ANDREAMBELOSON Tahina Mickaëlla

DETECTION DE L'INFECTION PLASMODIALE PAR POLYMERASE CHAIN REACTION CHEZ LES ECOLIERS DE TSARARANO MAROVOAY ET LEUR CONNAISSANCE ATTITUDE ET PRATIQUE EN MATIÈRE DE PALUDISME

Thèse pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine.

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DE MEDECINE

Année : 2018 **N° :** 9283

DETECTION DE L'INFECTION PLASMODIALE PAR POLYMERASE CHAIN REACTION CHEZ LES ECOLIERS DE TSARARANO MAROVOAY ET LEUR CONNAISSANCE ATTITUDE ET PRATIQUE EN MATIÈRE DE PALUDISME

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 19 Septembre 2018 à Antananarivo

Par

Madame ANDREAMBELOSON Tahina Mickaëlla

Née le 21 Juillet 1992 à Antananario

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MEDECINE (Diplôme d'Etat)

Directeur de thèse : Professeur RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona

MEMBRES DU JURY

Président : Professeur ROBINSON Annick Lalaina

Juges : Professeur ANDRIANASOLO Radonirina Lazasoa

Professeur RANDRIA Mamy Jean de Dieu

Rapporteur : Professeur RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona

REPOBLIKAN'IMADAGASIKARA
Fitiavana – Tanindrazana- Fandrosoana

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DE MEDECINE

☎/Fax : 22 277 04 - ✉ : BP. 375 Antananarivo
E-mail : facultedemedecine_antananarivo@yahoo.fr

I. CONSEIL DE DIRECTION

A. DOYEN — Pr. SAMISON Luc Hervé

B. VICE-DOYENS

Médecine Humaine

- Troisième Cycle Long (Internat Qualifiant, Clinicat, Agrégation) — Pr. ANDRIANAMPANALINARIVO HERY Rakotovao
- Scolarité
  - 1er cycle — Pr. VOLOLONTIANA Hanta Marie Danielle
  - 2ème cycle — Pr. RAHARIVELO Adeline
  - 3ème cycle court (stage interné, examens de clinique et thèses) — Pr. RAMANAMPAMONJY Rado Manitrala
- Legislation et LMD — Pr. SOLOFOMALALA Gaëtan Duval
- Projet, Recherche et Ethique — Pr. HUNALD Francis Allen
- DU, Master et Responsabilité Sociale — Pr. RAZAFINDRABE John Alberto Bam
- Partenariat et Système d'Information — Pr. RAKOTO RATSIMBA Hery Nirina

C. SECRETAIRE PRINCIPAL

- Administration Générale et Finances — M. RANDRIANJAFIARIMANANA Charles Bruno

II. CONSEIL D'ETABLISSEMENT

PRESIDENT — Pr. RAZAFIMAHANDRY Henri Jean Claude

III. RESPONSABLES DE MENTIONS

Mention Médecine Humaine	Pr. RAKOTO ALSON Aimée Olivat
Mention Vétérinaire	Pr. RAFATRO Herintsoa
Mention Pharmacie	Dr. RAOELISON Guy Emmanuel
Mention Sciences Paramédicales	Pr. RAVELOSON Nasolotsiry Enintsoa
Mention Master de Recherche	Pr. RAZAFIMAHANDRY Henri Jean Claude
Mention Master Professionnel	Pr. RAKOTOTIANA Auberlin Felantsoa

IV. CONSEIL SCIENTIFIQUE

PRESIDENT Pr. SAMISON Luc Hervé

V. COLLEGE DES ENSEIGNANTS

A- PRESIDENT Pr. RAJAONARISON Bertille Hortense

B- ENSEIGNANTS PERMANENTS

B-1- PROFESSEURS TITULAIRES D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE RECHERCHE

- **MENTION MEDECINE HUMAINE**

BIOLOGIE

- Hématologie Biologique	Pr. RAKOTO ALSON Aimée Olivat
- Immunologie	Pr. RASAMINDRAKOTROKA Andriamiliharison Jean
- Parasitologie	Pr. RAZANAKOLONA Lala Rasoamialy Soa

CHIRURGIE

- Chirurgie Cardio-vasculaire	Pr. RAVALISOA Marie Lydia Agnès
- Chirurgie Générale	Pr. RAKOTO RATSIMBA Hery Nirina
- Chirurgie Pédiatrique	Pr. ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana
	Pr. HUNALD Francis Allen
- Chirurgie Thoracique	Pr. RAKOTOVAO Hanitrala Jean Louis
- Chirurgie Viscérale	Pr. SAMISON Luc Hervé
	Pr. RAKOTOARIJAONA Armand Herinirina
- Orthopédie Traumatologie	Pr. RAZAFIMAHANDRY Henri Jean Claude
	Pr. SOLOFOMALALA Gaëtan Duval
- Urologie Andrologie	Pr. RANTOMALALA Harinirina Yoël Honora
	Pr. RAKOTOTIANA Auberlin Felantsoa

MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

- Cardiologie	Pr. RABEARIVONY Nirina
	Pr. RAKOTOARIMANANA Solofonirina
- Dermatologie Vénéréologie	Pr. RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa
	Pr. RAMAROZATOVO Lala Soavina
- Hépato Gastro-Entérologie	Pr. RAMANAMPAMONJY Rado Manitrala
- Maladies Infectieuses	Pr. RANDRIA Mamy Jean de Dieu
	Pr. ANDRIANASOLO Radonirina Lazasoa
- Néphrologie	Pr. RANDRIAMAROTIA Harilalaina Willy Franck
	Pr. RANDRIAMANANTSOA Lova Narindra
- Neurologie	Pr. TEHINDRAZANARIVELO Djacoba Alain
- Psychiatrie	Pr. RAHARIVELO Adeline
	Pr. RAJAONARISON Bertille Hortense
- Radiothérapie - Oncologie Médicale	Pr. RAFARAMINO RAZAKANDRAINA Florine
- Pneumologie	Pr. RAHARIMANANA Rondro Nirina
- Médecine Interne	Pr. VOLOLONTIANA Hanta Marie Danielle
- Réanimation Médicale	Pr. RAVELOSON Nasolotsiry Enintsoa

MERE ET ENFANT

- Gynécologie Obstétrique	Pr. ANDRIANAMPANALINARIVO HERY Rakotovao
	Pr. RANDRIAMBELOMANANA Joseph Anderson
- Pédiatrie	Pr. RAVELOMANANA RAZAFIARIVAO Noëline
	Pr. ROBINSON Annick Lalaina

SANTE PUBLIQUE

- Administration et Gestion Sanitaire	Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO Henriette
- Santé Communautaire	Pr. RANDRIANARIMANANA Vahiniarison Dieudonné
- Santé Familiale	Pr. RANJALAHY RASOLOFOMANANA Justin
- Statistiques et Epidémiologie	Pr. RAKOTOMANGA Jean de Dieu Marie

SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES

- Anatomie Pathologique	Pr. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA Nantenaina Soa
- Radiodiagnostic et Imagerie Médicale	Pr. AHMAD Ahmad
- Physiologie	Pr. RAKOTOAMBININA Andriamahery Benjamin

TETE ET COU

- Neurochirurgie	Pr. ANDRIAMAMONJY Clément
	Pr. RABARIJAONA Mamiarisoa
- Ophtalmologie	Pr. BERNARDIN Prisca Lala
- Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale	Pr. RAZAFINDRABE John Alberto Bam

- **MENTION VETERINAIRE**

VETERINAIRE

- Pharmacologie	Pr. RAFATRO Herintsoa

B-2- PROFESSEURS D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE RECHERCHE

- **MENTION MEDECINE HUMAINE**

BIOLOGIE

- Hématologie Biologique	Pr. RAKOTOVAO Andriamiadana Luc

CHIRURGIE

- Chirurgie Thoracique	Pr. RAKOTOARISOA Andriamihaja Jean Claude

SANTE PUBLIQUE

- Epidémiologie	Pr. RAKOTONIRINA El-C Julio

SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES

- Anesthésie Réanimation	Pr. RAKOTOARISON Ratsaraharimanana Cathérine Nicole
	Pr. RAJAONERA Andriambelo Tovohery

TETE ET COU

- Ophtalmologie	Pr. RAOBELA Léa

➢ **MENTION VETERINAIRE**

VETERINAIRE

- Sciences Ecologiques, Vétérinaires Agronomiques et Bioingenieries	Pr. RAHARISON Fidiniaina Sahondra

B-3- MAITRES DE CONFERENCE

➢ **MENTION MEDECINE HUMAINE**

MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

- Neurologie	Dr. ZODALY Noël
- Pneumo-Phtisiologie	Dr. RAKOTOMIZAO Jocelyn Robert

SANTE PUBLIQUE

- Santé Publique	Dr. RANDRIAMANJAKA Jean Rémi

SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES

- Biophysique	Dr. RASATA Ravelo Andriamparany

➢ **MENTION VETERINAIRE**

VETERINAIRE

- Evolution - Ecologie - Paléontologie - Ressources Génétiques	Dr. RASAMOELINA Andriamanivo Harentsoaniaina
- Biochimie Alimentaire et Médicale	Dr. RAKOTOARIMANANA Hajatiana
- Technologie	Dr. RAHARIMALALA Edwige Marie Julie

➢ **MENTION PHARMACIE**

PHARMACIE

- Pharmacologie Générale	Dr. RAMANITRAHASIMBOLA David
- Pharmacognosie	Dr. RAOELISON Emmanuel Guy
- Biochimie Toxicologie	Dr. RAJEMIARIMOELISOA Clara Fredeline
- Chimie Organique et Analytique	Dr. RAKOTONDRAMANANA Andriamahavola Dina Louisino
- Biochimie	Dr. RANDRIAMANANTENASOA Tiana Nathalie
- Chimie Appliquée, Pharmacologie Physiologie	Dr. RAKOTOARIVELO Nambinina Vololomiarana

B-4- ASSISTANTS

- **MENTION VETERINAIRE**

VETERINAIRE

- Virologie — M. KOKO

- **MENTION PHARMACIE**

PHARMACIE

- Procédés de Production, Contrôle et Qualité des Produits de Santé — Dr. RAVELOJAONA RATSIMBAZAFIMAHEFA Hanitra Myriam

C- ENSEIGNANTS NON PERMANENTS

C-1- PROFESSEURS EMERITES

Pr. ANDRIANARISOA Ange Christophe Félix
Pr. AUBRY Pierre
Pr. RABARIOELINA Lala
Pr. RABENANTOANDRO Casimir
Pr. RABETALIANA Désiré
Pr. RADESA François de Sales
Pr. RAJAONA Hyacinthe
Pr. RAKOTOMANGA Robert
Pr. RAKOTOMANGA Samuel
Pr. RAKOTOZAFY Georges
Pr. RAMAKAVELO Maurice Philippe
Pr. RAMONJA Jean Marie
Pr. RANDRIANASOLO Jean Baptiste Olivier
Pr. RAOBIJAONA Solofoniaina Honoré
Pr. RATSIVALAKA Razafy
Pr. RAZANAMPARANY Marcel Samimamy
Pr. RABENANTOANDRO Rakotomanantsoa

C-2- CHARGE D'ENSEIGNEMENT

TETE ET COU

- Neurochirurgie — Pr. RATOVONDRAINY Willy
- ORL et Chirurgie Cervico-Faciale — Pr. RAKOTO Fanomezantsoa Andriamparany
- Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale — Pr. RAKOTOARISON Richard

VI. SERVICES ADMINISTRATIFS

CHEFS DE SERVICE

SCOLARITE — Mme. SOLOFOSAONA R. Sahondranirina
TROISIEME CYCLE LONG — Mme. RANIRISOA Voahanginirina
PERSONNEL — Mme. RAKOTOARIVELO Liva Harinivo Vonimbola
AFFAIRES GENERALES — M. RANDRIANARISOA Rija Hanitra
COMPTABLITE — M. RATSIMBAZAFIARISON Nivoson Espérant
TELE-ENSEIGNEMENT ET INFORMATIQUE MEDICALE — Dr. ANDRIAMBOLOLONIANA Faly Herizo

VII. IN MEMORIAM

Pr. RAMAHANDRIARIVELO Johnson
Pr. RAJAONERA Frédéric
Pr. ANDRIAMASOMANANA Veloson
Pr. RAKOTOSON Lucette
Pr. ANDRIANJATOVO RARISOA Jeannette
Dr. RAMAROKOTO Razafindramboa
Pr. RAKOTOBE Alfred
Pr. ANDRIAMIANDRA Aristide
Dr. RAKOTONANAHARY
Pr. ANDRIANTSEHENO Raphaël
Pr. RANDRIAMBOLOLONA Robin
Pr. RAMANANIRINA Clarisse
Pr. RALANTOARITSIMBA Zhouder
Pr. RANIVOALISON Denys
Pr. RAKOTOVAO Rivo Andriamiadana
Pr. RAVELOJAONA Hubert
Pr. ANDRIAMAMPIHANTONA Emmanuel
Pr. RANDRIANONIMANDIMBY Jérôme
Pr. RAKOTONIAINA Patrice
Pr. RAKOTO-RATSIMAMANGA Albert
Pr. RANDRIANARISOLO Raymond
Dr. RABEDASY Henri
Pr. MAHAZOASY Ernest
Pr. RATSIFANDRIHAMANANA Bernard
Pr. RAZAFINTSALAMA Charles
Pr. FIDISON Augustin
Pr. RANDRIAMAMPANDRY
Pr. RANAIVOARISON Milson Jérôme
Pr. RASOLONJATOVO Andriananja Pierre
Pr. MANAMBELONA Justin
Pr. RAZAKASOA Armand Emile
Pr. RAMIALIHARISOA Angeline
Pr. RAKOTOBE Pascal
Pr. RANAIVOZANANY Andrianady
Pr. RANDRIANARIVO
Pr. RAKOTOARIMANANA Denis Roland
Pr. ANDRIAMANANTSARA Lambosoa
Pr. RAHAROLAHY Dhels
Pr. ANDRIANJATOVO Jean José
Pr. ANDRIANAIVO Paul Armand
Pr. RANDRIAMBOLOLONA RASOAZANANY Aimée
Pr. RATOVO Fortunat
Pr. GIZY Ratiambahoaka Daniel
Pr. RASOLOFONDRAIBE Aimé
Dr. RAZAKAMANIRAKA Joseph
Pr. ANDRIANJATOVO Joseph
Pr. RAHARIJAONA Vincent Marie
Pr. RAKOTOVAO Joseph Dieudonné
Pr. KAPISY Jules Flaubert
Pr. ANDRIAMBAO Damasy Seth
Pr. RAKOTO RATSIMAMANGA S.U
Pr. RANDRIARIMANGA Ratsiatery Honoré Blaise
Pr. ZAFY Albert
Pr. ANDRIAMANALINA Nirina Razafindrakoto
Pr. RAJAONARIVELO Paul
Pr. ANDRIANANDRASANA Arthur

DEDICACES

« Par la grâce de Dieu, je suis ce que je suis, et sa grâce en moi n'a pas été vaine»

I Corinthiens 15/10a

A Dieu Tout Puissant, Mon Seigneur, Mon Berger, à Toi seul la gloire!

Tous les mots ne sauraient exprimer ma reconnaissance et ma gratitude.
Aussi, c'est tout simplement que je dédie ce modeste mémoire de fin d'étude:

A mes parents : Dada, mon idéal et Neny, mon modèle d'intelligence et bonté, un livre entier ne suffirait pour citer toutes vos qualités et les riches valeurs que vous m'avez inculquer. Elles m'ont permise de me battre malgré tout pour la réalisation de ce vœux de devenir Médecin, qui a nourrit toutes mes ambitions depuis mon enfance. C'est à votre amour inconditionnel, vos sacrifices,votre force de foi, et surtout vos prières que je dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serais demain. Je ne vous remercierai jamais assez, ne serait-ce que pour votre patience sans limite et pour la famille humble et solidaire au sein de laquelle j'ai eu le bonheur et le privilège d'épanouir.

A mon petit frère et mes petites sœurs que j'aime beaucoup, mes fierté, mes éternelles amis qui me comprennent mieux que quiconque : Mendrika, Mampionona, Tanjona; vous avez été là quand j'avais le plus besoin de soutien, surtout ces rudes dernieres années. Petite Jessica, ta présence dans ma vie depuis ta naissance aucours de ma deuxième année de Médecine m'est un inestimable cadeau.

A mon mari et mes enfants. *Inot*, pour ton amour, ta patience, ta perseverance, toutes tes sacrifices et ton soutien, je dirais tout simplement merci. Tu as fais ressortir le meilleur en moi dans les pires moments. Notre adorable petite fille ainée Graciella née pendant les examens de sixième année et Ezra notre petit bébé attendu depuis la date de soutennance, en sont le témoignage. Vous avez partagé mes soffrances, ma joie et grace à vous ma détermination grandi de plus en plus, jour après jour.

A Dadabe et chaque membre de ma grande famille et belle famille qui, de jour comme de nuit, ont fait de leur mieux pour me soutenir en citant affectueusement: Mama, Anna, Donna, Balsama et surtout toi ma cousine et meilleure amie Fenohasina.

A mes collègues de la promotion « **ANDRAINA** », mes collègues de stages hospitaliers d' Antananarivo et de Mahajanga et à tous mes amis stagiaires de l'IPM. Mes sincères remerciements pour vos conseils et votre amitié.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Madame le Docteur, ROBINSON Annick Lalaina

- Professeur Titulaire d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Pédiatrie à la Faculté de Médecine d'Antananarivo
- Directeur du Centre Hospitalier Universitaire – Mère Enfant de Tsaralalana (CHU-MET)

Vous nous faites un très grand honneur en acceptant spontanément de présider cette thèse malgré vos lourdes responsabilités.

Cher Maître, nous vous sommes profondément reconnaissants.

A NOS MAÎTRES ET HONORABLES JUGES DE THESE

Monsieur le Docteur, ANDRIANASOLO Radonirina Lazasoa

- Professeur Titulaire d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Maladies Infectieuses à la Faculté de Médecine d'Antananarivo
- Chef du Service d'Endocrinologie au Centre Hospitalier Universitaire Joseph Raseta Befelatanana.

Monsieur le Docteur, RANDRIA Mamy Jean de Dieu

- Professeur Titulaire d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Maladies Infectieuses à la Faculté de Médecine d'Antananarivo
- Chef du Service de Maladies Infectieuses au Centre Hospitalier Universitaire Joseph Raseta Befelatanana.

Vous nous faites un très grand honneur en acceptant sans hésitation d'évaluer et de juger ce travail. C'est un honneur de bénéficier de vos jugements experts ! Soyez assurés de notre grand respect et de notre profonde reconnaissance.

A NOTRE MAÎTRE, DIRECTEUR ET RAPPORTEUR DE THESE

Monsieur le Docteur RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona

- Professeur d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Pathologies Tropicales et Maladies Transmissibles à l'Université de Toliara
- Titulaire de HDR (Habilitation à Diriger des Recherches) en Pathologies Tropicales et Maladies Transmissibles

Cher Maître, l'opportunité que vous m'avez donnée de pouvoir participer à cette étude, de découvrir les sites d'enquêtes et d'initier mes pas dans la recherche est un grand honneur pour moi. Vous n'aviez pas ménagé votre temps pour m'encadrer avec patience, détermination et bienveillance pour la réalisation de ce travail, et malgré vos nombreuses et lourdes responsabilités, vous avez bien voulu nous faire l'honneur de diriger, rapporter et défendre cette thèse.

Chère maître, nous ne vous remercierons jamais assez. Soyez rassuré de notre profonde admiration et notre entière gratitude !

A NOTRE MAÎTRE ET DOYEN DE LA FACULTE DE MEDECINE D'ANTANANARIVO.

Monsieur le Professeur SAMISON Luc Hervé

Veuillez agréer l'expression de nos plus respectueuses considérations.

A TOUS NOS PROFESSEURS ET ENSEIGNANTS A LA FACULTE DE MEDECINE, D'ANTANANARIVO ET DE MAHAJANGA

*Pour avoir nourri notre ambition par votre engagement et votre compétence qui nous ont servis de modèle***.**

A TOUS NOS MAÎTRES ET ENCADREURES DES STAGES HOSPITALIERS D'ANTANANARIVO ET DE MAHAJANGA

Merci pour votre dévouement dont nous sommes les bénéficiaires ;

Voyez en cette thèse le témoignage de notre profonde gratitude !

A TOUT LE PERSONNEL ADMINISTRATIF ET TECHNIQUE DE LA FACULTE DE MEDECINE DE L'UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

Pour leur active collaboration.

A LA DIRECTION ETA TOUT LE PERSONNEL ADMINISTRATIF ET TECHNIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR DEMADAGASCAR,

En particulier à M. André SPIEGEL

Pour m'avoir accueilli et permis la réalisation de mes stages au sein de cet institut.

