

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Il est transmis suite à la piqûre d'un moustique femelle infestée du genre *Anopheles*. Cinq (5) espèces de *Plasmodium* sont retrouvées en pathologie humaine : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi*. (Sutherland *et al.*, 2010). L'espèce *P. falciparum* est retrouvée dans 97% des cas de paludisme dont la majeure partie est enregistrée en Afrique subsaharienne. Elle peut entraîner des manifestations graves de l'infection pouvant entraîner la mort.

En 2017, le nombre de cas de paludisme a été estimé à 219 millions avec 435000 cas de décès enregistrés dans le monde. Les enfants de moins de 5 ans sont les plus vulnérables face au paludisme, ils représentent (61%) des décès associés au paludisme dans le monde (WHO, 2018).

Au Sénégal, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a rapporté en 2016 une prévalence parasitaire de 1,2% et une mortalité de 33‰ naissances vivantes chez les moins de 5 ans en 2014. Entre 2016 et 2017, l'incidence palustre a augmenté de 9,8% pour atteindre 25,94‰ en 2017 contre 23,62‰ en 2016. En 2017, la morbidité proportionnelle palustre passera de 5,40% en 2013 à 3,26% soit une réduction de 40% et la mortalité proportionnelle palustre, elle, va passer de 7,50% en 2013 à 1,73% en 2017 soit une réduction de 77%. (PNLP, 2016 ; PNL, 2017).

Face à ce problème de santé publique que représente le paludisme dans le monde et suite aux recommandations de l'OMS, le Sénégal, comme beaucoup d'autres pays, a adopté plusieurs stratégies de lutte et de contrôle en vue d'éliminer le paludisme. C'est entre autres : la lutte antivectorielle (utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA), les pulvérisations intra domiciliaires à effet rémanent, l'accès rapide au diagnostic grâce aux Tests de Diagnostic Rapide (TDR) et le traitement précoce (à bases de dérivés d'Artémisinine (CTA)) des cas confirmés, le traitement préventif intermittent (TPI) avec la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) chez les femmes enceintes, la chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) à la SP associée à l'Amodiaquine (AQ) chez les enfants de moins de dix (10) ans (PNLP, 2018 ; WHO, 2001-2018).

Malheureusement, la pression médicamenteuse, exercée au fil du temps sur le *Plasmodium*, a fini par sélectionner des parasites résistants aux antipaludiques utilisés amplifiant ainsi le fardeau de cette maladie (Dondorp *et al.*, 2009).

En effet, il a été démontré que les mutations observées sur plusieurs marqueurs moléculaires notamment le *Pfcr* pour la Chloroquine, le *Pfmdr1* pour l'Amodiaquine et la Luméfantrine, le *Pfdhfr* pour la Pyriméthamine, le *Pfdhps* pour la Sulfadoxine et le *PfK13* pour l'Artémisinine, confèrent une résistance aux médicaments antipaludiques (Price *et al.*, 1999 ; Djimdé *et al.*, 2001 ; Chapadense *et al.*, 2019 ; Jiang *et al.*, 2019).

Au Sénégal, après le retrait de la Chloroquine en **2003**, il a été respectivement noté des taux de prévalence de ces mutations de 11% pour le codon N86Y du gène *pfmdr1* à Dakar, en 2017, de 93%, pour la triple mutation du gène *dhfr* (N51I / C59R / S108N) et de 66% pour la quadruple mutation des gènes *dhfr* et *dhps* (N51I / C59R / S108N / A437G) à Thiès en 2011.

La résistance aux dérivés d'Artémisinine n'a, à ce jour, pas encore été notifiée au Sénégal qui vise l'élimination du paludisme aux vues des efforts consentis dans la réduction de cette maladie. Cependant, l'émergence de la résistance aux dérivés d'artémisinine a été rapportée en Asie du Sud-Est et pourrait compromettre les succès qui ont conduit à la réduction de la morbidité proportionnelle palustre de 40% et de la mortalité proportionnelle palustre de 77%, en 2017 (**Dondorp et al., 2009 ; Ndiaye et al., 2013 ; WHO, 2012 ; Ariey et al., 2014 ; Ashley et al., 2014 ; Mbaye et al., 2017 ; PNLP, 2017**).

