

Ac : Anticorps
ADN : Acide désoxyribonucléique
Ag : Antigène
AL : Artéméther-Luméfantrine
ASAQ : Amodiaquine-Artésunate
ASMQ : Artésunate-Méfloquine
ASSP : Artésunate-Sulfadoxine-pyriméthamine
CPS:chimio-prévention du paludisme saisonnier
CSPS : Centre de Santé et de Promotion Sociale
CTA : Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine
Dlrs : douleurs
dNTP : desoxynucléotide triphosphate
DP: Densité parasitaire
DSN : District sanitaire de Nanoro
FM : Frottis mince
FRC : Formulaire de Report des Cas
GE : Goutte épaisse
GRP : Globule Rouge Parasité
Hb : taux d'hémoglobine
HF: histoire de fièvre
i. m : intramusculaire
IMT : Institut de Médecine Tropicale
IRSS : Institut de Recherche en Science de la Santé
i.v : intraveineux
MGDP : Moyenne géométrique de la densité parasitaire
MILDA : Moustiquaire imprégnée à longue durée d'action
MSP-1: Protéine 1 de Surface du Mérozoïte
MSP-2 : Protéine 2 de Surface du Mérozoïte
MOI : Multiplicité de l'infection
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
Pb : paire de base

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

P.f : *Plasmodium falciparum*

PfEMP-1 : Protéine 1 de la membrane de l'érythrocyte de *P. falciparum*

P.m: *Plasmodium malariae*

P.o: *Plasmodium ovale*

TBE : Trizma base-Acide Borique- EDTA

TDR : Test de Diagnostic Rapide

URCN : Unité de Recherche Clinique de Nanoro

UV : Ultra-violet

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des tableaux

Tableau I : Programme d'amplification et séquence des amorces de la première PCR multiplex.....	26
Tableau II: Programme d'amplification et séquence des amorces de la PCR Nichée.....	26
Tableau III : Caractéristiques des sujets inclus par site de collecte	30
Tableau IV : Prévalence des allèles de <i>MSP-1</i> et <i>MSP-2</i> par site de collecte	31
Tableau V: Prévalences des allèles de <i>MSP-1</i> en fonction de la température, du taux d'hémoglobine et de la densité parasitaire.....	32
Tableau VI : Prévalences des allèles de <i>MSP-2</i> en fonction de la température, du taux d'hémoglobine et de la densité parasitaire.....	33
Tableau VII : Multiplicité de l'infection en fonction de la moyenne géométrique de la densité parasitaire (MGDP) et du taux d'hémoglobine (Hb).....	34
Tableau VIII : Multiplicité de l'infection (<i>MOI</i>), taux d'hémoglobine (Hb) et moyenne géométrique de la densité parasitaire (MGDP) en fonction de l'âge du patient.....	35

Liste des figures

Figure 1 : Cycle biologique des Plasmodiums	9
Figure 2 : Représentation de la structure de <i>MSP-1</i>	17
Figure 3 : Structure des deux familles alléliques de <i>MSP-2</i>	18
Figure 4 : Les principaux symptômes les plus couramment observés dans la zone de Nanoro.....	36
Figure 5 : Prévalence des familles alléliques de <i>MSP-1</i> par type de symptôme	37
Figure 6 : Prévalence des familles alléliques de <i>MSP-2</i> par type de symptôme.....	38

RESUME

Sur le plan génétique, il existe une grande diversité de souches de *Plasmodium falciparum* qui infectent les individus vivant en zone d'endémie. *MSP-1* et *MSP-2* sont les marqueurs de polymorphisme les plus couramment étudiés. Nous avons utilisé ces deux marqueurs pour vérifier si une famille allélique de *MSP-1* ou *MSP-2* pouvait être spécifiquement associée aux symptômes du paludisme les plus fréquemment observés dans la zone de Nanoro.

Une étude descriptive a été conduite aux CSPS de Nanoro et de Nazoanga sur des patients souffrant de paludisme à *P. falciparum*. Après un examen clinique, un prélèvement sanguin a été effectué pour la réalisation d'une GE / FM, la mesure du taux d'hémoglobine et la confection de confettis pour les analyses PCR. L'extraction de l'ADN a été faite avec les kits Qiagen et la technique de PCR nichée a été utilisée pour le génotypage des allèles du block 2 de *MSP-1* et du block 3 de *MSP-2*.

Au total 727 échantillons ont été analysés. Les familles alléliques *K1* de *MSP-1* et *3D7* de *MSP-2* étaient les plus dominants dans la zone de Nanoro. A l'exception de la famille allélique *FC27* de *MSP-2* qui était significativement associée à la survenue de l'anémie, aucune famille allélique n'était spécifiquement associée à un type particulier de symptômes de la maladie. Le fait d'héberger plusieurs souches était également associé à la survenue de l'anémie mais cela n'avait pas d'impact sur le niveau de la parasitémie. Les enfants hébergeaient en moyenne 2 génotypes parasitaires différents et cette valeur de la multiplicité de l'infection (*MOI*) diminuait significativement avec l'âge.

ABSTRACT

There is a large genetic diversity of *Plasmodium falciparum* clones that infect people living in malaria endemic area. The merozoite surface proteins *MSP-1* and *MSP-2* are the most studied markers of polymorphism. In the current study, we used these two markers to investigate if some specific clones are mostly associated with the most common malaria symptoms in Nanoro area.

A descriptive study was carried out in *P. falciparum* infected patients at the health centers of Nanoro and Nazoanga. After clinical examination, a blood sample was taken for thick and thin film preparation, hemoglobin measurement and to prepare filter papers for PCR analyses. DNA isolation was performed using Qiagen kits and a nested PCR technique was used for *MSP-1* block2 and *MSP-2* block3 allelic family amplification.

A total of 727 specimens were genotyped. *MSP1-K1* allelic family and *MSP2-3D7* allelic family were most prevalent in Nanoro area. Apart from the *MSP2-FC27* allelic family that was associated with the occurrence of anemia, no other allelic families were associated to a particular type of observed malaria symptoms. The carriage of several clones was also associated with the occurrence of anemia but not with parasite density. Children carried an average of 2 different clones and this value of multiplicity of infection (*MOI*) decreased significantly with age.

SOMMAIRE

DEDICACES	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
SIGLES ET ABREVIATIONS	vii
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	x
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
RESUME	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE: GENERALITES SUR LE PALUDISME ET LE POLYMORPHISME DE <i>Plasmodium falciparum</i>.....	4
Chapitre I : Généralités sur le paludisme	5
I. Définition	5
II. Taxonomie et biologie du parasite	5
III. Taxonomie et biologie du vecteur.....	6
IV La transmission du paludisme	7
V. Cycle de développement du <i>Plasmodium</i>	8
VI. Les manifestations cliniques du paludisme.....	10
VII. Diagnostic du paludisme	11
VIII. Traitement du paludisme	13
IX. Prévention du paludisme	13
Chapitre II : Polymorphisme génétique de <i>P. falciparum</i>	15
I. Le génome des plasmodiums	15
II. Origine de la diversité génétique de <i>Plasmodium falciparum</i>	15
III. La protéine de surface du mérozoïte <i>MSP-1</i>	16
IV. La protéine de surface du mérozoïte <i>MSP-2</i>	17
DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE	19
I. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	20

I.1. Objectif général	21
I.2. Objectifs spécifiques.....	21
II. MATERIEL ET METHODES	22
II.1. Site de l'étude.....	23
II.2. Type d'étude- Echantillonnage- Taille de l'échantillon	23
II.3. Collecte des données cliniques	24
II.4. Le prélèvement.....	24
II.5. Examen microscopique	25
II.6. Analyses moléculaires	25
II. 6.1 Extraction d'ADN	25
II. 6.2 Génotypage des allèles de <i>MSP-1</i> et <i>MSP-2</i> de <i>P. falciparum</i>	25
II. 6.3. Electrophorèse des produits PCR	27
II. 6.4. Interprétation des résultats.....	27
II. 7. Analyse des données	27
II. 8. Considérations éthiques.....	28
III. RESULTATS.....	29
IV. DISCUSSION	40
CONCLUSION.....	45
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	47

INTRODUCTION

Le paludisme est l'endémie parasitaire la plus répandue dans le monde. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 2,3 milliards le nombre de personnes vivant en zone d'endémie et à 655000 le nombre de décès dû au paludisme chaque année. La plupart de ces cas surviennent en Afrique sub-saharienne et les enfants de moins de cinq (05) ans et les femmes enceintes sont les plus touchés (OMS, 2012).

Au Burkina Faso, le paludisme est endémique et constitue un problème de santé publique. En effet 6,9 millions de cas de paludisme dont 7600 décès ont été enregistrés en 2013 au niveau national. *Plasmodium falciparum* est la principale espèce incriminée et est responsable de plus de 90% des cas de paludisme dans le pays (Ministère de la santé du Burkina, Programme national de lutte contre paludisme 2013).

En effet, *Plasmodium falciparum* est le plus dangereux parmi les cinq espèces pouvant parasiter l'homme. Il est incriminé dans 80% de toutes les infections humaines et 90% des décès. *P. falciparum* est une espèce extrêmement polymorphe. La diversité et la variation antigénique du parasite sont les deux principaux facteurs responsables de l'acquisition lente (plusieurs années) d'une protection contre le paludisme. Ainsi, les individus doivent rencontrer l'ensemble du répertoire des souches de *Plasmodium* présentes dans la région avant de développer une protection efficace (Jeffery et al., 1966). De ce fait, la caractérisation des souches de *P. falciparum* circulant dans une région donnée est nécessaire pour la compréhension du mécanisme de développement de l'immunité anti-palustre et l'élaboration d'un vaccin efficace. Les principaux marqueurs de polymorphisme les plus couramment étudiés sont les gènes des protéines 1 et 2 de la surface du mérozoïte (*MSP-1* et *MSP-2*).

Sur le plan clinique, le paludisme présente des manifestations très variables. Cette variabilité des symptômes constitue un défi pour le diagnostic clinique et la prise en charge correcte des cas. En effet, les manifestations cliniques résultent d'une interaction complexe entre le parasite et l'hôte humain (Marsh et al., 1997). Le risque pour un individu de manifester tel ou tel type de symptômes dépend de facteurs liés à l'hôte (génétique, immunitaire, nutritionnel...) mais aussi au parasite (Yazani et al., 2006).

En considérant les facteurs liés au parasite, l'hypothèse de souches plus virulentes que d'autres a été évoquée par plusieurs auteurs (Gupta et al., 1994). En effet les agents du paludisme des rongeurs présentent des différences notables de virulence et de

pathogénicité d'une souche à l'autre, mais le recours à ces paramètres pour distinguer les souches et les isoler a toujours été limité dans le cas des plasmodies parasitant les hommes pour des raisons d'éthique (Mémorandum OMS, 1981). Toutefois on peut avoir une certaine idée de la virulence en corrélant les manifestations cliniques de l'infestation aux caractéristiques biologiques des parasites. C'est dans ce contexte que nous avons initié cette étude pour vérifier si une famille allélique du gène *MSP-1* et *MSP-2* de *Plasmodium falciparum* est spécifiquement associées aux signes du paludisme les plus couramment rapportées comme la forte fièvre, l'anémie sévère, les fortes densités parasitaires...

**PREMIERE PARTIE: GENERALITES SUR
LE PALUDISME ET LE POLYMORPHISME
DE *Plasmodiumfalciparum***

Chapitre I : Généralités sur le paludisme

I. Définition

Le paludisme est une maladie parasitaire, potentiellement mortelle, causée par des protozoaires du genre *Plasmodium* qui sont transmis par des moustiques femelles appartenant au genre *Anopheles*. On pensait à l'origine que cette maladie provenait des zones marécageuses, d'où le nom de paludisme, dérivé du mot 'palud' qui signifie marais. En 1880, Charles Louis Alphonse LAVERAN a découvert la véritable cause du paludisme, un parasite du genre *Plasmodium*, de la famille des *Plasmodiidae*, phylum *Apicomplexa*.