A MONSIEUR LE CHEF DE SERVICE DE L'UNITE DE RECHERCHE SUR LE PALUDISME DE L'INSTITUT PASTEUR DE MADAGASCAR, Le Professeur RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona.

Pour votre accueil et la formation de qualité dont nous avons bénéficié.

A Madame le Docteur RAVAOARISOA Elisabeth,

Nous vous exprimons nos remerciements les plus

Sincères et notre profonde reconnaissance pour votre aide et votre participation inestimable dans l'accomplissement de ce travail.

AU TERME DE CETTE THESE, C'EST AVEC UNE REELLE RECONNAISSANCE QUE NOUS ADRESSONS NOS VIVES REMERCIEMENTS A L'ATTENTION PARTICULIERE DE :

❖ **Monsieur Mahosindrahaja Heriniaina.** ; et sa famille pour m'avoir appuyée dans ma recherche de projet de mémoire.

❖ L'école Primaire publique et l'école privée La Nichée de Tsararano : tous les élèves et parents d'élèves qui ont volontairement participé à cette étude ; tout le personnel enseignant, administratif et technique qui nous ont beaucoup aidé.

❖ **Messieurs** :

- Le Chef de la Zone Administratif Pédagogique du district de Marovoay.
- Le Medecin inspecteur du service de district de sante publique de Marovoay ; et à tous les personnels du Centre De Santé De Base de Tsararano, Marovoay dont le Medecin Chef.
- Le chef de district de Marovoay, le maire de la commune de Tsararano, le president du fokontany de Tsararano.

Pour votre hospitalité, votre étroite collaboration et le précieux temps que vous avez consacré dans la réalisation des travaux de terrain,

❖ **Au groupe G4** De l'Institut Pasteur De Madagascar, en citant particulièrement Monsieur, Ousmane NDiath, HDR et Tsiry.

Nous ne saurions combien vous exprimer notre entière gratitude pour votre précieux soutien technique et financier dans toutes les étapes de réalisation de cette thèse.

❖ **A toute l'équipe de l'Unité de Recherche sur le paludisme de l'IPM** passée et présente que j'ai eu le privilège de connaitre notamment Jeannot Rajoelison, Seheno Razanatsiorimalala, Rogelin Raherinjafy, Sylvia Rakotomalala, Livah Rabearison, Tianasoa Andriamiandranoro, Martial Jahevitra, Bakoly Elie NoroRaholimalala, le Docteur JemimaRavelonarivo A, les Docteurs Voahangy Andrianaranjaka et Ravaoarisoa Elisabeth, le Professeur Milijaona Randrianarivelojosia.

Pour toutes les valeurs humaines et professionnelles que chacun de vous m'avez instruites consciemment et inconsciemment ; le temps que vous m'avez accordé, votre accueil, votre soutien technique et moral et la formation de qualité dont j'ai pleinement bénéficié.

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 1

Première partie : RAPPELS 3

I. EPIDEMIOLOGIE 3

I.1. Le paludisme dans le monde 3

I.2. Transmission de *Plasmodium* 4

I.2.1. Facies épidémiologiques du paludisme à Madagascar 6

I.2.2. Surveillance du paludisme à Madagascar 8

II. DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE DU PALUDISME 13

II.1 Tests de diagnostiques rapide (TDR) du paludisme 13

II.2 Microscopie (Annexe 1) 14

II.3 Polymérase Chain Reaction (PCR) 14

Deuxième partie : METHODES ET RESULTATS 18

I. METHODES. 18

I.1. Cadre et objectif de l'étude 18

I.2. Site d'étude. 18

I.3. Type d'étude et période d'étude 20

I.4. Population d'étude 20

I.5. Dépistage de l'infection plasmodiale chez les écoliers 21

I.5.1. Enquête auprès des écoliers sur site 21

I.5.2. Diagnostic du paludisme au laboratoire à l'IPM 22

I.5.3. Enquête CAP 32

I.6. Saisie et analyse des données 33

I.7. Variables étudiées 33

I.8. Considérations éthiques 34

I.9. Limites de l'étude 34

II. RESULTATS 36

II.1 . Caractéristiques des écoliers à Tsararano. 36

II.2 Prévalence de l'infection plasmodiale chez les écoliers de Tsararano. 37

II.3 Comparaison entre les résultats des deux enquêtes 38

II.4 Caractéristiques des écoliers concernés par l'enquête CAP 39

II.5 Résultats des enquêtes CAP des deux enquêtes.....39

Troisième partie : DISCUSSION.....42

I. DISCUSSION.....42

II. PERSPECTIVES.....49

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

ANNEXES

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Déterminants du complexe pathogène du paludisme (d'après Julvez, 1993) ... 4
Figure 2: Evolution de la prévalence du paludisme selon les facies épidémiologiques chez les moins de 5 ans entre 2011 et 2016, à Madagascar. ... 8
Figure 3: Stratification Paludométrique de Madagascar, NMCP 2018-2022 ... 12
Figure 4: Courbe d'amplification pour la détection de P*lasmodium sp.* ... 16
Figure 5: Détection de P. *falciparum* et P. *ovale* par PCR nichée. ... 17
Figure 6: Carte représentant le site d'étude : la commune rurale de Tsararano, District de Marovoay, région Boeny. ... 19
Figure 7: Rizières à perte de vue dans la commune rurale de Tsararano servant de gites larvaires pour les anophèles vecteurs de *Plasmodium.* ... 20
Figure 8: Séchage des frottis colorés sous hotte. ... 22
Figure 9: Préparation des échantillons pour l'extraction d'ADN à partir du sang sur papier buvard. ... 27
Figure 10: Purification d'ADN à partir du sang sur papier buvard ... 28
Figure 11: Protocole expérimental de la PCR nichée spécifique à la détection de P. *ovale.* ... 31
Figure 12: Ecoliers dans la cour de l'école primaire publique de Tsararano. ... 32
Figure 13 : Image capturée par gamma caméra d'échantillon à forte parasitémie vue au microscope optique (goutte épaisse). ... 37
Figure 14: Augmentation de la précipitation dans le district de Marovoay après le passage du cyclone Enawo en Mars 2017. ... 44

LISTE DES TABLEAUX

		Pages
Tableau I :	Classification du paludisme en fonction de sa stabilité	**6**
Tableau II:	Objectifs du plan stratégique 2013-2017 de lutte contre le paludisme à Madagascar	**12-13**
Tableau III :	Réactifs et matériels utilisés pour la PCR	**27-28**
Tableau IV:	Caractéristiques des écoliers à Marovoay pendant les deux enquêtes transversales	**38**
Tableau V:	Prévalence de l'infection plasmodiale par PCR et RDT pendant les deux enquêtes	**39**
Tableau VI :	Infection plasmodiale détectée par la PCR chez les écoliers à Marovoay	**40**
Tableau VII :	Caractéristiques des élèves concernés par les enquêtes sur la Connaissance, Attitude et Pratique (CAP) sur le paludisme	**41**
Tableau VIII :	Connaissance sur le mode de transmission, la prévention, le diagnostic et traitement du paludisme parmi les adolescents à Marovoay	**42**
Tableau IX :	Procédure de coloration des étalements de sang sur lame pour le diagnostic microscopique du paludisme	**75**

LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

ACT : Artemisinin-based Combination Therapy

ADN :AcideDesoxyribo-Nucleique

ADNp : AcideDesoxyribo-Nucléique parasitaire

CSBII : Centre de Santé de Base niveau II

DDT: Dichloro-Diphenyl-Trichlorethane

DLP: Direction de la Lutte contre le Paludisme

ELISA: Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay

EIPMD: Enquête sur les Indicateurs Paludométriques de Madagascar

IC : Intervalle de Confiance

IEC/CC : Information Education Communication pour le Changement de Comportement

IPM : Institut Pasteur de Madagascar

MID : Moustiquaire àImpregnation Durable

OMS : Organisation Mondiale de la Sante

PCR : Polymerase Chain Reaction

PECADOM : Prise En Charge A DOMicile

PfPR : *Plasmodium falciparum* Prevalence Rate

PNLP : Politique Nationale de Lutte contre le Paludisme

TDR : Test de Diagnostic Rapide

TPI : Traitement Preventif Intermittent

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2017, le paludisme demeure l'une des plus importantes maladies parasitaires tropicales avec 216 millions de cas rapportés dans 91 pays et 445 000 décès associés en 2016 [1] . Cette maladie constitue un risque majeur pour près de la moitié de la population mondiale (3,2 milliards de personnes) et 50% de cette population à risque sont des enfants d'âge scolaire [2]. L'Asie, l'Amérique latine, et l'Afrique subsaharienne dont l'île de Madagascar figurent parmi les zones les plus touchées [3,4]. Par sa gravité, sa fréquence le paludisme demeure notamment un obstacle pour le développement [5,6].

Actuellement, il y a cinq espèces de *Plasmodium* infectant l'homme dont *P. falciparum* ; *P. vivax* ; *P. malariae* et *P. ovale* (avec ses deux variantes *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*) [7,8] et *P. knowlesi* [9]. Malgré une certaine inertie - voire un recul, constatée entre les progrès de 2016 et ceux des années antérieures, des progrès en matière de lutte antipaludique ont été acquis depuis le début de ce millénaire jusqu'en 2016 selon l'OMS. Ces progrès ont notamment permis de réduire de moitié le taux de mortalité associée au paludisme dans le monde. Cependant, tant au niveau mondial que national à Madagascar, outre les défis en matière de lutte anti-larvaire récemment documentés [10], de nombreux facteurs constituent une menace pour la continuité et la pérennité de la lutte contre le paludisme [11].

Un des trois piliers de la stratégie mondiale de lutte consiste à faire de la surveillance du paludisme une intervention de base [3,12]. On ne doit pas perdre de vue les infections plasmodiales asymptomatiques et les infections plasmodiales à faible parasitémie qui souvent échappent au diagnostic dans les centres de santé primaire; et qui constituent des réservoirs potentiels de plasmodies [13].

Si dans le passé, on est focalisé sur le paludisme chez les enfants de moins de 5 ans, après l'introduction des traitement combinés à base des dérivés d'Artémisinine et la promotion de l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides, on note un changement du profil épidémiologique; et le poids du paludisme pèse davantage chez les enfants de plus de 5 ans [14].

La morbi-mortalité liée au paludisme continue à toucher les enfants de moins de cinq ans dans les zones de forte transmission; et s'étend vers la tranche d'âge plus élevée - notamment chez les enfants d'âge scolaire, et se généralise à toute la population quand le niveau de transmission baisse [15]. A Madagascar, jusqu'en 2017, les enfants en âges scolaires n'ont forcément pas été ciblés par les politiques de lutte basée sur la prévention [16]. Prendre en considération des activités pour toucher les enfants âgés de 5 ans et plus comme la distribution de moustiquaire imprégnés dans les écoles figure parmi les nouvelles orientations du plan stratégique de lutte contre le paludique en vigueur [17].Le paludisme étant une maladie parasitaire, le diagnostic parasitologique joue un rôle clé dans les stratégies de lutte, que ce soit pour les malades vus dans les centres de santé que lors des enquêtes et interventions en dehors des centres de santé [18]. Les Tests de Diagnostic Rapide du paludisme (TDR) répondent aux conditions de terrain notamment en milieu rural [19]. La microscopie reste la méthode de diagnostic de référence [20] mais nécessite des microscopes, des consommables et des microscopistes expérimentés. Bien qu'en pratique la Polymérase Chain Reaction (PCR) n'est pas utilisée en routine pour le diagnostic du paludisme notamment dans les pays comme Madagascar, elle figure parmi les techniques les plus sensibles pour détecter les infections plasmodiales [21,22]. A Madagascar, depuis la révision de la politique nationale de lutte contre le paludisme en Décembre 2005, l'ambition du Gouvernement est d'éliminer le paludisme en tant que problème de santé publique [23]. Les zones rizicoles dans la partie ouest de l'île sont des zones où les gîtes larvaires sont permanents et la transmission du paludisme est pérenne même si elle est marquée par une variation saisonnière [24]. Compte tenu de tout ce qui est indiqué plus haut, dans le cadre de la surveillance du paludisme, nous nous sommes proposée à étudier l'infection plasmodiale chez les écoliers dans la commune de Tsararano dans la zone rizicole de Marovoay. Nous nous sommes fixés l'objectif principal d'évaluer par PCR la prévalence de l'infection plasmodiale chez ces enfants et parallèlement d'évaluer la connaissance, attitude et pratique de ces écoliers sur le sujet « paludisme ».

Après les généralités sur le paludisme utile pour ce travail, nous détaillerons la méthodologie adoptée pour l'enquête sur le terrain ainsi que les manipulations en laboratoire. Enfin suivront la présentation des résultats obtenus et la discussion de ces derniers.

Première partie : RAPPELS

EPIDEMIOLOGIE

Le paludisme dans le monde

A l'échelle mondiale, l'incidence annuelle du paludisme a reculé de 17% entre 2000 et 2010 et de 21% entre 2010 et 2015 avec un total de 212 millions de cas en 2015 vs 247 millions en 2006. Et entre 2015 et 2016, le nombre de pays et territoires sujets à une transmission continue de paludisme est passé de 95 à 91 [1]. Un succès remarquable mais insuffisant quant à la non- atteinte de l'objectif globale de réduction de 50% en 2015 pour les Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD). Par ailleurs les faces cachées de cette réussite, telle que la disparité entre les pays sont rarement dévoilées puisqu'elle est moins marquée dans plus de la moitié des 106 pays où la transmission persiste [25].

Sévissant disproportionnellement en Afrique subsaharienne, où sont chiffrés 90% des cas et 92% des décès, la « grande tueuse » affecte surtout les enfants de moins de 5 ans avec 70% des décès chez cette tranche d'âge. S'en suivent ensuite les femmes enceintes et les migrants ou voyageurs (cas des pays industrialisés où on parle de paludisme d'importation). Chez ces populations, dites à risque, on note surtout l'absence de prémunition contre le paludisme.

Dans le cadre des investigations d'envergure nationale sur le paludisme, les rapports sur les Enquêtes sur les Indicateurs du Paludisme à Madagascar (EIPMD) liant en partenariat l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM), la Direction Nationale de la lutte contre le Paludisme (DLP) et l'Institut National de la Statistique, (INSTAT) consistant en des enquêtes ménages impliquant des dépistages actifs sont les données les plus complètes et de références sur la prévalence du paludisme à Madagascar. Mais même ces données ne nous informent que de la prévalence à la microscopie chez les moins de 5 ans qui étaient respectivement aux alentours de 7% , 9%, et 6% en 2016 [24], 2013 [26] et 2011[27] alors qu'en 2010 une étude rétrospective sur les données nationales de la DLP a montré qu'on retrouvait plus de cas de paludisme, relatif à la consultation externe au niveau des CSB, chez les enfants de plus de 5ans [28].

Transmission de *Plasmodium*

L'Homme sert d'hôte vertébré intermédiaire mais à lui seul il ne peut entretenir la maladie, c'est le vecteur, chez qui se fait la reproduction sexuée du parasite, qui est l'hôte définitif et le pivot de l'épidémiologie du paludisme. L'ensemble Homme /Vecteur /Parasite, sous l'influence de l'environnement constitue le complexe pathogène du paludisme. Différents facteurs affectant la transmission du parasite représentent dans leur ensemble les déterminants de la dynamique de la situation épidémiologique du paludisme. Ils sont illustrés par la figure 1. De ces facteurs découlent les conditions indispensables à la présence du paludisme autochtone, les différents indicateurs épidémiologiques de l'infection palustre et les mesures de la transmission qui permettent d'évaluer et classifier l'endémie palustre.

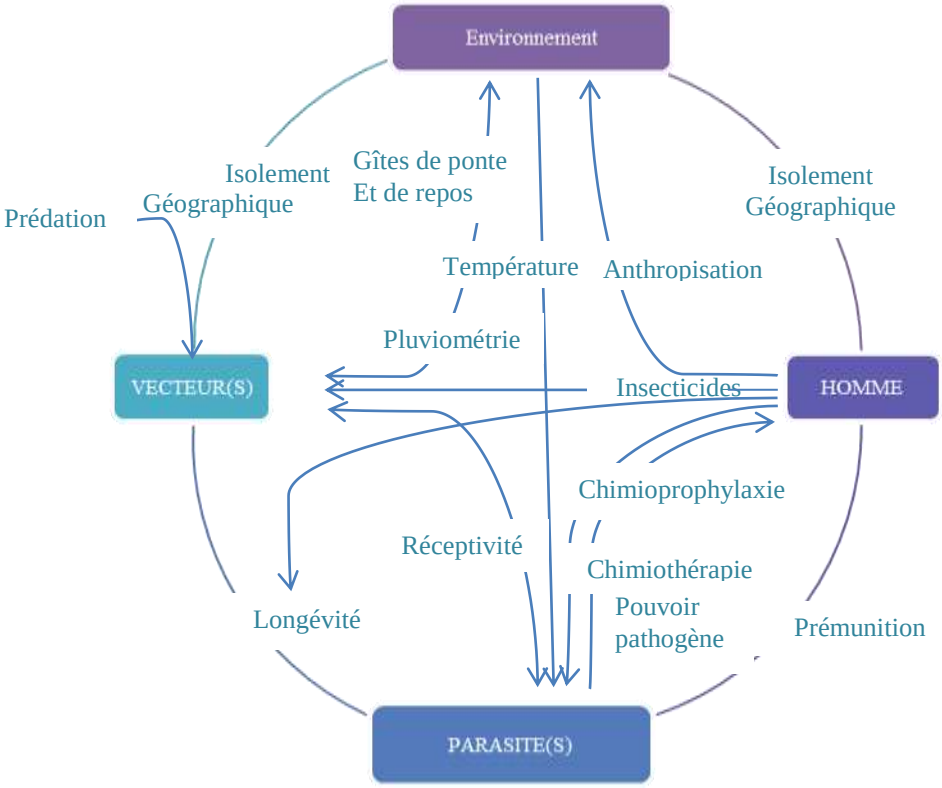


Figure 1: Déterminants du complexe pathogène du paludisme (d'après Julvez, 1993)

Source : Mouchet J, Carnevalle P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, et al. Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbey. CIC Edizioni Internazionali, editor. Montrouge, France; 2004.

La répartition géographique de la transmission du paludisme évolue suivant une dynamique spatiotemporelle caractéristique principalement liée aux conditions climatiques telles que le régime des précipitations, la température et l'humidité (température > 18°C pour *P. falciparum* et > 16° pour *P. vivax*) et d'altitude mais surtout à l'anthropisation du milieu. D'où les notions de stabilité du paludisme et de faciès épidémiologique du paludisme, reflets de cette diversité et dynamique du paludisme qui diffère en fonction des variations du biotope. A l'opposition des zones de paludisme stable où l'on observe une incidence stable (endémie) marquée par quelques pics saisonniers, le parasite circule sur un mode endémo-épidémique dans les zones dites instables. Ce que nous détaillons à l'aide du Tableau I. D'après Wilson, la notion de faciès associe une classification de l'endémicité selon la continuité de transmission. Selon Macdonald, la classification se base sur les différents paramètres caractéristiques du vecteur et du parasite. Au sein d'une même région biogéographique, un faciès regroupe l'ensemble des sites où les conditions des échanges parasites-vecteurs (transmission du paludisme) sont identiques. Par cette biodiversité du paludisme dans le monde, on distingue cinq grandes régions biogéographiques du paludisme : afro tropicale, orientale, paléarctique, américaine, australasienne. Chaque région incluant différents pays ayant leurs caractéristiques spécifiques et communs, est subdivisée en sous-région. La région afro tropicale est divisée en six strates majeures : équatoriale, tropicale, sahélienne, subdésertique, australe et montagnarde ; auxquelles s'ajoutent les faciès locaux (reliefs, cours d'eau, lagune, sol les facies anthropiques (irrigations, déforestations, urbanisations) qui modulent le paludisme. La population humaine autochtone de la région afro tropicale dont Madagascar et quarante-huit autres Etats, par exemple, serait dotée d'une remarquable capacité à développer une forte prémunition. En effet, en dépit d'une forte mortalité palustre infantile, on retrouve en Afrique un des plus haut taux de croissance du monde [29].

Tableau I. Classification du paludisme en fonction de sa stabilité.

(D'après Bruce-Chwatt, 1980)

Caractéristiques	**Paludisme instable**	**Paludisme stable**
Endémicité	Faible ou modérée, possibilité forte endémicité locale.	Très forte, possibilité endémicité modérée.
Cause déterminante	Vecteur peu anthropophile et de faible longévité, courte saison de transmission.	Vecteur très anthropophile longévité modérée ou longue, courte saison de transmission.
Densité critique anophélienne	1-10 piqûres/homme/nuit ou plus.	Peut être très basse (moins de 1 piqûres/homme/nuit).
Variations saisonnières	Prononcées.	Très peu voire rarement prononcées sauf pour de courtes saisons sèches.
Incidence du parasite	Fluctuations très marquées d'une année à l'autre. (fréquemment *P.vivax*).	Peu marquées en dehors de fluctuations saisonnières. (fréquemment P. *falciparum*).
Immunité de population	Très faible pour toutes les classes d'âge.	Fortes, quelques variations selon les localités
Epidémies	Fréquentes, en fonction du climat.	Très improbable.