Pour cela, il est nécessaire de surveiller la dynamique de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* au Sénégal en vue de contribuer à cet élan d'élimination du paludisme.

C'est pourquoi, nous nous sommes proposés d'évaluer l'efficacité des antipaludiques, par une approche phénotypique (**test *ex vivo***) et moléculaire (**High Resolution Melting - HRM**), dans la région de Thiès (Sénégal).

Pour réaliser ce travail, nous nous sommes fixés comme :

❖ **Objectif général**

Etudier la sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux molécules antipaludiques utilisées dans la région de Thiès au Sénégal.

❖ **Objectifs spécifiques**

Déterminer la sensibilité d'isolats de *P. falciparum* à la Chloroquine, la Pipéraquline, l'Amodiaquine, la Lumefantrine, la Méfloquine et à la Quinine.

- ✓ Déterminer la prévalence des mutations des gènes *Pfcr1* (K76T) et *Pfmdr1* (N86Y, Y184F, Y1246D) ;
- ✓ Corréler les résultats phénotypiques et les résultats génotypiques des marqueurs *Pfcr1* et *Pfmdr1*.

CHAPITRE I : Généralités sur le paludisme

I-1- Epidémiologie

I-1-1- Agent pathogène

Les *Plasmodiums* sont des hémiparasites intracellulaires, amiboïdes, produisant du pigment provenant de la dégradation de l'hémoglobine. Les caractères communs au *Plasmodium* sont : corps nus, situation intracellulaire et nutrition par osmose.

I-1-2- Classification

Phylum : *Apicomplexa*

Classe : *Sporozoea*

Sous-classe : *Coccidia*

Ordre : *Eucoccidiida*

Sous-ordre : *Haemosporiina*

Famille : *Plasmodiidae*

Genre : *Plasmodium*

Espèces : *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. knowlesi*

Sous-genre : *Laverania*

Espèce : *P. falciparum*

I-2- Morphologie

Après coloration au May-Grünwald-Giemsa, sur un frottis mince, le *Plasmodium* apparaît sous différentes formes : trophozoïte, schizonte, gamétocyte. L'aspect de ces différentes formes permet de différencier les 5 espèces pouvant infester l'homme : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* et *P. knowlesi* (Dièye, 2016). Le **Tableau 1** nous donnera plus de détails (**Image voir annexe**)

I-3- Vecteur et Transmission

Le paludisme est transmis, le plus souvent par la piqûre d'un moustique infesté. Il existe 400 espèces de moustique dont 60 assurant la transmission du paludisme. Ces derniers appartiennent au phylum des *Arthropodes*, à la classe des insectes, l'ordre des diptères, au sous ordre des Nématocères, à la famille des *Culicidae* ou moustique, à la sous-famille des *Anophelinae*, au genre *Anopheles*.

Seules les femelles sont hémaphages et ont une activité nocturne.

Au Sénégal, les espèces responsables de la transmission du paludisme sont *A. gambiae* et *A. funestus*. Mais, nous y rencontrons aussi *A. arabiensis*, *A. melas*, *A. nili*. (WHO, 2016)

Cependant, il existe trois autres modes de transmission plus rares de l'infection palustre :

- ✓ la contamination accidentelle lors d'une transfusion avec du sang contenant des hématies parasitées ;
- ✓ la transmission congénitale qui résulte d'une transmission materno-fœtale chez le nouveau-né ;
- ✓ la contamination par aiguilles souillées ou accident de laboratoire ;
- ✓ la transmission du paludisme est favorisée par plusieurs facteurs dont la température, l'eau, l'humidité et les facteurs anthropiques (barrages et irrigations).



