

Mem. S 4750

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ANIMALE



Année 2010

N° :34

**Caractérisation génétique des souches de
Plasmodium falciparum isolées chez des patients
atteints de paludisme simple à Thiès en 2009**

MEMOIRE DE DIPLOME DE MASTER II EN BIOLOGIE ANIMALE

Spécialité : PARASITOLOGIE

Présenté et soutenu publiquement le 22 novembre 2010 à la Faculté des Sciences et
Techniques

Par

Baba DIEYE

Né le 25 Octobre 1983 à Dombe (Diourbel - Sénégal)

MEMBRES DU JURY

Président : Pr Bhen Sikina TOGUEBAYE FST/UCAD

Membres : Pr Ngor FAYE FST/UCAD

Dr. Lassana KONATE FST/UCAD

Directeur de Mémoire: Dr Daouda NDIAYE, Maître-assistant, Agrégé de
Parasitologie-Mycologie, FMPOS/UCAD

Co-directeur de Mémoire : Dr Papa Diogoye SENE,
Assistant Parasitologie-Mycologie FMPOS/UCAD



NOTE AUX LECTEURS

Ce document a été numérisé et mis en ligne par la Bibliothèque Centrale de l'Université Cheikh Anta DIOP de DAKAR



Bibliothèque Centrale UCAD

Site Web: www.bu.ucad.sn

Mail: bu@ucad.edu.sn

Tél: +221 33 824 69 81

BP 2006, Dakar Fann - Sénégal



Dédicaces

Je dédie ce travail à

Mes chers parents

Votre présence est toujours source de courage et d'abnégation pour nous. Nous prions le Seigneur TOUT- PUISSANT de vous prêter longue vie afin que vos conseils puissent nous éclairer dans cette vie de lutte.

Mes grand-mères,

Vous me manquez énormément. Que la lumière DIVINE vous trouve là où vous êtes !

Mes tantes Astou SENE et Rokhaya FAYE

S'il y avait possibilité de dire seconde maman, alors je le dirais pour vous.

Mes frères et Sœurs

L'harmonie qui règne entre nous fait sans doute le succès de nos parents. J'aurai aimé mentionné chacun de vous ici. Que l'OMNIPOTENT veille sur vous et vous mène tout un chacun vers la réussite et vous guide vers le droit chemin.

Mes frères et sœurs de l'Association des Elèves et Etudiants

Musulmans du Sénégal

Je remercie ALLAH (SWT) de m'avoir compté parmi vous. Le Sénégal a aujourd'hui plus que jamais besoin de gens au sens de la responsabilité très élevé comme vous. Que vos intentions communes portent ses fruits dans un avenir proche.

L'Association des Jeunes Musulmans de Darou Salam

Ayant fait ta rencontre ignorant, aujourd'hui je suis fier de constater que tu remplis ta mission modestement mais sûrement.

A mes enseignants de l'école primaire : M. THIAM, M.

DIAGNE et M. NDIAYE.

Il y a longtemps, je faisais mes premiers pas à l'école entre vos mains, tout ignorant. Si aujourd'hui, j'en suis à ce stade alors le réflexe voudrait que je saisisse cette occasion pour vous dire merci infiniment.....

A tous mes amis

Remerciements

Je remercie :

- DIEU TOUT-PUISSANT pour m'avoir offert cette chance d'aujourd'hui ;
- Le Professeur Omar NDIR de m'avoir accepté dans son laboratoire ;
- Le Docteur Mbacké SEMBENE, Maître de Conférence, coordonateur du master de biologie animale ;
- Mes parents pour leurs prières ;
- Ma famille toute entière pour son soutien
- Le personnel du laboratoire de parasitologie-mycologie : Dr Mamadou NDIAYE, Major MBAYE, Younouss DIEDHIOU, Lamine NDIAYE, Madame BA, Mame Ndella DIOUF ;
- Mes frères et Amis : Moustapha DIALLO, EL Hadji Malick NDOUR, Alioune THIAM, Seydina NDIAYE, Dame BATHILY, Ousmane BADJI, Sidi Ahmad SAMB, Diogoye SENE, Mamadou DIOP, Mamadou FAYE, Alioune DIOUF Malick SAMB, Adama BEYE, EL Hadji Malick SY CAMARA, Moussa NDIAYE, Youssef TRAORE
- Mes sœurs et amies : Nafi, Seynabou, Penda, Yacine, Ndèye, Amy, Na Fanta, Awa
- Mes camarades de promotions : Malick SARR, Sissao GOUDIABY, Abdou DIONE, Colane FAYE, Fabrice Juliot, André SAGNA, Abdou Aziz, pour vos encouragements

A nos maîtres et juges

A Monsieur Bhen Sikina TOGUEBAYE

Professeur à la Faculté des sciences et Techniques (UCAD)/ Spécialité Parasitologie

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury. Vos hautes qualités scientifiques et votre accessibilité nous ont profondément marqué.

Soyez rassuré cher Maître de notre profonde gratitude.

A Monsieur Professeur Ngor FAYE

Professeur à la Faculté des sciences et Techniques (UCAD)/ Spécialité Parasitologie

Nous ne regretterons jamais d'avoir été à vos côtés. Votre rigueur scientifique, votre grande disponibilité au dialogue et vos conseils nous ont beaucoup aidés. Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Veillez trouvez ici, l'expression de notre très haute considération.

A Monsieur Lassana KONATE

Docteur à la Faculté des Sciences et Techniques/ Spécialité Entomologie Médicale

En acceptant de juger ce travail, vous nous faites un grand honneur. Votre rigueur scientifique et vos qualités humaines ne nous sont pas méconnues.

Veillez trouvez ici, l'expression de notre très haute considération.

A Monsieur Daouda NDIAYE

Docteur en Pharmacie, Maître-assistant Agrégé en Parasitologie-Mycologie (UCAD)

En acceptant de nous confier ce travail, vous nous faites un grand honneur. Votre amour pour la recherche, votre rigueur, vos hautes qualités humaines et votre humilité nous ont beaucoup aidés dans sa réalisation. Merci !

Je vous adresse ici mes sincères remerciements et vous souhaite une excellente carrière dans cette recherche que vous aimez tant.

A Monsieur Papa Diogoye SENE

Docteur en Pharmacie, assistant à la FMPOS/UCAD

Nous ne regretterons jamais d'avoir été à vos côtés. Votre rigueur scientifique et votre amour pour la recherche nous ont beaucoup marqué. Vous nous avez appris beaucoup de choses. Soyez rassuré que nous en ferons bon usage.

Veillez trouvez ici mes sincères remerciements.

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i>	5
Figure 2 : Représentation schématique d'un mérozoïte de <i>Plasmodium falciparum</i>	6
Figure 3 : Représentation schématique des gènes codant pour les antigènes majeurs de surface (MSP-1 et MSP-2) de <i>Plasmodium falciparum</i>	7
Figure 4 : Carte administrative de la ville de Thiès	11
Figure 5 : Papier-filtre contenant du sang parasité	15
Figure 6 : Photo de gel après électrophorèse.....	20
Figure 7 : Fréquences des allèles du MSP-1.....	23
Figure 8 : Fréquences des allèles du MSP-2	23
Figure 9 : Multiplicité de l'infection sur la base du gène MSP-1.....	23
Figure 10 : Multiplicité de l'infection sur la base du gène MSP-2	24
Figure 11 : Fréquences des infections sur la base des gènes MSP-1 et MSP-2	24

Liste des tableaux

Tableau I : Programme et volume réaction de la première amplification	17
Tableau II : Amorces, Programme et volume réaction de la deuxième amplification	18
Tableau III : Répartition des patients selon l'âge et le sexe	21

Liste des Abréviations

A: Adénine
ACT: Artemisinin Combination Therapy
ADN: Acide Désoxyribo-Nucleique
AMA: Apical Merozoite Antigen
C: Cytosine
D.D.T: Dichloro-Diphényl-Trichloréthane
DNTP: di-Nucléotide Tri-phosphate
dATP: di-Adénine Tri Phosphate
dCTP: di-Cytosine Tri Phosphate
dGTP : di-Guanine Tri Phosphate
dTTP: di-Thymine Tri Phosphate
EDTA: Ethylène Diamine Tétracétate
ELISA: Enzym Linked ImmunoSorbent Assay
FS : Frottis Sanguin
G : Guanine
GE : Goutte Epaisse
J : jour
KCl : Chlorure de Potassium
KDa : Kilodalton
MgCl₂ : Chlorure de Magnésium
MILDA : Moustiquaire Imprégné à Longue Durée d'Action
ml : millilitre
mm : millimètre
mn : minute
MSP : Merozoite Surface Protein
O.M.S. : Organisation Mondiale de la Santé
RESA: Ring-infected Erythrocytes Surface Antigen,
SERA : Serine Repeat Antigen
HRP : Histidine Rich Protein
PCR : Polymerase Chain Reaction
QBC : Quantitative Buffy Coat
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SLAP: Section de Lutte Anti-parasitaires
TBE: Tris/Borate/EDTA
TPI : Traitement Préventif Intermittent
TDR : Test de Diagnostic Rapide
UNICEF : Fonds des Nations Unies pour l'Enfance
µl : microlitre

Table des matières

Dédicaces	i
Remerciements	ii
A nos maîtres et juges	iii
Liste des figures et tableaux	iv
Liste des abréviations	v