Facies épidémiologiques du paludisme à Madagascar

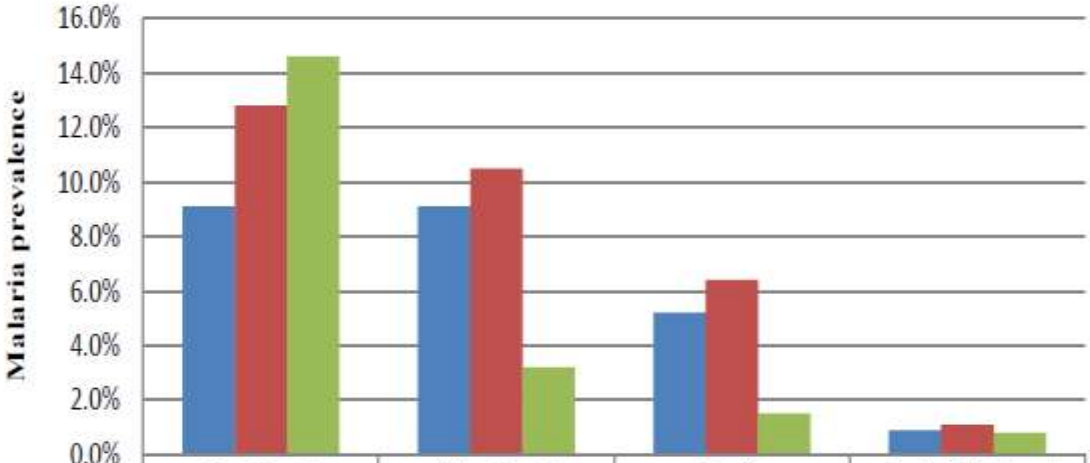
Le paludisme est endémique à Madagascar. L'aspect épidémiologique de la transmission du paludisme est caractérisé par une forte hétérogénéité. Il y a des régions

où la transmission est forte et pérenne (pour ne citer que la côte est de Madagascar) ; et des régions où la transmission est faible sinon très faible (comme les hautes terres centrales à plus de 1.000 m d'altitude). Mais entre ces deux extrêmes, il y a des zones où la transmission est saisonnière (notamment sur les marges des hautes terres centrales entre 600 et 900 m d'altitude). Globalement, quatre faciès épidémiologiques du paludisme sont décrits, en lien direct avec les facteurs climatiques et en tenant compte de la durée et l'intensité de la transmission :

- Paludisme stable à forte transmission toute l'année sur la côte Est (faciès équatorial), et le Sambirano au Nord jusqu'à une altitude de 700m environ
- Paludisme stable mais avec forte transmission en saison des pluies (novembre à mars) sur la côte Ouest d'une altitude de 900m jusqu'à la mer au Nord de Morobe et le Nord (faciès tropical),
- Paludisme instable à transmission liée aux précipitations dans le Sud (faciès sahélien),
- Paludisme instable et saisonnier (novembre à avril) sur les Hautes Terres Centrales jusqu'à 1500 mètres d'altitude (faciès montagnard).

Cette diversité de niveau de transmission n'est point constante ; et des recrudescences voire des épidémies du paludisme peuvent survenir dans des zones de faible transmission pour des raisons diverses et variées dont la rupture des médicaments antipaludiques [33].

Dans différents pays d'endémie palustre, des changements évidents dans l'épidémiologie du paludisme sont notés et prises en compte [17,30,31]. A Madagascar, les mesures de base de la classification de l'endémicité palustre sont représentées par l'incidence du paludisme (paludisme maladie) et par la prévalence de l'infection plasmodiale chez les enfants. Les referentiels sont principalement les enquêtes sur les indicateurs paludométriques et démographiques [23]. La figures 2 illustre la variation du niveau de transmission dans le temps et selon les faciès épidémiologiques prédéfinis jusqu'en 2016.



	East Coast	West Coast	South	Central Highland
MIS 2016	9.1%	9.1%	5.2%	0.9%
MIS 2013	12.8%	10.5%	6.4%	1.1%
MIS 2011	14.6%	3.2%	1.5%	0.8%

Figure 2: Evolution de la prévalence du paludisme selon les facies épidémiologiques chez les moins de 5 ans entre 2011 et 2016, à Madagascar.
Source: USAID. President 's malaria initiative 2018. USAID. 2018.

Surveillance du paludisme à Madagascar

L'histoire du paludisme à Madagascar, marquée par l'épidémie meurtrière des années 1870, 1890, 1980, montre les effets néfastes de l'anthropisation du milieu (construction des temples, riziculture), de la mobilité humaine (déplacement peu avant le début de la colonisation), du relâchement des mesures de surveillance et de lutte (arrêt de la nivaquinisation et de l'aspersion intradomiciliaire de DDT),et de la crise économique (accompagnée par l'érosion du système de santé) [32,33].

Compte tenu de l'endémisation secondaire du paludisme [35], les stratégies de lutte adoptées en 1949 en vue d'éradiquer cette maladie ont été basées sur les pulvérisations intra domiciliaire de DDT et la chimioprophylaxie hebdomadaire par la chloroquine chez les enfants. L'efficacité de cette lutte a conduit à une réduction de la prémunition après 20 ans; et l'arrêt de la chimioprophilaxie et de la campagne de pulvérisation de DDT vers la fin des années 1960 explique le retour du paludisme et l'épidémie meurtrière des années 1980 [34].

La circulation libre de la chloroquine (vente en épicerie entre autres) en 1988 et la reprise de l'aspersion intra-domiciliaire de DDT ont été les principaux moyens utilisés pour arrêter cette épidémie [29].

L'ambition du Gouvernement Malagasy à éliminer le paludisme est affiché depuis la révision de la politique nationale de lutte contre le paludisme en 2005 [35]. En janvier 2011, à travers une Revue du Programme Paludisme (RPP), le Gouvernement Malagasy s'est engagé avec ses partenaires à mener une évaluation de la performance du dernier Plan Stratégique et du programme de lutte contre le Paludisme dans son ensemble visant à une planification adaptée au contexte épidémiologique actuel. Elle a démontré la priorité que les partenaires et le gouvernement accordent à la lutte contre le paludisme, l'engagement politique manifeste des dirigeants et autorités du pays, la planification et le développement des plans et stratégies basés sur les évidences, la prestation gratuite des soins et une relative augmentation des ressources financières. Les conclusions de la revue ont permis de mettre en évidence les progrès et la performance des interventions à travers une augmentation de la couverture des interventions et de raffermir l'engagement des partenaires autour de l'Etat dans sa vision de « Zéro décès » à Madagascar en 2017. Les interventions définies dans le Plan Stratégique 2013-2017 s'inscrivent dans ce contexte de réduction de la morbidité et de la mortalité et seront mises en œuvre selon le nouveau profil épidémiologique qui divise le pays en trois zones opérationnelles d'intervention. Le pays s'est ainsi engagé jusqu'en fin 2017, à atteindre les objectifs décrits dans le Tableau II. La consolidation de la mise à l'échelle des stratégies dans le cadre de l'élimination du paludisme nécessite la mise en place d'un système de surveillance apportant des informations sur la tendance de la maladie, la résistance aux antipaludiques et aux insecticides ainsi que la gestion du programme en général. Aussi, la composante suivi et évaluation constitue un des points clés du programme de lutte contre le paludisme à Madagascar.

Tableau II : Objectifs du plan stratégique 2013-2017 de lutte contre le paludisme à Madagascar.

	DISTRICTS EN PHASE DE CONTROLE (mise à l'échelle et consolidation):	**DISTRICTS DE PRE-ELIMINATION :**
Critères de définition	Prévalence parasitaire chez les moins de 5 ans: $\geq 2\%$ Taux de positivité au RDT>5%, Au moins 10% de la population a été testé Incidence parasitaire annuelle (API) >10 cas/1000 population. On distingue deux niveaux de phases de control : 1) Control phase 1 ou mise à l'échelle : couverture des interventions antipaludiques à moins de80% Priorité aux interventions de mise à l'échelle 2) Phase de consolidation : couverture des interventions antipaludiques à 80% et plus Priorité au maintien de cette forte couverture et au renforcement de la surveillance	Prévalence parasitaire chez les moins de 5 ans: $< 2\%$ Taux de positivité au RDT$\leq$5%, Au moins 10% de la population a été testé Incidence parasitaire annuelle (API) $\leq$10 cas/1000 population.

Objectifs des stratégies de lutte	•Amener au moins 90% de la population à utiliser les MID comme moyen de prévention •Amener au moins 80% des femmes enceintes à observer le Traitement Préventif Intermittent (TPI) conformément à la politique nationale dans les zones ciblées.	•95% des structures sont aspergées dans les zones ciblées •Mettre en place toutes les mesures de surveillance adéquates au niveau des zones de pré-élimination.

•Prendre en charge correctement au moins 95% des cas de paludisme vus au niveau des formations sanitaires.

•Prendre en charge correctement au moins 80% de cas de fièvre ou notion de fièvre au niveau communautaire dans les 24 heures suivant l'apparition des symptômes chez les enfants de moins de 5 ans
•Détecter et gérer correctement 100% des épidémies

•Amener au moins 85% des populations cibles des interventions par zone à adopter des comportements favorables à la lutte contre le paludisme

•Assurer une disponibilité permanente des moyens diagnostique et thérapeutique antipaludique dans au moins 95% des formations sanitaires.

•Assurer le contrôle qualité d'au moins 90% des données rapportées par les formations sanitaires sur la lutte contre le paludisme.

Le Plan Stratégique National (PSN 2018-2022) en vigueur s'adapte aux changements dans l'épidémiologie du paludisme et vise l'élimination progressive du paludisme. Huit zones épidémiologiques sont définies. Voir figure 3 pour illustration.

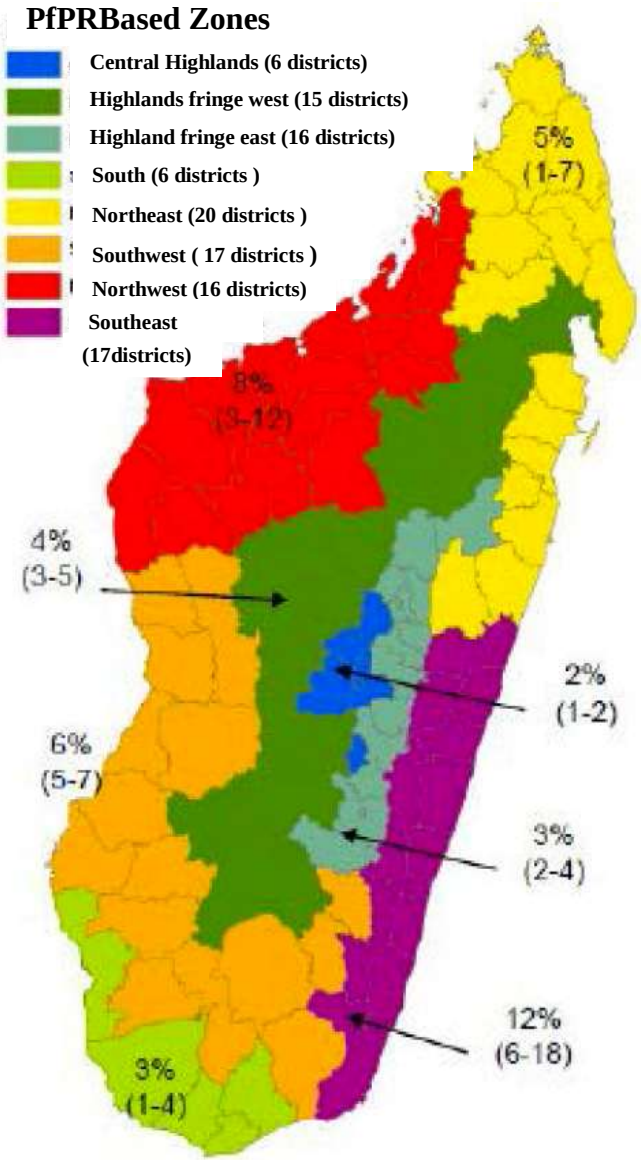


Figure 3: Stratification Paludométrique de Madagascar, NMCP 2018-2022

Source : President's malaria initiative 2018. USAID. 2018.

DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE DU PALUDISME

Le diagnostic du paludisme - une maladie parasitaire [36] causée par des protozoaires du genre *Plasmodium,* est une urgence [37]. En présence d'une symptomatologie évocatrice et d'arguments épidémiologiques avérés [38], le diagnostic parasitologique de l'infection plasmodiale est à réaliser. Ce diagnostic consiste à confirmer la présence (i) de parasites dans le sang par la microscopie, (ii) ou la détection des antigènes plasmodiaux par le test de diagnostic rapide (TDR) ou (iii) la présence d'ADN ou d'ARN de *Plasmodium* par Polymérase Chain Reaction (PCR) [39]. Le choix de l'outil de diagnostic varie selon le contexte [40]. La rigueur est exigée pour assurer la fiabilité des résultats. L'étroite collaboration entre praticiens et biologistes est de mise [41].

Tests de diagnostiques rapide (TDR) du paludisme

Il s'agit d'une méthode de diagnostic indirect et pratique basée sur la détection d'antigènes plasmodiaux par immunocapture ou immunochromatochraphie sur une petite quantité de sang (5 à 15µl) comme Histidine Rich Protein 2 (PfHRP2) spécifique de *P. falciparum,* la lactate deshydrogenase (PvLDH) spécifique de *P. vivax*ou l'aldolase produite par toutes les espèces de *Plasmodium* (pan- aldolase).Selon les recommandations des fabricants, la lecture du résultat se fait après un temps donné au-delà ou au- deçà duquel l'interprétation n'est pas fiable mais cette durée excède rarement 30mn [42,43].

Sur le plan opérationnel, dans le dépistage (passif) et la prise en charge des cas suspects de paludisme, la politique nationale de lutte contre le paludisme recommande, l'utilisation des tests de diagnostics rapides au niveau communautaire [4]. Cette technique non quantitative permet, selon les fabricants, un diagnostic de l'espèce plasmodiale (*P.falciparum* ou *non-P.falciparum).*

L’intérêt d’un diagnostic parasitologique rapide, accessible et fiable relève surtout de l’urgence diagnostique et thérapeutique de cette infection potentiellement grave (selon le terrain et l’espèce en cause) mais aussi des inconvénients du traitement présomptif [22].

Microscopie (Annexe 1)

Le diagnostic microscopique du paludisme demeure la technique de référence pour le diagnostic biologique du paludisme. Il s'agit d'une méthode de diagnostic direct basée sur la détection et la détermination des espèces de *Plasmodium* présentes. La recherche d'hématozoaires peut se faire sur des gouttes épaisses ou des frottis minces colorés au Giemsa. La microscopie permet de mesurer les charges parasitaires ou parasitémie (voir annexe 1). De la confection de frottis sanguin (frottis mince ou goutte épaisse) à l’examen au microscope chaque étape faite de procédures normalisées de cet examen technique exige un grand soin et des compétences visuelles et analytiques précises.
Sur le plan pratique, l'examen des gouttes épaisses est plus sensible pour le diagnostic du paludisme. La goutte épaisse sèche, bien conservée sur site est prête pour la coloration [44]. L'expérience de notre unité d'accueil montre qu'il est crucial de rapatrier au laboratoire les gouttes épaisses 15 jours après leurs confections. Autrement, on risque de perdre en qualité de coloration.

Polymérase Chain Reaction (PCR)

Parmi les moyens de diagnostic biologique indirect de l’infection plasmodiale, la Polymérase Chain Reaction ou PCR est une technique sensible qui permet la détection de matériels génétiques (ADN ou ARN) des parasites du genre *Plasmodium* dans le sang. Le seuil de détection parasitaire est de 1 parasite par microlitre pour la PCR nichée jusqu’à 0,02 parasite par microlitre pour la PCR en temps réelle, et peut être réalisée en un temps relativement moindre. Il s’agit de réplication in vitro de séquences spécifiques d’ADN aboutissant à des dizaines de milliards d’exemplaires d’un fragment d’ADN particulier (ADN cible) à partir d’extrait d’ADN (ADN matriciel). Si la séquence cible, ici celui de *Plasmodium*, est présente (même à quantité infinitésimale) dans l’extrait d’ADN, il est possible de sélectivement la répliquer (amplification) en très grande quantité.

Principes essentiels sur la PCR pour le diagnostic du paludisme.

La PCR consiste en l'amplification en série d'une séquence d'ADN cible par l'ADN polymérase. Cette technique repose sur le mécanisme de réplication de l'ADN in vivo qui peut se dénaturer et dénaturer. La PCR repose sur deux principes :

1. Les « ADN polymérases ADN dépendantes thermostables » ont des propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation « ADN double brins spécifique »

2. L'hybridation et la deshybridation des brins complémentaires d'ADN est fonction de la température.

Elle comprend les cycles répétitifs suivants :

- La dénaturation (92 à 95°C), conversion de l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire (simple brin).
- L'hybridation (56 à 64°C), fixation des deux amorces oligonucléotidiques ou « primers » sens et anti-sens définissant la séquence d'ADN à amplifier.
- L'élongation (72°C), synthèse de l'ADN complémentaire en utilisant l'ADN polymérase en présence de Mg2+ comme co-facteur et les désoxynucleotides tri phosphates ou dNTP.

Deux variantes de la technique PCR ont été utilisées pendant l'étude : la PCR en temps réel et la PCR nichée ou nested-PCR.

La PCR en temps réel

Cette technique permet de visualiser en temps réel l'amplification des gènes à l'aide d'un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité de produits d'amplification obtenus d'où son autre appellation PCR quantitative. En utilisant Eva Green (agent intercalant sur les ADN double brin), la spécificité de la PCR se base sur les amorces. Lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution émet peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la

fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant.

Lorsque suivi en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. Ainsi, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction, voir figure 6 pour illustration.

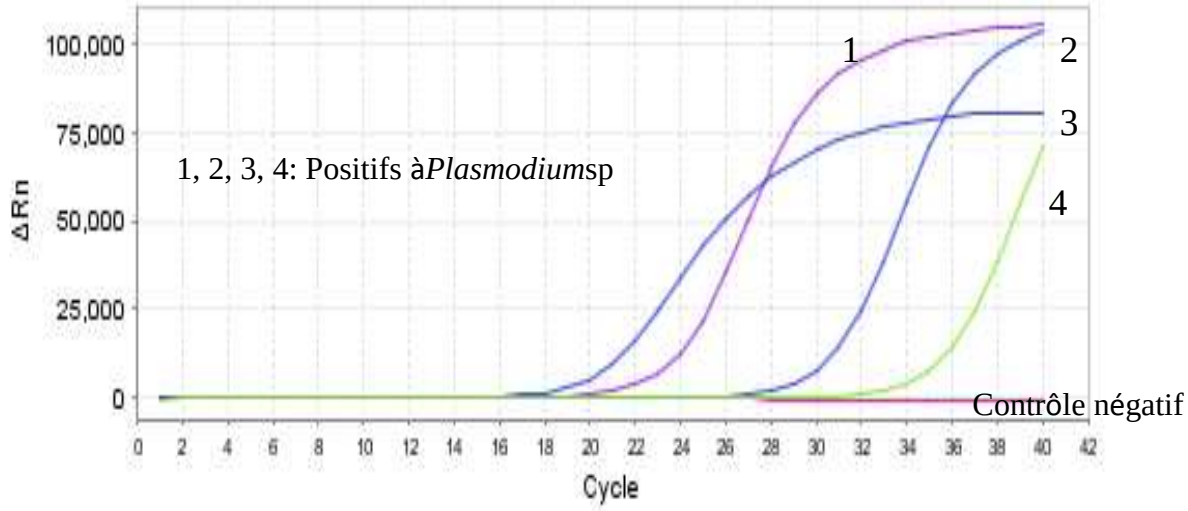


Figure 4: Courbe d'amplification pour la détection de P*lasmodium sp*.