II. Taxonomie et biologie du parasite

Les plasmodiums sont des eucaryotes c'est-à-dire des organismes possédant un noyau cellulaire séparé du cytoplasme par une membrane nucléaire. Selon le système international de classification des êtres vivants en Taxon (Systématique) les plasmodiums appartiennent au:

Règne : Animal

Sous-Règne : Protozoaire

Phylum : *Apicomplexa*

Classe : *Sporozoasida*

Ordre : *Eucoccidiorida*

Sous-ordre : *Hemosporidea*

Famille : *Plasmodiidae*

Genre : *Plasmodium*

On distingue plusieurs espèces plasmodiales : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* (Plasmodiums humains) et *P. knowlesi* (*Plasmodium* des macaques pouvant parasiter l'homme).

Un parasite est un être vivant qui pendant une partie ou la totalité de son existence vit en se nourrissant aux dépens d'un autre organisme (d'une autre espèce) appelé hôte. Les plasmodiums pour survivre doivent obligatoirement adopter ce mode de vie (parasitisme permanent) aux dépens de l'homme (plasmodies humaines) ou de

l'anophèle. Chez l'homme, ils se multiplient par schizogonie à l'intérieur des globules rouges et satisfont partiellement à leurs besoins nutritionnels en protéolysant l'hémoglobine dans sa vacuole acide. Ce processus libère l'hème qui, sous sa forme soluble, est toxique pour le parasite. Ne pouvant pas comme l'homme dégrader l'hème, le parasite le concentre sous la forme inoffensive de granules brun foncé appelés hémozoïne (Voet et *al.*, 2005). En ce qui concerne l'espèce *P. falciparum*, l'hématie parasitée est de taille normale, piquetée de tâche de Maurer. Dans le sang périphérique, on trouve des trophozoïtes jeunes de 1,5 à 2 microns de diamètre, formés d'un anneau cytoplasmique entourant une vacuole et d'un ou de deux noyaux. Le polyparasitisme des hématies est fréquent. On y trouve aussi des gamétocytes en forme de croissant, mesurant 8 à 14 microns. Le noyau, disséminé dans le cytoplasme bleu ou rosé est souvent masqué par du pigment. Ce parasite en l'absence de réinfections, disparaît en quelques mois car il n'y a pas de formes hépatocytaires secondaires.

III. Taxonomie et biologie du vecteur

Un vecteur est d'une manière générale un être vivant capable de transmettre de façon active un agent infectieux. Les anophèles sont des vecteurs et transmettent les formes infestantes du parasite (sporozoïtes) à l'homme. En règle générale de systématique, les anophèles peuvent être classés comme suit :

Règne : Animal

Phylum : Arthropodes (pattes articulées)

Classe : Insectes (corps segmenté en trois parties)

Sous- Classe : Ptérygotes (avec des ailes)

Ordre : Diptères (avec deux ailes)

Sous- Ordre : Nématocères (avec antennes rondes et longues)

Famille : Culicidés (moustiques)

Sous-famille : Anophélinés

Genre: *Anopheles*

Il existe 484 espèces d'anophèles dont environ 60 sont vectrices de plasmodiums humains (Harbach et *al.*, 2004). En Afrique, les deux principaux complexes d'espèces vectrices sont : *Anopheles funestus* et *Anopheles gambiae*. Le

complexe *An. gambiae* comprend les espèces suivantes *An. gambiae sensu strito*, *An. arabiensis*, *An. bwambae*, *An. merus*, *An. melas*, *An. quadriannulatus* A et B.

Seule l'anophèle femelle, grâce à l'appareil piqueur de sa trompe peut transmettre le *Plasmodium*. Morphologiquement, l'insecte femelle reconnaissable à sa façon de se fixer sur un support au repos (corps oblique par rapport au support) présente deux yeux à facette, une trompe fine constituée d'une lèvre inférieure ou labum, molle formant une gouttière, terminée par deux labelles mobiles. L'hématophagie est nécessaire à la femelle car certains éléments (vitamines, acides aminés) contenus dans le sang sont indispensables à la maturation des œufs après la fécondation de l'insecte femelle.

IV La transmission du paludisme

La première tentative de modélisation de la transmission du paludisme a été faite par Ronald Ross dans les années 1897 mais ces travaux en Sierra Leone ne concernaient que les cas aviaires. C'est l'italien Giovanni Battista GRASSI en 1898 qui montrera que le vecteur du paludisme humain était également un moustique du genre *Anopheles* (Cox et al., 2010). Outre ce mode de transmission, il existe d'autres modes de transmission : la transmission par voie placentaire, la transmission par transfusion sanguine. Dans les zones tropicales et subtropicales, ainsi que dans les régions de climat méditerranéen, la saison sèche ou hivernale s'accompagne d'une diminution notable des anophèles, donc d'un arrêt de la transmission. Par contre, la saison des pluies permet la pullulation des anophèles et la transmission de l'hématozoaire, qui sera donc saisonnière. La transmission débute quelques semaines après le début de la saison des pluies, temps nécessaire à la maturation des vecteurs, se poursuit durant toute la saison humide et se prolonge quelques semaines après le début de la saison sèche, car les gîtes larvaires s'assèchent lentement. On parle alors de zone de transmission instable, contrairement aux zones stables où la transmission est pérenne sur toute l'année.

V. Cycle de développement du *Plasmodium*

Le cycle biologique du *Plasmodium* passe par deux (02) hôtes : un hôte intermédiaire (l'homme) et un hôte définitif (l'anophèle femelle). Toutefois, pour des raisons anthropocentriques, on considère que le vecteur n'est pas l'homme mais le moustique et par conséquent cette zoonose est du type zooanthroponose.

-Phase sexuée chez le moustique

Le sang, ingéré par l'anophèle femelle lors du repas sanguin pris sur un sujet infecté par le plasmodium, contient entre autres des gamétocytes mâles et femelles du parasite.

Dans l'estomac de l'insecte, les gamétocytes femelles s'arrondissent et deviennent des gamètes ; les gamétocytes mâles subissent une ex flagellation et donnent chacun environ huit (08) gamètes mobiles. La fécondation a lieu dans l'estomac, puis l'œuf ainsi formé, ou oocinète mobile traverse la paroi gastrique et se fixe sur la face externe, bombant dans la cavité coelomique ; il devient alors un oocyste immobile et arrondi, qui en se divisant à l'intérieur de sa « coque » donne un grand nombre de sporozoïtes mobiles qui gagnent activement les glandes salivaires à travers la cavité générale ; ce sont les formes infestantes (sporozoïtes), prêtes à être injectées à l'homme lors d'une prochaine piqure.

- Phase asexuée chez l'homme

Les sporozoïtes inoculés dans le sang capillaire par l'anophèle femelle (l'injection de salive est indispensable pour empêcher la coagulation du sang) quittent rapidement la circulation pour pénétrer dans les hépatocytes. Ces trophozoïtes hépatocytaires augmentent de taille tandis que leurs noyaux se multiplient; il se forme ainsi des schizontes hépatocytaires contenant 10000 à 30000 noyaux ; ce sont les futurs mérozoïtes. L'hépatocyte éclate alors et les mérozoïtes passent dans la circulation.

Recouverts d'antigènes de surface, les mérozoïtes vont pénétrer à l'intérieur des hématies suivant une séquence précise. Des récepteurs de membrane protéique ou

glycoprotéines de l'érythrocyte sont reconnus par le mérozoïte, lui permettant de se fixer à la surface de la membrane érythrocytaire. La membrane du globule rouge s'invagine, entraînant avec elle le parasite. Le mérozoïte se retrouve alors dans la cavité érythrocytaire dans une pseudo vacuole et induit durant sa croissance, des altérations de la paroi érythrocytaire. Grâce à la dégradation de l'hémoglobine, le parasite augmente de taille puis se multiplie jusqu'à former un schizonte mûr qui provoque l'éclatement de l'hématie et la libération des mérozoïtes qui vont parasiter d'autres hématies. Ce sont ces éclatements brutaux et synchrones des hématies qui sont à l'origine des accès de fièvre. La formation des gamétocytes permettra l'infestation de l'anophèle femelle et un nouveau cycle recommence.

La figure 1 représente le schéma du cycle biologique.

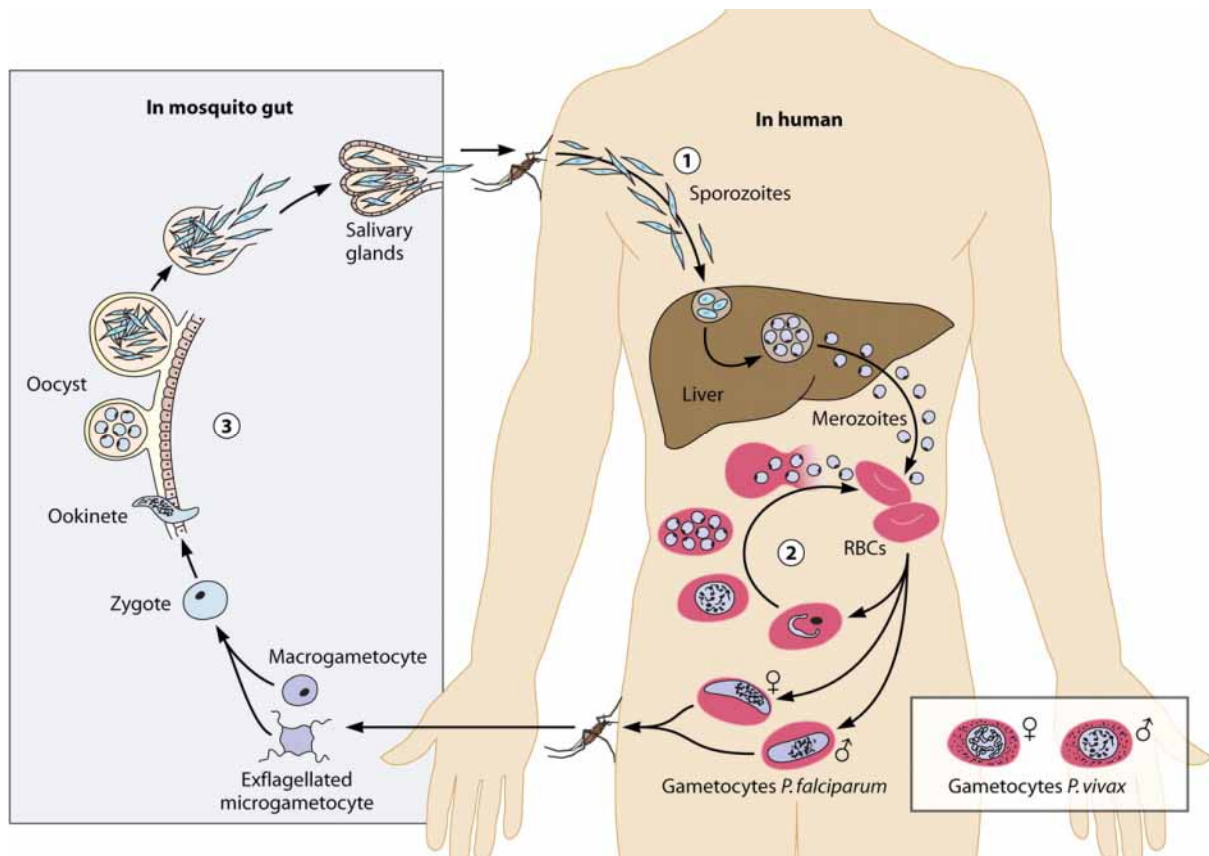


Figure 1 : Cycle biologique des plasmodiums (cmr.asm.org, site consulté le 25/10/12)

VI. Les manifestations cliniques du paludisme

Après une piqûre anophélienne infestante, l'évolution schématique du paludisme comporte : une période d'incubation, une phase de primo invasion et une phase d'accès intermittents.

La durée de la phase d'incubation est variable selon l'espèce plasmodiale, l'intensité et le mode d'infestation, la réceptivité et l'état immunitaire du sujet infesté. Pour *Plasmodium falciparum*, l'incubation est de 7 à 15 jours.

Les manifestations cliniques du paludisme n'apparaissent qu'au cours de la multiplication asexuée des plasmodiums à l'intérieur des hématies, faisant du paludisme, au sens propre, une érythrocytopathie parasitaire. Les premiers symptômes (fièvre, maux de tête, frissons et vomissements...) peuvent être modérés et difficiles à attribuer au paludisme.

