

---

## Chapitre III. Diagnostic du paludisme

### III .1.Diagnostic biologique

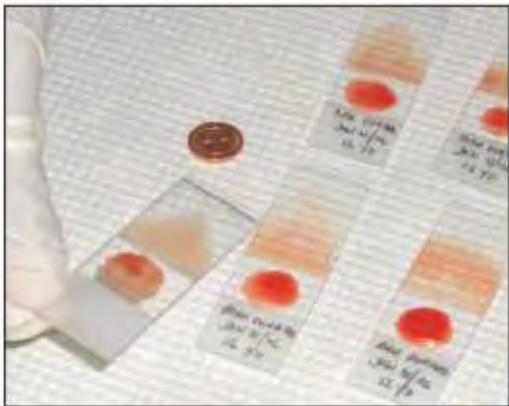
Ce diagnostic biologique repose sur plusieurs examens notamment la goutte épaisse, le frottis sanguin, les Tests de Diagnostic Rapide (TDR) et éventuellement sur la sérologie palustre (Siala et al., 2010).

#### III.1.1.Diagnostic direct

Il permet de rechercher l'agent pathogène en cause ou une partie de celui-ci (antigène,génome).

##### III.1.1.1. Diagnostic microscopique

L'examen microscopique du plasmodium consiste à mettre en évidence les plasmodies dans les deux types d'étalements de sang : la goutte épaisse et le frottis mince.



Titre : étalement d'une goutte épaisse et d'un frottis mince sur une lame

Source : (OMS, Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme)

##### III.1.1.1.1.Goutte épaisse

C'est une technique de référence pour diagnostiquer le paludisme qui se fait par l'étalement d'une goutte de sang sur une lame sans l'écraser sur 1cm de diamètre puis séchage pendant une heure à l'étuve à 37 °C ,ensuite coloration au Giemsa .En cas de présence du parasite ,l'observation microscopique permet d'apprécier les différents stades parasitaires de celui-ci et une parasitémie supérieure à 5% est un critère d'hospitalisation.

### **III.1.1.1.2.Frottis mince**

On l'utilise pour la confirmation de l'espèce parasitaire lorsque celle-ci est impossible à partir de la goutte épaisse. La méthode consiste à placer à 45° l'arrêt d'une autre lame en contact avec la petite goutte, laissé fuser le sang par capillarité en conservant toujours la même inclinaison, tirer la goutte vers l'extrémité libre de la lame sans arrêt.

### **III.1.2.Diagnostic indirect**

Les techniques indirectes mettent en évidence la réponse de l'hôte à l'infection.

#### **Tests immunologiques (ELISA et IFI)**

Le principe d'IFI (immunofluorescence indirecte) consiste à mettre en contact, un antigène figuré de parasite sur goutte épaisse et/ou sur frottis sanguin, et un sérum animal ou humain. Si ce sérum contient des anticorps spécifiques contre cet antigène le complexe immun persistera après le lavage, et sera fluorescent en lumière ultra-violet grâce au fluorochrome associé aux anticorps. Quant au principe d'ELISA, il consiste à fixer sur un support solide des éléments contenus dans le liquide biologique. Ensuite, les antigènes solubles sont détectés à l'aide d'un complexe immun marqué par l'enzyme, et sera révélé par addition d'un substrat spécifique de l'enzyme.

#### **Tests de Diagnostic Rapide (TDR)**

Les TDR sont faciles à utiliser, ne nécessitent pas d'électricité ou d'expertise intense et fournissent des résultats qui peuvent être utilisés pour prendre des décisions de traitement (Lucchi et al., 2014). Le principe repose sur une technique immunochromatographique révélant la réaction antigène – anticorps. Le sang est prélevé le plus souvent par simple piqure du doigt et les résultats sont disponibles au bout de 15 à 30 minutes. Les TDR détectent des antigènes spécifiques (des protéines) produits par les plasmodies présentes dans le sang des personnes infectées. Il existe des tests qui détectent soit des antigènes spécifiques de *P. falciparum* : Histidin Rich Protein (HRP2) soit des enzymes produites par le Plasmodium : Lactico-deshydrogenase (pLDH) et l'aldolase. Certains détectent les infections monospécifiques (soit *P. falciparum* soit *P. vivax*), d'autres des infections mixtes (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*) (OMS,2018).

### III .1.2.3.Diagnostique biologique par les techniques de biologie moléculaire

Les tests d'amplification d'acide nucléique (tests moléculaires) tels que la PCR (*Polymerase chain reaction*) , ont à la fois une sensibilité et une spécificité supérieures par rapport à la microscopie et aux TDR, détectant un nombre de parasitémie aussi bas que 1 parasite /  $\mu\text{L}$  .

