

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AID	Aspersion Intra Domiciliaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
AQ	Amodiaquine
CIVD	Coagulation Intra Vasculaire Disséminée
CTA	Combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine
CPS	Chimioprévention du Paludisme Saisonnier
DP	Densité Parasitaire
DO	Densité Optique
ECT	Echec Clinique Tardif
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPT	Echec Parasitologique Tardif
ETP	Echec Thérapeutique Précoce
LAV	Lutte Anti Vectorielle
M	Mole
mM	Millimole
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Polymérase Chain Réaction
<i>Pfdhfr</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate réductase
<i>Pfdhps</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydroptéroate synthétase
<i>Pfmdr</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> multi drug resistance
<i>Pfcrt</i>	<i>Plasmodium falciparum chloroquine transporter</i>
<i>Pfcytb.</i>	<i>Plasmodium falciparum cytochrome b</i>
<i>P.falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P.knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
QBC	Quantitative Buffy Coat
RCPA	Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SP	Sulfadoxine Pyriméthamine
SSOP	Sequence Specific Oligonucleotide Probes
TDR	Test Diagnostic Rapide
TMAC	Chlorure de tétraméthylammonium

TIE
TPI
UV

Taux d'Inoculation Entomologique
Traitement Préventif Intermittent
Ultra Violet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Définition du Paludisme grave ou compliqué à <i>Plasmodium falciparum</i> d'après l'OMS (2002)	Page 9
Tableau II	Les principaux antipaludiques utilisés pour le traitement du paludisme.	Page 13
Tableau III	Marqueurs de résistance associés aux antipaludiques	Page 22
Tableau IV	Programme de la première amplification du gène <i>Pfcrt</i> .	Page 31
Tableau V	Programme de la deuxième amplification du gène <i>Pfcrt</i> .	Page 31
Tableau VI	Programme de la première amplification du gène <i>Pfmdr</i> .	Page 32
Tableau VII	Programme de la deuxième amplification du gène <i>Pfmdr</i> .	Page 33
Tableau VIII	Prévalence des mutations du gène <i>Pfmdr</i> en 2013 et 2014.	Page 41
Tableau IX	Prévalence des mutations simples du gène <i>Pfdhfr</i> en 2013 et 2014.	Page 42
Tableau X	Prévalence des simples mutations du gène <i>Pfdhps</i> en 2013 et 2014	Page 43
Tableau XI	Prévalence des mutations multiples à la SP en 2013 et 2014	Page 44

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Répartition géographique du paludisme dans le monde	Page 5
Figure 2	<i>Anophèles gambiae</i> vecteur responsable du paludisme	Page 7
Figure 3	Cycle biologique du <i>Plasmodium falciparum</i> chez l'homme et l'anophèle.	Page 8
Figure 4	Districts sanitaires de la région médicale de Tambacounda.	Page 25
Figure 5	Présentation et situation du district sanitaire de Saraya	Page 26
Figure 6	Thermocycleur pour l'amplification de l'ADN.	Page 30
Figure 7	Générateur et cuve de migration.	Page 34
Figure 8	Procédure de la réalisation de la SSOP ELISA.	Page 37
Figure 9	Distribution de la population recrutée lors de enquêtes ménages de 2013 et 2014.	Page 39
Figure 10	Prévalence palustre des différentes enquêtes ménages de 2013 et 2014.	Page 40
Figure 11	Prévalence des haplotypes de <i>Pfcrt</i> en 2013 et 2014.	Page 41
Figure 12	Prévalence de la triple mutation du gène <i>Pfdhps</i> en 2013 et 2014	Page 44

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	2
I- RAPPEL SUR LE PALUDISME	5
I.1. Définition	5
I.2. Epidémiologie	5
I.3. Diagnostic	8
I.4. La lutte antipaludique.....	12
II- RESISTANCES DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> AUX ANTIPALUDIQUES	16
II.1. Définition de la résistance	16
II.2. Emergence et propagation de la résistance.....	16
II.3. Surveillance de l'efficacité et de la résistance des antipaludiques.....	18
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL	5
I. METHODOLOGIE	24
I.1. Cadre de l'étude	24
I.2. Type d'étude.....	26
I.3. Déroulement de l'étude.....	26
I.3.1. Echantillonnage.....	26
I.4. Analyse des données.....	38
I.5.Considérations éthiques	38
II.RESULTATS.....	39
II.1. Caractéristiques de la population d'étude	39
II.2. Prévalence palustre	39
II.3 Prévalence des mutations associées à la résistance à l'AQ et à la CQ	40
II.3.1- Prévalence de la mutation 86Y du gène <i>Pfmdr1</i> associée à la résistance à l'AQ	40
II.3.2- Prévalence des mutations 76T du gène <i>Pfcrt</i> associée à la résistance à la CQ.....	41
II.4. Prévalence des marqueurs moléculaires associés à la résistance de <i>P.falciparum</i> à la SP	42
II.4.1. Prévalence des simples mutations de résistance à la SP	42
II.4.2. Combinaison des mutations associées à la résistance de <i>P. falciparum</i> à la SP	43
DISCUSSION	24
CONCLUSION	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	50

INTRODUCTION

Le paludisme demeure un véritable problème de santé publique, malgré les nombreux efforts déployés pour le contrôle de cette maladie. En 2015, on estimait à 3,2 milliards de personnes, soit près de la moitié de la population mondiale, exposées au paludisme dans le monde. Dans cette même année, 214 millions nouveaux cas de paludisme et environ 438 000 décès liés à cette parasitose ont été enregistré dans le monde (5). Quinze pays, principalement en Afrique sub-saharienne dont le Sénégal, comptaient 80% des cas de paludisme et 78% des décès dans le monde (5). On enregistre, chez les enfants de moins de cinq ans, plus des deux tiers du total des décès liés au paludisme dans le monde. Cependant, entre 2000 et 2014, le taux de mortalité des moins de 5 ans avait baissé de 65%, ce qui représentait 5,9 millions de vies d'enfants épargnées, sur 6,2 millions de vies épargnées au total (5). Au Sénégal, où le paludisme sévit de manière endémique avec une recrudescence saisonnière, cette pathologie est la cause de plus de 20 % des décès qui surviennent chez les enfants de moins de 5 ans, constituant ainsi la première cause de mortalité (31). La plupart des cas de décès surviennent au sein de la communauté ou quelques fois dans les heures qui suivent l'arrivée du patient dans les structures de santé du fait d'une prise en charge tardive (11).

Ainsi l'OMS recommande depuis plusieurs années de nombreuses stratégies pour la lutte et le contrôle voire l'élimination du paludisme. Parmi ces stratégies nous avons :

- Pour la lutte anti vectorielle : l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII/ MILDA) et les pulvérisations intradomiciliaires à effet rémanent ;
- L'accès rapide au diagnostic (grâce aux Test de Diagnostic Rapide : TDR) et le traitement précoce (avec des combinaisons à bases de dérivés d'Artémisinine : CTA) des cas confirmés

- le Traitement Préventif Intermittent (TPI) avec la SP, chez la femme enceinte,
- Plus récemment la chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) associé à l’Amodiaquine (AQ) chez les enfants de moins de 5 ans (**2, 21 et 31**).

Pour mieux contrôler le paludisme chez les enfants, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) du Sénégal met en œuvre la CPS depuis 2013 dans 4 régions au sud du pays. Cette zone est caractérisée par une prévalence palustre élevée chez les enfants et une transmission saisonnière du paludisme. Toutefois l’efficacité continue de cette stratégie dépend fortement de la sensibilité des parasites aux molécules utilisées (SP+AQ). Plusieurs études ont montré que la CPS avait un effet limité sur le développement et la propagation de la résistance (**27**). Cependant peu de données sont disponibles sur l’impact de la mise en œuvre à grande échelle de cette stratégie et à long terme de la CSP sur le développement de la résistance.

C’est ainsi qu’il était important de monitorer de manière régulière les marqueurs moléculaires de résistance associés à la résistance de *P. falciparum* aux médicaments utilisés dans le cadre de la CSP. C’est dans contexte que nous avons mené notre étude dont l’objectif général était de déterminer l’impact de la CPS sur le développement de la résistance de *P. falciparum* aux médicaments (SP+AQ) utilisés pour la CPS. Les objectifs spécifiques de notre étude étaient de :

- Déterminer la prévalence des mutations associées à la résistance de *P.falciparum* à la SP et situées sur les codons 51, 59 et 108 du gène *Pfdhfr* et sur les codons 437 et 540 du gène *Pfdhps*
- Déterminer la prévalence des mutations associées à la résistance de *P.falciparum* à l’AQ et situées sur le codon 86 du gène *Pfmdr* et sur les codons 72 et 76 du gène *Pfcrt*

PREMIERE PARTIE :

GENERALITES

I- RAPPEL SUR LE PALUDISME

I.1. Définition.

Le paludisme ou malaria est une maladie parasitaire fébrile provoquée par des protozoaires du genre *Plasmodium* (*P.*) et transmise par la piqûre d'un insecte vecteur appartenant au genre *Anopheles* (1. Pages F et 153-61.).

I.2. Épidémiologie.

I.2.1 Répartition géographique

Le paludisme est pratiquement inexistant à une altitude supérieure à 2000 mètres. Sa répartition géographique théorique va de 60°C de latitude Nord, à 40°C de latitude Sud. Il recouvre en fait « la ceinture de pauvreté du monde », qui concerne actuellement plus de cent pays, essentiellement les plus pauvres d'Afrique, d'Asie, d'Amérique du Sud et du Centre (26, 33).

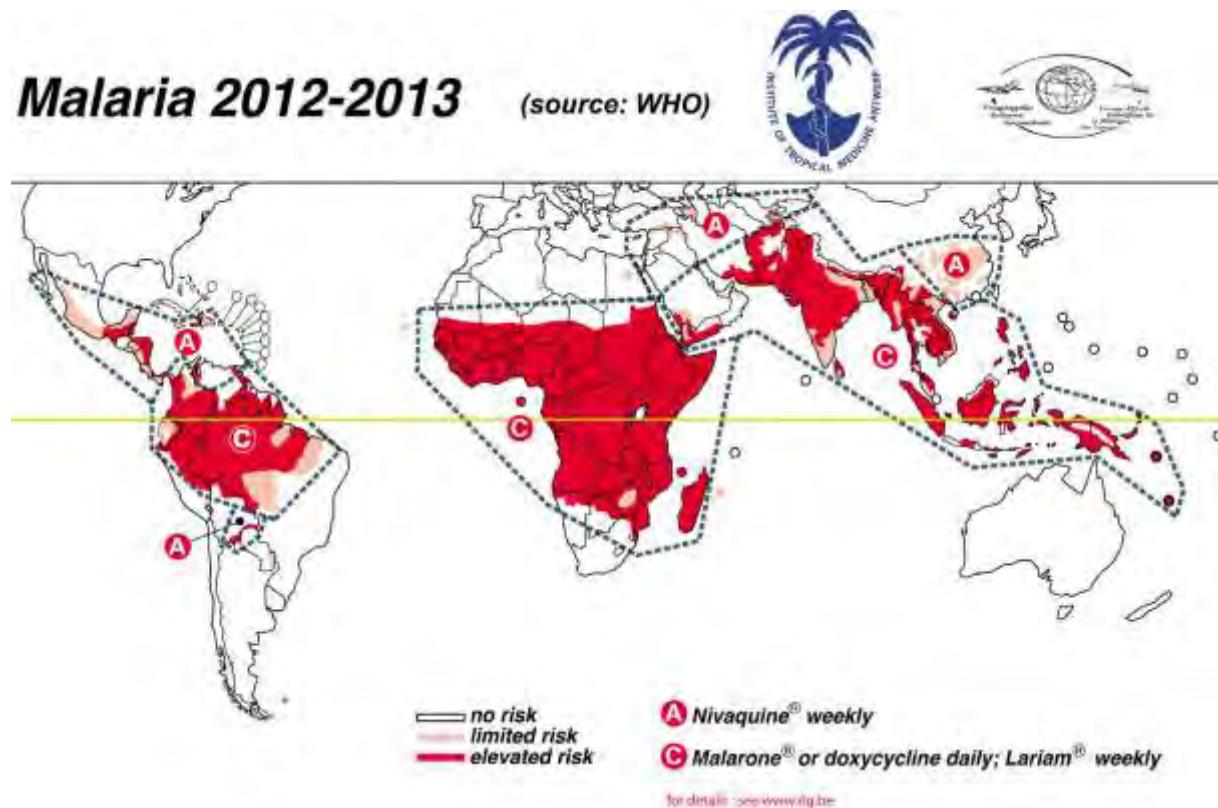


Figure 1: Répartition géographique du paludisme dans le monde (www.itg.be le 12 juillet 2016)

Au Sénégal, le paludisme est endémique dans la majeure partie du pays avec une recrudescence saisonnière. L'épidémiologie du paludisme au Sénégal est

caractérisée par une grande hétérogénéité des niveaux d'endémicité et des modalités de la transmission (36). Elle est fonction des conditions écologiques et socio-économiques locales déterminantes dans les relations étroites qui existent entre l'hôte, le parasite et le vecteur (35).