Les enfants fortement atteints développent fréquemment un ou plusieurs des symptômes suivants: anémie sévère, paludisme cérébral détresse, respiratoire consécutive à une acidose métabolique. Chez l'adulte, on observe aussi fréquemment une atteinte de tous les organes. Dans les zones d'endémie, les personnes peuvent parfois être partiellement immunisées, et il peut y avoir des infections asymptomatiques.

Pour le paludisme à *P. vivax* et à *P. ovale*, des rechutes cliniques peuvent se produire des semaines ou des mois après la première infection même si le patient a quitté la zone impaludée. Ces nouveaux épisodes sont dus à des hypnozoïtes (formes hépatiques «dormantes» qui n'existent pas avec *P. falciparum* et *P. malariae*), et un traitement spécial ciblant ces stades hépatiques est impératif pour guérir complètement le malade.

On distingue le paludisme simple qui, s'il n'est pas traité dans les 24 heures peut évoluer vers un paludisme grave, affection sévère souvent mortelle. Selon l'OMS, le paludisme simple se définit comme étant une infection plasmodiale sans signes de gravité ni éléments d'appréciation (cliniques ou biologiques) permettant d'affirmer un dysfonctionnement des organes vitaux. Sur le plan clinique, la suspicion de paludisme

repose donc principalement sur la présence d'un état fébrile ou d'antécédents de fièvre. Le paludisme à *P. falciparum* est considéré comme étant un paludisme grave s'il y a au moins un des signes suivants :

Sur le plan clinique (OMS, 2011):

- troubles de la conscience ou coma aréactif,
- prostration, c'est-à-dire que le malade est si faible qu'il est incapable de marcher ou de s'asseoir sans assistance,
- incapacité à s'alimenter,
- convulsions multiples (plus de deux épisodes par 24 h),
- respiration profonde, détresse respiratoire (respiration acidosique),
- collapsus cardiovasculaire ou état de choc, tension artérielle systolique < 70 mm Hg chez l'adulte et < 50 mm Hg chez l'enfant,
- ictère clinique accompagné d'autres signes de dysfonctionnement des organes vitaux,
- hémoglobinurie,
- saignements spontanés anormaux,
- œdème pulmonaire (radiologique),

Sur le plan biologique (OMS, 2011):

- hypoglycémie (glycémie < 2,2 mmol/l ou < 40 mg/dl),
- acidose métabolique (bicarbonate plasmatique < 15 mmol/l),
- anémie normocytaire sévère (Hb< 5 g/dl, hématocrite < 15 %),
- hyperparasitémie (> 2 % ou >100 000/μL en zone de faible transmission ou > 5 % ou >250 000 /μl en zone de transmission forte et stable),
- hyperlactacidémie (acide lactique > 5 mmol/l),
- insuffisance rénale (créatinine sérique > 265 μmol/L).

VII. Diagnostic du paludisme

Une prise en charge efficace de la maladie requiert qu'un bon diagnostic soit posé sans délai. Le diagnostic repose sur la suspicion clinique d'un paludisme et la recherche des hématozoaires dans le sang (OMS, 2011).

(i) **Diagnostic clinique**

La symptomatologie du paludisme n'est pas spécifique. En zone d'endémie, la suspicion clinique est basée sur une notion de fièvre au cours des dernières 24 heures ou sur la présence d'une anémie, pour laquelle une pâleur palmaire semble être le signe le plus fiable chez le jeune enfant. Dans une zone de faible transmission elle est basée sur la notion de fièvre au cours des trois jours précédents sans autres signes de maladie grave. Dans tous les cas, toute suspicion de paludisme basée sur des signes cliniques devrait être confirmée par un diagnostic parasitologique.

(ii) **Diagnostic biologique**

Il est essentiellement parasitologique mais plusieurs autres méthodes de diagnostic sont actuellement disponibles.

-L'examen microscopique de la goutte épaisse /frottis mince : il certifie le diagnostic du paludisme en mettant en évidence le parasite dans le sang circulant. Il demeure la méthode de référence en termes de sensibilité et de spécificité. Il permet de confirmer la maladie, d'identifier l'espèce plasmodiale en cause et permet un contrôle de l'efficacité du traitement antipaludique par le suivi de la parasitémie.

Cependant, ses performances en termes de sensibilité et de fiabilité dépendent directement de l'expérience du microscopiste et du niveau de la parasitémie du sujet infecté.

- La détection d'antigènes du parasite par les tests de diagnostic rapides (TDR) : ils reposent sur le principe de l'immuno-chromatographie en utilisant des bandelettes sensibilisées par des anticorps monoclonaux spécifiques détectant des antigènes plasmodiaux.

-Le QBC Malaria test ou quantitative buffycoat : le principe de cette technique microscopique de fluorescence repose sur l'utilisation d'un fluorochrome (l'acridine orange) capable de se fixer sur le noyau du parasite.

- La détection des anticorps antipalustres : en zone d'endémie, la sérologie n'a pas de place dans le diagnostic des accès palustres aigus en raison de l'apparition tardive des anticorps (Ac) antipalustres par rapport à l'émergence des parasites dans le sang.

Le diagnostic sérologique se heurte également à des difficultés d'interprétation. En effet, la présence d'Ac spécifiques peut témoigner soit d'une infection palustre évolutive soit d'un paludisme antérieur dans la mesure où les Ac peuvent persister 2 à 3 ans après l'infection (Siala et *al.*, 2010).

-La détection des acides nucléiques par les techniques d'amplification génique : il s'agit de la technique la plus sensible. Elle permet de détecter de très faibles parasitémiessdans le sang avec une possibilité de quantification de l'ADN plasmodial en utilisant la PCR quantitative (Siala et *al.*, 2010).

VIII. Traitement du paludisme

En cas de paludisme simple l'objectif du traitement est de guérir l'infestation le plus rapidement possible. Cela permet de prévenir la progression vers une forme grave et d'éviter une morbidité résultant d'un échec thérapeutique.

Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) sont les traitements recommandés. Les combinaisons suivantes sont recommandées par l'OMS : Artéméther-Luméfantrine (AL), Amodiaquine-Artésunate (ASAQ), Artésunate-Méfloquine (ASMQ), Artésunate-Sulfadoxine-pyriméthamine (ASSP).

Pour le paludisme grave, le principal objectif est d'éviter une issue fatale, les objectifs secondaires étant la prévention des séquelles ou d'une recrudescence. L'artésunate en intra veineuse ou en intra musculaire est le traitement recommandé. L'artéméther ou la quinine sont des alternatives possibles si l'on ne dispose pas de l'artésunate injectable (OMS, 2011). Toutefois au Burkina Faso la quinine garde toujours une place de choix en plus de l'artésunate injectable.

IX. Prévention du paludisme

La lutte anti-vectorielle reste le principal moyen de réduire la transmission du paludisme au niveau communautaire. Cette lutte au niveau communautaire est essentiellement basée sur la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations.

Au niveau individuel, la protection contre les piqûres de moustiques représente le premier moyen de défense contre le paludisme. Cette stratégie est surtout basée sur

l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA) dont la couverture universelle est recommandée par l'OMS.

La chimioprophylaxie chez la femme enceinte avec la sulfadoxine-pyriméthamine constitue aussi une stratégie de base en matière de prévention contre le paludisme.

Depuis 2010, l'OMS a recommandé une intervention supplémentaire pour lutter contre le paludisme à *Plasmodium falciparum*: la chimio-prévention du paludisme saisonnier (CPS). En effet, dans la zone sahélienne la mortalité et la morbidité dues au paludisme chez les enfants sont les plus élevées durant la saison des pluies généralement de courte durée. Cette intervention consiste à l'administration à intervalles appropriés, d'un traitement complet avec un médicament antipaludique efficace au cours de cette période chez les jeunes enfants.

Chapitre II : Polymorphisme génétique de *P.falciparum*

I. Le génome des plasmodiums

Les plasmodiums sont haploïdes pour la plus grande partie de leur cycle. Ils ne sont diploïdes qu'au stade oocinète/zygote où ont lieu la méiose et les recombinaisons génétiques. Le génome des plasmodiums entièrement séquencé en 2002 (clone3D7) comporte 14 chromosomes variant considérablement en taille (0,7-3,3Mb) du fait des délétions, crossing-overs et réarrangements. La taille du génome des plasmodies varie entre 20-25Mb et contient environ 5300 gènes. Outre l'ADN nucléaire, les plasmodiums contiennent également deux éléments : un fragment d'ADN mitochondrial de 6 Kb et un fragment circulaire de 35 Kb dans l'apicoplaste (Gardner *et al.*, 2002).

II. Origine de la diversité génétique de *Plasmodium falciparum*

Quatre éléments majeurs participent à la diversité des populations plasmodiales : un important polymorphisme chromosomique et allélique, la reproduction asexuée et la variation antigénique.

- Le polymorphisme chromosomique

Les régions subtélomériques des chromosomes sont le site de fréquents réarrangements génétiques intra et inter-chromosomiques. Ces délétions des extrémités instables des chromosomes contribuent de façon significative au polymorphisme de taille des chromosomes.

- Le polymorphisme allélique

Chez *Plasmodium falciparum*, de nombreux antigènes codés par des gènes en copie unique possèdent un très grand nombre d'allèles, pouvant, parfois être regroupés en familles alléliques de séquence primaire très différente comme *MSP-1* et *MSP-2*. Les bases structurelles de ce polymorphisme sont multiples : mutations ponctuelles, présence de séquences répétées pouvant varier en nombre, en taille ou de cadre de lecture.

- La reproduction sexuée

La reproduction sexuée du parasite chez l'anophèle contribue à la diversité génétique des populations de *Plasmodium falciparum*. Des crossing-overs méiotiques et la ségrégation aléatoire des chromosomes permettent un réassortiment des combinaisons d'allèles et l'émergence de nouveaux génotypes.

- **L'effet de l'haploïdie**

Le fait que le parasite soit sous forme haploïde dans la quasi-totalité de son cycle (en particulier chez l'homme) permet son adaptation par l'expression rapide d'un nouveau phénotype (par l'un des mécanismes décrits ci-dessus) et l'émergence rapide d'une nouvelle population mieux adaptée à son environnement.

- **La variation antigénique**

La forte pression de sélection exercée par la diversité de l'hôte, a contraint le parasite à une meilleure adaptabilité et à sélectionner la mise en place « d'un processus de variation phénotypique programmé » : la variation antigénique. La quasi-totalité de l'adhésion du parasite aux cellules de l'hôte est réalisée par l'intermédiaire d'une molécule, «l'Erythrocyte Membrane Protein1» (*PfEMP1*), exprimée par le parasite et transportée à la surface des globules rouges infectés. Ces protéines de surface sont exposées au système immunitaire de l'hôte. En réponse à ces attaques, le parasite produit sans cesse de nouveaux variants d'*EMP-1* qui viennent remplacer le précédent variant à la surface des cellules. La variation antigénique chez *P. falciparum* a trois fonctions : une fonction d'échappement au système immunitaire et d'immunorégulation et une fonction d'adaptation aux récepteurs endothéliaux de l'hôte (Kyes et *al.*, 2001).

III. La protéine de surface du mérozoïte *MSP-1*

Le gène codant la protéine est localisé sur le chromosome 9. Le gène *MSP-1* comporte 17 blocks dont 5 séquences conservées, 5 semi-conservées et 7 variables. Le block 2 est le plus polymorphe et comporte 3 lignées : *K1*, *MAD20* et *RO33* (Tanabe et *al.*, 1999). Il a été suggéré que la *MSP-1* joue un rôle dans l'interaction parasite-hôte en s'attachant au ligand acide sialique sur les érythrocytes humains.

L'antigène *MSP-1* est considéré comme un candidat de choix pour le développement d'un vaccin contre les formes sanguines et constitue de ce fait l'un des

marqueurs de polymorphisme les plus couramment étudiés. La figure 2 illustre la structure du gène *MSP-1*.