INTRODUCTION1

PREMIERE PARTIE : RAPPELS SUR LE PALUDISME

1. L'agent pathogène	3
1.1. Classification	3
1.2. Morphologie des quatre espèces de Plasmodium parasites de l'homme	3
1.3. Biologie	3
1.3.1 Habitat	3
1.3.2. Cycle évolutif du parasite	3
1.3.2.1. Le cycle asexué ou schizogonie	3
a. cycle exoérythrocytaire	3
b. cycle intra-érythrocytaire	4
1.3.2.2. Le cycle sexué ou sporogonie	4
1.3.3 Diversité de <i>Plasmodium falciparum</i>	5
1.3.3.1. Le polymorphisme chromosomique	5
1.3.3.2. Un polymorphisme allélique étendu	5
1.3.3.3. Caractères antigéniques	6
1.3.3.3. 1. Le gène MSP -1	7
1.3.3.3.2. Le gène MSP -2	7
2. Le vecteur	7
3. Modes de contamination	8
4. Clinique du paludisme	8
4.1. L'accès simple	8
4.2. Le paludisme grave.....	8

5. Diagnostic biologique	8
5.1. Diagnostic direct (parasitologique ou microscopique)	8
5.2. Diagnostic indirect	8
6. Principes thérapeutiques	8
7. La prophylaxie du paludisme	9
7.1. La lutte anti-vectorielle	9
7.2. La protection de l'homme sain	9
7.3. Le vaccin	9
8. La chimiorésistance	10
8.1 Définition	10
8.2 Mécanismes de la résistance	10
8.3 Facteurs favorisant la survenue de la résistance	10

DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES D'ETUDE

1. Le cadre d'étude	11
1.1. Présentation de la région de Thiès	11
1.2. La Section de Lutte Anti – Parasitaire (SLAP)	11
1.3. Période d'étude	12
1.4. Population d'étude	12
1.5. Critères de sélection	12
1.5.1. Critères d'inclusion	12
1.5.2. Critères d'exclusion	13
2. Matériels	13
3. Méthode	14
3.1. Confection de la goutte épaisse (GE) et du frottis sanguin (FS)	14
3.2. Prélèvement	14
3.3. Confection des prélèvements sanguins des papiers-filtres	15
3.4. Extraction de l'ADN parasitaire	15
3.5. La Polymerase Chain Reaction (PCR)	16
3.5.1 Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR).	16
3.5.2. Amplification des gènes MSP-1 et MSP-2	16
3.5.2.1. Première amplification	16
3.5.2.2. Deuxième amplification	17
3.5.3. L'électrophorèse	18

3.5.3.1. Préparation du gel d'agarose	19
3.5.3.2. Visualisation des bandes	19
3.5.3.3. Interprétation des résultats	19
3.6. Analyse des résultats	20

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats	21
1.1. Caractéristiques de la population d'étude	21
1.2. Résultats parasitologiques	21
1.2.1. Distribution de la parasitémie en fonction du sexe	21
1.2.2. Distribution de la parasitémie en fonction de l'âge	22
1.3 Résultats du génotypage	22
1.3.1. Prévalence des différents allèles des gènes MSP1 et MSP-2	22
1.3.1.1. Le gène MSP-1	22
1.3.1.2. Le gène MSP-2	23
1.3.2. Multiplicité des infections	23
1.3.2.1. Multiplicité des infections liées au gène MSP-1	23
1.3.2.2. Multiplicité des infections liées au gène MSP-2	24
1.3.2.3. Multiplicité des infections sur la base des gènes MSP-1 et MSP-2	24
2. Discussion	25
CONCLUSION	28
BIBLIOGRAPHIE	29

INTRODUCTION

Le paludisme est une parasitose due à des protozoaires du genre *Plasmodium* transmis par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles*, provoquant des fièvres intermittentes et une lyse des globules rouges. C'est l'une des maladies parasitaires les plus fréquentes et la plus meurtrière de toutes les affections humaines. Connue depuis l'antiquité [5], son impact sanitaire et socio-économique n'est plus à démontrer.

Selon l'O.M.S, en 2006, il y a eu 3,3 milliards de personnes à risque ; 247 millions de cas dont un million de décès surtout chez les enfants de moins de cinq ans. En 2008, le paludisme était endémique dans 109 pays dont 45 en Afrique¹.

Au plan socio-économique, ce sont les personnes les plus pauvres qui sont les plus touchées par cette endémie qui en plus entraîne une baisse de 1,3% du taux de croissance des pays endémiques².

A ce jour, d'innombrables efforts sont fournis pour l'éradication de la maladie. Toutefois, ceux-ci sont freinés par plusieurs facteurs dont ceux intrinsèques au parasite : le développement et la propagation des souches résistantes.

En effet, l'utilisation récente des nouvelles techniques immunologiques et de biologie moléculaire a ouvert une nouvelle dimension de la complexité de l'épidémiologie du paludisme.

Ces techniques ont montré que les souches de *Plasmodium falciparum* peuvent se différencier par leurs profils antigéniques [26] et par leur sensibilité ou résistance aux médicaments anti-paludiques [10]. De plus, il a été observé que ces micro-organismes génétiquement différents peuvent coexister dans le sang lors d'une infection.

Le séquençage du gène des protéines majeures de surface du mérozoite (MSP -1 et MSP -2) des isolats de *Plasmodium falciparum* provenant de différentes zones géographiques a montré un grand polymorphisme génétique surtout au niveau des blocs 2 de MSP -1 et 3 de MSP -2 [14].

¹ O.M. S. 2008, World Malaria Report

² O. M. S. / Bureau régional de l'Afrique, 2009, Accélération de la lutte contre le paludisme en vue de son élimination dans la région africaine ; Rapport du Directeur Général

Le polymorphisme très important de ces derniers a fait que les populations plasmodiales présentent une grande diversité génétique et un génotype presque unique pour chaque individu [17].

C'est ainsi que nous nous sommes proposés de caractériser génétiquement les souches de *Plasmodium falciparum* à Thiès en 2009 par le génotypage des gènes du MSP -1 et du MSP -2.

Dans le cadre de cette étude nous nous sommes fixés l'objectif général et les objectifs spécifiques suivants :

Objectif général :

- Contribuer à une meilleure connaissance génétique des souches plasmodiales circulant dans la ville de Thiès ;

Objectifs spécifiques :

- Etudier la fréquence des allèles des gènes MSP-1 et MSP-2;
- Déterminer la complexité des infections palustres à Thiès.

Pour atteindre nos objectifs d'étude, nous nous proposons, le plan suivant :

- ✓ Introduction ;
- ✓ Chapitre I : Synthèse bibliographique sur le paludisme ;
- ✓ Chapitre II : Matériels et Méthodes d'étude ;
- ✓ Chapitre III : Résultats et Discussion ;
- ✓ Conclusion

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE PALUDISME

1. L'agent pathogène

1.1. Classification

Le parasite appartient au *phylum* des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoa*, l'ordre des *Haemosporidae*, la famille des *Plasmodiidae* et au genre *Plasmodium* avec quatre espèces parasites de l'homme : *Plasmodium falciparum*; *P. Malariae* ; *P. vivax*, *P. Ovale*.³.

1.2. Morphologie des quatre espèces de *Plasmodium* parasites de l'homme

Sur frottis sanguin ou goutte épaisse, ils apparaissent avec un noyau rouge et un cytoplasme bleu après coloration à la solution de Giemsa. Tous les stades peuvent être ou non rencontrés : trophozoïte, schizonte, gamétocyte. Chaque espèce dispose également d'un aspect propre par exemple l'aspect en « bague à chaton » pour *Plasmodium falciparum* ; en bande équatoriale pour *P. malariae*.

1.3. Biologie

1.3.1 Habitat

Le parasite est retrouvé au niveau du foie et du sang de l'homme ; au niveau du tube digestif et des glandes salivaires du moustique.

1.3.2. Cycle évolutif du parasite

Les *Plasmodium* sont des parasites dixènes. Les hôtes sont :

- l'homme, chez qui a lieu le cycle asexué ou schizogonie ;
- l'anophèle vecteur, chez qui se déroule le cycle sexué ou sporogonie.

1.3.2.1. Le cycle asexué ou schizogonie

a. cycle exoérythrocytaire

Au cours d'un repas de sang, la femelle d'anophèle infectée injecte à l'homme sain des sporozoïtes qui transitent dans la circulation générale et, en quelques heures, gagnent les hépatocytes. A ce niveau, ils entrent dans une phase de multiplication asexuée (schizogonie) aboutissant à la formation d'éléments plurinucléés appelés schizontes intra-hépatiques ou corps bleus. La rupture de l'hépatocyte conduit à la libération de plusieurs dizaines de

³ Malaria 1998: Parasites, biology, pathogenesis and protection; Edited by Irwin W. Sharman, ASM Press, Washington DC.

milliers d'éléments uni-nuclées ou mérozoïtes dans la circulation. Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure 8 à 15 jours, selon les espèces. Chez *P. vivax*, il existe des formes de persistance hépatique ou hypnozoïtes (**figure1**).

b. cycle intra-érythrocytaire

Seule cette phase sanguine est responsable des symptômes qui peuvent être d'intensité variable. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte vont débiter un cycle sanguin asexué (**figure 1**). Une fois dans le sang, les mérozoïtes pénètrent activement dans les hématies et se différencient au sein de la vacuole parasitophore en anneaux, puis en trophozoïtes, stade à partir duquel une intense phase répllicative commence. Ils divisent plusieurs fois leurs noyaux donnant naissance à des schizontes sanguins. Chaque schizonte libère ensuite 8 à 32 mérozoïtes qui rapidement réinfestent des érythrocytes sains (**figure 1**). L'ensemble de ce cycle dure 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* ; 72heures pour *P. malariae*. Après plusieurs cycles certains mérozoïtes vont se transformer en éléments sexuels appelés gamétocytes qui vont poursuivre leur évolution chez l'insecte vecteur. Ces gamétocytes apparaissent généralement dans la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison.