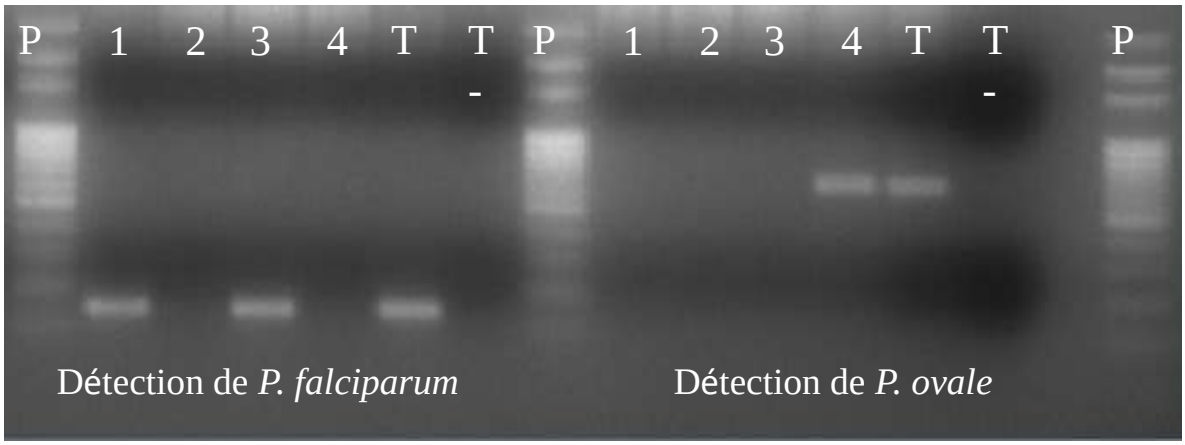
Source : Unité de Recherche sur le Paludisme, Institut Pasteur de Madagascar.

La PCR nichée ou nested-PCR

Elle consiste en l'utilisation de 2 paires d'amorces : une externe et une interne. La paire d'amorces externes permet d'amplifier un fragment plus long du gène à amplifier et la paire d'amorces internes permettant d'amplifier spécifiquement une des séquences révélées par le couple d'amorces externes. Cette méthode a une bonne sensibilité permettant de détecter des parasites de l'ordre de 1 à 10 parasites par microlitre de sang [45]. La présence et/ou absence d'ADNp sera visualisée après électrophorèse sur gel d'agarose. Ce dernier consiste à la séparation des ADNp en fonction de leur taille à l'intérieur des « pores » du gel d'agarose sous l'influence d'un champ électrique.

La concentration en agarose utilisée est inversement proportionnelle à la taille attendue d'ADN.

La visualisation des résultats s'opère en utilisant le bromure d'éthidium, agent intercalant des ADN doubles brins, qui en présence d'ultra-violet émettent une fluorescence [46], voir figure 5 pour illustration.



PM: Marqueur de poids moléculaire
1 et 3: Positifs à *P. falciparum*
2 et 4: Négatif
T+: Témoin positif
T-: Témoin négatif

PM: Marqueur de poids moléculaire
1, 2 et 3: Négatif
2 et 4: Positifs à *P. ovale*
T+: Témoin positif
T-: Témoin négatif

Figure 5: Détection de P. *falciparum* et P. *ovale* par PCR nichée.

Source : Unité de Recherche sur le paludisme, Institut Pasteur de Madagascar.

Deuxième partie : METHODES ET RESULTATS

I. METHODES.

I.1. Cadre et objectif de l'étude

Notre étude fait partie intégrante du projet « Diversité génétique des populations anophéliennes à Marovoay » inclut dans le grand projet « Mesure de la transmission des plasmodium humains (*falciparum, vivax et ovale*) de l'Homme aux moustiques ». Ce projet est réalisé et dirigé par le Groupe G4 Malaria et par l'unité de Recherche sur le Paludisme de l'Institut Pasteur de Madagascar. Les calendriers des activités ont été bien déterminés au préalable notamment concernant l'enquête parasitologique auprès des écoliers. Suite au passage du cyclone Enawo à Marovoay en Mars 2017, nous nous sommes proposée à étudier l'infection plasmodiale chez les écoliers dans la commune de Tsararano dans la zone rizicole de Marovoay. Les objectifs sont d'évaluer par PCR de la prévalence de l'infection plasmodiale chez ces enfants et d'évaluer leur connaissance, attitude et pratique sur le paludisme.

Site d'étude.

L'étude a été réalisée dans la commune rurale de Tsararano du district de santé de Marovoay (S 16°10'42.4'', E 046°40'13.6'') située à 80m d'altitude dans la partie Centre–est de la région côtière de Boeny dans la partie Nord-Ouest de Madagascar. Avec ses 4000 hectares de superficie mise en culture, au début, sa richesse hydrologique (naturelle et technologique) et une industrialisation de la récolte sur place, Marovoay, le deuxième grenier à riz de Madagascar fournit deux récoltes par an et pendant la période coloniale, on y exportait jusqu'à 60 tonnes de riz en destination de France, Maurice, La Réunion et la Côte orientale d'Afrique. En effet le riz est cultivé pendant deux périodes : le *varyjeby* pendant la saison sèche d' Avril à Octobre et le *varyasara* pendant la saison de pluies d'Octobre à Mars [47]. Depuis des années, la riziculture et le paludisme sont liés à Marovoay [48].

La commune de Tsararano est une zone fortement rizicole. Elle comporte 10 fokontany, dont Tsararano, Androtra, Bevary, Ambanjabe, Bepako, Betaramamay, Tsiasesy, Andranomangatsiaka, Bekalila, Madirokely.

C’est dans le fokontany de Tsararano, un village entouré de rizières - gites larvaires permanents pour les anophèles vecteurs de *Plasmodium* illustrés par les figures 6 et 7 [49]- que se trouvent d'une part les seules écoles primaires de la commune dont une école primaire publique et une école primaire privée où nous avons recruté les élèves qui ont participé à notre étude et d'autre part le seul Centre de Santé de Base niveau II de la Commune.

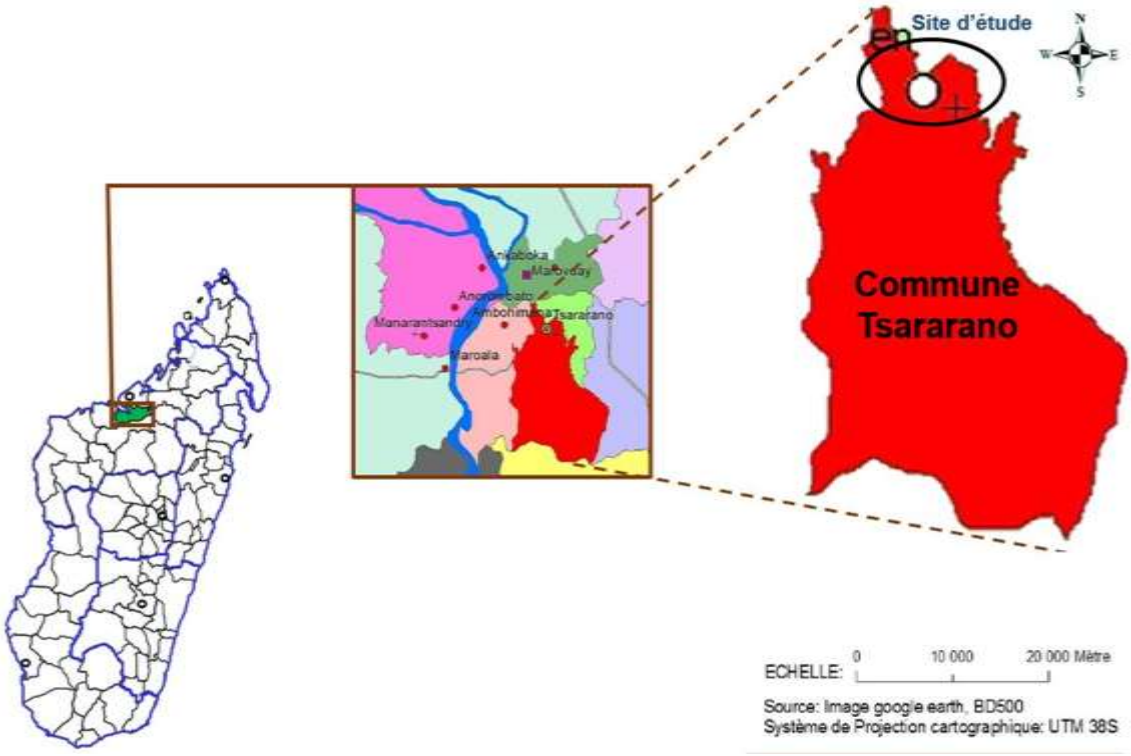


Figure 6: Carte représentant le site d’étude : la commune rurale de Tsararano, District de Marovoay, région Boeny.

Source : Image GoogleEarth.

Le Fokontany de Tsararano est composé de six quartiers : Tsararano, Antananjiva, Antanambao, Ambalapamba, Ambalakida, Ambalavary. Le paludisme y est encore endémique avec une transmission pérenne [24]. Le contact Homme-vecteur est permanent, les conditions géo climatiques locales sont favorables au développement des parasites malgré les variations saisonnières documentées [10].

Figure 7: Rizières à perte de vue dans la commune rurale de Tsararano servant de gites larvaires pour les anophèles vecteurs de *Plasmodium*.

Type d'étude et période d'étude

Deux enquêtes transversales en communauté ont été menées respectivement aux mois de Février et Mai 2017, consistant en des dépistages actifs de l'infection plasmodiale, d'une part et des enquêtes sur la connaissance l'attitude et la pratique (CAP) en matière de paludisme d'autre part.

Population d'étude

Les enquêtes de dépistage concernaient de façon exhaustive tous les écoliers consentants de l'école primaire publique et de l'école primaire privée (La Nichée) de la commune rurale de Tsararano. Les seules conditions d'exclusion pendant les enquêtes étaient le refus de l'enfant et/ou des parents ou des tuteurs. Par souci de discrimination et afin de traiter tous les enfants impaludés (TDR positifs) nous n'avons exclus que lors de l'analyse de données ceux âgés de plus de 15ans, la limite d'âge en pédiatrie.

L'enquête CAP ne concernait que les enfants âgés de 10 ans à 15 ans et plus. Concernant l'enquête CAP en Février, pour chaque classe, nous avons constitué un

échantillon incluant le cinquième des élèves de 5 à 10 ans choisis au hasard. En Mai, tous les élèves de 10 à 15 ans ont été enquêtés.

Dépistage de l'infection plasmodiale chez les écoliers
Enquête auprès des écoliers sur site

Les deux enquêtes ont été effectuées en Février 2017 (saison de pluies) et en Mai 2017 (saison sèche). La réalisation de cette enquête sur terrain consistait à la fois à un dépistage actif de l'infection plasmodiale et une enquête sur les Connaissances, Aptitudes et Pratiques (CAP). Après obtention du consentement éclairé, les informations individuelles (âge, sexe, …) ont été recueillies pour chaque écolier. Un prélèvement sanguin au bout du doigt, à l'aide de lancette à usage unique, a été réalisé pour effectuer le TDR, recueillir des gouttes de sang sur papier buvard pour les analyses moléculaires, et effectuer un frottis sanguin sur lame porte-objet (goutte épaisse et frottis mince) pour le diagnostic microscopique. Un identifiant unique pour chaque élève a été attribué et collé sur la fiche d'enquête, la cassette du TDR, la lame porte-objet, et le papier buvard.

Les prélèvements ont été acheminés aux laboratoires de l'Institut Pasteur de Madagascar pour réaliser les analyses microscopique et moléculaire.

Pour le dépistage du paludisme, nous avons utilisé suivant les recommandations du fabricant le TDR Care Start^{TM} (Access Bio, Somerset, USA) détectant à la fois l'antigène pan-LDH et l'antigène PfHRP2. Les résultats des TDR ont été portés à la connaissance des directeurs, instituteurs, parents et écoliers. Conformément à la politique nationale de lutte contre le paludisme en vigueur, les enfants impaludés (TDR positif) ont été traités par ACT (artésunate + amodiaquine) comprimés sécables de par voie orale en une prise par jour pendant trois jours. La première dose de médicament a été administrée par notre équipe médicale et les comprimés pour les deux derniers jours de traitement ont été confiés à l'enseignant avec des consignes précises.

A la fin de l'enquête une sensibilisation par IEC- CCC (Information, Education, Communication pour le changement de comportement) a été faite dans l'optique d'améliorer leur connaissance, attitudes et pratique en matière de lutte contre le paludisme.

Diagnostic du paludisme au laboratoire à l'IPM

Le diagnostic du paludisme par la microscopie ou par la PCR a été réalisé à l'Unité de Recherche sur la Paludisme à l'IPM.

- ***Microscopie*** **:** Des frottis sanguins ont été confectionnés à Marovoay pour chaque élève. L'acheminement des frottis sanguins vers l'Institut Pasteur de Madagascar a été effectué après séchage. Après coloration au Giemsa puis séchage sous hotte, Voir figure 8 pour illustration, 30 % des lames des TDR négatifs et toutes les lames des TDR et PCR positifs ont été examinés au microscope à l'huile d'immersion à l'objectif ×100 par des microscopistes expérimentés.

  La parasitémie a été estimée après comptage de parasités détectés contre 500 leucocytes, en admettant que la densité de leucocytes est estimée à 8000 par microlitre de sang, voir annexe 1. Vingt pour cent des frottis tirés au sort ont été réexaminés par un autre microscopiste pour le contrôle de qualité interne. La recherche de *Plasmodium sp* est considérée définitivement négative si l'absence de parasite après comptage de 2000 leucocytes est confirmée.

Figure 8: Séchage des frottis colorés sous hotte.

Source : Unité de Recherche sur le Paludisme, Institut Pasteur de Madagascar

- ***PCR* :**

Les réactifs ainsi que les matériels de laboratoire utilisés pendant l'étude sont présentés dans le Tableau III.

❖ **Extraction d'ADN**.

Le protocole de l'extraction est résumé sur les figures 9 et 10. Pour chaque échantillon de sang déposé sur papier buvard, 2 puits ont été découpés à l'aide d'une pince perforatrice ou « puncher » puis transvasés dans de tube stérile 2 ml étiqueté. La pince perforatrice a été désinfectée par de l'éthanol absolue puis flambage au Bec Bunsen après chaque découpage d'échantillon différente. Pour chaque tube contenant les échantillons découpés, un mélange de 950µl de PBS 1X et 50µl de saponine 10% a été incubé à 4°C pendant une nuit permettant la lyse des hématies. Deux séries de lavage avec 1 ml de PBS 1X séparé par incubation à 4° C pendant 5 minutes suivent par la suite pour éliminer les restes de saponine. La purification se fait par plusieurs étapes : 180µl de tampon ATL a été ajoutés dans chaque tube contenant les échantillons et incubé à 85°C pendant 30 min ; puis 20µl de protéinase K a été additionnés dans chaque tube permettant l'élimination des protéines, le mélange a été homogénéisé au vortex puis incubé à 56° C pendant 1heure (la protéinase K permet de libérer l'ADN nucléaire en digérant les histones qui lui sont associées dans les chromosomes eucaryotes); 200µl de tampon de AL a été additionnés par la suite dans chaque tube, le mélange a été homogénéisé au vortex puis incubé à 70° C pendant 30 minutes. Afin de précipiter l'ADNp, 200µl d'éthanol absolu ont été ajoutés dans chaque tube et le mélange a été homogénéisé puis centrifugé pendant 1 minute à 8000 tour par minute (rpm). Le lysat est transvasé dans la colonne de silice puis centrifugé pendant 1 minute à 8000rpm. D'autres séries de lavage ont été effectuées, lavage 2 fois avec 500µl du tampon AW1 et AW2 respectivement 1 minute à 8000rpm et 3 minutes à 14 000rpm. Ces lavages permettent d'éliminer les traces d'éthanol. L'ADNp est élué en déposant 60µl d'eau distillée stérile au centre de la colonne puis incubé à température ambiante pendant 5 minutes. L'éluât est récupéré par centrifugation pendant 1 minute à 10 000rpm. Cette étape a été répétée 2 fois. Le tube contenant l'extrait d'ADNp est étiqueté avec un encodage unique puis conservé à 4°C jusqu'à l'utilisation.

❖ Détection et typage de *Plasmodium sp* par PCR en temps réel

La PCR consiste en l'amplification en série d'une séquence d'ADN en utilisant l'ADN polymérase. Pour la détection de la présence de P*lasmodium sp* nous avons adopté une technique développée à partir de la méthode décrite par Snounou et ses collaborateurs en 2002 basés sur la détection de des séquences spécifiques du gène de l'ARN ribosomal (ARNr) 18S de *Plasmodium.* La première étape consiste à amplifier une région de 1600 paires de bases commune à toutes les espèces plasmodiales en utilisant les amorces RPLU3 et RPLU4 [50]. Dans ce travail nous avons utilisé la PCR par fluorométrie temps réelle et choisi un agent intercalant contenus dans un Master MIX, Evagreen, une variante de la technologie SYBER^{TM} Green I. Le mélange réactionnel contient 1µl d'ADN, 5,5µl Eva Green et 0,625µl de chaque primer. En ajoutant 17,25µl d'eau distillé stérile, le volume final contenu dans chaque puits est de 25µl. Chaque barrette et chaque puits qu'ils contiennent sont préalablement numérotés à l'aide d'un marqueur indélébile à pointe fine et déposés sur un portoir réfrigéré adapté. Les conditions de PCR sont : dénaturation initiale à 95°C pendant 15min suivie de l'amplification en 40 cycles : 15s à 95°C, 30s à 53°C, et 30s à 68°C, avec une acquisition de la fluorescence à la fin de chaque étape. L'amplification est immédiatement suivie d'un programme de « melting » de 55°C à 95°C, avec un incrément de température de 0.5°C/s, 5 secondes par étape et une acquisition de la fluorescence à la fin de chaque étape de transition de la température. Toutes ces conditions sont programmées dans le thermocycleur Applied Biosystems Step one plus N° 27 200 5446.

Tableau III : Réactifs et matériels utilisés pour la PCR.

	REACTIFS	MATERIELS
Extraction d'ADN de *Plasmodium sp*	❖ Kit Qiagen pour extraction : • Buffer AL: tampon de lyse • Protéinase K : élimination des protéines • Ethanol absolue (96 à 100°) : précipitationde l'ADN ❖ Eau Distillée stérile (EDs) : tampon d'élution	❖ Kit Qiagen pour extraction (QiAamp DNA Blood Mini Kit 250) : • Tubes à colonne • Tubes collecteurs ou tubes jupés-Micropipettes et pointes à filtres correspondants : 20µl à 200µl, 1000µl ❖ Tubes stériles 1,5ml et 2 ml ❖ Portoir ❖ Vortex ❖ Bloc chauffant Centrifugeuse
PCR	❖ EDs ❖ Tampon 10x:(10µM) (Buffer 10x Solis biodyne, RBD 1990) ❖ MgCl2 25mM (Solis biodyne, M 27 50) ❖ dNTPmix 20mM (Solis biodyne, DNTP 23 20) ❖ Taq-polymérase (Solis biodyne, F10 70) ❖ Evagreen (Solis BioDyne, Cat. no. 08-25-00001) ❖ Couples d'amorces sens et anti-sens	❖ Portoir glacé ❖ Microtubes en barrette, plaque à 96 puits ❖ Micropipettes, pipettes multicanaux et pointes à filtres correspondants : 0,5µl-10µl, 2µl-20µl, 20µl-200µl, 1000µl ❖ Tubes stériles 1,5 et 2ml ❖ Centrifugeuse ❖ Thermocycleur

Post-PCR	❖ Poudre d'agarose	❖ Cuve à électrophorèse
	❖ TAE : Tris Acétate d'EDTA	❖ Balance
	❖ BET : Bromure d'éthidium	❖ Four microonde
	❖ Bleu de bromophénol : bleu de charge	❖ Gel scan
	Marqueur de taille 100 bp (DNA ladder, SolisBioDyne)	❖ Micropipettes, pipettes multicanaux et pointes à filtres correspondants : 0,5µl-10µl, 2µl-20µl

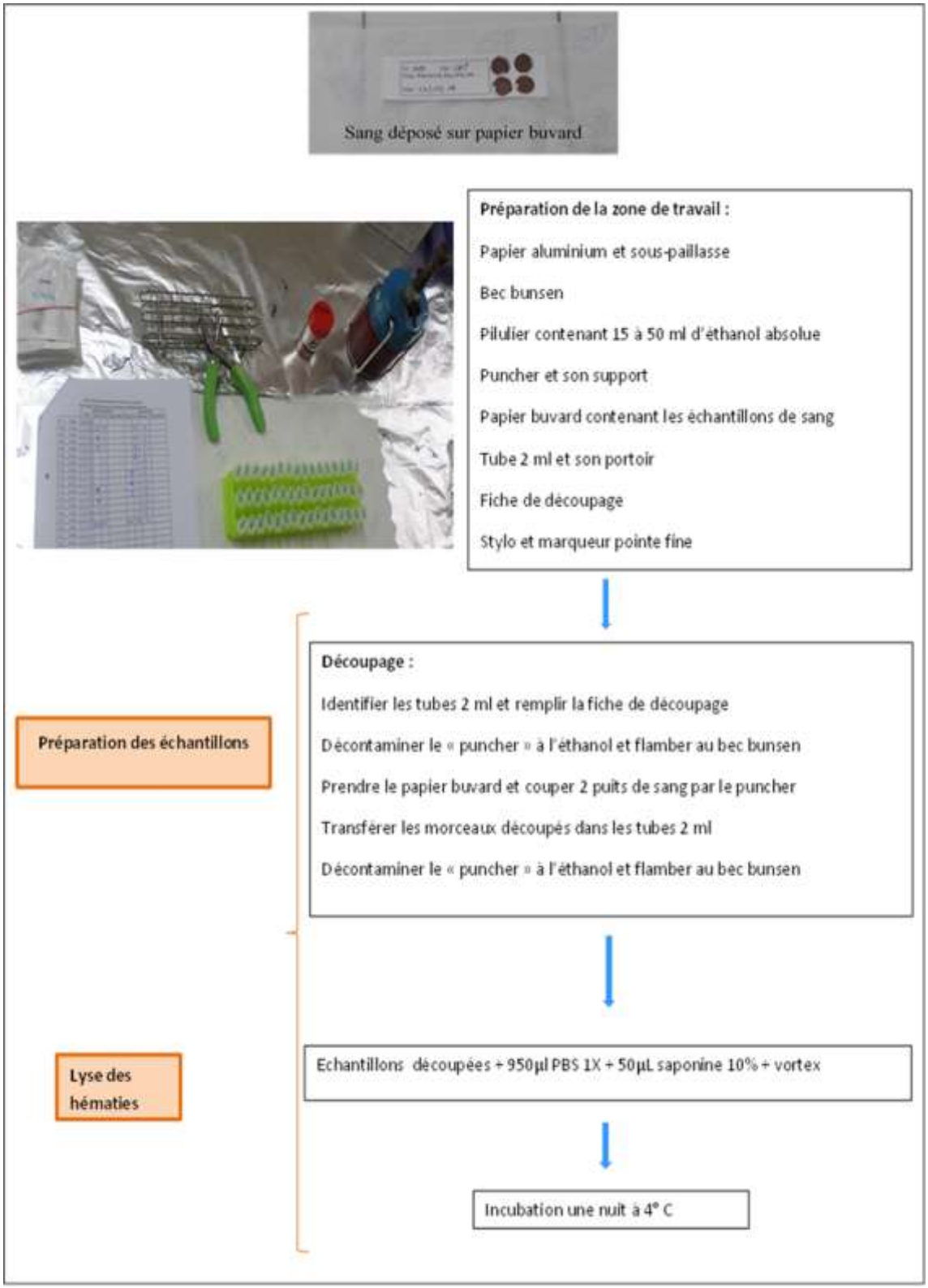


Figure 9: Préparation des échantillons pour l'extraction d'ADN à partir du sang sur papier buvard.

