

## SOMMAIRE

	<u>Pages</u>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE : QUELQUES RAPPELS SUR LE PALUDISME.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Définition.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Epidémiologie .....</b>	<b>7</b>
<b>3. Symptômes .....</b>	<b>9</b>
<b>4. Diagnostic .....</b>	<b>10</b>
4.1. Diagnostique clinique.....	10
4.2. Diagnostic biologique.....	10
4.2.1. Les techniques microscopiques conventionnelles.....	10
4.2.2. La technique microscopiques par fluorescence.....	11
4.2.3. La détection des antigènes du paludisme par immunochromatographie	11
4.2.4. Sérologie.....	11
4.2.5. Détection d'acides nucléiques spécifiques (PCR).....	12
<b>5. Les antipaludiques.....</b>	<b>12</b>
<b>6. Immunité contre le paludisme .....</b>	<b>15</b>
6.1. Immunité innée.....	16
6.2. Immunité acquise .....	17
6.3. Transmission maternofoetale d'anticorps.....	17
6.4. Facteurs physiologiques .....	18
<b>7. Chimiorésistance du paludisme.....</b>	<b>18</b>
7.1. Mécanismes de résistance aux antipaludiques .....	19
7.2. Chimiorésistance multiple .....	21
7.3. Facteurs favorisants la résistance .....	21
<b>8. Prévention.....</b>	<b>22</b>
8.1. Lutte antivectorielle.....	22
8.2. Traitement préventif intermittent chez la femme enceinte et le nourrisson..	22

8.3. Chimioprévention du paludisme saisonnier.....	23
8.4 Vaccin contre le paludisme.....	23
<b>DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL REALISE.....</b>	<b>24</b>
1. Zone d'étude.....	25
2. Population d'étude.....	28
3. Stratégie adaptée.....	29
<b>Objectif 1 : Evaluer les marqueurs moléculaires de la résistance à la Sulfadoxine-Pyrimethamine et l'Amodiaquine dans une zone où la Chimioprévention Saisonnière du Paludisme est implantée.</b>	
1. Introduction.....	31
2. Méthode.....	31
3. Résultats.....	33
4. Commentaires.....	34
<b>Publication 1: Prevalence of molecular markers of drug resistance in an area of seasonal malaria chemoprevention in children in Senegal.....</b>	<b>36</b>
<b>Objectif 2: Mesurer la sécrétion des anticorps anti MSP-1 et anti AMA-1 chez des enfants soumis à la Chimioprévention Saisonnière du Paludisme au Sénégal</b>	
1. Introduction.....	37
2. Méthode.....	37
3. Résultats.....	38
4. Commentaires.....	40
<b>Article 2: Seasonal malaria Chemoprevention in children and production of antibodies against MSP1 and AMA1 in Senegal.....</b>	<b>42</b>
<b>TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>57</b>
Discussion générale.....	58
Conclusion et perspectives.....	61
<b>QUATRIEME PARTIE BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>62</b>

# INTRODUCTION

En Afrique sahélienne, la transmission du paludisme est très saisonnière. Pendant quelques mois, au cours de la saison des pluies, la mortalité et la morbidité dues au paludisme sont très élevées. La plupart des décès surviennent chez les sujets vulnérables à savoir les enfants et les femmes enceintes. Près d'un millions de décès surviennent chaque année. Au Sénégal, malgré la forte baisse du taux de mortalité (30% en 2006 à 3% en 2009) (PNLP 2009), le paludisme demeure toujours un problème de santé publique.

La perte d'efficacité des antipaludiques a mis en avant non seulement le besoin de nouveaux traitements antipaludiques, mais aussi la nécessité de développer de nouvelles approches pour prévenir l'infection, particulièrement chez les jeunes enfants. La propagation de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques est un problème de santé publique dans le monde entier compte tenu du nombre limité de médicaments disponibles, de l'absence de vaccin et de l'impact de la morbidité et de la mortalité du paludisme. La résistance des souches de *Plasmodium falciparum* vis à vis de la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP), une des alternatives de la chloroquine, retrouvée en Asie du Sud-est et en Amérique du Sud, s'est propagée jusqu'en Afrique de Ouest (Wongsrichanalai *et al.* 2008). La compréhension des mécanismes de résistance est d'une importance capitale surtout pour les cibles de nouveaux antipaludiques car elle permet d'avoir des marqueurs moléculaires pour surveiller l'activité de la drogue et l'efficacité du traitement. Au Sénégal l'utilisation de la combinaison Amodiaquine plus Sulfadoxine-Pyrimethamine (AQ+ SP, dénommée TPI saisonnier pour la prévention du paludisme chez les enfants vivant dans les zones à transmission saisonnière a entraîné une réduction de 86% des incidences de la maladie (Cisse *et al.*, 2006). Une approche similaire adoptée par la même équipe mais cette fois ci en utilisant la combinaison Piperaquine plus Sulfadoxine-Pyrimethamine (PQ+SP) ou avec Dihydroartémisinine (DHA+PQ) a montré que la combinaison PQ+SP était la plus efficace et la mieux tolérée (Cisse *et al.*, 2009). Plusieurs études ont montré que les enfants africains pouvaient être protégés efficacement contre le paludisme par la chimioprophylaxie avec l'utilisation de médicaments antipaludiques régulièrement pris, parfois en une dose sous-thérapeutique (Greenwood *et al.*, 1988).

Une stratégie recommandée actuellement par l'OMS consiste à administrer de façon standardisée, aux femmes enceintes et aux nourrissons, une dose thérapeutique d'antipaludiques lors des visites prénatales et des séances de vaccinations. Il s'agit du traitement préventif intermittent (TPI), qui a donné de bons résultats chez les femmes enceintes et les nourrissons, mais qui n'avait pas encore été envisagée chez les enfants

résidant en zone de paludisme saisonnier et pour lesquels le risque de mourir du paludisme reste très élevé jusqu'à l'âge de cinq ans. Ainsi la Chimioprévention du Paludisme Saisonnier (CPS), anciennement connue sous le nom de traitement préventif intermittent chez les enfants (TPIe), est une nouvelle stratégie de lutte adaptée à des zones de transmission fortement saisonnière. La CPS est définie comme l'administration intermittente de traitement complet avec un antipaludique pendant la saison de transmission du paludisme afin de prévenir la maladie en maintenant les concentrations thérapeutiques des médicaments dans le sang tout au long de la période à risque du paludisme (OMS 2012). C'est ainsi que l'OMS recommande désormais que tous les enfants vivant dans les zones de transmission fortement saisonnière devraient recevoir la combinaison Sulfadoxine-Pyriméthamine plus amodiaquine chaque mois pour un maximum de 4 mois pendant la période de transmission du paludisme. Cependant les efforts visant à lutter contre cette maladie dans ces zones, peuvent être entravés par la propagation de la résistance aux antipaludiques.

La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques est corrélée à des simples polymorphismes nucléotidiques (SNPs) situés à différents niveaux des gènes de ce dernier. Ainsi pour la SP la résistance est associée à des simples polymorphismes situés au niveau des gènes *P. falciparum dihydrofolate réductase (pfdhfr)* et *P. falciparum dihydroptéroate synthétase (pfdhps)*. La résistance à la pyriméthamine est due aux SNPs du gène *pfdhfr* donnant une substitution d'aminoacides aux positions N51I, C59R, S108N/T et I164L (Cowman et Morry 1988 ; Peterson et Walliker 1988). En ce qui concerne la sulfadoxine, la résistance de *P. falciparum* se manifeste par un changement d'aminoacides aux positions S436A/F, A437G, K540E, A581G et A613S/T du gène *pfdhps* (Brooks *et al.* 1994 ; Triglia et Cowmam. 1994). La présence de la triple mutation du gène *P. falciparum dihydrofolate réductase (pfdhfr)* aux codons 108, 51 et 59 ainsi que celle de la double mutation de *P. falciparum dihydroptéroate synthétase (pfdhps)* au niveau des codons 437 et 540 sont associées à des niveaux élevés de résistance à la SP. On peut cependant noter que le TPI chez le nourrisson au Sénégal avec la SP a révélé que malgré une augmentation de la prévalence des mutations individuelles de *P. falciparum dihydrofolate réductase (pfdhfr)* et de *P. falciparum dihydroptéroate synthétase (pfdhps)*, il n'y avait pas d'impact majeur sur l'efficacité de SP (Faye *et al.*, 2011). Des études faites à Maputo ont montré que l'utilisation de la combinaison Artésunate + Sulfadoxine-Pyriméthamine (AS +SP) n'a pas pu empêcher une augmentation du nombre de parasites résistants à la SP (Raman *et al.*, 2010). La triple mutation restait stable mais la double mutation pour pfdhps et la quintuple mutation pfdhfr/pfdhps ont augmenté de

pourcentage entre 2004 et 2008 (Raman *et al.*, 2010). Ainsi avec le niveau élevé de la quadruple mutation à Maputo, il se pose des questions sur l'utilisation de la SP combinée à un autre antipaludique dans le traitement du paludisme non compliqué. Une prévalence élevée de la quintuple mutation suggère une utilisation thérapeutique limitée de SP-AS pour le traitement du paludisme non compliqué, et peut réduire l'efficacité de la SP-monothérapie pour le traitement préventif intermittent au Mozambique (Raman *et al.*, 2010).

En plus des marqueurs de résistance à la SP, les mutations des gènes *P. falciparum* chloroquine transporteur (*pfcrt*) et de *P. falciparum* multi drug résistance (*pfmdr1*) devraient être évaluées afin de surveiller l'efficacité de AQ dans les zones où la CPS utilisant la SP+AQ est mise en œuvre. L'haplotype mutant de Pfcrt (CVIET) basé sur le codon 72-76, qui a été démontré comme indicateur de résistance à la chloroquine (CQ), a été associé à une résistance modérée à l'Amodiaquine en Afrique, en présence d'haplotypes particuliers de pfmdr1. Ce dernier a des mutations génétiques au niveau des codons 86, 184 et 1246. Mais la substitution de la tyrosine à la position 1246 est rare en Afrique de l'Ouest. Ainsi sa présence avec l'allèle CVIET de pfcrt est un bon marqueur de résistance à AQ.

L'immunité anti palustre humaine est aussi un autre facteur important dans la prévention du paludisme, en particulier chez les adultes dans les zones de transmission modérée à intense. Cette immunité se développe après des années d'exposition et, bien qu'elle ne confère jamais une protection totale, elle réduit le risque à une infection palustre et la survenue des complications sévères. C'est la raison pour laquelle la plupart des décès due au paludisme en Afrique surviennent chez de jeunes enfants, tandis que, dans les zones de faible transmission où la population est peu immunisée, tous les groupes d'âge sont exposés. Cependant avec la chimioprophylaxie contre le paludisme, l'acquisition de l'immunité anti-palustre peut à la longue être retardée. Des études faites chez des femmes enceintes ont montré que le TPI dans cette population peut entraver l'immunité contre le paludisme surtout chez les multi gestes. L'immunité acquise contre la maladie est surtout observée dans les régions d'endémie palustre où la densité parasitaire diminue avec l'âge et les manifestations cliniques du paludisme sont généralement plus fréquentes chez les enfants de moins de 5 ans (McGregor 1986 ; Snow *et al.*, 1999). Plusieurs antigènes considérés comme des cibles de la réponse immunitaire durant le stade érythrocytaire ont été identifiés (Cooper 1993 ; Crewther *et al.*, 1990 ; Good *et al.*, 1998). Parmi eux, la Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) et l'Apicale Membrane l'Antigène 1 (AMA-1) de *Plasmodium falciparum* constituant deux principaux candidats vaccins [Good *et al.* 1998]. L'antigène MSP1 est le plus intensément étudié de ces protéines. Des études

d'immunisation ont montré que AMA1 suscite des réponses immunitaires protectrices (Bouharoun-Tayoun *et al.* 1995, Theisen et al. 1998, Miura et al 2007). Situé sur la surface des merozoïtes, ils jouent un rôle dans le processus d'invasion parasitaire (Blackman 1990 ; Triglia *et al.*, 2000).

Afin de déterminer dans quelle mesure la Chimioprévention Saisonnière du Paludisme peut être efficace lorsqu'elle est mise en œuvre à grande échelle, une étude a été initiée par le service de Parasitologie de la Faculté de Médecine de l'UCAD en collaboration avec l'IRD, la London School et le Ministère de la Santé. Trois districts sanitaires ont été choisis à savoir Mbour, Fatick et Bambey. La combinaison Sulfadoxine-Pyriméthamine plus l'amodiaquine a été administrée chez les enfants vivant dans ces trois districts sanitaires par des relais communautaires durant la période de forte transmission à savoir les mois de Septembre, Octobre et Novembre. L'intervention a été introduite graduellement sur une période de trois ans de 2008, 2009 et 2010 pour permettre l'évaluation de son impact. Approximativement 100.000 enfants issus de 725 villages ont été inclus. Pendant le mois de Décembre de chaque année, une évaluation durant laquelle des prélèvements de sang sont effectués, a été menée.

Les objectifs de notre travail étaient

- 1- D'évaluer la prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (*pfdhfr* et *pfdhps*) et l'amodiaquine (*pfcr1* et *pfmdr1*) dans une zone où la SMC est implantée.
- 2- De mesurer l'impact de la stratégie sur la production d'anticorps dirigés contre les antigènes AMA1 et MSP1 de *Plasmodium falciparum*.

## **PREMIERE PARTIE :**

Quelques rappels sur le paludisme

## **1. Définition du paludisme**

Le paludisme est une affection parasitaire fébrile due au développement et à la multiplication, d'abord dans les hépatocytes puis dans les hématies, de cinq espèces de sporozoaires appartenant toutes au genre *Plasmodium* transmis par l'anophèle femelle. Seule la phase endo-érythrocytaire a une traduction clinique où domine la fièvre.

## **2. Epidémiologie du paludisme**

Le paludisme est due à cinq espèces que sont : *P. falciparum* ; *P. malariae* ; *P. ovale* ; *P. vivax* et *P. knowlesi*.

Responsable de la forme la plus redoutable du paludisme, *Plasmodium falciparum* est plus répandu dans les régions tropicales chaudes. La prévention et le traitement du paludisme y sont devenus de plus en plus difficiles à cause de la chimiorésistance.

La transmission du paludisme est assurée par des arthropodes appartenant à l'ordre des *Diptères*, au sous-ordre des *Nematocères*, à la famille des *Culicidae*, à la sous-famille des *Anophelinae* et au genre des *Anopheles*. On dénombre environ 450 espèces d'anophèles dans le monde, parmi lesquelles une cinquantaine sont capables de transmettre des plasmadies à l'Homme (Mouchet *et al.*, 2004). La faune anophélique au Sénégal est composée d'une vingtaine d'espèces (Diagne *et al.*, 1994). Mais comme dans la plupart des autres régions de l'Afrique sub-saharienne, l'essentiel de la transmission du paludisme est assurée par les espèces du complexe *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* (Bâ- Fall, 2000).