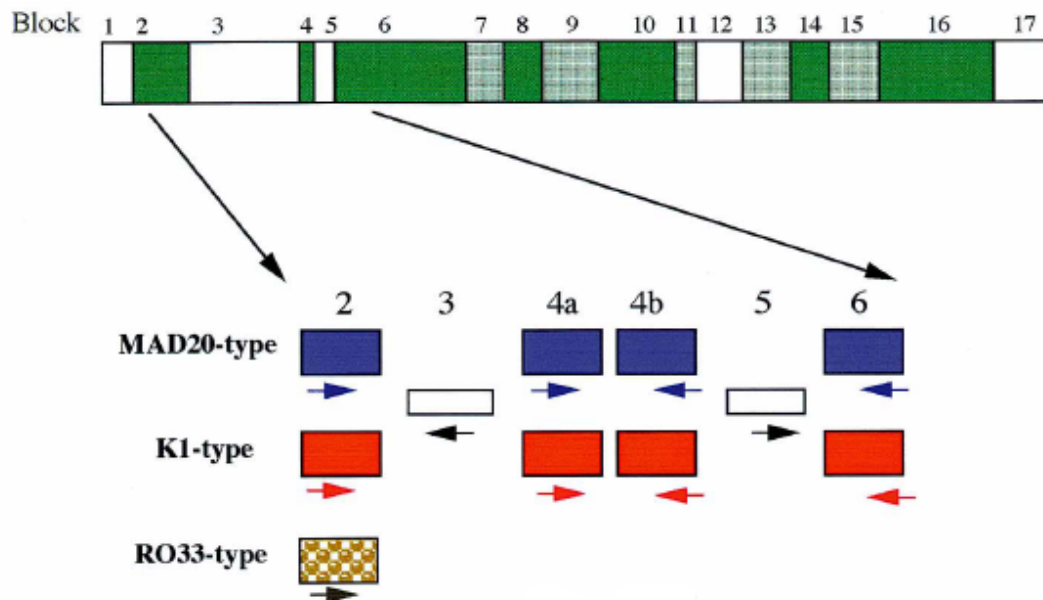


Figure 2 : représentation de la structure de *MSP-1* (Tanabe et al., 1999).

La figure montre un important polymorphisme au niveau du block 2 du gène qui comporte trois lignées *K1*, *MAD20* et *RO33*. Ainsi toutes les souches de *P. falciparum* correspondent à l'une des trois familles allélique du gène *MSP-1*.

IV. La protéine de surface du mérozoïte *MSP-2*

MSP-2 est une protéine de 45 Kd codée par un gène localisé sur le chromosome 2. Le gène est divisé en cinq blocks dont les blocks 1, 2, 4 et 5 situés aux deux extrémités sont conservés ou semi-conservés. Les allèles de la protéine 2 de surface du mérozoïte sont groupés en 2 familles principales *3D7* et *FC27*, correspondant à la structure dimorphique de la région centrale variable (Block 3). (Kanunfre et al., 2003), (Low et al., 2007), (Boyle et al., 2013).

La figure 3 présente une description de la structure du gène *MSP-2*, mettant en évidence la différence entre les deux familles alléliques.

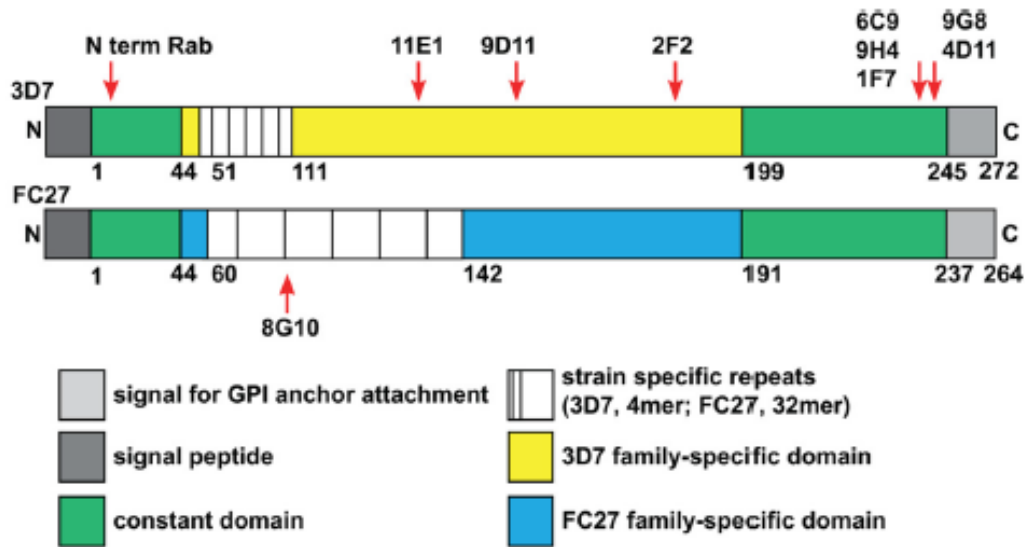


Figure 3 : Structure des deux familles alléliques de *MSP-2*. (Boyle et *al.*, 2013)

La variabilité du block central de *MSP-2* permet de classer les populations parasites suivant les deux familles alléliques 3D7 et FC27.

La famille FC27 renferme 2 copies d'un motif de 32 acides aminés dont la séquence est la suivante ADTIASGSQRSTNSASTSTTNNGESQTTTPTA, suivie d'une copie d'un motif de 12 acides aminés comme suit : ESISPPITTT.

La famille 3D7 renferme un nombre de répétitions d'un motif de quatre acides aminés que sont : GGSA (Kanunfre et *al.*, 2003, (Low et *al.*, 2007), (Boyle et *al.*, 2013).

La protéine *MSP-2* entraîne une réponse immunitaire et constitue un candidat de choix pour l'élaboration d'un vaccin contre le paludisme. Ce polymorphisme marqué de *MSP-2* fait de lui l'un des marqueurs les plus étudiés, surtout dans la distinction des populations parasites pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutiques des médicaments antipaludiques.

DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE

I. OBJECTIFS DE L'ETUDE

I.1. Objectif général

Etudier la relation entre la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* et la variabilité des signes du paludisme dans le district sanitaire de Nanoro, Burkina Faso.

I.2. Objectifs spécifiques

1. Déterminer les principaux signes du paludisme les plus fréquemment observés chez les patients de la zone de Nanoro.
2. Déterminer le profil polymorphique des souches circulant en utilisant comme marqueurs de polymorphisme le block 2 de *MSP-1* et le block 3 de *MSP-2*.
3. Déterminer le nombre de génotypes parasitaires présents chez chaque patient infecté.
4. Déterminer la relation entre le profil polymorphique des souches rencontrées chez un patient et les types de symptômes observés.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Site de l'étude

L'étude s'est déroulée à Nanoro dans la Province du Boulkiemdé au Burkina Faso en Afrique de l'Ouest. Le District sanitaire de Nanoro (DSN) est l'un des cinq districts de la région sanitaire du Centre-Ouest du Burkina Faso. La population totale de la zone était estimée à 158.127 habitants en 2014 et couvre une superficie de 1302 Km², soit 5,98% de la superficie de la région du centre ouest (Ministère de la Santé, DSN, Plan d'action 2014). Le climat est de type soudano-sahélien, avec une saison des pluies de juin/juillet à octobre/novembre avec une pluviométrie moyenne estimée entre 450-700 mm par an. Cette saison pluvieuse est suivie d'une saison froide et sèche de novembre à février (température minimum 17°C) et d'une saison chaude et sèche de mars à mai (températures maximum de 43°C). Le paludisme est hyper-endémique avec une transmission saisonnière pendant la saison des pluies. Le taux d'inoculation entomologique (TIE) est estimé à 50-60 piqûres infectantes par personne/an (Diabaté A., renseignement personnel). Les vecteurs les plus courants sont *Anopheles gambiae*, *An. funestus* et *An. arabiensis*. *P. falciparum* est le principal agent pathogène (90%), suivi de *P. malariae* (3-8%) et de *P. ovale* (0,5-2%).

La collecte des données s'est effectuée dans les Centres de Santé et de Promotion Sociale (CSPS) de Nanoro et de Nazoanga. Le CSPS de Nanoro est situé au centre de la commune rurale de Nanoro et couvre 5 villages : Nanoro, Basziri, Goulouré, Poëssie et Gouroumbila. Le CSPS de Nazoanga est situé à environ 15 km au Sud –Est de la commune de Nanoro et couvre les villages de Nazoanga, Kokolo, Zimidin et Sitaon.

II.2. Type d'étude- Echantillonnage- Taille de l'échantillon

Il s'agit d'une étude descriptive ancillaire à une étude plus large intitulée « Pharmacovigilance des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine en Afrique » Protocole A70283. Nos échantillons ont été collectés dans le cadre du volet "Etude randomisée de l'efficacité des combinaisons Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et Atéméther-Luméfántrine (AL) en condition de vie réelle, sans observation des traitements".

La taille de l'échantillon prévue pour ce volet de l'étude était de 340 patients par an pendant deux ans, soient 680 patients au total pour les deux ans de l'étude. Toutefois, notre analyse a porté sur les échantillons collectés lors du screening de ce volet de l'étude avant l'administration des traitements.

Les sujets de notre étude étaient composés de patients souffrant de paludisme à *P. falciparum* sans distinction d'âge ni de sexe. Les patients inclus dans cette étude étaient ceux dont le diagnostic du paludisme était confirmé par la microscopie avec une parasitémie ≥ 2000 formes asexuées de *P. falciparum* par microlitre de sang.

• II.3. Collecte des données cliniques

Les patients inclus ont bénéficié d'un examen clinique réalisé par les infirmiers de notre équipe de recherche et le personnel soignant des centres de santé de la localité. L'histoire de la maladie, les manifestations cliniques et les traitements antérieurs étaient notifiés et consignés sur le formulaire de report des cas (CRF).

Les patients souffrant de paludisme grave étaient pris en charge par le personnel de santé des CSPS selon l'algorithme national de prise en charge du paludisme grave. Les patients souffrant de paludisme simple à *P. falciparum* étaient enrôlés dans l'essai randomisé pour recevoir comme traitement soit Amodiaquine-Artésunate ou Artéméther-luméfantrine s'ils avaient une parasitémie comprise entre 2000 et 200000 formes asexuées/ μ l de sang et consentaient de participer à l'étude. Ceux qui avaient une densité parasitaire < 2000 parasites/ μ l de sang étaient systématiquement traités à l'Amodiaquine-Artésunate, seul médicament disponible pour la prise en charge du paludisme simple dans les dépôts pharmaceutiques des deux centres de Santé.

II.4. Le prélèvement

Un prélèvement de sang périphérique a été effectué par piqûre au bout du doigt pour la réalisation d'une goutte épaisse et d'un frottis mince, la mesure du taux d'hémoglobine à l'aide d'un Hémocue(301⁺) et la confection de confettis sur du papier Whatman®(3MM, Maidstone, UK) pour les analyses PCR ultérieures.

II.5. Examen microscopique

La recherche d'hématozoaires s'est effectuée sur la goutte épaisse et le frottis mince, colorés par la méthode standard de *Giemsa* diluée quotidiennement à 3%. Toutes les lames ont bénéficié d'une double lecture à l'objectif x100 à immersion. Un résultat négatif n'est déclaré qu'après observation de 100 champs microscopiques. La formule standard basée sur le ratio de 8000 globules blancs/ μ l de sang a été considérée pour l'estimation de la densité parasitaire.

II.6. Analyses moléculaires

Les analyses moléculaires ont été faites dans le laboratoire de biologie moléculaire du Centre MURAZ de Bobo-Dioulasso et dans le laboratoire de biologie moléculaire de l'Institut de Recherche en Science de la Santé, direction régionale de l'ouest (IRSS/DRO), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

II. 6.1 Extraction d'ADN

Les extraits d'ADN ont été obtenus à partir des échantillons de sang séchés sur du papier Whatman suivant les instructions du kit Qiagen (version 2010). Une quantité de 80 μ l d'extrait d'ADN était recueillie dans un tube Eppendorf bien étiqueté puis conservé à -20°C pour les analyses ultérieures.

