAATTACTACAAAAGGTGCAAGTG-3'	204
K1-R	5'-AGATGAAGTATTTGAACGAGGTAAGTG-3'	
MAD20-F	5'-GAACAAGTSGAACAGCTGTTA-3'	167
MAD20-R	5'-TGAATTATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGA-3'	
RO33-F	5'-GCAAATACTCAAGTTGTTGCAAAGC-3'	160
RO33-R	5'-AGGATTTGCAGCAYCTGGAGATCT-3'	
MSP2-F	5'-ATGAAGGTAATTAACACATTGTCCTATTATA-3'	811
MSP2-R	5'-ATATGGCAAAGATAAAACAAGTGTGCTG-3'	
3D7-F	5'-GCAGAAAGTAAKGCCTYTCTACTGGTCT-3'	214
3D7-R	5'-GATTTGTTTCGGCATTWTTATGA-3'	
FC27-F	5'-GCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAG-3'	447
FC27-R	5'-GCTTTGGGTCCTTCTTCAGTTGATTC-3'	

Annexe 5 : Tableau de composition du mélange réactionnel pour la PCR1 (diagnostic genre)

Réactif	Quantité pour 1 tube (µl)	Concentration finale
Tampon 5X	5	1X
MgCl ₂ 25mM	2.5	2.5
dNTP (10mM)	2.5	400 µM
RPLU 5	1	0.25 µM
RPLU 6	1	0.25 µM
Eau stérile	7.75	-
TaqPolymerase 1	0.25	1.25U
DNA	3	

Annexe 6 : Tableau de composition du mélange réactionnel pour la PCR2 multiplex (diagnostic d'espèces)

Réactif	Quantité pour 1 tube (µl)	Concentration finale
Tampon 5X	5	1X
MgCl ₂ 25mM	2.5	2.5
dNTP (10mM)	2.5	100 µM
RFAL1	0.5	0.25 µM
RFAL2	0.5	0.2 µM
RVIV1	0.5	0.2 µM
RVIV2	0.5	0.2 µM
RMAL1	0.5	0.2 µM
RMAL2	0.5	0.2 µM
ROV1	0.5	0.2 µM
ROV2	0.5	0.2 µM
Eau stérile	8.75	-
Taq polymerase (5U/µl)	0.25	1.25U
Amplicons	1	

Annexe 7 : Tableau de composition du mélange réactionnels pour le typage des gènes *m*sp-1 et *m*sp-2 (PCR1)

Réactif	Quantité pour 1 tube (µl)	Concentration finale
Tampon 5X	5	1X
MgCl ₂ 25mM	2.5	2.5
dNTP (10mM)	2.5	400 µM
Amorce-F	1.25	0.5 µM
Amorce-R	1.25	0.5 µM
Eau stérile	7.25	
Taq Polymerase 1	0.25	1.25U
ADN	3	

Annexe 8 : Tableau de composition du mélange réactionnel pour le typage des gènes *msp-1* et *msp-2* (PCR2 : K1, MAD20, RO33 ,3D7 et FC27)

Réactif	Quantité pour 1 tube (µl)	Concentration finale
Tampon 5X	5	1X
MgCl ₂ 25mM	2.5	2.5
dNTP (10mM)	2.5	400 µM
Amorce-F	1	0.4 µM
Amorce-R	1	0.4 µM
Eau stérile	11.75	
Taq Polymerase 1	0.25	1.25U
Amplicons	1	

Annexe 9 : Tableau du profil thermique des amplifications

PROGRAMME PCR	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale	Nombre de cycles	Taille attendue (pb)
PCR1 (genre)	94°C, 5min	94°C, 30 sec	55°C, 1 min	72°C, 3 min	72°C, 10 min	40	
PCR2 (espèces)	94°C, 5 min	94°C, 30 sec	62°C, 1 min	72°C, 3 min	72°C, 10 min	40	Pf : 205 Pv : 144 Pm : 120 Po : 787
PCR1 MSP1	95°C, 5 min	95°C, 1 min	55°C, 2 min	72°C, 2 min	72°C, 10 min	30	633
PCR MAD20	94°, 5 min	94°, 30s	60,5, 30s	72°C, 40s	72°C, 5min	30	120-250
PCR RO33	94°, 5 min	94°, 30s	60,5, 30s	72°C, 40s	72°C, 5min	30	160
PCR K1	94°, 5 min	94°, 30s	62°C, 30s	72°C, 40s	72°C, 5min	30	160-300
PCR1 MSP2	94°, 5 min	94°, 30s	60°C, 40s	72°C, 60s	72°C, 5min	30	811
PCR 3D7	94°, 5 min	94°, 30s	55°C, 40s	72°C, 60s	72°C, 5min	30	150-350
PCR FC27	94°, 5 min	94°, 30s	60°C, 40s	72°C, 60s	72°C, 5min	30	300-600