La transmission est plus intense aux endroits où les espèces de vecteurs ont une durée de vie relativement longue (ce qui permet au parasite de compléter son cycle de développement à l'intérieur du moustique) et piquent plutôt les êtres humains que les animaux. Par exemple, la longue durée de vie et la forte préférence pour l'homme des espèces africaines de vecteurs expliquent que plus de 90% des décès par paludisme enregistrés dans le monde surviennent en Afrique (OMS 2013). Elle dépend aussi des conditions climatiques qui peuvent influer sur l'abondance et la survie des moustiques, telles que le régime des précipitations, la température et l'humidité. À beaucoup d'endroits, la transmission est saisonnière avec un pic pendant ou juste après la saison des pluies. Des épidémies de paludisme peuvent survenir lorsque le climat et d'autres conditions favorisent soudainement la transmission dans des régions où les populations sont peu ou ne sont pas immunisées. Elles peuvent aussi survenir lorsque des

personnes faiblement immunisées se déplacent vers des régions de transmission intense, par exemple pour trouver du travail ou en tant que réfugiés (OMS 2013 : Aide-mémoire N°94).

### **Le paludisme au Sénégal**

L'épidémiologie du paludisme au Sénégal se caractérise par une grande diversité du vecteur, du parasite et des populations à risque. Ceci se traduit par une répartition inégale de la maladie dans le pays et un niveau de vulnérabilité des populations variable selon les caractéristiques socio démographiques, les conditions climatiques et les facteurs écologiques.

#### **Parasites et vecteurs**

Le parasite du paludisme est rencontré dans toutes les régions du pays. Aucune région n'est exempte de *Plasmodium*. Cependant, la prévalence de ce parasite est variable en terme d'intensité suivant les zones géographiques.

Au Sénégal, *Plasmodium falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale* sont présents mais *P. falciparum* est responsable de plus de 90% des cas de paludisme. Ces différentes espèces de *Plasmodium* ne présentent jusqu'à présent dans le pays de résistance ni aux ACT ni à la quinine selon le suivi de la sensibilité aux antipaludiques réalisé par le service de Parasitologie de l'université de Dakar (PNLP 2010).

Concernant la SP le taux de résistance est de l'ordre de 10 à 12 % dans les zones péri urbaines de Dakar et de 3 à 4% au niveau des sites au sud du pays (PNLP 2010).

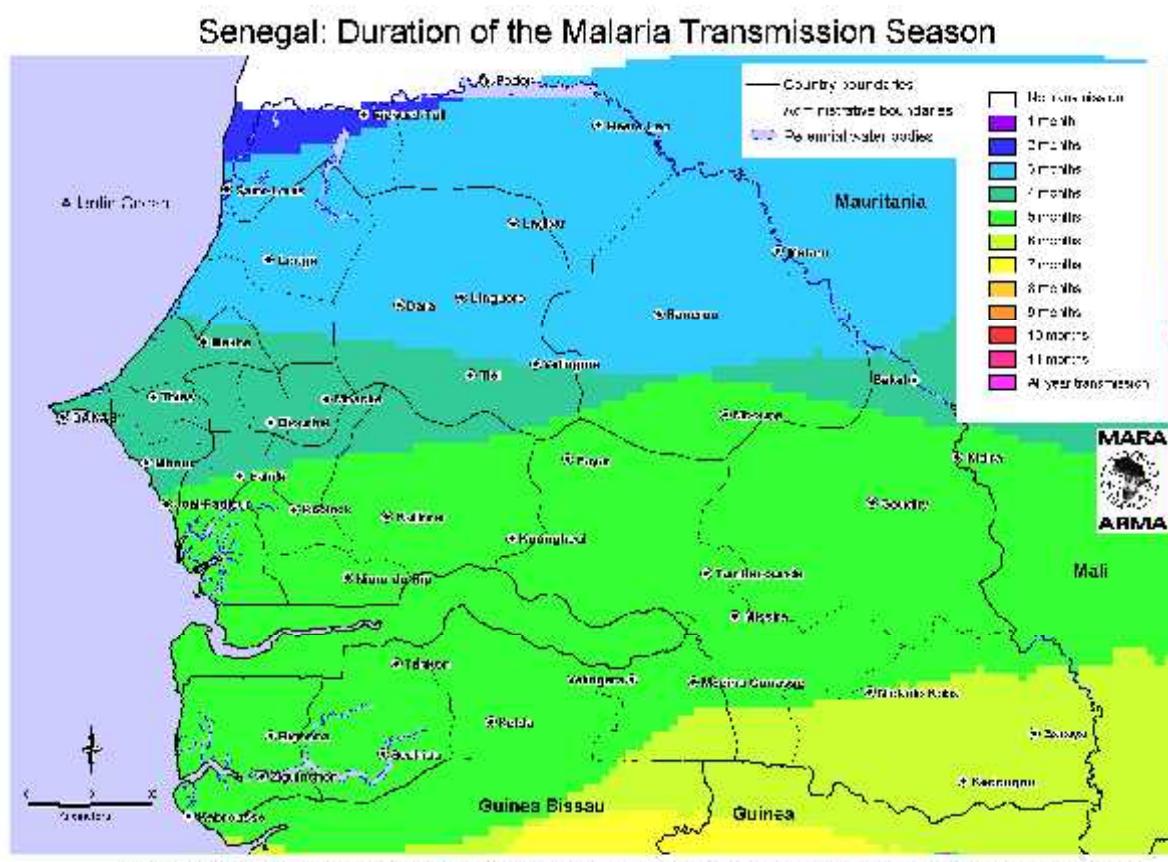
La dynamique des populations de vecteurs est dans la majeure partie du pays sous la dépendance des pluies. Elle est modulée dans certaines zones par des modifications naturelles ou anthropiques du milieu.

La dynamique de la transmission varie suivant les zones climatiques majeures correspondant à 2 principaux faciès éco-épidémiologiques du paludisme: le faciès tropical et le faciès sahélien:

Le faciès tropical correspond à la zone soudanienne caractérisée par une transmission saisonnière de 4 à 6 mois, couvrant la saison des pluies et une partie de la saison sèche. La transmission est assurée essentiellement par *An. gambiae*, *An. arabiensis*, à qui peuvent se joindre par endroit, *An. funestus* et *An. melas*. Le taux d'inoculation entomologique (TIE), en général élevé (20 à 300 piqûres infectées/homme/an) est variable dans le temps et dans l'espace. Il en est de même de la morbidité palustre, élevée pendant la période de transmission (> 20% de l'ensemble de la pathologie fébrile). Ce faciès du paludisme est retrouvé dans les régions de Ziguinchor (hors de la mangrove), de Kolda, de Tambacounda et les parties

méridionales des régions de Fatick et Kaolack où l'essentiel de la transmission s'effectue de juillet à décembre (PNLP 2010).

Le faciès sahélien est caractérisé par une transmission saisonnière courte (< 4 mois), assurée principalement par *An. arabiensis* et *An. gambiae*. Le TIE en général faible est fluctuant d'une année à l'autre (0 à 20 piqûres infectées/homme/an). La morbidité palustre est également faible mais des pics à tendance épidémique peuvent être observés au cours des années où la pluviométrie est particulièrement importante. Ce faciès est retrouvé surtout dans les régions du centre (Kaolack, Fatick, Diourbel, Dakar et Thiès) et au Nord du pays, dans le Ferlo et la vallée du fleuve Sénégal (Louga, Saint Louis et Matam) où l'essentiel de la transmission s'effectue entre Août et Octobre (PNLP 2010).



**Figure 1 : Durées des saisons de transmission du paludisme au Sénégal**

### 3. Symptômes

Le paludisme est une maladie caractérisée par des épisodes fébriles aigus. Les symptômes apparaissent au bout de sept jours ou plus (généralement 10 à 15 jours) après la piqûre de

moustique infectante. Les premiers symptômes – fièvre, maux de tête, frissons et vomissements – peuvent être modérés et difficiles à attribuer au paludisme. S'il n'est pas traité dans les 24 heures, le paludisme à *P. falciparum* peut évoluer vers une affection sévère souvent mortelle.

Les enfants fortement atteints développent fréquemment un ou plusieurs des symptômes suivants: anémie sévère, détresse respiratoire consécutive à une acidose métabolique, un paludisme cérébral. Chez l'adulte, on observe aussi fréquemment une atteinte de tous les organes. Dans les zones d'endémie, les personnes peuvent parfois être partiellement immunisées, et il peut y avoir des infections asymptomatiques.

Pour les paludismes à *P. vivax* et à *P. ovale*, des rechutes cliniques peuvent se produire des semaines ou des mois après la première infection même si le patient a quitté la zone impaludée. Ces nouveaux épisodes sont dus à des formes hépatiques «dormantes» (qui n'existent pas avec *P. falciparum* et *P. malariae*), et un traitement spécial – ciblé sur ces stades hépatiques – est impératif pour guérir complètement le malade.

## 4. Diagnostic

### 4.1. Diagnostic clinique

Il y a de grandes difficultés avec cette méthode car basée sur l'enregistrement des cas de paludisme à partir des signes cliniques telles que la fièvre qui ne sont pas forcément spécifiques au paludisme et qui varient avec le degré de transmission (OMS, 2006)

### 4.2. Diagnostic biologique :

4.2.1. Les techniques microscopiques conventionnelles : frottis mince, goutte épaisse demeurent la référence et nécessitent une méthodologie simple, mais précise et rigoureuse et un long apprentissage. La sensibilité est corrélée au temps d'observation (pour un frottis : lecture d'au moins 100 champs, en pratique 20 minutes).

Le frottis mince permet : l'étude morphologique des hématozoaires et le diagnostic différentiel entre les espèces plasmodiales (il reste toujours un défi même pour un lecteur averti).

La goutte épaisse, examen de référence de l'OMS, est largement utilisée pour le diagnostic de routine. Sa sensibilité (seuil de détection d'hématies parasitées/ $\mu\text{L}$ ) est de 20 hématies parasitées/ $\mu\text{L}$ , 10 fois plus élevée que celle du frottis mince (100 à 200).

4.2.2. La technique microscopique par fluorescence : Elle consiste en la coloration fluorescente des acides nucléiques par l'acridine orange : le malaria-test QBC (quantitative buffy-coat). Cette technique nécessite un équipement particulier. Sa sensibilité est de 5 hématies parasitées/ $\mu$ L.

4.2.3. La détection des antigènes du paludisme par immunochromatographie : les Tests de Diagnostic Rapide.

Plusieurs tests de diagnostic rapide (TDR) par immunochromatographie sont disponibles. Ils sont classés en fonction de l'antigène détecté. Certains tests permettent la mise en évidence de l'HRP2 (Histidin Rich Protein 2), spécifique à *P. falciparum*; et d'autres permettent la mise en évidence de la pLDH (Plasmodium lactate déshydrogénase) : *Pf* pour *P. falciparum*, *Pv* pour *P. vivax*; Pan-LDH commune aux quatre espèces plasmodiales. La sensibilité et la spécificité revendiquées par les fabricants de ces tests sont comparables

#### 4.2.4. 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. La technique la plus couramment utilisée est celle de l'immunofluorescence indirecte en utilisant comme support des hématies parasitées. Comme toute technique sérologique, elle nécessite des réactifs annexes (antiglobulines humaines ...) ainsi qu'un microscope plus coûteux. Par ailleurs, elle ne peut répondre à l'urgence du diagnostic dans la mesure où le temps passé est long et surtout parce qu'un résultat négatif ne peut exclure un accès palustre.

**ELISA (Enzyme linked ImmunoSorben Assay).** Elle consiste à une technique de dosage immuno enzymatique qui repose sur l'utilisation d'antigènes ou d'anticorps fixés sur une phase solide et permettant de capter l'anticorps ou l'antigène de la solution étudiée. L'addition d'immunoglobulines hétérologues conjuguées à une enzyme permet la transformation d'un substrat chromogène en un produit coloré dont l'intensité, mesurée en densité optique, est proportionnelle à la quantité d'anticorps.

#### 4.2.5. Détection d'acides nucléiques spécifiques (PCR).

Il s'agit certainement de la technique la plus sensible mais qui ne peut en aucun cas répondre au diagnostic d'urgence. Elle est très coûteuse, nécessitant un équipement et une compétence très particuliers. Elle permet une différenciation de souches et on la réserve essentiellement à l'étude des mutations et des gènes impliqués dans la résistance. Les techniques de biologie moléculaire sont devenues indispensables sur le plan fondamental mais ne sont pas utilisables pour le diagnostic biologique d'accès palustre.

### 5. Les antipaludisques

Le diagnostic et le traitement précoces du paludisme réduisent l'intensité de la maladie et permettent d'éviter qu'elle ne devienne mortelle. Ils contribuent aussi à réduire la transmission du paludisme.

Le meilleur traitement disponible, en particulier pour le paludisme à *P. falciparum*, est une association médicamenteuse comportant de l'artémisinine (ACT). L'OMS recommande que, dans tous les cas présumés, le paludisme soit confirmé par un diagnostic basé sur la recherche des plasmodes (par microscopie ou test diagnostique rapide) avant d'administrer un traitement. La confirmation parasitologique peut être obtenue en moins de 15 minutes. Un traitement uniquement symptomatique ne doit être envisagé que si le diagnostic parasitologique n'est pas possible. Parmi les antipaludiques actuels nous avons:

#### ➤ La quinine (QN)

La QN était utilisée par les médecins avant même que le paludisme soit une maladie parasitaire reconnue. La QN reste le principal antipaludique recommandé dans le traitement du paludisme grave et chez la femme enceinte en Europe et en Afrique. Elle est un antipaludique efficace cliniquement contre des souches résistantes à la CQ ou à la méfloquine (MQ). Les premiers cas documentés de résistance à la QN ont été rapportés dans les années 1960 au Brésil et en Asie du Sud-Est (Bjorkman, 1990 ; Giboda et Denis 1998) puis deviennent moins rares depuis les années 1980 en Asie, Amérique du Sud et en Afrique (Harinasuta *et al.*, 1990 ; Jelinek *et al.*, 1995 ; Tish et Pillans 1997 et Pradines *et al.*, 2010). En Asie du Sud-Est, la QN est utilisée en association avec la tétracycline (Duarte *et al.*, 1996 ; Looareesuwan *et al.*, 1992) ou la clindamycine (Kremsner 1990).

