



MEMOIRE

Présenté par :

Silvère Dieudonné ZAONGO

Maître ès Sciences

Pour l'obtention du :

Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en Biologie
Appliquée et Modélisation des systèmes Biologiques
(BA/MSB)

THEME

**Evaluation des performances de « CareStart™ Malaria
HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo » et de « CareStart™ Malaria
pLDH (PAN/Pf) » dans la détection de l'infection palustre chez les
femmes enceintes à Bobo-Dioulasso.**

Soutenu le 05 Février 2013

Directeur du Mémoire

Pr. Jean-Bosco OUEDRAOGO

Président du jury

Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO

Membres du jury

Dr. Zakaria BENGALY

Pr. Jean-Bosco OUEDRAOGO

DEDICACES

*Je dédie ce présent mémoire à toute la famille **ZADNGO** à Bobo-Dioulasso et à Ouagadougou. Je fais mention spéciale à mon père **Félix Dieudonné ZADNGO** et à ma mère **Ursule BONKOUNGOU**. Merci pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour ma personne. Que Dieu vous garde en bonne santé.*

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu se concrétiser sans le concours de nombreuses personnes. Mes remerciements vont particulièrement:

Au Professeur Jean-Bosco OUEDRAOGO, Directeur de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé Direction Régionale de l'Ouest (IRSS-DRO), Directeur de ce mémoire. Je vous serai toujours reconnaissant pour m'avoir accueilli et guidé dans ce travail malgré vos occupations multiples. Je vous suis très reconnaissant pour cette initiation à la recherche et pour toutes les connaissances acquises auprès de vous.

Au Professeur Georges Anicet OUEDRAOGO, Président et Professeur Titulaire de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso.

A Monsieur Anyirékun Fabrice SOME, encadrant de ce mémoire. Merci pour avoir partagé votre temps, votre expérience et vos compétences avec moi. J'ai beaucoup appris de vous.

Aux Docteurs de l'IRSS : Issaka ZONGO et Yves-Daniel COMPAORE respectivement Co investigateur principal et investigateur du projet FIND. Je remercie également le **Dr Zékiba TARNAGDA** responsable du laboratoire de biologie moléculaire de l'IRSS-DRO. Je vous exprime à tous ma profonde gratitude pour vos conseils et vos encouragements.

A tous mes enseignants de l'Institut du Développement Rural (IDR) à l'Université Polytechnique de Bobo (UPB).

Au personnel administratif de l'IRSS. Je vous remercie pour les appuis multiformes.

A tous les stagiaires de l'IRSS, mes collègues, camarades et amis (es), retrouvez ici ma parfaite considération. Je m'en voudrais si je ne porte pas une attention particulière à Adissa KOBRE, Liz Karen TAHO, Arnaud LEKPA et Dieudonné OUATTARA. Merci pour tout.

A tous ceux dont les noms n'ont pu être cités, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

SOMMAIRE

RESUME.....	vi
ABSTRACT	vii
SIGLES ET ABREVIATIONS	viii
I. INTRODUCTION	1
II. GENERALITES SUR LE PALUDISME.....	3
II.1 Epidémiologie du paludisme.....	3
II.1.1 Le vecteur du paludisme	3
II.1.2 Les Parasites du paludisme humain	3
II.1.3 Cycle de reproduction du <i>Plasmodium</i>	4
II.1.4 Ampleur du paludisme dans le monde	6
II.1.5 Les formes cliniques du paludisme	8
II.2 Diagnostic du paludisme.....	9
II.2.1 Diagnostic clinique.....	9
II.2.2 Diagnostic biologique.....	9
II.3 La Lutte anti-palustre	11
II.3.1 Traitement du paludisme	11
II.3.2 La prévention du paludisme	12
II.4 Résistance de <i>P. falciparum</i> aux antipaludéens.....	13
II.5 Immunité anti-palustre	14
II.5.1 L'immunité innée	14
II.5.2 L'immunité acquise	15
III. MATERIELS ET METHODES	16
III.1 Type d'étude	16
III.2 Site, période et population d'étude	16
III.3 Critères d'inclusion.....	16
III.4 Activités au laboratoire.....	16
III.4.1 Collecte du matériel biologique	16
III.4.2 Diagnostic de l'infection palustre par les tests CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo et CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf).....	17
III.4.3 Diagnostic de l'infection palustre par la goutte épaisse/frottis mince	19
III.4.4 Diagnostic de l'infection palustre par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	20
III.5. Analyse statistique des données	23

IV. RESULTATS	25
IV.1 Profil de l'étude	25
IV.2 Prévalence de l'infection palustre à l'inclusion	25
IV.3 Performance du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo à l'inclusion.	26
IV.3.1 Sensibilité et spécificité du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo.	26
IV.3.2 Valeur prédictive positive et négative du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo	27
IV.4 Performance du test CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf) à l'inclusion.	27
IV.4.1 Sensibilité et spécificité du test CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf).	27
IV.4.2 Valeur prédictive positive et négative du test CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf).	28
IV.5 Comparaison de la performance des tests CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) et CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf)	28
V. DISCUSSION	31
V.1 De la prévalence de l'infection palustre à l'inclusion	31
V.2 Des performances des tests de diagnostic rapide.....	31
V.2.1 De la performance de CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo	32
V.2.2 De la performance de CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf)	33
V.3 De la comparaison des performances des tests de diagnostic rapide.....	34
VI. CONCLUSION	36
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37
ANNEXES	I

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des Figures

Figure 1: Cycle de reproduction du <i>Plasmodium</i>	6
Figure 2: Répartition géographique du paludisme dans le monde en 2010 (World Health Organization., 2011b).....	7
Figure 3: Photo des tests de diagnostic rapide utilisés	18
Figure 4 : Interprétation des résultats des tests (Carestart TM Malaria RPYDTEST., 2009). 19	
Figure 5 : Photo des thermocyclers utilisés.....	22
Figure 6: Photo d'un gel montrant les bandes d'ADN après révélation aux UV.....	23
Figure 7 : Profil de l'étude	25
Figure 8: Prévalences de l'infection palustre obtenues à l'inclusion en fonction des types d'examen utilisés.....	26

Liste des Tableaux

Tableau I : Marqueurs moléculaires de résistance de <i>P. falciparum</i>	14
Tableau II : Tableau récapitulatif le mélange de la réaction PCR	21
Tableau III : Tableau récapitulatif des séquences d'amorces et des programmes d'amplification	22
Tableau IV : Détermination des indicateurs de performance.....	24
Tableau V : Validité du test CareStart TM Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo dans le diagnostic de l'infection palustre en comparaison avec la goutte épaisse.	27
Tableau VI : Validité du test CareStart TM Malaria pLDH (PAN/Pf) dans le diagnostic de l'infection palustre en comparaison avec la goutte épaisse.....	28
Tableau VII : Performances comparées des tests de diagnostic rapide.....	29
Tableau VIII: Performances comparées des tests de diagnostic rapide après correction à la PCR	30

RESUME

Le diagnostic parasitologique du paludisme est un élément fondamental dans la prise en charge adéquate de la maladie. L'utilisation des tests de diagnostic rapide constitue un élément essentiel à cette stratégie. L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances de CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo » et « CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf) dans la détection de l'infection palustre chez la femme enceinte à Bobo-Dioulasso.

Au total 650 participantes ont été incluses au cours de leur deuxième et troisième trimestre de grossesse. A l'inclusion comme à toutes les visites ultérieures, les participantes ont bénéficié d'une brève évaluation clinique et d'un prélèvement de deux millilitres (2 ml) de sang veineux dans un tube EDTA pour les réalisations de tests de diagnostic rapide (TDRs) du paludisme, de la goutte épaisse/frottis mince ainsi que de la PCR.

Parmi les 650 participantes, 20,62% (134/650) avaient une infection palustre détectée par le test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo contre 15,69% (102/650) par le test CareStart™ Malaria pLDH, 14% (91/650) par la microscopie et 35,85% (233/650) par la PCR.

Les sensibilités et les spécificités des tests « CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo » et « CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf) » sont respectivement de 93,4% [IC 95% 88,3-98,5] Vs 85,7% [IC 95% 78,5-92,9] et 91,2% [IC 95% 88,9-93,6] Vs 95,7% [IC 95% 94-97,4]. La correction des résultats de la microscopie par la PCR a permis de noter les sensibilités et les spécificités : 96,37% [IC 95% 93,3-99,5] Vs 89,47% [IC 95% 83,8-95,1] et 99,8% [IC 95% 99,4-100] Vs 100%.

Les résultats de cette étude montrent que les tests CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo et CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf) ont des sensibilités et des spécificités relativement satisfaisantes. Ces résultats suggèrent que ces TDRs peuvent jouer un rôle important dans le diagnostic du paludisme s'ils sont associés à la microscopie.

Mots clés : Paludisme, Tests de diagnostic rapide, Grossesse.

ABSTRACT

The diagnosis of malaria based on parasitological detection is a major step in the suitable management of the disease. Quick methods of diagnosing are of a righteous help to that strategy. This study is conducted with the aim of assessing the performance of two rapid diagnostic tests in the detection of paludal infection among pregnant women in Bobo-Dioulasso.

650 over-three-month pregnant women were selected after undergoing each a proper clinical check up. Blood samples of 2ml were collected into tubes with EDTA on visits paid to those women regularly. These samples were used to carry out two Rapid Diagnostic Tests (RDT), thick smear as well as PCR.

Among the 650 participants, 20.62% (134/650) were carrying paludal infection detected by the CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo test against 15.69% (102/650) detected by the CareStart™ Malaria pLDH test. 14% (91/650) detected microscopically and 35.85% (233/650) by PCR.

The sensitivity and the specificity of the tests « CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo » and « CareStart™ Malaria pLDH 3 lines (PAN/Pf) were respectively 93.4% [95% IC 91.5-95.3] Vs 85.7% [95% IC 83-88.4] and 91.23% [95% IC 89.1-93.4] Vs 95.7% [95% IC 94.2-97.3]. Results of microscopy corrected by PCR showed following sensitivities and specificities: 96.37% [95% IC 93.3-99.5] Vs 89.47% [95% IC 83.8-95.1] and 99.8% [95% IC 99.4-100] Vs 100%.

The results showed that the CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo test and the CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf) test provided sensitivity and specificity acceptable to a certain extent. The use of the RDT tests coupled with microscopy might play an important role in the detection of malarial infection.

Keywords: Malaria; Rapid Diagnostic Tests; Pregnancy.

SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AMQ :	Amodiaquine
ART :	Artémisinine
ATV :	Atovaquone
CQ :	Chloroquine
CSPS :	Centre de Santé et de Promotion Sociale
CTA :	Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
DOX :	Doxycycline
dNTP :	Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates
FIND :	Foundation for Innovative New Diagnostics
HRP 2 :	Histidine Rich Protein 2
IRSS-DRO :	Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Direction Régionale de l'Ouest
MII :	Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide
MQ :	Méfloquine
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PCR :	Polymerase Chain Reaction
<i>Pfprt</i> :	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
<i>Pfdhfr</i> :	<i>P. falciparum</i> dihydrofolate reductase
<i>Pfdhps</i> :	<i>P. falciparum</i> dihydropteroate synthase
<i>Pfmdr1</i> :	<i>P. falciparum</i> multidrug resistance 1 protein
<i>Pfnhe-1</i> :	<i>P. falciparum</i> Na ⁺ /H ⁺ exchanger
pLDH :	Lactate déshydrogénase du <i>Plasmodium</i>
PNLP :	Programme National de Lutte contre le Paludisme
PRG :	Proguanil
PY :	Pyriméthamine
QN :	Quinine
SP :	Sulfadoxine Pyriméthamine
TDR :	Test de Diagnostic Rapide
TPI :	Traitement Préventif Intermittent
UNICEF :	United Nations International Children's Emergency Fund
UV :	Ultra Violet
VPN :	Valeur Prédictive Négative
VPP :	Valeur Prédictive Positive
WHO :	World Health Organization

I. INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire à transmission vectorielle. Un siècle après la découverte du rôle vecteur des moustiques dans la transmission du *Plasmodium*, le paludisme demeure la plus grande endémie parasitaire mondiale. L'incidence annuelle estimée du paludisme a réduit de 17 % depuis 2000 et les taux de mortalité ont diminué de 26 % (World Health Organization., 2011b). La maladie sévit sur le mode endémo-épidémique et son incidence dépend étroitement de l'écologie du vecteur et du niveau de développement (Malvy *et al.*, 2000).

Il existe plusieurs formes de paludisme mais on peut retenir : la forme simple et la forme grave. Les populations les plus à risque sont les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes (UNICEF/WHO., 2000). Le paludisme pendant la grossesse revêt un caractère grave car il comporte des risques non négligeables pour la mère, le fœtus et le nouveau-né. En effet, dans les zones où la transmission de *Plasmodium falciparum* est faible, les femmes, peu immunisées, sont exposées à des accès de paludisme grave pouvant entraîner soit la naissance d'un enfant mort-né, soit un avortement spontané ou soit le décès de la mère (Luxemburger *et al.*, 1997). Par contre, dans les zones de forte transmission de *P. falciparum*, les femmes ont généralement une immunité élevée et sont exposées à une infection asymptomatique qui peut entraîner une anémie maternelle et une parasitémie placentaire et par voie de conséquence, une insuffisance pondérale à la naissance (Steketee *et al.*, 1996).