Annexe 10 : Photo du *Thermocycler (Thermal cycler C 1000 Touch)*



Annexe 11 : Appareils d'électrophorèse pour le dépôt et migration des amplicons de PCR



(Cuve avec gel contenant les amplicons et circuit d'électrophorèse avec cuve connecté au générateur)

Source : laboratoire PNLN, 2019

Annexe 12 : Photo du *Gel scan BIO-RAD molecular imager*



Source : laboratoire PNLN, 2019

Annexe 13 : Poster présenté lors de la conférence *MIM*, Dakar 2018

Population genetics analysis of *Plasmodium falciparum* in Madagascar

Stéphane Rabearimanana, Fanomezantsoa Ralinoro, Oméga Raobela, Rogelin Raherinjafy, Tiavina Rakotomanjaka, Michel Marolahy, Tovonahary Angelo Rakotomanga, Valérie Andriantsoanirina, Arsène Ratsimbaoa

National Malaria Control Programme Madagascar

Contact: srabearimanana@gmail.com



Introduction

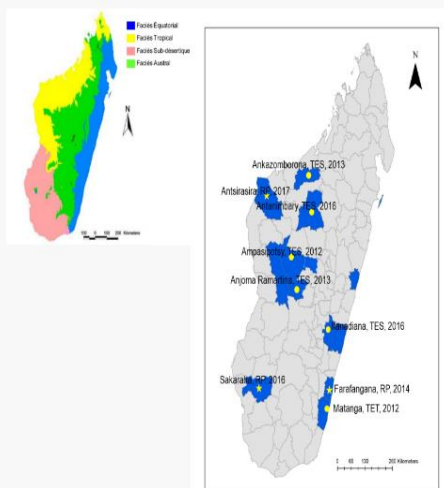
Despite continuous efforts against malaria, *Plasmodium falciparum* is still endemic in Madagascar, mainly on the coasts. Recently, some epidemics were reported in remote rural areas. The characterization of malaria parasite populations circulating in a given area may be used to evaluate the impact of malaria interventions. It is very important to evaluate any malaria control intervention with genetic diversity and multiplicity of infection (MOI). The MOI or mean number of parasite genotype per infected individual is a tool to assess the level of the semi immunity in individuals and the level of malaria transmission in endemic areas. The aim of this study was to better characterize the population genetics of *P. falciparum* parasites involved in the current transmission of malaria in Madagascar.

Methods

P. falciparum samples were obtained from therapeutic efficacy assays or patients during malaria epidemics in years 2012-2017. Malaria cases were determined on the basis of blood smears microscopy and/or rapid diagnostic tests. Filter paper blood spots were collected. DNA was extracted and parts of *msp1* and *msp2* genes were amplified by nested PCR.

Results

Samples were collected from 708 individuals with uncomplicated malaria. Alleles of the three families of *msp1* (MAD20, RO33, K1) and/or the two families of *msp2* (3D7 and FC27) were observed among the isolates in 9 study areas. Results were interpretable for *msp1* gene in 617 cases out of 708 (87.3%) with a predominance of alleles of the K1 allelic family. Results were interpretable for *msp2* gene in 426 cases out of 708 (65.3%) with a balanced proportion of alleles of 3D7 and FC27 families. Out of 617 samples, 47.6% and 28.8% appeared multiclonal on the basis of the analysis of *msp1* gene and *msp2* gene, respectively. In all, the multiplicity of infection (MOI) was, in mean, 1.85 (95% IC: 1.67-2.02). There was a significant difference of the MOI between north-west and centre-west study areas ($p=0.005$). Neither parasite density nor age was related to MOI.



Conclusion

The present study is the first in the last decade to provide information about genetic diversity of *P. falciparum* in Madagascar. MOI and genetic diversity of *P. falciparum* infections could be a reflection of the disease transmission rate. The relatively low MOI observed in the majority of studied sites reflected probably the low intensity of malaria transmission. MOI and genetic diversity could also be in relation with the clinical outcome of malaria episodes. These results advocate for the implementation of a follow-up of plasmodial populations at a regional scale to monitor the efficiency of malaria control and elimination interventions

Name : RABEARIMANANA
Surname : Maminirina Stéphane
Title : genetic diversity of *Plasmodium falciparum* population based on the *msp-1* and *msp-2* genes in the rural commune of Antsirasira, besalampy district, Melaky region

ABSTRACT

The rapid diagnostic test (RDT) and microscopy represent the main diagnostic tools for malaria in Madagascar. Molecular diagnosis by PCR results in a higher degree of sensitivity and specificity.