### ➤ L'amodiaquine (AQ)

L'AQ a récemment connu un regain d'intérêt, dans le traitement de l'accès simple, en association avec les dérivés de l'artémisinine (ACT) et plus particulièrement en association avec l'artésunate, leur combinaison ayant un pouvoir synergique puissant. Le mode d'action de l'AQ semble être le même que celui de la CQ. L'accumulation de l'AQ est corrélée à celle de la CQ et est aussi diminuée chez les isolats chloroquinorésistants [Bray *et al.*, 1996].

### ➤ La méfloquine (MQ)

Molécule de synthèse, la méfloquine est un arylaminoalcool. Elle a fait son apparition à la fin des années 1970. Elle reste une des molécules recommandée pour la prophylaxie en zone de poly-résistance. La MQ a été utilisée avec efficacité sur des souches poly-résistantes de *P. falciparum* (Palmer *et al.*, 1993) et notamment comme traitement de première ligne d'accès simples de paludisme en Thaïlande après la QN. Depuis, il a été observé une diminution de son efficacité dans certaines régions (Fontanet *et al.*, 1993), et notamment l'apparition et la propagation de souches résistantes en Asie (Uhlmann et Krishna 2005). Elle reste très largement utilisée en Asie associée à l'artésunate. Cependant, même des résistances à l'association artésunate-MQ se sont développées sur le continent asiatique (Shah *et al.*, 2008 ; Carrara *et al.*, 2009 et Rogers 2009).

### ➤ Dérivés de l'artémisinine

L'artémisinine est un alcaloïde naturel extrait de l'armoise *Artemisia annua*. Bien que les vertus de cette plante soient connue en Chine depuis plus de 2 000 ans, elle n'a été étudiée en Occident qu'à partir des années 1970 et introduite dans la pharmacopée antipaludique à la fin de la décennie. Il a pourtant fallu attendre le début des années 1990, et les graves problèmes de chloroquino-résistance, pour qu'elle soit utilisée hors de Chine et de Birmanie. En 2001, l'OMS considérait que l'artémisinine était « le plus grand espoir mondial contre le paludisme ». Elle agit très rapidement mais elle ne permet pas d'éliminer complètement tous les parasites, d'où la nécessité de l'associer à d'autres antipaludiques (ACT). Depuis 2001, plus de 60 pays ont adopté officiellement les ACT en traitement de première ligne (Nosten et White 2007, Eastman et Fidock 2009) Différentes associations sont commercialisées ou en cours d'évaluation (artesunatesulfadoxine-pyrimethamine, artesunate-amodiaquine, artemether-lumefantrine, artesunate-mefloquine, artesunate-chloroproguaïnil-dapsone,

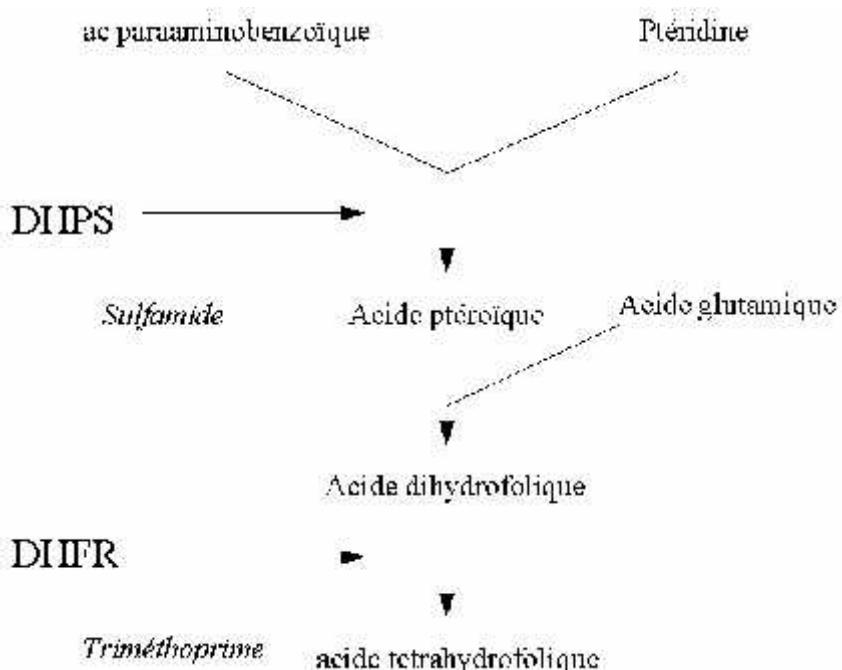
artesunate-atovaquone- proguanil, dihydroartemisinin-piperaquine et artesunatepyronaridine). L'utilisation des ACT s'est accompagnée d'une diminution drastique de la transmission, de la morbidité et de la mortalité par paludisme dans de nombreuses zones d'endémie (OMS 2008 ; Nyarango *et al.*, 2004). Mais déjà, les premiers cas d'échecs cliniques aux ACT sont identifiés en Asie du Sud-est (Noedl *et al.*, 2008 ; Wongsrichanalai et Meshnick 2008 ; Dondorp *et al.*, 2009).

➤ Antifoliniques : pyriméthamine (P) et proguanil (PRG)

L'invasion de l'Indonésie par les Japonais pendant la seconde guerre mondiale a privé les armées alliées de leur unique source d'antipaludique, la quinine. Ceci a conduit à une recherche intensive et au développement du proguanil. Le succès du PRG (Curd *et al.*, 1945) a stimulé la recherche sur les dérivés des pyrimidines et la synthèse de la Pyriméthamine (Falco *et al.*, 1951). Ce sont des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (*dhfr*) une enzyme intervenant dans la synthèse des folates, empêchant ainsi la transformation de l'acide dihydrofolique en acide tetrahydrofolique conduisant à l'acide folinique, métabolite indispensable à la croissance du parasite intra globulaire (Sano *et al.*, 1994 ; Sarawaraporn *et al.*, 1997). Il y a moins de cinq ans, la pyriméthamine et la sulfadoxine étaient encore recommandées par la plupart des pays africains pour le traitement de première ligne de l'accès simple à *P. falciparum*. Malheureusement, la résistance à la S/P s'est étendue rapidement. Cette association connaît actuellement un regain d'intérêt pour son utilisation en prophylaxie (traitement préventif intermittent) chez les enfants et les femmes enceintes en zone d'endémie (Aponte 2009 ; Parikh et Rosenthal 2010).

➤ Anti foliques : sulfones (dapsone) et sulfonamides (sulfadoxine)

Les sulfones et les sulfonamides ont été très utilisés pendant la seconde guerre mondiale puis nettement moins avec l'utilisation de la CQ et de la Pyriméthamine. Le plus utilisé des sulfonamides en Afrique est la sulfadoxine (S) en association avec la Pyriméthamine. Les sulfones et les sulfonamides inhibent la dihydroptéroate synthétase (*dhps*) de *P. falciparum* (Zhang et Meshnick 1991 ; Triglia *et al.*, 1997). La *dhps* est une autre enzyme de la voie des folates qui est inhibée par la Sulfadoxine et la dapsoné dont elle est la cible moléculaire (Sibley *et al.*, 2001 ; Hyde 2005). Les antifoliniques et les sulfamides agissant à deux niveaux de la même voie métabolique. Cela explique l'effet synergique qu'ils ont en association (Pradines 2009 ; Fidock *et al.*, 2000). Cette enzyme est bifonctionnelle.



**Figure 2 : Schéma du mécanisme d'action des anti métaboliques**

## 6. Immunité contre le paludisme

Après plusieurs années d'infections répétées, l'hôte du *Plasmodium* peut acquérir une immunité, appelée prémunition (symptômes atténués d'une maladie qui protège contre une infection ultérieure de type sévère). On constate une grande variabilité des réponses à l'infection palustre entre des individus vivant dans les mêmes zones d'endémie. Dans des régions où la transmission est forte, une grande proportion des enfants sont souvent porteur de parasites de *P. falciparum* sans déclarer aucun symptôme ; c'est l'immunité clinique. Avec l'âge et les contacts successifs entre humain/parasite s'installe peu à peu cette prémunition, qui fait appel à des mécanismes de résistance à l'infection parmi lesquels les protéines « interférons » métabolisées et excrétées, entre autres, par le foie jouent un rôle majeur dans l'immunité anti-parasite. On parlera, alors, de tolérance à l'infection ou d'immunité anti-parasite. Une hypothèse est que le *Plasmodium* a besoin de fer pour se développer ; le déficit en fer dû à une première infection apporterait une protection relative et éviterait une « superinfection ». Par ailleurs, l'immunité dirigée contre *P. falciparum* est fortement spécifique de la ou des souches parasitaires présentes. Ces particularités de la réponse immunitaire contre le paludisme sont à l'origine des difficultés pour élaborer un vaccin.

Les réponses immunes sont régulées aussi bien par le système immunitaire non spécifique dit inné, par le système immunitaire spécifique ou acquis, que par des facteurs environnementaux. Les deux types d'immunité sont complémentaires. L'immunité innée se mobilise dès le début (dans les premières heures) de toute infection en attendant la mise en place de l'immunité « acquise » qui est opérationnelle dans les dix jours suivant l'infection. L'immunité acquise, est tout à la fois spécifique des stades de développement du parasite que des espèces parasitaires. Cette immunité est rarement complètement protectrice, et dans le cas du paludisme l'on sait qu'elle ne pas du tout. Les sujets adultes vivant dans les zones où le paludisme est endémiques et où la transmission du parasite est pérenne, stable durant toute l'année, sont dits semi immuns, c'est-à-dire qu'ils ont une protection qui les « protège » contre les formes graves de la maladie. L'immunité acquise, contre le paludisme est ainsi associée aux faibles taux de parasitémies (le nombre de parasite dans le sang) et aux épisodes cliniques de la maladie tout au long de la vie (Marsh 1992, Trape *et al.*, 1994).

## 6.1. L'immunité innée

L'immunité innée se distingue de l'immunité acquise par le fait qu'elle s'active très rapidement, sans immunisation, sans vaccination préalable. Elle se met en place dès le début de toute infection et se maintient jusqu'à la mise en place de l'immunité acquise. L'immunité innée est ainsi considérée comme la première ligne de défense de l'organisme. Elle aide à la mise en place de l'immunité acquise qui est plus ciblée et spécifique du pathogène. Une fois parvenus dans l'organisme de l'hôte, les parasites gagnent certains types de cellules immunitaires dans lesquelles ils se développent. Des travaux ont montré que ce développement peut être empêché par le système immunitaire inné. Les mécanismes innés de l'inhibition de la croissance des parasites par l'hôte humain seraient probablement la cause du faible taux de parasitémie observé au cours des infections aigues à *P. falciparum* [Mohan *et al.* 1998]. L'infection palustre engendre la production par les lymphocytes B de concentrations plasmatiques très élevées d'immunoglobulines (anticorps) non spécifiques du paludisme (Cohen *et al.*, 1961). Cependant l'importance de l'activation polyclonale B par l'immunité innée sous jacente n'est pas connue à ce jour. L'activation polyclonale B est cette activation des cellules responsables de la production d'anticorps. En règle générale, dans les expériences de prolifération cellulaire, lorsque les lymphocytes T provenant d'une personne, ayant contracté une infection quelconque, sont mises *in vitro* en présence d'antigènes de l'agent pathogène responsable de l'infection en question, ces cellules se multiplient rapidement.

Placées dans les mêmes conditions, les lymphocytes provenant de personnes n'ayant pas contracté l'infection, ne prolifèrent pas. Dans le cas du paludisme, il existe des sujets répondeurs et d'autres dits non répondeurs. Les lymphocytes T exprimant l'antigène CD4 (les cellules T CD4 positifs ou encore cellules T CD4+) des répondeurs qui, bien que n'ayant eu aucune exposition préalable au paludisme, ont des cellules lymphocytaires qui réagissent positivement dans les expériences de prolifération cellulaire in vitro. Les cellules CD4+ de ces sujets produisent également des cytokines lorsqu'elles sont exposées aux antigènes de *P. falciparum* (Currier *et al.*, 1992).

## **6.2. L'immunité acquise**

Chez les populations des régions où le paludisme est endémique, l'infection palustre induit de fortes réponses immunes humorales, impliquant une production à prédominance d'IgM et d'IgG mais aussi d'autres isotypes d'immunoglobuline, notamment les sous classes d'IgG : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Bien qu'une grande proportion de ces immunoglobulines soit non spécifique au paludisme, reflétant une activation polyclonale de la lignée lymphocytaire B, plus de 5% d'entre elles sont des anticorps spécifiques qui réagissent avec une grande variété d'antigènes des parasites. Le transfert passif des IgG de donneurs immuns suggérait déjà il y a bien longtemps, que les anticorps pouvaient conférer une protection contre le paludisme (Orago *et al.*, 1991, McGregor, 1963).

## **6.3. La transmission maternofoetale d'anticorps**

Les premières infections sanguines néonatales apparaissent dès le premier mois de la vie mais les densités parasitaires restent faibles et les accès palustres sont rares avant l'âge de 4 mois (Kitua *et al.*, 1996). Les raisons de cette relative non susceptibilité du nouveau né ne sont complètement élucidées. Différents mécanismes sont évoqués dont la présence d'un fort pourcentage d'hémoglobine fœtale (HBF) (Pasvol *et al.*, 1977), l'allaitement exclusif durant les premiers mois de la vie (Maegraith *et al.*, 1952) et le passage d'anticorps anti palustres de la circulation maternelle dans la circulation fœtale (Logie *et al.*, 1973 ; Racheed *et al.*, 1995). Le rôle protecteur de ces anticorps et leur mécanisme d'action sont difficiles à mettre en évidence. Les résultats d'une étude au Libéria suggèrent que les nouveaux nés présentant un haut niveau d'anticorps anti MSP1-p<sub>19</sub>, ont un risque moindre de présenter un accès clinique. Cependant il semblerait que cet effet protecteur durerai au delà du délai d'action couramment admis pour les anticorps maternels transmis (Hogh *et al.*, 1995).

#### **6.4. Les facteurs physiologiques**

Tous les enfants bénéficient d'un facteur inné de protection d'origine physiologique. En effet HBF freine la croissance de *Plasmodium falciparum* dans les hématies (Pasvol *et al.*, 1977). Ceci expliquerait en partie, la disparition rapide des parasites lors des infections congénitales et les faibles densités parasitaires rencontrées au cours des infections survenant pendant les premières semaines de la vie. Cette protection disparaît progressivement avec le remplacement de HBF par l'hémoglobine A.

Plusieurs molécules de parasites codées dans les érythrocytes infectés, présentent un haut degré de diversité antigénique, reflétant l'expression des gènes alléliques ou des gènes alternatifs appartenant aux familles de multi gènes (Newbold, 1999 ; Chen *et al.*, 2000).