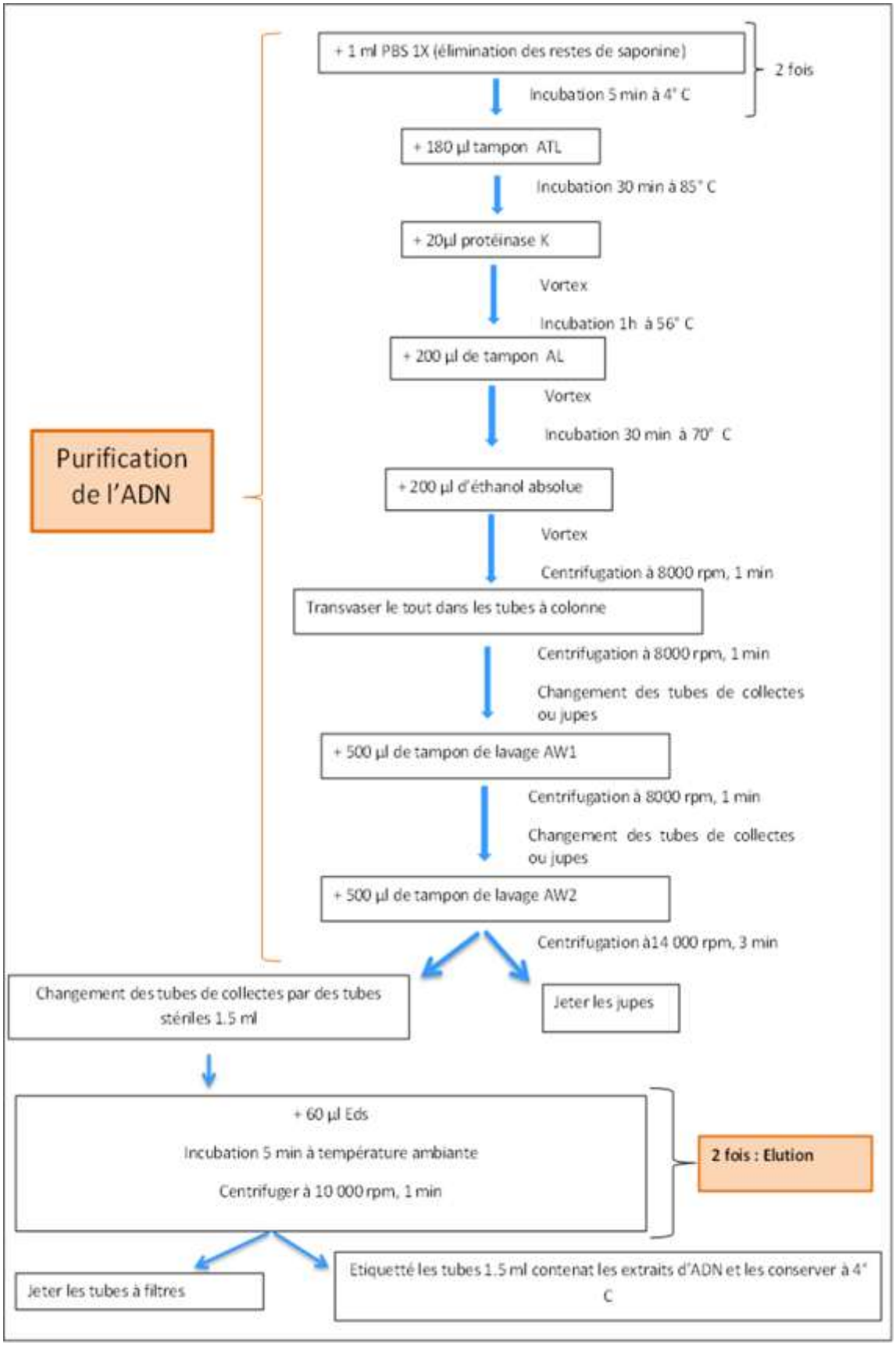


Figure 10: Purification d'ADN à partir du sang sur papier buvard

- **Détection de *P. falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae* par PCR en temps réel**.

La PCR pour l'identification d'espèce ne concerne que les échantillons vus positifs au premier PCR de détection (ratissage). Pour ces trois espèces, il s'agit d'une technique de PCR en temps-réel développée à partir de la technique de de Monbrison et ses collaborateurs en 2003 permettant la détection simultanée des quatre espèces plasmodiales par la même méthode de PCR temps –réel par fluorométrie.

Pour la méthode de de Monbrison et ses collaborateurs, les trois couples d'amorces utilisés pour la détection de ces trois espèces plamodiales sont présentes dans chaque échantillon et les conditions d'amplification du programme consistent en une dénaturation initiale à95ºC pendant 10 min ; 35 cycles d'amplification faite chacune d'une dénaturation à 95°C pendant 10sec puis hybridation à 58°C pendant 10sec et enfin élongation à 72°C pendant 30sec. Dans ces conditions, la détection simultanée de l'amplification des trois espèces ne sera positive que pour la ou les espèces présentes dans chaque échantillon. La différence avec notre technique est que l'on n'a plus fait une détection de *Plasmodium sp* par les primers Psp1 et PSP 2 car elle a déjà été faite ultérieurement et séparément en utilisant le couple de primer Rplu3/ Rplu4.

- **Détection de *Plasmodium ovale* sp par PCR niché.**

Pour les échantillons vus positifs à la détection de présence de *Plasmodium spp*, le reste d'extrait d'ADN du deuxième aliquot seront testés pour identifier l'espèce. Nous avons choisi d'effectuer une technique de PCR nichée conventionnelle développée à partir de la technique de Fuehrer et Noedl en 2014 afin d'identifier la présence de *P.ovale* qui affiche, dans la littérature et au laboratoire, quelques difficultés pour la détection par PCR en temps réelle, selon les primers utilisés. Pour cette technique de PCR standard, ou conventionnelle en deux principales étapes (deux PCR), la procédure à suivre pour ces deux PCR comprend à part les étapes retrouvées pour la PCR en temps réelle une étape additionnelle appelée Post-PCR. Cette étape à part, qui, « analyse » les produits de PCR sur un principe de fluorométrie par ultra-violet, et non par laser de fluorescence, après un principe de migration par électrophorèse sur gel d'agarose. En effet les résultats d'amplification après lancement du thermocycler, « classique », contenues des tubes sont appelé amplicons. Dans cette technique de PCR, nichée, les amplicons issus

du 1er PCR avec comme couple de primers Rplu1/Rplu-5 seront ajoutés, au lieu d'extrait d'ADN, à un second Mix, préalablement préparé dans des tubes fermés dont le couple de primer spécifique de l'espèce est Rova1wc, Rova2wc (avant d'être amplifiée au thermocycler).

Le programme choisi, contenant les conditions d'amplifications dans le thermocycler est le même pour les deux réactions de PCR. Ce n'est qu'après cette seconde réaction que les produits d'amplifications mélangé à du bleu de charge et à un agent intercalant, le bromure d'éthydium ou BEt, seront déposés dans l'ordre sur le gel de migration préalablement préparé. Un autre réactif appelé marqueur de taille est déposés aux deux extrémités de chaque ligne formée les puits du gel. Comme pour la PCR en temps réel il faut inclure et marquer, ici pour chaque ligne, les témoins positifs et négatifs. En routine, le témoin positif est déposé à une extrémité juste après le marqueur de taille.
La migration sur électrophorèse selon la taille de base attendue (en se référant au marqueur de taille) et suivant des conditions électriques spécifiques dure une à deux heures selon le protocole et les conditions techniques (baisse du voltage l'après-midi). Selon sa taille, le gel de migration sera ensuite découpé à l'aide du gel-cutter (ou non) et soumis, (une partie après l'autre) à l'excitation ultraviolette du gel-scan où il sera déposé, par transillumination. Les échantillons positifs émettront une florescence qui sera captée par le camera intégré. Cette image d'alternance, ou non (si les échantillons sont tous positifs) de bandes fluorescentes et non fluorescentes est alors imprimée. Le recueil des résultats consiste à marquer sur une fiche préétablie contenant l'identifiant des échantillons positifs selon l'ordre de déposition des échantillons. Voir figure 11 pour illustration.

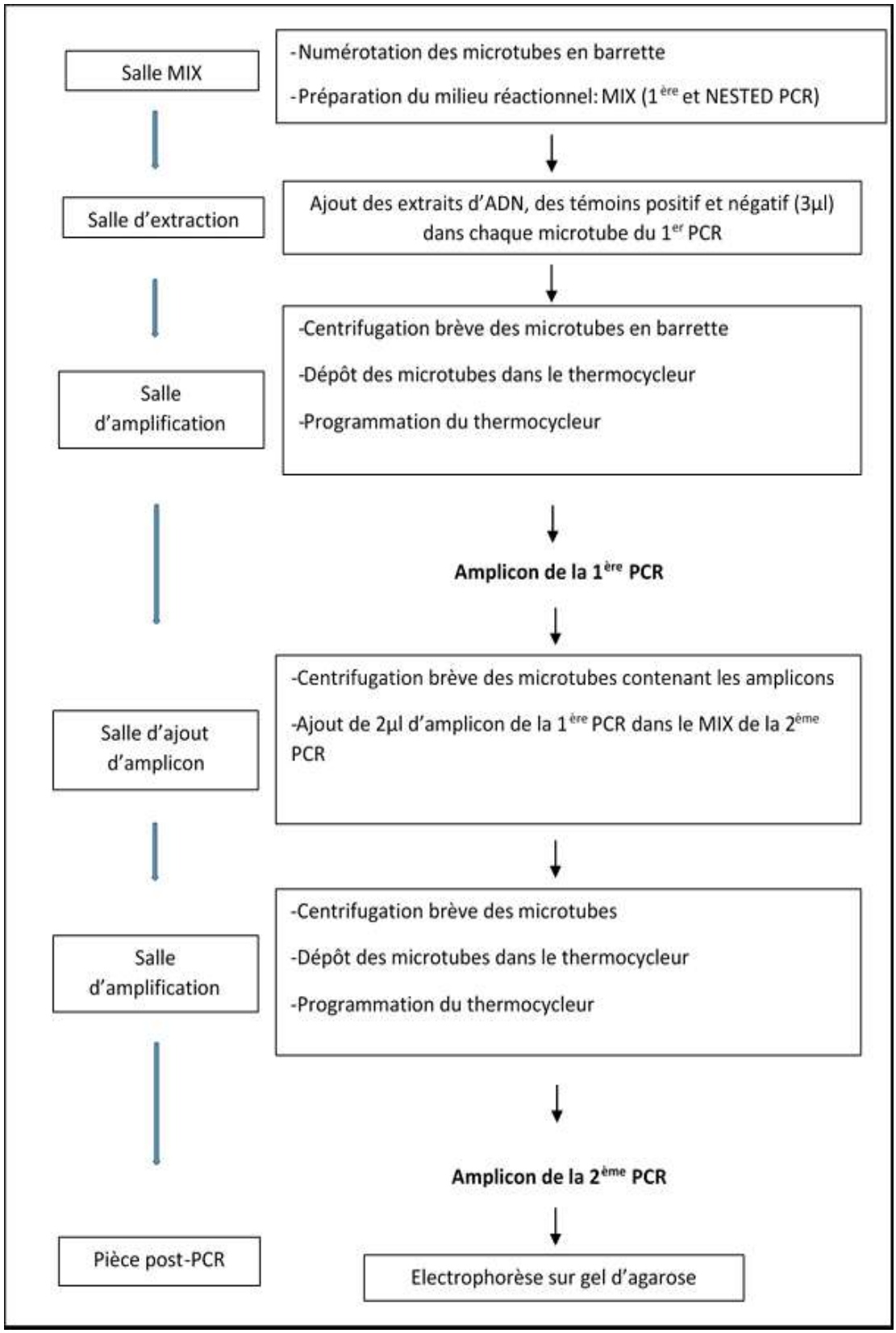


Figure 11: Protocole expérimental de la PCR nichée spécifique à la détection de P. *ovale*.

Enquête CAP

Les informations sur les connaissances, l'attitude et la pratique sur le paludisme chez les écoliers de 10 à 15ans que nous illustrons par la figure 12, ont été recueillies sur un questionnaire adapté à partir de celui de l'enquête EIPMD (Annexe 2). L'entretien a été dirigé en malgache mais nécessitait l'aide des agents communautaires autochtones pour l'adaptation au dialecte local au cours des interviews. Chaque entretien durait respectivement 8 à 12 minutes.

En résumé les renseignements recueillis par l'enquête CAP pour les élèves de 10ans à 15 ans étaient axés sur la connaissance de :

- la transmission du paludisme
- la prévention du paludisme
- le diagnostic et traitement du paludisme

A la fin de chaque enquête, chaque élève a été remercié individuellement. Mais surtout, nous avons fait une brève séance d'information sur le paludisme (orientée vers la prévention individuelle basée sur l'utilisation des moustiquaires) et par la même occasion nous avons corrigé les notions erronées qui ont été évoquées lors des enquêtes (sur la transmission, les signes, la médication).

Figure 12: Ecoliers dans la cour de l'école primaire publique de Tsararano.

Saisie et analyse des données

Les données ainsi générées ont été enregistrées en double saisie dans Microsoft Excel 2007 et analysées, par une analyse uni variée à l'aide du logiciel libre RStat (Développment Core Team). Les résultats des deux enquêtes ont été comparés en utilisant le Chi-square test de Pearson ou le test exact de Fisher et un $p<0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

Variables étudiées :

Les variables analysées dans cette étude étaient :

- Pour l'enquête de dépistage actif et l'enquête CAP :
    - L'âge
    - Le genre
- Pour l'enquête de dépistage actif :
    - Le lieu de résidence : Fokontany, quartier
    - La présence de fièvre ou non
    - Les résultats de TDR et PCR
    - Les résultats de microscopie dont la parasitémie
    - L'espèce plasmodiale
- Pour l'enquête CAP :
    - Connaissance sur la transmission du paludisme
        - Entendre le mot "paludisme"
        - Contracter le paludisme, piqûre moustique
        - Symptômes du paludisme, fièvre
        - Connaitre les sujets à risque
        - Savoir la période de transmission
    - Prévention du paludisme
        - Connaitre un moyen de prévention (MID, TPI, CAID)
        - Connaitre au moins 2 types de prévention
        - Utiliser MID bénéfique
    - Diagnostic et traitement du paludisme simple
        - Connaitre RDT
        - Connaitre ACT

Considérations éthiques

Nous avons eu au préalable l'autorisation du CERBM auprès du ministère de la santé publique de Madagascar selon la lettre no.122 MNSANP/CE ; et aussi l'accord des autorités de l'éducation nationale et sanitaire du district de Marovoay. Par ailleurs nous avons eu l'appui des directeurs d'écoles et des enseignants pour remplir les fiches d'enquête. Les parents d'élèves ont été invités à une réunion par les Directeurs de chaque école le premier jour de chaque session de dépistage. Cette réunion consistait à une communication sur le déroulement et l'intérêt de l'étude, suivie d'une séance de question réponse. Nous avons informé tous les parents présents qu'un dépistage actif du paludisme et une enquête CAP sur le paludisme seront effectués ; et que leurs enfants étaient invités à participer s'ils le souhaitaient. Après chaque dépistage, nous avons distribué des biscuits empaquetés à chaque participant en guise de compensation.

Limites de l'étude

Nous ne pouvons prétendre avoir une population d'étude représentative des enfants d'âge scolaire de la commune de Tsararano même s'il s'agit de l'exhaustivité des écoliers de la commune. Certes leur nombre est suffisamment grand et ils viennent des différents Fokontany de la commune. Cependant, nous ne disposons officielles et celles sur le taux de fréquentation des écoles pour affiner notre analyse. D'autant plus qu'il nous a fallu exclure lors de notre analyse les données recueillis pour les enfants âgés de plus de 15 ans.

Durant la réalisation de l'enquête, nous avons rencontré quelques difficultés.

Le manque d'enquêteur parlant le dialecte local a été le principal frein à la rapidité de la réalisation des enquêtes surtout celle portant sur la connaissance, l'attitude et la pratique en matière de paludisme.

L'équipe constituée de deux enquêteurs qualifiés pour le dépistage actif du paludisme pour la première enquête ajoutée d'un troisième enquêteur « stagiaire » s'est révélée être relativement insuffisante pour couvrir l'effectif des écoliers à enquêter pour chaque dépistage.

Au second dépistage, la plupart des refus et absences d'écoliers étaient liés à une réticence des villageois à tout acte médical causée par une rumeur sur laquelle une circoncision de masse par des « esprits » se fait dans la région de Boeny pour tous ceux qui n'ont pas encore été circoncis. Une partie de la population considère cette rumeur comme un moyen utilisé par les personnels médicaux qui font les actes de circoncision en milieu rural pour obtenir de l'argent.

Les résultats des deux enquêtes ont permis d'objectiver l'impact du passage du cyclone Enawo sur l'augmentation des taux d'infection plasmodiale chez les écoliers mais à priori nous étions sur site avec du retard au second dépistage dû au fait que les missions ont été préprogrammées.

II. RESULTATS

II.1. Caractéristiques des écoliers à Tsararano.

Pendant les deux enquêtes transversales dans les deux écoles primaires de la commune de Tsararano, au total, 524 écoliers ont été enquêtés en Février et 509 écoliers ont été enquêtés en Mai. Les caractéristiques sociodémographiques de ces écoliers sont montrées dans le Tableau IV. L'âge s'échelonne de 4 ans à 15 ans avec une moyenne de 10 ± 2,4 an.

Tableau IV : Caractéristiques des écoliers à Marovoay pendant les deux enquêtes transversales.

	Février - Mars 2017 (N=524)		**Mai - Juin 2017 (N=509)**	
Classe d'âge (an)	**N**	**%**	**N**	**%**
4 – 5	11	2,1%	11	2,2%
6 – 10	305	58,2%	289	56,8%
11 – 15	208	39,7%	209	41,1%
Fokontany				
Bepako	1	0,2%	1	0,2%
Betaramahamay	1	0,2%	1	0,2%
Madirokely	102	19,4%	93	18,3%
Tsararano	420	80,2%	414	81,3%
Genre				
Féminin	252	48,1%	250	49,1%
Masculin	272	51,9%	259	50,9%
Fièvre ou notion de fièvre				
Oui	66	12,6%	17	3,3%
Non	458	87,4%	492	96,7%
Dormir toutes les nuits sous MID				
Oui	390	74,4%	460	90,4%
Non	134	25,6%	49	9,6%

Prévalence de l'infection plasmodiale chez les écoliers de Tsararano.