I.2.2 La transmission.

L'agent pathogène (9).

Cinq espèces de parasites sont responsables du paludisme chez l'homme : *Plasmodium falciparum* (espèce la plus pathogène et est responsable des accès pernicieux potentiellement mortels), *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*.

Au Sénégal, *P falciparum*, est l'espèce la plus répandue et est responsable de plus de 90% des cas de paludisme (37).

Les vecteurs.

Le paludisme est transmis par la piqûre de l'anophèle femelle, insecte diptère de la famille des *Culicidae*, de la sous famille des *Anophelinae*, du genre *Anopheles*.

Au Sénégal, les espèces : *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*, *Anopheles arabiensis* sont les principaux vecteurs du paludisme (36).



Figure 2 : Anopheles gambiae, vecteur responsable du paludisme.

(source : www....wikipedia.org/paludisme le 20 juillet 2016)

✚ Le réservoir de parasites.

L'homme infecté et l'anophèle femelle constituent les réservoirs de parasites pour les principales espèces. Cependant, les animaux aussi peuvent abriter aussi des Plasmodii. C'est le cas de *P malariae* qui a été retrouvé chez le singe.

I.2.3. Le mode de contamination.

Le paludisme est transmis à l'homme par la piqûre de l'anophèle femelle, infectée. La transmission peut également se faire à travers la barrière hémato-placentaire.

I.2.4. Les facteurs favorisants de la transmission (26).

La transmission du paludisme dépend de plusieurs facteurs dont les plus importants sont : la température; l'eau et l'humidité et les facteurs anthropiques (barrages et irrigations) ;

I.2.5. Le cycle du parasite (26).

Le cycle du parasite comporte trois stades dont deux se déroulent chez l'homme et un chez le moustique (**Figure 3**).

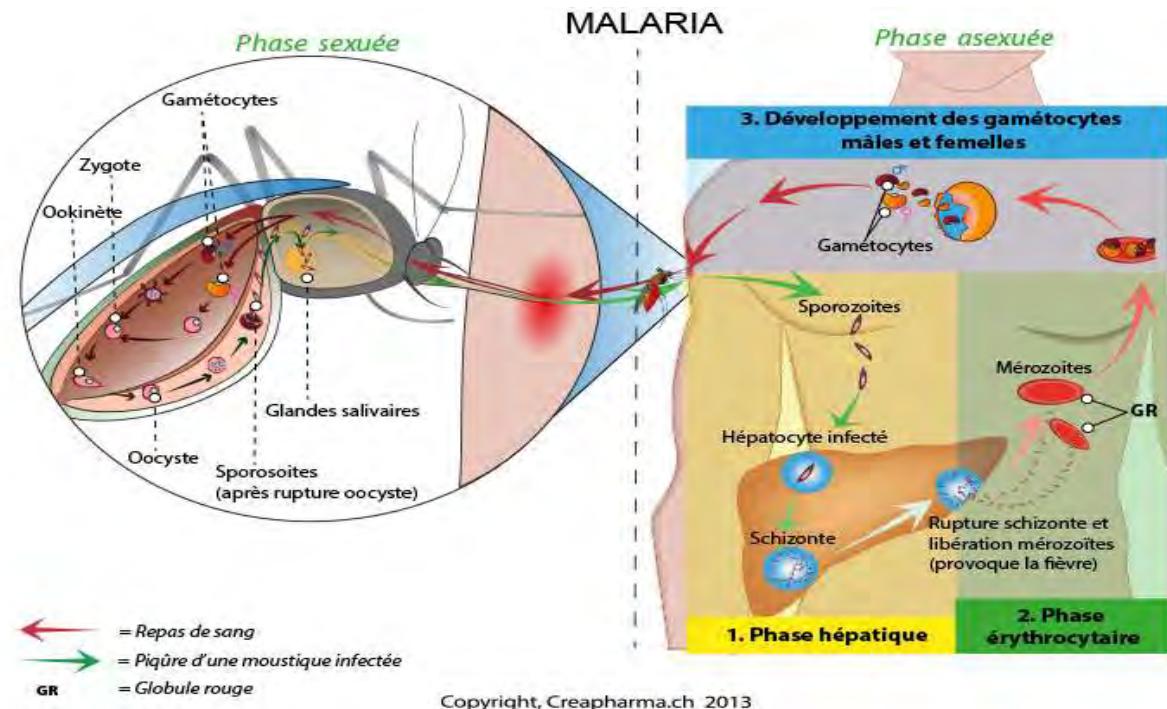


Figure 3: Cycle évolutif du *Plasmodium falciparum* chez l'homme et l'anophèle.

I.3. Diagnostic.

Le diagnostic du paludisme est aussi bien clinique que para clinique.

I.3.1. Diagnostic clinique (2, 3, 7 et 13).

Les manifestations cliniques du paludisme sont diverses. Elles dépendent aussi bien du parasite que de l'hôte. Il existe deux tableaux cliniques :

- Les accès simples** qui comprennent le paludisme de primo invasion et les accès de reviviscence schizogonique à fièvre périodique, communs à toutes les espèces plasmodiales
- Les formes graves** dont l'accès pernicieux (Neuropaludisme ou paludisme cérébral) dues essentiellement à *P.falciparum* (**Tableau I**).

Tableau I : Définition d'un Paludisme à *Plasmodium falciparum* grave ou compliqué d'après l'OMS (2002).

Présence de formes sexuées de *Plasmodium falciparum* dans le sang (GE et frottis positif) et d'une ou plusieurs des manifestations suivantes :

01	Neuropaludisme. (coma stade II ou plus)
02	Crises convulsives généralisées répétées (plus de 2/4 heures, plus de 15 mn. de phase postcritique)
03	Anémie grave (hémoglobine < 6g / dl. Et hématocrite < 20%)
04	Insuffisance rénale (diurèse < 400 ml ou 12 ml / kg / 24 h ;
05	créatininémie > 265 µmol / l)
06	Œdème pulmonaire (ou syndrome de détresse respiratoire)
07	Hypoglycémie (< 2 mmol / l ou 0,4 g / l)
08	Collapsus circulatoire
09	Hémorragie diffuse (ou CIVD)
10	Hémoglobinurie massive
11	Acidose sanguine (pH artériel < 7,25 ou bicarbonates < 15 mmol / l)
12	Obnubilation ou prostration (coma stade I)
13	Parasitémie élevée (> 5% chez un sujet non immun)
14	Ictère clinique
15	Hyperthermie (> 41°C) ou hypothermie (< 36°C)

	<p>SIGNES GENERAUX DE DANGER CHEZ LES ENFANTS DES MOINS DE 5 ANS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Incapacité de boire ou de téter - Vomissements incoercibles - Léthargie ou inconscience - Convulsions ou antécédents de convulsions - Malnutrition (au Sénégal)
--	---

I.3.2. Diagnostic biologique.

Le diagnostic du paludisme est parasitologique (paludisme.). C'est une urgence qui se définit par la présence de formes asexuées de *Plasmodium* à l'examen microscopique (39). L'objectif fixé par les recommandations de l'OMS est d'obtenir les résultats dans un délai inférieur à 2 heures (37), (2006).

a. Diagnostic direct :

L'examen microscopique permet de mettre en évidence la présence du pathogène responsable du paludisme dans le sang. Il doit être réalisé avant tout traitement antipaludique et immédiatement sans attendre un pic thermique (44).

➤ Diagnostic microscopique classique: frottis sanguin et goutte épaisse

Ils permettent d'établir un diagnostic d'espèce en ne nécessitant qu'un microscope optique et des colorants d'un coût modéré. La qualité du résultat dépend cependant beaucoup de l'expérience de la personne réalisant cet examen (11).

- **Le frottis sanguin** permet un diagnostic précis d'espèce (19).
- **La goutte épaisse (GE)** permet de mettre en évidence dans une plus grande quantité de sang, une parasitémie moindre. Elle a l'avantage de concentrer 20 fois plus de parasites qu'un frottis mince (19).

Il est recommandé d'associer systématiquement ces deux techniques pour le diagnostic microscopique du paludisme (11).

➤ **Autres méthodes de diagnostic direct :**

- **Le QBC** (Quantitative Buffy Coat) (24) est une technique basée sur l'utilisation de fluorochromes qui rendent fluorescents les acides nucléiques des parasites.
- **L'amplification génétique** (PCR): Elle permet d'obtenir un résultat en quelques heures. Elle permet une différenciation de souches et on la réserve essentiellement à l'étude des mutations et des gènes impliqués dans la résistance (11).

b. Diagnostic indirect.

Les techniques de diagnostic indirect ne mettent pas directement en évidence la présence du parasite responsable du paludisme. Elles permettent cependant de le suspecter. Les moyens pour le diagnostic indirect peuvent être classées en plusieurs catégories: sérologie, recherche d'antigènes spécifiques (méthodes dites des bandelettes).

➤ **Sérologie**

Elle n'a pas d'intérêt pour un diagnostic d'urgence. La sérologie est surtout utilisée sur le plan épidémiologique et pour le diagnostic de certaines formes cliniques tel le paludisme viscéral évolutif, au cours duquel le taux d'anticorps est très élevé (11). Les différentes techniques utilisées sont : l'immunofluorescence indirecte; l'immunoélectrophorèse; l'immuno-enzymologie (ELISA); l'hémagglutination et l'immuno-diffusion (11).

➤ **Les tests de diagnostic rapides (TDR) (édition).), (12).**

Les tests diagnostiques rapides permettent un diagnostic rapide de la maladie partout surtout dans les zones les plus reculées qui n'ont accès au diagnostic microscopique. Ils permettent de mettre en évidence d'antigènes spécifiques (protéines) des *Plasmodii spp* responsable du paludisme. Ces antigènes sont

présents dans le sang des personnes infectées, et peuvent persister dans le sang jusqu'à deux semaines. (17)

La sensibilité et la spécificité de tous les TDR sont telles qu'ils viennent compléter et renforcer fortement les services de diagnostic. Ils viennent ainsi donc élargir la couverture diagnostique dans le paludisme à *P. falciparum* non compliqué. Il existe plusieurs TDR de sensibilités et de spécificités différentes (17):

- **Les tests qui détectent l'antigène HRP-2. (PARACHEK®)**
- **Les tests qui détectent la LDH : (OptiMAL®-IT).**
- **Les tests qui détectent aussi bien HRP2 et la LDH (NOW® Malaria) (édition).).**
- **Illimugène malaria :** □ test de diagnostic simple et abordable. Ce test a une sensibilité analytique 80.000 fois supérieure aux méthodes conventionnelles (1). C'est aussi un test rapide (résultats en moins d'une heure).

I.4. La lutte antipaludique (2, 7, 19)

Elle comprend le traitement curatif et la prophylaxie du paludisme.

I.4.1 Traitement curatif

Plusieurs médicaments sont proposés et peuvent être utilisés comme moyens curatifs pour la prise en charge correcte des cas de paludisme. (Tableau III)

Tableau II : Les principaux antipaludiques utilisés pour le traitement du paludisme.

Origines	Dérivés	Molécules	Action	Sites d'action
Antipaludiques Naturels	Alcaloïdes Quinine,	Quinidine, Cinchonine, Cinchonidine	Schizonticides	Vacuole digestive
	Quinghaosu Artémisinine,	Artémether, Artésunate	Schizonticides	Vacuole digestive
Antipaludiques de synthèse	Amino-4-Quinoléines	Chloroquine, Amodiaquine,	Schizonticides	Vacuole digestive
	Aryl-Amino-Alcools	Méfloquine, Halofantrine	Schizonticides	Vacuole digestive
	Antifoliques et Antifoliniques	Sulfadoxine, Pyriméthamine	Schizonticides	Cytoplasme
	Naphtoquinones	Atovaquone	Schizonticides	Mitochondrie
	Antibiotiques	Cyclines, Macrolides,	Schizonticides	Ribosome
	Amino-8-quinoléines	Primaquine Tafénoquines, Quinocides, Bulaquines, Pamaquines, Plasmocides	Gamétocytocides	Mitochondrie

I.4.2 La prévention du paludisme.