L'organisation mondiale de la santé (OMS) recommande un ensemble d'interventions pour lutter contre le paludisme chez la femme enceinte dans les zones de transmission stable ou élevée de *P. falciparum* (World Health Organization. Regional Office for Africa., 2004) qui comprend l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII), un traitement préventif intermittent (TPI) et une bonne prise en charge des cas de paludisme et d'anémie.

La prise en charge efficace du paludisme requiert un diagnostic rapide et précis de la maladie. Un diagnostic de grande sensibilité est en particulier important pour les groupes de population les plus vulnérables dans les zones d'endémies, tandis qu'un diagnostic de spécificité élevée permet de réduire les recours inutiles aux traitements anti-palustres. L'utilisation des tests de diagnostic rapide dépistant des antigènes constitue un élément essentiel dans la stratégie de prise en charge tout en garantissant l'accès au diagnostic du paludisme dans les zones où la microscopie fait défaut. Ces dernières années, de nombreux tests rapides provenant de différents fabricants sont largement utilisés dans le diagnostic du paludisme. Cependant, l'insuffisance des essais comparatifs de terrain, la variation de la transmission et de

l'épidémiologie du paludisme limitent la quantité de données de qualité sur la performance de ces tests nécessaires pour une prise de décision adéquate en matière d'achat et de mise en œuvre de ces tests (WHO/World Bank/FIND., 2010).

L'objectif général de la présente étude c'est d'évaluer les performances des tests « CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo » et « CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf) » dans le diagnostic de l'infection palustre chez la femme enceinte à Bobo-Dioulasso.

Les objectifs spécifiques sont :

- Déterminer la sensibilité et la spécificité de « CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo » et de « CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf) ».
- Calculer les valeurs prédictives positives et négatives de « CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo » et de « CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf) ».
- Comparer les performances de « CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo » et « CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf) »

II. GENERALITES SUR LE PALUDISME

Le paludisme (malaria en anglais) est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium*, transmise par des moustiques du genre *Anopheles*. Cette maladie, surtout importante pour les populations vivant en zone d'endémie, l'est aussi pour les voyageurs.

II.1 Epidémiologie du paludisme

II.1.1 Le vecteur du paludisme

Le vecteur du paludisme est un moustique de la famille des *Culicidae*, de la sous-famille des *Anophelinae* et du genre *Anopheles*. Il existe environ 400 espèces d'*Anophèles* dont seulement une soixantaine sont capables de transmettre le paludisme (Harbach, 2004). En Afrique, *Anopheles gambiae*, *A. funestus* et *A. arabiensis* sont les vecteurs couramment rencontrés (Carnevale *et al.*, 1991). Seule la femelle, hématophage, transmet la maladie. Elle ne pique qu'à partir du coucher du soleil entre 19 heures et 7 heures (Ndiath *et al.*, 2011)

II.1.2 Les Parasites du paludisme humain

Le paludisme est causé par un parasite protozoaire appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa*, à l'ordre des *Haemosporida*, la famille des *Plasmodiidae* et au genre *Plasmodium*. Le genre *Plasmodium* se caractérise par une multiplication asexuée par schizogonie et par leur hôte appartenant à diverses espèces de Diptères.

II.1.2.1 Les principales espèces de Plasmodium

Environ 140 espèces de *Plasmodium* ont été décrites chez divers animaux mais chez les humains, le paludisme est essentiellement causé par 4 espèces. Récemment, *P. knowlesi* a été identifié comme étant la cinquième espèce responsable du paludisme chez les humains (Cox-Singh *et al.*, 2008). De toutes ces espèces, *P. falciparum* est la cause la plus commune des infections et est responsable d'environ 80 % de tous les cas de paludisme ainsi que 90 % des décès (Mendis *et al.*, 2001). Ainsi, les principales espèces de *Plasmodium* qui transmettent le paludisme à l'homme sont : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*.

- *Plasmodium falciparum* : découvert par Welch en 1897, il est largement représenté dans les zones tropicales et est responsable des formes cliniques graves. Dans les régions équatoriales, il est transmis toute l'année avec cependant des recrudescences

saisonniers et est à l'origine de la fièvre tierce maligne. Sa période d'incubation dure 7 à 12 jours.

- *Plasmodium vivax* : découvert par Grassi et Fetletti en 1890, il est rarement observé en zones tropicales et subtropicales (Afrique de l'Est, Amérique du centre et du Sud, Asie du Sud-Est, Proche et Moyen Orient). Les érythrocytes du groupe sanguin Duffy négatif (observé chez la majorité des sujets originaires d'Afrique de l'Ouest) ne possèdent pas le récepteur membranaire nécessaire à l'infection par *P. vivax*. Il est responsable de fièvre tierce bénigne. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours.
- *Plasmodium ovale* : découvert par Stephens en 1922, il sévit en Afrique intertropicale du Centre et de l'Ouest (et dans certaines régions du Pacifique) et provoque une fièvre tierce bénigne. Sa période d'incubation est de 15 jours au minimum mais peut-être beaucoup plus longue.
- *Plasmodium malariae* : Il sévit en Afrique, de manière beaucoup plus sporadique. Il se différencie des autres espèces par une incubation plus longue (15 à 21 jours) et par une périodicité différente de la fièvre (fièvre quarte bénigne). Il a été découvert par Alphonse Lavéran en 1880.
- *Plasmodium knowlesi* : décrit par Knowles en 1932, c'est un parasite des singes d'Asie. Il s'agit du cinquième agent du paludisme humain et son aspect sur frottis au microscope est identique à *P. malariae*. La réaction de polymérisation en chaîne «en anglais, polymerase chain reaction » ou PCR est la technique nécessaire pour les différencier (Singh *et al.*, 2004).

II.1.3 Cycle de reproduction du *Plasmodium*

Le cycle de reproduction du *Plasmodium* se déroule successivement en deux phases : une phase asexuée chez l'homme et une phase sexuée chez l'anophèle (Figure 1).

II.1.3.1 La phase de reproduction asexuée

Elle est initiée chez l'homme après l'inoculation des sporozoïtes suite à la pique de l'anophèle femelle. Elle se caractérise par une multiplication asexuée des parasites par schizogonie. On y distingue une schizogonie exo-érythrocytaire et une schizogonie endo-érythrocytaire.

i) Schizogonie exo-érythrocytaire ou schizogonie hépatique

Les sporozoïtes sont inoculés à l'homme par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin. Ces sporozoïtes restent dans le sang environ une demi-heure. Au cours de leur migration vers le foie, beaucoup de sporozoïtes sont détruits par les macrophages mais certains parviennent à gagner les cellules du foie. Chaque sporozoïte traverse activement deux hépatocytes, avant d'aller se loger au sein d'une vacuole parasitophore qu'il élabore lors de la pénétration du 3^{ème} hépatocyte (Prudencio *et al.*, 2006). Au sein de cette vacuole, les sporozoïtes se différencient en trophozoïtes puis en schizontes hépatiques, qui, au bout de 5 à 6 jours, libèrent dans la circulation sanguine jusqu'à 30 000 mérozoïtes selon l'espèce (Prudencio *et al.*, 2006). La schizogonie hépatique est unique dans le cycle car la cellule hépatique ne peut être infectée que par des sporozoïtes.

ii) Schizogonie érythrocytaire ou schizogonie sanguine

Très rapidement les mérozoïtes pénètrent dans les globules rouges. Une fois dans l'érythrocyte, le mérozoïte évolue successivement des stades trophozoïtes au stade schizonte entre 48 à 72 heures (en fonction de l'espèce). On assiste alors à la destruction des globules rouges de l'hôte suivie de l'éclatement des schizontes qui libèrent entre 8 et 32 nouveaux mérozoïtes suivant l'espèce. Ces mérozoïtes réinfectent de nouveaux globules rouges et débutent un nouveau cycle de réplication. La schizogonie érythrocytaire correspond à la phase clinique du paludisme : la parasitémie augmente, le sujet devient fébrile traduisant ainsi l'accès palustre. En l'absence de traitement, tous les parasites évoluent progressivement au même rythme. Les schizontes érythrocytaires arrivent à maturation au même moment, entraînant la destruction d'un grand nombre de globules rouges de manière périodique. La périodicité étant liée à l'espèce, on a : 24 heures (pour *P. knowlesi*) (Cox-Singh *et al.*, 2008), 48 heures (pour *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. ovale*) ou toutes les 72 heures (pour *P. malariae*). Après un ou plusieurs cycles érythrocytaires certains mérozoïtes, par un processus encore inconnu, se transforment en gamétocytes mâles et femelles.

Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, une schizogonie hépatique retardée (hypnozoïtes) peut entraîner la libération de mérozoïtes dans le sang plusieurs mois après la piqûre du moustique, expliquant ainsi les reviviscences tardives observées avec ces 2 espèces. Les hypnozoïtes n'existent pas dans l'infection à *P. falciparum* et ils n'ont pas été mis en évidence non plus dans l'infection à *P. malariae* (Dembélé *et al.*, 2011).

II.1.3.2 La phase de reproduction sexuée

Les gamétocytes mâles et femelles ingérés par le moustique lors de son repas sanguin fusionnent en un œuf libre et mobile appelé ookinète. Cet ookinète libre va ensuite traverser l'épithélium intestinal pour se loger au niveau de la lame basale. Au cours de cette migration, les ookinètes se différencient en oocystes (Aly *et al.*, 2009) qui par la suite vont libérer des sporozoïtes. Les sporozoïtes ainsi libérés vont se diriger vers les glandes salivaires du moustique qu'ils vont envahir avant d'être inoculés à un nouvel hôte. La durée du cycle chez *Anopheles spp.* est d'environ deux semaines et varie avec la température ambiante (Greenwood *et al.*, 2008).

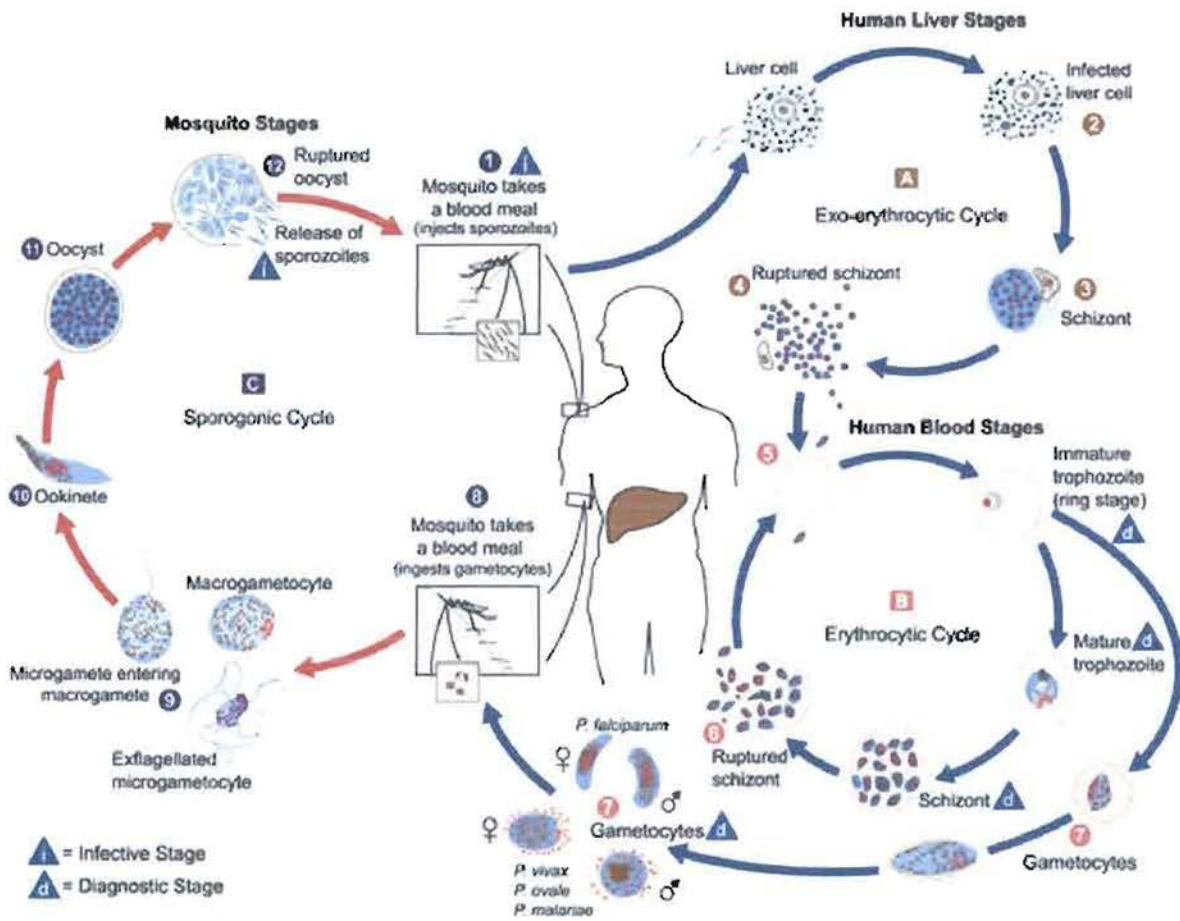


Figure 1: Cycle de reproduction du *Plasmodium*

Source : <http://dpd.cdc.gov/dpdx/btml/Malaria.htm> consulté le 13/08/2012

II.1.4 Ampleur du paludisme dans le monde

Le rapport mondial sur le paludisme de l'OMS estime à 216 millions le nombre de cas de paludisme survenus dans le monde entier avec 655 000 décès en 2010 (World Health Organization., 2011b). Les populations les plus concernées sont, pour la majorité, présentes

dans les zones tropicales et subtropicales (Figure 2), où la température et les pluies régulières favorisent la prolifération et l'expansion du vecteur. L'Afrique subsaharienne est la partie la plus touchée du continent africain. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes représentent la population la plus vulnérable en terme de mortalité et de morbidité (UNICEF/WHO., 2000).