Figure 1: *Anopheles funestus*

Source : <https://media1.picsearch.com/is?uR7NAIjib6FoqwscnJ7rNSpHEtdUc7BMgtyRIxC7D-4&height=27030> (octobre 2018)

I-3-1- Biologie de l'espèce *Plasmodium falciparum*

❖ Cycle parasitaire

➤ Chez l'homme

Les sporozoïtes inoculés par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin restent pendant une trentaine de minutes maximum dans la peau, la lymphe et le sang. Beaucoup sont détruits par les macrophages mais certains parviennent à gagner les hépatocytes. Ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires ou « corps bleus » (formes multinucléées) qui, après 7 à 15 jours de maturation, éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes dans le sang (10 000 à 30 000 mérozoïtes en fonction des espèces) qui passent dans le sang et infectent les hématies. La phase intra-hépatique représente le cycle exo-érythrocytaire schizogonique. Dans l'hématie, le mérozoïte donne un trophozoïte qui, à maturité, forme un schizonte endoérythrocytaire. Le schizonte mature se lyse, libère des mérozoïtes qui vont infecter d'autres hématies : c'est le cycle endoérythrocytaire. Ce cycle dure 48h pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, et 72h chez *P. malariae*, 24h pour *P. knowlesi*.

Après un certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes subissent une maturation d'une dizaine de jours, accompagnée d'une différenciation sexuée : ils se transforment en gamétocytes à potentiel mâle ou femelle, qui vont rester en circulation dans le sang pendant 10 à 15 jours.

➤ Chez l'anophèle femelle

Les gamétocytes, ingérés par le moustique lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté, se transforment en gamètes mâles et femelles qui fusionnent en un œuf libre, mobile appelé ookinète. Cet ookinète quitte la lumière du tube digestif, se fixe ensuite à la paroi externe de l'estomac et se transforme en oocyste. Les cellules parasites se multiplient à l'intérieur de cet oocyste, produisant des centaines de sporozoïtes qui migrent ensuite vers les glandes salivaires du moustique. Ces sporozoïtes sont les formes infectantes prêtes à être inoculées avec la salive du moustique, lors d'un repas sanguin sur un hôte vertébré (**figure 2**) (ANOFEL, 2014).