Pendant la première enquête en saison pluvieuse, au mois de Février 2017, parmi les 524 écoliers analysés, la prévalence de l'infection plasmodiale détectée par la RDT et la PCR ont été respectivement de 1,9% et 2,5%. Parmi les 509 écoliers qui ont participé à la seconde enquête en Mai 2017, en saison sèche, la prévalence de l'infection plasmodiale détectée par la RDT et par PCR ont été respectivement de 2,2% et 4,7%, voir Tableau V.

Tableau V : Prévalence de l'infection plasmodiale par PCR et RDT pendant les deux enquêtes

	Février - Mars 2017 (N=524)		**Mai - Juin 2017 (N=509)**	
Diagnostic par RDT	**N**	**%**	**N**	**%**
Positif	10	1,9%	11	2,2%
Négatif	514	98,1%	498	97,8%
Diagnostic par PCR				
Positif	13	2,5%	24	4,7%
Négatif	511	97,5%	485	95,3%

La médiane de la parasitémie pour la première enquête a été de 87 parasites/µl de sang (extrêmes : 48 à 1131 parasites/µl de sang). La médiane de la parasitémie a été de 3435 parasites/µl de sang. Les extrêmes : 79 à 131 514 parasites/µl de sang, voir figure 13.

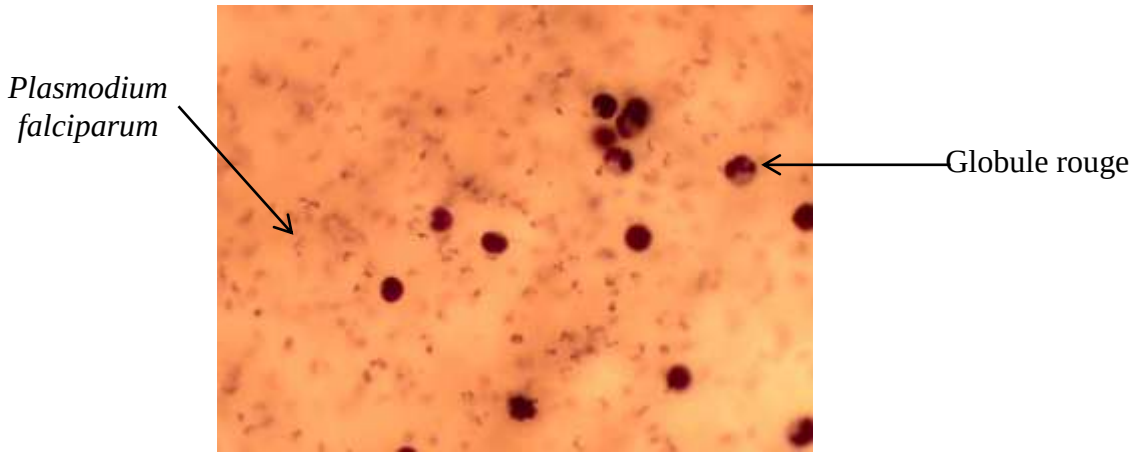


Figure 13 : Image capturée par gamma caméra d'échantillon à forte parasitémie vue au microscope optique (goutte épaisse).

Des infections par *P. falciparum* ont été observées pendant les deux enquêtes.
La PCR a été la méthode plus sensible pour la détection des infections plasmodiales.

Comparaison entre les résultats des deux enquêtes

Une augmentation de la prévalence de l'infection plasmodiale est observée au mois de Mai 2017 ; et la prévalence de l'infection plasmodiale a significativement augmenté au mois de Mai chez les filles. Voir Tableau VI pour illustration.

Tableau VI : Infection plasmodiale détectée par la PCR chez les écoliers à Marovoay.

	Février 2017 (E1)			**Mai 2017 (E2)**			
	N	**n PCR pos**	**% [IC95]**	**N**	**n PCR pos**	**% [IC95]**	***p-value* E1 vs. E2**
Age							
4 – 5	11	0		11	0		
6 – 10	305	8	2,6 [1,2 - 5,3]	289	16	5,5 [3,3 - 9,0]	
11 – 15	208	5	2,4 [0,8 - 5,8]	209	8	3,8 [1,8 - 7,7]	
Fokontany							
Bepako	1	0		1	0		
Betaramahamay	1	0		1	0		
Madirokely	102	4	3,9 [1,3 - 10,3]	93	6	6,4 [2,6 - 14,0]	
Tsararano	420	9	2,1 [1,0 - 4,1]	414	18	4,3 [2,7 - 6,9]	
Genre							
Féminin	252	1	0,4 [0,02 - 2,5]	250	9	3,6 [1,8 - 6,9]	0,01
Masculin	272	12	4,4 [2,4 - 7,8]*	259	15	5,8 [3,4 - 9,6]	
Notion de fièvre							
Oui	66	1	1,5 [0,007 - 9,3]	17	0	0 [0 - 22,9]	
Non	458	12	2,6 [1,4 - 4,6]	492	24	4,9 [3,2 - 7,3]	

* p-value= 0,007 (comparaison entre le genre de l'enquêt1)

Caractéristiques des écoliers concernés par l'enquête CAP

Concernant l'enquête CAP, les questionnaires des élèves de 10 à 15 ans ont été analysés. La moyenne d'âge pour la première enquête est de 12 ± 1,4 an et pour la seconde enquête de 11 ± 1,3 an, voir Tableau VII.

Tableau VII : Caractéristiques des élèves concernés par les enquêtes sur la Connaissance, Attitude et Pratique (CAP) sur le paludisme.

	Enquête 1 (n= 65)		**Enquête 2 (n=127)**	
	n	**% [IC95]**	n	**% [IC95]**
Age				
10 – 12	46	71 [58 - 81,1]	111	87 [80 - 92,4]
13 – 15	19	29 [18,9 - 42]	16	12 [7,6 - 20,0]
Genre				
Féminin	28	43 [31,0 - 55,9]	50	39 [30,9 - 48,4]
Masculin	37	57 [44,1 - 68,9]	77	61 [51,5 - 69,1]

Résultats des enquêtes CAP des deux enquêtes

Selon les résultats montrés par le tableau VIII, en général, une amélioration relative de l'état de connaissance des écoliers sur le paludisme a été observée en Mai 2017 sauf sur deux points qui sont l'utilisation bénéfique des MID en tant que moyen de prévention et le traitement à base de combinés d'Artémisinine ou ACT. Cette amélioration était nettement significative en ce qui concerne d'une part la connaissance des sujets à risque qui a été connue par 26% des élèves en Février puis par 61% en Mai. D'autre part, la connaissance du RDT pour le diagnostic qui a été notée chez 60 puis 83% des interviewés.

Tableau VIII : Connaissance sur le mode de transmission, la prévention, le diagnostic et traitement du paludisme parmi les écoliers à Tsararano Marovoay

	Enquête tous (N=192)		**Enquête 1 (N= 65)**		**Enquête 2 (N=127)**		***p-value***
	n	**% [IC95]**	n	**% [IC95]**	n	**% [IC95]**	**E1 vs E2**
Connaissance sur la transmission du paludisme							
Entendre le mot "paludisme"	168	88 [81,8 - 91,7]	56	86 [74,8 - 93,1]	112	88 [81,0 - 93,0]	
Contracter le paludisme, piqûre moustique	152	79 [72,3 - 84,5]	50	77 [64,5 - 86,1]	102	80 [72,1 - 86,6]	
Symptômes du paludisme, fièvre	135	70 [63,2 - 76,6]	45	69 [56,4 - 79,8]	90	71 [62 - 78,4]	
Connaitre les sujets à risque	94	49 [41,7 - 56,2]	17	26 [16,4 - 38,8]	77	61 [51,5 - 69,1]	**<0,001**
Savoir la période de transmission	102	53 [45,8 - 60,3]	34	52 [39,6 - 64,7]	68	53 [44,5 - 62,4]	
Prévention du paludisme							
Connaitre un moyen de prévention (MID, TPI, CAID)	148	77 [70,4 - 82,7]	46	71 [58 - 81,1]	102	80 [72,1 - 86,6]	
Connaitre au moins 2 types de prévention	16	8 [5,0 - 13,4]	9	14 [6,9 - 25,2]	7	5 [2,4 - 11,4]	
Utiliser MID bénéfique	106	55 [47,9 - 62,3]	42	**65 [51,7 - 75,8]**	64	**50 [41,4 - 59,3]**	0,08
Diagnostic et traitement du paludisme							
Connaitre RDT	144	75 [68,1 - 80,1]	39	60 [47,1 - 71,7]	105	83 [74,7 - 88,5]	**0,001**
Connaitre ACT	111	58 [50,5 - 64,8]	41	**63 [50,1 - 74,4]**	70	**55 [46 - 63,9]**	0,37

Troisième partie : DISCUSSION

I. DISCUSSION

Infection plasmodiale chez les écoliers à Tsararano : les résultats des enquêtes transversales que nous avons menées indiquent que - quelle que soit la méthode de diagnostic utilisée et même pendant la période de pic de transmission du paludisme (Février), le taux d'infection plasmodiale était faible chez les élèves. Ces données reflétaient une faible intensité de transmission de paludisme. Il est pourtant à souligner qu'en 1998 (vingt ans en arrière), un taux d'infection plasmodiale de 21,7% était détecté en microscopie chez les écoliers de Tsararano [51].

Pour que l'on puisse mieux comprendre la situation, prenons un exemple de Cameroun, Kimbi et al. [52] ont rapporté en 2013 que chez une population d'écoliers (n = 728) de la même tranche d'âge que celle de Tsararano et d'une zone d'altitude comparable, la prévalence d'infection plasmodiale détectée par la microscopie était de 60,6%, (IC95% : 54,6–65,9%) lors d'études transversale menée en période de pic de transmission. Ce contraste montre que le niveau de transmission retrouvé à Tsararano était faible.

Surveiller et intervenir : bien qu'à petite échelle, notre étude épouse la vision "surveiller et intervenir". Les résultats des TDR effectués sur site ont permis de traiter les enfants impaludés qui ont participé à l'enquête à Tsararano. Une telle approche est applicable même lors des enquêtes en population quelle que soit la population concernée.

Au-delà de notre étude, nous tenons à souligner que pour la progression vers l'élimination du paludisme, on aura normalement de plus en plus de régions avec des faibles taux de positivité de RDT. Ce qui est déjà la situation sur les hautes terres centrales de Madagascar. On peut citer les résultats de Rakotomanana et al. [53] qui rapportaient 1,3% de TDR positifs lors d'une étude incluant une enquête école en milieu urbain à Antananarivo en 2010. Afin de "surveiller et intervenir" efficacement, il faut des intrants et du personnel compétent.

Impact du passage du cyclone Enawo : Contrairement aux résultats attendus, une augmentation de la proportion d'enfants impaludés était notée en saison sèche, en Mai 2017 par rapport aux données du mois Février 2017, ce, après le passage du cyclone Enawo en Mars 2017. En effet, si l'on se réfère à une études antérieure effectuée chez les écoliers de Tsararano aux mêmes périodes, on peut dire que la tendance a été inversée. Il est évident que les pluies qui accompagnaient le cyclone étaient favorable à l'augmentation des gites larvaires [54] et à l'humidité globale dans la région. La pullulation des populations d'anophèles qui s'en suivait augmentait le niveau de transmission des plasmodies. Dans la littérature, il est décrit que les cyclones tropicaux et les inondations, désastres naturels de nature hydrométéorologique sont des facteurs connus dans la survenue d'épidémies de maladies infectieuses telles celles à transmission vectorielle comme le paludisme par les changements qu'ils entrainent dans l'environnement, l'écosystème des agents pathogènes et les conditions humaines [55]. Les données du registre d'activités du centre de santé de base de Tsararano ont montré que depuis le début de l'année 2017 jusqu'à notre passage en Mai 2017 pour la deuxième enquête dans les écoles, le taux de positivité maximale de TDR chez les consultants fébriles était de 17,8% lors de la dernière semaine d'Avril 2017 (soit trois semaines avant la deuxième enquête). De plus amples études longitudinales impliquant des variables météorologiques et une modélisation seraient sans doutes indispensables afin d'apporter plus pertinentes explications.

Voir figure14 pour illustration.

.

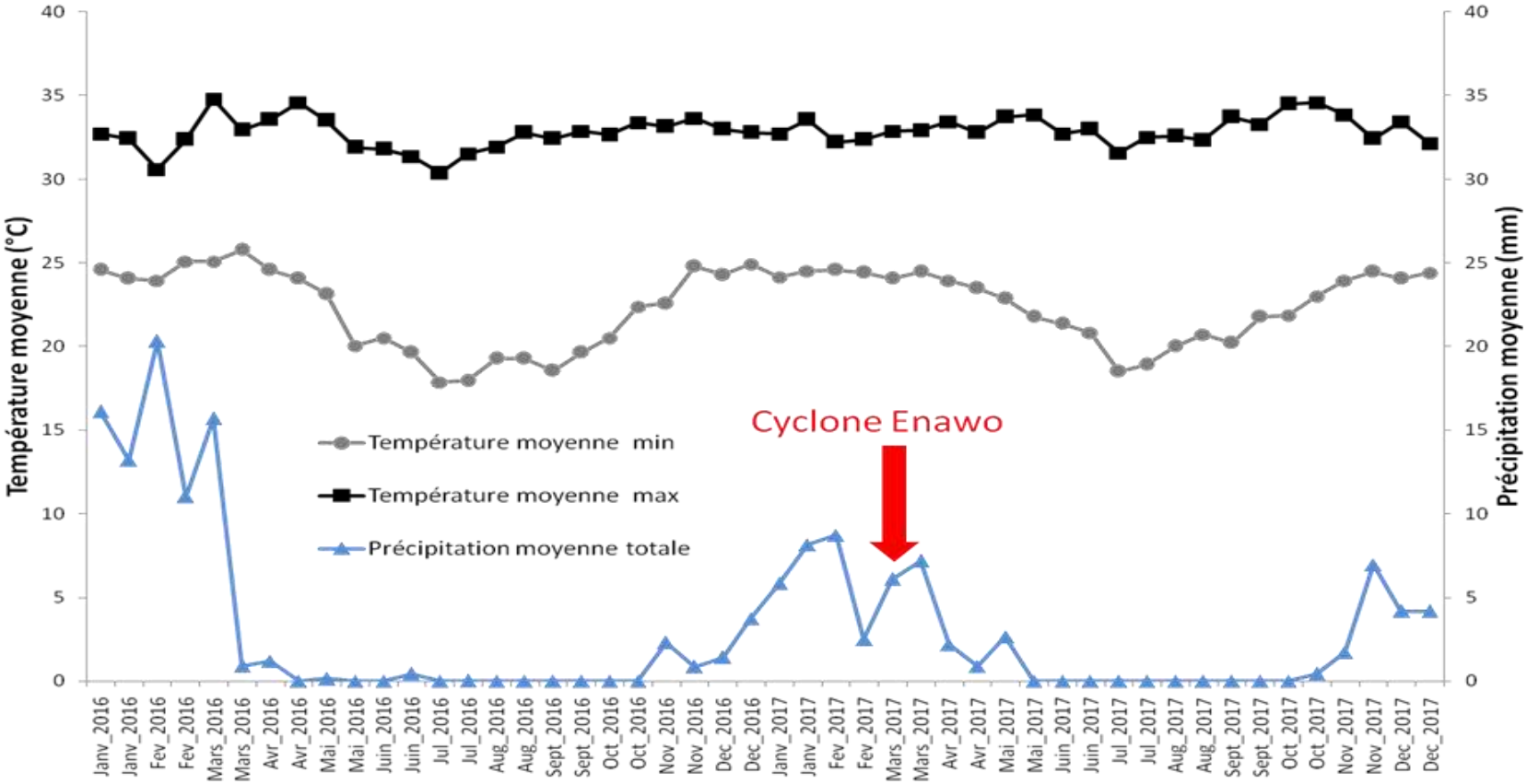


Figure 14: Augmentation de la précipitation dans le district de Marovoay après le passage du cyclone Enawo en Mars 2017.

Source : Direction d'Exploitation de la Météorologie (DEM) Ampasapito, Antananarivo Madagascar

Transmission dynamique du paludisme et défis de la lutte :

Rien que l'étendu des rizières accroissant la surface de gites larvaires favorables aux anophèles et s'étendant avec la maitrise de l'eau depuis l'époque coloniale même où on y a élaboré et exécuté un plan d'irrigation contribue à expliquer la permanence de la transmission dans la région. A tout ceci s'ajoute la richesse hydrologique naturelle de la région qui y entretien une humidité per annuelle quasi-constante dont l' influence de la pluviométrie locale n'a que peu de conséquence car en prenant leur source dans les grands lacs limpides d'Ankarafantsika, la constance de leur débit est assurée [47]. Bien que la pluviométrie soit faible à la fin de l'année 2016 et au début de l'année 2017, nos résultats confirment la permanence de la transmission du paludisme à Tsararano. Nos résultats montrent que les enfants impaludés ont été de différents fokontany de la commune rurale de Tsararano. Les plus touchés ont été les fokontany de Tsararano et de Madirokely. La présence d'enfants impaludés indique la présence de réservoirs éparpillés dans la commune. Ce qui reflète un problème qui est beaucoup plus large au niveau du district de Marovoay et certainement dans la région de Boeny. Le défi pour réussir l'élimination du paludisme est ainsi immense. Si le niveau de transmission du paludisme à Tsararano était faible en 2017 (nos résultats le montrent et les données du centre de santé de base de Tsararano révèlent qu'il y a eu peu de malades impaludés à la même époque), on ne doit pas oublier que rien n'est figé; et que la transmission du paludisme est dynamique [30].Une pluviométrie normale dans la région est favorable au développement des différentes espèces de vecteurs (complexes *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*) ; et pourrait accélérer la transmission avec la présence de réservoirs de *Plasmodium* infectant l'homme. On ne doit pas s'étonner si le nombre de cas se multiplie par dix en espace de deux saisons de transmission surtout si les médicaments et les outils de diagnostic font défaut.

PCR pour la détection du paludisme chez les écoliers : dans notre étude, dans l'intérêt des élèves, les résultats des TDR réalisés sur site ont permis de traiter les enfants. Cependant, il est évident que plus de cas d'infection plasmodiale ont été mis en évidence par PCR (sachant que la PCR était réalisée plus tard). Un certain nombre de points sont alors à soulever :

- Nous avons des raisons de croire que ce n'est relativement pas nécessaire d'examiner tous les frottis sanguins (goutte épaisse) lors d'une enquête concernant plus de 1000 participants si on prévoit d'analyser par PCR l'ensemble des échantillons de sang collectés. Déjà, avec les microscopistes experts de l'Institut Pasteur de Madagascar, l'examen d'une goutte épaisse prend en moyenne 20 minutes (donc 334 heures de microscopie pour 1000 goutes épaisses).

- Comme nous l'avons adopté pour la seconde enquête, la microscopie a été seulement effectuée en simple aveugle pour les élèves avec des RDT positifs ou PCR positives et une portion des élèves tirés au sort avec des RDT négatifs et PCR négatives, la PCR permet une identification sans faille des espèces de *Plasmodium.*

Genre et infection : l'effectif de la population d'étude est trop limité pour tirer des conclusions sur la corrélation entre le genre et le risque d'infection et on n'a pas tous les paramètres qui pourraient renseigner sur les facteurs de confusions (comme la qualité des maisons, le niveau de vie de chaque famille, la proximité des gites larvaires, etc.). Néanmoins, les garçons ont été plus infectés que les filles en Février 2017. Les mêmes résultats ont été rapportés par d'autres équipes de chercheurs comme celle de Kimbi et al en 2013 après une étude faite dans la région du Sud-Ouest Cameroun [52] et par Nankabirwa et al en 2013 après une étude faite en en Ouganda [56]. Par contre, les données pour la deuxième enquête à Tsararano montrent que l'augmentation de la prévalence de l'infection plasmodiale est statiquement significative chez les filles en Mai 2017 (p-value= 0,01). Ce type de résultats ont été rapportés par Ayele et al en 2012 [57]. Ce n'est pas facile de trouver une explication à ces faits car les natures et formes des rapports sociaux avec le genre varient d'une société à une autre, voire d'une zone à une autre [31,58] en plus de l'implication de facteurs biologiques (dont l'immunité) qui expliqueraient la susceptibilité aux infections parasitaires [59,60].