II. 6.2 Génotypage des allèles de *MSP-1* et *MSP-2* de *P. falciparum*

Pour l'amplification de l'ADN nous avons utilisé une technique de PCR nichée. Elle a consisté en une première amplification ciblant un domaine plus large du block 2 de *MSP-1* et celui du block 3 de *MSP-2* suivi d'une seconde amplification plus spécifique. La première amplification utilisait 0,1 μ l des couples d'amorce *M1-OF* / *M1-OR* pour *MSP-1* et *M2-OF* / *M2-OR* pour *MSP-2* en présence de 12,5 μ l d'eau, 5 μ l de buffer (colorless buffer), 1,5 μ l de $MgCl_2$, 0,6 μ l de dNTP Master Mix Eurogentec, 0,2 μ l de GoTaq® Flexi DNA polymérase (Promega) et 5 μ l d'extrait d'ADN servant de matrice, soit un volume final de 25 μ l. Le programme d'amplification de cette première PCR multiplex ainsi que les séquences des amorces utilisées sont consignées dans le tableau ci-dessous.

Tableau I : Programme d'amplification et séquence des amorces de la première PCR multiplex.

Gène	Amorce	Séquence	Programme d'amplification
<i>MSP-1</i>	<i>M1-OF</i>	5'CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG 3'	<u>Etape 1</u> : 5 minutes 94 °C <u>Etape 2</u> : 1 minute 94°C <u>Etape 3</u> : 2 minutes 58°C <u>Etape 4</u> : 2 minutes 72°C <u>Etape 5</u> : 35 X à partir de 2 <u>Etape 6</u> : 10 minutes 72°C <u>Etape 7</u> : Conserver à 15 °C
	<i>M1-OR</i>	5'CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA3'	
<i>MSP-2</i>	<i>M2-OF</i>	5'ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATT ATA3'	
	<i>M2-OR</i>	5'CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT3'	

La deuxième PCR utilisait le produit d'amplification de la première PCR comme ADN matrice. Les couples d'amorces spécifiques à chaque famille allélique du *MSP-2* et du *MSP-1* étaient utilisées en présence des mêmes constituants réactionnels que la première PCR. Les couples d'amorces étaient respectivement *M1-KF* / *M1-KR* pour la famille *K1*, *M1-MF* / *M1-MR* pour la famille *MAD20* et *M1-RF* / *RO33-R2* pour la famille *RO33* de *MSP-1*. Pour les familles alléliques du gène *MSP-2* les couples d'amorces *S1-7bpTail*/ *N5* et *S1/M5-6FAM* étaient utilisés, respectivement pour la famille *FC27* et *3D7*.

Le programme d'amplification de cette deuxième PCR et les séquences des différentes amorces utilisées figurent dans le tableau II.

Tableau II : Programme d'amplification et séquence des amorces de la PCR Nichée.

Gène	Famille allélique	Amorce	Séquence	Programme d'amplification
<i>MSP-1</i>	<i>K1</i>	<i>M1-KF</i>	5'AAATAGAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC3'	<u>Etape 1</u> : 5 minutes 94 °C <u>Etape 2</u> : 1 minute 94°C <u>Etape 3</u> : 2 minutes 59°C <u>Etape 4</u> : 2 minutes 72°C <u>Etape 5</u> : 29 X à partir de 2 <u>Etape 6</u> : 10 minutes 72°C <u>Etape 7</u> : Conserver à 15 °C
		<i>M1-KR</i>	5'GCTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGACACCAGA3'	
	<i>MAD20</i>	<i>M1-MF</i>	5'AAATGAAGGAACAAGTGGAACAGCTGTTAC3'	
		<i>M1-MR</i>	5'ATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATTACC3'	
	<i>RO33</i>	<i>M1-RF</i>	5'TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG3'	
		<i>RO33R2</i>	5'TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG3'	
<i>MSP-2</i>	<i>3D7</i>	<i>S1</i>	7bpTail-GCTTATAATATGAGTATAAGGAGAA	<u>Etape 1</u> : 2 minutes 94 °C <u>Etape 2</u> : 30 secondes 94°C <u>Etape 3</u> : 45 secondes 58°C <u>Etape 4</u> : 1,5 minutes 72°C <u>Etape 5</u> : 39 X à partir de 2 <u>Etape 6</u> : 10 minutes 72°C <u>Etape 7</u> : Conserver à 15 °C
		<i>N5</i>	VIC-CTGAAGAGGTACTGGTAGA	
	<i>FC27</i>	<i>S1</i>	7bpTail-GCTTATAATATGAGTATAAGGAGAA	
		<i>M5</i>	6FAM-GCATTGCCAGAACTTGAA	

II. 6.3. Electrophorèse des produits PCR

La révélation des bandes d'ADN s'est faite par électrophorèse sur gel d'agarose préparé à 2% et contenant du bromure d'éthidium. Cette technique est basée sur le principe que les fragments d'ADN peuvent être séparés par des champs électriques. En faisant migrer l'ADN à travers le gel d'agarose, les fragments se séparent en fonction de leur taille. Le bromure d'éthidium qui a la propriété de s'intercaler entre les bases permet ainsi de visualiser les fragments d'ADN aux UV.

II. 6.4. Interprétation des résultats

La première étape consistait à une validation des résultats de la PCR. Les résultats étaient considérés comme valides s'il y avait :

- i. Apparition de la bande du contrôle positif confirmant alors sa positivité
- ii. Absence de bandes au niveau du contrôle négatif
- iii. Absence de bandes au niveau du mélange réactionnel (Mix).

Les photos des gels pour lesquels les résultats sont valides étaient ensuite scannées puis analysées à l'aide du logiciel Photo CaptMw (version 11.01). Ce dernier permet de détecter et de calculer la taille des différents fragments par rapport à la référence qui est un marqueur de poids moléculaire de 100Pb Thermo Scientific Fermentas®.

Un échantillon était considéré comme appartenant à une famille allélique donnée s'il y avait apparition d'au moins une bande suite à l'amplification de l'ADN de cet échantillon avec les amorces spécifiques de la famille en question. En cas d'absence de bande, l'échantillon était considéré comme n'étant pas de cette famille allélique.

Les infections multiples (*MOI*) étaient définies par la présence de plus d'un allèle de *MSP-2* ou de *MSP-1* de *P. falciparum* dans un seul isolat. La fréquence des infections multiples était alors définie comme étant le rapport du nombre de patients portant plus d'un clone de *P. falciparum* sur le nombre total de sujets infectés.

II. 7. Analyse des données

Les données cliniques et biologiques ont été consignées sur le cahier de report des cas de chaque patient puis saisies en double avec le logiciel Microsoft Access (2003, Microsoft Office). Une base Excel (Version 2010) a été développée pour la

saisie des résultats des analyses moléculaires. Les données ont été analysées en utilisant les tests statistiques appropriés du point de vue de leur précision avec STATA (version 9, StataCorp LP). Le test de X^2 a été utilisé pour comparer les proportions. Pour les moyennes le T-Test (2 moyennes) et le test ANOVA (cas de plusieurs moyennes) ont été utilisés. La différence a été considérée comme statistiquement significative pour une valeur de p inférieur à 0,05.

La population concernée ici par notre analyse est la population parasitaire. L'unité statistique est l'allèle et les variables étudiées sont les différents allèles de *MSP-1* et *MSP-2* (présence ou absence) caractérisés par leur séquence (famille *3D7* ou famille *FC27* pour *MSP-2* et famille *K1* ou famille *MAD20* ou famille *RO33* pour *MSP-1*). La fréquence d'un allèle est exprimée simplement en pourcentage comme étant le rapport du nombre d'allèles X observés sur l'ensemble des allèles dénombrés dans les isolats.

II. 8. Considérations éthiques

L'étude s'est déroulée en conformité avec les principes de la déclaration d'Helsinki et le consentement libre et éclairé des patients, parents ou tuteurs légaux a été exigé avant l'enrôlement du participant. Le participant a eu l'occasion de poser toutes les questions relatives à l'étude et a pu obtenir de plus amples informations avant de donner son consentement. Cette étude est un volet de la grande étude sur la Pharmacovigilance des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine en Afrique dont le protocole a été approuvé par le Comité d'éthique institutionnel du centre Muraz et le Comité d'éthique pour la recherche en santé du Burkina Faso.

III. RESULTATS

Autotal 1480 participants ont été enrôlés au cours de l'étude. Parmi eux, 1010 (68,2%) patients étaient positifs à la microscopie. Les mono infections par *P. falciparum* ont été retrouvées dans 97% (980/1010) des cas. Les autres espèces rencontrées, le plus souvent en association avec *P. falciparum* étaient *P. malariae* dans 2% des cas (n=21) et *P. ovale* dans 0,9% des cas (n=9).

Parmi les cas de paludisme à *P. falciparum* 76,33% (748/980) des patients avaient une densité parasitaire ≥ 2000 formes asexuées par microlitre de sang. Ceux dont les confettis étaient disponibles (n=727) ont été considérés de façon systématique pour l'analyse moléculaire. Les caractéristiques de cette population d'étude par site de collecte sont résumées dans le tableau III.

Tableau III : Caractéristiques des sujets inclus par site de collecte

Caractéristiques	Site de collecte		P value
	Nanoro (N=378)	Nazoanga (N=349)	
Sexe			
M	200(52.36%)	182(47.64%)	0.83
F	178(51.59%)	167(48.41%)	0.83
Age Médian (Q25- 75)	4 (2-7)	3 (1-5)	0.0028
Température (SD)	38.42 \pm 0.86	38.46 \pm 0.96	0.65
Hb* (SD)	9.58 \pm 2.19	9.30 \pm 1.83	0.069
MGDP**	40052.65 (35321.5 - 45417.5)	31992.95 (27829.59 - 36779.15)	0.0186
Prévalence gamétocytes	29(7.67%)	20(5.73%)	0.29

*Taux d'hémoglobine en g/dL

**Moyenne Géométrique de la Densité Parasitaire / μ L

Aucune différence n'a été observée entre les deux sites ni pour la température axillaire moyenne (p=0,65) ni pour le taux d'hémoglobine (p=0,06). Par contre, l'âge moyen des patients et le niveau moyen de parasitémie étaient significativement plus élevés à Nanoro qu'à Nazoanga (p=0,003 et p=0,018 respectivement). Les deux sexes

étaient aussi représentés à des proportions quasiment équitables (sexe ratio M/F de 1,10). Dans l'ensemble, ce sont les enfants de moins de cinq ans qui étaient les plus représentés.

Tous les 727 isolats ont été considérés pour le génotypage des allèles du gène de *MSP-1* et celui de *MSP-2*. Un seul isolat présentait une PCR négative sur l'ensemble des deux gènes. Les résultats de prévalence de chaque famille allélique sont consignés dans les tableaux IV.

Tableau IV : Prévalence des allèles de *MSP-1* et *MSP-2* par site de collecte

Famille allélique	Site de collecte		P -value
	Nanoro N=377	Nazoanga N=349	
<i>MSP-1</i>			
<i>K1</i>	289(50.17%)	287(49.83%)	0.064
<i>MAD20</i>	177(48.10%)	191(51.90%)	0.033
<i>R033</i>	188(51.51%)	177(48.49%)	0.792
<i>MSP-2</i>			
<i>3D7</i>	322(51.77%)	300(48.23%)	0.767
<i>FC27</i>	254(51.63%)	238(48.37%)	0.774

Ce tableau montre que tous les profils polymorphiques de *MSP-1* et de *MSP-2* de *P. falciparum* étaient représentés dans la zone de Nanoro. A l'exception de l'allèle *MAD20* de *MSP-1* qui était plus représentés à Nazoanga qu'à Nanoro ($p=0,033$), aucune différence de prévalence des allèles n'a été observée entre les deux sites de collecte. Il y avait une forte prédominance des familles *K1* et *3D7* pour *MSP-1* et *MSP-2* respectivement. Les moins représentées pour *MSP-1* étaient les familles *RO33* (50,27%) et *MAD20* (50,69%). Pour *MSP-2* la famille allélique *FC27* était la moins représentée avec une prévalence de 67,77%.

Pour étudier la relation entre la présence d'une famille allélique donnée du gène *MSP-1* et *MSP-2* de *P. falciparum* et les signes du paludisme, nous avons choisi trois paramètres clés objectivement mesurables et qui représentent des traits caractéristiques de la maladie : La fièvre, l'anémie et la parasitémie.

Le tableau V résume les résultats du typage des allèles de *MSP-1* et de *MSP-2* en fonction de la température axillaire, du taux d'hémoglobine et du niveau de parasitémie.