A l'instar des autres pays d'Afrique au Sud du Sahara, le paludisme demeure au Burkina Faso un problème majeur de santé publique. Il reste une endémie stable dans tout le pays, avec une recrudescence saisonnière (Mai à Octobre) (PNLP, 2007). La maladie représentait, en 2010, 47,65% des motifs de consultations, 59,75% des motifs d'hospitalisation, 46,91% des causes de décès et 85,5% des décès chez les enfants de moins de cinq ans (PNLP, 2011).



En bleu foncé : Pays ou régions du monde où la transmission du paludisme est permanente.

En bleu clair : Pays ou régions du monde où le risque de transmission du paludisme est limité.

Figure 2: Répartition géographique du paludisme dans le monde en 2010 (World Health Organization., 2011b)

II.1.5 Les formes cliniques du paludisme

II.1.5.1 Les accès palustre simple

Le paludisme simple se définit comme un paludisme asymptomatique sans signes de gravité ni éléments d'appréciation (cliniques ou biologiques) permettant d'affirmer un dysfonctionnement des organes vitaux (World Health Organization., 2011a).

i) L'accès palustre de primo-invasion à *P. falciparum*

C'est la forme clinique chez un sujet neuf, non immunisé, comme les voyageurs. En zone d'endémie elle est observée chez les jeunes enfants.

L'incubation correspond à la durée de la phase hépatocytaire (7 à 12 jours) et est totalement asymptomatique.

L'invasion est marquée par l'apparition d'une fièvre brutale, continue, souvent accompagnée d'un malaise général avec des myalgies, des céphalées, et parfois des troubles digestifs (anorexie, douleurs abdominales, nausées, vomissements et même parfois une diarrhée).

Le malade peut, à tout moment et en quelques heures, évoluer de « l'accès simple » (c'est à dire non compliqué) vers un accès grave, d'évolution rapidement mortelle en l'absence d'une prise en charge adaptée.

ii) L'accès palustre à fièvre périodique

Cette forme clinique correspond à la description de la triade classique de l'accès palustre : « frissons, chaleur, sueurs » survenant tous les 2 ou 3 jours. En pratique elle n'est observée de manière typique que dans les infestations à *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*, faisant suite à un accès de primo-invasion non traité, mais pouvant survenir longtemps après l'épisode fébrile initial.

II.1.5.2 Le paludisme grave

Le paludisme à *P. falciparum* du sujet non immun (jeune enfant en zone d'endémie, femme enceinte, expatrié, voyageur) est potentiellement mortel. Le décès, quand il survient, est secondaire à la défaillance aiguë d'une ou de plusieurs grandes fonctions, et ce, parfois, même si la mise en place d'un traitement étiologique s'avère efficace. Un paludisme grave peut donc prendre différentes formes cliniques dont la plus importante est l'atteinte cérébrale encore appelée « neuropaludisme ».

La fièvre est le plus souvent très élevée. Lorsqu'il n'est pas traité, le neuropaludisme est mortel en deux ou trois jours. Ces accès graves non traités sont mortels, mais correctement traités la mortalité reste cependant élevée.

Le pronostic global repose essentiellement sur la rapidité du diagnostic de la maladie.

II.2 Diagnostic du paludisme

II.2.1 Diagnostic clinique

La reconnaissance des signes cliniques du paludisme demeure la méthode de diagnostic la plus utilisée dans les pays endémiques du paludisme. Les symptômes évocateurs du paludisme sont en général la fièvre, les tremblements intermittents, les douleurs articulaires, les nausées et vomissements. L'avantage du diagnostic clinique est de permettre une prise en charge rapide des personnes infectées. Cependant, un diagnostic posé uniquement sur la base de signes cliniques est d'une très faible spécificité et conduit à des excès thérapeutiques (World Health Organization., 2011a)

II.2.2 Diagnostic biologique

C'est le diagnostic de certitude de l'accès palustre. Il consiste à mettre en évidence la présence du parasite dans le sang. Le diagnostic biologique permet une meilleure prise en charge des patients en évitant l'administration inutile d'antipaludiques ; il permet de confirmer les échecs thérapeutiques (World Health Organization., 2011a).

II.2.2.1 L'examen microscopique

L'examen microscopique d'un frottis sanguin et d'une goutte épaisse demeure la technique de référence préconisée par l'OMS (World Health Organization., 2011a). Il permet de confirmer le diagnostic en identifiant l'espèce plasmodiale en cause et en évaluant la parasitémie. Le diagnostic par l'examen microscopique conditionne à la fois le pronostic et la conduite thérapeutique. C'est un examen peu coûteux et demeure la technique la plus utilisée (Siala *et al.*, 2010). Cependant, l'examen microscopique nécessite un temps de lecture relativement long. De plus, les performances de cet examen en terme de sensibilité et de fiabilité dépendent directement de l'expérience du microscopiste et du niveau de la parasitémie du sujet infecté (Makler *et al.*, 1998).

II.2.2.2 Les tests de diagnostic rapide immuno-chromatographiques

En l'absence de microscope ou de personnel médical formé au diagnostic microscopique du paludisme, il est possible d'utiliser des tests de diagnostic rapide (TDR) immuno-chromatographiques. Ces tests sont basés sur la détection des antigènes spécifiques de *Plasmodium* dans le sang à partir d'anticorps monoclonaux spécifiques (Kattenberg *et al.*, 2011). Les TDRs peuvent se présenter sous la forme d'une cassette ou d'une bandelette réactive et leur réalisation dure 15 à 20 minutes. Ils sont simples, rapides et n'exigent pas de compétences particulières. En revanche, leurs performances sont dépendantes de la parasitémie du sujet infecté. Les TDR doivent être considérés comme complémentaire des autres méthodes diagnostiques (Siala *et al.*, 2010).

Les conditions de conservation des TDRs sont importantes car elles déterminent leurs performances. Certains TDRs sont performants lorsqu'ils sont conservés à des températures comprises entre 4 et 30°C. D'autres par contre le sont pour des températures élevées (entre 35 et 45°C). De ce fait, il est recommandé de choisir des TDRs ayant une thermostabilité élevée (35°C et 45°C) pour une utilisation dans les zones très chaudes. Avant leur commercialisation, l'OMS recommande aussi que le choix d'un TDR soit opéré conformément à la série de critères suivants (WHO/World Bank/FIND., 2011):

- Avoir un score de détection de *P. falciparum* d'au moins 75% pour des densités parasitaires de 200parasites/ μ l ;
- Avoir un score de détection de *P. vivax* d'au moins 75% pour des densités parasitaires de 200parasites/ μ l ;
- Avoir un taux de faux positifs inférieur à 10% ;
- Avoir un taux de tests invalides inférieur à 5% ;
- Être facile à utiliser.

II.2.2.3 La réaction de polymérisation en chaîne (en anglais PCR)

La PCR (polymerase chain reaction) est une technique d'amplification *in vitro* qui permet à partir d'un fragment d'ADN, d'obtenir un grand nombre (plusieurs millions) de copies identiques de ce même fragment. Elle a été inventée en 1985 par le biochimiste américain Kary Mullis (Mullis *et al.*, 1986). La PCR est une technique très sensible pouvant détecter de très faibles parasitémies (de Monbrison *et al.*, 2003a). Elle est également d'un apport appréciable dans l'identification des espèces plasmodiales, le suivi post-thérapeutique et l'étude des gènes impliqués dans la résistance aux antipaludiques (de Monbrison *et al.*, 2003b). En dépit de ses avantages, la PCR ne peut pas être utilisée en routine. En effet, ses

exigences en matériel, son coût et sa durée de réalisation font d'elle une technique réservée aux laboratoires spécialisés.

II.3 La Lutte anti-palustre

La lutte anti-palustre nécessite une approche intégrée comprenant le traitement sans délai du malade au moyen d'antipaludéens efficaces et la prévention contre la maladie (World Health Organization., 2011a).

La stratégie mondiale comprend trois éléments qui permettront de combattre efficacement la maladie (World Health Organization., 2008). Ce sont: i) le contrôle du paludisme grâce aux outils existants, ii) l'élimination du paludisme et iii) la recherche de nouveaux outils et de nouvelles approches.

II.3.1 Traitement du paludisme

Après le diagnostic positif du paludisme, le patient doit être traité rapidement avec un médicament antipaludique sûr et efficace. Le traitement doit démarrer dans les 24 heures qui suivent l'apparition des symptômes, si l'on veut éviter une évolution vers des complications entraînant un taux de létalité élevé (World Health Organization., 2011a).

Il existe plusieurs familles d'antipaludiques et l'essentiel des médicaments actuels agit sur les formes endo-érythrocytaires de *P. falciparum* (Pradines *et al.*, 2010) qui est l'espèce développant le plus de résistance (World Health Organization., 2010).

Les règles actuelles de prise en charge du paludisme exposées dans ce document sont basées sur les recommandations de l'OMS publiées en 2011 (World Health Organization., 2011a).

II.3.1.1 Traitement du paludisme simple

i) Accès palustre simple à *P. falciparum*

Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) sont recommandées pour le traitement du paludisme simple à *P. falciparum*. L'artémisinine et ses dérivés ne doivent pas être utilisés en monothérapie et le choix de la CTA dans un pays est fonction du degré de résistance du parasite vis-à-vis du médicament associé. Les CTA recommandées sont: artéméter + luméfantrine, artésunate + amodiaquine, artésunate + méfloquine et artésunate + sulfadoxine-pyriméthamine (AS + SP).

ii) Accès palustre simple à *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae*

Le traitement du paludisme à *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae* peut être administré par voie orale avec la chloroquine. Cependant, pour les souches de *P. vivax* résistantes à la chloroquine, il est recommandé d'utiliser une CTA associée à la primaquine. Les CTA recommandées pour le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* peuvent aussi être utilisées pour le traitement des souches chloroquino-résistantes de *P. vivax*, à l'exception de l'association AS + SP qui n'est pas efficace contre le paludisme à *P. vivax* dans de nombreuses régions (World Health Organization., 2011a).

II.3.1.2 Traitement du paludisme grave à *P. falciparum*

Chez l'adulte et l'enfant: l'OMS recommande l'utilisation de l'artésunate ou de la quinine par voie intraveineuse ou intramusculaire. L'artéméther peut aussi être utilisé par voie intraveineuse.

Cependant, il a été démontré qu'en cas de paludisme grave, l'administration d'artésunate par voie intraveineuse réduisait sensiblement le risque de décès comparativement à l'administration intraveineuse de quinine (Dondorp *et al.*, 2010). L'artésunate présente un certain nombre d'avantages, d'un point de vue programmatique, par rapport à la quinine en ce sens qu'il ne nécessite pas de perfusion à débit contrôlé ni de surveillance de la fonction cardiaque.

Chez la femme enceinte: Des doses complètes d'antipaludéens doivent être administrées sans délai par voie parentérale aux femmes enceintes atteintes de paludisme grave. L'artésunate par voie parentérale est préféré à la quinine au cours des deuxième et troisième trimestres car la quinine comporte un risque d'hypoglycémie récurrente. Au premier trimestre, ce risque est moindre et l'incertitude au sujet de l'innocuité des dérivés de l'artémisinine plus grande.

II.3.2 La prévention du paludisme

Les méthodes utilisées pour la prévention du paludisme incluent la protection contre les piqûres de moustiques et la prophylaxie par la prise de médicaments (UNICEF/WHO., 2000).

La protection contre les piqûres de moustiques est essentielle dans la stratégie de lutte contre le paludisme. Elle permet d'éviter le contact homme-vecteur par l'utilisation des répulsifs, des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) et la pulvérisation intra domiciliaire

d'insecticides (World Health Organization. Roll Back Malaria Dept., 2005). En effet, pour que le paludisme puisse exister de façon continue dans une zone, il faut une combinaison de facteurs tels que la forte densité de population, le fort taux de transmission des humains aux moustiques et réciproquement (World Health Organization., 1958).