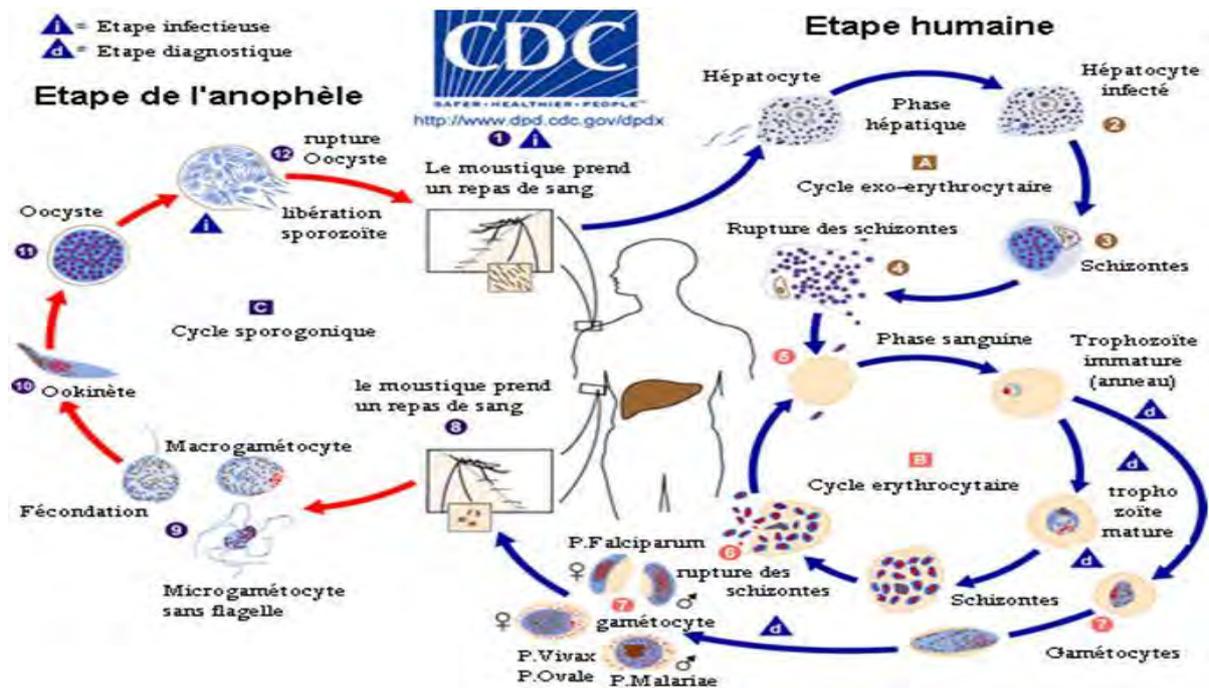


Figure 2: Cycle biologique du paludisme. Source : (CDC, 2017)

I-3-2- Forme clinique

Les manifestations de la maladie sont polymorphes. Il en est ainsi dans leur expression comme dans leurs gravités.

Les symptômes habituels sont les suivants : une forte fièvre, des maux de tête, des frissons, des sueurs profuses et des courbatures dans tout le corps. Il arrive que certains patients vomissent, toussent, aient de la diarrhée ou fassent des convulsions. Dans le cas des infections persistantes ou récurrentes, nous pouvons observer une anémie. Comme nous observons des signes cliniques similaires dans d'autres maladies courantes, des investigations plus approfondies sont nécessaires avant de pouvoir diagnostiquer le paludisme avec fiabilité (PNLP, 2017, 2018).

I-4-Diagnostic et Traitement

Le diagnostic et le traitement précoces du paludisme réduisent l'intensité de la maladie et permettent d'éviter les décès. Ils contribuent aussi à réduire la transmission du paludisme.

I-4-1-Diagnostic

Il permet de mettre en évidence la présence du parasite ou son ADN dans le sang, c'est le diagnostic direct. Il permet aussi de mettre en évidence soit des anticorps dirigés contre les parasites, soit des antigènes exprimés par ceux-ci, c'est le diagnostic indirect.

I-4-1-1- Goutte épaisse et frottis mince

La goutte épaisse et le frottis mince sont des techniques parasitologiques microscopiques reposant sur l'utilisation du colorant **Giemsa** essentiellement, qui permettent de détecter les *Plasmodiums*, de les identifier et de les quantifier. Le Giemsa est un mélange de bleu de méthylène et d'éosine. (**Fleischer B, 2004**)

La goutte épaisse (concentrée de globules rouges sur une petite surface) et le frottis mince (film rouge sur une large surface) (**figure 3**) sont aussitôt devenus les techniques de référence pour le diagnostic du paludisme.

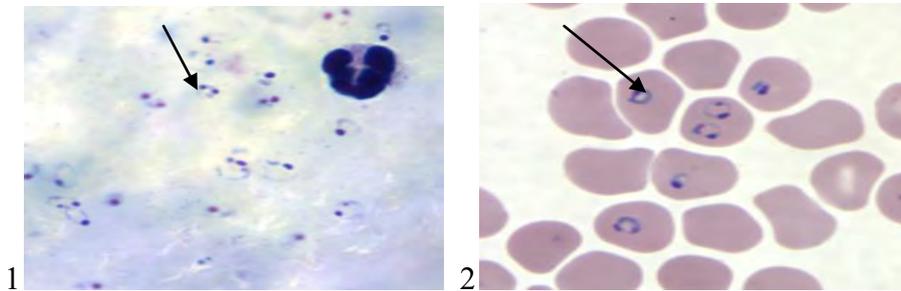


Figure 3 : Goutte épaisse (1) et frottis mince (2) positifs à *Plasmodium falciparum* colorés au GIEMSA (les flèches montrent les parasites) Source : (CDC, 2016)