Elle vise à protéger les individus par rupture de la chaîne de transmission.

a. La Chimioprophylaxie

- **Le Traitement Préventif Intermittent (TPI):**

Le TPI consiste à l'administration de médicaments antipaludiques à des doses thérapeutiques, à une population à risque (femmes enceintes, enfants), indépendamment du fait que la personne soit infectée ou non, dans l'objectif de prévenir la morbidité ou la mortalité (37, 39).

- **La chimioprévention du paludisme saisonnier :**

La CPS, autrefois appelée « traitement préventif intermittent du paludisme chez les enfants », est définie comme « l'administration intermittente d'un traitement complet par un médicament antipaludique pendant la saison de haute transmission du paludisme pour prévenir la maladie ». L'objectif de cette stratégie est de maintenir des concentrations thérapeutiques de médicament antipaludique dans le sang pendant la période où le risque de contracter le paludisme est plus élevé. La stratégie de la CPS consiste à administrer un maximum de quatre cycles de traitement de SP + AQ à intervalles d'un mois à des enfants âgés de 3 à 59 mois dans les régions de forte transmission saisonnière du paludisme (31, 39).

- **Chimioprophylaxie des expatriés et des voyageurs (39).**

La prophylaxie médicamenteuse est indispensable pour les zones à *P. falciparum*. Elle n'est pas efficace à 100%. Elle doit être prise pendant tout le séjour et après le retour pendant une durée dépendant de l'antipaludique utilisé.

b. Les candidats vaccins antipaludiques :

Les candidats vaccins sont basés sur les divers antigènes issus des différents stades du cycle évolutif parasitaire. On peut distinguer :

- Le candidat vaccin anti-stade pré-érythrocytaire (RTS,S/AS01) (41),
- Le candidat vaccin anti-stade sanguin asexué : (vaccin MSP/RESA),
- Le candidat vaccin bloquant la transmission.

Les antigènes variant de surface exprimés par les parasites adhérents au placenta sont des candidats prometteurs pour une vaccination spécifique contre le paludisme de la femme enceinte.

c. **La lutte anti-vectorielle (13).**

Elle vise à éviter la transmission des parasites à la population par l'anophèle. Elle s'attaque au vecteur et aux différents stades de son développement. Pour cela, plusieurs méthodes sont utilisées :

➤ **La lutte anti larvaire : (26).**

Elle a pour objectif de réduire les populations d'anophèles à leur source. Elle comporte plusieurs méthodes qui se classent en trois catégories :

- ✓ **L'aménagement de l'environnement** par asséchement et drainage des eaux usées.
- ✓ **La lutte biologique** avec des poissons larvivores comme gambusies et guppies.
- ✓ **La lutte chimique** par l'utilisation de larvicides chimiques.

➤ **Aspersions intra-domiciliaires (AID) d'insecticides à effet rémanent.**

L'AID est une méthode de lutte anti vectorielle (LAV) très sélective qui ne concerne que les populations de vecteurs endophiles. Le traitement est fait par aspersion/pulvérisation d'insecticide sur les surfaces intérieures des murs, plafonds ou toits des habitations et autres structures. L'effet insecticide persiste pendant une période variable (3 - 6 mois) et le traitement est fait avec un cycle variable selon la dynamique de la transmission du paludisme (13).

➤ **Moustiquaires imprégnées d'insecticides (deltaméthrine, perméthrine):**

C'est l'outil majeur de prévention du paludisme recommandée par l'OMS. Il est nécessaire de ré-imprégnier régulièrement les moustiquaires pour maintenir leur

efficacité. Actuellement, on utilise les moustiquaires imprégnées «longue durée» avec une rémanence de plusieurs années (55).

- **Ports de vêtements imprégnés de perméthrine** (utilisés par les armées) (55);
- **Répulsifs** (insecticides ou répellents) : deux produits sont recommandés en pratique : le DEET et le KBR 3023 (55).

II- RESISTANCES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* AUX ANTIPALUDIQUES

II.1. Définition de la résistance.

L'OMS a défini en 1967 la résistance comme étant la capacité du parasite à survivre et/ou à se multiplier en dépit de l'administration et de l'absorption d'un médicament donné à doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées mais dans les limites de la tolérance du malade (51). Il a été ajouté à cette définition en 1986 que la forme active du médicament devait pouvoir atteindre le parasite ou accéder à l'intérieur de l'érythrocyte infecté pendant la durée nécessaire à son action normale (1986 et 66(1):5-13.).

La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques constitue un obstacle majeur dans la lutte contre le paludisme (14, 29).

II.2. Emergence et propagation de la résistance.

Le développement de la résistance peut s'expliquer par la grande diversité génétique de *P.falciparum* due à un taux élevé de mutations dans son génome et par les masses très importantes de parasites portées par les individus infectés (53). Les mutations sont à l'origine de la grande variabilité génétique de *P. falciparum*, elles peuvent dans certains cas avantager sa survie en lui permettant par exemple d'échapper au système immunitaire de son hôte, de supporter la présence de molécules toxiques dans son environnement ou de se multiplier plus

rapidement que d'autres clones (53). Les parasites mutants qui survivent en présence d'un antipaludique deviennent ainsi résistants et transmettent par la suite la mutation aux autres générations du parasite, générant ainsi une population capable de résister à une molécule (46, 53).

a. Les facteurs influençant le développement de la résistance

L'exposition des parasites à des concentrations de médicaments inférieures au seuil thérapeutique favorise davantage la sélection des parasites mutants résistants aux médicaments (49). Aussi, la propagation des nouvelles résistances émergeantes dépend de la recrudescence et de la transmission subséquente d'une infection ayant généré un nouveau parasite résistant (53). La production de gamétozytes à partir de l'infection recrudescente devrait être prévenue par l'administration précoce du traitement approprié. Il existe un intervalle de temps durant lequel le niveau du médicament avantage la survie du parasite résistant par rapport au parasite sensible (46). La propagation subséquente des parasites mutants est facilitée par l'administration des médicaments à longue durée d'action. L'activité antipaludique résiduelle présente après traitement sert de « filtre sélectif », prévenant seulement l'infection des parasites sensibles (53).

Le niveau de transmission du paludisme dans une zone influence également la propagation de la résistance du parasite aux antipaludiques (20).

b. Les autres facteurs favorisant l'émergence de résistances (47):

Il s'agit entre autre de :

- Une mauvaise utilisation des antipaludiques par les individus infectés conduisant à des traitements incomplets,
- Une indisponibilité des médicaments efficaces ou le déploiement inadéquat des médicaments sous forme de monothérapies.
- La consommation de contrefaçons sous dosées qui est un facteur permettant à des parasites viables de survivre à des concentrations sub-optimales d'antipaludiques et d'être sélectionnés pour leur aptitude à résister.

II.3. Surveillance de l'efficacité et de la résistance des antipaludiques.

L'OMS a fait des efforts considérables pour standardiser les méthodes d'évaluation d'efficacité de médicaments antipaludiques pendant les 40 dernières années, mais les recommandations les concernant ont changé plusieurs fois, en fonction de l'avis des experts de chaque époque et de l'avancée des connaissances. La méthode de référence de diagnostic et de surveillance des résistances est donc le test *in vivo* de l'OMS développé en 1965 et révisé en 1967, en 1972, en 1996 et enfin en 2007 (52). La confirmation de la résistance exige la preuve:

- Que les parasites sont recrudescents chez un patient qui a récemment reçu le traitement à dose adaptée et
- Que la concentration sanguine efficace du médicament ou de ses métabolites actifs a été maintenue pour au moins quatre cycles parasitaires (52).

Plusieurs méthodes de surveillance de la résistance aux antipaludiques sont utilisées :

a. Les tests d'efficacité thérapeutiques.

Ce sont des méthodes de référence standardisées par l'OMS (54), ces tests permettent d'évaluer l'efficacité clinique des schémas thérapeutiques recommandés pour traiter les accès palustres non compliqués. L'efficacité du principe actif est déduite à partir de la disparition de la parasitémie et de l'amélioration du tableau clinique du patient (54). Le suivi biologique et parasitologique, pendant 28 ou 42 jours, des patients traités permet de distinguer quatre types de réponse au traitement : l'échec thérapeutique précoce (ETP) (4), l'échec parasitologique tardif (EPT) (47), l'échec clinique tardif (ECT) (48), et une réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) (30), qui caractérise un parasite sensible. Ces études cliniques sont généralement coordonnées avec des tests *in vitro* et moléculaires (54).

b. Les tests *ex vivo* et *in vitro*.

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'antipaludique (6). La mesure de la croissance des parasites (microscopique, isotopique, ELISA ou fluorimétrique) en fonction de la concentration en antipaludique permet de définir son niveau de sensibilité (6). Le résultat est évalué à partir de la concentration inhibitrice 50% (IC50), valeur correspondante à la concentration d'antipaludique permettant d'inhiber la croissance de 50% des parasites (par rapport au témoin sans drogue). Même si cette technique nécessite une logistique et un plateau technique de qualité, elle permet de tester plusieurs antipaludiques en parallèle et de se départir des facteurs liés à l'hôte (immunité, variation individuelle de la concentration sérique en antipaludique) (6).

c. Les marqueurs moléculaires de résistance.

Il s'agit d'un ensemble de marqueurs impliqués dans les mécanismes moléculaires de résistance. Ces marqueurs sont sensibles et spécifiques pour prédire le niveau de résistance d'un parasite aux antipaludiques, ils ont une place de choix dans la surveillance de l'activité de tel ou tel antipaludique. Il existe des marqueurs qui sont associés à un défaut d'accumulation des pharmacophores (partie d'une structure moléculaire qui est responsable d'une interaction biologique ou pharmacologique particulier qu'il subit) au niveau de la cible parasitaire, d'autres à une modification de la cible parasitaire. Les marqueurs moléculaires de résistance peuvent être étudiés 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. Les principaux marqueurs moléculaires utilisés dans la surveillance de l'efficacité de la combinaison SP+AQ sont:

- *P.falciparum chloroquine transporter (Pfcrt)*.

Ce gène situé sur le chromosome 7 code pour un transporteur membranaire de la vacuole digestive. La mutation sur le codon 76 (K→T), associée à sept autres

points de mutation (43, 50), permet au parasite de limiter l'accumulation de chloroquine dans sa vacuole digestive, où elle exerce son action inhibitrice (40). *Pfcrt* est également impliqué dans la baisse de sensibilité du parasite à l'Amodiaquine et à la quinine (10, 48). Dans les zones où les allèles de résistance ne sont pas fixés, on observe une augmentation de la fréquence de l'allèle sauvage après abandon de la chloroquine (23, 28). L'analyse de ce locus renseigne sur la pression médicamenteuse exercée au sein des populations.

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

Situé sur le chromosome 5, ce gène code pour un transporteur de type ABC (ATP binding cassette). La protéine *Pfmdr-1* est impliquée dans la modulation de la sensibilité à de multiples antipaludiques et, plus particulièrement, dans l'efflux des antipaludiques hydrophobes (15). Les mécanismes de résistance sont liés: soit à des phénomènes de duplication, entraînant une augmentation de l'expression de la protéine (29) et la résistance aux aryl-amino-alcool (comme la Méfloquine ou la Luméfantrine) et une baisse de sensibilité aux dérivés de l'Artémisinine (mais sans lien statistiquement établi avec l'efficacité clinique des ACT (38); soit à l'apparition de mutations au niveau des codons 86 (N→Y), 184 (Y→F), 1034 (S→C), 1042 (N→D) et 1246 (D→Y), entraînant une altération de sensibilité des parasites à certains antipaludiques comme les amino-4-quinoléines (15). Il existe un effet antagoniste entre la sensibilité à la chloroquine et à la Méfloquine: la mutation 86Y diminue la sensibilité des parasites à la chloroquine, mais augmente celle de la Méfloquine. De même, l'augmentation du nombre de copies du gène (86N) augmente la résistance à la Méfloquine et à l'inverse accroît la sensibilité à la chloroquine.

- *P.falciparum dihydrofolate reductase (Pfdhfr).*

Ce gène, situé sur chromosome 4, code pour une enzyme intervenant dans la voie de synthèse des folates (20). Elle est la cible des médicaments anti-folates (Pyriméthamine, par exemple) qui, en inhibant son activité enzymatique, entraînent le blocage de la synthèse des pyrimidines et la réPLICATION de l'ADN

parasitaire (42). L'accumulation de plusieurs mutations spécifiques au sein de cette protéine (codons 50N→R, 51C→I, 108S→N et 164I→L) entraîne la résistance clinique des parasites à l'action des anti-folates.

- *P.falciparum dihydropteroate synthétase (Pfdhps)*.