La prophylaxie par la prise de médicament est systématique chez tout sujet non immun se rendant en zone impaludée. Plusieurs antipaludiques sont recommandés en prophylaxie dans les zones de chloroquino-résistance et de poly-résistance. Ce sont par exemple, la méfloquine, l'association atovaquone-proguanil et la doxycycline (Pradines *et al.*, 2010)

En outre, la prophylaxie est nécessaire chez la femme enceinte vivant dans une zone à risque. La molécule préconisée dans ce cas est la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) qui est administrée sous la forme d'un traitement préventif intermittent (TPI) (PNLP, 2007; World Health Organization., 2007).

Avec l'évolution de l'épidémiologie du paludisme à *P. falciparum*, l'OMS recommande désormais la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS), auparavant appelée traitement préventif intermittent de l'enfant. Un traitement complet d'amodiaquine et de sulfadoxine-pyriméthamine (AQ+SP) doit être administré aux enfants âgés de 3 à 59 mois à intervalles réguliers d'un mois, en commençant au début de la saison de transmission et en donnant au maximum quatre doses pendant celle-ci (World Health Organization., 2012). La CPS est recommandée chez l'enfant de moins de 5 ans.

A l'heure actuelle, il n'y a pas de vaccin antipaludique commercialisé. Néanmoins, depuis une dizaine d'années, la recherche sur les vaccins a beaucoup progressé. Le vaccin RTS,S est de nos jours le candidat vaccin antipaludique le plus avancé en terme de développement clinique. Il a été le premier à démontrer que, dans les zones d'endémie palustre en Afrique, un vaccin pouvait contribuer à la protection des jeunes enfants et des nourrissons contre l'infection et la maladie provoquée par le *Plasmodium falciparum* (Agnandji *et al.*, 2012; Aponte *et al.*, 2007).

II.4 Résistance de *P. falciparum* aux antipaludéens

La résistance dont fait preuve *P. falciparum* est particulièrement inquiétante d'une part en raison de la charge de morbidité considérable qui lui est imputable, de la mortalité qu'elle peut engendrer et de sa propension aux épidémies. D'autre part, la résistance de cette espèce est préoccupante à cause du coût des médicaments de remplacement à envisager pour les régions où la pharmaco-résistance est bien établie (World Health Organization., 2011a).

Depuis 2006, la plupart des pays où cette espèce est endémique ont progressivement actualisé leur politique de traitement, abandonnant ainsi l'utilisation de la chloroquine (CQ) et de la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) qui sont en situation d'échec (World Health Organization., 2011a). Les résistances ont émergé contre la majorité des antipaludiques utilisés dans les zones endémiques (Pradines *et al.*, 2010). La méthode de référence de diagnostic et de surveillance des résistances est le test *in vivo* (Ringwald *et al.*, 2005). Il existe aussi des tests *in vitro* réalisés sur des cultures de parasites et des tests moléculaires. Les tests moléculaires sont des méthodes de génotypage permettant d'identifier les marqueurs moléculaires de résistance. Un certain nombre de gènes impliqués ou potentiellement impliqués (Tableau I) dans la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques ont été identifiés (World Health Organization., 2010).

Tableau I : Marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum*

Médicament	Marqueurs de résistance	
	Gène mutant	Allèles associés à la résistance ou à la diminution de la sensibilité
Pyriméthamine	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Asn, Asn51Ile, Cys59Arg et Ile164Leu
Sulfadoxine	<i>Pfdhps</i>	Ser436Ala/Phe, Ala437Gly, Lys540Glu, Ala581Gly et Ala613Thr/Ser
Chloroquine	<i>Pfcr1</i>	Lys76Thr
	<i>Pfmdr1</i>	Asn86Tyr
Mefloquine	<i>Pfmdr1</i>	Nombre de copie > 1
Quinine	<i>Pfnhe-1</i>	Asn86Tyr, Ser1034Cys, Asn1042Asp and Asp1246Tyr
Artémisinine	<i>Pfserca</i>	Ser769Asn

II.5 Immunité anti-palustre

II.5.1 L'immunité innée

Contrairement aux personnes souffrant de paludisme aggravé, certains individus sont moins sensibles à l'infection. Cela peut s'expliquer par : i) la présence de certaines anomalies génétiques altérant le développement du parasite dans l'érythrocyte (hémoglobinopathies et

déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase) ; ii) l'absence de molécule à la surface du globule rouge (GR) indispensable à la pénétration du parasite, telle que la molécule du groupe Duffy pour *P. vivax* (Kempinska-Podhorodecka *et al.*, 2012). Un des cas très connu est celui des personnes drépanocytaires présentant une hémoglobine AS. Ce type d'hémoglobine anormal est trouvé essentiellement chez les populations vivant en zone impaludée. La forme anormale des GR falciformes et l'hypoxie qui en résulte semblent gêner fortement le développement du parasite (Gong *et al.*, 2012).

II.5.2 L'immunité acquise

Après plusieurs années d'infections répétées, l'hôte du *Plasmodium* peut acquérir une immunité appelée prémunition. Elle se crée en 2 temps : i) acquisition d'une immunité clinique qui protège contre les symptômes de la maladie sans diminuer fortement la parasitémie (la tolérance) ; ii) acquisition d'une immunité antiparasite qui maintient la parasitémie à un faible niveau permettant le portage asymptomatique (Rolfes *et al.*, 2012).

III. MATERIELS ET METHODES

III.1 Type d'étude

Il s'agit d'une étude longitudinale non randomisée de femmes enceintes vivant en zone périurbaine.

III.2 Site, période et population d'étude

L'étude a été conduite au Centre de Santé et de Promotion Sociale (CSPS) de Colsama dans le district sanitaire de Do, en zone urbaine de Bobo-Dioulasso de Novembre 2010 à Février 2012.

Les participantes à cette étude sont des femmes enceintes se présentant pour des consultations prénatales au CSPS de Colsama au cours de leur deuxième et/ou troisième trimestre de grossesse.

III.3 Critères d'inclusion

Les critères spécifiques de sélection des participantes dans l'étude ont été les suivants :

- Se présenter pour une consultation prénatale au cours du deuxième ou troisième trimestre de la grossesse ;
- Etre dans la tranche d'âge de 16 à 44 ans ;
- Ne pas être allergique aux sulfamides ;
- Ne pas être allergique aux médicaments à base d'artémisinine ;
- Ne pas être porteuse du VIH ;
- Ne pas avoir d'antécédents obstétricaux ou de complications obstétricales courantes ;
- Ne pas avoir de maladies chroniques (diabète sucré, anémie falciforme) ;
- Provision de consentement éclairé signé en présence d'un témoin
- Avoir un taux d'hémoglobine ≥ 7 g/dl.

III.4 Activités au laboratoire

III.4.1 Collecte du matériel biologique

A l'inclusion et à toutes les visites ultérieures (visites subséquentes), toutes les participantes ont bénéficié d'un prélèvement de deux millilitres (2 ml) de sang veineux dans un tube EDTA

(Ethylène diamine tétraacétique) pour les réalisations de deux TDRs (sur le terrain), de la goutte épaisse/ frottis mince et de la PCR.

A l'accouchement, un prélèvement de 2 ml de sang placentaire ainsi qu'un morceau de placenta ont été également collectés pour le diagnostic de l'infection palustre respectivement par les examens ci-dessus cités et par l'histologie.

Tous les prélèvements de sang ont été centrifugés et les culots étaient conservés à -20 °C.

Pour cette étude, nous avons pris en compte seulement les prélèvements à l'inclusion.

III.4.2 Diagnostic de l'infection palustre par les tests CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo et CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf).

Les tests Carestart™ Malaria utilisés pour l'étude sont fabriqués par la firme « Access Bio, Inc » et ont un prix d'achat inférieur à 1 dollar.

III.4.2.1 Principe des tests

Le test « CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo » contient une bande membranaire pré-revêtue par deux anticorps monoclonaux. Un anticorps monoclonal (ligne de test 2) spécifique au lactate déshydrogénase des espèces de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale*) et l'autre anticorps (ligne de test 1) spécifique à la protéine riche en histidine « Histidine rich protein 2 » (HRP2) de l'espèce *P. falciparum*.

Le test «CareStart™ Malaria pLDH » permet la détection exclusive du lactate déshydrogénase. En effet, ce test contient un anticorps monoclonal (ligne de test 1) spécifique au lactate déshydrogénase de *P. falciparum* et un autre anticorps monoclonal (ligne de test 2) spécifique au lactate déshydrogénase des espèces de *P. falciparum*, *P.vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*.

Dans chaque kit de TDR, on trouve des micropipettes et une solution tampon qui servent à la réalisation des tests.

La solution tampon conjuguée permet aux antigènes de se fixer aux anticorps monoclonaux qui leurs sont spécifiques. La formation du complexe Anticorps - Antigène se traduit par l'apparition d'un trait rouge au niveau de la ligne de test 1 et/ou 2 de chaque TDR. Les deux TDRs (Figure 3) sont capables de donner un diagnostic positif fiable sur des échantillons de sang ayant des parasitémies faibles de l'ordre de 200 parasites/ μ l (WHO/World Bank/FIND., 2010). Du fait que la performance de chaque produit est susceptible de varier d'un lot à l'autre au fil du temps, l'OMS recommande que tous les lots de production de TDR soient contrôlés, que ce soit avant ou après l'expédition, par le canal d'un centre de contrôle

travaillant en collaboration avec le Programme OMS/FIND d'évaluation des tests de diagnostic rapide du paludisme (WHO/World Bank/FIND., 2011).



Figure 3: Photo des tests de diagnostic rapide utilisés

Source : IRSS/DRO

III.4.2.2 Procédure de réalisation des Tests

La réalisation des TDRs est facile et ne demande pas de qualification particulière. A partir du sang collecté dans les tubes EDTA, un prélèvement de 5µl de sang est effectué et introduit dans le puits dédié à l'échantillon sanguin. Puis, deux 2 gouttes de la solution tampon sont ajoutées dans le puits correspondant. La lecture et l'interprétation sont réalisées 20 minutes après.

III.4.2.3 Interprétation des résultats

Les résultats des TDRs ont été interprétés en fonction de l'apparition ou non d'une bande colorée (rouge) indiquant la validité du test ou la formation du complexe anticorps-antigène (Figure 4). Ainsi :

- La présence d'une seule bande colorée au niveau de la zone de contrôle indique un résultat négatif pour l'antigène correspondant.
- Le test est invalide si la bande de contrôle n'apparaît pas dans la fenêtre des résultats. Dans ce cas, l'examen est répété en utilisant un nouveau test.

- La présence de deux bandes colorées (contrôle et zone « 1 ») indique un résultat positif à *Plasmodium falciparum*.
- La présence de deux bandes colorées (une bande au niveau de la zone de contrôle et une bande au niveau de la zone « 2 ») indique un résultat positif pour *P. vivax*, *P. malariae* ou *P. ovale*.
- La présence de trois bandes colorées (contrôle, zone « 1 », « 2 ») indique un résultat positif à *P. Falciparum* ou une infection mixte à *P. falciparum* et autres espèces.

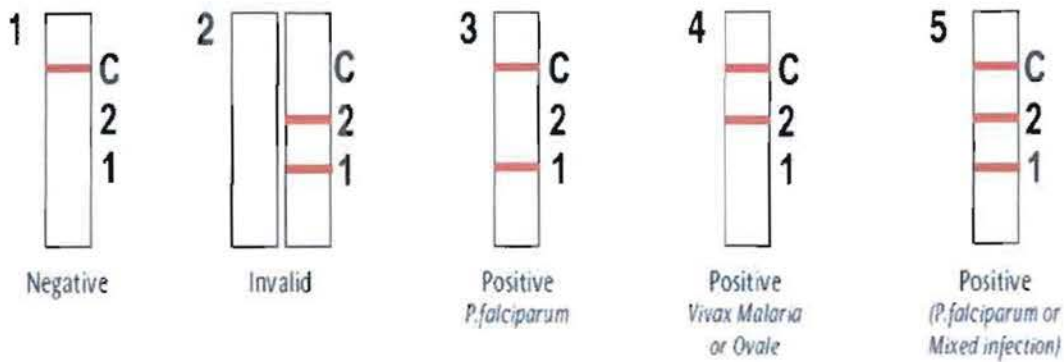


Figure 4 : Interprétation des résultats des tests (Carestart™ Malaria RPYDTEST., 2009)

III.4.3 Diagnostic de l'infection palustre par la goutte épaisse/frottis mince

La goutte épaisse est réalisée à partir d'une goutte de sang que l'on dépose sur une lame porte objet. Ensuite, à l'aide du coin d'une autre lame, on étale la goutte de sang par des mouvements concentriques sur une surface d'environ un centimètre (1cm) puis séchée.