I-4-1-2- QBC Malaria (quantification Buffy Coat)

Il s'agit d'une technique basée sur une centrifugation en tube capillaire et un marquage non spécifique des parasites par un fluorochrome (acridine orange). Il s'agit d'une technique de concentration, très facile à maîtriser, donnant une sensibilité « équivalente à celle de la goutte épaisse (mais ne permettant pas un diagnostic d'espèce). En revanche elle nécessite un matériel spécifique. L'arrêt de sa commercialisation est annoncé. (**Lecamus et al., 1992**)

I-4-1-3- PCR ((Polymerase Chain Reaction)

Une autre approche du diagnostic biologique du paludisme consiste à détecter des séquences nucléotidiques spécifiques des espèces plasmodiales grâce à la PCR. C'est une technique extrêmement sensible, plus sensible même que le QBC ou les TDRs. La PCR peut détecter de faible parasitémie (au moins 5 parasites/ μ l de sang) et sa spécificité est de 100%. Toutefois, c'est une technique qui est chère, laborieuse et nécessite une expertise. (**Chien et al., 1976**)

I-4-1-4- Illumigene – malaria

Illumigene-malaria est un test de diagnostic qui s'appuie sur la technologie innovatrice génétique moléculaire appelée Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Il amplifie l'ADN et détecte la présence du parasite du paludisme avec une sensibilité de 100%. La technologie est simple, précise et facile à utiliser. (Naomi *et al.*, 2016)

I-4-1-5- Diagnostic indirect

I-4-1-5-1- TDR (test de diagnostic rapide)

Ces tests se présentent sous forme de cassette (**figure 4**) et sont basés sur la détection du lactate déshydrogénase (LDH) qui est une enzyme commune aux quatre espèces mais produite plus par *P. falciparum* et l'Histidine Rich Protein (HRP 2) qui est spécifique à *P. falciparum*. Ils permettent une détection rapide de la présence du parasite par simple observation de la cassette et présentent une sensibilité de 95%. (Munier *et al.*, 2009)

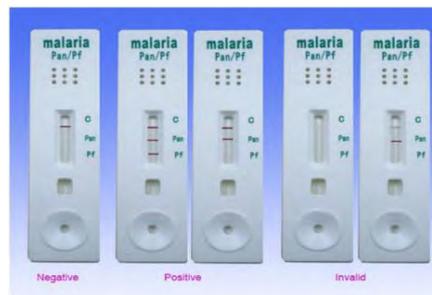


Figure 4: Tests de diagnostic rapide (TDR), Source : (WHO, 2008)

I-4-1-5-2- Sérologie

La sérologie est également un outil de diagnostic du paludisme ; elle est basée sur la détection des anticorps dirigés contre les stades sanguins du parasite. (Tangpukdee *et al.*, 2009) La sérologie n'est pas utilisée pour le diagnostic du paludisme mais pour un diagnostic rétrospectif d'expositions antérieures récentes ou lointaines (Warhurst, 1996). Les tests sérologiques sont nombreux, mais les plus courants sont la technique ELISA et l'immunofluorescence indirecte. (WHO, 1974)

I-4-2- Prévention

I-4-2-1- Prophylaxie

➤ Lutte antivectorielle

La lutte antivectorielle consiste à mettre en place des mesures qui protègent contre l'infection palustre. Cette lutte peut se faire aussi bien au niveau individuel que collectif.

➤ Prophylaxie individuelle

La prophylaxie individuelle consiste à l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA), au port de vêtement de protection, à l'utilisation de répulsifs et à la pose d'écran anti moustique sur les ouvertures des habitations.

➤ **Prophylaxie collective**

La prophylaxie collective consiste à traiter les eaux de surface avec des larvicides pour éviter les gîtes larvaires. Elle consiste également à l'utilisation des insecticides à effet rémanent pour la pulvérisation intra-domiciliaire des habitations.