Tableau V : Prévalences des allèles de *MSP-1* en fonction de la température, du taux d'hémoglobine et de la densité parasitaire

	Profil polymorphique							P value
	<i>KI</i>	<i>MAD20</i>	<i>R033</i>	<i>KI-MAD20</i>	<i>KI - R033</i>	<i>MAD20-R033</i>	<i>KI-MAD20 -R033</i>	
	(n=175)	(n=68)	(n=62)	(n=125)	(n=121)	(n=20)	(n=155)	
Temp*(SD)	38.42 (0.84)	38.43 (0.96)	38.65 (0.91)	38.35 (0.97)	38.48 (0.88)	38.17 (1.06)	38.46 (0.92)	0.217
Hb**(SD)	9.53 (2.11)	9.4 (2.01)	9.79 (2.2)	9.45 (2.0)	9.5 (1.9)	9.42 (2.4)	9.09 (1.9)	0.264
MGDP *** IC	30178.7 (25441.3 - 37095.8)	43593.7 (31405.7- 60511.7)	33432.3 (22943.3- 48716.5)	31200.2 (25293.4 - 38486.2)	47947.26 (38476.2 - 59749.5)	42813.47 (24700.3 - 74209.3)	36681.8 (30503.9- 44111.0)	0.315

*Température axillaire moyenne en °C

**Taux d'hémoglobine moyen en g/dL

***Moyenne Géométrique de la densité parasitaire / μ L

Aucune influence du profil polymorphique de *MSP-1* n'a été observée ni avec la température, ni avec le taux d'hémoglobine ou le niveau de parasitémie. Les valeurs moyennes de chacun des trois paramètres étaient quasiment identiques sur tous les types de profile polymorphiques.

Nous avons ensuite étudié l'influence du polymorphisme de *MSP-2* sur la survenue de ces paramètres (tableau VI).

Tableau VI : Prévalences des allèles de *MSP-2* en fonction, de la température, du taux d'hémoglobine et de la densité parasitaire

	Profil polymorphique			P value
	<i>3D7</i> (n=234)	<i>FC27</i> (n=104)	<i>3D7 - FC27</i> (n=388)	
Temp* (SD)	38.40(0.9)	38.50(0.1)	38.44(0.9)	0.558
Hb** (SD)	9.68(2.1)	9.30(2.1)	9.30(1.9)	0.021
MGDP*** (IC)	36856.01 (30999. - 43818.4)	27917.74 (21169.9 - 36816.4)	38067.6 (33752.6-42934.3)	0.311

*Température axillaire moyenne en °C

**Taux d'hémoglobine moyen en g/dL

***Moyenne Géométrique de la densité parasitaire / μ L

Le taux moyen d'hémoglobine était significativement moins élevé ($p=0,021$) chez les patients infectés par les clones de type *FC27*. Cela montre une association de cette famille allélique (*FC27*) avec la survenue de l'anémie palustre chez les patients infectés. Aucune influence du polymorphisme au niveau du gène *MSP-2* n'a été observée ni sur la température axillaire ni sur le niveau de parasitémie ($p=0,558$ et $p=0,311$ respectivement).

Dans la zone de Nanoro en moyenne 64,84% des patients étaient infectés par plus d'un clone de *P. falciparum*. Cela nous a conduit à évaluer l'impact de la multiplicité de l'infection sur la survenue de l'anémie et le l'hyperparasitémie. Les résultats de cette analyse sont consignés dans le tableau VII.

Tableau VII : Multiplicité de l'infection en fonction de la moyenne géométrique, de la densité parasitaire (MGDP) et du taux d'hémoglobine (Hb)

<i>MOI</i>	1	2	3	4	5	≥6	P-value
<i>MSP-1</i>							
Effectif (n)	257	195	129	73	45	27	-
MGDP* (IC)	34391.7 (28951.7 - 40853.8)	38287.5 (32035.5 - 45759.7)	37060.3 (29818.5 - 46060.9)	37005.5 (28528.3 - 48001.8)	36336.4 (25877.9 - 51021.7)	29130.3 (17887.5 - 47439.3)	0.416
Hb** (SD)	9.61(2.1)	9.57(2.2)	9.15(1.9)	9.08(1.9)	9.05(1.9)	9.38(1.9)	0.063
<i>MSP-2</i>							
Effectif (n)	246	223	123	90	28	16	-
MGDP* (IC)	31577.3 (26588.2- 37502.6)	39505.6 (33359.9- 46783.5)	39986 (32797.1- 48750.6)	38348.3 (29019.6 - 50675.7)	32373.2 (20719.4- 50581.7)	29140.5 (15120.7- 56159.7)	0.623
Hb**(SD)	9.56(2.2)	9.42(2.1)	9.34(1.9)	9.44(1.9)	9.29(1.7)	8.08(1.8)	0.083

*Moyenne Géométrique de la Densité Parasitaire /μL

**Taux d'hémoglobine moyen en g/dL

Ce tableau montre que si un patient héberge plusieurs souches de *P. falciparum*, cela entraînerait une diminution pouvant être considérée significative du son taux d'hémoglobine. Par contre le fait d'héberger un ou plusieurs clones n'avait pas d'impact sur le niveau de parasitémie. Le tableau VIII résume les résultats de l'étude de la multiplicité de l'infection (*MOI*), de la parasitémie et du taux d'hémoglobine en fonction de l'âge du patient.

Tableau VIII : Multiplicité de l'infection (MOI), taux d'hémoglobine (Hb) et moyenne géométrique de la densité parasitaire (MGDP) en fonction de l'âge du patient.

Age /an	<2	2-5	6-10	11-15	≥16	p-value
Effectif (n)	137	388	138	47	17	
Hb*(SD)	8.23(1.73)	9.45(1.7)	9.2(2.1)	10.33(2.9)	12.85(2.1)	<0.00001
MGDP** (IC)	44257.34 (34807.2 - 56273.2)	36635.3 (32258.56 - 41605.81)	34125.15 (27623.4 - 42157.3)	26526.05 (19410.9 - 36249.2)	15611.71 (10976.5 - 22204.27)	0.002
MOI-MSP1	2.5(1.52)	2.44(1.41)	2.23(1.36)	2(1.39)	1.52(1.00)	0.002
MOI-MSP2	2.5(1.39)	2.32(1.27)	2.15(1.23)	2.04(1.30)	1.35(0.60)	0.002

*Taux d'hémoglobine moyen en g/dL

**Moyenne Géométrique de la densité parasitaire / μ L

On note une augmentation du taux d'hémoglobine suivant l'âge, allant de 8,23 chez les moins de 2 ans à 12,85 chez les plus âgés ($p < 0,00001$). On note cependant une diminution significative de la moyenne géométrique de la densité parasitaire (MGDP) a été notée suivant l'âge. Les enfants de 2-5 ans présentent les niveaux de parasitémie les plus élevés. Egalement, une diminution statistiquement significative de la multiplicité de l'infection (MOI) a été observée suivant l'âge. Les enfants de moins de deux ans hébergeaient en moyenne 2,5 génotypes parasitaires différents alors que cette valeur chez les adultes (≥ 16 ans) variait entre 1,3 et 1,5.

Dans une deuxième phase de notre analyse, nous avons étudié la variabilité des symptômes selon le profil polymorphique de la souche incriminée chez les patients souffrant de paludisme simple à *P. falciparum* avec $2000 < DP < 200000$ et $Hb \geq 5g/dL$. Pour cela, nous avons dans un premier temps répertorié les différents symptômes rapportés au cours de notre étude (figure 4).

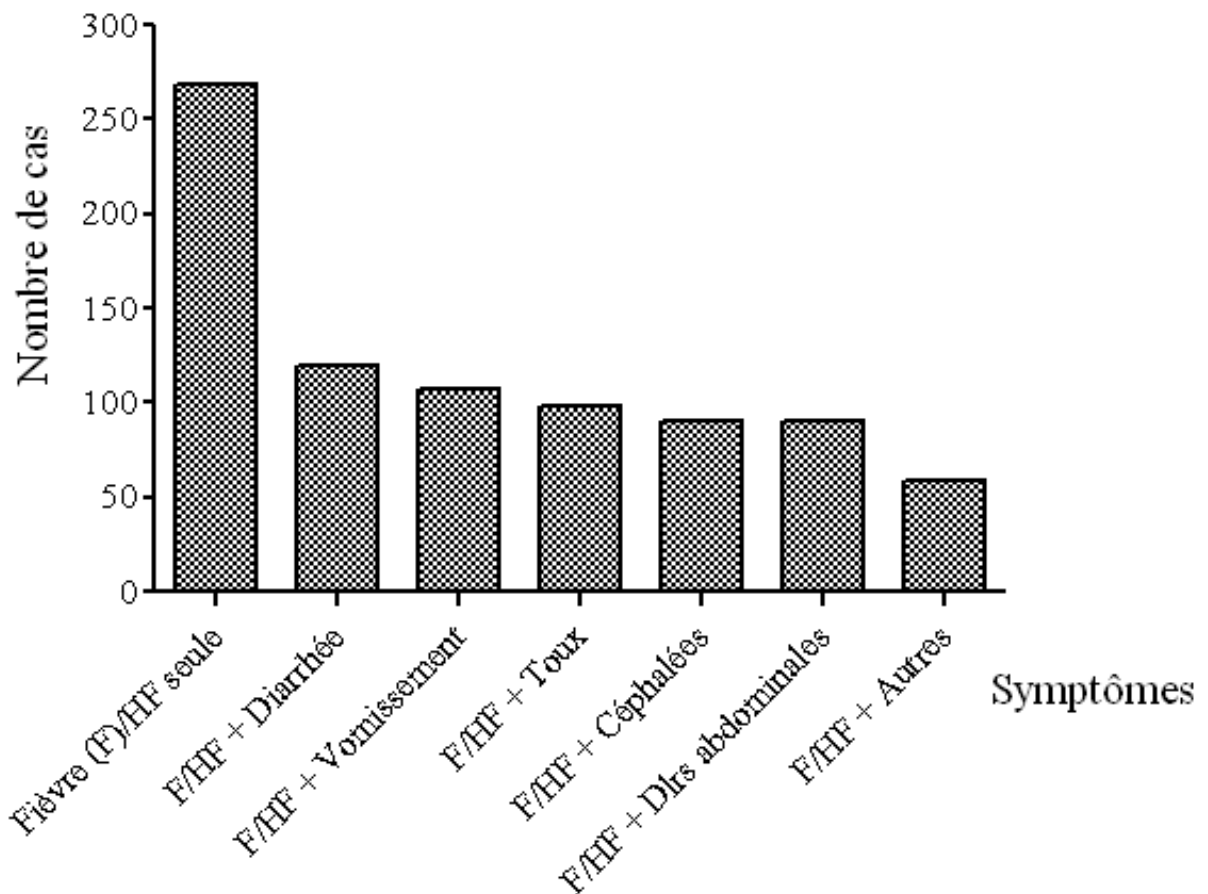


Figure 4 : Les principaux symptômes les plus couramment observés dans la zone de Nanoro

HF : Histoire de Fièvre

Dls : Douleurs

Autres : myalgie, anorexie, asthénie, algie diffuse, sensation de froid, dysurie, prurit, otite, râles, vertiges, conjonctivite, lésion cutanée, algie d'oreille et frisson.

Les cas de fièvre ou d'histoire de fièvre étaient les plus rapportés et constituaient le principal motif de consultation.

Les symptômes associés les plus fréquemment observés étaient respectivement la diarrhée, les vomissements, la toux, les céphalées et les douleurs abdominales. Les autres symptômes étaient : myalgie, anorexie, asthénie, algie diffuse, sensation de froid, dysurie, Prurit, otite, râles, vertiges, conjonctivite, lésion cutanée, algie d'oreille et frisson.

Dans un second temps, nous avons vérifié si une famille allélique du gène *MSP-1* était spécifiquement associée à la survenue d'un des types de symptômes répertoriés. La figure 2 représente les résultats du génotypage des allèles du gène *MSP-1* selon les types de symptômes.