1.3.2.2. Le cycle sexué ou sporogonie

Une fois ingérés par l'anophèle vecteur (**figure 1**), les gamétocytes parviennent dans l'estomac du moustique ; ils y subissent un processus d'exflagellation donnant naissance à des microgamètes mobiles. Quant aux gamétocytes femelles, elles augmentent de taille donnant naissance à des macrogamètes. De la rencontre entre gamètes mâles et femelles, résulte la formation d'un oeuf ou zygote mobile appelé ookinète; celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique et est suivie par plusieurs milliers de mitoses qui conduisent à la formation de sporozoïtes (**figure 1**). Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils seront injectés avec la salive lors d'une piqûre infestante. Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule en 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et les espèces en cause.

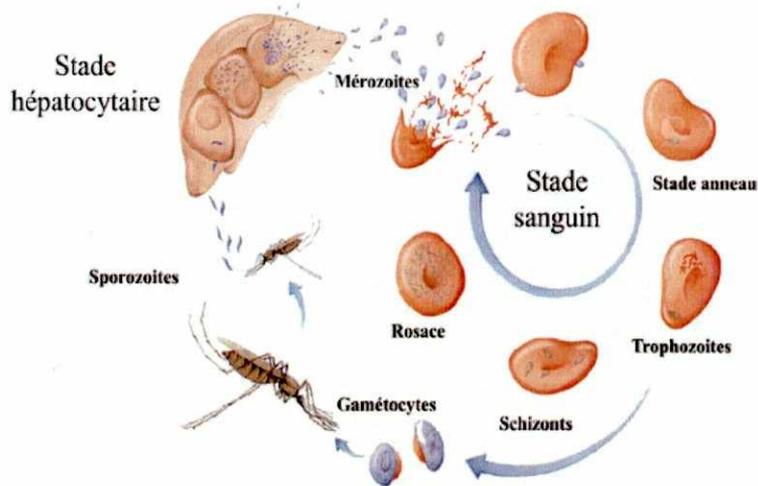


Figure 1 : Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*

Source : <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/ImmStr/recherches/recherches-new-malaria.html#anchor213115>
 visité le 06/09/10

1.3.3 Diversité de *Plasmodium falciparum*

A la complexité de la réponse immunitaire et de sa mise en place effective, répond, au niveau du parasite, une diversité antigénique, phénotypique et moléculaire. La diversité des populations parasitaires fait intervenir plusieurs facteurs dont: un important polymorphisme chromosomique et allélique et la variation antigénique. [2].

1.3.3.1. Le polymorphisme chromosomique

Les régions subtélomériques des chromosomes sont le site de fréquents réarrangements génétiques chez de nombreux organismes et *P. falciparum* ne déroge pas à la règle. La délétion de l'extrémité des chromosomes est un événement qui contribue de façon significative au polymorphisme de taille des chromosomes. Des variations sont observées au cours de la multiplication asexuée des parasites ou *in vitro*, mais également lors de la reproduction sexuée. L'instabilité de l'extrémité des chromosomes est en partie imputée à la présence de motifs répétés. Ces répétitions sont le site privilégié de recombinaison intra- et interchromosomiques à l'origine du polymorphisme de taille des chromosomes [2].

1.3.3.2. Un polymorphisme allélique étendu

La diversité antigénique de *P. falciparum* est le reflet d'un polymorphisme allélique important. Plusieurs études et techniques ont permis de mettre en évidence le polymorphisme allélique, que ce soit par Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ou par typage génétique d'isolats de zone d'endémie palustre par Polymerase Chain Reaction (PCR) ainsi que le séquençage de plusieurs allèles de certains gènes comme MSP-1. Chez *P. falciparum*,

de nombreux antigènes codés par des gènes en copie unique possèdent un très grand nombre d'allèles, pouvant, parfois, être regroupés en familles alléliques de séquences primaires très différentes (comme MSP-1 et MSP2...) [2]. Les bases structurelles de ce polymorphisme sont multiples. Il y a, bien sûr, les mutations ponctuelles. Cependant *P. falciparum* utilise de manière intensive d'autres mécanismes afin de générer une telle diversité. Beaucoup d'antigènes comportent des séquences répétées ; suivant les allèles, celles-ci peuvent varier en nombre, en taille ou même de cadre de lecture. Enfin la dégénérescence des répétitions assure un degré de diversité supplémentaire. [2].

1.3.3.3. Caractères antigéniques

La forte pression de sélection exercée par la diversité de l'hôte, a contraint le parasite à une meilleure adaptabilité (au sens de meilleur potentiel d'adaptation) et a sélectionné la mise en place d'un processus de variation phénotypique programmée : la variation antigénique. Chez le mérozoïte, forme d'invasion des érythrocytes, on rencontre plusieurs structures antigéniques (**figure 2**) qui interviendraient dans le processus d'invasion du globule rouge. On peut citer le Ring-infected Erythrocytes Surface Antigen (RESA), la Serine Repeat Antigen (SERA), l'Histidine Rich Protein (HRP-1 et HRP-2), Apical Merozoite Antigen-1 (AMA-1) et surtout les Merozoite Surface Protein (MSP) dont MSP-1, MSP-2.

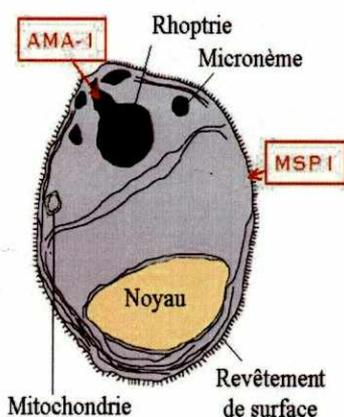


Figure 2: Représentation schématique d'un mérozoïte de *Plasmodium falciparum* : la localisation de quelques antigènes de surface est indiquée en rouge.

Source : <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/ImmStr/recherches/recherches-new-malaria.html#anchor213115> visité le 18 09.10

1.3.3.3. 1. Le gène MSP -1

Situé sur le chromosome 9, il code pour une protéine d'environ 200 KDa qui est synthétisée au cours de la schizogonie. Le gène MSP-1 peut être subdivisé en 17 blocs (**figure 3**) variables semi-conservés ou conservés [24]. De tous, le bloc 2 est le plus polymorphe et présente trois types d'allèles K-1, Mad 20 et Ro33 [4, 16].

1.3.3.3.2. Le gène MSP -2

Il est situé sur le chromosome 2 et code pour une protéine d'environ 55kDa. Cette protéine est caractérisée par des extrémités N terminal et C terminal très conservées et induisant des réponses immunes. Le gène est situé au niveau du chromosome 2 et subdivisé en 5 blocs (**figure 3**). Le bloc 3 ou central de ce gène est identifié plus polymorphe avec deux familles d'allèles FC27 et IC3D7 [8].

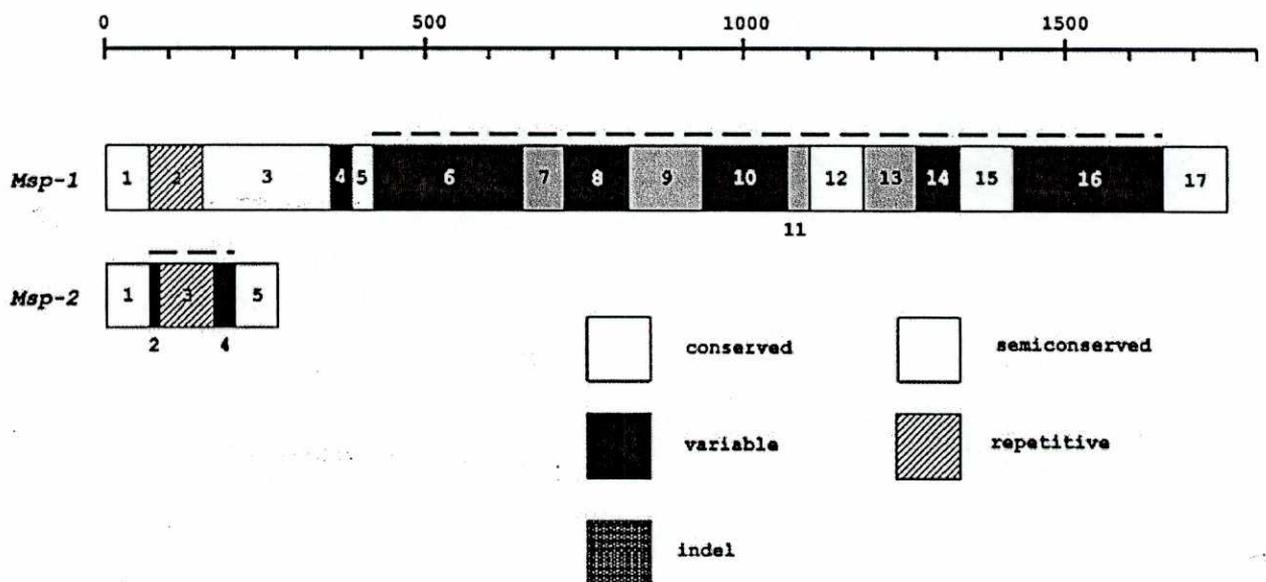


Figure 3: Représentation schématique des gènes codant pour les antigènes majeurs de surface (MSP -1 et MSP-2) de *Plasmodium falciparum*. [22].

2. Le vecteur [7,9].

Les vecteurs du paludisme sont des insectes anophèles. Les anophèles appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, la classe des Insectes, l'ordre des Diptères, la famille des *Culicidea* et la sous-famille des *Anophelinae*. Au Sénégal, vingt espèces d'anophèles sont actuellement connues. Mais, comme dans les autres régions de l'Afrique sub-saharienne, les principaux vecteurs du paludisme sont *Anophèles gambiae* s.l et *An .funestus*.

3. Modes de contamination

Le principal mode de transmission est l'apanage des femelles hématophages d'anophèles qui au cours de leur repas sanguin, injectent leur salive riche en sporozoïtes dans le sang de l'hôte. Les parasites peuvent aussi être transmis par voie placentaire de la mère au fœtus (paludisme congénital), par partage d'une seringue souillée ou par transfusion sanguine (paludisme post transfusionnel) bien que ce dernier moyen de transmission soit assez rare.