La PCR est un ajout intéressant à la microscopie pour l'identification confirmatoire de *Plasmodium* spp. dans les échantillons cliniques(Johnston et al., 2006) .Il existe plusieurs types de PCR :

- PCR en temps réel : L'apport de la PCR quantitative en temps réel ou real-time PCR a été considérable. Elle est rapide (30–40 minutes) et offre la possibilité de quantifier et d'identifier les produits de PCR dans un système fermé limitant les risques de contamination (Gouriet and Raoult, 2009). Un des aspects les plus intéressants de cette technique est la possibilité de détecter plusieurs cibles dans la même réaction de PCR.
- PET-PCR : récemment, un test de PCR en temps réel connu sous le nom de transfert d'électrons photo-induit (PET) -PCR qui repose sur des amorces d'auto-extinction pour la détection de *Plasmodium* spp. et *Plasmodium falciparum* a été décrit en Haiti et s'est avéré plus facile à utiliser par rapport aux méthodes de PCR en temps réel actuellement disponibles (Lucchi et al., 2014; ). Les techniques moléculaires sont une procédure coûteuse, y compris le coût du travail et l'accès aux réactifs, par rapport à l'examen des frottis sanguins.

## III .2.Moyens de lutte

### III .2.1.Lutte antivectorielle

Elle est indispensable pour la prévention du paludisme et il est prouvé qu'elle permet de réduire ou d'interrompre la transmission du paludisme quand la couverture est suffisamment large (OMS, 2020). Les deux mesures de lutte antivectorielle de base largement applicables sont les moustiquaires à imprégnation durable (MID) et la pulvérisation d'insecticide à effet rémanent à l'intérieur des habitations (PIH) (OMS, 2020). Près de la moitié (50 %) de toutes les personnes à risque de paludisme en Afrique étaient protégées par une MID en 2017, contre 29 % en 2010 (OMS ,2020).

### III.2.2.Lutte antipaludique

#### III.2.2.1.Chimioprévention

Au Burkina Faso, la prévention du paludisme chez la femme enceinte est prioritaire pour les autorités sanitaires nationales. C'est ainsi qu'avec la chloroquino-résistance ayant atteint 26,9% à 63,3% en 2003 (Sirima et al.,2003)les mesures actuelles de lutte antipaludique reposent en grande partie sur la chimioprévention, incluant un traitement préventif intermittent durant la grossesse et chez les nourrissons (Vandoolaeghe et Schuerman, 2018). Selon les estimations, c'est uniquement au Burkina Faso et en République-Unie de Tanzanie que plus de 50 % des femmes enceintes ont reçu trois doses de traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPIp3) en 2018 (OMS,2019) .

La chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) consiste en une administration intermittente de protocoles thérapeutiques complets d'antipaludiques à base de sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et de l'amodiaquine (AQ) aux enfants pendant la saison du paludisme dans des zones où la transmission a un caractère fortement saisonnier comme dans la sous-région du Sahel de l'Afrique sub-saharienne dont Six pays ont mis en œuvre la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) en 2018, où *P. falciparum* est sensible aux deux antipaludiques(OMS,2013 ,2019). En moyenne, 17 millions d'enfants sur les 26 millions ciblés ont été traités par cycle de CPS (OMS,2019).Il a été démontré qu'administrer un traitement antipaludique à intervalles mensuels pendant cette période protégeait à 75% contre les cas de paludisme non compliqués et sévères chez les enfants de moins de 5 ans (OMS,2012).

- Posologie et fréquence d'administration en fonction de l'âge (OMS,2013) :
  - Nourrissons de 3-11 mois : un demi-comprimé de 153 mg d'AQ une fois par jour pendant trois jours et une dose unique d'un demi-comprimé de 500/25 mg de SP
  - Enfants de 12-59 mois : un comprimé entier de 153 mg d'AQ une fois par jour pendant trois jours et une dose unique d'un comprimé entier de 500/25 mg de SP.

### **III.2.2.2. Chimio prophylaxie antipalustre**

Utilisée surtout pour les personnes qui voyagent en pays endémique, la prophylaxie antipaludique est une méthode basée sur l'administration d'une substance chimique pour empêcher l'apparition du paludisme. Elle permet de supprimer le stade palustre sanguin évitant la déclaration de la maladie.