Ecoliers face au paludisme : au-delà de l'aspect méthodologique axé sur la PCR pour la détection de l'infection plasmodiale chez les écoliers, nous aimerions considérer ces écoliers comme étant des grands enfants. Des années durant, on n'évoque que les enfants de moins de 5 ans comme étant vulnérables face au paludisme [35]. Nous sommes d'avis que les enfants en âge scolaire constituent un groupe à risque face au paludisme. Des résultats de différentes études réalisées à Madagascar entre 2005 et 2014 en milieu urbain sur les hauts plateaux [53], sur les marges des hautes terres centrales [61], en milieu rural sur les hautes terres centrales [62] ou sur la côte Sud- Est [63] montrent que la majorité des cas de paludisme (40 à 59% des cas) sont chez les enfants de 5 à 15 ans. Ainsi, il est temps d'introduire ou de réintroduire dans le programme d'enseignement dans les écoles primaires et dans les collèges l'éducation sur la prévention et le traitement contre le paludisme (au même titre que les notions d'hygiène des mains). Nous avons constaté que les élèves de 10 à 15 ans ont mieux compris sur le mode de la transmission du paludisme, les mesures de prévention, le diagnostic biologique et le traitement du paludisme après les explications que nous leurs ont données après la première enquête. Nos résultats ont mis en exergue une amélioration significative de l'état de connaissance des écoliers sur deux points : (i) la connaissance des sujets à risque et (ii) la connaissance du TDR. Il y a certainement, une implication du « vécu » lors des séances dépistages en ce qui concerne cette amélioration de l'état de connaissance sur le TDR. Ces enfants seraient des vecteurs d'informations vers leurs parents et leurs proches. En les écoutant, on peut capturer des informations utiles pour ajuster les messages pour la population. Pour illustration, on peut citer le témoignage spontané d'une écolière de 11 ans à Tsararano : « Aminay ndraiky misy lay fa mamako sy tsaiky zandrinaka foana ndro matory anaty lay, zaho tsy ary matory anaty lay » (Traduction : nous avons une moustiquaire à la maison mais il n'y a que ma mère et mon petit frère qui l'utilisent. Je ne dors pas sous la moustiquaire). Ce témoignage expliquerait la discordance entre connaissance et pratique que suggèrent nos résultats. Plus d'élèves ont pourtant compris l'utilisation bénéfique des MID en tant que moyen de prévention individuelle contre le paludisme (Tableau VIII).

Cependant, il est crucial de noter que les résultats présentés dans le Tableau IV concernaient tous les élèves ayant participé au dépistage. Ce qui inclut des élèves de 10 à 15 ans qui ont participé à l'enquête CAP.

Deux élèves de la seconde enquête ayant présenté des parasitémies élevés dormaient sous moustiquaire.

Sur le plan clinique, il est évident qu'un individu parasité n'est pas forcement fébrile (du moins au moment de l'examen) [64,65]. Nous pouvons citer les exemples des deux enfants impaludés (TDR, PCR, Microscopie) avec des valeurs de parasitémie assez élevées mais apyrétiques (examen physique et antécédents).

Enquête portant sur le paludisme dans les écoles : partout dans le monde, des enquêtes dans les écoles ont été menées depuis leur lancement aux Etats-Unis dans les années 1920-1940. Entre autres, le Kenya, le Burundi, le Mozambique, la Tanzanie, le Mali, le Ghana, le Malawi, le Sri-Lanka, la Thaïlande et Madagascar ont réalisé des enquêtes auprès des écoliers selon les interventions menées. Il y a celles associées à la distribution des moustiquaires imprégnées d'insecticides, celles qui sont faites pour évaluer la chimioprophylaxie à l'école etc. [66]. Les avantages pratiques de ces enquêtes et leur pertinence en tant qu'outils de surveillance du paludisme sont décrits notamment la simplicité de sélection, identification et suivi des individus avec une conformité élevée [67].

PERSPECTIVES

La surveillance de routine de l'infection plasmodiale ne figure pas forcément dans les priorités définies dans les stratégies nationales de lutte contre le paludisme à Madagascar. On peut pourtant soutenir des enquêtes auprès des enfants (moins de 15 ans) qui fréquentent des écoles ou qui ne sont pas scolarisés. On peut commencer par les écoliers dans de structures tirées au sort réparties dans les différents faciès de transmission du paludisme. Les TDR peuvent être utilisés par tout. Tels résultats viennent compléter les résultats des Enquêtes sur les Indicateurs du Paludisme menées chez les enfants de moins de 5 ans à Madagascar tous les deux ou trois ans depuis 2011[27].

On peut aussi sélectionner une partie des écoles en milieu rural (pour être réaliste, deux par province) pour en faire un réseau de surveillance de la tendance du paludisme (et d'autres pathologies). Deux enquêtes tous les ans seront menés dans ces écoles. En plus des TDR sur site, on prévoit la réalisation des PCR pour la détection et l'identification des espèces plasmodiales présentes. On génère ainsi des données utiles et utilisables qui renseignent sur "la tendance" du paludisme à Madagascar. Partant de notre expérience à Tsararano, on peut envisager en moyenne 1000 prélèvements par école à analyser par an (soit 12.000 prélèvements par an pour tout le pays). Les mesures d'accompagnement seraient le financement, la création d'équipe et de laboratoire aptes à réaliser la PCR dont la technique LAMP [68] au niveau provincial quitte mettre à niveau des Centres Hospitaliers Universitaires ou des laboratoires dans des universités.

Quand le contrôle du paludisme progresse de façon significative, le dépistage des cas secondaires autours des rares cas de paludisme (dépistage passif) constitue la pierre angulaire des systèmes de surveillance et d'intervention [69]. Quand l'élimination du paludisme en tant que problème de santé publique est effective, la surveillance passive est la première ligne pour la détection des cas de paludisme « importé » des zones à risque et la transmission locale. Dans les deux cas de figure, notre expérience montre qu'il y a de la place pour la PCR en mettant en place un système qui permet d'envoyer des échantillons à analyser dans un ou des centres pour un rendu de résultats en moins de 96 heures pour rendre les résultats.

Avant d'arriver à vulgariser la PCR, on pourrait aussi miser sur l'utilisation des TDR ultrasensibles [70] pour améliorer la détection des infections plasmodiales à faible parasitémies et assoir un système normalisé : un jour pour signaler le cas, trois jours pour enquêter et sept jours pour commencer une réponse dans la communauté.

CONCLUSION

A l'issue de cette étude, il est évident que le TDR permet de décider le traitement immédiatement sur site. La PCR est un outil précieux pour un rendu de résultat rapide pour une enquête dans une école ou dans une commune. La microscopie sur les échantillons avec des PCR positives permet de suivre l'évolution globale de la parasitémie, et l'ensemble des résultats de l'enquête chez les écoliers reflète la tendance du paludisme dans la commune de Tsararano.

En guise de conclusion, le niveau de transmission du paludisme était relativement faible dans cette commune de Tsararano en Février et Mai 2017 malgré une légère augmentation notée après le passage du cyclone Enawo. Mais avec la circulation de *P. falciparum* et la présence des *Anophèles* vecteurs, le problème demeure entier. La transmission du paludisme étant dynamique, il faut rester vigilant dans un esprit de veille et surveiller le paludisme par PCR auprès des écoliers est une option pour mieux documenter la morbidité liée au paludisme. Avec les ressources financières et humaines nécessaires, avec la vision "traquer et traiter", on pourrait envisager de retourner les résultats de PCR en moins de 96 heures vers les sites pour traiter les enfants infectés.

Nous ne prétendons pas avoir une population d'étude représentative de la population du District de Marovoay mais nous avons des raisons de croire que la situation du paludisme dans les autres communes du district ne serait pas trop différente de celle de Tsararano.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WHO.World Malaria Report 2017.WHO. 2018. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/

2. OMS. Rapport sur le paludisme dans le monde 2015 Résumé. OMS.2016;32. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/ report/en/

3. OMS. Rapport sur le paludisme dans le monde.OMS. 2016; Available from: http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/fr/

4. Ministère de la Santé Publique de Madagascar. Plan Strategique De Lutte Contre Le Paludisme Madagascar 2013-2017. Ministère de la Santé Publique de Madagascar.2012;124.

5. INSTAT. Enquête nationale sur le suivi des Objectifs du Millénaire pour le Développement à Madagascar: Objectif 05. INSTAT.2013;63.

6. Mattern C, Pourette D, Raboanary E, Kesteman T, Piola P, Randrianarivelojosia M, et al. Tazomoka is not a problem. local perspectives on malaria, fever case management and bed net use in Madagascar. PLoS One. 2016;11(3).

7. Sutherland C, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite Plasmodium ovale occur globally. J Infect Dis. 2010;

8. Randriamiarinjatovo D. Mise en évidence de la coexistence de Plasmodium ovale curtisi et de Plasmodium ovale wallikeri à Saharevo (Moramanga). [Mémoire: Faculté de Sciences Antananarivo]2016;

9. OMS. World Malaria Report. OMS.2014.

10. Rakotoniaina T. Etude des déterminants de la transmission résiduelle du paludisme dans le district de Marovoay , Madagascar Etude des déterminants de la transmission résiduelle du paludisme dans le district de Marovoay , Madagascar.[Mémoire: Faculté de Sciences Antananarivo] 2017.

11. Alonso P, Noor AM. The global fight against malaria is at crossroads. Lancet . World Health Organization. 2017;0(0):1–3. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617330805

12. OMS. AMS. Paludisme : projet de stratégie technique mondiale pour l ' après-2015. OMS. AMS.. 2016;1

13. Elbadry MA, Al-Khedery B, Tagliamonte MS, Yowell CA, Raccurt CP, Existe A, et al. High prevalence of asymptomatic malaria infections: a cross-sectional study in rural areas in six departments in Haiti. Malar J . BioMed Central; 2015;14(1):510. Available from: http://www.malariajournal.com/content/14/1/510

14. Walldorf JA, Cohee LM, Coalson JE, Bauleni A, Nkanaunena K, Kapito-Tembo A, et al. School-age children are a reservoir of malaria infection in Malawi. PLoS One. 2015;10(7):1–13.

15. Nankabirwa J, Brooker SJ, Clarke SE, Fernando D, Gitonga CW, Schellenberg D, et al. Malaria in school-age children in Africa: An increasingly important challenge. Trop Med Int Heal. 2014;19(11):1294–309.

16. Noor AM, Kirui VC, Brooker SJ, Snow RW. The use of insecticide treated nets by age: implications for universal coverage in Africa. BMC Public Health . 2009;9(1):369. Available from: http://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-9-369

17. USAID. President 's malaria initiative 2018.USAID. 2018. Available from: https://www.pmi.gov/docs/default-source/default-document-library/malaria-operational-plans/fy16/fy-2016-madagascar-malaria-operational-plan.pdf?sfvrsn=5

18. RaharimalalaL A, Rabarijaona L, Randrianarivelojosia M, Razanavololo F, Rason MA, Andrianantenaina HB, et al. Etude du paludisme en zone de risque cyclonique : approche entomologique , diagnostique et thérapeutique dans la région Sud-Est de Madagascar. Arch Inst Pasteur de Madagascar. 2002;68:79–85.

19. Ratsimbasoa A, Ravony H, Vonimpaisomihanta J-A, Raherinjafy R, Jahevitra M, Rapelanoro R, et al. Management of uncomplicated malaria in febrile under five-year-old children by community health workers in Madagascar: reliability of malaria rapid diagnostic tests. Malar J . BioMed Central Ltd; 2012;11(1):85. Available from: http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-85

20. J. W Bailey, J. Williams, B. J. Bain JP-W and PC for. Guideline: The Laboratory Diagnosis of Malaria. Br Soc Haematol. 2012;XXXIII(2):81–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161%5Cnhttp://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/cir991%5Cnhttp://www.scielo.cl/pdf/udecada/v15n26/art06.pdf%5Cnhttp://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861150233&partnerID=tZOtx3y1

21. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11(6):623–39. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eri.13.45

22. OMS. Note d ' orientation sur le diagnostic du paludisme dans les contextes de faible transmission Septembre 2014 Cadre général. a.OMS. 2014;1–13.

23. USAID. President ' s malaria in itiative Madagascar Malaria Operational Plan FY 2015. USAID.2015;

24. USAID, INSTAT, IPM. Enquête sur les indicateurs du Paludisme 2016. USAID, INSTAT, IPM. 2017.

25. Thellier M, Kendjo E, Bras J Le, Danis M. Épidémiologie du paludisme dans le monde : un véritable espoir de contrôle de la maladie, mais de nouvelles inquiétudes. Vol. 6, La Lettre de l'Infectiologue. 2012 ; 6

26. Institut National de la Statistique, Programme National de Lutte contre le Paludisme, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar and ICF International . Enquête sur les Indicateurs du Paludisme à Madagascar (EIPM)2013.Institut National de la Statistique, Programme National de Lutte contre le Paludisme, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar and ICF International. 2013;33–45. Available from: http://dhsprogram.com/pubs/pdf/MIS17/MIS17.pdf

27. Institut National de la Statistique, Programme National de Lutte contre le Paludisme, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar and ICF International. Enquête sur les Indicateurs du Paludisme Madagascar 2011.Institut National de la Statistique, Programme National de Lutte contre le Paludisme, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar and ICF International. 2011,320. Available from: http://www.cairn.info/revue-projet-2011-1-page-102.htm

28. Benjamin R. Programme National de lutte contre le Paludisme, Stratégie de la prise en charge des cas: leçons apprises. 2010; Available from: https://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/artemisinin/2010_Madagascar/Lessons_learnt.pdf

29. Mouchet J, Carnevalle P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, et al. Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbe. CIC Edizioni Internazionali, editor. Montrouge, France; 2004. 22 p.

30. Ihantamalala FA, Rakotoarimanana FMJ, Ramiadantsoa T, Rakotondramanga JM, Pennober G, Rakotomanana F, et al. Spatial and temporal dynamics of malaria in Madagascar. Malar J . BioMed Central; 2018;17(1):1–13. Available from: https://doi.org/10.1186/s12936-018-2206-8

31. Cotter C, Sturrock HJW, Hsiang MS, Liu J, Phillips AA, Hwang J, et al. The changing epidemiology of malaria elimination: New strategies for new challenges. Lancet . Elsevier Ltd; 2013;382(9895):900–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60310-4

32. Lepers JP, Deloron P, Andriamagatiana-Rason MD, Ramanamirija JA, Coulanges P. Newly transmitted Plasmodium falciparum malaria in the central highland plateaux of Madagascar: assessment of clinical impact in a rural community. Bull World Health Organ. 1990;68(2):217–22. Available from: http://europepmc.org/articles/PMC2393115/?report=abstract

33. Lepers JP, Fontenille D, Andriamangatiana-Rason MD, Deloron P, Coulanges P. Facteurs écologiques de la recrudescence du paludisme à Madagascar. Bull la Société Pathol Exot. 1999;83(3):330–41. Available from: http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=19635063

34. Jambou R, Ranaivo L, Raharimalala L, Randrianaivo J, Rakotomanana F, Modiano D, et al. Malaria in the highlands of Madagascar after five years of indoor house spraying of DDT. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95(1):14–8.

35. Ministère de la Santé Publique. Plan Stratégique de Lutte contre le Paludisme 2007-2012 - Du contrôle vers l'élimination du paludisme à Madagascar. Ministère de la Santé Publique.2007;1–54.

36. Darar EY. Etude épidemio-clinique et moléculaire du Paludisme à Plasmodium falciparum par la MSP-1 à Missira (Cercle de Kolokani). [Thèse Médecine Mali].2004;

37. Médecins Sans Frontières. Guide clinique et thérapeutique. Médecins Sans Frontières.2007.

38. Bin A, Charpentier JC, Davidson J, Delmas H, Fan L, Jameson G, et al. Paludisme UE6 Notes. Edition 2018 e-Pilly Trop;166 : 8.

39. WHO. WHO malaria terminology.WHO. 2017;38. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/208815/1/WHO_HTM_GMP_2016.6_eng.pdf

40. Association Française de Parasitologie. Paludisme. Association Française de Parasitologie.2014;

41. OMS. Techniques de base pour le diagnostic microscopique du Paludisme. Partie I Guide du Stagiaire. 2014. p. pp 90.

42. Plan d'assurance qualité (PAQ), University Research Co., LLC E,Organisation mondiale de la Santé (OMS) . Comment utiliser les tests diagnostiques rapides (TDR) : un guide pour la formation au niveau du village et du district. Plan d'assurance qualité (PAQ), University Research Co., LLC EO, Organisation mondiale de la Santé (OMS) .2008;48.

43. Hance P, Garnotel E, De Pina JJ, Vedy S, Ragot C, Chadli M, et al. Tests immunochromatographiques rapides de détection du paludisme, principes et stratégies d'utilisation. Médecine Trop. 2005;65:389–93.

44. WHO. Basic laboratory methods in medical parasitology: part 2. WHO.1991. p. 1–53.

45. Snounou G, Pinheiro L, Gonçalves A, Fonsec, L, Dias F, Brown KN.et al . The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993;6(87):.649–653.

46. Sambrook J. Molecular Cloning. Cold Spring Harb Lab Press. 2001;1:589.

47. Servicede l'hydraulique et des ameliorations agricoles. Les irrigations en 1925 dans la plaine de Marovoay. Madagascar et dependances- bulletin economique. Antananarivo; 1926;193–7.

48. Rabe TA. Etude des facteurs bio-écologiques modulant la prémunition contre le paludisme sur les Hautes Terres de Madagascar . [Thèse] Médecine Humaine Antananarivo ; 2003

49. Chauvet G, Coz J, Gruchet , Grjebine ALr. Contribution à l'étude biologique des vecteurs du paludisme à Madagascar. Méd Trop. 1964;24((1)):26–44.

50. Snounou G. Genotyping of Plasmodium spp.: Nested PCR. Malaria Methods and Protocols. 2002. p. 103–16. Available from: http://link.springer.com/10.1385/1-59259-271-6:103

51. Randrianarivelojosia M. Un regard sur le paludisme à Madagascar. Edition 23 Actualités du Pharo. 2017;

52. Kimbi HK, Sumbele IU, Nweboh M, Anchang-Kimbi JK, Lum E, Nana Y, et al. Malaria and haematologic parameters of pupils at different altitudes along the slope of Mount Cameroon: A cross-sectional study. Malar J. 2013;12(1):1–10.

53. Rakotomanana F, Ratovonjato J, Randremanana R V, Randrianasolo L, Raherinjafy R, Rudant J, et al. Geographical and environmental approaches to urban malaria in Antananarivo (Madagascar). BMC Infectious diseases. 2010;

54. Aghababian RV, Teuscher J. Infectious diseases following major disasters. Ann Emerg Med. 1992;21(4):362–7.

55. Waring SC, Brown BJ. The Threat of Communicable Diseases Following Natural Disasters: A Public Health Response. Disaster Manag Response. 2005;3(2):41–7. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1540248705000040

56. Nankabirwa J, Wandera B, Kiwanuka N, Staedke SG, Kamya MR, Brooker SJ. Asymptomatic Plasmodium infection and cognition among primary schoolchildren in a high malaria transmission setting in Uganda. Am J Trop Med Hyg. 2013;88(6):1102–8.

57. Ayele DG, Zewotir TT, Mwambi HG. Prevalence and risk factors of malaria in Prevalence and risk factors of malaria in Ethiopia. Malar J [Internet]. 2012;11(1):1. Available from: Malaria Journal

58. United Nations Development Programme. Discussion Paper: Gender and Malaria.United Nations Development Programme. 2015;.

59. Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites , Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology; 2001;14 . p. 476–88. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432809

60. Markle JG, Fish EN. SeXX matters in immunity. Trends Immunol . Elsevier Ltd; 2014;35(3):97–104. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.10.006

61. Rabarijaona LP, Randrianarivelojosia M, Raharimalala LA, Ratsimbasoa A, Randriamanantena A, Randrianasolo L, et al. Longitudinal survey of malaria morbidity over 10 years in Saharevo (Madagascar): further lessons for strengthening malaria control. Malar J . 2009;8(1):190. Available from: http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-8-190

62. Tisserand C, Ravaoarisoa E, Andrianaranjaka V, Raherinjafy R, Noro Raholimalala E, Rakondramanga J-M, et al. Réemergence du paludisme à Ankazobe, sur les Hautes Terres Centrales de Madagascar. Rev Epidemiol Sante Publique. Elsevier Masson SAS; 2017;65:S103–4. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0398762017302912

63. Kesteman T, Rafalimanantsoa SA, Razafimandimby H, Rasamimanana HH, Raharimanga V, Ramarosandratana B, et al. Multiple causes of an unexpected malaria outbreak in a high-transmission area in Madagascar. Malar J . BioMed Central; 2016;15(1):57. Available from: http://www.malariajournal.com/content/15/1/57

64. Szeless T. De l'infection à la maladie , un processus mal connu ; l'exemple du paludisme dans une zone endémique d'Afrique sub-saharienne.[Thèse Facultés de sciences Université de Genève], 2009.