Le frottis sanguin est réalisé sur la même lame que la goutte épaisse. Une petite goutte de sang est déposée près de la goutte épaisse et étalée sur la partie restante de la lame grâce à l'extrémité d'une autre lame inclinée d'un angle de 45°. Le mouvement d'étalement doit être rapide, régulier, sans trop appuyer, en maintenant la même inclinaison. Contrairement à la goutte épaisse, le frottis est fixé avec du méthanol avant d'être coloré. La coloration des 2 étalements se fait au Giemsa 3% pendant 30 minutes.

La goutte épaisse est évaluée en fonction de la présence des formes asexuées et sexuées du parasite. Les densités parasitaires ont été calculées en comptant le nombre de formes asexuées du parasite pour 200 leucocytes (ou pour 500 leucocytes, si le compte est inférieur à 10 parasites asexués pour 200 leucocytes), sur la base d'un nombre de leucocytes de 8.000/μl de

sang. La goutte épaisse est considérée négative lorsque l'examen de 100 champs microscopiques ne révélait pas la présence de formes asexuées ou gamétocytaires du parasite. Lorsqu'une goutte épaisse est positive, le frottis sanguin correspondant est utilisé pour l'identification de l'espèce du parasite.

III.4.4 Diagnostic de l'infection palustre par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR permet d'obtenir par répllication *in vitro* de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait. Dans notre étude, nous avons utilisé la technique de la « PCR nichée ». Elle consistait à amplifier l'ADN en 2 étapes (PCR 1 et PCR 2) avec des couples d'amorces différents (Tableau III). Les amorces ont été synthétisées sur la base de l'ARN de la petite sous unité ribosomale 18 S du *Plasmodium*.

III.4.4.1 Extraction de l'ADN du *Plasmodium*

L'ADN du parasite a été extrait à partir des culots de sang veineux à l'aide du « Kit Qiagen DNA Mini and Blood ». De façon brève, l'ADN est extrait après hémolyse des globules rouges puis purifié après plusieurs étapes de filtration (Annexe 1).

III.4.4.2 Amplification des séquences spécifiques d'ADN par la PCR « nichée »

L'amplification des extraits d'ADN est réalisée dans un mélange réactionnel (Mix) préparé dans une salle spéciale dépourvue d'ADN appelée « salle des mix ». Après avoir préparé la surface de travail, les plaques de PCR à utiliser sont numérotées et déposées sur la glace. Les volumes individuels des réactifs qui entrent dans la composition du « mix » sont calculés et multipliés au nombre total d'échantillons à amplifier.

Le « mix » est préparé sur de la glace pilée dans un réservoir à multicanaux conformément au Tableau II ci-dessous. Les volumes des réactifs requis sont successivement ajoutés dans l'ordre : eau distillée, amorces, tampon, dNTP, MgCl₂, Taq polymérase en utilisant pour chaque réactif un cône différent. Un volume de 23 µl de « mix » est ensuite distribué dans chaque puits de la plaque. Enfin, dans la « salle PCR », 2 µl d'ADN de chaque échantillon sont ajoutés dans les puits correspondant. La plaque est par la suite incubée dans un des thermocyclers (« eppendorf Mastercycler gradient » et « S1000™ Thermal cycler ») (Figure 5) pour l'amplification suivant un programme spécifique (Tableau III). Après la réalisation de la PCR 1 et la préparation du « mix » de la PCR 2, 2 µl du produit de PCR 1 sont ajoutés au

« mix » de la PCR 2. Le mélange est ensuite amplifié dans un thermocycler suivant le programme spécifique à la PCR 2.

Notons que pour chaque réaction PCR, nous avons ajouté un contrôle positif (ADN de *P. falciparum*) et un contrôle négatif (eau).

Tableau II : Tableau récapitulatif du mélange de la réaction PCR

Réactifs et Solvants	Concentration du stock	Concentration finale	Volume pour une réaction (µl)
H ₂ O	-	-	12,8
Primer 1 ^a	10µM	0,25µM	0,5
Primer 2 ^b	10µM	0,25µM	0,5
Buffer	5x	1x	5
dNTP	2mM	200µM	2,5
MgCl ₂	25mM	4mM	1,5
Taq Polymerase	5U/µl	1,25Unit	0,2
ADN	-	-	2
Volume final	-	-	25

a= rPLU1 pour PCR1 et rPLU 3 pour PCR2

b=rPLU 5 pour PCR1 et rPLU4 pour PCR 2



Figure 5 : Photo des thermocyclers utilisés

Source : IRSS/DRO

Tableau III : Tableau récapitulatif des séquences d'amorces et des programmes d'amplification

Étapes de la PCR	Couple d'amorces	Séquences des amorces 5'-.....-3'	Programme d'amplification
PCR 1	rPLU1	5'-TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA-3'	<u>Dénaturation initiale</u> : 94°C x 4 min <u>PCR</u> : 35 cycles 94°C x 30 sec, 55°C x 1 min, 72°C x 1 min <u>Elongation finale</u> : 72°C x 4 min
	rPLU5	5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC-3'	
PCR 2	rPLU3	5'-TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT-3'	<u>Dénaturation initiale</u> : 94°C x 4 min <u>PCR</u> : 35 cycles 94°C x 30 sec, 62°C x 1 min, 72°C x 1 min <u>Elongation finale</u> : 72°C x 4 min
	rPLU4	5'-TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC-3'	

III.4.4.3 Révélation et interprétation des résultats

Tous les produits de PCR 2 ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2,5% contenant du Bromure d'éthidium (BET). Le protocole permettant la préparation du gel est décrit en Annexe 2. L'électrophorèse dure 45min-1h30min (en fonction de la taille attendue) et sa réalisation est détaillée en Annexe 3.

Les résultats sont interprétés à partir de la photo du gel (Figure 6) prise avec un système de révélation aux UV (« VILBER LOURMAT » équipé d'un écran « Rainbow CCTV RMB92 »). En effet, le BET se fixe spécifiquement à l'ADN et émet une fluorescence sous illumination aux rayons ultra-violet (UV). La présence de l'ADN se traduit alors par l'apparition d'une bande sur la photo du gel. La réaction est validée lorsque le contrôle négatif était négatif et le contrôle positif apparaissait à 240 paires de bases. Un échantillon est positif lorsque la bande apparaissait à la même taille que le contrôle positif.

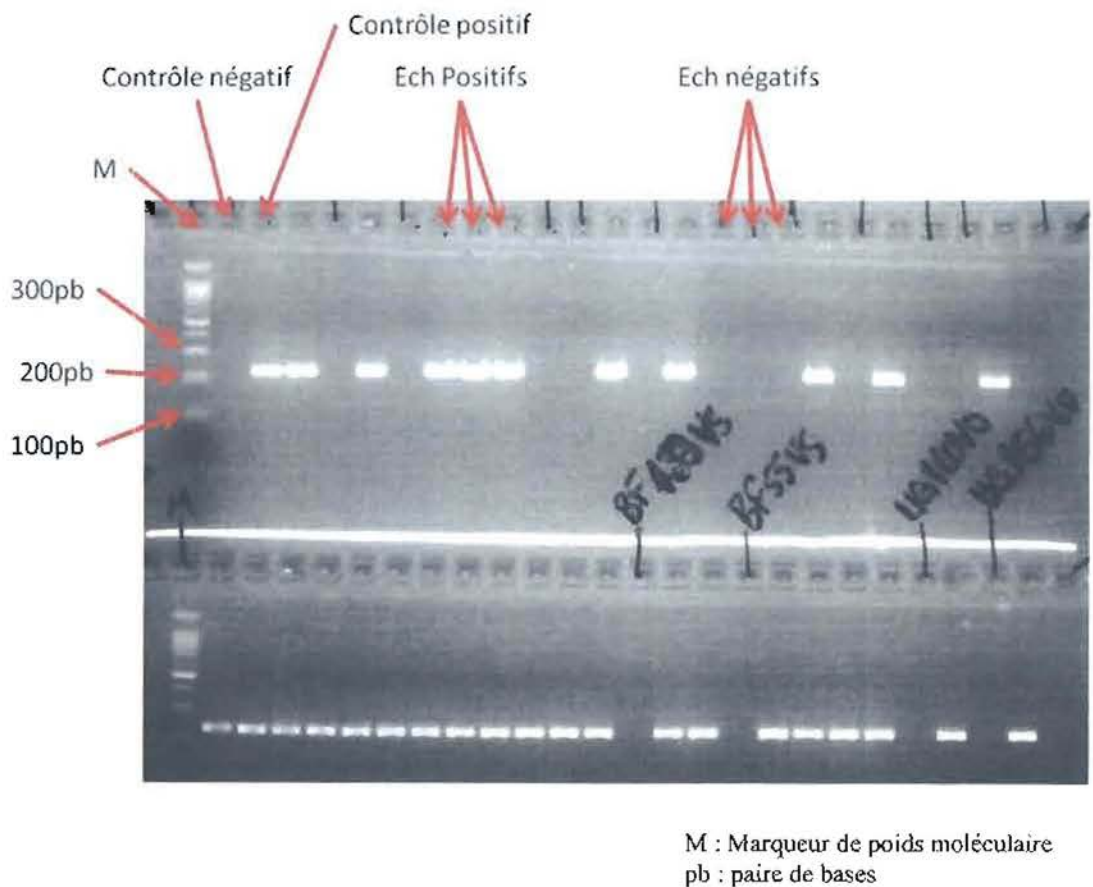


Figure 6: Photo d'un gel montrant les bandes d'ADN après révélation aux UV

Source : IRSS/DRO

III.5. Analyse statistique des données

La taille de l'échantillon de l'étude a été calculée pour tester l'hypothèse $H_0: [VPP \leq (\text{prévalence de malade} + \alpha) \text{ ou } VPN \leq (1 - \text{prévalence de malade})]$ avec une puissance de 80%, un degré de signification de 5% et $\alpha = 0,4$. Nous avons estimé que les exigences statistiques de l'étude pouvaient être satisfaites par l'inclusion de 860 femmes. Cette estimation suppose une marge de perte de 15% durant le suivi.

Les données ont été saisies sur le logiciel Microsoft office Excel 2007 et analysées avec le logiciel Stata/SE 11.0. Le test du Chi carré (χ^2) a été utilisé pour la comparaison des prévalences à l'infection obtenues par les différentes méthodes d'analyse. Le seuil de signification statistique a été fixé à $p < 0,05$.

Les performances des TDRs ont été évaluées à partir la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positives et négatives.

- La sensibilité d'un test est la probabilité que le test soit positif si la personne est atteinte de la maladie. Elle est exprimée en proportion (ou en %) des personnes atteintes de la maladie.

- La spécificité d'un test est la probabilité que le test soit négatif si la personne testée est indemne de la maladie. Elle est exprimée en proportion (ou en %) des personnes indemnes de la maladie.

- La VPP est la probabilité que la personne soit réellement malade si son test est positif. Elle exprime la proportion des personnes atteintes de la maladie parmi ceux ayant un test positif.

- La VPN est la probabilité que la personne n'ait pas la maladie si son test est négatif. Elle exprime la proportion des personnes indemnes de la maladie parmi ceux ayant un test négatif.

Ces paramètres ont été calculés suivant les méthodes publiées (Delacour *et al.*, 2005) en considérant les résultats de la microscopie comme référence. Chaque résultat de TDR a été classé comme vrai-positif, vrai-négatif, faux-positif et faux-négatif.

Le tableau « IV » illustre le calcul ces différentes valeurs.

Tableau IV : Détermination des indicateurs de performance

		Microscopie		Total
		Positif	Négatif	
Test	Positif	a vrai positif	b faux positif	a + b total tests positifs
	Négatif	c faux négatif	d vrai négatif	c + d total tests négatifs
Total		a + c total malades	b + d total non malades	a + b + c + d effectif total

Sensibilité = $a/(a+c)$; VPP = $a/(a+b)$.

spécificité = $d/(b+d)$; VPN = $d/(c+d)$.

IV. RESULTATS

IV.1 Profil de l'étude

Au total 664 femmes ont bénéficié des examens cliniques dont 650 incluses dans l'étude et 14 non incluses. La moyenne d'âge des participantes était de 24,85 ($\pm 5,77$). Au cours du suivi, nous avons observé 95 perdues de vue et 555 femmes incluses (85,38%) ont été suivies jusqu'à l'accouchement (Figure 7).