I-4-2-2-- Chimio prophylaxie

De nos jours, la chimio prophylaxie ne se limite plus seulement aux femmes enceintes par un traitement antipaludique. En effet, l'OMS préconise l'utilisation chez les enfants de moins de dix (10) ans, pendant la saison de haute transmission, d'un cycle de traitement complet par de la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) et de l'Amodiaquine (AMQ) à des intervalles d'un mois, à partir du début de la saison de transmission jusqu'à un maximum de quatre cycles pendant la saison. Son objectif est de maintenir des concentrations d'antipaludiques dans le sang pendant la période où les risques de contracter la maladie sont plus élevés. **(WHO, 2013)**

Pour les femmes enceintes, l'OMS recommande que le traitement préventif intermittent (TPI) soit administré à toutes les femmes enceintes lors des visites de soins prénataux dès le début du deuxième trimestre de grossesse.

Chaque dose devrait être donnée à au moins un (1) mois d'intervalle. L'OMS recommande au moins trois (3) doses de TPI à base de Sulfadoxine-Pyriméthamine durant chaque grossesse. **(WHO, 2017)**

I-4-3- Traitement

Le meilleur traitement disponible, en particulier pour le paludisme à *Plasmodium falciparum*, est une combinaison thérapeutique à base d'Artémisinine (CTA). En effet, l'OMS recommande que, dans tous les cas présumés, le paludisme soit confirmé par un diagnostic basé sur la recherche des plasmodies (par microscopie ou test diagnostique rapide) avant d'administrer un traitement. La confirmation parasitologique peut être obtenue en 30 minutes ou moins. Un traitement sur la seule base des symptômes ne doit être envisagé que si le diagnostic parasitologique n'est pas possible. Nous trouverons des recommandations plus détaillées dans les Directives pour le traitement du paludisme publiées, en 2015. **(WHO, 2017)**

I-4-3-1- Traitement du paludisme simple

Le traitement du paludisme simple se fait en utilisant l'une des trois combinaisons :

- ✓ Artéméther + Luméfantrine,
- ✓ Artésunate + Amodiaquine,
- ✓ Dihydroartémisinine-Pipéraquline.

I-4-3-2- Traitement du paludisme grave

La prise en charge du paludisme grave se fait avec la Quinine, l'Artésunate et l'Artéméther injectable.

I-4-4- Les principaux antipaludiques

Il existe plusieurs molécules antipaludiques avec des modes d'action différents.

Tableau 1: Principaux antipaludiques et leurs modes d'Action

SCHIZONTICIDES					
Action rapide			Action lente (antimétabolite)		Antibiotique
quinoléines	alcools	Sesquiterpènes	Antifoliques	Antifoliniques	Antibiotiques
Chloroquine	Méfloquine	Arthéméther	Sulfadoxine	Pyriméthamine	Doxycycline
Amodiaquine	Halofantrine	Arthésunate		Proguanil	
Pipéraquine	Alcaoloïdes	Artéminol			
Luméfantrine	Quinine				
GAMETOCYDES (Amino-8-quinoléines)					
Primaquine (ATU)					

Source : <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antipaludeens-les-points-essentiels>

I-5- La chimiorésistance

I-5-1- Définition

La chimiorésistance est définie par l'OMS comme étant : « la capacité d'une souche parasitaire à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées, mais comprises dans les limites de tolérance du sujet. »

La chimiorésistance concerne aujourd'hui la plupart des molécules antipaludiques (Figure 5).