65. Delley-michel V. Approche épidémiologique du paludisme en zone d'endémie : incidence de fièvre chez les enfants de 1 à 12 ans et suivi de variations naturelles de la parasitémie chez les adultes.[Thèse Facultés de sciences Université de Genève], 1998.

66. Bernard P, WHO Expert Committee on Malaria. La lutte contre le paludisme à Madagascar.WHO. 1950;9 Available from: http://whqlibdoc.who.int/malaria/WHO_Mal_52_fre.pdf

67. Brooker S, Kolaczinski JH, Gitonga CW, Noor AM, Snow RW. The use of schools for malaria surveillance and programme evaluation in Africa. Malar J . 2009;8(1):231. Available from: http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-8-231

68. Lucchi NW, Ndiaye D, Britton S U V. Expanding the malaria molecular diagnostic options: opportunities and challenges for loop-mediated isothermal amplification tests for malaria control and elimination. Expert Rev Mol Diagn. 2018;

69. Howes RE, Mioramalala SA, Ramiranirina B, Franchard T, Rakotorahalahy AJ, Bisanzio D, et al. Contemporary epidemiological overview of malaria in Madagascar: operational utility of reported routine case data for malaria control planning. Malar J . BioMed Central; 2016;15(1):502. Available from: http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-016-1556-3

70. Das S, Jang IK, Barney B, Peck R, Rek JC, Arinaitwe E et al. Performance of a High-Sensitivity Rapid Diagnostic Test for Plasmodium falciparum Malaria in Asymptomatic Individualsfrom Uganda and Myanmar and Naive Human Challenge Infections. Am J Trop Med Hyg. 2017;

71. OMS. Techniques de base pour le diagnostic microscopique du Paludisme. Partie I Guide du Stagiaire. OMS. 2014.

72. Woronzoff-Dashkoff KK. The Wright-Giemsa stain: Secrets revealed.Clinics in Laboratory Medicine. Elsevier; 2002; 22. p. 15–23. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11933573

73. Mirdha BR, Samantaray JC, Mishra B. Laboratory diagnosis of malaria. J Clin Pathol. 1997;50(4):356.

74. Division of Parasitic Diseases and Malaria. Laboratory diagnosis of malaria: Plasmodium spp. Life Cycle of Plasmodium spp. http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Parasitemia_and_Life Cycle.pdf . 2013; Available from: http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Parasitemia_and_Life Cycle.pdf

ANNEXE 1

MICROSCOPIE POUR LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME

Techniques de base pour le Diagnostic microscopique du paludisme Partie I. (OMS. Guide du stagiaire. 2014)[71]

Techniques de coloration

Depuis la découverte du parasite, à l'examen de sang frais, en 1880 par Charles Louis Alphonse Laveran, diverses techniques de coloration de plus en plus innovatrices, par différents chercheurs ont été élaborées jusqu'à la coloration « dite de Giemsa » actuelle qui sert de référence dans les études de diagnostic microscopique [72]. Le colorant de Giemsa est un colorant de Romanovski à base d'alcool. On l'achète prêt à l'emploi ou il est préparé dans des centres régionaux par des techniciens expérimentés puis distribué dans tout le réseau des laboratoires et du programme de lutte antipaludique. C'est un mélange d'éosine, qui colore la chromatine du parasite et les granulations dans des teintes de rouge ou de rose, et de bleu de méthylène, qui colore le cytoplasme parasitaire en bleu. Les noyaux des leucocytes prennent une teinte bleue à presque noire, selon le type de leucocyte.

Deux méthodes de coloration sont utilisées au laboratoire et chacune respecte les étapes suivantes dans un ordre chronologique décroissant : hémolyse, coloration, rinçage et séchage, voir Tableau IX pour illustration [73].

Tableau IX : procédure de coloration des étalements de sang sur lame pour le diagnostic microscopique du paludisme.

	Méthode 1	Méthode2
Hémolyse	▪ Plonger les frottis dans 500ml de PBS 1X dans la cuve dédiée ▪ Laisser pendant 5 min ▪ Egoutter sur le papier absorbant	
Coloration	▪ Plonger les frottis hémolysés dans la cuve à coloration contenant préalablement le colorant ▪ Laisser pendant 10min ▪ Egoutter sur le papier absorbant	▪ Mettre les frottis sur le support de cuve à coloration ▪ Couvrir les frottis par le colorant de travail ▪ Laisser pendant 10min
Rinçage	▪ Plonger les frottis colorés un à un dans le bac de rinçage N°1 ▪ Plonger les frottis colorés un à un dans le bac de rinçage N°2 ▪ Plonger les frottis colorés un à un dans le bac de rinçage N°3	
séchage	▪ Egoutter les frottis sur le papier absorbant ▪ Transférer les frottis un à un sur les portoirs de séchages placés dans un grand bac ▪ Laisser égoutter pendant 5 min ▪ Remplacer le papier absorbant du grand bac ▪ Remettre les frottis sur les portoirs dans le grand bac ▪ Ramener avec les deux mains le grand bac sous la hotte pour séchage ▪ Laisser sécher pendant deux heures sous hotte en marche ou pendant une nuit sous hotte en veille dans la salle appropriée ▪ Ramener avec les deux mains le grand bac avec les frottis séchés	

dans la salle de rangement des frottis pour la remise en boite dans leur boite respective

- Ranger sur l'étagère des frottis colorés non lus

Identification de P*lasmodium*

Attention, rigueur, précision et finesse : quelques-unes des qualités indispensables lors de l'examen au microscope. La manipulation des vis macro et surtout micrométrique et des vis de balayage (haut en bas, droite à gauche) requiert beaucoup d'attention et minutie car la distinction des formes et éléments visualisées, leur netteté varie d'un gradient de l'ordre du micron vue leur taille microscopique.

Trois composants des parasites sont visualisables sauf pour les formes jeunes (ne possédant pas de granulation). Le cytoplasme coloré en bleu, la chromatine en rouge ou violet, les granulations en marron ou noir. Afin de distinguer le parasite des cellules de l'hôte (globules blancs) et des artéfacts éventuels, l'observation correcte de ces trois composants a une importance cruciale.

A la goutte épaisse. Les globules rouges sont normalement lysés et le diagnostic repose essentiellement sur l'observation du parasite et notamment ses trois composants. Ce qui est théoriquement plus facile que sur le frottis mince car les éléments observés paraissent plus denses et plus compacts. La lyse des globules rouges parasitées aboutis à une quantité plus massive de parasites observés que celle observée à la goutte épaisse et à plus de clarté du champ microscopique à visualiser. Ce qui signifie, plus de densité parasitaire et par conséquent, rapidité de lecture, meilleur seuil de détection de l'ordre de quatre *P. falciparum* par microlitre soit 10^{-6}à 10^{-7}. Ce qui explique en partie la différence significative entre la sensibilité des deux techniques selon les objectifs de l'étude et le choix de la goutte épaisse dans la détection du parasite pour poser le diagnostic de présence de *Plasmodium* ou non avant de pouvoir identifier l'espèce.

Au frottis mince, examiner l'apparence du parasite et celle du globule rouge parasité conduit aux observations suivantes :

- ❖ Le globule rouge parasité :
  - sa taille. Pareille à celle des globules rouges non-parasités ou élargie.
  - pigmentation. Si présentes, la couleur, les granulations rouge ou rose, appelées granulations de Shüffner caractéristique de l'infection à *P. vivax et P. ovale.* Celles de couleur mauve-rouge et irrégulières appelées granulations de Maürer sont rencontrées chez les formes de trophozoïtes matures de P. *falciparum*
- ❖ L'apparence du parasite :

Au stade « ring » ou anneau ou bague, la différence entre les différentes espèces plasmodiales est peu évidente. L'observation de ses formes jeune doit conduire au reflexe de chercher des formes plus âgées qui sont généralement absente au cours de l'infection à *P. falciparum* sauf en cas d'infections sévères. Et dans ces cas où *P. falciparum* ou *P.knowlesi* est identifié, le calcul de la parasitémie doit obligatoirement être rapporté *P.knowlesi*, une espèce normalement trouvée chez les macaques est aujourd'hui responsable de paludisme humain dans la plupart des pays de l'Asie du Sud Est mais, la dynamique de transmission du *Plasmodium*, précédemment développée nous emmène à avancer une probabilité sur l'extension ultérieure de la distribution de cette espèce aussi dangereuse que *P. falciparum*, souvent confondue morphologiquement avec les autres espèce et surtout *P. malariae.*

Les différences morphologiques (taille, couleur, aspect, nombre) organites des espèces à identifier aux différents stades de développement visualisés permettent de les distinguer les unes des autres.

IL y a des cas où la goutte épaisse seule est disponible, d'autres où en présence des deux, le frottis est négatif et la goutte épaisse positive. Selon les circonstances, trois possibilités aux choix peuvent aider à l'identification de l'espèce plasmodiale :
A défaut de goutte épaisse, le calcul peut se faire à partir des globules rouges parasitées et seulement quand le nombre de parasite est élevé. On établit le pourcentage d'hématies parasitées rapporté au nombre total d'hématies (saines et parasité). Il suffit

pour cela de compter dans 3 à 4 champs microscopiques choisis au hasard mais éloignés les uns des autres, le nombre d'hématies (au moins 1000) et le nombre d'hématies parasitées. Il est tenu standard que (i) un champ microscopique à immersion ($\times 100$) contient entre 150 et 300 hématies et (ii) le nombre moyen d'hématies est de 4500000 par microlitre. La formule à adopter est :

$$nombre\ de\ parasite\ par\ microlitre = \%\ hématies\ parasitées \times 45000$$ [74]

Exemple : on compte 16 hématies parasitées sur 5 champs microscopiques d'environ 300 hématies chacun. Le pourcentage d'hématies parasitées est donc : $\frac{16\times100}{1500} = 1.06\%$

le nombre de parasite par microlitre est donc : $1.06 \times 45000 = 48000\ par\ \mu l$

Les résultats obtenus sont à transcrire sur une fiche de lecture. Seuls les stades asexués de plasmodium seront quantifiés pour la parasitémie sauf si on ne retrouve que des gamétocytes. Ce qui est rencontré en absence de traitement mais pouvant également indiquer la suppression d'une infection active. L'indice gamétocytaire (même mode de calcul) est un paramètre à part, plutôt réservé aux études épidémiologiques. Dans le cas de coïnfection, le comptage est réservé à P. *falciparum* ou P. *knowlesi*

Les éléments suivants sont souvent confondus avec les parasites :

- Plaquettes adhérentes aux globules rouges dans les frottis minces
- Culot plaquettaire
- Fragments de globules blancs (goutte épaisse)
- Précipités de colorant

Annexe 2 : Questionnaire enquête CAP

Mpanadihady ....

Daty fanadihadiana ..../..../....

Anarana sy fanampiny ....

Fanavahana 1: LAHY 2: VAVY

Daty nahaterahana ..../..../....

Taona ....

Fokontany ....

Kaominina ....

1	PALU1	Mahafantatra mikasika ny aretina tazomoka ve ianao ?	ENY .... 1 TSIA 2
2	PALU2	Inona avy ireo soatra aretina ahafantarana ny olona voan'ny tazomoka?	MARARY LOHA .... 1 MARARY KIBO .... 2 MANGATSIAKA .... 3 MANDOA .... 4 MAFANA HODITRA 5
3	PALU3	Ahoana ny fomba ahazoana ny tazomoka? TSY TONONINA NY TOLON-KEVITRA MARIHO IZAY REHETRA VOALAZA TSINDRIO, AVERENO : Fomba ahoana koa?	TSY FAHADIOVAN'NY MANODIDINA, FISIAN'NY RANO MANDRONA, LOBOLOBO .... A KAIKITRY NY MOKA .... B TSY FATORIANA ANATY LAY .... C NY TSY FIHINANANA FANAFODY IZAY AHAFAHANA MIBOROKA NY TAZOMORA .... D FAMPIASANA VATANA HAVIZANA .... E FITANTANANDRO DE LOATRA MANDRITRA NY FIASANA .... F REHEFA LENA NY ORANA .... G FIOVAN'NY TOETR'ANDRO TAMPOKA .... H TSY FAHAMPIAN-TSAKAFO .... I FIHINANANA VOANKAZO .... J TSY FAHADIOVAN'NY VATANA, TANANA MALOTO .... K ANY AMBANIVOHITRA .... L MOSAVY .... M HAFA ________ (MARIHO) W HAFA ________ (MARIHO) X HAFA ________ (MARIHO) Y TSY FANTATRA .... Z
4	GENS_PALU	Iza avy ireo karazan'olona mora handairan'ny tazomoka ? TSY TONONINA NY TOLON-KEVITRA MARIHO IZAY REHETRA VOALAZA AVERENO : Tsy misy olona hafa?	ZAZA LATSAKY NY 5 TAONA .... A NY ANKIZY .... B NY VEHIVAVY BEVOHOKA .... C NY VEHIVAVY .... D NY LEHILAHY .... E NY OLONA MAHAZO TAONA .... F IREO OLONA MIAINA ANY @ TOERANA TSY MISY ARETINA MATETIKA SY IREO VAHINY AVY ANY IVELANY .... G NY OLON-DREHETRA .... H HAFA ________ (MARIHO) X TSY FANTATRA .... Z
5	PERIODE_PALU	Vanim-potoana inona no misy ahazoana ny tazomoka amin'ny ? MARIHO IZAY VOLANA REHETRA VOALAZA	JANOARY .... A FEBROARY .... B MARTSA .... C APRILY .... D MAY .... E JONA .... F JOLAY .... G AOGOSITRA .... H SEPTAMBRA .... I OKTOBRA .... J NOVAMBRA .... K DESAMBRA .... L MANDAVAN-TAONA .... X TSY MISY VANIM-POTOANA .... Y NE SAIT PAS .... Z
6	TEST1_PALU	Efa nahita na naheno ny atao hoe "test diagnostic" na fitiliana ho an'ny aretina tazomoka ve ianao (fitsirihana atao @ ran-tànana na vodi-tongotra) talohan'izao fanadihadiana izao?	ENY .... 1 TSIA .... 2 TSY FANTATRA 9

VELIRANO

Eto anatrehan’ Andriamanitra Andriananahary, eto anoloan’ireo mpampianatra ahy, sy ireo mpiara-mianatra tamiko eto amin’ity toeram-pianarana ity, ary eto anoloan’ny sarin’i HIPPOCRATE.

Dia manome toky sy mianiana aho, fa hanaja lalandava ny fitsipika hitandrovana ny voninahitra sy ny fahamarinana eo am-panatontosana ny raharaham-pitsaboana.

Ho tsaboiko maimaimpoana ireo ory ary tsy hitaky saran’asa mihoatra noho ny rariny aho, tsy hiray tetikamaizina na oviana na oviana ary na amin’iza na amin’iza aho mba hahazoana mizara ny karama mety ho azo.

Raha tafiditra an-tranon’olonaaho dia tsy hahita izay zava-miseho ao ny masoko, ka tanako ho ahy samy irery ny tsiambaratelo haboraka amiko ary ny asako tsy avelako hatao fitaovana hanatontosana zavatra mamoafady na hanamorana famitankeloka.

Tsy ekeko ho efitra hanelanelana ny adidiko amin’ny olona tsaboiko nyanton-javatra ara-pinoana, ara-pirenena, ara-pirazanana, ara-pirehana ary ara-tsaranga.

Hajaiko tanteraka ny ain’olombelona na dia vao notorontoronina aza, ary tsy hahazo mampiasa nyfahalalako ho enti-manohitra nylalàn’ny maha olona aho na dia vozonana aza.

Manaja sy mankasitraka ireo mpampianatra ahy aho, ka hampita amin’ny taranany ny fahaizananoraisiko tamin’izy ireo.

Ho toavin’ny mpiara-belona amiko anie aho raha mahatanteraka ny velirano nataoko.

Ho rakotry ny henatra sy horabirabian’ireo mpitsabo namako kosa aho raha mivadika amin’izany.

PERMIS D'IMPRIMER

LU ET APPROUVE

Le Directeur de Thèse

Signé : **Professeur** RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Le Doyen de la Faculté de Médecine d'Antananarivo,

Signé : **Professeur SAMISON Luc Hervé**

Name and First names : ANDREAMBELOSON Tahina Mickaëlla

Title of thesis: « POLYMERASE CHAIN REACTION DETECTION OF PLASMODIAL INFECTION AMONG THE SCHOOLCHILDREN OF TSARARANO, MAROVOAY AND THEIR KNOWLEDGE, ATTITUDE AND PRACTICE ABOUT MALARIA»

Number of pages: 50 Number of tables: 09 Number of figures: 14

Number of annexes: 06 Number of bibliographical references: 74

SUMMARY

Introduction: Malaria surveillance focused on parasitological aspects is crucial in the politics of malaria elimination. The study carried out in Tsararano aimed to estimate the prevalence of malaria infection among schoolchildren.

Methods: We carried out two cross-sectional surveys in February and Mai 2017. On site, RDT was used to diagnose malaria infection Microscopy and Polymerase Chain Reaction (PCR) detection have been used for the laboratory diagnostic of malaria. We also fulfilled an ad hoc questionnaire to assess schoolchildren knowledge, attitudes and practices in relation to malaria.

Results: The mean age of the schoolchildren aged between 4 to 15 years old was 10 years old. A total of 3.6% [IC95%: 2,6 – 4,9 %] malaria infection was detected by PCR and 2.3% [IC95%: 1,3 - 3,1%] by RDT and these were all *Plasmodium falciparum* infection. The mean value of parasitemia was 375 parasites /µl of blood for the 16 out of 99 microscopy confirmed infection. Additionally, an improvement in the schoolchildren's knowledge in relation to malaria was significantly observed.

Conclusion: Malaria transmission level in the rural community of Tsararano was relatively low from February to May 2017. Although, we noticed a slight increase after the passage of the Tropical cyclone Enawo. As the transmission of malaria is dynamic, we have to keep watchful in a waking mind and malaria surveillance by PCR among schoolchildren is an option for better malaria morbidity documentation.

Key words: Malaria infection, prevalence, PCR, schoolchildren, Tropical cyclone Enawo, Tsararano,

Director of the thesis: Professor RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona

Reporter of the thesis: Professor RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona

Address of Author: Lot VT 85 NE Andohanimandroseza

Nom et Prénoms : ANDREAMBELOSON Tahina Mickaëlla
Titre de la thèse : « DETECTION DE L'INFECTION PLASMODIALE PAR POLYMERASE CHAIN REACTION CHEZ LES ECOLIERS DE TSARARANO MAROVOAY ET LEUR CONNAISSANCE, ATTITUDE ET PRATIQUE EN MATIERE DE PALUDISME »

Rubrique : SANTE PUBLIQUE

Nombre de pages : 50 Nombre de tableaux : 09 Nombre de figures : 14

Nombre d'annexes : 06 Nombre de références bibliographiques : 74

RESUME

Introduction : Dans la politique d'élimination du paludisme, la surveillance épidémiologique, axée sur l'aspect parasitologique, est cruciale. Notre étude menée à Tsararano vise à estimer la prévalence de l'infection plasmodiale chez les écoliers.

Méthodes : Deux enquêtes transversales ont été menées en Février et en Mai 2017. Le diagnostic de l'infection plasmodiale a été effectué sur site par le test de Diagnostic Rapide du paludisme (TDR) et en laboratoire, par microscopie et par Polymérase Chain Reaction (PCR). Par ailleurs, un questionnaire ad hoc a été utilisé pour évaluer la connaissance, attitude et pratique des écoliers sur le paludisme.

Résultats : La moyenne d'âge des écoliers âgés entre 4 à 15 ans était de 10 ans. Au total, le taux d'infection plasmodiale détectée par PCR était de 3,6% [IC95% : 2,6 – 4,9 %] contre 2,3% [IC95% : 1,3 - 3,1%] détectée par TDR. Il s'agissait d'infection à P*lasmodium falciparum*. La médiane de la parasitémie était de 375 parasites /µl de sang [extrêmes :48 – 131.514 parasites/µl] pour les 16/99 infections confirmées par la microscopie. Par ailleurs, une amélioration significative de la connaissance des écoliers sur les TDR a été notée lors de la deuxième enquête.

Conclusion : Le niveau de transmission du paludisme était relativement faible dans la commune de Tsararano de Février à Mai 2017. La transmission du paludisme étant dynamique, il faut rester vigilant dans un esprit de veille. Surveiller le paludisme par PCR auprès des écoliers est une option pour mieux documenter la morbidité liée au paludisme.

Mots clés : Cyclone Tropical Enawo, Ecolier, infection plasmodiale, PCR, Tsararano,

Directeur de Thèse : Professeur RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona
Rapporteur de Thèse : Professeur RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona
Adresse de l'auteur : Lot VT 85 NE Andohanimandroseza