La dihydroptéroate synthétase est une autre enzyme intervenant dans la synthèse des folates (le gène correspondant est situé sur le chromosome 8). Elle est inhibée par les sulfamides. Les mutations se situant au niveau des codons 436 (S→A/F), 437 (K→G), 540 (K→E), 581 (A→G), 613 (A→S/T) confèrent une résistance à la Sulfadoxine (20).

L'analyse groupée des mutations au niveau des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* permet de prévoir l'efficacité clinique de l'association Sulfadoxine Pyriméthamine, largement utilisée en Afrique chez la femme enceinte en traitement préventif (TPI : traitement préventif intermittent) ou en association avec l'Artésunate en traitement curatif (18), (Tableau III).

Tableau III : Les marqueurs de résistance associés aux différents antipaludiques.

Médicament	Marqueur de résistance		Niveau de validation
	Gène ou locus	Allèle associé à la résistance ou à la diminution de sensibilité	
Chloroquine	<i>pfcrt</i>	Lys76Thr	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Amodiaquine	<i>pfmdr1</i>	Asn86Tyr	Association <i>in vitro</i>
	<i>pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Méfloquine	<i>pfmdr1</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vivo</i>
Sulfadoxine-Pyriméthamine	<i>pfdhfr</i>	Ser108Asn	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhfr</i>	Triple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile + Cys59Arg	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhps</i>	Ala437Gly	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhps</i>	Double mutation : Ala437Gly + Lys540Glu	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhfr</i> + <i>pfdhps</i>	Quintuple mutation : Ser108Asn (<i>dhfr</i>) + Asn51Ile (<i>dhfr</i>) + Cys59Arg (<i>dhfr</i>) + Ala437Gly (<i>dhps</i>) + Lys540Glu (<i>dhps</i>)	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfmrp</i>	Lys1466Arg	Association <i>in vivo</i>
Proguanil (cycloguanil)	<i>pfdhfr</i>	Ser108Thr + Ala16Val	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhfr</i>	Double/triple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile et/ou + Cys59Arg	Association <i>in vivo</i>
Atovaquone	<i>pfcytb</i>	Tyr268Asn ou Tyr268Ser	Association <i>in vivo</i>
Luméfantrine	<i>pfmdr1</i>	Asn86 & Nombre de copie > 1	Sélection d'allèle en cas d'échec thérapeutique
Quinine	<i>pfnhe-1</i> (ms4760)	Nombre de motifs : DNNND > 2 ou NHNDNHNNDD < 3	Association <i>in vitro</i>
	<i>pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Doxycycline	<i>pftetQ</i>	Nombre de motif KYNNNN < 3	Association <i>in vitro</i>
	<i>pftetQ</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
	<i>pfmdt</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
Artéméthér	<i>pfserca</i>	Ser769Asn	Association <i>in vitro</i> en Guyane

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

I. METHODOLOGIE

I.1. Cadre de l'étude

Notre étude s'est déroulée dans la zone sud du Sénégal dans les régions de Tambacounda, Kolda et Kédougou. Elle a eu lieu dans les districts de Maka Colibantang, Vélingara et Saraya en novembre et décembre 2013 (avant administration de la CPS) et dans le district de Saraya en janvier 2014 (après la campagne d'administration de la CPS).

Le district de Vélingara est situé au sud-est du Sénégal. Il est limité au nord par la Gambie, au sud par la Guinée Conakry et la Guinée Bissau, à l'ouest par le département de Kolda et à l'est par celui de Tambacounda. Sa superficie est de 5435km². Le climat y est de type soudano-guinéen, avec une pluviométrie de 1000 à 2000 mm³ par an. Le district de Vélingara est arrosé par deux affluents du fleuve Gambie : l'Anambé et le Koulountou. On note aussi la présence de deux barrages de retenue d'eau : Niandouba et Anambé. La présence de ce réseau hydrographique dense et d'une pluviométrie importante favorisent le développement d'une végétation dense favorable aux développements d'anophèles (surtout *Anopheles gambiae*) responsables de la transmission du paludisme.

Le district de Maka Colibantang est un district rural, inaccessible par endroits en hivernage avec des routes impraticables et une précarité socio-économique. Il est limité au nord par les districts de Tambacounda et Koumpentoum, et à l'est par le district de Tambacounda; et à l'ouest et au sud par la Gambie (Figure 4). Le climat est de type soudano-guinéen avec une pluviométrie supérieure à 1000mm³ par an.

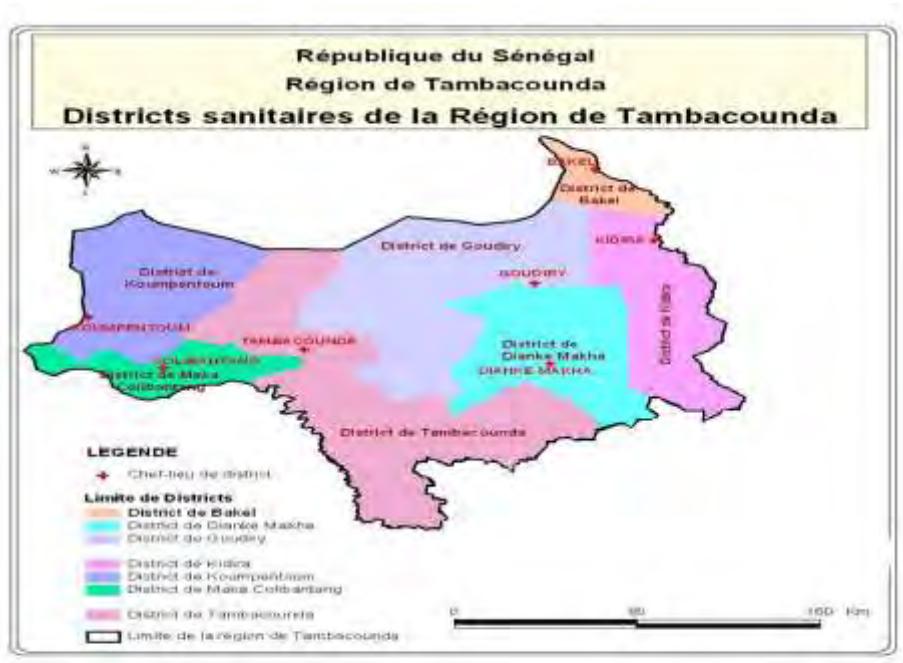


Figure 4: Différents districts sanitaires de la région de Tambacounda.

Le district de Saraya est situé au sud-est du Sénégal dans la région de Kédougou. Il est limité à l'est par le Mali, à l'ouest par le département de Kédougou, au nord par le département de Goudiry et au sud par la Guinée Conakry (Figure 5). Le climat y est de type soudano-sahélien avec deux saisons: une saison sèche de décembre à mai et une saison des pluies de juin à novembre. La saison de transmission du paludisme est donc longue avec un taux d'inoculation entomologique (TIE) d'environ 100 piqûres infectantes par homme et par an. Le paludisme y est endémique avec une recrudescence saisonnière.

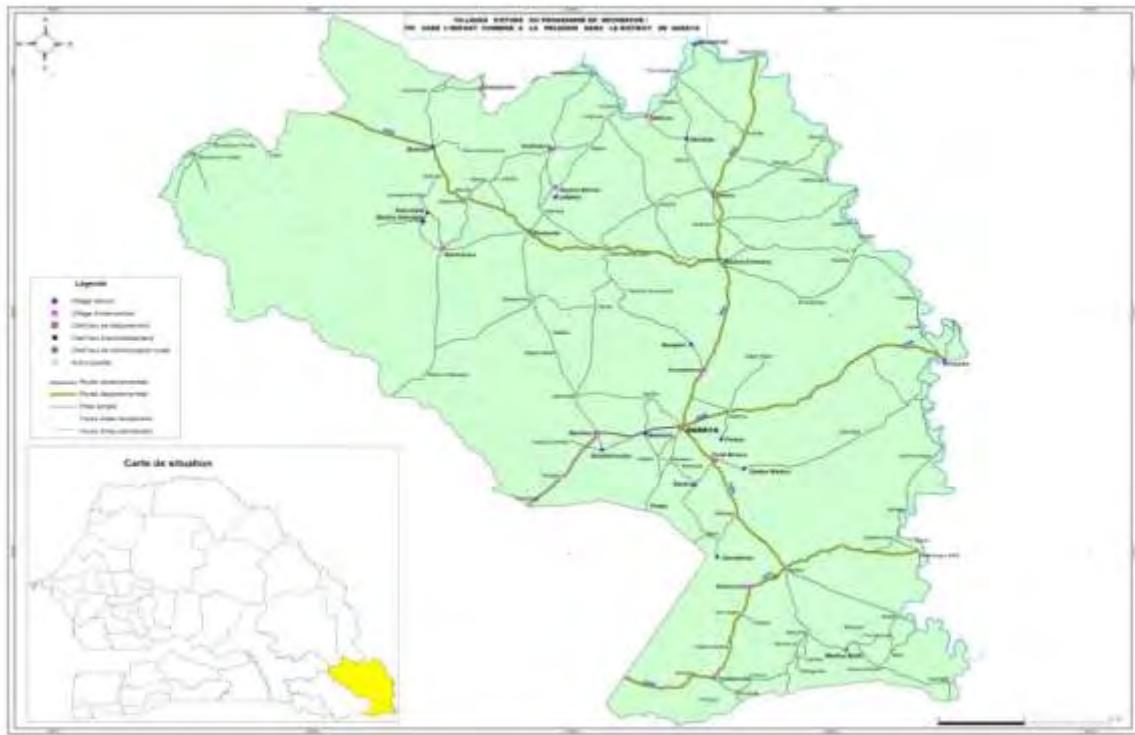


Figure 5: Présentation et situation du district sanitaire de Saraya

I.2. Type d'étude.

Il s'agit d'une étude transversale comparative avant-après qui a été faite à partir des enquêtes ménages où des prélèvements sanguins ont été réalisés afin de mesurer la prévalence palustre et de déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P.falciparum* à la SP et AQ dans les districts de Maka Colibantang, Saraya et Vélingara en 2013 et 2014.

I.3. Déroulement de l'étude.

I.3.1. Echantillonnage.

Nous avons effectué des enquêtes transversales avant et après la campagne d'administration de la CPS. Un échantillon d'adultes a été ajouté pour vérifier si les parasites résistants chez les enfants circulent aussi chez les sujets adultes.

Le calcul de la taille d'échantillon était basé sur une prévalence de parasitémie d'environ 5-10% au sud du Sénégal et des marqueurs de la résistance avec un intervalle de confiance de + ou - 10%.

Le logiciel Epi Info nous avait donné une taille de l'échantillon de 500 et avec un effet de grappe de 2, à 1000 sujets à recruter avant et après la campagne CPS.

I.3.2 Description de l'étude

Les enquêtes ménage se sont déroulées dans des villages situés au sud du pays (régions de Kédougou, Kolda et Tambacounda : zones éligibles pour la mise en œuvre de la CPS). Les villages avaient été choisis sur la base d'une probabilité proportionnelle de la taille estimée. Au sein de chaque village sélectionné, les ménages à visiter avaient été choisis par un échantillonnage basé sur une carte du village. Dans chaque ménage, tous les enfants âgés de 3 à 120 mois, et toutes les personnes de 15 à 45 ans, résidant dans le ménage, ont été invités à participer. Pour chaque personne consentante (dans le cas des enfants dont le parent / tuteur y consent), un court questionnaire avait été administré afin d'enregistrer les identifiants personnels et l'âge, la date de naissance, sexe, date de l'interview, l'emplacement de la résidence, et autres détails. Un prélèvement sanguin était aussi effectué à la pulpe du doigt pour déterminer le taux d'hémoglobine et la confection d'une goutte épaisse et d'un papier filtre n°3 Whatmann A3. Tous les prélèvements confectionnés au cours de ces enquêtes de ménages avaient été ensuite acheminés au laboratoire de parasitologie et mycologie de l'UCAD pour les besoins d'analyses biologiques.

I.3.3. Travail au laboratoire.

I.3.3.1. La microscopie

a. Confection des lames de GE et Frottis sanguin.

➤ Goutte Epaisse

Une goutte de sang prélevée au niveau capillaire, d'environ 2µl, a été déposée au milieu d'une lame porte objet. A l'aide du coin d'une seconde lame, nous

avons exécuté un mouvement en spiral afin de favoriser la défibrillation et d'obtenir un étalement homogène de 5mm de diamètre. Nous avons ensuite laissé sécher à température ambiante.

➤ **Frottis sanguin.**

Une goutte de sang a été posée sur une première lame. Une seconde lame a été posée à environ 45⁰ sur la première lame au niveau de la goutte de sang. Nous avons laissé le sang fuser le long du bord de la lame puis d'un geste rapide, nous l'avons étalé vers l'extrémité de la première lame.

b. Coloration et lecture de lames.