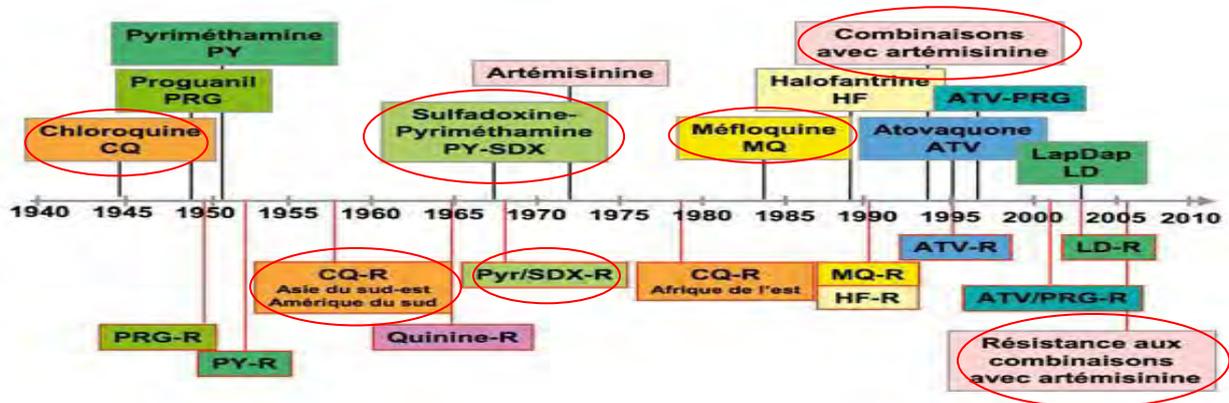


Figure 5: Introduction et apparition de résistance aux différentes molécules antipaludiques

Source : (Pradines *et al.*, 2010)

I-5-2- Facteurs favorisant la survenue de la résistance

Il existe plusieurs facteurs :

La pression médicamenteuse, le Non-observance du traitement, l'automédication, la prescription irrationnelle des antipaludiques, la concentration insuffisante du médicament, le

mouvement de population humaine et/ou anophélienne, le niveau de transmission et le Degré d'immunité de l'hôte

I-5-3- Mécanisme de la résistance

Le mécanisme de la résistance aux antipaludiques n'est pas bien élucidé dans la plupart des cas (Tableau 3).

Tableau 2: Mécanismes et cibles d'Action des antimalariques

Molécules	Amino-4-quinoléines Amino-alcools	Dérivés de l'artémisinine	Antifoliques	Antifoliniques
Site d'action	Vacuole digestive	Vacuole digestive	Cytoplasme	
Mécanisme d'action	Accumulation dans la vacuole digestive du parasite.	Molécules de structure endopéroxydes.	Inhibition compétitive des enzymes de la voie de synthèse de l'acide folique	
	Augmentation du pH vacuolaire.	Production de radicaux libres après interaction avec l'hème	Dihydroptéroate Dihydrofolate	
	Inhibition de l'hème polymérase impliquée dans la polymérisation de la ferriprotoporphyrine IX en pigment insoluble		synthétase réductase	
			DHFS	DHFR
Effet final	Accumulation de ferriprotoporphyrine IX toxique pour les membranes du parasite	Stress oxydant avec altération des protéines, des organites et des membranes du parasite.	Inhibition de la production d'acide folique.	
			Altération de la synthèse des pyrimidines	
Apparition de la résistance	Lente	Non décrite	Rapide	
Mécanisme de résistance	Diminution accumulation vacuolaire	-	Mutations des enzymes cibles	
	Facteurs multigéniques		(DHFS, DHFR, DHOD) Utilisation thérapeutique en association	

Source: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antipaludeens-les-points-essentiels>

I-5-4- Implication des marqueurs moléculaires dans les mécanismes de résistances

Il s'agit d'un ensemble de marqueurs impliqués dans les mécanismes de résistance. Pertinents et spécifiques pour prédire le niveau de résistance d'une population parasitaire aux antipaludiques, ils ont une place de choix dans la surveillance de l'activité de tel ou tel antipaludique. Certains marqueurs sont associés à un défaut d'accumulation des pharmacophores au niveau de la cible parasitaire, d'autre à une modification de la cible parasitaire. Ils présentent l'énorme avantage de pouvoir être étudié sur une large échelle (à partir d'échantillons sanguins prélevés au bout du doigt et déposés sur papier filtre) et sont potentiellement automatisables. Il n'en existe que pour un nombre restreint d'antipaludiques. (Ménard *et al.*, 2013)