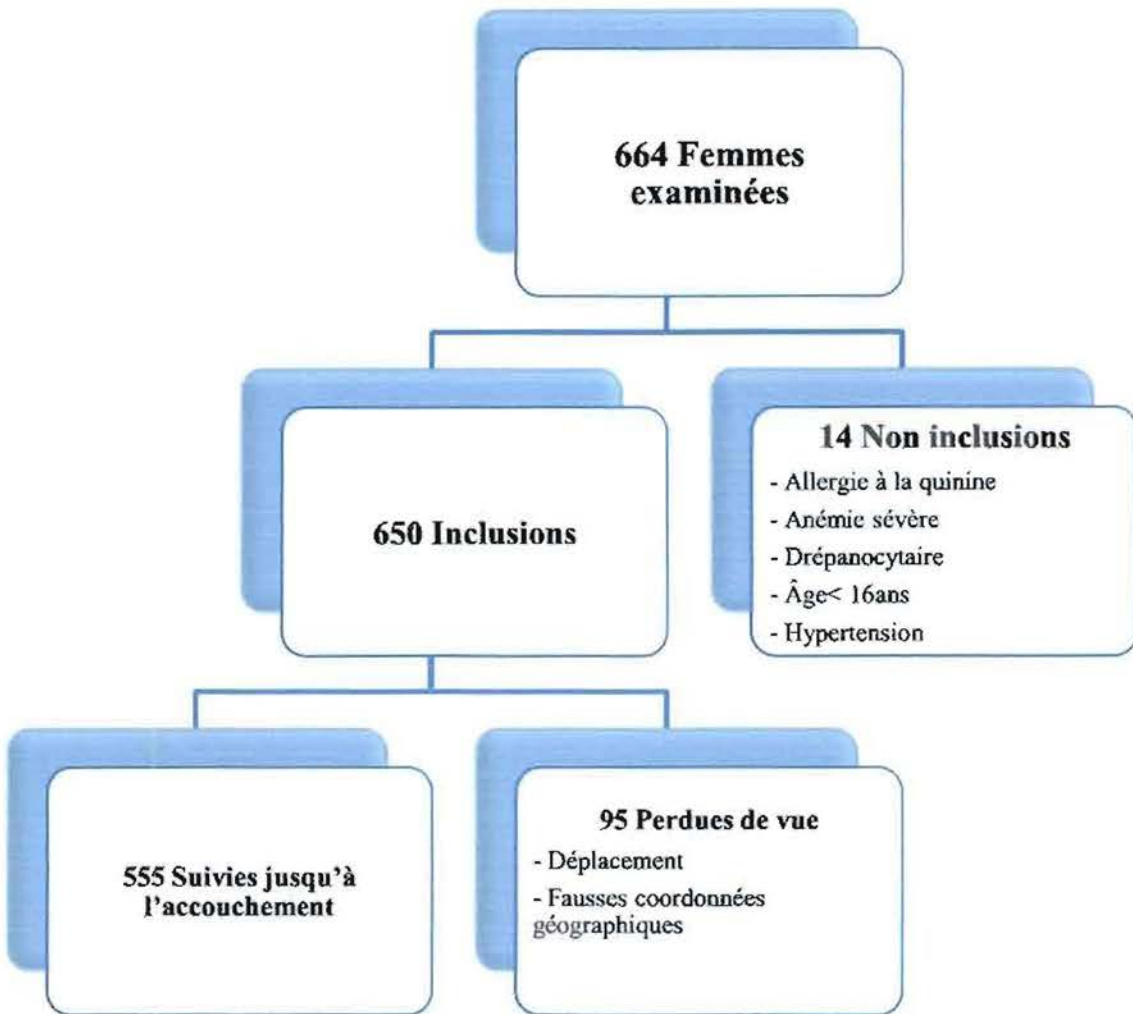


Figure 7 : Profil de l'étude

IV.2 Prévalence de l'infection palustre à l'inclusion

Parmi les 650 participantes à l'inclusion, 20,62% (134/650) avaient une infection palustre détectée par le test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo contre 15,69% (102/650) par le

test CareStart™ Malaria pLDH, 14% (91/650) par la microscopie et 35,85% (233/650) par la PCR (Figure 8). La différence entre les prévalences obtenues par les différents tests est statistiquement significative ($p = 0,001$). Cette différence signifie que les tests d'analyses que nous avons utilisées ont des résultats propres à chacun d'entre eux.

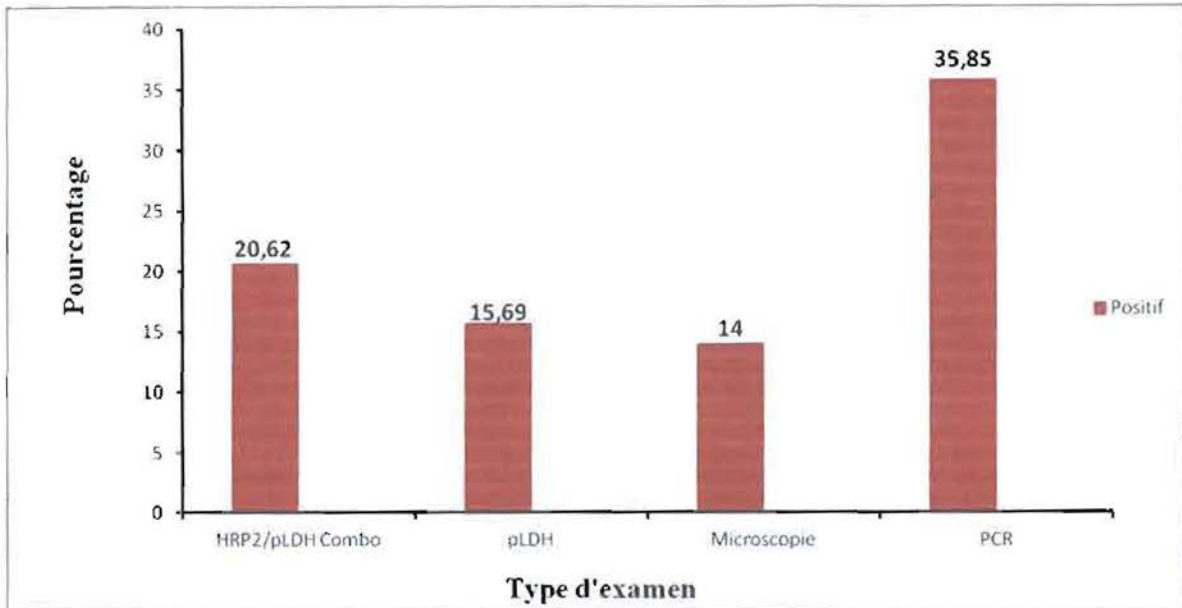


Figure 8: Prévalences de l'infection palustre obtenues à l'inclusion en fonction des types d'examen utilisés.

IV.3 Performance du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo à l'inclusion.

IV.3.1 Sensibilité et spécificité du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo.

La concordance entre la goutte épaisse et le test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo est de 63,43% et de 98,83% respectivement pour les vrais positifs et les vrais négatifs (Tableau V).

Le tableau V indique que la sensibilité et la spécificité du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo étaient respectivement de 93,4% [IC 95% 88,3-98,5] et de 91,2% [IC 95% 88,9-93,6].

En considérant les résultats de la PCR comme référence, la sensibilité et la spécificité du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo étaient respectivement de 96,37% [IC 95% 93,3-99,5] et 99,8% [IC 95% 99,4-100].

Tableau V : Validité du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo dans le diagnostic de l'infection palustre en comparaison avec la goutte épaisse.

		Microscopie		Total
		Positif	Négatif	
HRP2/pLDH Combo	Positif (%)	85 (63,43)	49 (36,57)	134
	Négatif (%)	6 (1,16)	510 (98,83)	516
Total		91 (14)	559 (86)	650

IV.3.2 Valeur prédictive positive et négative du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo

La valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN) du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo étaient respectivement de 63,4% [IC 95% 55,3-71,6] et 98,8% [IC 95% 97,9-99,7].

La VPP et la VPN du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo enregistrées après correction des résultats de la microscopie par la PCR sont respectivement 99,25% [IC 95% 97,8-100] et 99,03% [IC 95% 98,2-99,8].

IV.4 Performance du test CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf) à l'inclusion.

IV.4.1 Sensibilité et spécificité du test CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf).

La concordance entre la goutte épaisse et le test CareStart™ Malaria pLDH est de 76,47% et de 97,63% respectivement pour les vrais positifs et les vrais négatifs (Tableau VI).

Le tableau VI indique que la sensibilité et la spécificité du test CareStart™ Malaria pLDH sont respectivement de 85,7% [IC 95% 78,5-92,9] et 95,7% [IC 95% 94-97,4].

Après correction des résultats de la microscopie par la PCR, la sensibilité et la spécificité du test CareStart™ Malaria pLDH étaient respectivement de 89,47% [IC 95% 83,8-95,1] et 100%.

Tableau VI : Validité du test CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf) dans le diagnostic de l'infection palustre en comparaison avec la goutte épaisse.

		Microscopie		Total
		Positif	Négatif	
pLDH	Positif (%)	78 (76,47)	24 (23,53)	102
	Négatif (%)	13 (2,37)	535 (97,63)	548
Total		91 (14)	559 (86)	650

IV.4.2 Valeur prédictive positive et négative du test CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf).

Les VPP et VPN du test CareStart™ Malaria pLDH sont respectivement de 76,5% [IC 95% 68,2-84,7] et 97,6% [IC 95% 96,3-98,9].

La VPP et la VPN du test CareStart™ Malaria pLDH enregistrées après correction des résultats de la microscopie par la PCR sont respectivement 100% et 97,81% [IC 95% 96,6-99].

IV.5 Comparaison de la performance des tests CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) et CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf)

La comparaison des performances (tableau VII) du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo à ceux du test CareStart™ Malaria pLDH nous a permis de noter que :

1. La sensibilité du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo est relativement supérieure à celle de CareStart™ Malaria pLDH mais la différence statistique n'est pas significative.
2. La spécificité du test du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo est significativement inférieure à celle de CareStart™ Malaria pLDH.

3. La VPP du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo est significativement inférieure à celle de CareStart™ Malaria pLDH.
4. La VPN du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo est relativement supérieure à celle de CareStart™ Malaria pLDH mais la différence statistique n'est pas significative.

Après correction des résultats de la microscopie par la PCR la sensibilité du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo reste significativement supérieure à celle de CareStart™ Malaria pLDH ($p = 0,03$) avec respectivement une VPP de 99,25% et 100%. Les spécificités des deux tests sont aussi sensiblement identiques (99,8% pour CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo et 100% pour CareStart™ Malaria pLDH avec respectivement des VPN de 99,03% et 97,81% (Tableau VIII).

Tableau VII : Performances comparées des tests de diagnostic rapide

TDR	Sensibilité % (IC 95%)	Spécificité % (IC 95%)	VPP % (IC 95%)	VPN % (IC 95%)
HRP2/pLDH Combo	93,4 (88,3-98,5)	91,2 (88,9-93,6)	63,4 (55,3-71,6)	98,8 (97,9-99,7)
pLDH	85,7 (78,5-92,9)	95,7 (94-97,4)	76,5 (68,2-84,7)	97,6 (96,3-98,9)
<i>p</i>	<i>0,09</i>	<i>0,002</i>	<i>0,03</i>	<i>0,1</i>

Il ressort du tableau VII que le test CareStart™ Malaria pLDH est plus spécifique ($p = 0,002$) avec une VPP significativement supérieure à celle du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo ($p = 0,03$).

Tableau VIII: Performances comparées des tests de diagnostic rapide après correction à la PCR

TDR	Sensibilité % (IC 95%)	Spécificité % (IC 95%)	VPP % (IC 95%)	VPN % (IC 95%)
HRP2/pLDH Combo	96,37 (93,3-99,5)	99,8 (99,4-100)	99,25 (97,8-100)	99,03 (98,2-99,8)
pLDH	89,47 (83,8-95,1)	100 -	100 -	97,81 (96,6-99)
<i>p</i>	<i>0,03</i>	<i>0,3</i>	<i>0,3</i>	<i>0,1</i>

V. DISCUSSION

V.1 De la prévalence de l'infection palustre à l'inclusion

Le paludisme chez la femme enceinte est un problème de santé publique dans les pays d'endémie palustre et est associé aux risques de faible poids à la naissance, à l'anémie maternelle (Nosten *et al.*, 1999; Tiono *et al.*, 2009; Valea *et al.*, 2012) et à la mortalité périnatale (Adebami *et al.*, 2007). Les fortes prévalences de l'infection palustre enregistrées dans cette étude respectivement par la microscopie, les TDRs et la PCR pourraient s'expliquer par le fait que la population d'étude vit dans une zone de transmission stable du paludisme. La technique de PCR demeure la plus sensible avec 35,85% de diagnostics positifs contre respectivement 20,62%, 15,69 % et 14% pour les tests CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo, CareStart™ Malaria pLDH et la microscopie. Les fortes prévalences observées pourraient également s'expliquer par la baisse de l'immunité pendant la grossesse (Shulman *et Dorman*, 2003). En effet, au cours de la grossesse, il se produit une immunosuppression physiologique induite par les hormones et les protéines associées à la grossesse. Cette régulation est considérée par certains comme un ajustement nécessaire au maintien du fœtus qui est antigéniquement différent de la future mère (Raghupathy, 1997) et serait de ce fait comme un corps étranger. L'état de dépression immune générale affecte l'ensemble des mécanismes spécifiques (pour maintenir la grossesse) et non spécifiques, qui entraînent une augmentation du risque à plusieurs infections, dont le paludisme.