Les lames de frottis sanguin et goutte épaisse confectionnées, ont été stockés à température ambiante le temps des enquêtes ménages. Elles ont ensuite été lavées dans de l'eau Pierval, pH 7,2, avant d'être colorées avec une solution de Giemsa à 10% pendant 20 minutes. Après la coloration, nous avons effectué une lecture de la GE pour déterminer la densité parasitaire (DP) et du frottis pour en déterminer l'espèce. La microscopie a été utilisée pour détecter la présence ou l'absence de parasites asexués et sexués. La DP a été calculée selon la formule suivante : DP = (Nombre de parasites x 8000) /200. Un contrôle de qualité a été réalisée grâce à une double lecture de toutes les lames de GE/ frottis collectées. Une lame est déclarée négative en l'absence d'hématozoaires après la lecture de 200 champs. En cas de discordance des deux premières lectures, une troisième est effectuée par un technicien de laboratoire plus expérimenté, et le résultat des deux lectures allant dans le même sens était retenu et la moyenne des deux DP faite si toutefois elles sont positives. Les papiers filtres des lames positives ont été sélectionnés pour la PCR.

2. Génotypage moléculaire

a. Extraction de l'ADN

Les papiers filtres dont les GE étaient positives avaient été choisis pour l'extraction de l'ADN. Nous avons utilisé la méthode Chelex-100 telle que

décrise par Wooden et al (56) pour cette extraction. Nous avons coupé nos papiers filtres en de petits confettis que nous avons mis dans des tubes Eppendorfs. Ensuite un mélange de 1X PBS avec 0,5 % de saponine a été préparé, puis mis dans les tubes Eppendorfs contenant les confettis. Nous les avons ensuite agités dans une centrifugeuse pendant 10mn (150 rpm) et laissés incuber over night à température ambiante. Le lendemain nous avons éliminé le surnageant et lavé deux fois avec du tampon PBS. Après les deux lavages, 150 µl d'eau distillée (Q H₂O) et 75 µl de 20% du mélange Chelex (5g Chelex dans 25 ml d'eau distillée) ont été ajoutés dans les différents tubes. Les tubes scellés ont été portés ensuite à ébullition à 100°C pendant 8mn (2 x 4) et laissés refroidir pendant 10 mn à température ambiante. Le surnageant de chaque tube Eppendorf a été transposé dans un tube PCR en laissant soigneusement le Chelex dans le tube Eppendorf.

b. Le Génotypage

Le produit d'extraction obtenu a été ensuite utilisé pour la recherche de mutations sur les gènes *Pfdhps*, *Pfdhfr* pour la SP, les gènes *Pfmdr* et *Pfcrt* pour l'AQ.

i. La PCR

A partir de l'ADN extrait, une double PCR a été réalisée avec un thermocycleur Primus 96 V1 19 R Biotech (Figure 6).



Figure 6 : Thermocycleur pour l'amplification de l'ADN.

PCR du gène *Pfcrt* 76.

Une PCR nichée comme décrit par Djimde et al., a été faite pour l'amplification de l'ADN *Pfcrt*.

Le mélange de la première amplification *Pfcrt* égal à 25ul était composé :

- des amorces P1 / P2 (1 μ l/ amorce),
- 1.0X TEMPase Hot Start1
- Master Mix (3,0 mM MgCl₂, 0,4 mM 2'- deoxynucleoside5' - triphosphate [dNTP], et 0,2 unités/ul TEMPase Hot Start DNA Polymérase, Ampliqon III ; VWR-Bie, Berntsen , Denmark)
- et 2 ul de l'ADN extrait.

Ce produit de ce premier mélange réactionnel avait été amplifié selon le programme dans le tableau IV ci dessous.

Tableau IV : Programme de la première amplification du gène *Pfcrt*.

		Température	Temps
1	Dénaturation initiale	94 ⁰ C	15 minutes
2	Dénaturation	94 ⁰ C	30 secondes
3	Hybridation	56 ⁰ C	30 secondes
4	Extension	72 ⁰ C	1 minute
5		Retourner à l'étape 2, 45 fois	
6	Extension finale	72 ⁰ C	10 minutes
7	Fin du programme	4 ⁰ C	Infini

Le mélange pour la deuxième amplification de la PCR nichée *Pfcrt* a été identique au mélange de la première, et l'ensemble d'amorces D1 / D2 a été utilisée. Ce mélange avait ensuite été amplifié selon le programme dans le tableau V.

Tableau V : Programme de la deuxième amplification du gène *Pfcrt*.

		Température	Temps
1	Dénaturation initiale	94 ⁰ C	15 minutes
2	Dénaturation	92 ⁰ C	30 secondes
3	Hybridation	48 ⁰ C	45 secondes
4	Extension	72 ⁰ C	30 secondes
5		Retourner à l'étape 2, 30 fois	
6	Extension finale	72 ⁰ C	10 minutes
7	Fin du programme	4 ⁰ C	Infini

PCR du gène *Pfmdr 86*.

Une PCR nichée pour *Pfmdr1* a été faite pour l'amplification de l'ADN.

Pour la première amplification, un mélange de 20 μ l était nécessaire pour la PCR. Il était constitué de :

- 4,0 μ l (0,2 μ M/amorce) des amores MDR2/1 New rev1:;
- 10,0 μ l TEMPase/AH
- 5,0 μ l Master Mix (3,0 mM MgCl₂, 0,4 mM 2'- deoxynucleoside5' - triphosphate [dNTP], et 0,2 unités / μ l TEMPase Hot Start ADN polymérase, Ampliqon III ; VWR-Bie, Berntsen, Danemark)
- 1 μ l de l'extrait d'ADN.

Le mélange ainsi composé avait été amplifié selon le programme dans le tableau ci dessous :

Tableau VI : Programme de la première amplification du gène *Pfmdr 86*.

		Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95 ⁰ C	3 minutes
2	Dénaturation	92 ⁰ C	30 secondes
3	Hybridation	48 ⁰ C	45 secondes
4	Extension	65 ⁰ C	1 minute
5		Retourner à l'étape 2, 44 fois	
6	Extension finale	65 ⁰ C	5 minutes
7	Fin du programme	4 ⁰ C	Infini

Le mélange réactionnel de la PCR nichée *pfmdr1* était identique au mélange de la première PCR. Seuls, l'amorce et le produit de la première amplification utilisée étaient différents du premier mélange réactionnel. Ce deuxième mélange réactionnel avait amplifié selon le programme suivant (Tableau VII):

Tableau VII: Programme de la deuxième amplification du gène *Pfmdr 86*.

		Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95 ⁰ C	3 minutes
2	Dénaturation	92 ⁰ C	30 secondes
3	Hybridation	48 ⁰ C	45 secondes
4	Extension	65 ⁰ C	1 minute
5		Retourner à l'étape 2, 25 fois	
6	Extension finale	65 ⁰ C	5 minutes
7	Fin du programme	4 ⁰ C	Infini

 **PCR des gène *Pfdhfr* et *Pfdhps*.**

Nous avons étudié les codons 51I, 59R, 108S et 164L pour le gène *Pfdhfr*; et les codons 437G et 540E pour le gène *Pfdhps*.

Pour la première amplification il faut un mélange réactionnel de 20 µl constitué de :

- 4µl d'eau
- 5µl d'amorces (M1/M7 pour *Pfdhfr* ou N1/N2 pour *Pfdhps*)
- 10µl de TEMPase mastermix
- 1µl du produit d'extraction d'ADN

Pour la deuxième amplification, notre mélange réactionnel de 25µl était constitué de :

- 5,25µl d'eau
- 6,25µl d'amorces (M3b/M9 pour *Pfdhfr* ou R2/R pour *Pfdhps*)
- 12,5µl de TEMPase mastermix
- 1µl du produit de la première amplification

La migration de notre produit d'amplification nous avait permis d'avoir des fragments d'ADN de taille différente en fonction du codon recherché (Figure 7).

La révélation des produits des différentes PCR s'était faite en utilisant des cuves de migration et générateurs.



Figure 7 : Générateur et cuve de migration.

Après la PCR nous avons utilisé deux techniques pour la détection des mutations. Pour les gènes *Pfcrt* et *Pfmdr* nous avons utilisé la digestion enzymatique RFLP, tandis que pour la recherche de mutations associées à la SP nous avons utilisé la SSOP ELISA.

i. Digestion enzymatique de *Pfcrt* et *Pfmdr* (Enzymes de restriction RFLPs génératrices)

Les enzymes de restriction ont été utilisés pour la détermination des SNP. Les endonucléases ApoI et Afl III ont été obtenus respectivement auprès de New

England BioLabs™, et Stratagene™. L'incubation des échantillons d'ADN de *P. falciparum* avec les enzymes de restriction s'est faite suivant les instructions du fabricant.

- Digestion de l'ADN du gène *Pfcrt*

Après l'amplification des fragments concernés, l'enzyme ApoI a été utilisée pour la détermination *Pfcrt* SNP. L'ADN pour *Pfcrt* a été incubé avec l'enzyme ApoI pendant une nuit à 53°C. Le produit du mélange a été migré sur gel d'agarose 2% avec du Bromure d'Ethidium et visualisé sous UV (ultraviolets). Les échantillons sont classés comme des haplotypes de type sauvage quand la longueur de fragment d'ADN trouvé était de 96pb et 46pb tandis que le type mutant a été trouvé à 261bp. L'échantillon a été classé comme mixte, si la longueur des fragments pour les types sauvages et mutants était trouvée.

- Digestion de l'ADN du gène *Pfmdr*

Pour pfmdr1 analyse du polymorphisme, l'enzyme AflIII a été utilisé pour Pfmdr1-86. Les haplotypes de type mutant 86Y ont été trouvés à 346 et 175pb tandis que les types sauvages 86N ont été trouvés à 521bp.

ii. La SSOP ELISA pour les *Pfdhfr* et *Pfdhps*

C'est la technique que nous avons utilisée pour l'étude des mutations que nous avons recherchées sur les gènes *Pfdhps* et *Pfdhfr*.

Les plaques ELISA (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Danemark) ont été revêtues de Streptavidine dans du tampon phosphate salin (PBS) (1 g/ml), puis recouvertes et incubées over night à 4 ° C. Avant leur utilisation, les plaques ont été lavées trois fois dans du tampon de lavage (1X PBS contenant 0,05% de Tween 20). Les produits de PCR, dénaturés à 95°C pendant cinq minutes, puis refroidis immédiatement à 4°C jusqu'à utilisation, ont été dilués dans l'eau dans une plaque à 96 puits. Les SSOP, dont l'extrémité 3' a été conjuguée avec de la digoxigénine (MWG Biotech, Riskov, Danemark), ont été dilués à une concentration 4 nM dans du chlorure de tétraméthylammonium (TMAC)

solution 3M (TMAC, 50 mM de Tris, pH 8,0, 0,1% de dodécylsulfate de sodium, 2 mM d'EDTA, pH 8,0), chauffée à 53°C, 100 µl ont été ensuite ajoutés dans chaque puits de la plaque ELISA. Ensuite, nous avons ajouté 2µl des produits PCR dilués. Une fois répliquées, les plaques ELISA ont été prises pour permettre le sondage simultané avec les SSOP spécifiques aux différents génotypes *de Pfdhps et Pfdhfr*. Les plaques ont été incubées dans une étuve d'hybridation équipée d'un dispositif d'agitation pendant une heure à une température spécifique à chaque codon, puis lavées trois fois dans du tampon de lavage. Cela a été suivi par deux tours de lavage et d'incubation avec une solution TMAC à une température fonction du codon étudié. Pour enlever le TMAC, les plaques ont ensuite été lavées trois fois dans du tampon de lavage, et de la peroxydase conjuguée à un anticorps anti-digoxigénine dans le tampon de dilution a été ajoutée à chaque puits. Après incubation pendant une heure à température ambiante, les plaques ont été lavées encore trois fois dans du tampon de lavage. Nous avons ensuite ajouté 100µl de substrat TMB dans chaque puits et laissé incuber à température ambiante dans une chambre noire. La réaction a été arrêtée au bout de cinq minutes, en ajoutant 0,5 M de H₂SO₄ (Acide sulfurique). Nous avons ensuite mesuré la densité optique (DO) de chaque puits grâce à un lecteur ELISA. (Figure 8).