Les candidats antigènes à l'induction de la production d'anticorps protecteurs pourraient être localisés dans les organelles apicales ou à la surface des merozoïte comme à la surface des érythrocytes infectés. Les exemples les plus frappants sont les protéines de surface des merozoïte (MSP1, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5) (Berzins *et al.*, 1999). Il contient toute la séquence d'acide aminé d'une région conservée C-Terminale qui est portée par tous les parasites lorsqu'ils envahissent les érythrocytes non infectés, ainsi que les séquences antigéniquement variables qui sont libérées (Newbold, 1999 ; Chen *et al.*, 2000).

Nous avons aussi l'antigène AMA1 qui est une protéine membranaire produite par les organelles apicales du merozoïte. Pendant l'invasion érythrocytaire, la protéine se répartie sur toute la surface du parasite et, de même que MSP1, subit une série de coupures protéolytiques. Bien que la fonction d'AMA1 ne soit pas encore bien caractérisée au niveau moléculaire, son importance dans le processus d'invasion a été démontrée par des études d'immunisation dans des modèles animaux

### **7. Chimiorésistance du paludisme**

Selon l'OMS, la chimiorésistance dans le paludisme à *P. falciparum* est l'aptitude d'une souche parasitaire à continuer son développement malgré l'administration et l'absorption du médicament aux doses thérapeutiques recommandées. Malgré les efforts déployés pour la découverte de nouveaux médicaments antiplasmodiaux et la mise en place effective par les systèmes de santé de combinaisons thérapeutiques pour le traitement antipaludique, *P.*

*falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances, y compris contre les ACT (Noedl *et al.*, 2008 ; Wongsrichanalai et Meshnick 2008 ; Dondorp *et al.*, 2009). Des résistances croisées à CQ et AQ ont été observées *in vivo* et *in vitro* (Bjorkman 1990), cependant il existe des souches qui ne présentent pas de résistance croisée *in vitro* (Geary et Jensen 1983). Les taux d'échecs parasitologiques et cliniques à l'AQ sont plus faibles que ceux à la CQ, dans le traitement d'enfants en Gambie (Muller *et al.* 1996) au Sénégal, au Cameroun, au Gabon et au Congo (Brasseur 1995 et 1999). L'AQ semble plus efficace que la CQ même dans des zones où la résistance à la CQ est élevée (Olliaro *et al.*, 1996). Il semblerait que l'utilisation de l'AQ dans les ACT sélectionnerait des parasites de sensibilité diminuée à la monodéséthylamodiaquine, le métabolite actif de l'AQ, suggérant une perte d'efficacité rapide de cette association en Afrique (Nawaz *et al.*, 2009). Peu d'études ont exploré les bases moléculaires de la résistance à l'AQ, les études réalisées font l'hypothèse de certains points communs entre l'AQ et la CQ. L'efficacité de la pyriméthamine a rapidement diminué en raison du développement rapide d'une résistance du parasite. Dans les années 50, dans une étude menée en Tanzanie, la Pyriméthamine était administrée tous les mois en prophylaxie à des habitants d'un village rural. Initialement, il n'y avait pas d'échec clinique. Au troisième mois, on notait 8 % d'échecs cliniques puis 37 % au cinquième mois. Au bout d'un an, on recensait plus de 50 % d'échecs cliniques après une prise hebdomadaire de Pyriméthamine (Clyde et Shute 1957). Cette émergence très rapide de la résistance à la Pyriméthamine en réponse à une pression locale a été suivie rapidement par une propagation de la résistance à la Pyriméthamine alors qu'elle était en association avec un sulfonamide, la sulfadoxine (S).

## 7.1. Mécanismes de résistance aux antipaludiques

### ➤ Mécanisme de résistance à la chloroquine et à l'amodiaquine:

L'activité la plus spectaculaire de la chloroquine est sa capacité à se concentrer à partir de niveaux nano molaires hors du parasite jusqu'à des niveaux milli molaires dans la vacuole digestive du trophozoïte érythrocytaire. C'est à ce niveau qu'elle inhibe la digestion de l'hémoglobine et qu'elle se fixe à l'hématine (Bray *et al.*, 1998 ; Slater et Cerami, 1992). La caractéristique commune des isolats résistants est une altération de l'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive. Il apparaît maintenant que la chloroquino-résistance implique une captation diminuée de la molécule (Ridley, 1998). Des mutations ponctuelles de gène *mdr1* de *Plasmodium falciparum* (*pfdm1*) sont liées à la chloroquino-résistance en

Afrique (Basco *et al.*, 1995 ; Bray & Ward, 1998). Lors d'expériences de recombinaison homologue, des gènes s'associant avec la chloroquine-résistance ont été retrouvés chez *P. falciparum* (Carlton *et al.*, 1998). D'autres études ont mis en évidence l'implication du gène *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance transporter (pfCRT) situé sur le chromosome 7 dont les mutations ponctuelles ont été retrouvées lors des échecs thérapeutiques de la chloroquine (Fidock *et al.*, 2000 ; Basco, 2001 ; Chen et Russel, 2001). La mutation Lys76Thr du gène pfCRT est associée à la résistance au point qu'elle est présente dans toutes souches résistantes à la chloroquine. La résistance à l'Amodiaquine (AQ) semble être liée aux gènes pfCRT (Gushimana *et al.*, 1993) et pfmdr1 (Happi *et al.*, 2006 ; Holmgren *et al.*, 2006 et Humphreys *et al.*, 2007). La présence de la mutation Asn86Tyr sur pfmdr1 multiplie le risque de résistance in vivo à l'amodiaquine et le risque d'échec thérapeutique par la combinaison amodiaquine plus sulfadoxine-pyriméthamine (Marfurt *et al.*, 2008).

#### ➤ Mécanismes de résistance à la pyriméthamine

Il est vraisemblable que des mutations sur le gène *dhfr* altèrent la structure de la protéine et diminuent son affinité pour la P et le CYG conduisant à une résistance aux inhibiteurs de la *dhfr*. La mutation Ser108Asn du gène de la *dhfr* est associée à la résistance de *P. falciparum* aux antifoliniques (Sibley *et al.*, 2001 ; Hyde, 2005). La présence de cette mutation multiplie le risque de résistance in vivo à la S/P (Picot *et al.*, 2009). Les mutations additionnelles Asn51Ile, Cys59Arg ou Ile164Leu augmentent cette résistance, l'association des quatre mutations étant responsable du niveau le plus élevé de résistance aux antifoliniques et à l'association S/P. La triple mutation des codons 108, 51 et 59 est souvent observée en Afrique ou en Asie chez les souches résistantes à la S/P. Cette triple mutation multiplie le risque de résistance in vivo à la S/P (Picot *et al.*, 2009). C'est généralement cette triple mutation qui est considérée comme le meilleur facteur prédictif de la résistance in vivo à la S/P. La détection de la mutation Ser108Asn est quant à elle prédictive de la présence des deux autres mutations. La mutation Ile164Leu mais aussi les mutations Asn188Lys, Ser189Arg et Val213Ala, sont plus rares et peuvent être associées à des niveaux élevés de résistance à la Pyriméthamine.

#### ➤ Mécanismes de résistance à la sulfadoxine

Il a été initialement évoqué que des mutations sur le gène dihydroptéroate synthétase (*dhps*) cloné en 1994 (Triglia *et al.*, 1994 ; Brooks *et al.*, 1994), pourraient être responsables de la résistance à la sulfadoxine (Triglia et Cowman, 1999). L'analyse de séquences du gène de la

*dhps* montre des différences d'acides aminés entre des souches sensibles et résistantes à la S (Triglia *et al.*, 1994 ; Brooks *et al.*, 1994). Les mutations Ser436Ala, Ser436Phe, Ala437Gly et Lys540Glu du gène *dhps* sont associées à des diminutions de sensibilité à la sulfadoxine (Basco *et al.*, 1995 ; Wang 1 et 2 1997]. En particulier, la mutation isolée Ala-437Gly et la double mutation Ala437Gly + Lys540Glu augmentent le risque de résistance in vivo à la SP (Picot *et al.*, 2009).

## 7.2. Chimiorésistance multiple

On entend par paludisme polychimiorésistant, une résistance à plusieurs antimalariques observée chez *P. falciparum*. Cette résistance peut être croisée ou simultanée. La résistance simultanée est principalement la conséquence d'une utilisation simultanée importante de plusieurs antipaludiques induisant une forte pression sélective. Ainsi en Asie du Sud-est, la résistance à la chloroquine est accompagnée d'une résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine. Par contre en Afrique de l'Ouest, la résistance à la chloroquine n'est pas encore associée à celle aux antifoliniques et la fréquence de la bi résistance SP/Chloroquine est généralement égale au produit des fréquences individuelles de résistances (Le Bras *et al.*, 1998). La résistance croisée entre antipaludiques est un phénomène lié à la communauté de leurs modes d'action et sans doute de leurs mécanismes de résistance. Ainsi une corrélation étroite est observée entre les sensibilités au cycloguanil et à la pyriméthamine de plusieurs isolats africains.

## 7.3. Facteurs favorisant la résistance

La fréquence des mutations et la vitesse à laquelle les résistances se développent dépendent des caractéristiques de la molécule utilisée, du contexte épidémiologique (intensité de la transmission) et de la façon dont les médicaments sont utilisés. Toutefois le phénotype de résistance acquis après mutation n'est pas toujours un avantage en l'absence de pression médicamenteuse. Ainsi, les autres facteurs favorisant l'émergence de résistances sont i) une mauvaise utilisation des antipaludiques par les individus infectés (automédications abusives, mauvaise observance) conduisant à des traitements incomplets, ii) une indisponibilité des médicaments efficaces ou le déploiement inadéquat des médicaments sous forme de monothérapies et iii) la consommation de contrefaçons sous dosées, facteurs permettant à des parasites viables de survivre à des concentrations sub-optimales d'antipaludiques et d'être

sélectionnés pour leur aptitude à résister. Ainsi, des résistances ont émergé contre la majorité des antipaludiques dans la plupart des régions endémiques.

## 8. Prévention

### 8.1. La lutte anti vectorielle

Il reste le principal moyen de réduire la transmission du paludisme au niveau communautaire. C'est la seule intervention qui peut ramener une forte transmission à des niveaux quasiment nuls. Pour les personnes, la protection individuelle contre les piqûres de moustique représente le premier moyen de défense contre le paludisme.

Deux formes de lutte anti vectorielle sont efficaces dans beaucoup de situations. Ce sont:

Les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII); les moustiquaires à imprégnation durable (MID) sont celles qui sont les plus fréquemment distribuées dans les programmes de santé publique. L'OMS recommande une couverture universelle de la lutte anti vectorielle dans la plupart des régions. Le moyen le plus efficace et le moins coûteux d'y parvenir est de fournir des moustiquaires à imprégnation durable de façon à ce que chacun puisse dormir toutes les nuits sous une telle moustiquaire.

Les pulvérisations d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations ; c'est un moyen très efficace pour réduire rapidement la transmission du paludisme. Pour obtenir un résultat optimal, il faut pulvériser au moins 80% des habitations dans les zones ciblées. Cette pulvérisation est efficace pendant 3 à 6 mois en fonction du type d'insecticide utilisé et du type de surface pulvérisée. Le DDT peut être efficace pendant 9 à 12 mois dans certains cas. Des insecticides à effet rémanent plus long sont actuellement en cours d'élaboration de même que de nouvelles classes de produits destinés aux programmes de pulvérisation (OMS 2013). La maladie peut également être prévenue au moyen d'antipaludiques. Les voyageurs peuvent se protéger au moyen d'une chimio prophylaxie qui supprime le stade sanguin de l'infection palustre, ce qui empêche le développement de la forme clinique de la maladie.

### 8.2. Traitement Préventif Intermittent chez la femme enceinte et le nourrisson

L'OMS recommande en outre le traitement préventif intermittent par la Sulfadoxine-Pyriméthamine pour les femmes enceintes vivant dans des zones de forte transmission, à chaque visite prénatale programmée après le premier trimestre. De même, pour les nourrissons vivant dans des zones de forte transmission d'Afrique, 3 doses de Sulfadoxine-

Pyriméthamine en traitement préventif intermittent sont recommandées en même temps que les vaccinations systématiques.

### 7.3. Chimioprévention du Paludisme Saisonnier.

En Mars 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié une recommandation de politique de santé en faveur d'une nouvelle intervention contre le paludisme à *Plasmodium falciparum*. La Chimioprévention du paludisme saisonnier est définie comme « l'administration intermittente d'un traitement complet par un médicament antipaludique pendant la saison de haute transmission du paludisme pour éviter la maladie, l'objectif étant de maintenir des concentrations thérapeutiques de médicament antipaludique dans le sang pendant la période où le risque de contracter le paludisme est plus élevé ». Elle consiste en un cycle de traitement complet par la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et l'amodiaquine (AQ) administré à des enfants âgés de 3 à 59 mois à intervalles d'un mois, à partir du début de la saison de transmission (dans les zones où les deux médicaments conservent une efficacité antipaludique suffisante). Elle est recommandée dans les zones de la sous-région du Sahel où la transmission saisonnière est forte. (OMS 2013 : Aide-mémoire N°94).