V.2 Des performances des tests de diagnostic rapide

L'évaluation des tests de diagnostic rapide est une étape nécessaire avant leur implémentation dans les systèmes de santé. La présente étude a évalué les performances des tests CareStart™ Malaria HRP2/pLDH et CareStart™ Malaria pLDH dans la détection de l'infection palustre (*Plasmodium sp*) chez la femme enceinte. Dans l'ensemble, les conditions de réalisation des deux tests étaient faciles et les résultats obtenus reproductibles. La microscopie a été considérée comme technique de référence et de ce fait, nous lui avons attribuée une sensibilité et une spécificité de 100% malgré les variations des résultats dues aux lecteurs, et/ou à la densité parasitaire.

V.2.1 De la performance de CareStart™ Malaria HRP2/pLDH (PAN/Pf) Combo

La sensibilité et la spécificité du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo dans cette étude sont respectivement de 93,4% et 91,2% pour des densités parasitaires de la population comprises entre 14 et 96979 parasites/ul. Après double lecture à la microscopie 36,57% (49/134) des échantillons positifs au test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo ont été révélés négatifs alors que seulement 6/516 (1,16%) des échantillons négatifs au test ont été révélés positifs à la microscopie.

La performance du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo obtenue dans cette étude est légèrement inférieure à celle obtenue par l'OMS en collaboration avec FIND (WHO/World Bank/FIND., 2010). Dans cette évaluation, les sensibilités du test à détecter *P. falciparum* et *P. vivax* à une densité parasitaire de 200/ul étaient respectivement de 97,5% et 90,0% et 100% et 95,0% pour des densités parasitaires comprises entre 2000-5000/ul. Par ailleurs, Maltha et ses collaborateurs ont rapporté plus récemment que la sensibilité de ce test dans la détection de *P. falciparum* était de 88,8% et 94,3-99,3% pour des densités parasitaires respectivement au-dessus de 100 et 1000/ul. Pour *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*, la sensibilité était respectivement de 77,6%, 18,4% et 30,4% (Maltha *et al.*, 2010).

Il est difficile d'établir des comparaisons entre les performances étant donné que la présente étude a été conduite chez les femmes enceintes se rendant au CSPS pour des consultations prénatales contrairement aux autres études réalisées sur des échantillons provenant de patients atteints de paludisme. Les légères différences obtenues peuvent s'expliquer par les différences de population d'étude ou de la variation des densités parasitaires dans la population d'étude.

La forte sensibilité du test pourrait s'expliquer par le fait que la population d'étude se situe dans une zone de forte transmission ou encore par la persistance de l'antigène dans le sang quelques semaines après traitement (Kattenberg *et al.*, 2012; Wongsrichanalai *et al.*, 2007). Le fort taux de faux positifs (36,57% soit 49/134) obtenu pourrait s'expliquer par des réactions croisées d'antigène-anticorps (Mishra *et al.*, 1999) ou des densités parasitaires inférieures à la limite de la détection microscopique (Forney *et al.*, 2001). En effet, parmi les 49 échantillons faux-positifs en référence à la microscopie, 48 échantillons étaient réellement positifs contre un seul négatif après le diagnostic de l'infection par la technique de PCR. De même, sur les 6 échantillons considérés comme faux-négatifs, 5 échantillons étaient positifs à la PCR contre un seul négatif. La considération des résultats de la PCR augmenterait la sensibilité du test de 93,4% à 96,37% pour une spécificité de 91,2% à 99,8%.

Dans cette étude, les tests rapides ont été permanemment gardés dans un réfrigérateur (4-8 C) écartant de ce fait le problème de conservation généralement connu comme facteur influençant la performance des tests. Aussi, le test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo était facile d'utilisation avec très peu de difficultés rencontrées dans l'interprétation des résultats par nos techniciens. Aucun résultat invalide n'a été enregistré au cours de l'interprétation des résultats.

En conclusion, notre étude a démontré que le test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo a une bonne performance dans le diagnostic de l'infection à *Plasmodium sp* chez la femme enceinte à Bobo-Dioulasso.

V.2.2 De la performance de CareStart™ Malaria pLDH (PAN/Pf)

La présente étude a également évalué la performance du test CareStart™ Malaria pLDH dans le diagnostic de l'infection palustre chez la femme enceinte à Bobo-Dioulasso. En référence toujours à la microscopie comme technique de référence, nous avons enregistré une sensibilité (85,7%) et une spécificité (95,7%) satisfaisantes pour des limites de détection parasitaire variant entre 32 et 96979 parasites/ul.

En 2011, la performance du test CareStart™ Malaria pLDH a été conjointement évaluée par l'OMS et FIND (WHO/World Bank/FIND., 2011): la sensibilité a une parasitémie fixe de 200/ul était respectivement de 88,9% et 91,4% pour *P. falciparum* et *P. vivax*. Lorsque la parasitémie était fixée entre 2000 et 5000/ul, la sensibilité du test était de 100% pour les deux espèces. Au Myanmar (Birmanie), Ashley et ses collaborateurs ont enregistré des sensibilités de 90,5% et 78,9% respectivement pour *P. falciparum* et *P. vivax* (Ashley *et al.*, 2009). Une étude récente en Belgique a montré que la sensibilité du test CareStart™ Malaria pLDH variait entre 94,7% et 98,7% quand la densité parasitaire dépassait 1000/ul pour *P. falciparum* (Heutmekers *et al.*, 2012).

A la différence des autres études, la performance du test CareStart™ Malaria pLDH a été évaluée dans cette étude dans la détection de *Plasmodium sp* ce qui pourrait expliquer les légères baisses de sensibilité observées. La baisse de la sensibilité dans cette étude pourrait également s'expliquer par les différences des populations d'étude ou par les densités parasitaires en dessous de la limite de détection microscopique (WHO/World Bank/FIND., 2010). En effet, 100% (24/24) des échantillons considérés faux-positifs (positifs au test et négatifs à la microscopie) ont été révélés positifs après la PCR. De même sur les 13 échantillons faux-négatifs (positif à la microscopie et négatif au test), un seul était effectivement négatif après la PCR. En considérant les résultats de la PCR (correction des

résultats microscopiques), la sensibilité du test augmente de 85,7% à 89,47% et la spécificité de 95,7% à 100%.

La thermostabilité n'a pas été évaluée dans cette étude, mais pour minimiser l'influence de la température sur la stabilité, les TDRs étaient stockés entre 2-8°C au laboratoire de l'IRSS/DRO et n'étaient envoyés sur le terrain que pour une utilisation courante. Une mauvaise condition de conservation sur le terrain pour différentes raisons (coupure d'électricité, indisponibilité ou absence de réfrigérateur) pourrait influencer cependant la performance du test même si ce test reste stable à des températures élevées (environ 4-30°C). Le fort taux de faux négatifs observés avec le CareStart™ Malaria pLDH (2,37% soit 13/548) peut être dû à une faible densité parasitaire (< 200 parasites/μl) au niveau des échantillons concernés.

Tout comme le CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo, le test CareStart™ Malaria pLDH a démontré une bonne performance dans le diagnostic du paludisme chez la femme enceinte. Son utilisation a également été jugée facile après une courte formation du personnel.

V.3 De la comparaison des performances des tests de diagnostic rapide

Une évaluation comparative des résultats de la performance des tests CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo et CareStart™ Malaria pLDH permet de distinguer lequel des deux tests fonctionne bien ou moins bien, afin d'éclairer la prise de décision de choix et d'achat des programmes de lutte antipaludique. Dans l'ensemble, les deux tests sont performants dans le diagnostic de l'infection palustre. Les résultats de cette étude donnent un aperçu de la sensibilité des deux tests à diagnostiquer l'infection palustre chez les femmes enceintes en consultation prénatale. La sensibilité du test CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo (PAN/Pf) est relativement plus élevée que celle du test CareStart™ Malaria pLDH et cela peut s'expliquer par les faibles densités parasitaires ou par le fait que l'antigène HRP-2 persiste dans l'organisme plusieurs semaines même après un traitement antipaludique réussi (Kattenberg *et al.*, 2012; Tjitra *et al.*, 2001). Les spécificités des deux tests sont satisfaisantes (91,2% pour CareStart™ Malaria HRP2/pLDH Combo Vs 95,7% CareStart™ Malaria pLDH) atteignant même 99,8% et 100% respectivement si nous considérons les résultats de la microscopie corrigés par la PCR. Cette étude n'a pas évalué la thermostabilité qui est un élément essentiel pour le maintien de la sensibilité des tests rapides. Cependant, une évaluation récente de l'OMS en collaboration avec FIND montre que les deux tests ont une thermostabilité identique (WHO/World Bank/FIND., 2011). Les limites des TDRs basés sur la détection de HRP-2 sont connues : la délétion du gène HRP2 pouvant entraver leur

utilisation (Gamboa *et al.*, 2010), la persistance de la protéine HRP2 plusieurs semaines après traitement qui réduirait la valeur prédictive positive du test. Les deux tests sont faciles à réaliser et l'interprétation des résultats n'a posé aucun problème aux techniciens.

VI. CONCLUSION

Le diagnostic adéquat du paludisme, qu'il soit basé sur les examens microscopiques ou sur l'utilisation des tests de diagnostic rapide demeure un élément essentiel pour une bonne prise en charge efficace de la maladie. Dans les centres de santé périphériques où le personnel qualifié fait parfois défaut et l'infrastructure limitée le recours aux tests de diagnostic rapide dans la détection du paludisme constitue une alternative à la microscopie.

Malgré les limites que peuvent présenter cette étude, les performances des tests CareStart™ Malaria HRP2/pLDH et CareStart™ Malaria pLDH enregistrées montrent que ceux-ci peuvent représenter une option non négligeable dans le diagnostic du paludisme chez la femme enceinte à Bobo-Dioulasso. L'utilisation de test rapide couplée à la microscopie chez les femmes enceintes au moment de leur consultation prénatale permettrait une prise en charge adéquate des cas de paludisme en empêchant du même coup l'utilisation de la SP chez les femmes atteintes du paludisme.

Au regard des résultats de l'étude, les suggestions que nous préconisons au ministère de la santé sont :

- Disponibiliser les TDRs dans les zones où la microscopie fait défaut ;
- Associer la microscopie et les TDRs dans les structures sanitaires bien équipées pour un diagnostic plus efficace du paludisme.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adebami O. J., Owa J. A., Oyedeji G. A. et al.** (2007). "Associations between placental and cord blood malaria infection and fetal malnutrition in an area of malaria holoendemicity." Am J Trop Med Hyg **77**(2): 209-213.
- Agnandji S. T., Lell B., Fernandes J. F. et al.** (2012). "A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants." N Engl J Med **367**(24): 2284-2295.
- Aly A. S., Vaughan A. M. et Kappe S. H.** (2009). "Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host." Annu Rev Microbiol **63**: 195-221.
- Aponte J. J., Aide P., Renom M. et al.** (2007). "Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial." Lancet **370**(9598): 1543-1551.
- Ashley E. A., Touabi M., Ahrer M. et al.** (2009). "Evaluation of three parasite lactate dehydrogenase-based rapid diagnostic tests for the diagnosis of falciparum and vivax malaria." Malar J **8**: 241.
- Carestart™ Malaria RAPYDTEST.** (2009). Using combined HRP2 / pLDH technology for the differential diagnosis of Plasmodium falciparum and the other Plasmodium species. DiaSys, Unit 5, The Sapphire Centre, Fishponds Road, Wokingham, Berkshire, RG41 2QL, England.
- Carnevale P., Robert V., Snow R. et al.** (1991). "The impact of impregnated mosquito nets on prevalence and morbidity related to malaria in sub-Saharan africa." Ann Soc Belg Med Trop **71 Suppl 1**: 127-150.
- Cox-Singh J., Davis T. M., Lee K. S. et al.** (2008). "Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening." Clin Infect Dis **46**(2): 165-171.
- de Monbrison F., Angei C., Staal A. et al.** (2003a). "Simultaneous identification of the four human Plasmodium species and quantification of Plasmodium DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction." Trans R Soc Trop Med Hyg **97**(4): 387-390.
- de Monbrison F., Raynaud D., Latour-Fondanaïche C. et al.** (2003b). "Real-time PCR for detection of molecular markers of resistance in Plasmodium falciparum." Pathol Biol (Paris) **51**(8-9): 528-533.
- Delacour H., Servonnet A., Perrot A. et al.** (2005). "ROC (receiver operating characteristics) curve: principles and application in biology." Ann Biol Clin (Paris) **63**(2): 145-154.
- Dembele L., Gego A., Zeeman A. M. et al.** (2011). "Towards an in vitro model of Plasmodium hypnozoites suitable for drug discovery." PLoS One **6**(3): e18162.
- Dondorp A. M., Fanello C. I., Hendriksen I. C. et al.** (2010). "Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial." Lancet **376**(9753): 1647-1657.
- Forney J. R., Magill A. J., Wongsrichanalai C. et al.** (2001). "Malaria rapid diagnostic devices: performance characteristics of the ParaSight F device determined in a multisite field study." J Clin Microbiol **39**(8): 2884-2890.
- Gamboa D., Ho M. F., Bendezu J. et al.** (2010). "A large proportion of P. falciparum isolates in the Amazon region of Peru lack pfrp2 and pfrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests." PLoS One **5**(1): e8091.
- Gong L., Maiteki-Sebuguzi C., Rosenthal P. J. et al.** (2012). "Evidence for both innate and acquired mechanisms of protection from Plasmodium falciparum in children with sickle cell trait." Blood **119**(16): 3808-3814.
- Greenwood B. M., Fidock D. A., Kyle D. E. et al.** (2008). "Malaria: progress, perils, and prospects for eradication." J Clin Invest **118**(4): 1266-1276.
- Harbach R. E.** (2004). "The classification of genus Anopheles (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships." Bull Entomol Res **94**(6): 537-553.