4. Clinique du paludisme

4.1. L'accès simple

Ces accès sont fréquents en zone d'endémie et se caractérisent par la succession de trois stades : frisson, chaleur, sueur.

4.2. Le paludisme grave

Si l'accès palustre présente des complications, on parle de paludisme grave. Ces complications sont: neuropaludisme avec ou sans coma, anémie normocytaire profonde, insuffisance rénale aiguë, œdème pulmonaire, hypoglycémie, etc.

5. Diagnostic Biologique

5.1. Diagnostic direct (parasitologique ou microscopique)

C'est le diagnostic de certitude, il permet la mise en évidence des parasites dans le sang. Il repose sur 2 techniques complémentaires : la goutte épaisse (GE) et le frottis sanguin (FS)⁴.

5.2. Diagnostic indirect

C'est l'ensemble des autres méthodes basées sur des tests moléculaires ou immunologiques. Ce sont la Polymerase Chain Reaction (PCR), les Tests de Diagnostic Rapide (TDR), la séro-immunologie, la Quantitative Buffy Coat (QBC).

6. Principes thérapeutiques

On distingue selon leurs modes d'action, les schizonticides et les gamétocides. Le développement grandissant de résistance vis-à-vis des premiers antipaludiques (quinine, amino-4-quinoléine ect.) a fait qu'aujourd'hui ce sont les associations médicamenteuses surtout à base d'Artémisinine (ACT) qui sont utilisées pour le traitement du paludisme.

⁴ Institut National de Santé Publique du Québec : cahier stage ; avril 2005

Celles-ci sont actuellement les médicaments les plus efficaces contre le paludisme. [1, 18, 19]. Exemple d'ACT :

Artéméther + Luméfantrine

Artésunate + Mefloquine

Artésunate + Amodiaquine

Artésunate + pyronaridine

Artésunate + sulfadoxine/ Pyriméthamine.

Artésunate + Luméfantrine

Cette dernière association est présentement utilisée pour le traitement du paludisme simple.

7. La prophylaxie du paludisme

C'est un ensemble de mesures et d'actions destinées à éviter l'infestation et/ou la survenue de la maladie. Les initiatives portent essentiellement sur la lutte anti-vectorielle et la protection de l'homme sain.

7.1. La lutte anti-vectorielle

Elle utilise une diversité de produits insecticides en pulvérisation intra et extra domiciliaires et le désherbage pour lutter contre les adultes et la destruction des gîtes larvaires par dessèchement des points d'eau. Cependant les anophèles deviennent de plus en plus résistants aux insecticides usuels ce qui pose un problème pour la lutte anti vectorielle.

7.2. Protection de l'homme sain.

Elle repose principalement sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA).

Suite à l'apparition de la chimiorésistance aux antipaludéens, la chimioprophylaxie n'est plus de rigueur et est réservée aux femmes enceintes dans le cadre du Traitement Préventif Intermittent (TPI).Celui ci utilise l'association Sulfadoxine – Pyriméthamine

7.3. Le vaccin

A ce jour, il n'existe aucun vaccin pour prévenir le paludisme. Toutefois, des études très poussées en ce sens sont établies avec le séquençage complet du génome plasmodiale, et les

progrès dans l'immunologie du *Plasmodium*. Ce qui a abouti à la mise au point du vaccin RTS, S de GlaxoSmithKline Biologicals qui est en phase de test avancé.

8. La chimiorésistance

8.1 Définition

La chimiorésistance est définie par l'O.M.S 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» ⁵[12].

8.2 Mécanismes de la résistance [3].

Elle fait intervenir plusieurs mécanismes:

- La diminution de l'affinité de la molécule pour les récepteurs érythrocytaires
- La réduction des mécanismes de concentration
- L'altération des enzymes parasitaires par mutation génétique.

8.3 Facteurs favorisant la survenue de la résistance [3]

Il existe plusieurs facteurs :

- ✓ Pression médicamenteuse
- ✓ Non-observance du traitement
- ✓ Automédication
- ✓ Prescription irrationnelle des antipaludiques
- ✓ Concentration insuffisante du médicament
- ✓ Les mouvements de population humaine et/ou anophélienne ;
- ✓ Le niveau de transmission ;
- ✓ Le degré d'immunité de l'hôte.

⁵ O.M.S. 1973 : Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. *Série de rapports techniques n° 259, 128p*

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES D'ETUDE

1. Le cadre d'étude

1.1. Présentation de la région de Thiès

Thiès est située au centre de la zone soudano-sahélienne, elle se caractérise par une pluviométrie inférieure à 600 mm par an. L'acquisition de la prémunition est tardive vers 10 ans. Des formes graves de paludisme se voient également à tout âge. L'endémicité palustre et la recrudescence saisonnière cumulée à la forte densité de la population, la mobilité et l'accessibilité font de Thiès un site sentinelle tel que défini par l'O.M.S.

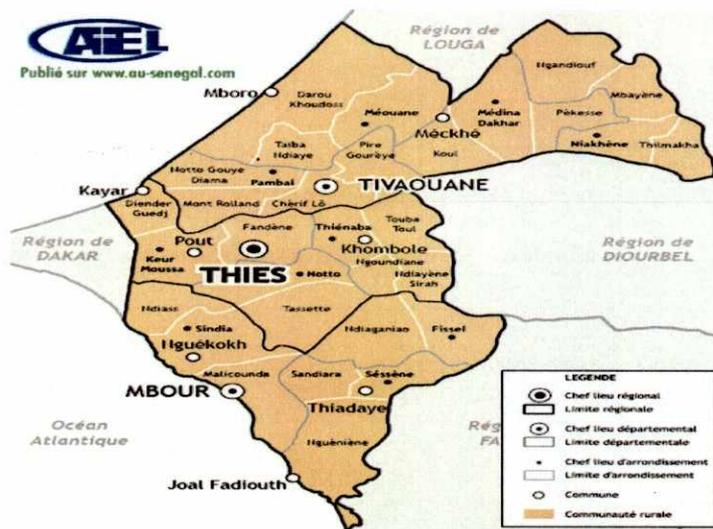


Figure 4: Carte administrative de la ville de Thiès

Source : <http://www.au-senegal.com/Carte-administrative-de-la-region,40.html> visité le 02 novembre 2009

1.2. La Section de Lutte Anti – Parasitaire (SLAP)

Les échantillons de l'étude ont été collectés à la Section de Lutte Anti – Parasitaire localisée au centre ville de la commune de Thiès.

Créée en 1953 par un accord tripartite signé entre l'OMS, l'UNICEF et le gouvernement français, le Service de Lutte Anti – Paludique (SLAP), de son premier nom, avait comme objectif de parvenir à l'éradication du paludisme qui fut à l'époque l'une des endémies parasitaires majeures du pays.

C'est en 1977, que le SLAP sera érigé en Section de Lutte Anti – Parasitaire par l'arrêté ministériel n°11609/MSPAS/DSP du 23 septembre 1977 lui assignant ainsi une mission

beaucoup plus large qui consiste entre autres à arrêter la transmission des maladies parasitaires notamment le paludisme, les bilharzioses, l'onchocercose, la filariose lymphatique, la trypanosomiase humaine africaine, etc.

1.3. Période d'étude

Notre étude est réalisée durant la période du 28 septembre au 28 novembre 2009.

1.4. Population d'étude

Elle est constituée par les patients venus en consultation durant notre période d'étude et répondant aux critères de sélection définis par l'OMS. Ces patients ont été pris dans les deux sexes, âgés entre 5 et 70 ans.

1.5. Critères de sélection

Seuls les malades hébergeant *P. falciparum* uniquement ont été sélectionnés en tenant compte des critères d'inclusion et d'exclusion définis par l'OMS avec une approbation du comité d'éthique du ministère de la santé du Sénégal.

1.5.1. Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion sont les suivants :

- Une infestation à *P. falciparum* uniquement, confirmée par une goutte épaisse ;
- Une densité parasitaire comprise entre 1000 et 100000 formes asexuées/ μ l de sang pour les régions à transmission faible à modérée et entre 2000 et 200000 formes asexuées/ μ l de sang dans les régions à transmission élevée ;
- Une absence de signes généraux de danger chez les enfants de moins de 5 ans ou d'autres signes de paludisme à *P. falciparum* graves et compliqués tels que définis actuellement par l'OMS ;
- Une température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C ;
- Une absence d'antécédents de réactions d'hypersensibilité aux médicaments évalués ;

Les patients sélectionnés sont suivis cliniquement et parasitologiquement à j0 j3, j7, j14 et j28.

1.5.2. Critères d'exclusion

- Absence de consentement du malade ou de ses parents ou tuteurs pour les mineurs.
- Grossesse et allaitement
- Critères d'exclusion propres à certains médicaments
- Accès difficile au centre de santé

2. MATERIELS D'ETUDE

Pour la réalisation de notre étude, la liste de matériels ci-dessous a été utilisée.