COATING: 1µg/ml Streptavidin in PBS, incubate overnight 4°C

PCR product from:

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

- Dilute PCR product 1 ____ in H₂O in PCR plate (10 ad 100µl or 5 ad 50µl)
- Denature PCR product, 95°C 5 min., followed by + 4°C until use (Use immediately!)
- 3x Wash in Washing buffer (PBS+0.05% tween20)

PRIMARY INCUBATION:

- Add 100µl PBS+0.05% tween20 to plate
- Add 2µl (4µl c51CB) PCR product, incubate 1 h, room temp, shake
- 3x Wash in Washing buffer

SECONDARY INCUBATION:

- Add 100µl TMAC/probe solution to plate
- Incubate 23°C for 1 h (NB! discard TMAC sol. Safely)

	Probes (Conc. 2 µM)	TMAC sol
ALL	74µl	12 ml (>4nM)
C51	Probe alone 10 µM	12 ml (>20nM)

- 3x Wash in washing buffer (low stringency)
- 2x Wash in TMAC sol, 10 min at ____°C (high stringency) using shaking device
- 3x Wash in washing buffer
- Add PEG-10g-Ab-Fab (1:1000) in PBS+0.05% tween20, incubate 1 h, Room temp
- 3x Wash in washing buffer,
- Add 100µl (0.01 µg/absorbance unit) of tabs ad 12 ml H₂O + 5µl H₂O₂ (30%). Incubate ____ min.
- Add 50µl of a 2.5M H₂SO₄. Read at 492nm

Probe	Temp
c50/51	58°C
c108	62°C
c28/c613	66°C
Rest	60°C

CONCLUSION:

Conditon:	50/51	S9	108	164	436/437	S40	S81	613	Pfert 72-76	CVTD1 268	Pfondr 86
Temp	58	60	62	62	60	60	62	62	60	60-62	64
NB!					2x12 min						
5d7	CN	C	S	I	SG	K	A	A	CVMSK	Y (62)	N
Fer3	CN	C	T	I	SA	K	A	A	CVIET		
Dd2	CJ	R	N	I	PG	K	S	S	UVIEC		F
7g8	CJ	C	N	I	SG	K	A	A	SVMNT		N
K1	CN	R	N	I	SG	K	G	A	CVIET		Y
H63	CN	C	N	I	SA	K	A	A	CVMNK		
AA/AA		R	N	I	AA	K	A	A			
AG		C	N	I	AG	K	A	A			
UN518		R	N	I	AG	I	A	A			
UN542		C	N	I	SG	I	O	A		S (60-62)	
JC2											S (60)
Wahrheit											

Figure 8: Protocole de réalisation de la SSOP ELISA avec les différents codons et témoins nécessaires

I.4. Analyse des données

Les données obtenues au cours de notre étude ont été analysées par Excel et le logiciel Epi info 7. Les variables quantitatives ont été décrites en termes de moyenne et écart-type. Des comparaisons intergroupes ont été effectuées en utilisant le test Anova ou Mann-Withney en fonction des conditions d'application. Les variables qualitatives ont été décrites en termes d'effectif et de pourcentage. Les tableaux de contingence ont été analysés en utilisant le Khi2 de Pearson.

I.5. Considérations éthiques

Le protocole de notre étude avait été soumis et approuvé par le Comité National d'éthique de Recherche en Santé (CNERS). La confidentialité des données recueillies dans les questionnaires avait été bien énoncée dans notre protocole. Un consentement éclairé écrit avait été recueilli auprès de chaque individu ayant décidé de participer à notre étude. Les éventuels risques qui auraient pu survenir lors de l'étude avaient aussi été notifiés aux différents participants à notre étude. Une approbation des leaders communautaires a également été obtenue et toutes les informations avaient été fournies aux populations avant l'administration des questionnaires et la réalisation des prélèvements.

II.RESULTATS

Dans le cadre de notre étude nous avons sélectionné 200 papiers filtres : 100 issus des enquêtes de ménages de 2013, c'est à dire avant le début de la mise en œuvre de la CPS et 100 autres ont été collectés en 2014 (année suivant le début de la mise en œuvre de la CPS).

II.1. Caractéristiques de la population d'étude

Les enquêtes ménages effectués avant la campagne CPS de 2013, avaient permis de recruter 1016 et 1088 individus tous des enfants (3 à 120 mois) respectivement à Saraya et Maka Colibantang-Vélingara en 2013. Les enquêtes à Saraya en 2014 un an après la CPS, avaient permis de recruter 873 personnes composées de 524 enfants âgés de 3 à 120 mois et de 349 adultes dont l'âge était supérieur à 15 ans (Figure 9).

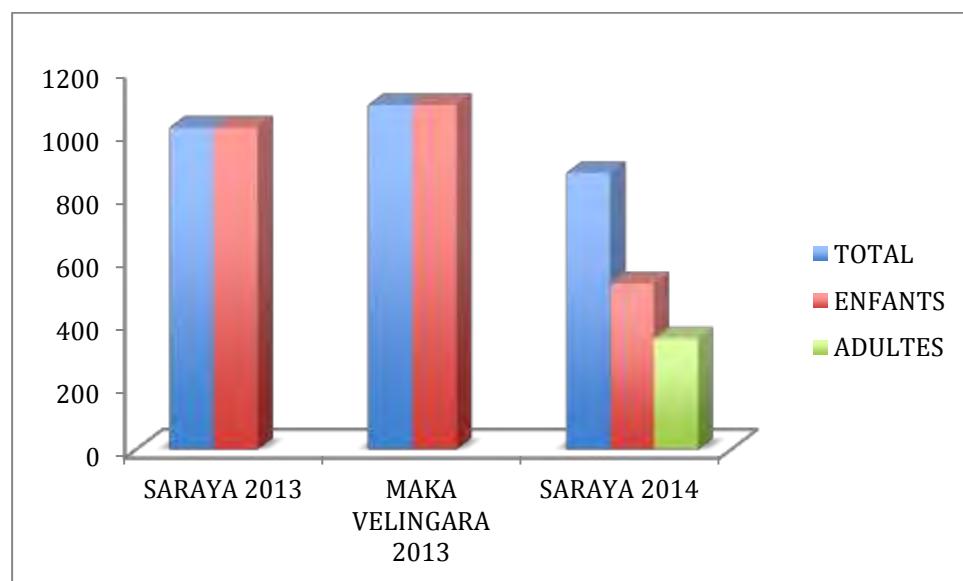


Figure 9: Distribution de la population d'étude lors de enquêtes ménages de 2013 et 2014.

II.2. Prévalence palustre

Les différentes enquêtes ménages effectués avaient permis de retrouver des prévalences palustres respectivement de 14,9% et 11,6% pour Saraya et Maka Colibantang- Vélingara avant administration de la CPS en 2013. La prévalence palustre était de 11,9% un an après administration à Saraya en 2014 (Figure 10).

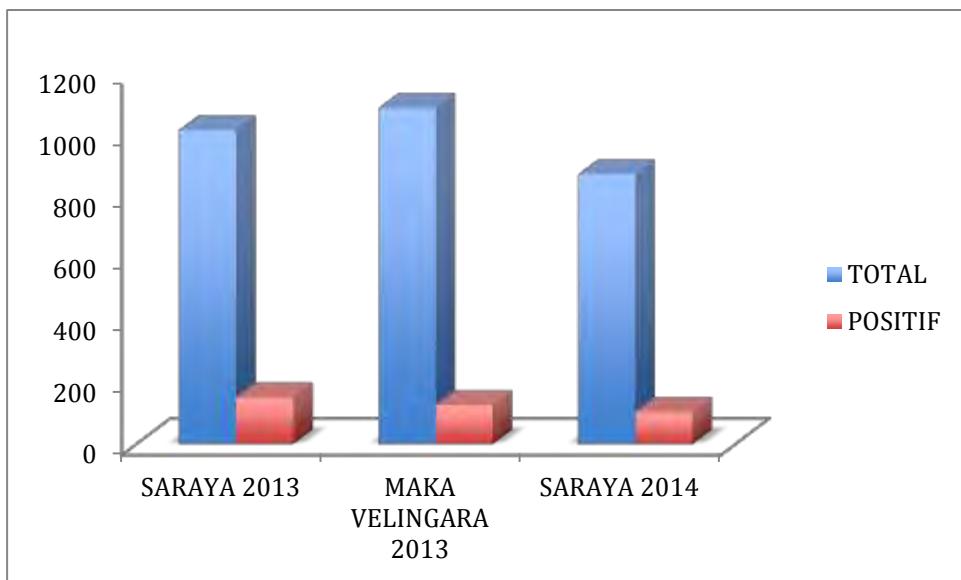


Figure 10: Prévalence palustre des différentes enquêtes ménages de 2013 et 2014.

Pour la recherche des marqueurs moléculaires de résistance du *Plasmodium falciparum* nous avons choisi au hasard 100 papiers filtres dont les gouttes épaisses étaient positives en 2013. Cents autres papiers filtres avaient été choisis aussi en 2014 parmi les gouttes épaisses positives.

II.3 Prévalence des mutations associées à la résistance à l'AQ et à la CQ

II.3.1- Prévalence de la mutation 86Y du gène *Pfmdr1* associée à la résistance à l'AQ

Les prévalences de la mutation *Pfmdr86Y* associée à la résistance à l'AQ étaient respectivement de 15,62% (15/96) et 11,11% (10/90), avant et après le début de l'administration de la CPS (Tableau VIII).

Tableau VIII : Prévalence de la mutation *Pfmdr86Y* en 2013 et 2014

Période	Nbre d'échantillons utilisés	Nbre d'échantillons positifs à <i>Pfmdr86Y</i>	Pourcentage (%)
Avant CPS	96	15	15,62
Après un an de CPS	90	10	11,11

II.3.2- Prévalence des mutations 76T du gène *Pfcrt* associée à la résistance à la CQ.

Les mutations associées à la résistance de *P.falciparum* à la CQ (*Pfcrt* 76) avaient été retrouvés aussi bien en 2013 qu'en 2014. Les prévalences des souches sauvages CVMNK étaient respectivement de 77% et 73% en 2013 et en 2014. Par contre celles des souches mutantes étaient 23% et 27% respectivement avant et après la CPS (Figure 11).

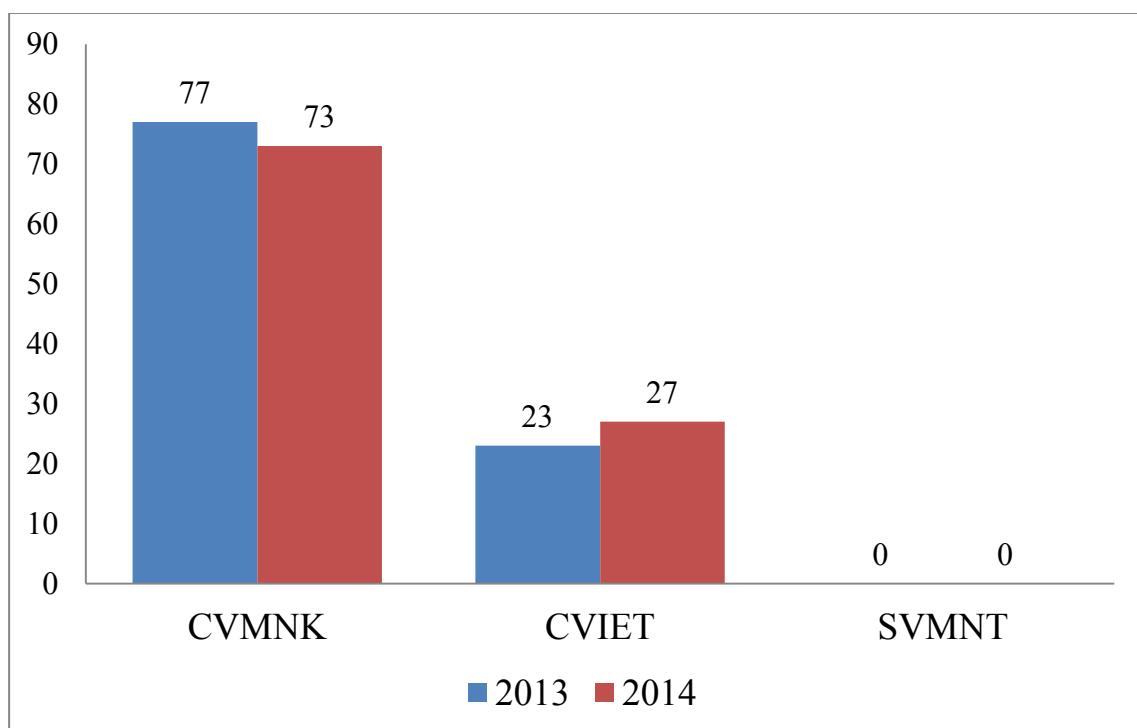


Figure 11: Prévalence des haplotypes de *Pfcrt* en 2013 et 2014.