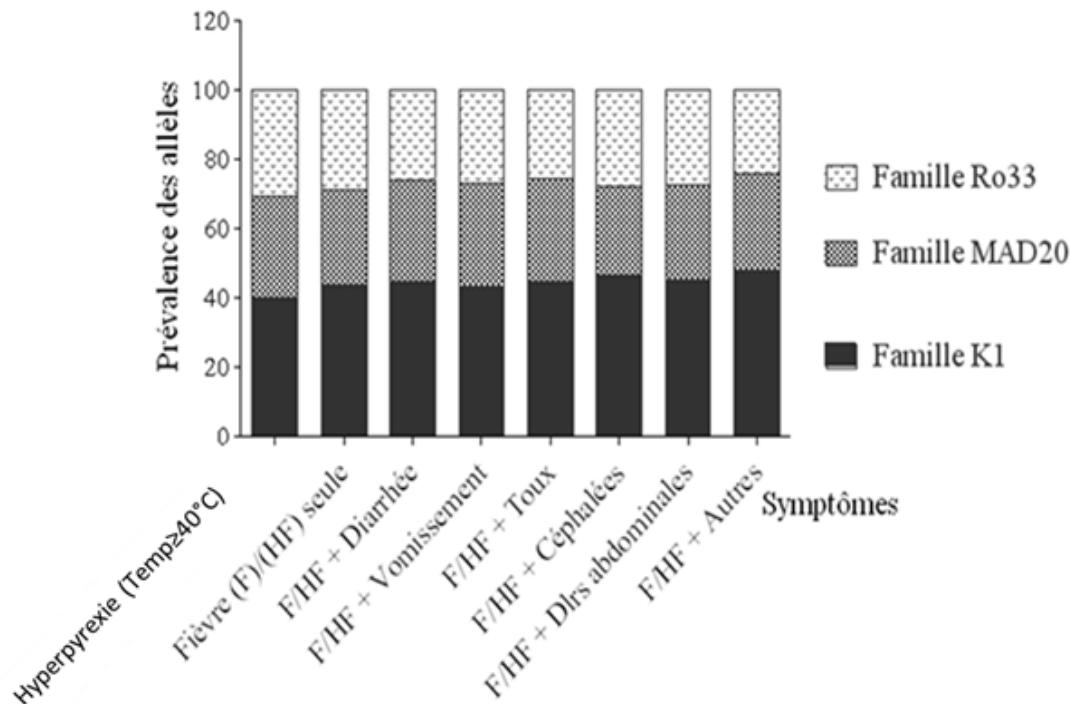


Figure 5 : Prévalence des familles alléliques de *MSP-1* par type de symptôme

HF : Histoire de Fièvre

Dls : Douleurs

Autres : myalgie, anorexie, asthénie, algie diffuse, sensation de froid, dysurie, prurit, otite, râles, vertiges, conjonctivite, lésion cutanée, algie d'oreille et frisson.

La famille allélique *K1* est dominant dans tous les types de symptômes. Elle est suivie respectivement de la famille *MAD20* et *RO33*. Pour chacun des trois familles, aucune différence significative n'a été observée suivant les types de symptômes. La figure montre alors qu'aucune famille allélique de *MSP-1* n'est spécifiquement associée à des signes cliniques particuliers.

Cette même analyse de la relation entre polymorphisme de *P. falciparum* et les manifestations cliniques du paludisme a été reprise en utilisant cette fois-ci le block central de *MSP-2* comme marqueur de polymorphisme (figure 3).

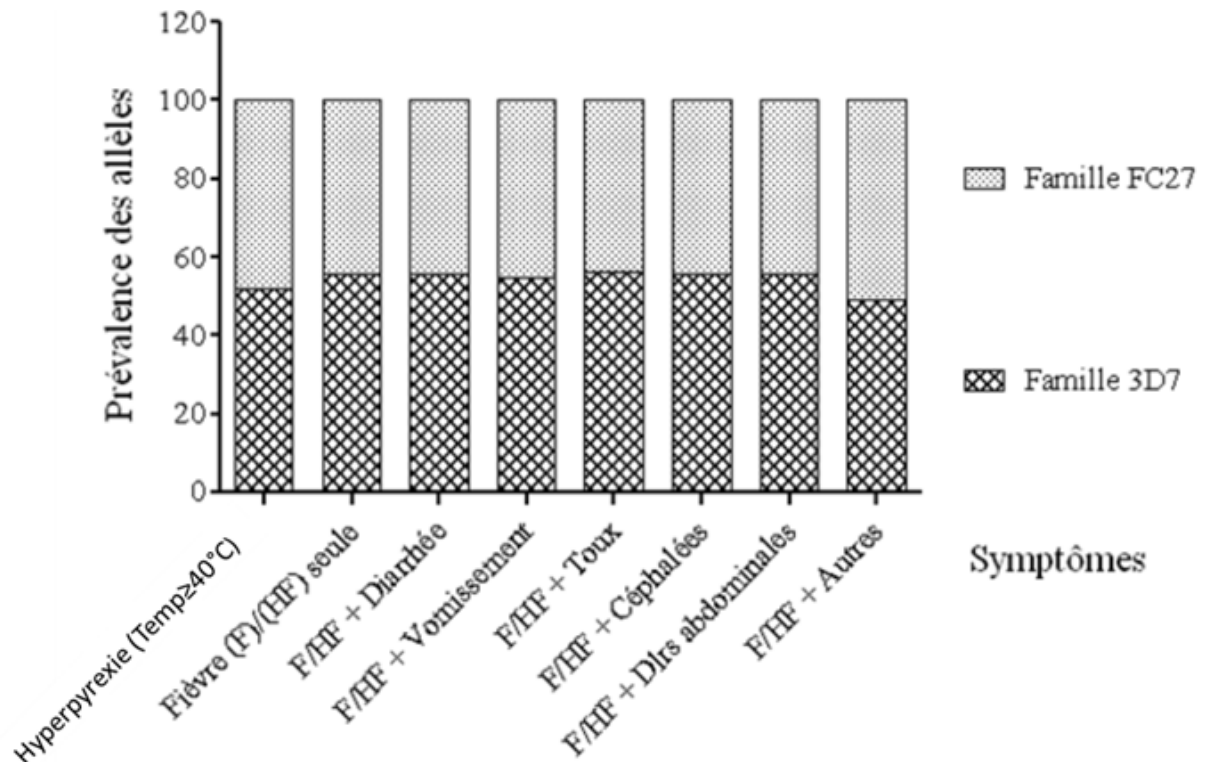


Figure 6 : Prévalence des familles alléliques de *MSP-2* par type de symptôme

HF : Histoire de Fièvre

Dls : Douleurs

Autres : myalgie, anorexie, asthénie, algie diffuse, sensation de froid, dysurie, Prurit, otite, râles, vertiges, conjonctivite, lésion cutanée, algie d'oreille et frisson.

La famille allélique *3D7* était majoritairement retrouvée dans tous les types de symptômes observés et cela en conformité avec la forte prédominance de cette famille allélique dans la zone de Nanoro. Elle est suivie de la famille allélique *FC27* qui était aussi représentée dans tous les types de symptômes. Cette figure montre qu'il n'y pas de différence de prévalence des allèles de *MSP-2* d'un symptôme observé à l'autre. Il n'ya donc pas d'association entre un type de symptôme observé et une famille allélique donnée du gène *MSP-2*.

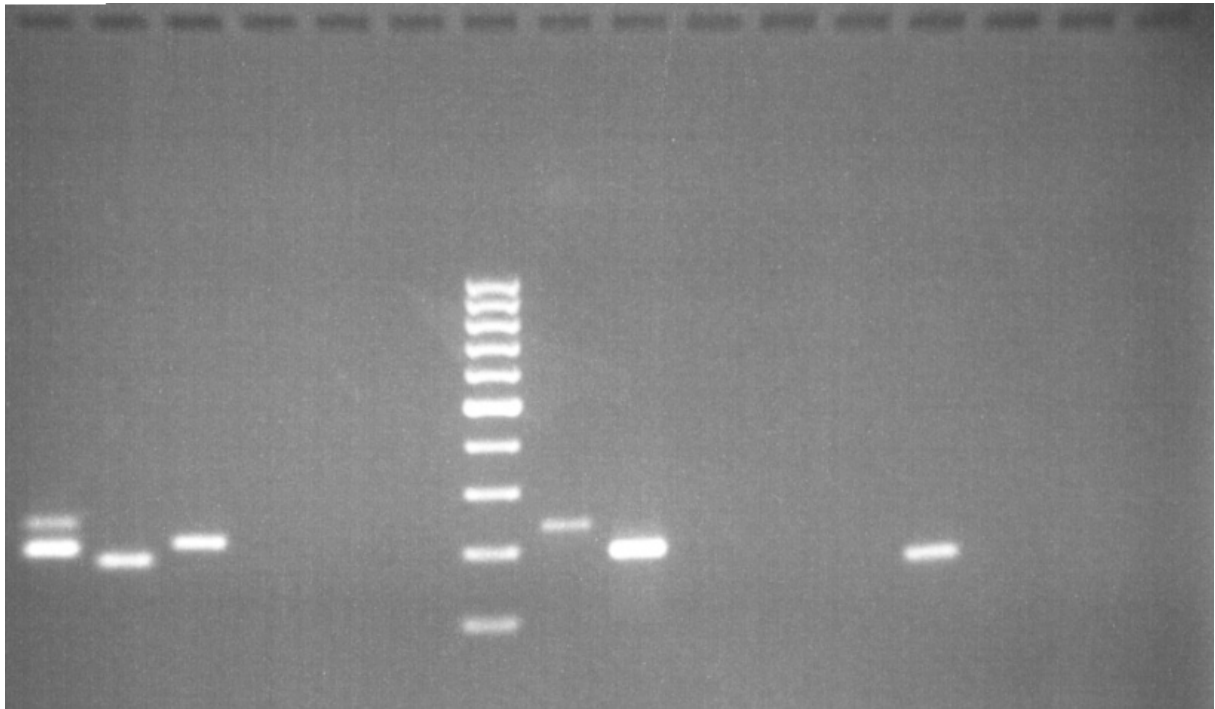


Photo PCR prise le 04/03/13 (e) de la famille allélique *MAD20* de *MSP-1*

Puits 1 : échantillon positif avec 2 génotypes parasites

Puits 2, 3, 8 et 9 : échantillons positifs avec un génotype parasite chacun

Puits 4, 5, 6, 10, 11 et 12 : Échantillons négatifs pour cette famille allélique

Puits 13 : D10 (Contrôle positif de la famille allélique)

Puits 7 : Marqueur de Poids moléculaire de 100pb.

Puits 14, 15 : Contrôle négatif

Puits 16 : Mix (mélange réactionnel de la PCR).

IV. DISCUSSION

En zone d'endémie palustre, les individus hébergent une ou plusieurs souches en même temps. Le nombre de clones qu'héberge un patient ainsi que le profil polymorphique de ces clones sont des paramètres importants à prendre en compte dans l'épidémiologie du paludisme. En effet selon l'étude de Ntoumi et *al.* au Gabon, certains clones étaient sur-représentés chez les isolats de malades que chez les isolats provenant des porteurs asymptomatiques (Ntoumi *et al.*, 2000). Eu égard à la diversité des signes cliniques du paludisme, notre but dans la présente étude était de vérifier d'une part si certains clones étaient associés à des manifestations cliniques particulières de la maladie et de vérifier d'autre part si le fait d'héberger plusieurs clones pouvait favoriser la survenue de certains types de symptômes.

De la diversité des souches entre les deux sites de collecte

Nos résultats montrent une diversité des souches circulant dans la zone de Nanoro. Tous les profils polymorphiques de *MSP-1* et de *MSP-2* y étaient retrouvés. Il y avait une forte prédominance de l'allèle K1 de *MSP-1* et l'allèle 3D7 de *MSP-2* dans les deux sites de collecte. Le même constat avait été fait par Soulama et *al.* en 2009 à la fois en zone urbaine et en zone rurale du Burkina Faso (Soulama et *al.*, 2009). Exceptée la famille allélique *MAD20* de *MSP-1* qui était sur-représentée à Nazoanga, on notait une parfaite similarité des clones rencontrés à Nanoro et à Nazoanga. Cela s'explique par la proximité des deux sites (environs 15 Km) et l'intensité du flux de la population entre les deux sites.