Confection goutte épaisse et frottis sanguin

- Alcool 70° et 90°
- Coton cardé
- Lames porte objet
- Solution de Giemsa
- Microscope optique (LEICA)
- Eau de robinet
- Huile à immersion
- Gouttes de sang
- Vaccinostyle

Prélèvement de sang veineux

- Tube EDTA de 5ml
- Garot
- Vacutener
- Tampon alcool

Confection des papiers -filtres

- Sang total
- Pipette 1000µl
- Embouts 1000µL
- Papiers- filtres

Extraction de l'ADN à partir des papiers- filtres

- Alcool 95°

- Bougie
- Hole-puncher
- Kit QIAGEN QIAamp
- Vortex
- Microcentrifugeuse
- Four électronique
- Tube eppendorf
- Portoirs
- Pipettes 50µl, 100µl, 200µl ; 1000µl
- Embouts : 50µl, 100µl, 200µl, 1000µl
- Papier filtre
- Incubateur

Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Amorces (O, K, M, R, F, I)
- Taq polymerase
- Eau distillée
- ADN
- Tubes PCR
- Pipettes 10µl, 20µl
- Embouts 10µl, 20µl
- Portoir

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Thermocycler <p>Gel agarose, électrophorèse et révélation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Agarose - Balance électronique - Scalpel - Erlenmeyer - TBE | <ul style="list-style-type: none"> - Bromure d'éthydiu - Plaques d' électrophorèse - Four électronique - Marqueur de poids moléculaire - Contrôles positif et négatif - Voltmètre - Chambre post PCR avec lumière UV |
|--|---|

3. METHODES

3.1. Confection de la goutte épaisse (GE) et du frottis sanguin (FS)

Les signes cliniques du paludisme n'étant pas spécifiques, une GE et un FS sont confectionnés pour le diagnostic de certitude.

- **Goutte épaisse**
 - ✓ Recueillir sur une lame dégraissée une grosse goutte de sang ;
 - ✓ Défibriner à l'aide d'une autre lame sur un diamètre de 1cm ;
 - ✓ Laisser sécher ;
 - ✓ Déshémoglobiner avec l'eau du robinet pendant 5 à 10 mn ;
 - ✓ Recouvrir la lame de solution de Giemsa pendant 10 mn (Giemsa rapide) ;
 - ✓ Laver avec l'eau de robinet.
- **Frottis sanguin**
 - ✓ Déposer une goutte de sang sur une lame dégraissée ;
 - ✓ Etaler à l'aide d'une autre lame et Laisser sécher ;
 - ✓ Fixer avec l'alcool méthylique pendant 3 minutes ;
 - ✓ Recouvrir la lame de solution de Giemsa pendant 10 mn (Giemsa rapide) ;
 - ✓ Laver avec l'eau de robinet.

3.2. Prélèvement

Un prélèvement de sang veineux (5ml sur tube EDTA) est effectué chez les personnes ayant une goutte épaisse positive.

3.3. Confection des prélèvements sanguins des papiers-filtres

Avec le sang du prélèvement, chacune des zones délimitées du papier-filtre est soigneusement recouverte de sang (**figure 5**). Le papier est ensuite séché à l'air libre puis conservé dans un sachet en présence d'un dessiccateur. Nous avons utilisé du papier QIAcard FTA® lot N° 93030.

Les papiers de mêmes que les prélèvements ont été numérotés puis acheminés au laboratoire de biologie moléculaire de l'hôpital Aristide Le Dantec.

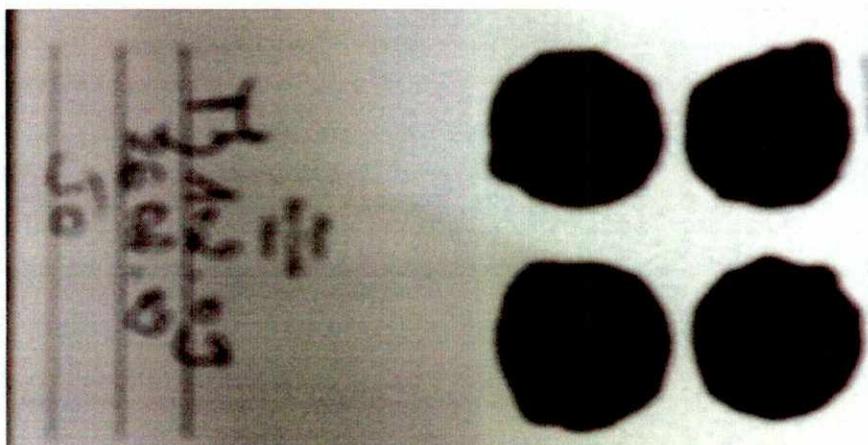


Figure 5: Papier-filtre contenant du sang parasité

3.4. Extraction et purification de l'ADN parasitaire

L'extraction est réalisée avec le kit QIAGEN QIAamp lot 41829453.

Le protocole :

- Mettre 3 confettis du papier-filtre dans un tube Eppendorf de 1,5ml et ajouter 180µl de Buffer ATL puis mélanger ;
- Incuber à 85°C pendant 10mn et centrifuger brièvement pour récupérer les gouttelettes dues à la vapeur. ;
- Ajouter 20µl de protéinase K et mélanger au vortex ;
- Incuber à 56°C pendant une heure puis centrifuger brièvement ;
- Ajouter 200µl de Buffer AL et mélanger par vortex ;
- Incuber à 70°C pendant 10mn et centrifuger brièvement ;
- Ajouter 200µl d'éthanol (96-100%) et bien mélanger par vortex ;

- Avec précaution mettre le mélange obtenu dans la colonne QIAamp (fournie par le fabricant du Kit) en évitant de toucher les rebords du capuchon ;
- Fermer le capuchon puis centrifuger à 8000 tours pendant 1mn ;
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 2ml et jeter le filtrat ;
- Ouvrir avec précaution le capuchon puis ajouter 500µl de Buffer AW1 sans toucher les rebords du capuchon ;
- Centrifuger à 8000 tours pendant 1mn ;
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 2ml et jeter le filtrat ;
- Ouvrir avec précaution le capuchon puis ajouter 500µl de Buffer AW2 sans toucher les rebords du capuchon ;
- Centrifuger à vitesse maximale 14000 tours/ minute pendant 3 minutes ;
- Placer la colonne dans un tube eppendorf de 1,5ml et jeter le tube contenant le filtrat ;
- Ajouter 150µl de Buffer AE ou de l'eau distillée, incuber à la température ambiante pendant 1mn puis centrifuger à 8000 tours/mn pendant 1 mn ;
- Conserver l'ADN à -20°C jusqu'à utilisation.

3.5. La Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.5.1. Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR).

Découverte en 1985, cette réaction de polymérisation en chaîne est une technique révolutionnaire qui a beaucoup apporté à la science. Elle permet d'amplifier de façon exponentielle une séquence génomique cible. Le principe est simple et basé la synthèse d'un nouveau fragment d'ADN à partir d'une matrice à l'aide d'une amorce spécifique, de nucléotides et d'enzyme.

3.5.2. Amplification des gènes MSP-1 et MSP-2

Pour l'étude du polymorphisme des gènes MSP-1 et MSP-2, nous avons utilisé la technique de la PCR nichée (nested PCR). Elle consiste en une série consécutive de deux réactions de PCR au moyen d'amorces différentes entre les deux séries. Les fragments d'ADN amplifiés lors de la première PCR servent de matrice pour la deuxième réaction ce qui augmente la probabilité d'amplifier de faible quantité d'ADN contenues dans le prélèvement initial.

3.5.2.1. Première amplification

Elle consiste à amplifier les blocs 2 et 3 des gènes MSP-1 et MSP-2 respectivement. Les amorces de la réaction sont les suivantes :

MSP1 : amorce sens : 5' -CTA GAA GCT TTA GAA GAT GCA GTA TTG-3' ; amorce anti-sens : 5' -CTT AAA TAG TAT TCT AAT TCA AGT GGA TCA-3'

MSP-2 : amorce sens : 5' -ATG AAG GTA ATT AAA ACA TTG TCT ATT ATA- 3' ; amorce anti-sens : 5' -CTT TGT TAC CAT CGG TAC ATT CTT-3'.

Tableau I : Programme et volume réactionnel de la première amplification.

Programme		Volume réactionnel	
1. 94°C	5mn	Gotaq	10µl
2. 94°C	1mn	Amorce O	2µ
3. 58°C	2mn	Eau	3µl
4. 72°C	2mn	ADN	5µl
5. retour à 2 et répéter 29 fois			
6. 72°C	3mn	Volume total	20µl
7. 4°C	48heures		
8. fin du programme			

Nb : l'amorce O est un mélange contenant les amorces sens et anti-sens des deux gènes.

3.5.2.2. Deuxième amplification

Il consiste à génotyper les allèles K1, Mad 20 et Ro33 pour MSP-1 et FC27, IC3D7 pour le MSP-2 en utilisant le produit de la première PCR.

Le tableau ci-dessous donne le programme ainsi que les volumes réactionnels.

Tableau II : Amorces, programme et volume réactionnel de la deuxième amplification

MSP1	K1	Amorce sens	5' -AAA TGA AGA AGA AAT TAC TAC AAA AGG RGC-3'	
		Amorce anti-sens	5' -GCT TGC ATC AGC TGG AGG GCT TGC ACC AGA-3'	
	Mad20	Amorce sens	5' -AAA TGA AGG AAC AAG TGG AAC AGC TGT TAC-3'	
		Amorce anti-sens	5' -ATC TGA AGG ATT TGT ACG TCT TGA ATT ACC- 3'	
	Ro33	Amorce sens	5' -TAA AGG ATG GAG CAA ATA CTC AAG TTG TTG- 3'	
		Amorce anti-sens	5' -CAT CTG AAG GAT TTG CAG CAC CTG GAG ATC- 3'	
MSP2	FC27	Amorce sens	5' -AAT ACT AAG GTA GGT GCA TAT GCT CCA-3'	
		Amorce anti-sens	5' -TTT TAT TTG GTG CAT TGC CAG AAC TTG AAC-3'	
	IC3D7	Amorce sens	5' -AGA AGT ATG GCA GAA AGT AAC CCT TCT ACT-3'	
		Amorce anti-sens	5'-GAT TGT AAT TCG GGG GAT TCA GTT TGT TCG-3'	
Programme		Volume réactionnel		
1. 95°C	5mn	Gotaq		10µl
2. 94°C	1mn	Primers		1µl
3. 61°C	2mn	Eau		6µl
4.72°C	2mn	ADN		3µl
5. retour à 2 et répéter 30 fois				
6. 72°C	3mn			
7. 4°C	48 heures			
8. fin du programme		Volume total		20µl

3.5.3. L'électrophorèse

Elle est utilisée pour déterminer la taille et la concentration de l'ADN amplifié. En présence d'un courant électrique, les fragments migrent en fonction de leurs poids moléculaires sur un gel.