II.4. Prévalence des marqueurs moléculaires associés à la résistance de *P.falciparum* à la SP.

II.4.1. Prévalence des simples mutations de résistance à la SP

➤ Prévalence des simples mutations situées sur le gène *Pfdhfr*.

Les prévalences des simples mutations situées au niveau des codons 51I, 59R et 108S du gène *Pfdhfr* étaient élevées au cours de notre étude. Elles étaient sans différence significative pour le codon 51I (64,4% et 67,7% ; p=0,63) et pour le codon 59R (65,5% et 68,8% ; p=0,63) entre les deux années. D'autre part une différence significative avait été noté pour le codon 108S entre ces deux années (87,7% vs 76,6% avec p=0,05). Par ailleurs la mutation 164L associée à la résistance clinique de *P.falciparum* à la Pyriméthamine n'avait pas été retrouvée au cours de notre étude (Tableau IX).

Tableau IX: Prévalence des simples mutations du gène *Pfdhfr* en 2013 et 2014.

	<i>Mutation</i>	<i>Avant CPS</i>	<i>Apres un an de CPS</i>	<i>p-value</i>
<i>Pfdhfr</i>	51I	64,4% (58/90)	67,7% (61/90)	0.63
	59R	65,5% (59/90)	68,8% (62/90)	0.63
	108S	87,7% (79/90)	76,6% (69/90)	0.05
	164L	0% (0/90)	0% (0/90)	-

➤ **Prévalence des simples mutations située sur le gène *Pfdhps*.**

Une prévalence élevée de la simple mutation *Pfdhps* 347G a été retrouvée. Par ailleurs nous avons noté une différence significative entre les prévalences de mutation au niveau du codon 437G du gène *Pfdhps* entre 2013 (71,1%) et 2014 (54,4%) ($p=0,02$). La mutation 540E était très faible en 2013 (2.2%) et absente en 2014 (Tableau X).

Tableau X: Prévalence des simples mutations du gène *Pfdhps* en 2013 et 2014.

	<i>Mutation</i>	<i>Avant CPS</i>	<i>Après un an de CPS</i>	<i>p-value</i>
<i>Pfdhps</i>	437G	71.1% (64/90)	54.4% (49/90)	0.02
	540E	2,2% (2/90)	0,0% (0/90)	-

II.4.2. Combinaison des mutations associées à la résistance de *P. falciparum* à la SP.

➤ **Prévalence de la double mutation 437G/540E du gène *Pfdhps***

La double mutation n'avait été retrouvé qu'en 2013 avec une fréquence de 3,1% (2/64). Par contre elle était absente en 2014.

➤ **Prévalence de la triple mutation 51I, 59R et 108S du gène *Pfdhfr***

Les prévalences de la triple mutation 51I, 59R et 108S étaient similaires pour les années 2013 et 2014 avec respectivement 58,2% contre 67% ($p=0,24$) (Figure 12).

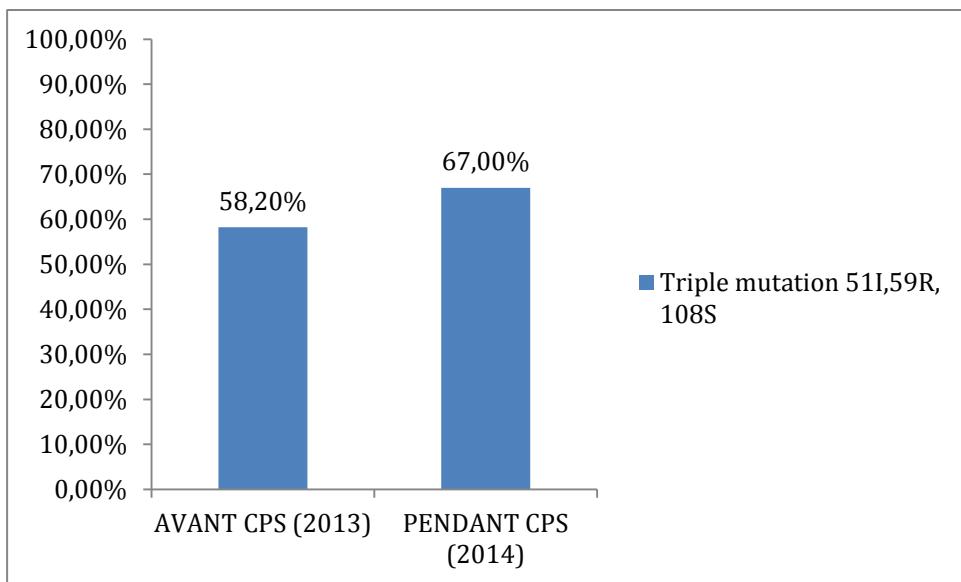


Figure 12: Prévalence de la triple mutation associée au gène *Pfdhps* marqueur de la résistance à la Pyriméthamine en 2013 et 2014

➤ **Prévalence des multiples mutations à la SP**

Pendant notre étude, les prévalences de la quadruple mutation (51I, 59R, 108S et 437G) étaient similaires en 2013 et 2014 avec respectivement des fréquences de 48,6% et 43% ($p=0,52$). La quintuple mutation (51I, 59R, 108S, 437G et 540E) n'avait pas retrouvée qu'en 2013 avec une fréquence de 1,3% (Tableau X).

Tableau X: Prévalence des mutations multiples associées à la SP en 2013 et 2014.

	<i>Mutation</i>	<i>Avant CPS</i>	<i>Après un an</i>	<i>p-value</i>
			<i>de CPS</i>	
Quadruple	<i>51I, 59R, 108S, 437G</i>	48,6% (38/79)	43,0% (34/79)	0,52
Quintuple	<i>51I, 59R, 108S, 437G, 540E</i>	1,3% (1/79)	0,0% (0/79)	-

DISCUSSION

Au Sénégal depuis 2003, le traitement préventif intermittent (TPI) a été adopté comme stratégie de chimioprévention du paludisme chez la femme enceinte. Devant le succès de cette stratégie, plusieurs études pilotes ont été menées un peu partout en Afrique dont le Sénégal sur le Traitement Préventif Intermittent du paludisme chez l'enfant (TPIe). Aujourd'hui cette nouvelle stratégie de prévention du paludisme chez les enfants est appelée CSP utilisant la SP+AQ. Elle a été recommandée par l'OMS depuis 2012 dans les zones de transmission saisonnière du paludisme et chez les enfants de 3 à 59 mois. Le Sénégal a commencé sa mise œuvre en 2013 en phase pilote dans quatre districts situés au sud du pays, chez les enfants de 3 à 120 mois. Cependant, l'efficacité de cette stratégie est menacée par la propagation de la résistance du *P.falciparum* à la SP et AQ bien établie en Afrique de l'Est et qui continue à se propager en Afrique de l'Ouest.

Des études moléculaires ont montré que l'AQ et la CQ ont le même mode d'action sur les souches plasmodiales et que des souches résistantes à la CQ devenaient résistantes à l'AQ vis-versa. Fort de ces constats et du fait de l'existence de marqueurs moléculaires validés et très fiables pour le suivi de la résistance à la CQ (*Pfcrt*), à l'AQ (*Pfmdr*) d'une part et la SP (*Pfdhfr* et *Pfdhps*) d'une part ; que nous avons mené cette étude dans le cadre notre master dont l'objectif était de déterminer l'impact de la CSP sur la prévalence de marqueurs moléculaires associées à la résistance de *P. falciparum* à la SP et à l'AQ.

Nous avions choisi au hasard 100 échantillons provenant des enquêtes ménages d'avant administration et 100 autres des enquêtes après CPS. Toutefois lors des différentes amplifications nous n'avions pas eu de l'ADN pour certains échantillons expliquant ainsi la baisse des certains effectifs dans nos résultats.

Les résultats de notre étude ont montré que les marqueurs moléculaires de résistance à la SP et AQ étaient présents aussi bien avant la mise en œuvre de la CPS, qu'un an après. La présence de ces marqueurs moléculaires de résistance surtout avant la CPS, pourrait être expliquée par le fait que la SP est utilisée

pour le traitement préventif intermittent du paludisme chez la femme enceinte, mais aussi par le fait que l’AQ est aussi utilisé en association avec l’Artésunate dans le traitement en première ligne des cas de paludisme simple. L’absence de modifications considérables des prévalences, retrouvée dans notre étude, pourrait s’expliquer par la courte durée attendue pour l’évaluation d’impact.

Dans une étude menée au Sénégal, mais au centre du pays, en 2008 et 2010, il avait été démontré que les haplotypes de CVIET de *Pfcrt* et le polymorphisme de 86Y de *Pfmdr1*, étaient plus fréquents chez ceux qui avaient reçu le TPI chez l’enfant (TPIe), (25).

Les résultats d’une étude menée au Burkina Faso, avaient montré une modification des prévalences un an après l’administration de la CPS. En effet dans cette étude, une différence significative avait été retrouvée pour les mutations de *Pfcrt* 76T (68.5% à 83.0%, p = 0,04) (45). Au Mozambique, la fréquence de la résistance à la Chloroquine qui avait été retrouvée associée à l’haplotype mutant CVIET de *Pfcrt* était supérieure à 90 % avant et après administration du TPIe (16).

Les simples mutations 51I, 59R et 108S du gène *Pfdhps* ont été retrouvées au cours de notre étude à des fréquences élevées mais similaires entre les deux années. Cette fréquence élevée de mutations *Pfdhfr* avant la mise en œuvre effective CPS peut être due à l’utilisation d’autres médicaments chimiquement apparentés à la SP, tels que le Cotrimoxazole, qui est couramment utilisé dans notre zone d’étude pour traiter les infections respiratoires aigues (IRA) bactériennes au niveau communautaire et comme mesure préventive chez les patients vivant avec le VIH/SIDA. Bien que non montré, *in vivo*, une résistance croisée *in vitro* a été rapportée entre Cotrimoxazole et les composants de la SP (22).

La mutation 164L n’avait pas été retrouvée lors de notre étude tout comme dans l’étude menée au centre du pays (25); ce qui confirme que le parasite est toujours sensible à la Pyriméthamine. Par contre dans l’étude menée au Burkina

Faso, une différence significative des fréquences avait été retrouvée entre les deux années avec respectivement *Pfdhfr* 59R (54,8% à 83,3%, $p=0,0002$), et *Pfdhfr* 108N (55,0% à 87,2%, $p=0,0001$) (45).

Pour le gène *Pfdhps*, nous avons retrouvé aussi une différence significative pour les simples mutations 437G et 540E. Cette même situation avait été notée par une étude menée dans la même zone mais entre 2010 et 2011, et au cours de laquelle la mutation gène *Pfdhps* 437G avait diminué dans les deux groupes de 44,6% à 28,6% ($p=0,07$) et de 66,7% à 47,5% ($p=0,02$) respectivement chez les contrôles et les groupes TPIe (27). Par contre dans l'étude menée au centre du pays en 2008 et 2010, cette mutation n'avait pas été retrouvée (25).

La recherche des mutations multiples de résistance du *Plasmodium falciparum* pendant notre étude nous a permis de noter la présence de la triple mutation 51I, 59R et 108S du gène *Pfdhfr*, à des fréquences similaires. Par contre une autre étude menée au Sénégal, dans la même zone et évaluant le TPIe, avait retrouvé une faible tendance à la hausse de la triple mutation du gène *Pfdhfr* dans le groupe contrôle (sans TPIe) passant de 52,1% à 64,3% ($p=0,17$) respectivement en 2009 et 2010. Dans le groupe TPIe une différente significative de la prévalence ce la triple mutation de *Pfdhfr* avait été retrouvée, sa prévalence était passée de 40,6% à 64,6% ($p=0,005$) respectivement pour 2009 et 2010 (27). La double mutation 437G/540E du gène *Pfdhps* n'a été retrouvée qu'en 2013 avec une fréquence de 3,1% (Fréquence= 2/64) dans notre étude. Ceci est de bonne augure quant à la continuation de l'utilisation de Sulfadoxine. La quadruple mutation (51I, 59R, 108S et 437G) avait quant à elle des proportions similaires en 2013 et 2104 avec respectivement des fréquences de 48,6% et 43% ($p=0,52$). Par contre dans une autre étude menée dans la même zone, il avait été retrouvé une baisse de la prévalence lors de la comparaison de deux groupes (contrôle et TPIe). Celle-ci était passée de 36,8% à 20% ($p=0,15$) en 2009 et de 35,6% à 27,1% ($p=0,35$) en 2010 (27).