### 7.4. Vaccins contre le paludisme

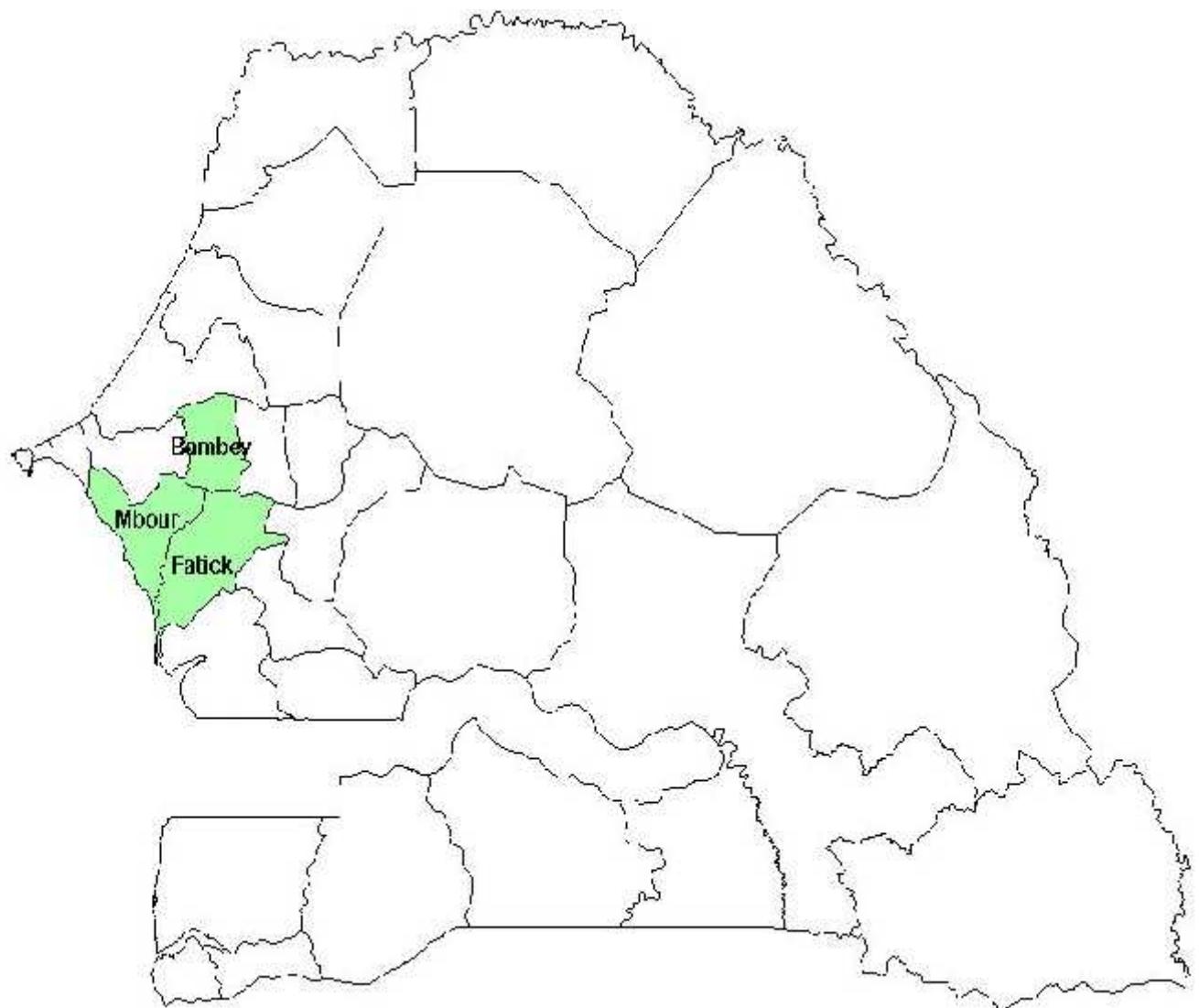
Il n'existe actuellement aucun vaccin homologué contre le paludisme ou aucun autre parasite de l'homme. Un vaccin expérimental contre *P. falciparum*, connu sous le nom de RTS,S/AS01, est le plus avancé. Ce vaccin est actuellement évalué dans le cadre d'un vaste essai clinique dans 7 pays d'Afrique. En fonction des résultats finaux de l'essai clinique, l'OMS recommandera ou non l'utilisation du vaccin. Les résultats définitifs sont attendus fin 2014 et une recommandation relative à l'adjonction ou non de ce vaccin aux moyens de lutte actuellement utilisés devrait être formulée en 2015 (OMS 2013 : Aide-mémoire N°94).

# **DEUXIEME PARTIE**

# **TRAVAIL PERSONNEL**

## **1. Zone d'étude**

Selon le recensement national de 2002, approximativement, 450,000 personnes vivent dans les trois districts sanitaires que constitue notre zone d'étude (Mbour, Bambeuy et Fatick) (ANSD). La partie septentrionale de la zone de l'étude fait partie du district médical de Bambeuy tandis que la partie sud fait partie du district médical de Fatick. Il existe approximativement 725 villages dans la zone de l'étude et 54 postes de santé dirigés par des agents sanitaires et deux centres de santé dirigés par un médecin. Tous les postes de santé sont placés sous la supervision directe du Ministère sénégalais de la santé.





**Figure 3 : Région de Fatick**

La prévalence du paludisme est passée de 7,6% en 2008 à 2,7% en 2010 chez les enfants de moins de cinq ans dans la région de Fatick (Centre-ouest), selon Enquête Démographique et de Santé au Sénégal (EDS). Ce recul résulte de différentes actions menées de lutte contre le paludisme, mais aussi de la campagne de couverture universelle menée, de la prise en charge à domicile des malades, de la gratuité du traitement du paludisme et de la distribution des moustiquaires imprégnées



**Figure 4 : Commune de Mbour**

Dans le district sanitaire de Mbour qui compte 22 postes de santé et 1 centre de santé, 42000 consultations ont été enregistrées dont 11496 cas de paludisme durant la période allant de juin à aout 2007. La morbidité du paludisme a été de 27% dans la population générale. Chez les enfants de 0 à 5 ans le paludisme est plus important d'autant que 28% de ces derniers ont été atteints. Ils sont 3385 malades du paludisme sur 11921 consultations chez ses mêmes enfants. Les femmes enceintes n'ont pas été épargnées par le paludisme. 29% d'entre elles ont été atteintes, ce qui témoigne de la vulnérabilité chez ces dernières et chez les enfants de moins de 5 ans (Sénégal Paludisme Santé et Médecine)



**Fig  
ure 5 : Commune de Bambey**

Dans le district sanitaire de Bambey (Région de Diourbel) le paludisme y est la première cause de morbidité et de mortalité. C'est un véritable problème de santé publique comme dans de nombreux autres districts de l'intérieur et même de la capitale. Selon une étude des registres de consultations et d'hospitalisation de l'année 2000, 20.075 cas de paludisme, sur 55957 consultations, sont enregistrés soit 35%. Sur ce nombre, 8230 étaient des enfants âgés de 0 à 5 ans et 14.052 de 0 à 15 ans (Santé et Médecine).

## 2. Population de l'étude

La population de l'étude s'élève approximativement à 450.000 personnes dont 95.000 enfants de moins de cinq ans (recensement national de 2002). La zone d'étude comporte 54 zones d'intervention dont chacune correspond à un poste de santé et aux villages qu'il couvre. En moyenne, 15 villages et 1975 enfants de moins de 5 ans sont sous la responsabilité de chaque poste de santé. Le chef du village, ou la personne qu'il désigne, établit un registre d'enfants éligibles.

### 3. Stratégie adoptée

La Chimioprévention Saisonnière du Paludisme avec SP + AQ a été administrée une fois par mois en Septembre, Octobre et Novembre chez les enfants dans les trois districts au centre du Sénégal (Mbour, Bambey et Fatick) de 2008 à 2010. La mise en œuvre de la CPS/SMC a été faite graduellement dans 54 postes de santé avec 9 postes de santé en 2008, 27 postes de santé en 2009 et 45 en 2010.

Durant toute la durée de l'étude, nous avons comparé les populations d'enfants de poste de santé sous SMC à celle des poste de santé n'ayant pas encore bénéficié de la stratégie. Ainsi en 2008, 27 postes de santé ont été inclus dont 9 sous SMC et 18 postes de santé considérés comme contrôle. En 2009, 27 postes de santé ont bénéficié du SMC et 27 autres étant considérés comme contrôle. En 2010, la stratégie a été effectué dans 45 postes de santé ; les 9 restant étaient des postes de santé contrôle (voir tableau1).

L'enquête de 2008 ayant montré une prévalence du paludisme plus élevée chez les enfants de 5 à 10 ans, il a été décidé d'étendre la stratégie à cette tranche d'âge.

A la fin de chaque saison de transmission, une étude transversale sur les enfants est menée pour mesurer la prévalence de la parasitémie et prélever des échantillons de sang sur papier filtre pour l'analyse des marqueurs moléculaires de la résistance aux médicaments utilisés et pour l'étude sérologique. Cette étude sérologique a été réalisée uniquement en 2009.

**Tableau I : Conception de l'étude**

	Nombre de postes de santé							Total
	9	9	9	9	9	9	9	54
2008	CPS	C	C	0	0	0	9	
2009	CPS	CPS	CPS	C	C	C	27	
2010	CPS	CPS	CPS	CPS	CPS	C	45	

Après lecture des lames au Service de Parasitologie, les prélèvements qui se sont révélés positifs à *P. falciparum* ont été analysés afin de rechercher les prévalences des mutations au

niveau du gène pfdhfr (51, 59 et 108), du gène pfdhps (437, 540), du gène pfmdr1 (86, 184) et du gène pf crt (76) de *P. falciparum*.

Puis concernant les prélèvements de 2009, nous avons mesuré la production d'immunoglobuline dirigés contre les antigènes MSP1 et AMA1.

Cette étude a été approuvée par les comités d'éthique du ministère de la Santé du Sénégal et de la London School of Hygiene and Tropical Medicine.

## **Objectif I : Evaluer des marqueurs moléculaires de la résistance à la Sulfadoxine-Pyriméthamine et l'Amodiaquine dans une zone où la Chimioprévention Saisonnière du Paludisme est implantée.**

### **1. Introduction**

Malgré les efforts déployés pour la découverte de nouveaux médicaments anti paludiques et la mise en place effective par les systèmes de santé de combinaisons thérapeutiques pour le traitement antipaludique, *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances, y compris contre les ACT [[Noedl, 2008 ; Wongsrichanalai, 2008 ; Dondorp, 2009]]. Ceci s'explique d'abord 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. Même si les mutations capables de conférer une résistance à un nouveau médicament sont extrêmement rares et peu probables, le nombre élevé de parasites infectant les humains fait que ces mutations finissent par apparaître et par être sélectionnées par la pression médicamenteuse. Les erreurs de réPLICATION de l'ADN dans les cellules introduisent des mutations au hasard dans le génome et permettent le processus d'évolution. Ces mutations sont à l'origine de la grande variabilité génétique de *P. falciparum* et lorsque celles-ci ne sont pas létales pour le parasite, 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.

La surveillance de l'évolution des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à AQ devient très importante surtout dans les zones où la Chimioprévention saisonnière du paludisme est implantée. Et c'est dans ce contexte que nous avons décidé de déterminer la prévalence de mutation des gènes *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfCRT* et *pfMDR1* de *Plasmodium falciparum* en faisant une comparaison entre la zone où la stratégie est appliquée et une zone contrôle sans intervention.

### **2. Méthode**

Pour chaque enfant, un consentement signé a été obtenu à partir d'un parent ou d'un tuteur après avoir expliqué les objectifs et les procédures de l'enquête. Des prélèvements de sang sur papier filtre qui étaient à positifs à *P. falciparum* ont été utilisés pour déterminer la présence

de mutations dans les gènes *Pfdhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1* et *pfcrt* associées à la résistance à la SP et à AQ par séquençage et PCR en temps réel, afin de mesurer l'impact de la SMC sur la prévalence de ces mutations à la fin de chaque saison de transmission.

➤ Microscopie

Les gouttes épaisses ont été stockées à température ambiante pendant 48 heures, puis déshémoglobinisées avec de l'eau à pH 7,2 et colorées dans une solution à 6% de Giemsa pendant 20 minutes.

Après coloration, les leucocytes et les parasites éventuels resteront sur la lame. L'examen se fait au microscope optique à l'objectif 100 en utilisant de l'huile à immersion. La numérotation se comptant les parasites rapportés au nombre de leucocytes comptés (200). Ainsi la parasitémie est exprimée par la formule suivante :

$$Dp = \text{nombre de parasites asexués} \times 8000/200.$$

Le contrôle de qualité a été réalisé par la lecture de 10% de toutes les lames par un technicien de laboratoire expérimenté différent; en cas de divergence, une troisième lecture sera effectuée et les résultats obtenus avec les deux moyens plus proches.

➤ Extraction de l'ADN

L'ADN génomique du parasite a été extrait à partir de papier filtre rapporté positif après examen au microscope en utilisant la méthode du Chelex décrite par Plowe et al. Pour le gène *pfcrt*, la recherche de mutation au codon K76T été déterminée par une PCR en temps réel en utilisant la plate-forme tourne RotorGene 3000. Les ADN 3D7, Dd2 et 7G8 obtenus grâce à « Malaria Research Reagent Resource (MR4)» ont été utilisées pour fournir des contrôles positifs spécifiques de la séquence.

Les gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfmdr1* ont subi une double amplification avec séquences des amorces et conditions d'amplification décrites dans le tableau I. Puis les amplicons ont été séquencés grâce à l'analyseur génétique ABI PRISM (amorces et conditions voir tableau I). Les produits de séquençage ont été analysés par le logiciel Chromas. Puis les séquences d'ADN ont été comparées avec la séquence du gène *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfmdr1* du clone 3D7 de *P. falciparum* en utilisant un alignement similaire.

### 3. Résultats

Au terme des analyses faites à la fin de cette étude, nous avons vu que sur les 2721 enfants enquêtés en 2008, des échantillons de sang ont été obtenus sur 2705 enfants. Ainsi 84 étaient positifs à *P. falciparum* après examen microscopique dont 18/1019 (1,8%) dans la zone sous SMC et 66/1686 (3,9%) dans la zone de contrôle ((IC à 95%: 0,15, 0,61), p = 0,001).

En 2009, 6809 enfants ont été enquêtés et 6646 prélèvements obtenus dont 50 soit 9/3326 (0,27%) et 41/3320 (1,2%) respectivement dans les zones de SMC et de contrôle, étaient positifs à *P. falciparum* ; aPR 0,16 (0,06, 0,42), p <0,001.

En 2010, 1098 ont été enquêtés, des échantillons de sang ont été obtenus sur 1098 enfants, dont 27 étaient positifs par microscopie, 21/882 (2,4%) et 6/216 (2,8%) respectivement dans les zones de SMC et de contrôle, aPR 0,71 (0,23, 2.20), p = 0,55.

Pour le gène *pfdhfr*, les résultats obtenus nous montrent que le niveau de mutation pour ces trois codons (51, 59 et 108) reste élevé et augmente d'année en année et ceci tant au niveau des districts d'intervention qu'au niveau des districts de contrôle.

En tenant compte des paramètres associés soit à la triple ou à la quadruple mutation, nous avons constaté que ni l'intervention, ni l'âge, ni le sexe n'influent sur le niveau de prévalence, mais avec le temps une augmentation significative la prévalence des mutations est remarquée. Mais malgré cela, notons qu'aucune mutation n'est observée au niveau des codons 164 et 540 des gènes *pfdhfr* et *pfdhps* respectivement (tableaux I et II).

Tableau I: Paramètres associés à la triple mutation *pfdhfr* au cours de la stratégie.