3.5.3.1. Préparation du gel d'agarose

- Mettre 1.5 g de gel d'agarose dans 200 ml d'une solution de 5×TBE puis chauffer pendant 3 minutes à 100°C ;
- laisser refroidir à 50°C et ajouter 1 µl d'éthidium bromate ;
- couler dans la plaque à électrophorèse et laisser solidifier.

3.5.3.2. Migration du produit de PCR

- ✓ Déposer le gel dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE dilué à 1/10 ;
- ✓ Déposer 10 µl du produit de la deuxième PCR dans les puits du gel d'agarose en double ;
- ✓ Déposer 10µl d'un marqueur de poids moléculaire de 100 paires de bases ainsi que 10µl du contrôle positif et du contrôle négatif ;
- ✓ Soumettre à un courant électrique pendant 1h à 1h 20mn.

3.5.3.3. Visualisation de la bande

Elle se fait à l'aide d'un lecteur de gel qui est muni d'une lampe UV et utilise les propriétés du bromure d'éthidium : le bromure d'éthidium a la propriété de s'intercaler entre les fragments d'une molécule et de produire une fluorescence s'il est éclairé par une lumière ultra-violette. Ce qui permet de visualiser les fragments d'ADN matérialisés par une bande fluorescente sur le gel.

3.5.3.4. Interprétation du résultat de l'électrophorèse

La présence d'un allèle est matérialisée par une bande fluorescente. La présence de deux allèles d'un même gène est synonyme d'une poly-infection.

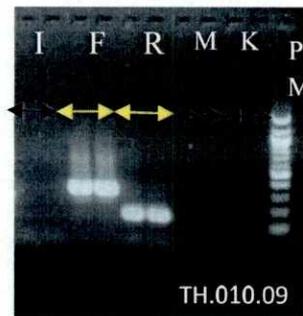


Figure 6: Photo de gel après électrophorèse. *TH.010.09* est le numéro du patient ; *PM* le marqueur de poids moléculaire ; *K, M, R, F* et *I* les allèles dont *R* et *F* sont visualisé pour cet isolat.

3.6. Analyse des résultats

Les résultats obtenus sont saisis sur Excel pour les besoins de nos analyses.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. RESULTATS

1.1. Caractéristiques de la population d'étude

Pour la réalisation de notre étude, nous avons travaillé sur 53 isolats provenant de sujets ayant un paludisme simple et remplissant les critères d'inclusion. Ces sujets étaient venus en consultation lors de notre séjour à Thiès.

Comme le montre le tableau III, 54,7% des patients sont de sexe masculin contre 45,3% pour le sexe féminin soit une sex-ratio de 1,21 en faveur des hommes. Le nombre de patients est cependant très inégalement réparti entre les 3 intervalles ; on retrouve le plus grand nombre dans l'intervalle [16 à 69 ans] avec 42 patients soit 79,2%. Les patients de moins de 10 ans sont les moins nombreux avec seulement 3,8% de représentativité.

Tableau III : Répartition des patients selon l'âge et le sexe

AGE	SEXE				TOTAL	
	MASCULIN		FEMININ		NBRE	%
	NBRE	%	NBRE	%		
< 10 ans	1	1,9	1	1,9	2	3,8
[10 à 15 ans]	7	13,2	2	3,8	9	17
[16 à 70ans]	21	39,6	21	39,6	42	79,2
Total	29	54,7	24	45,3	53	100

1.2. Résultats parasitologiques

La parasitémie moyenne de la population d'étude est de 1,8%. Les parasitémie maximale et minimale sont respectivement 5 et 0,05%.

1.2.1. Distribution de la parasitémie en fonction du sexe

La parasitémie moyenne des hommes (2%) est plus élevée que celle des femmes (1%).

1.2.2. Distribution de la parasitémie en fonction de l'âge

Les parasitémies moyennes sont 0,43% ; 1% et 2% respectivement pour les tranches d'âges de 6 à 9ans, 10 à 15ans et 16 à 70ans.

1.3. Résultats du génotypage

Tous les, 53 échantillons ont donné des résultats exploitables aussi bien pour le MSP-1 que pour le MSP-2.

1.3.1. Prévalence des différents allèles des gènes MSP-1 et MSP-2

1.3.1.1. Le gène MSP-1

On remarque une prédominance de l'allèle K1 suivi de Mad20 et Ro33 avec des fréquences de 68,33% ; 16,67% et 15%, respectivement (**figure 7**).

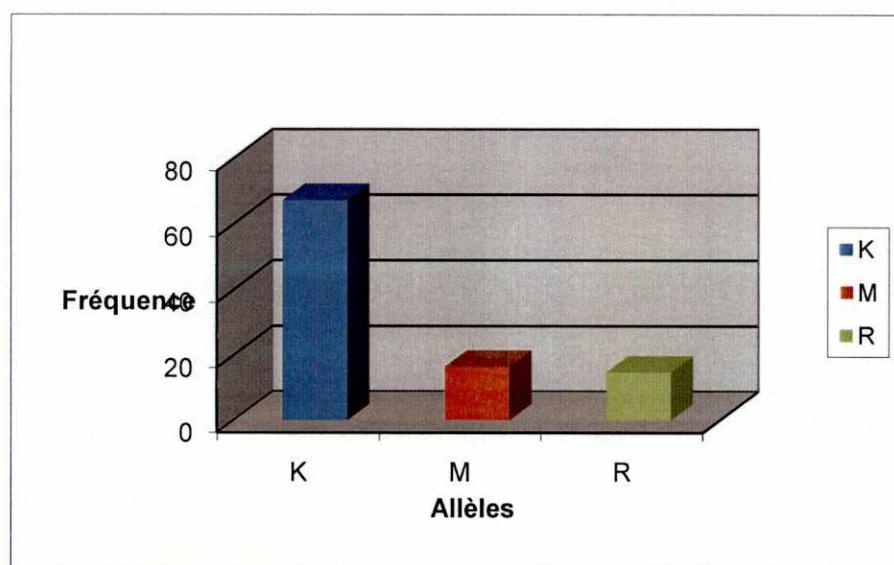


Figure 7: Fréquence des allèles du MSP-1

1.3.1.2. Le gène MSP-2

On note, **figure 8**, une prédominance de l'allèle IC3D7 (63,75%) sur l'allèle FC27 (36,5%).

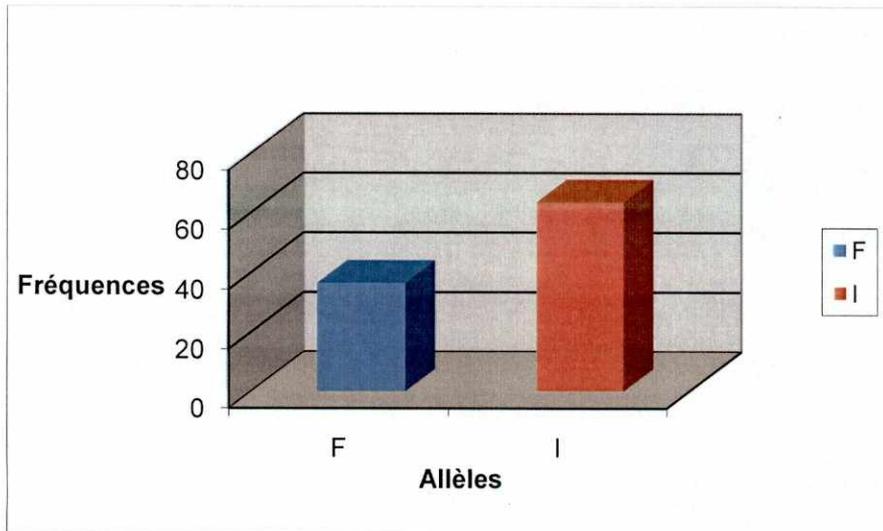


Figure 8 Fréquence des allèles du MSP-2

1.3.2. Multiplicité des infections

1.3.2.1. Multiplicité des infections liées au gène MSP-1

On constate, **figure 9**, que ce sont les infections simples avec 86,8% qui sont plus importantes que les infections mixtes (13,2%).

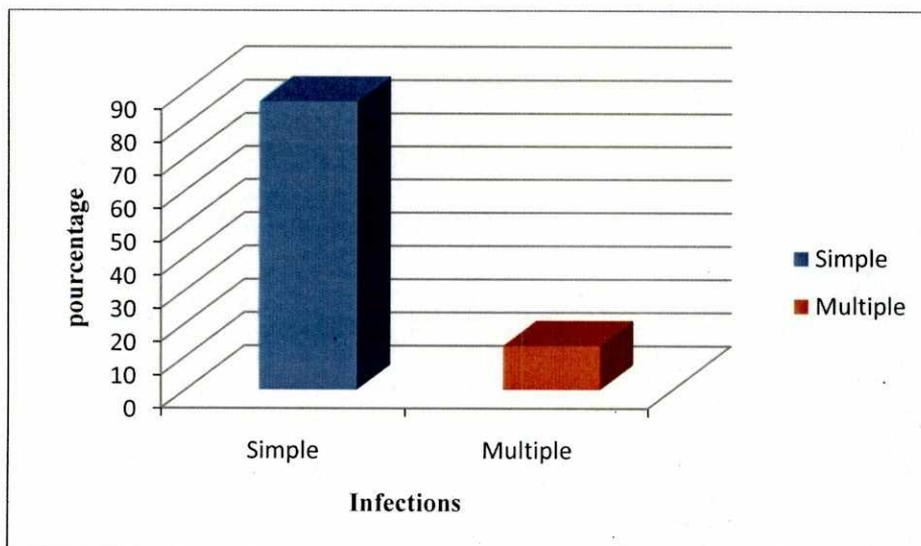


Figure 9 : Multiplicité de l'infection sur la base du gène MSP-1.