### **III.3. Les outils disponibles pour l'étude de la sensibilité aux antipaludiques**

#### **III.3.1. Les tests d'efficacité thérapeutiques**

L'efficacité des antipaludiques est mesurée au moyen d'études d'efficacité thérapeutiques qui sont des évaluations prospectives des réponses cliniques et parasitologiques au traitement du paludisme sans complications en observation directe(OMS,2018). Ces études prédisent le risque de résistance aux antipaludiques et pour cela on peut avoir recours à des outils supplémentaires pour confirmer sa présence, tels que des essais in vitro, l'analyse moléculaire et la mesure de la concentration sanguine du médicament.

#### **III.3.2. Les tests ex vivo et in vitro ; mesure de la concentration sanguine**

Ils consistent à mettre en culture, soit directement (test ex vivo ), soit après adaptation en culture continue (test in vitro ), un isolat sauvage de *P. falciparum* en présence d'une concentration croissante d'un antipaludique (Basco,2007). La mesure de la croissance des parasites (microscopique, isotopique, ELISA ou fluorimétrique) en fonction de la concentration d'un antipaludique permet de définir son niveau de sensibilité.

#### **III.3.3. Les marqueurs moléculaires de résistance**

Il s'agit d'un ensemble de marqueurs impliqués dans les mécanismes moléculaires de résistance pour prédire le niveau de résistance d'une population parasitaire aux antipaludiques. L'OMS recommande l'utilisation de marqueurs moléculaires pour surveiller l'émergence de mutations associées à la résistance aux médicaments antipaludiques comme exercice proactif pour détecter l'émergence de la résistance et prévenir le potentiel échec futur du traitement(OMS,2014).Des mutations dans deux gènes ont été impliquées dans la résistance à la chloroquine ,on distingue donc :

- *P. falciparum* chloroquine transporter (Pfcr1) :

Situé sur le chromosome 7, le gène pfcr1 est codé par un gène d'exon 13 à une seule copie, Pfcr1 , comprenant 424 codons . Une mutation ponctuelle au codon 76 (K76T) est un

déterminant clé du phénotype de résistance à la chloroquine (Fidock et al., 2000 ; Petersen et al., 2015).

On pense que l'activité antipaludique de la chloroquine (CQ) se produit dans la vacuole digestive des stades intra-érythrocytaires haploïdes de *P. falciparum*, où le médicament interfère avec la polymérisation et la détoxification des molécules d'hème libérées par la digestion de l'hémoglobine.

- ***P. falciparum* multi-drug resistance 1 (Pfmdr-1) :**

Situé sur le chromosome 5, ce gène code pour un transporteur de type ABC (ATP binding cassette). Les mutations d'acides aminés Pfmdr1 qui ont été impliquées dans les phénotypes multirésistants comprennent les mutations amino-terminales (N86Y et Y184F) et les trois mutations carboxyl-terminales (S1034C, N1042D et D1246Y) sur le gène Pfmdr1.

Dans le cas de l'artémisinine :

- ***Plasmodium falciparum* Kelch 13 (PfK13) :**

Les mutations de la protéine Plasmodium falciparum Kelch 13 (PfK13) dans son domaine d'hélice sont associées à la résistance à l'artémisinine (Siddiqui et al., 2020).

Un rôle central des mutations de l'hélice pfk13 dans la médiation de la résistance au stade de l'anneau a été confirmé par la démonstration que les parasites conçus pour contenir les mutations présentaient une résistance au stade de l'anneau à l'artémisinine, tandis que les parasites avec l'allèle de type sauvage étaient sensibles (Straimer et al., 2015).

Le knock-out conditionnel de PfK13 conduit à un arrêt rapide de la croissance au stade de l'anneau, les parasites se transformant progressivement en formes condensées, ce qui suggère que PfK13 est nécessaire pour la survie du stade de l'anneau et / ou pour la transition du stade de l'anneau au trophozoïte chez *P. falciparum* (Birnbaum et al., 2017).

### **III.3.4.Chimiorésistance**

En 1973, l'Organisation mondiale de la santé a défini la chimiorésistance des parasites du paludisme comme « l'aptitude d'une souche de parasites du paludisme 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 ».

Selon les lignes directrices de l'OMS, la résistance à l'artémisinine est définie comme une clairance parasitaire retardée après un traitement par artésunate en monothérapie ou par une association à base d'artémisinine . La première découverte d'isolats résistants à l'artémisinine au Cambodge en 2008 (Noedl et al.,2008), a été suivie d'une propagation au Myanmar et en Thaïlande.