	No /Total No	%	aOR (95%CI)	p value
<b>Variable Intervention</b>				
Non	50/102	49	<i>Reference</i>	
Oui	40/50	80	2.17 [0.88-5.33]	0.09
<b>Années</b>				
2008	36/82	43.9	<i>Reference</i>	
2009	33/43	76.7	3.49 [1.26-9.62]	0.01
2010	23/27	85.2	5.54 [1.53-20.05]	0.009
<b>Groupes Ages</b>				
5-10 ans	35/50	70.0	<i>Reference</i>	
Moins 5	55/102	55.8	0.73 [0.24-2.18]	0.57
<b>Sexe</b>				
Filles	44/67	65.7	<i>Reference</i>	
Garçons	43/73	58.9	1.97 [0.90-4.33]	0.08

Tableau II: Paramètres susceptibles d'influencer la quadruple mutation *pfdhfr/pfdhps* au cours de la stratégie

	No /Total No	%	aOR (95%CI)	p value
<b>Variable Intervention</b>				
Non	55/102	53.9	<i>Reference</i>	
Oui	35/50	70	1.38 [0.59-3.10]	0.45
<b>Année</b>				
2008	31/82	37.8	<i>Reference</i>	
2009	29/43	67.4	2.43 [0.95-6.24]	0.063
2010	22/27	81.4	5.72 [1.72-18.92]	0.004
<b>Groupe Age</b>				
5-10 ans	34/50	68.0	<i>Reference</i>	
Moins de 5	48/102	47.0	0.46 [0.16-1.29]	0.14
<b>Sexe</b>				
Filles	38/67	56.7	<i>Reference</i>	
Garçons	39/73	53.4	1.66 [0.78-3.54]	0.18

Les prévalences de mutation obtenues aux niveaux des gènes *pfcrt*, *pfmdrl* sont relativement élevées entre 2008 et 2010. Et ces taux sont importants aussi bien dans les districts tests que les districts de contrôles.

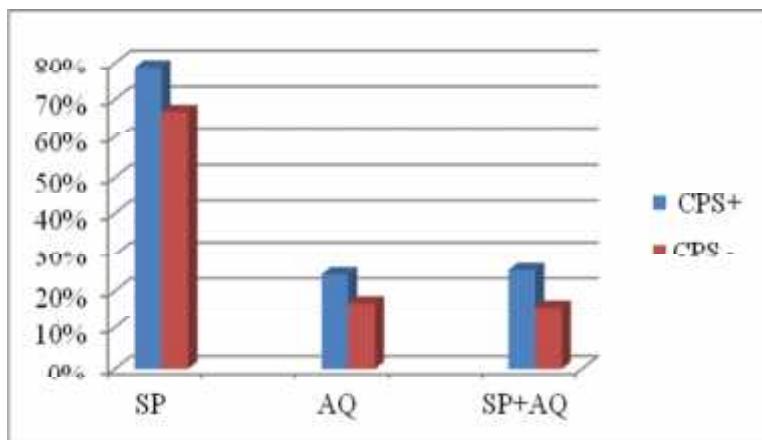


Figure 1: Prévalence des marqueurs à SP, AQ et SP/AQ trois années après l'intervention

#### 4. Commentaires

Dans cette étude à grande échelle dont le but est de faire l'évaluation de l'efficacité de la chimioprévention saisonnière du paludisme, des remarques ont été faites. Malgré la taille petite des échantillons positifs à *Plasmodium falciparum*, la prévalence des marqueurs de résistance à la SP et à l'Amodiaquine n'est pas significativement différente entre les zones d'intervention et les zones de contrôle. Cependant, la prévalence absolue de marqueurs de

résistance a été plus faible dans les zones de contrôle, ce qui ne devrait pas compromettre l'efficacité des traitements utilisés pour la gestion des cas. Les mutations considérées comme des marqueurs confirmés de résistance à la Sulfadoxine-Pyriméthamine à savoir au niveau des codons 164 du gène *pfdhfr* et 540 du gène *pfdhps*, ne sont pas observées dans cette étude. L'évaluation de la prévalence des marqueurs de résistance aux médicaments devrait faire partie de la surveillance de routine et d'évaluation surtout dans les zones où la SMC est déployée.

*Publication 1*

## **Objectif II : Mesurer la sécrétion des anticorps anti MSP-1 et anti AMA-1 chez des enfants soumis à la Chimioprévention Saisonnière du Paludisme au Sénégal**

### **1. Introduction**

Lorsque l'enfant est exposé à l'infection, il commence à développer sa propre immunité, un processus qui prendra plusieurs années avant qu'elle ne devienne effective. Cependant un enfant né de mère immune est protégé pendant les premiers mois de sa vie, par transfert passif de l'immunité maternelle. Dès que l'immunité maternelle commence à s'affaiblir, chaque infection donnera lieu à un accès palustre clinique et un certain pourcentage des enfants vont mourir de paludisme, surtout dans des circonstances où un diagnostic et un traitement précoce ne sont pas disponibles. Une fois que l'enfant atteint l'âge scolaire, les accès palustres vont progressivement diminuer de fréquence et de gravité: c'est le stade de l'immunité 'anti-maladie' (ou tolérance clinique). A ce stade, l'enfant continue à être infecté, développant quelquefois des taux de parasitémie extrêmement élevés, tout en présentant des signes cliniques modérés ou pouvant même rester asymptomatique. L'âge-dépendance est un facteur crucial dans l'immunité anti-palustre (Impact malaria). Plusieurs antigènes dont la Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) et l'Apicale Membrane l'Antigène 1 (AMA-1) de *Plasmodium falciparum* (Good *et al.*, 1998) sont considérés comme des cibles de la réponse immunitaire durant le stade érythrocytaire et peuvent être affectés (Asa *et al.*, 2008, Cooper, 1993, Crewther *et al.*, 1990). Situé sur la surface des merozoïtes, ils jouent un rôle dans le processus d'invasion parasitaire (Blackman *et al.*, 1990, Triglia *et al.*, 2000).

Dans le but de mesurer l'impact de cette stratégie sur l'acquisition d'une immunité contre le paludisme, nous avons évalué la production d'anticorps spécifique dirigés contre les antigènes Apical Membrane Antigen-1 et Merozoite Surface Protein-1 de *Plasmodium falciparum* chez des enfants soumis à la chimioprévention saisonnière du paludisme (CSP) en 2009.

### **2. Méthode**

#### **Extraction du sérum à partir des papiers buvard**

Le sérum a été extrait à partir des prélèvements de sang sur papiers filtre gardés à +4°C suivant la procédure décrite par Corran *et al.* 2008. Il s'agit de découper approximativement 3,5 mm de diamètre (équivalent à 1,5µl de sérum) de chaque papier filtre imprégné de sang et le déposé dans des tubes Eppendorf secs. Ensuite on ajoute 300µl de 1XPBS/Tween 20

(0,5%) dans chaque tube contenant un morceau de papier filtre préalablement découpé. Le mélange est ensuite incubé pendant toute la nuit à 4°C avec une légère agitation. Après on récupère l'eluât dans de nouveau tube de 1,5 ml pour faire l'ELISA.

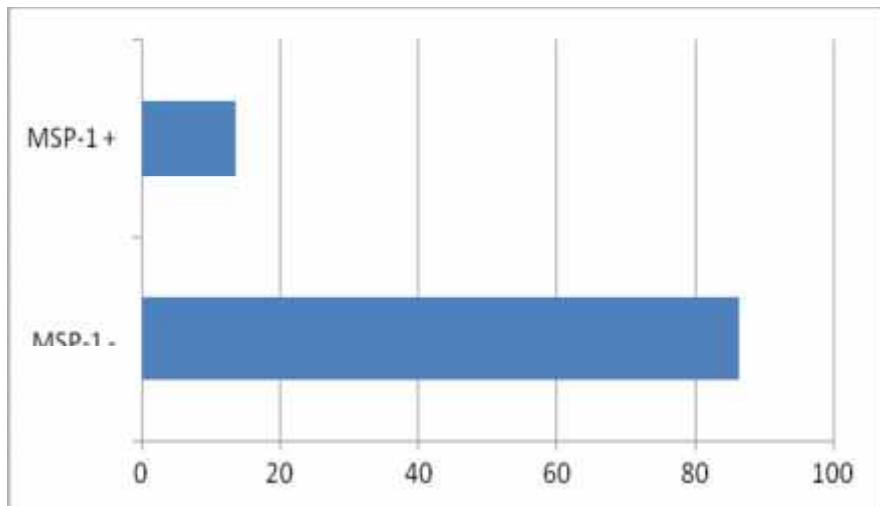
### **Technique d'ELISA**

Afin de mesurer la production d'immunoglobulines spécifiques dirigées contre les antigènes MSP1 et AMA1, la méthode **ELISA (Enzyme linked ImmunoSorben Assay)** décrite par Good et al. 1998, a été utilisée. En résumé il s'agit de sensibiliser les plaques toute une nuit avec les antigènes (MSP1 et AMA1) dilué dans du tampon de dilution préalablement préparé. Ensuite les plaques sont bloquées avec une solution 1% de lait écrémé pendant 3h après trois lavages successifs avec du tampon de lavage. Après trois autres lavages, on ajoute 100µl de chaque sérum dans deux puits successifs et on incube la plaque à une température ambiante pendant 1h. Pour chaque plaque, trois types de contrôles sont utilisés : d'abords il y'a des puits sans sérum mais avec le second anticorps pour mesurer la fixation non spécifique, des puits avec sérum de sujets n'ayant jamais en contact avec le plasmodium (contrôle négatif) et enfin des puits avec sérum d'un individu ayant une forte production d'anticorps anti-MSP1 et anti-AMA1 (contrôle positif). Puis trois lavages sont effectués avant l'incubation par l'anticorps secondaire pendant 30mn à température ambiante. Après trois lavages, on effectue une révélation en ajoutant 500µl de Tétramethyl benzoïde (TMB one) puis on incube à l'abris de la lumière et température ambiante pendant 30mn. La réaction est enfin arrêtée en ajoutant 50µl d'acide Chlorhydrique diluée (HCl) et immédiatement après, la lecture est effectuée avec un lecteur ELISA.

### **3. Résultats**

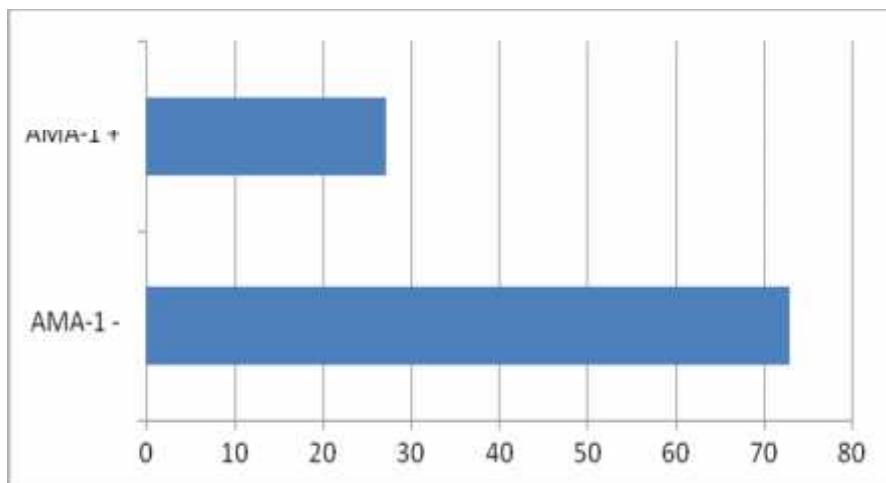
Durant la période de cette étude 5833 enfants ayant moins de 10 ans ont été inclus au niveau des 54 postes de santé. L'analyse par ELISA a porté sur 5433 échantillons. La tranche d'âge de 60 à 120 mois c'est à dire 5 ans et plus est la plus représentée soient 49,83%. Les enfants de 24 à 60 mois (entre 2 et 5 ans) représentent 34,37% et ceux de 0 à 24 mois (0 à 2 ans) 15,81%.

L'année 2009 est celle où le nombre de postes de santé avec intervention est égal à celui des postes de santé sans intervention. Ainsi plus de 85% des enfants vivant dans la zone de contrôle, ont produits des anticorps anti-MSP1 alors que dans la zone d'intervention seulement moins de 15% ont sécrété des anticorps anti-MSP1 (figure1 ).



**Figure 1 :** Prévalence des anticorps anti MSP-1<sub>19</sub>

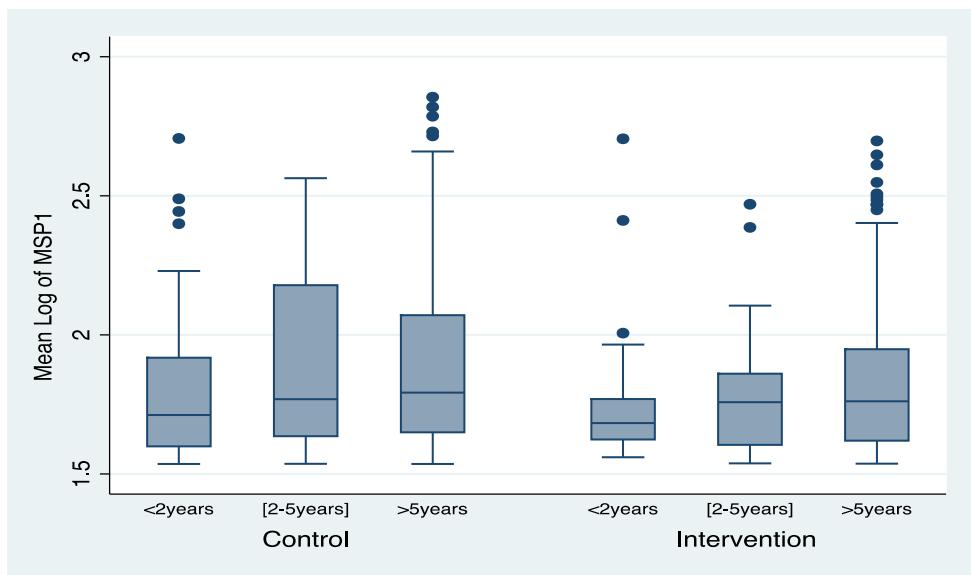
La même remarque est faite pour les anticorps AMA1 avec plus de 73% dans la zone contrôle contre 28% dans la zone avec SMC (figure 2).