1.3.2.2. Multiplicité des infections liées au gène MSP-2

Les infections simples avec 81,13% sont plus fréquentes que les infections multiples 18,87% (figure 10).

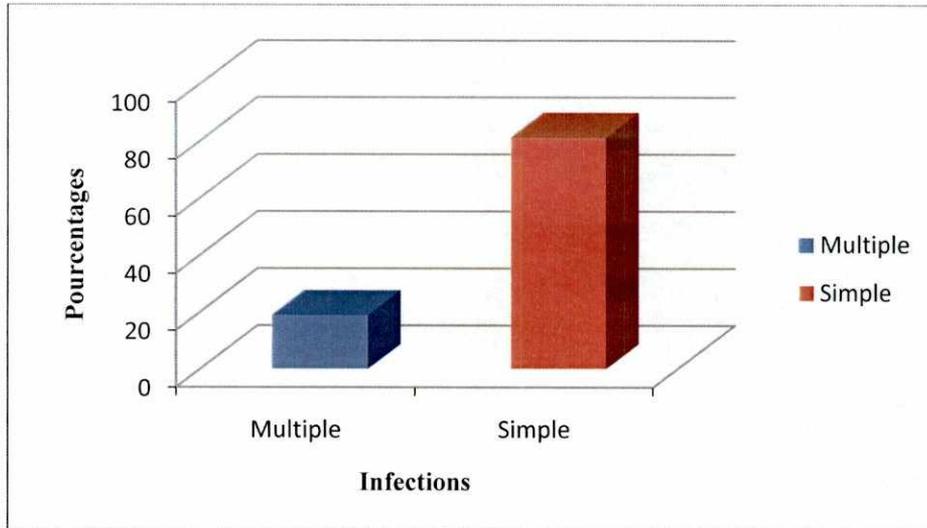


Figure 10 : Multiplicité de l'infection sur la base du gène MSP-2.

3.3.2.3. Multiplicité des infections sur la base des gènes MSP-1 et MSP-2

On note (figure 11) que les infections simples (68%) sont plus fréquentes que les infections mixtes (32%).

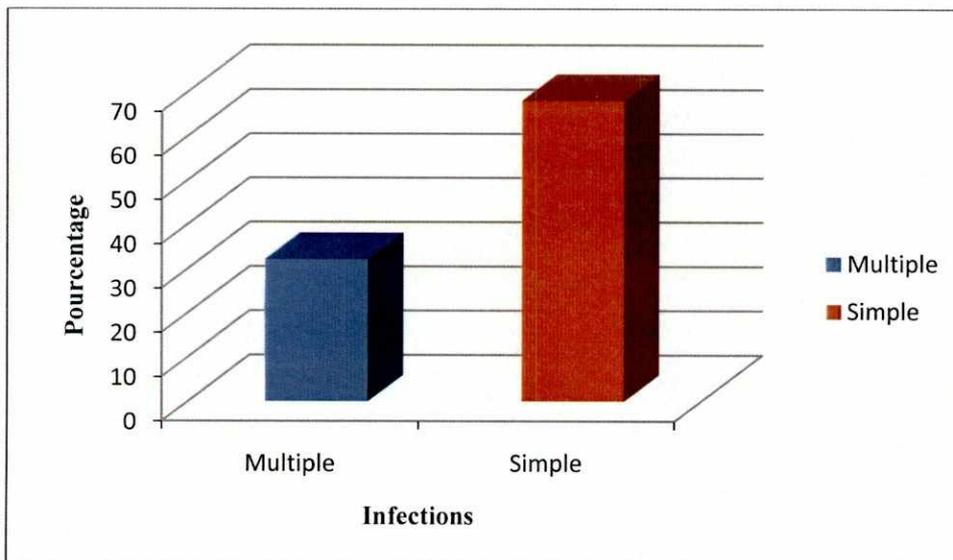


Figure 11 : Multiplicité de l'infection selon MSP-1 et MSP-2

2. DISCUSSION

Le site d'étude, la ville de Thiès, n'a pas été choisi au hasard mais constitue un site sentinelle tel que décrit par l'O.M.S (cf. site d'étude).

Le recrutement a été fait au hasard dans le but d'obtenir le maximum de diversité génétique possible.

Quant à la technique utilisée pour caractériser nos populations, la PCR nichée, elle est sensible, spécifique très simple à réaliser comparée au séquençage et au clonage par exemple. Cependant, tout comme les autres techniques de biologie moléculaire, elle nécessite beaucoup de précautions pour éviter les contaminations.

La caractérisation génétique des populations de *Plasmodium falciparum* à Thiès en 2009 nous a permis d'obtenir des résultats similaires et des résultats contradictoires à ceux d'autres études au Sénégal et ailleurs.

Pour le MSP-1, nous avons constaté une forte prédominance de l'allèle K1 par rapport aux allèles Mad20 et Ro33 qui sont presque également répartis dans la population. Des résultats similaires ont été obtenus par **LY (2005)** à Thiès avec 61,9% pour l'allèle K-1, 20% pour l'allèle Mad20 et 19% pour l'allèle Ro33. A Vélingara, Pikine et Passy, le même auteur (**LY, 2005**) avait aussi noté une plus grande représentativité de l'allèle K1 suivi de Ro33 tandis que Mad20 était minoritaire. Avec des proportions variables, une telle distribution allélique a été également obtenue au Burkina Faso par **ROSALIE (2006)** : K1 28,1%, Mad20 10,3% et Ro33 3,4%. En Inde, **ROUT et al., (2009)** avaient obtenus : K1 49,5% ; Mad20 29,4% et Ro33 21,1%.

Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que la présence de l'allèle K1 conférerait une résistance aux souches qui le possèdent. Cette hypothèse peut être corroborée par les résultats de **ROSALIE (2006)** qui avait montré qu'avant et après administration de traitement, le nombre de clones de cet allèle restait le même, contrairement au Mad20 et Ro33 pour lesquels le nombre de clones étaient réduits.

Toujours pour ce qui est du MSP -1, des résultats différents des nôtres ont été obtenus au Sénégal, au Mali, et au Pakistan. Des études menées à Richard- Toll (**LY, 2005**) avaient permis de noter une plus grande représentativité de l'Allèle Ro33 (53,1%) suivi de K1 (44,9%). A Missira au Mali (**HOUSSEIN, 2004**) avait obtenu : 38,3% pour K1, 20,8% pour

Mad20 et 57,4% pour Ro33. Au Pakistan **NAJIA et al., (2010)** avaient montré que l'allèle Mad20 (46%) était plus représenté suivi de K1 (26%).

Ces résultats semblent montrés que la fréquence des allèles varie avec la localité ; laquelle hypothèse peut être appuyée par nos résultats qui ont permis de constater qu'en 2005 et en 2009, la distribution des allèles est la même pour Thiès. Par ailleurs, dans des études menées entre deux zones, rurale et urbaine du Burkina Faso, **SOULAMA et al., (2009)** avaient constaté que l'allèle Mad 20 était plus représenté en zone urbaine qu'en zone rurale.

Pour le MSP-2, l'allèle IC3D7 est le plus rencontré dans notre étude. Des résultats similaires avaient été obtenus au Sénégal et ailleurs. **LY (2005)** avait obtenu à Thiès (64% pour IC3D7), Vélingara (68% pour IC3D7), Pikine (62% pour IC3D7), Passy (58% pour IC3D7) et Richard-Toll (73% pour IC3D7). A Niakhar, **VAFA et al., (2008)** avaient obtenu 35 % pour IC3D7 et 25% pour FC27 avant la saison des pluies ; 33 et 24% respectivement pour IC3D7 et FC27 après la saison des pluies. Des études faites au Burkina ont donné 35,1% pour IC3D7 et 6% pour FC27 (**ROSALIE 2006**). Cela pourrait s'expliquer là aussi par une « fitness » plus importante liée à l'allèle IC3D7.

En Inde, **ROUT et al., (2009)** avaient noté une plus grande représentativité de l'allèle FC 27 (52,6%) comparé à IC3D7 (47,4%) tandis qu'au Pakistan, des proportions presque égales, 44 et 40% respectivement pour FC27 et IC/3D7 avaient été obtenues par **NAJIA et al., (2010)**. Ce qui, tout comme le MSP-1, pose l'hypothèse d'un probable influence de la localité ; laquelle hypothèse peut être consolidée par les résultats de **SOULAMA et al., (2009)** qui avaient noté que l'allèle IC3D7 était plus représenté en zone urbaine comparé à FC 27 au Burkina Faso.

La présence d'infections multiples est aussi notée dans notre étude avec cependant une faible représentativité, comparée aux infections simples. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **LY 2005** à Thiès et Vélingara (60% d'infections multiples), à Pikine (53% d'infections multiples), à Passy (67% d'infections multiples) et à Richard-Toll (57% d'infections multiples) ; à Niakhar avec le MSP-2, **VAFA et al., (2008)** avaient obtenu 64 et 87% d'infections multiples avant et après la saison des pluies respectivement. A Bangui (République Centrafricaine), une forte prévalence des infections multiples a été notée : 42,7%, 72,7% et 86,4% respectivement avec MSP-1 et MSP-2 et avec la combinaison MSP-1 MSP-2 (**DOLMAZON et al., 2008**).

Ces résultats pourraient s'expliquer par le niveau de transmission. En effet, plus ce niveau est élevé plus les infections multiples sont importantes et inversement.