La chimioprévention du paludisme saisonnier est une nouvelle stratégie qui est en train de faire ses preuves au Sénégal depuis sa mise en œuvre. En effet l'évaluation de son impact sur la morbidité palustre a permis de constater une baisse considérable de celle ci. Les marqueurs moléculaires de résistance du *P.falciparum* à la SP+AQ présents aussi bien entre les deux années et sans différence significative, il n'en demeure pas moins que le parasite reste encore sensible aux molécules utilisées pour la CPS. Nous pensons donc continuer le monitoring annuel de ces marqueurs de résistance afin d'informer les autorités sanitaires et de proposer d'autres molécules alternatives.

Pour conserver et préserver l'efficacité de la SP et l'AQ, il sera nécessaire de respecter les posologies d'administration de la CPS lors des différentes campagnes. Il faudra aussi s'assurer que la CPS ne soit pas administrée aux enfants ayant pris un traitement antipaludique contenant de la SP ou de l'AQ dans le même mois que l'administration. Dans les régions de mise en œuvre de la CPS, il faudra remplacer le Cotrimoxazole utilisé dans la prise en charge de IRA au niveau communautaire et pour la prévention des infections opportunistes par une autre molécule ne contenant pas de Sulfamide.

CONCLUSION

Dans cette étude qui entre dans le cadre du suivi et de l'évaluation de la CPS, nous avons évalué l'impact de cette stratégie sur les marqueurs moléculaires de résistance du *Plasmodium falciparum* à la SP+AQ. Nous avons réalisé notre travail sur 200 prélèvements dont les 100 premiers proviennent des enquêtes de ménages menées en 2013 dans les districts de Maka Colibantang, Saraya et Vélingara avant la mise en œuvre de la CPS. Les 100 autres ont été recueillis lors d'enquêtes de ménages effectuées dans le district de Saraya en 2014, un mois après la fin de la campagne CPS. Ces différents prélèvements nous ont permis de rechercher la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance du *Plasmodium falciparum* à la SP (portant sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*) et à l'AQ (*Pfmdr* et *Pfcrt*).

L'évaluation de la résistance du *Plasmodium falciparum* à l'AQ nous a permis d'observer la présence de mutations liées au gène *Pfmdr* (*Pfmdr86Y*) à des fréquences de l'ordre de 15,62% et de 11,11% respectivement en 2013 et 2014. De même les marqueurs moléculaires de résistance du *Plasmodium* associés au gène *Pfcrt* ont été retrouvés aussi bien en 2013 qu'en 2014. Toutefois l'haplotype sauvage (CVMNK) a été plus rencontré que celui mutant (CVIET) au cours de ces deux années avec des fréquences respectivement de 77% vs 23% en 2013 et 73% vs 27% en 2014.

Cette étude nous a permis de constater que les marqueurs moléculaires de résistance du *Plasmodium falciparum* à la SP+AQ étaient présents dans notre site d'étude avant le début de l'administration de la CPS. L'évaluation de ces mêmes marqueurs, un an après la mise en œuvre de cette nouvelle stratégie de prévention du paludisme chez les enfants, n'a pas montré de différences significatives mais plutôt des similitudes.

L'absence de mutation au niveau du codon 164L pour le gène *Pfdhfr* et au niveau des codons 540E et 436 pour le gène *Pfdhps*, et la faible prévalence des marqueurs moléculaires de résistance à l'AQ, malgré la présence des autres marqueurs de résistance, montrent que le *Plasmodium falciparum* est encore

sensible aux molécules utilisées dans le cadre de la CPS. Pour mieux mesurer l'impact de la CPS sur la résistance du Plasmodium, il conviendra alors de l'évaluer annuellement pour pouvoir alerter à temps les autorités sanitaires du pays. Des études pour la recherche d'autres stratégies ou molécules alternatives pour la chimioprévention du paludisme doivent aussi être parallèlement menées en guise de prévision à une augmentation de la résistance après plusieurs années de CPS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abba, Katharine., et al. “Rapid Diagnostic Tests for Diagnosing Uncomplicated Non-falciparum or Plasmodium Vivax Malaria in Endemic Countries.” Cochrane Database of Systematic Reviews (2014). illumigene® Malaria package insert, SN11102.

1. **A.I.D. Project Impact Evaluation Report N09:** Senegal: The Sine-Saloum Rural health, October 1980.
2. **Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, et al.** Efficacy of the RTS, S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. Lancet. 2004 Oct. 16-22 , 364(9443) :1380-3. Lancet. 2005 Feb 5-11 et 365(9458) :472-3.
3. **Anstey NM, Russell B, Yeo TW, et al.** The pathophysiology of vivax malaria. Trends Parasitol 2009 et 25 :220-7.
4. **Aubry P, Gaüzère BA.** Paludisme Actualités 2015, Mise à jour le 03/10/2015, Médecine tropicale.
5. **Basco LK.** Field application of in vitro assays sensitivity of human malaria parasites antimalarial drugs. Geneva : WHO Press, 2007.
6. **Boukary BS, Napo-Koura G, Kampitibe N.** Le paludisme congenital: considerations cliniques, parasitologiques et histologiques, à propos de 200 cas colligés au C.H.U de LOME et à l'hôpital KPALIME Bull. Soc. Path. Exo.1991 et 84 (5) : 448-57 7.
7. **Bruce-Chwatt et al.** Malaria vaccine trials: a guided step into the unknown. Ann Soc Belg Med Trop. et 66(1):5-13. 1986.
8. **Bruneel F.** Paludisme grave. Encyc Med Chir Anesthésie-réanimation, 2009 et (36-984-B-10).
9. **Cooper RA, Lane KD, Deng B, et al.** Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. Mol Microbiol 2007 et 63 : 270-82.
10. **Dansokho E.F, Ki-Zerbo G, Badiane S.** Prise en charge diagnostique et thérapeutique de l'accès palustre simple dans la région de Dakar au Sénégal. Ann. Soc. Belge Med. Trop., 1994 et 291-300.

11. **Deluol AM, Levillayer H, Poirot J-L**: Diagnostic du paludisme (<http://www.ledamed.org/IMG/html/doc-10811.html>).
12. **Diaz CA, Allocco J, Powles MA, et al.** Liberator PA. Mol Biochem Parasitol. 2006 Mar et 146(1):78-88. Epub 2005 Nov 1. PMID:16325279.
13. **Dondorp AM, Nosten F, Yi P, et al.** Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. The New England journal of medicine, 361 (5). pp. 455-67. ISSN 0028-4793 Downloaded from: <http://researchonline.lshtm.ac.uk/3379/>
14. **Duraisingham MT, Cowman AF**. Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance. Acta Trop 2005 et 94 : 181-90.
15. **Enosse. S, Magnussen P, Abacassamo F, et al.** Rapid increase of Plasmodium falciparum dhfr/dhps resistant haplotypes, after the adoption of sulphadoxine-pyrimethamine as first line treatment in 2002, in southern Mozambique.
<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-7-115>
16. **Etude RDT PNLP/UCAD_ Rapport d'activités Août 2007** : étude de la faisabilité de l'utilisation des tests de diagnostic rapide du paludisme rapport final août 2007.
17. **SJ, Cowman AF**. The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. Acta Trop 1994 et 56 : 157-71.
18. **Gentilini. M et Duflo. B**: Maladies tropicales transmissibles : le paludisme dans le Sahel, l'exemple du Mali, édition John Libbey Eurotex et éditions 2, 3 ,4 et 5 : Flammarion médecine-sciences. Médecine tropicale.
19. **Gregson A, Plowe CV**. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. Pharmacol Rev 2005 et 57 : 117-45.
20. http://www.who.int/malaria/publications/atoz/smcr_report_teg_meeting_may_2011.pdf, 1.
21. **Khalil I, Ronn AM, Alifrangis M, et al.** Dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genotypes associated with in vitro resistance of Plasmodium falciparum to pyrimethamine, trimethoprim, sulfadoxine, and sulfamethoxazole. Am J Trop Med Hyg. 2003 et 68:586-589.

22. **Laufer MK, Thesing PC, Eddington ND, et al.** Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *N Engl J Med* 2006 et 355 : 1959-66.
23. **Levine RA, Wardlaw SC, Patton CL.** Detection of hemoparasite using QBC analysis tubes. *Parasitol. Today*, 1989, 5 : 132-134.
24. **Lo AC, Faye B, Ba el-H et al.** Prevalence of molecular markers of drug resistance in an area of seasonal malaria chemoprevention in children in Senegal. <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-137>
25. **Mazier D.** Le paludisme : cycle et biologie des plasmodiums. Ed. Market., Ellipses/ Aupelf. 1991 :25-34.
26. **Ndiaye M, Tine R, Faye B et al.** Selection of antimalarial drug resistance after intermittent preventive treatment of infants and children (IPTi/c) in Senegal. www.ncbi.nlm.nih.gov › NCBI › Literature › PubMed Central (PMC).
27. **Nishiyama Y, Okuda Y, Kim HS, et al.** Genetic analysis of mefloquine-resistant mechanism of *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004 et 48 : 163-4.
28. **Noranate N, Durand R, Tall A, et al.** Rapid dissemination of *Plasmodium falciparum* drug resistance despite strictly controlled antimalarial use. *PLoS One* 2007 et 2 : e139.
29. **Organisation mondiale de la Santé.** Rapport mondial sur l'efficacité des médicaments antipaludiques et les pharmacorésistances 2000-2010. Genève, 2010. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241500470/en/index.html>.
30. **OMS Programme mondial de lutte antipaludique** : Recommandation de politique générale de l'OMS : Chimioprévention du paludisme saisonnier pour lutter contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* en zone de forte transmission saisonnière dans la sous-région du Sahel en Afrique mars 2012.
31. **Organisation Mondiale de la Santé** : Faire reculer le paludisme : L'utilisation des Tests diagnostiques rapides du paludisme (2ème édition).
32. **Organisation mondiale de la santé** : Evaluation et surveillance de l'efficacité des antipaludiques pour le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* non compliqué. WHO/HTM/RBM/2003.50. Organisation Mondiale de la Santé, Genève (2006).

33. **OMS** : directives pour le traitement du. paludisme.
34. **Pages F, Orlandi-Pradines E, Corbel V.** Vecteurs du paludisme : biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Méd Mal Infect* 2007 et 37 : 153-61.
35. **Plan stratégique pour faire reculer le paludisme au Sénégal 2001 – 2005.**
36. **PNLP**: plan stratégique national 2011-2015.
37. **Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, et al.** Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfdmbr1* gene copy number. *Lancet* 2004 et 364 : 438-47.
38. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* : recommandations pour la pratique clinique 2007 (révision du consensus 1999). Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF).
39. **Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M.** Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 2007 et 23 : 332-9.
40. **S Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, et al.** Efficacy of the RTS, S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004 Oct 16-22, 364(9443): 1380-3. *Lancet*. 2005 Feb 5-11 et 365(9458) : 472-3.
41. **Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, et al.** Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol* 2001 et 17 : 582-8.
42. **Sidhu AB, Verdier-Pinard V, Fidock DA.** Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcrt mutations. *Science* 2002 et 298 : 210-3.
43. **Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF).** Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* recommandations pour la Réanimation et pratique clinique (Révision 2007 of the 1999 Consensus conférence). 17: 1-54. 2008.
44. **Somé AF, Zongo I, Compaoré YD, et al.** Selection of drug resistance-mediating *Plasmodium falciparum* genetic polymorphisms

by seasonal malariachemoprevention in Burkina Faso.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24733476.

45. **Stepniewska K, White NJ.** Pharmacokinetic determinants of the window of selection for antimalarial drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May et 52(5): 1589-96. doi: 10.1128/AAC.00903-07. Epub 2008 Feb 25.
46. **Stratton L, O'Neill MS, Kruk ME et al.,** The persistent problem of malaria: addressing the fundamental causes of a global killer. *Soc Sci Med* 2008 et 67 : 854-62.
47. **Trape JF.** The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* et 64 : 12-7. 2001.
48. **Valderramos SG, Scanfeld D, Uhlemann AC, et al.** Investigations into the role of the Plasmodium falciparum SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Sep et 54(9): 3842-52. doi: 10.1128/AAC.00121-10. Epub 2010 Jun 21.
49. **Warhurst DC.** A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med* et 344 : 299-302. 2001.
50. **White NJ, Pongtavornpinyo W.** The de novo selection of drug-resistant malaria parasites. *Proc Biol Sci.* 2003 Mar 7 et 270 (1514):545-54.
51. **White. N.** Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy Published 29 April 1999.DOI: 10.1098/rstb.1999.0426.
52. **WHO Scientific Group on Chemotherapy of Malaria.** et World Health Organization., 1967.
53. **World Health Organization.** Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva: WHO Press, 2009.
54. **WHO** guidelines for the treatment of malaria. World Health Organisation, 2006.
55. **Wooden J, Kyes S, Sibley CH.** PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*, 1993. 9: 303-305.