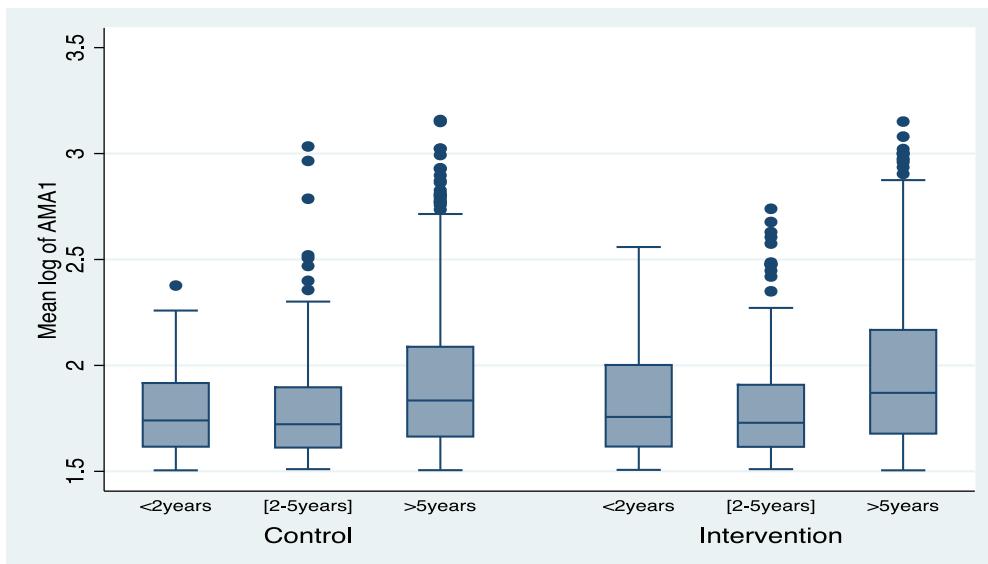
**Figure 2 :** Prévalence des anticorps anti AMA-1

Selon la prévalence paludisme, nous avons constaté que 36 enfants qui présentaient une parasitémie, provenaient de la zone sans intervention contre seulement 06 dans la zone d'intervention. La tranche d'âge 5 ans et plus étaient ainsi plus représentative

En tenant compte la tranche d'âge en fonction des districts et de l'intervention, la moyenne de production d'anticorps aussi bien MSP1 que AMA1, est plus fréquente chez les enfants de 5 ans et plus sauf pour le district de Mbour où la production de MSP1 est supérieure dans la tranche d'âge 2 à 5 ans aussi bien dans la zone contrôle (2,02 pour l'âge 2 à 5 ans versus 1,96 chez les autres) que celle d'intervention (1,78 chez les 2 à 5 ans contre 1,72 chez les 0 et 2 ans et 1,74 chez les plus de 5 ans) (figures 3 et 4 ).



**Figure 3:** MSP1 production among study participants by age group and intervention area.



**Figure 4:** AMA1 production among study participants by age group and intervention area.

#### 4. Commentaires

La SMC constitue de plus en plus un outil efficace pour lutter contre le paludisme chez les jeunes enfants (Grobusch *et al.*, 2007). Cependant elle a un impact sur l'acquisition d'une immunité antipalustre chez ces derniers. En effet, l'absence d'infection palustre chez ces enfants pourrait affecter la production d'anticorps protecteurs et les rendre plus vulnérables au paludisme.

La présente étude a montré que les enfants ayant reçu la combinaison de SP + AQ ont un niveau inférieur d'anticorps antispasmodiques par rapport aux enfants témoins. Ces résultats sont en accord avec la réponse IgG anti- schizonte réduite mesurée chez les nourrissons ghanéens six mois après une dose unique de SP en monothérapie (Schreiber *et al.*, 2007).

La production d'anticorps est plus remarquée chez les enfants de 5 ans et plus. Ceci est en accord avec les résultats dans le nord du Sénégal où les réponses IgG anti- schizontes ont augmenté progressivement chez les enfants cinq ans, puis sont restés stables jusqu'à neuf ans (Sarr *et al.*, 2007). Des études antérieures ont montré, en Gambie, que le risque de paludisme clinique augmente plusieurs années après l'arrêt de la chimio prophylaxie (Greenwood *et al.*, 1995). Le contrôle de l'effet de rebond potentiel des enfants qui recevront TPIc pendant plusieurs années consécutives sera également d'un grand intérêt (Greenwood *et al.*, 2008)

Publication 2 en cours de soumission:

## **Impact of seasonal malaria Chemoprevention in the production of MSP1 and AMA1 antibodies in Senegal**

Annie Abiola<sup>1</sup>, Aminata C LO<sup>1</sup>, Babacar Faye<sup>1</sup>, Roger Tine<sup>1</sup>, Badara Cissé<sup>1,2</sup>, Magatte Ndiaye<sup>1</sup>, Jean L Ndiaye<sup>1</sup>, Daouda Ndiaye<sup>1</sup>, Doudou Sow<sup>1</sup>, Khadim Sylla<sup>1</sup>, Omar Ndir<sup>1</sup>, Yemou Dieng<sup>1</sup>, Therese Dieng<sup>1</sup>, El Hadj Ba<sup>2</sup>, Cheikh Sokhna<sup>3</sup>, Jules F Gomis<sup>1</sup> Paul Miligan<sup>2</sup>, Chris Drakeley<sup>2</sup>, Oumar Gaye<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Service of Parasitology, faculty of Medicine, University Cheikh Anta Diop, Dakar/Senegal

<sup>2</sup>London School of Hygiene and Tropical Medicine, London/ UK

<sup>3</sup>Institut de Recherche pour le Developpement, Dakar/ Senegal

### **Background**

Malaria is a major cause of morbidity mortality and in children in endemic areas. Due to the repeated contact with the parasite and the gradual establishment of malarial immunity, the susceptibility of the child will constantly evolve with age. Hence the introduction of seasonal malaria chemoprevention in children in areas with seasonal transmission. In order to study the impact of the strategy on the acquisition of immunity against malaria, we evaluated the production of specific antibodies against antigens Apical Membrane Antigen-1 and Merozoite Surface Protein-1 of *Plasmodium falciparum*.

### **Method**

The study was conducted in Mbour, Fatick and Bambey health districts of. It involved children less than 10 years. Filter papers were collected after administration of 3 doses of SP+AQ in these children. Production of anti-MSP-1<sub>19</sub> and anti-AMA-1 antibodies was determined by ELISA.

### **Result**

We find that children over 5 years are those that produce more antibodies and this production increases with age significantly ( $p < 10^{-3}$ ). We recorded little cases of malaria in the intervention area compared to the control area with 0.21% against 1.37% ( $p = 0.0001$ ). The production of AMA-1 antibody is most important with 27.09% than that of anti-MSP antibody 119 with 13.69%. Controls areas produce more antibody than the intervention areas, therefore, the Chemotherapy Malaria is a seasonal factor affecting the production of antibodies.

### **Conclusion**

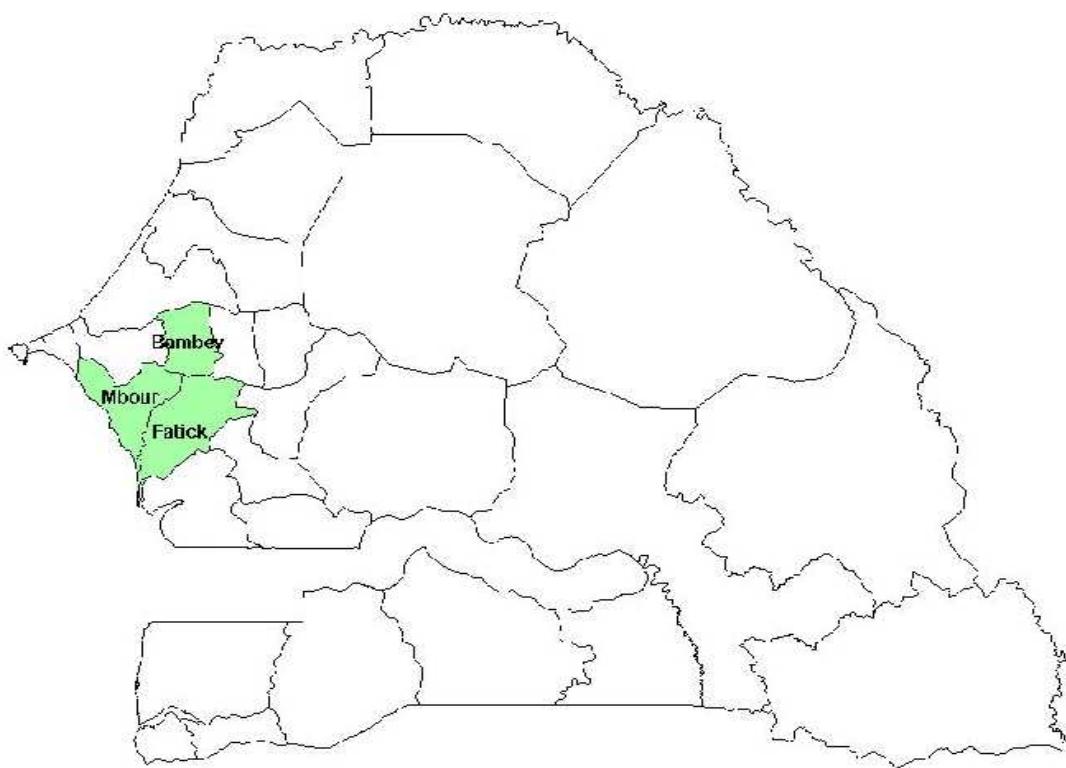
It is known that in malaria endemic area, acquisition of protective immunity against malaria moved progressively depending on the transmission and age. These markers have antimalarial capital interest in assessing the transmission and the discovery of a vaccine.

Keys words: SMC, immunity, *Plasmodium falciparum*, antibody, MSP-1, AMA-1

## **Background**

*Plasmodium falciparum* malaria is a major public health problem and a serious impediment to social and economic development, particularly in sub-Saharan Africa, where 85% of the global burden occurs. Malaria causes an estimated 0.9 million deaths per year, and 89% of deaths occur in children below five years of age and in pregnant women living in malaria-endemic areas (1). In Senegal, malaria remains a major concern for the Ministry of Health, despite the sharp decline in morbidity observed in recent years (30% in 2006 to 3% in 2009) (NMCP 2009). These encouraging results observed in many countries have raised hopes of eliminating the disease in many parts of the world. In this context, new prevention strategies have been adopted to help achieve this goal. Thus, WHO recommended after IPT in pregnant women and infants (2), Seasonal Malaria Chemoprevention (SMC) in children in areas of seasonal transmission on the basis of several studies in Africa (WHO 2012). It calls for every child living in these areas to receive a sulfadoxine-pyrimethamine plus amodiaquine combination (SP + AQ) each month for up to four months during the malaria transmission season. However, the actual impact of this strategy on the acquisition of an effective antimarial immunity in children subjected to this chemoprevention needs to be determined. Due to the protection against malaria infection that it allows, this strategy may delay the production of specific antibodies. Some studies in pregnant women have shown that IPTp affected immunity against malaria, especially in multi gestures (4). Many antigens considered as targets for the immune response during the erythrocytic stage and have been identified and that can be affected (5), (6), (7). Among them, the Merozoite Surface Protein1 (MSP1) and the Apical Membrane Antigen1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum* (8). Located on the surface of merozoites, they play a role in the parasite invasion process (9), (10). In order to measure the impact of this strategy on the acquisition of immunity against malaria, we evaluated the production of antibodies directed against the antigens Apical Membrane Antigen-1 and Merozoite Surface Protein-1 of *Plasmodium falciparum* in children subjected to seasonal malaria chemoprevention (CSP) in a study of an evaluation of the strategy conducted from 2008 to 2010 in three health districts in Senegal.

## Study site and subjects



**Figure 1 : study map**

The study site and the implementation of SMC are described by Cisse *et al.* (11). In brief, SMC with SP+AQ was administered once per month from September to November to children in three districts in central Senegal (Mbour, Bambey and Fatick) from 2008 to 2010. According to the 2002 national census, approximately 450,000 people live in this area. There are approximately 725 villages in the three districts and 54 health posts run by health workers and three health centers (one in each district) directed by a medical doctor. Implementation of SMC was phased in the 54 health posts as described by LO *et al.* (LO *et al.*, 2013). Initially children aged three to 59 months were included in the program but in 2009 the upper age limit was raised to include all children below 10 years of age due to the increasing number of malaria cases during the first year in children between 5 to 10 years old (unpublished data, article in preparation). At the end of each transmission season, a cross-sectional survey of children was conducted to measure the prevalence of parasitaemia and to take blood samples on filter paper for analysis. For this study, the year 2009 has been chosen. Indeed, during this year, the number of health posts with SMC (27) is equal to the number of control health posts.

## Methods

The blood samples were collected by finger prick on to Whatman 3 M filter paper, dried with silica gel and stored at +4°C until testing.

The reconstitution of dried blood spots was conducted as previously described [8]. Briefly, a 3.5 mm diameter circle was punched out from a blood spot and reconstituted by adding 300 µl of the reconstitution buffer made from PBS/Tween wash solution and 0.1% Azide after overnight agitation.

ELISA was used to analyse blood samples to detect IgG antibodies to recombinant blood stage *P. falciparum* malaria antigens AMA-1 and MSP119 (13).

Briefly, Immulon-4 plates (Nunc) were coated overnight with 50 µl of 0.5 µg/ml of the antigen. After blocking 50 µl of each of the samples and standards (**a pool of positive sera from The Gambia**) were added to duplicate wells; filter paper eluate were tested at a final dilution of 1:1,000 for MSP-119 and 1:2,000 for AMA-1. The plates were incubated over night at 4°C after which rabbit antihuman IgG-antibody conjugated to horse-radish peroxidise (Dako) was added at a dilution of 1:5,000. Antibody responses were detected as optical densities (OD) after development with o-phenylenediamine (OPD) and read at a wavelength of 490 nm on a spectrophotometer.

## Statistical analysis

**Cut off:** ELISA OD were converted to antibody titres expressed in Arbitrary Units (AU/ml) using the standard curve from a pool of hyperendemic sera. Paired t-tests of the continuous data were conducted and correlation coefficients calculated. A mixture model was used to define an arbitrary cut-off for positivity for each sample collection method [8]. Briefly, the distribution of normalized OD values was fitted as the sum of two Gaussian distributions (a narrow distribution of sero-negatives and a broader distribution of sero-positives) using maximum likelihood methods. The mean OD of the Gaussian corresponding to the sero-negative population plus three standard deviations was used as the cut-off for seropositivity.

A separate cut off was generated for each antigen. Sensitivity analysis was conducted in Stata11 (Statacorp,Texas).

**Univariate and multivariate analysis:** Data were entered into Excel ®, the analysis was done with the IC10 STATA software (StataCorp LP).

Quantitative variables were described as mean, standard deviation or median, minimum, maximum, depending on the type of distribution.

Qualitative variables were described in terms of the numbers and percentages. Prevalence was calculated as a percentage with confidence intervals at 95%. Contingency tables were analyzed using the Pearson Chi2. Stratified analyses were also performed. In the absence of interaction tested by Chi2 homogeneity of relative risk, a Mantel-Hanzel adjusted relative risk was obtained as well as a confidence interval of 95%. A logistic regression model was established considering malaria as the dependent variable. The model's explanatory variables (predictors) were selected following a stepwise procedure (forward), step (stepwise) based on the likelihood ratio. Only significant associations were included in the final model. From the final model, the adjusted odds ratio adjustés were derived and their confidence intervals set at 95%. The adequacy of the model was verified by the Hosmer and Lemeshow test.