CONCLUSION

Le paludisme est la maladie parasitaire qui affecte le plus l'humanité et ceci depuis bien des décennies. Son éradication est aujourd'hui au cœur des préoccupations des organismes internationaux ainsi que des pays endémiques. Ce qui justifie les innombrables efforts fournis en ce sens notamment pour ce qui est de la recherche. Toutefois une meilleure connaissance du parasite serait d'un grand atout pour la mise au point de médicaments efficaces et d'avoir une idée sur la population plasmodiale dans le cadre de la recherche vaccinale. C'est dans ce cadre, que nous avons étudié la distribution génétique des souches plasmodiales infectantes dans la ville de Thiès. Cette caractérisation génétique a été faite par le génotypage de deux marqueurs très polymorphes : MSP-1 et MSP-2.

Des résultats que nous avons obtenus, il en ressort que :

- la distribution des allèles de MSP-1 et MSP-2 à Thiès est hétérogène avec une prédominance K1 et IC3D7 ;
- la multiplicité de l'infection y est faible ce qui donne ainsi une idée sur le niveau de transmission dans cette ville ;
- La combinaison du génotypage de MSP-1 et MSP-2 permet une meilleure détection de la multiplicité de l'infection.

Sur la base de ces résultats, il nous semble utile d'envisager :

- Une cartographie génétique des souches plasmodiales pour voir si la distribution génétique est homogène pour tout le pays et au cas contraire voir les facteurs d'hétérogénéité;
- Une étude du polymorphisme allélique des gènes MSP-1 et MSP-2 dans le cadre d'une évaluation de la chimio sensibilité *in vivo* avant et après administration de traitement, ce qui permettrait de confirmer ou d'infirmer la puissance des allèles K1 et IC3D7.

BIBLIOGRAPHIE

1. **AMBROISE-THOMAS P. 2000.** Traitement du paludisme : prévenir les résistances par les associations d'antipaludiques. *Med Trop*, 60 : 219-220
2. **BISCOFF E. 2001.** Etude de deux membres de la superfamille PF60/VAR *Plasmodium falciparum* exprimés par recodage traductionnel programmé. *Thèse de doctorat de l'université Paris 7.*
3. **BOUCHAUD O., DOUMBO O., GAYE O., MBACHAM W., Ogotu B., SOUMARE M., TALISUNA A. 2008.** Mémento thérapeutique du paludisme en Afrique. *Première Edition.*
4. **CERTA U., ROTMANN D., MATILE H., REBER-LISK R. 1987.** A naturally occurring gene encoding the major surface antigen precursor p 190 of *Plasmodium falciparum* lacks tripeptide repeats; *EMBO J*, 6: 4137-4142
5. **COX F. E. G. 2001.** History of Human Parasitology. *Clin. Microbiol Rev*, vol. 15, n°4: pp. 595-612.
6. **DOLMAZON V., MATSIKA-CLAQUIN M.D., MANIRAKIZA A., YAPOU F., NAMBOT M., MENARD D. 2008.** Genetic diversity and genotype multiplicity of *Plasmodium falciparum* in symptomatic individuals living in Bangui (CAR). *Acta Tropica* 107 : 37-42.
7. **FAYE O., KONATE L., GAYE O., FONTENILLE D., MOLEZ J.F. 1995.** Quelques aspects épidémiologiques du Paludisme au Sénégal N°5: juin-juillet-août.
8. **FENTON B., CLARK J.T., WILSON C.F., McBRIDE J.S., WALLIKER D. 1989.** Polymorphism of the 35 and 48 kilodalton *Plasmodium falciparum* mérozoïte surface antigen *Mol. Biochem. Parasitol* , 34: 79-86.
9. **FONTENILLE D., COHUET A., AWONO-AMBENE P.H., ANTONIO-NKONDJIO C., KENGNE P., DIA I., BOCCOLINI D., DUCHEMIN J-B., RAJAONARIVELO V., DABIRE R., ADJA-AKRE M., CEAINU C., LE GOFF G., SIMARD F. 2003.** Systématique et biologie des Anopheles vecteurs de *Plasmodium* en Afrique, données récentes. *Med Trop*, 63 : 247-253.
10. **FRUH K., DOUMBO O., MULLER HM., KOITA O., McBRIDGE, CRISANTI A., TOURE Y., BUGAND H. 1991.** Human Antibody responds to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium* in Strain specific and short lived. *Infect Immun*, 59 :1319-24.
11. **HOUSSEIN Y.D. juin 2004.** Etude épidémiologique et moléculaire du paludisme à *Plasmodium falciparum* par la MSP-1 à Missira (Cercle de Kolokani) ; Université de Bamako ; Thèse de Doctorat d'Etat en Médecine.
12. **LE BRAS J. 1999.** Chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*. *Méd. Mal Infect*, 29 Suppl. 3 : 274-281.
13. **LY O. 2005.** Caractéristiques génétiques des populations de *Plasmodium falciparum* au Sénégal (MSP-1 et MSP-2). Mémoire d'ingénieur technologique en génie biologie et sanitaire *UCAD-ESP 2005* : p 51-52.
14. **MILLER L.H., ROBERT T., SHAHABUDDIN M., McCUTCHAN T. F. 1993.** Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem. Parasitol.*, 59 : 1-14.

15. NAJIA K.G., MARTENSSON A., URSING J., JAFRI S., BERECZY S., HUSSAIN R., BEG M. A.2010. Genetic diversity among *Plasmodium falciparum* field isolates in Pakistan measured with PCR genotyping of the Merozoite Surface Protein 1 and 2. *Malaria Journal*, 9:1, 1-6.
16. PETERSON G., COPPEL R. L., MONOLEY M.B., KEMP D.J. 1988. Third form of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2644-2667.
17. PEYERL-HOFFMANN G., JELINEK T., KILIAN A., KABAGAMBE G., METZGER W.G., AND VON SONNENBURG F. 2001. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. *Tropical Medicine and International Health*, volume 6 no 8 pp 607-613.
18. PILLOY J. 2006. La lutte contre le paludisme. Le marché de l'artémisinine et des dérivés. *Med Trop*, 66 : 554-557.
19. PRADINES B., VIAL H., OLLARIA P. 2003. Prophylaxie et traitement du paludisme : problèmes, récents développements et perspectives *Med Trop*, 63 : 79-98.
20. ROSALIE N.2006. Etude du polymorphisme du Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1) et du Merozoite Surface Protein- 2 (MSP-2) de *Plasmodium falciparum* au Burkina Faso. *Mémoire de D.E.A de Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques. Institut du Développement Rural*, 38-39.
21. ROUT R., MOHAPATRA B.N., KAR K.S., RANJIT M. 2009. Genetic complexity and transmissibility of *Plasmodium falciparum* parasite causing severe malaria in Central – east Coast India. *Tropical Biomedicine*, 26 (2): 165-172.
22. ROY S.W., FERREIRA M.U., and HARTL D.L. 2008. Evolution of allelic dimorphism in malarial surface antigens. *Heredity*, 100: 103-110.
23. SOULAMA I., NEBIE I., OUEDRAOGO A., GANSANE A., DIARRA A., TIONO A.B., BOUGOUMA E.C., KONATE A.T., KABRE G.B., TAYLOR Rj. W., SIRIMA S.B. 2009. *Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in a urban and rural setting in Burkina Faso. *Malaria Journal*, 8:135.
24. TANABE K., MACKAY M., GOMAN M., SCAIFE J.G. 1987. Allelic dimorphism in a surface antigen of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.*, v195: p 3707-3717.
25. VAFA M., TROYE-BLOMBERG M., ANCHANG J., GARCIA A., MIGOT-NABIAS F.2008. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants. *Malaria Journal* 7:17.
26. WANG P., LEE C.S., BAYOUMI R., DJIMDE A., DOUMBO O., SWEDBERG G., DAO L.D., MSHINDA H., TANNER M., WATKINS W.M., SIMS P.F., HYDE J.E. nov 1997. Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored and dihydrofolate reductase alleles in a large of fields samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol*, 89: 161-77.

Caractérisation génétique des souches de *Plasmodium falciparum* isolées chez des patients atteints de paludisme simple à Thiès en 2009

Résumé

Dans le but d'apporter plus d'informations pour une prise en charge efficace du paludisme à Thiès (voire Sénégal), nous avons essayé de faire une caractérisation génétique des souches de *Plasmodium falciparum* en circulation dans cette ville. Pour se faire, nous avons utilisé la technique de la Polymérase Chain Reaction (PCR) pour génotyper deux marqueurs génétiques très polymorphes, le MSP-1 et le MSP-2.

Nous avons travaillé sur un échantillon de 53 isolats d'hommes et de femmes âgés entre 5 et 70ans et atteints de paludisme simple.

Les résultats obtenus nous ont permis de constater une forte prédominance des allèles K1 (68,33%) de MSP-1 et IC3D7 (63,75%) de MSP-2. Nous avons également noté la présence d'infections multiples avec cependant une faible prévalence (32%) comparées aux infections simples (62%).

Ces résultats nous permettent de conclure à une hétérogénéité de la distribution souches plasmodiales et à une baisse probable du niveau de transmission dans cette zone.

Abstract

To give some information in order to take care of malaria efficiently in Thiès (Sénégal), we have tried to do genetic characterization of malaria parasites in this area. To do so, Polymerase Chain Reaction (PCR) technique is used to type two high polymorphic markers, the merozoite surface protein - 1 and the merozoite surface protein -2 (MSP-1 and MSP-2).

53 isolates from men and women with uncomplicated malaria were assessed. The limits of age were 5 and 70 years old.

Our results have allowed us to notice a high predominance of K1 (68.33%) allele of MSP-1 and IC3D7 (63.95%) allele of MSP-2. Multiplicities of infections are also noticed with a low rate of mixed infections that is to say 32% compared to simples infections (68%).

These interesting finding allow us to conclude that there are an heterogeneity of the widespread of *Plasmodium* stokes in this area and an expected decrease of the level of transmission.

Keys Words: *Paludisme - Thiès - PCR - MSP-1 - MSP- 2*