- Heutmeckers M., Gillet P., Cnops L. et al.** (2012). "Evaluation of the malaria rapid diagnostic test SDFK90: detection of both PfHRP2 and Pf-pLDH." *Malar J* **11**(1): 359.
- Kattenberg J. H., Ochodo E. A., Boer K. R. et al.** (2011). "Systematic review and meta-analysis: rapid diagnostic tests versus placental histology, microscopy and PCR for malaria in pregnant women." *Malar J* **10**: 321.
- Kattenberg J. H., Tahita C. M., Versteeg I. A. et al.** (2012). "Antigen persistence of rapid diagnostic tests in pregnant women in Nanoro, Burkina Faso, and the implications for the diagnosis of malaria in pregnancy." *Trop Med Int Health*.
- Kempinska-Podhorodecka A., Knap O., Drozd A. et al.** (2012). "Analysis for genotyping Duffy blood group in inhabitants of Sudan, the fourth cataract of the Nile." *Malar J* **11**: 115.
- Luxemburger C., Ricci F., Nosten F. et al.** (1997). "The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**(3): 256-262.
- Makler M. T., Palmer C. J. et Ager A. L.** (1998). "A review of practical techniques for the diagnosis of malaria." *Ann Trop Med Parasitol* **92**(4): 419-433.
- Maltha J., Gillet P., Bottieau E. et al.** (2010). "Evaluation of a rapid diagnostic test (CareStart Malaria HRP-2/pLDH (Pf/pan) Combo Test) for the diagnosis of malaria in a reference setting." *Malar J* **9**: 171.
- Malvy D., Djossou F., Thiebaut R. et al.** (2000). *Plasmodies - Malaria. Formes cliniques et diagnostic*. Paris, Elsevier, Encyclopédie médico-chirurgicale.
- Mendis K., Sina B. J., Marchesini P. et al.** (2001). "The neglected burden of Plasmodium vivax malaria." *Am J Trop Med Hyg* **64**(1-2 Suppl): 97-106.
- Mishra B., Samantaray J. C., Kumar A. et al.** (1999). "Study of false positivity of two rapid antigen detection tests for diagnosis of Plasmodium falciparum malaria." *J Clin Microbiol* **37**(4): 1233.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S. et al.** (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Ndiath M. O., Mazonot C., Gaye A. et al.** (2011). "Methods to collect Anopheles mosquitoes and evaluate malaria transmission: a comparative study in two villages in Senegal." *Malar J* **10**: 270.
- Nosten F., McGready R., Simpson J. A. et al.** (1999). "Effects of Plasmodium vivax malaria in pregnancy." *Lancet* **354**(9178): 546-549.
- PNLP** (2011). "Plan stratégique 2011-2015 du PNLN."
- PNLP** (2007). Plan stratégique de lutte contre le paludisme 2006 - 2010.
- Pradines B., Dormoi J., Briolant S. et al.** (2010). "La résistance aux antipaludiques." *Revue francophone des laboratoires* **422**.
- Prudencio M., Rodriguez A. et Mota M. M.** (2006). "The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage." *Nat Rev Microbiol* **4**(11): 849-856.
- Raghupathy R.** (1997). "Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy." *Immunol Today* **18**(10): 478-482.
- Ringwald P., Shallcross L., Miller J. M. et al.** (2005). *Susceptibility of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs : report on global monitoring 1996-2004*. Geneva, World Health Organization.
- Rolfes M. A., McCarra M., Magak N. G. et al.** (2012). "Development of Clinical Immunity to Malaria in Highland Areas of Low and Unstable Transmission." *Am J Trop Med Hyg*.
- Shulman C. E. et Dorman E. K.** (2003). "Importance and prevention of malaria in pregnancy." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **97**(1): 30-35.
- Siala E., Ben A. R., Bouratbine A. et al.** (2010). "Actualités du diagnostic biologique du paludisme." *Revue Tunisienne d'Infectiologie* **4**: 5-9.
- Singh B., Kim Sung L., Matusop A. et al.** (2004). "A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings." *Lancet* **363**(9414): 1017-1024.
- Steketee R. W., Wirima J. J. et Campbell C. C.** (1996). "Developing effective strategies for malaria prevention programs for pregnant African women." *Am J Trop Med Hyg* **55**(1 Suppl): 95-100.

- Tiono A. B., Ouedraogo A., Bougouma E. C. et al.** (2009). "Placental malaria and low birth weight in pregnant women living in a rural area of Burkina Faso following the use of three preventive treatment regimens." Malar J **8**: 224.
- Tjitra E., Suprianto S., McBroom J. et al.** (2001). "Persistent ICT malaria P.f/P.v panmalarial and HRP2 antigen reactivity after treatment of Plasmodium falciparum malaria is associated with gametocytemia and results in false-positive diagnoses of Plasmodium vivax in convalescence." J Clin Microbiol **39**(3): 1025-1031.
- UNICEF/WHO.** (2000) "Malaria prevention and treatment." The prescriber.
- Valea I., Tinto H., Drabo M. K. et al.** (2012). "An analysis of timing and frequency of malaria infection during pregnancy in relation to the risk of low birth weight, anaemia and perinatal mortality in Burkina Faso." Malar J **11**: 71.
- WHO/World Bank/FIND.** (2010). Malaria rapid diagnostic test performance : results of WHO product testing of malaria RDTs : round 2 (2009). Geneva, World Health Organization.
- WHO/World Bank/FIND.** (2011). Malaria rapid diagnostic test performance : summary results of WHO malaria RDTs product testing:rounds 1-3 [2008-2011]. Geneva, World Health Organization.
- Wongsrichanalai C., Barcus M. J., Muth S. et al.** (2007). "A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT)." Am J Trop Med Hyg **77**(6 Suppl): 119-127.
- World Health Organization.** (2011a). Directives pour le traitement du paludisme. Genève, Organisation mondiale de la Santé.
- World Health Organization.** (2008). Global malaria control and elimination : report of a technical review. Geneva, World Health Organization.
- World Health Organization.** (2010). Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. Geneva, World Health Organization.
- World Health Organization.** (1958). Malaria. The First Ten Years of the World Health Organization. World Health Organization.: 172-187.
- World Health Organization.** (2007). Malaria in pregnancy : guidelines for measuring key monitoring and evaluation indicators. Geneva, World Health Organization.
- World Health Organization.** (2012). WHO Policy Recommendation: Seasonal Malaria Chemoprevention (SMC) for Plasmodium falciparum malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-region in Africa. Geneva, World Health Organization.
- World Health Organization.** (2011b). World malaria report 2011. Geneva, World Health Organization.
- World Health Organization. Regional Office for Africa.** (2004). A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the African region. Brazzaville, World Health Organization.
- World Health Organization. Roll Back Malaria Dept.** (2005). Strategic orientation paper on prevention and control of malaria : for national and international programme officers involved in malaria control at country level. Geneva, World Health Organization.

ANNEXES

Annexe 1 : Procédure d'extraction de l'ADN avec kit Qiagen DNA Mini and Blood

Etapes avant de commencer l'extraction

- Equilibrer les échantillons à température ambiante
- Mettre la plaque chauffante en marche à la température de 56°C
- Mettre le Buffer AE à température ambiante
- S'assurer que les Buffer AW1, AW2 et la QIAGEN protease ont été préparés selon les instructions du kit.

Préparation des réactifs pour l'extraction

La QIAGEN Protéase

- Pour le QIAamp DNA Mini Kit (50), ajouter 1,2ml de solvant de protéase dans le flacon contenant la QIAGEN protéase lyophilisée.
- Pour le QIAamp DNA Mini Kit (250), ajouter 5,5 ml de solvant au flacon contenant le QIAGEN protéase lyophilisée.

La QIAGEN protéase reconstituée est stable pendant 2 mois si elle est gardée entre 2-8°C.

Buffer AL

Mélanger attentivement le buffer AL en le secouant avant utilisation. Le Buffer AL est stable pendant un an à température ambiante.

NB : Ne jamais ajouter directement la QIAGEN protéase au buffer AL.

Buffer AW1

Avant la première utilisation, ajouter 125 ml d'éthanol (96-100%) à la bouteille du buffer AW1. Le Buffer AW1 reconstitué est stable pendant un an à température ambiante

Buffer AW2

Avant la première utilisation, ajouter 160 ml d'éthanol (96-100%) à la bouteille du buffer AW2. Le Buffer AW2 reconstitué est stable pendant un an à température ambiante

Protocole d'extraction

1. Pipeter 20 μ l de QIAGEN Protéase (Protéinase k) dans un micro-tube de 1,5 ml.
2. Ajouter 200 μ l d'échantillon (sang) dans le micro-tube.
3. Ajouter 200 μ l de Buffer AL à l'échantillon. Vortexer le micro-tube contenant le mélange pendant 15s.
4. Incuber à 56°C pendant 10 min.
5. Centrifuger brièvement le micro-tube de 1,5 ml.
6. Ajouter 200 μ l d'Ethanol (96-100%) à l'échantillon et vortexer à nouveau le micro-tube pendant 15s. Centrifuger brièvement le micro-tube de 1,5ml.
7. Transférer le mélange obtenu dans la colonne QIAamp Mini spin déjà placée dans un tube de collection de 2 ml. Fermer la colonne et centrifuger le tube à 8000 rotations par minute (rpm) pendant 1 minute. Ensuite placer la colonne du QIAamp Mini dans un tube propre de 2 ml et jeter le tube contenant le filtrat.
8. Ouvrir délicatement la colonne du QIAamp Mini et ajouter 500 μ l de Buffer AW1. Refermer et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute. Placer la colonne du QIAamp Mini dans un tube propre de 2 ml et jeter le tube contenant le filtrat ;
9. Ouvrir délicatement la colonne du QIAamp Mini et ajouter 500 μ l de Buffer. Refermer et centrifuger à 14000 rpm pendant 4 minutes ;
10. Placer la colonne du QIAamp Mini dans un tube propre de 2 ml et jeter le tube contenant le filtrat. Ouvrir délicatement la colonne du QIAamp Mini et ajouter 200 μ l de Buffer AE. Incuber à température ambiante pendant 1 minute et enfin centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute.
11. L'éluant contenant l'ADN peut être utilisé pour amplification ou autre analyse, ou être stocké à -20°C pour une utilisation ultérieure.

Annexe 2 : Préparation du Gel à 2,5%

Avant de commencer, il faut :

- Nettoyer le matériel
- Placer les peignes sur les moules et vérifier que ceux-ci ne touchent pas le fond des moules.

Pour la préparation de 2 gels à 2,5%, il faut :

1. Mélanger 7,5g d'agarose dans 300ml de 1X TBE (Tris Borate EDTA) dans un Bécher
2. Homogénéiser et Placer le mélange dans un four à micro onde. Lancer le four pendant 5m30s.

3. Refroidir le mélange pendant 3 minutes
4. Ajouter 22,5µl de Bromure d'éthidium et homogénéiser le mélange.
5. Mélanger le tout et couler le gel dans des moules.
6. Après séchage du gel, retirer les peignes
7. Enlever le gel du moule et le placer dans le bac de migration.

Annexe 3 : Protocole de Migration des produits de PCR2 sur gel d'agarose

1. Placer le gel dans le bac de migration et s'assurer que le gel soit complètement immergé dans la solution de 0,5 X TBE ;
2. Orienter les gels dans le bac de migration de telle sorte que les produits de PCR 2 soient déposés au niveau de la borne négative ;
3. Réserver un puits du gel pour le marqueur de poids moléculaire qui sera introduit en dernier ;
4. Introduire 13µl du contrôle négatif dans le puits du gel dédié au contrôle négatif ;
5. Introduire 13µl du contrôle positif dans le puits du gel dédié au contrôle positif ;
6. Pipeter 13µl de PCR 2 de chaque échantillons et l'introduire dans le puits du gel en fonction du plan de migration établi ;
7. Pipeter 15µl de marqueur de poids moléculaire et l'introduire dans le puits réservé au marqueur de poids moléculaire ;
8. Fixer les bornes positives et négatives du générateur de courant au bac de migration et faire passer le courant à 80-90V ;
9. Surveiller attentivement la migration de tel sorte que la bande bleue (niveau de l'ADN) sur le gel ne tombe pas du gel.
10. Passer à la visualisation du gel sous UV et prendre la photo du résultat grâce au dispositif de révélation du laboratoire.