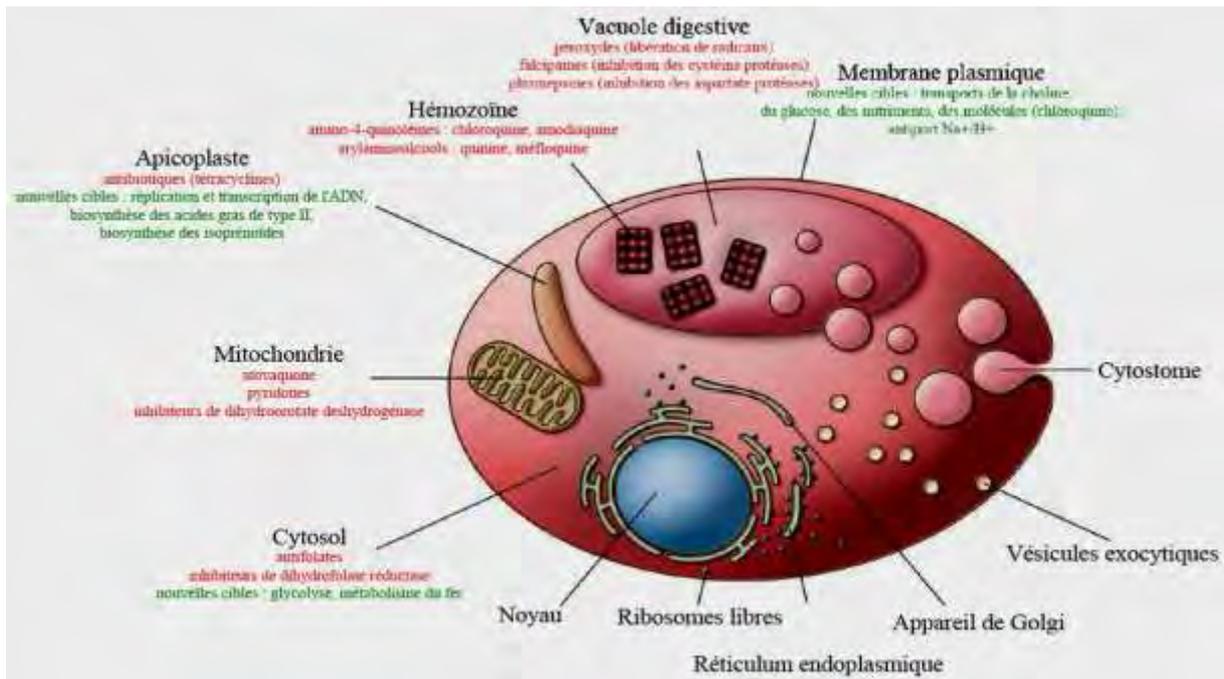
Au Sénégal, lors d'études in vivo de la chimiosensibilité de *P. falciparum*, la gamétocyémie post-thérapeutique à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine a été plus élevée chez les patients avec des infections chimiorésistantes que chez ceux ayant des infections chimiosensibles.

#### **III.4.Essais thérapeutiques**

En l'absence de vaccin les antipaludiques jouent un rôle majeur dans la lutte contre le paludisme.

- Modes d'actions des antipaludiques :

Ils sont classés en fonction de leur mode d'action ou de leur structure chimiques. La chloroquine perturbe le métabolisme des jeunes gamétocytes en cours de gamétocytogenèse et pourrait, ainsi, s'opposer à l'apparition dans le sang périphérique de gamétocytes matures sensibles, mais elle paraît aussi avoir un effet stimulant l'infectivité des gamétocytes eux-mêmes. Pour ce qui est de la sulfadoxine-pyriméthamine un effet double fut constaté : gamétocytogène et sporonticide. Les dérivés de l'artémisine (comme l'arthéméthér) ont aussi un effet gamétocytocide qui réduit, sans la bloquer complètement, l'infectivité post-thérapeutique.



Titre : paludisme, progrès, périls et perspectives d'éradication

Source : (Fidock, 2008)

### III.4 .1.Médicaments couramment utilisés

De nombreux antipaludiques sont utilisés pour lutter contre le paludisme. Ils sont divisés en six groupes comprenant les arylamino-alcools, les 4-aminoquinoléines, les inhibiteurs de la synthèse des folates, les 8-aminoquinoléines, les antimicrobiens, les peroxydes (Zheng et al., 2013). La CQ a été le pilier du traitement du paludisme au cours des 40 dernières années.