The objectives of this thesis consist in (i) confirming the positivity (by RDT and by microscopy) or not and in determining the plasmodial species responsible for malaria in the study area detected by microscopy and (ii) collecting usable data on population genetic diversity of *Plasmodium falciparum* based on the *msp-1* and *msp-2* genes.

Thus after the descent on the ground (realization of TDR, preparation of GE_FM, and of BDS), readings of slides to determine the plasmodial species and the parasite density followed by molecular biology (confirmation of *Plasmodium* species and genotyping of *Plasmodium falciparum* population) were carried out in the rural commune of Antsirasira, Besalampy district, Melaky region at the PLNP laboratory to have a reliable and usable database.

A total of 220 samples were extracted using the QIAamp QIAGEN extraction method, 200 samples are positive for *Plasmodium falciparum* by nested PCR targeting the 18S rRNA gene and are genotyped using the *msp-1* genes and *msp-2*. The most common allelic family in the population is 3D7 (31,79%) followed by FC27 (27,15%) and K1 (23,12%). The rarest allelic families are MAD20 (17,20%) and RO33 (6.45%). The multiplicity of infections is measured by the MOI, the number of clones varies from 1 to 5 clones per patient. 47,31% of infections are monoclonal against 52,69 (polyclonal) for *msp-1* while 58.94% are polyclonal against 41,72% for *msp-2*.

This thesis encompasses the first data concerning the genetic diversity of *Plasmodium falciparum* population in this facies and may serve as a means to assess malaria control later.

Keywords : RDT, Microscopy, PCR, *P. falciparum*, *msp-1* and *msp-2*, Malaria, Madagascar
Advisors : Docteur RAZAFIARIMANGA Zara Nomentsoa
Professeur RATSIMBASOA Arsène

Nom : RABEARIMANANA
Prénoms : Maminirina Stéphane
Titre : Diversité génétique du *Plasmodium falciparum* en basant sur les gènes *msp-1* et *msp-2* dans la commune rurale d'Antsirasira, district de Besalampy, région Melaky

RESUME

Le test de diagnostic rapide (TDR) et la microscopie représentent les principaux outils de diagnostic du paludisme à Madagascar. Le diagnostic moléculaire par PCR permet d'obtenir un degré de sensibilité et une spécificité plus élevée.

Les objectifs de ce mémoire consistent à (i) confirmer la positivité (par TDR et par microscopie) ou non et à déterminer les espèces plasmodiales responsables du paludisme dans la zone d'étude détectées par la microscopie et (ii) collecter des données exploitables sur la diversité génétique de population de *Plasmodium falciparum* en basant sur les gènes *msp-1* et *msp-2*.

Ainsi après la descente sur terrain (réalisation de TDR, confection de GE_FM, et de BDS), des lectures de lames pour déterminer les espèces plasmodiales et la densité parasitaire suivies de la biologie moléculaire (confirmation des espèces *Plasmodium* et génotypage de population de *Plasmodium falciparum*) ont été effectuées dans la commune rurale d'Antsirasira, district de Besalampy, région Melaky au laboratoire du PLNP pour avoir une base de données fiable et exploitable.

Au total, 220 échantillons ont été extraits en utilisant la méthode d'extraction *QIAamp QIAGEN*, 200 échantillons sont positifs à *Plasmodium falciparum* par PCR nichée en ciblant le gène de l'ARNr 18S et font l'objet de génotypage en utilisant les gènes *msp-1* et *msp-2*. La famille allélique la plus fréquente dans la population est 3D7 (31,79%) suivie de FC27 (27,15%) et K1 (23,12%). Les familles alléliques les plus rares sont MAD20 (17,20%) et RO33 (6,45%). La multiplicité des infections est mesurée par le *MOI*, le nombre de clones varie de 1 à 5 clones par patient, 47,31% des infections sont monoclonales contre 52,69 (polyclonales) pour *msp-1* alors que 58,94% sont polyclonales contre 41,72% pour *msp-2*.

Ce mémoire englobe les premières données concernant la diversité génétique de population de *Plasmodium falciparum* dans ce faciès et peut servir un moyen pour évaluer la lutte contre le paludisme ultérieurement.

Mots-clés : TDR, Microscopie, PCR, *P. falciparum*, *msp-1* et *msp-2*, Paludisme, Madagascar

Encadreurs : Docteur RAZAFIARIMANGA Zara Nomentsoa

Professeur RATSIMBASOA Arsène