De la diversité génétique et la densité parasitaire

En considérant la variation de la prévalence des allèles selon la densité parasitaire, la différence n'était pas significative pour la plupart des allèles de *MSP-1* et de *MSP-2*. Il n'y a donc pas de profil polymorphique qui soit plus susceptible dans la survenue des fortes parasitémies. Cela pourrait donc être lié à d'autres facteurs de l'hôte (état nutritionnel, le statut immunitaire, le type d'hémoglobine, la prise ou non d'un traitement antipaludique) ou de l'inoculum (nombre de sporozoïtes injectés lors de la piqûre infestante). Une étude de ces facteurs nous aurait permis de confirmer

cette hypothèse. Cependant cela aurait nécessité des ressources supplémentaires dont nous ne disposions pas au moment de l'étude.

De la diversité génétique et l'anémie palustre

Nos résultats montrent que c'est la famille allélique *FC27* du gène *MSP-2* qui était beaucoup plus associée aux faibles valeurs de taux d'hémoglobine. Aucune différence significative n'a été observée avec la famille *3D7*. Nos résultats sont proches de ceux de Soulama et al. qui a montré une association statistiquement significative entre la présence de la famille *3D7* et l'atténuation de la sévérité de l'anémie palustre (Soulama et al., 2005). Pour les familles alléliques de *MSP-1* aucune différence significative n'a été observée ni pour la prévalence de chaque famille prise individuellement, ni par comparaison avec les autres familles. Toutefois, la relation entre la diversité génétique de *P. falciparum* et l'anémie palustre nécessite encore plus d'investigation en prenant en compte les autres causes d'anémie chez le patient.

De la multiplicité de l'infection (MOI)

Nos résultats montrent que plus de la moitié des patients étaient infectés par plus d'un clone de *P. falciparum*. Cela corrobore les résultats de Issifou au Bénin qui montrait une prévalence d'infection multiples de 57% et de 70% au cours de la saison des pluies et de la saison sèche respectivement (Issifou et al., 2007). Les enfants de moins de 2 ans hébergeaient le plus grand nombre de génotypes parasites avec une *MOI* de 2,5 en moyenne. Contrairement aux observations de Issifou et al qui montrait que l'âge du patient n'avait pas d'influence sur ce nombre, nos résultats montrent une diminution statistiquement significative du *MOI* avec l'âge. Cette association entre l'âge et la multiplicité de l'infection avait été évoquée par Hamid et al. en 2013 dans une étude conduite au Soudan (Hamid et al., 2013). Cela pourrait s'expliquer par le fait de l'acquisition d'une immunité antiparasitaire chez les adultes vivant en zone d'endémie, entraînant l'élimination de certaines souches parasites.

Nos résultats montrent que l'accroissement du nombre de génotypes parasites hébergés par le patient était une cause de la diminution du taux d'hémoglobine.

Cela est corroboré par les résultats de Mockenhaupt et *al.* qui montrait aussi une corrélation entre la multiplicité de l'infection et l'anémie palustre (Mockenhaupt et *al.*, 2003). Par contre le portage de plusieurs souches n'avait pas d'impact sur la densité parasitaire. Cela voudrait dire qu'une forte densité parasitémie ne signifie pas la présence de plusieurs génotypes parasitaires. Une forte parasitémie pourrait donc être la résultante de plusieurs autres facteurs liés à l'hôte (favorable à la prolifération du parasite) ou à l'inoculum.

De l'influence de l'âge du patient sur ces paramètres

L'âge du patient avait une influence très importante sur le taux d'hémoglobine ($p < 0,00001$). L'anémie sévère ($Hb < 5g/dl$) était beaucoup plus fréquente chez les enfants de moins de cinq ans. Cela pourrait s'expliquer par le caractère multifactoriel de l'anémie qui pourrait associer d'autres causes telle que la malnutrition dont les enfants sont les plus concernés (Beiersmann et *al.*, 2012). Nos observations en relation avec l'anémie sont donc à relativiser à cause des autres causes d'anémie que notre étude n'a pas explorées. Ce qui représente d'ailleurs une des limites de notre étude. Nos résultats indiquent également qu'il y avait une relation statistiquement significative entre l'âge et la densité parasitaire. En effet, les plus fortes densités parasitaires étaient observées chez les enfants de moins de 2 ans et les faibles densités s'observaient beaucoup plus chez les adultes. Ce constat a déjà été fait par plusieurs auteurs (Hamid et *al.*, 2013). L'acquisition d'une prémunition chez ces derniers pourrait être la cause majeure de cette différence.

Du polymorphisme de *P. falciparum* et la variabilité de signes cliniques

La symptomatologie du paludisme n'est pas spécifique. Dans la zone de Nanoro les symptômes les plus fréquemment observés étaient respectivement la fièvre ou l'histoire de fièvre, la diarrhée, les vomissements, la toux, et les douleurs abdominales. En étudiant la relation entre la fréquence de ces symptômes et le profil polymorphique des souches incriminées, nos résultats montrent qu'aucune famille allélique de *MSP-1* ou de *MSP-2* n'était spécifiquement associée à un type de symptôme particulier. En

effet quel que soit le type de symptôme, tous les profils polymorphiques de *MSP-1* et de *MSP-2* y étaient représentés à des proportions approximativement égales.

Aussi, aucune différence significative de la prévalence des familles allélique n'a été observée d'un symptôme à l'autre et cela différait du constat de Ofosu-Okyere et *al.* qui montrait dans une étude conduite au Ghana une susceptibilité de la famille *MAD20* de *MSP-1* et *FC27* de *MSP-2* dans la morbidité palustre (Ofosu-Okyere et *al.*, 2000).

CONCLUSION

Il existe une très grande diversité génétique des souches de *P. falciparum* circulant dans la zone de Nanoro. Avec respectivement 79,36% et 85,60% de prévalence, les familles alléliques *K1* de *MSP-1* et *3D7* de *MSP-2* constituaient les profils polymorphiques les plus prédominants dans la zone. L'étude a permis une meilleure compréhension de la relation entre les manifestations cliniques du paludisme et la diversité génétique des populations parasitaires. Nous avons en effet observé que d'une manière générale, aucune famille allélique n'était associée à une manifestation clinique particulière du paludisme simple exception faite de la famille allélique *FC27* qui était beaucoup plus associée à la survenue de l'anémie.

A travers cette étude, il ressort que la variabilité génétique des souches est un paramètre très important à prendre en compte dans l'étude de l'épidémiologie de la maladie. Il est donc nécessaire d'étendre cette étude au niveau national afin de connaître la répartition spatiale des clones sur les différents faciès épidémiologiques du pays. L'étude soulève également la question de savoir quel profil polymorphique de *P. falciparum* serait la plus susceptible en matière de résistance aux antipaludiques. De ce fait, nos investigations à venir viseront à étudier la relation entre le polymorphisme de *P. falciparum* et la réponse au traitement avec les médicaments recommandés par le Burkina Faso pour le traitement du paludisme simple à *P. falciparum*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Beiersmann C, Bountogo M, Tiendrébeogo J, Louis VR, Gabrysch S, Yé M, Jahn A, Muller O (2012): Malnutrition in young children of rural Burkina Faso: comparaison of survey data from 1999 with 2009. *Tropical Medicine and International Health*, Vol 17 (6), 715-721.

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.

Cox Francis EG (2010): History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors* 3:5.

Carnevale P, Robert V (2009) : Les anophèles : biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. IRD 2009, Collection Didactiques.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O et al (2002): Genome sequence of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nature*, Vol 419, 498-511.

Gupta S, Hill AVS, Kwiatkowski D, Greenwood AM, Greenwood BM, Day KP (1994): Parasite virulence and disease patterns in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol 91, 3715-3719.

Hamid MMA, Mohammed SB, El-Hassan IM (2013): Genetic diversity of *P. falciparum* Fiel isolates in Central Sudan Inferred by PCR Genotyping of Merozoite Surface Protein 1 and 2. *North American Journal of Medical Sciences* Vol 5 (2), 95-101.

HARBACH R.E., 2004 – The classification of genus *Anopheles* (Diptera :Culicidae) : a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull.Ent. Res.*, 94, 537-553.

Issifou S, Djikou S, Sanni A, Lekoulou F, Ntoumi F (2001): Pas d'influence de la saison de transmission ni de l'âge des patients sur la complexité et la diversité génétiques des infections dues à *P. falciparum* à Cotonou (Bénin) *Bull Soc PatholExot* 94 2bis, 195-198.

Jeffery G M (1966): Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of *Plasmodium*. *Bull. Org. Mond. Santé*, (35), 873-882.

Kanunfre KA, Léoratti FMS, Hoffmann EHE, Durlacher RR, Ferreira AW, Moraes-Avila SL, Ferreira MU (2003) : Differential Recognition of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 2 Variants by Antibodies from Malaria Patients in Brazil *American Society for Microbiology*, Vol 10 (5), 973-976.

Kyes S, Horrocks P and Newbold C (2001): Antigenic variation in the infected red cell surface in malaria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 673-707.

Low A, Chandrashekar IR, Adda CG, Yao S, Sabo JK, Zhang X, Soetopo A, Anders RF, Norton RS (2007): Merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum*: expression, structure, dynamics, and fibril formation of the conserved N-terminal domains. *Biopolymers*, Vol 87 (1), 12-22.

Marsh K, Snow RV (1997): Host-parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. *Philos Trans R Soc Lond B BiolSci* 352 (1359), 1385-1394.

Ministère de la Santé du Burkina Faso-District sanitaire de Nanoro : Plan d'action 2014

Ministère de la Santé du Burkina Faso- Programme National de lutte contre le Paludisme (PNLP), rapport 2013 sur la situation du paludisme au Burkina Faso.

Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Eggelte TA, Markert M, Anemana S, Otchwemah R, Bienzle U (2003): *Plasmodium falciparum* multiplicity correlates with anaemia in symptomatic malaria *Tropical Medicine and International Health*, Vol 8 (10), 857-859.

Ntoumi F, Ngoundou-Landji J, Luty AJF, Dubreuil G, Millet P (2000) : Polymorphisme allélique du gène *MSP-2* de *Plasmodium falciparum* analysé à partir d'échantillons sanguins d'enfants gabonais. *Bull Soc Pathol Exot* Vol 94 (2bis), 183-187.

Oforu-okyere A, Mackinnon MJ, Sowa MPK, Koram KA, Nkrumah F, Osei YD, Hill WG, Wilson MD, Arnot DE (2000): Novel *Plasmodium falciparum* clones and rising clone multiplicities are associated with the increase in malaria morbidity in Ghanaian children during the transition into the high transmission season *Cambridge University Press Parasitology* (123), 113-123.

Organisation mondiale de la santé (1981) : Caractérisation de souches de parasite du paludisme ; cryoconservation et banques d'isolements : mémorandum OMS. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, 59, 881-894.

Organisation Mondiale de la Santé (2012) : Rapport global sur le paludisme.

Organisation Mondiale de la Santé (2011) : Directives pour le traitement du paludisme- 2^e Edition.

Peyerl-Hoffmann G, Jelinek T, Kilian A, Kabagambe G, Metzger WG, von Sonnenburg F (2001): Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda *Tropical Medicine and International Health* vol 6 (8), 607-613.

Siala E, Abdallah R Ben, Bouratbine A, Aoun K (2010) : Actualités du diagnostic biologiques du paludisme, *Revue Tunisienne d'Infectiologie*, Vol 4, 5-9.

Smythe JA, Coppel RL, Day KP, Martin RK, Oduola AMJ, Kemp DJ, Anders RF (1991): Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88,1751-1755.

Soulama I, Sawadogo M, Nebie I, Diarra A, Tiono AB, Konaté A, Sirima SB (2006) : Diversité génétique de *Plasmodium falciparum* et pathogénie de l'anémie palustre sévère chez des enfants de moins de 5 ans de la province du Boulgou, Burkina Faso. *Bull SocPatholExot* 99, 3, 166-170.

Tanabe K, Sakihama N, Kaneko O, Saito-Ito A, Kimura M (1999) : A PCR Method for Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* MSP-1. *Tokai J ExpClin Med.*, Vol. 23 (6), 375-381.

Voet Donald, Voet G Judith (2005): métabolisme des acides aminés in *Biochimie*, 2^e édition, section 26-4, page 1023.

Yazdani SS, Mukherjee P, Chauhan VS, Chitnis CE (2006) : Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. *Curr. Mol. Med* 6 (2), 187-203.