- Traitement du paludisme non compliqué

L'OMS recommande les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) pour traiter le paludisme non compliqué causé par *P. falciparum*. La thérapie à base d'ACT est très efficace en raison de son effet sur une gamme plus large de cycles de vie du parasite. En outre, puisqu'aucun autre dérivé de l'artémisinine ne devrait être mis sur le marché avant plusieurs années, leur efficacité doit être préservée (OMS,2018). La durée du traitement ACT est de 3 jours. À l'exception de la combinaison artésunate + sulfadoxine- pyriméthamine (AS+SP), toutes les CTA sont efficaces contre les infections à *P. vivax* au stade sanguin (OMS,2018) . Ils sont également recommandés pour les femmes enceintes au deuxième et au troisième trimestre, mais ne doivent être utilisés au cours du premier trimestre que si d'autres options de traitement sont inappropriés (Zekar et Sharman,2020). Une étude d'efficacité de la pyriméthamine / sulfadoxine par rapport à la chloroquine pour le traitement du paludisme à

falciparum non compliqué chez les enfants de moins de 5 ans montre que PS a une efficacité thérapeutique plus élevée chez les enfants de moins de 5 ans que la CQ (Zheng et al., 2013). Pour les infections à *P. falciparum* sensibles à la chloroquine (y compris femmes enceintes), le médicament de choix est la chloroquine.

- **Traitement du paludisme grave**

Le paludisme grave doit être traité avec de l'artésunate injectable par voie intramusculaire ou intraveineuse pendant au moins 24 heures chez tous les patients (y compris les enfants, les femmes allaitantes et les femmes enceintes à tous les trimestres), suivi d'une CTA complète de 3 jours une fois que le patient peut tolérer des médicaments par voie orale (OMS, 2018 ; Plewes et al., 2019). Les enfants devraient recevoir une dose plus élevée (3 mg / kg de poids corporel par dose) d'artésunate pour assurer l'effet médicamenteux équivalent. La dose pour les enfants plus grands et les adultes est de 2,4 mg / kg de poids corporel par dose. Trois doses d'artésunate intraveineux doivent être administrées: une immédiatement, suivie d'une dose à 12 heures et 24 heures et s'il n'est pas disponible, le médicament recommandé est l'artéméther de préférence à la quinine (Zekar et Sharman, 2020).

### III.4.2. Association thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT)

Thérapies combinées à base d'artémisinine (ACT) ont été recommandées par l'OMS pour le traitement simple *Plasmodium falciparum* malaria depuis 2006.

Le médicament et ses dérivés jouent un rôle majeur dans la destruction de *Plasmodium falciparum* en inhibant l'activité de la phosphatidylinositol-3-kinase (PfPI3K). L'artémisinine, isolée de la plante *Artemisia annua*, et ses dérivés semi-synthétiques (artéméther, artésunate, dihydroartémisinine) sont des médicaments puissants connus pour leur capacité à réduire rapidement le nombre de *Plasmodium* dans le sang des patients atteints de paludisme (Adjuik et al., 2004).

Une des principales priorités de santé publique mondiale consiste à protéger l'efficacité des CTA en tant que traitement actuel de première intention du paludisme à *P. falciparum* (OMS, 2018). Les artémisinines sont dérivées d'extraits d'absinthe douce (*Artemisia annua*) et sont bien établies pour le traitement du paludisme, y compris des souches hautement résistantes aux médicaments (Krishna et al., 2008).

Ils ne doivent pas être utilisés en monothérapie orale car cela favorise l'apparition d'une résistance à l'artémisinine (OMS,2018). Leur efficacité s'explique au fait que ces composés ciblent non seulement les stades tardifs du parasite érythrocytaire, comme la plupart des antipaludiques, mais également les stades précoces (Ouji et al., 2018).

- **Vaccins antipaludiques**

Des progrès scientifiques récents sur l'application du génie génétique ont contribué dans la découverte et le développement des vaccins pré-érythrocytaires contre le paludisme, en particulier sur les vaccins à base de sporozoïtes entiers génétiquement atténués. L'efficacité du vaccin RTS,S/AS01 (Mosquirix, Glaxo Smith Kline Vaccines) , seul vaccin candidat ayant achevé l'évaluation de phase III ciblant le stade pré-érythrocytaire du parasite a ravivé l'intérêt des chercheurs (OMS,2019). A cet effet, RTS,S est un antigène de vaccin antipaludique candidat comprenant un segment carboxy-terminal de la protéine circumsporozoïte de *P. falciparum* (CS) fusionnée à l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) (Nielsen et al., 2018).

Trois pays pilotes – le Ghana, le Kenya et le Malawi – ont commencé à introduire le vaccin en 2019 dans des zones déterminées où la transmission du paludisme est modérée à élever (OMS ,2019).Le vaccin est administré par voie intramusculaire.