## Results

During the study 5833 children below 10 years were covered, in the 54 health posts. The ELISA analysis focused on 5433 samples. The age group from 60 to 120 months ie 5 years and older are the most highly represented, with a percentage of 49.83%. Children of 24 to 60 months (between 2 and 5 years) represented 34.37% and the 0 to 24 months (0-2 years) accounted for 15.81% of the samples. With a sex ratio of 1.03, the girls represented 2667 and 2766 were boys.

2006 samples (36.92%) were from the Bambey health district with 941 (33.61%) in the SMC area and 1065 (40.45%) in the control area. 1777 (32.71%) samples came from the Fatick district, 977 (34.89%) of them in the SMC area and 800 (30.38%) in the control area. 1650 samples (30.37%) were taken in the Mbour District, with 882 (31.50%) from the intervention area and 768 (29.17%) from the control area (Table1).

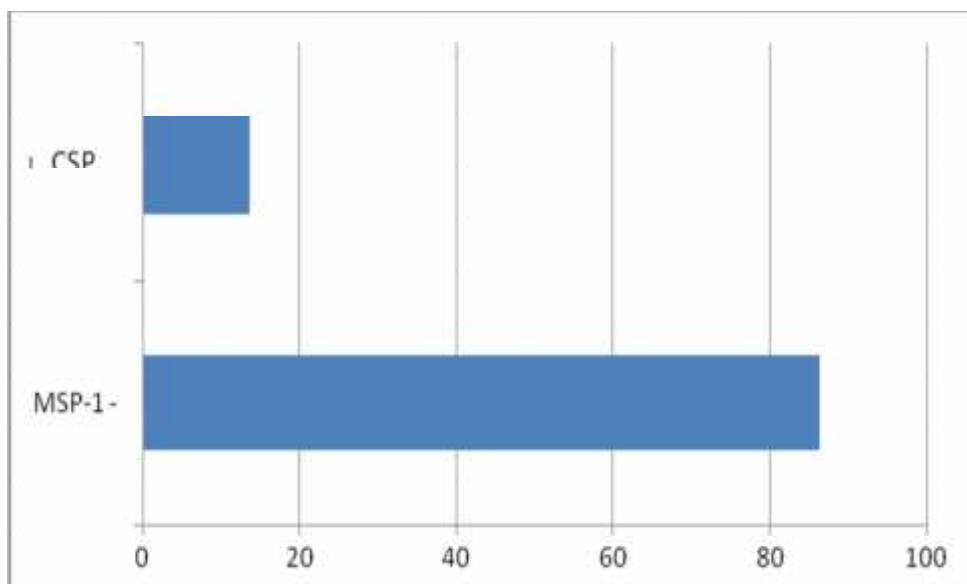
**Table I:** Distribution of samples according to the type of intervention

District	PSP +	PSP -	Total
	Effectif (%)	Effectif (%)	%
<b>Bambey</b>	941 (33,61)	1065 (40,45)	2006 (36.92%)
<b>Fatick</b>	977 (34,89)	800 (30,38)	1777 (32.71%)
<b>Mbour</b>	882 (31,50)	768 (29,17)	1650 (30.37%)
<b>Total</b>	2800 (100)	2633 (100)	5433 (100%)

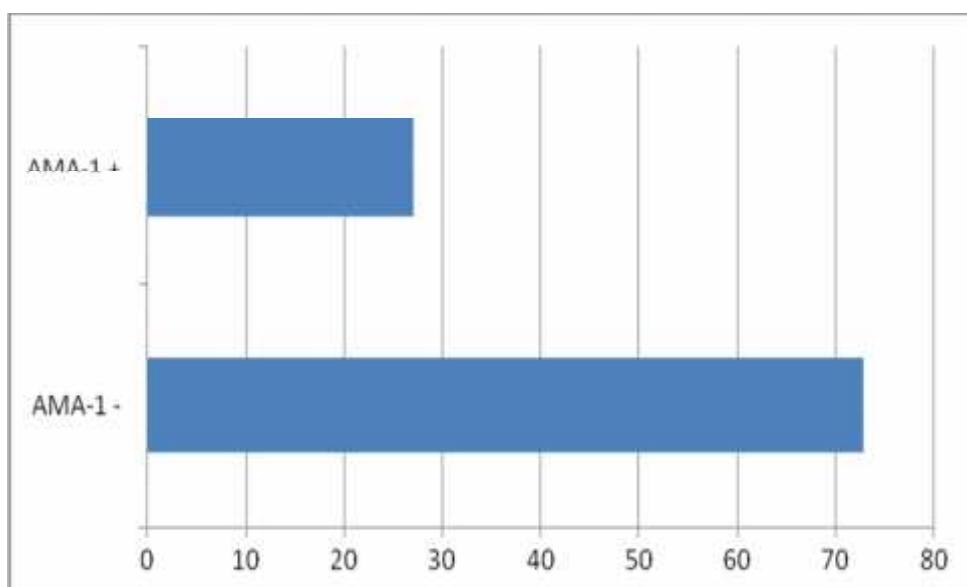
Only 50 samples (0.7%) were positive for Plasmodium falciparum by microscopic examination performed on each child.

The ELISA analysis showed that, overall, the production of anti-AMA-1 is higher than the production of anti-MSP-1 with 27.09% (1355) and 13.69% (691) respectively.

Antibody production depending on the implementation or not of the intervention showed a greater number of children producing antibodies in the area without SMC with 1.37% versus 0.21 % in the intervention area ( $p = 0.0001$ ) both for AMA- 1 and PSM -1<sub>19</sub> (FIGS. 2 and 3).

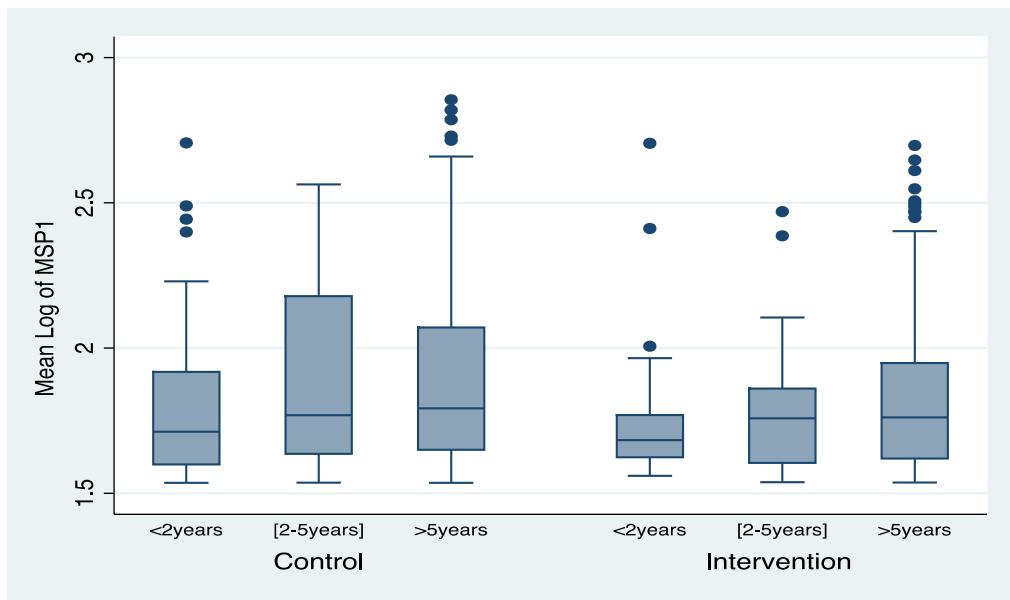


**Figure 2:** Prevalence of anti-MSP-1 antibody



**Figure 3:** Prevalence of anti-AMA-1 antibody

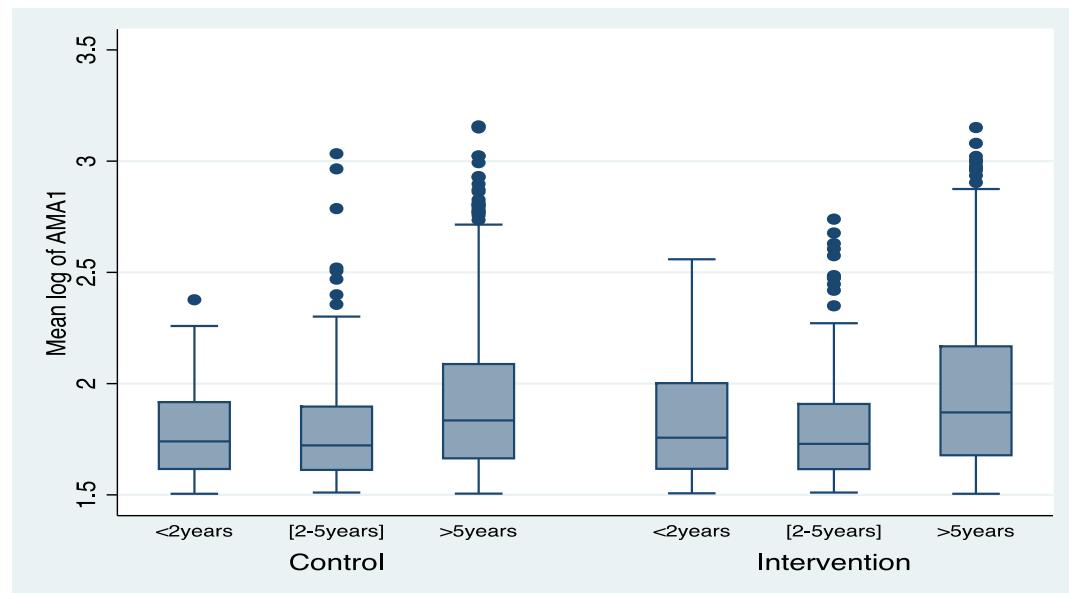
By age, the production of anti MSP- 1<sub>19</sub> antibody was higher in children above 5 years with 17.19% versus 11.33% for children between 2 and 5 years. The small children who produced MSP -1<sub>19</sub> antibody represented 9.36% ( $p = 0.0001$ ). No significant variation by sex was found (Table 3 and figure 4).



**Figure 4:** MSP1 production among study participants by age group and intervention area.

**Table II:** Factors influencing the production of anti-MSP-1<sub>19</sub> antibody

	MSP-1 <sub>19</sub>			
	Effectif (%)	IC95%	OR a *(IC95%)	p value
<b>Catégorie d'âge</b>				
<b>Moins de 2 ans (n=724)</b>	70 (9,64)	7,5-12,2	1	
<b>2 à 5 ans (n=1562)</b>	177 (11,33)	9,7-13,1	0,95 (0,56-1,63)	0,86
<b>Plus de 5 ans (n=2274)</b>	391 (17,19)	15,5-18,9	1,95 (1,48-2,56)	0,0001
<b>Manquant (n=530)</b>	53 (10,0)	7,4 – 13,1	1,18 (0,81-1,74)	0,38
<b>Sexe</b>				
<b>Garçons (n=2562)</b>	348 (13,58)	12,2-15,1	1	
<b>Filles (n=2486)</b>	343 (13,80)	12,3-15,3	1,05 (0,89-1,23)	0,54
<b>District</b>				
<b>Bambey (n=1870)</b>	286 (15,29)	13,4-17,0	1	
<b>Fatick (n=1647)</b>	234 (14,21)	12,1-17,7	0,88 (0,72-1,07)	0,21
<b>Mbour (n=1531)</b>	171 (11,17)	9,5-13,0	0,73 (0,59-0,89)	0,003
<b>Zone d'étude</b>				
<b>Zone sans PSP (n=2418)</b>	388 (16,05)	15,1-18,5	1	
<b>Zone avec PSP (n=2630)</b>	303 (11,52)	10,3-12,9	0,71 (0,60-0,84)	0,0001
<b>Plasmodium falciparum</b>				
<b>Négatifs (n=5014)</b>	665 (13,3)	12,2-14,3	1	
<b>Positifs (n=34)</b>	26 (76,4)	50,0-100	18,75 (8,31-42,28)	0,0001



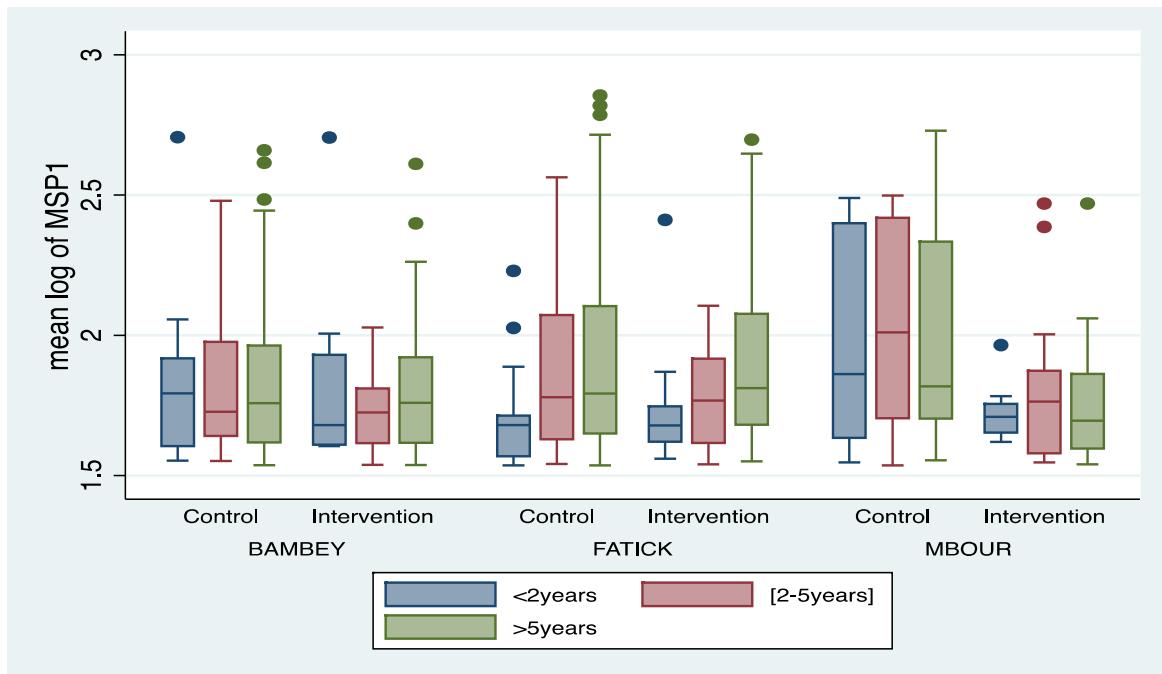
**Figure 5:** AMA1 production among study participants by age group and intervention area.

The same observation was noted with AMA- 1 but with a non-significant difference in terms of the intervention (Table 4). The variation in the production of anti-AMA- 1 antibodies was not significant whether in the SMC area or not ( $p = 0.47$ ) (Table 4 and figure 6).

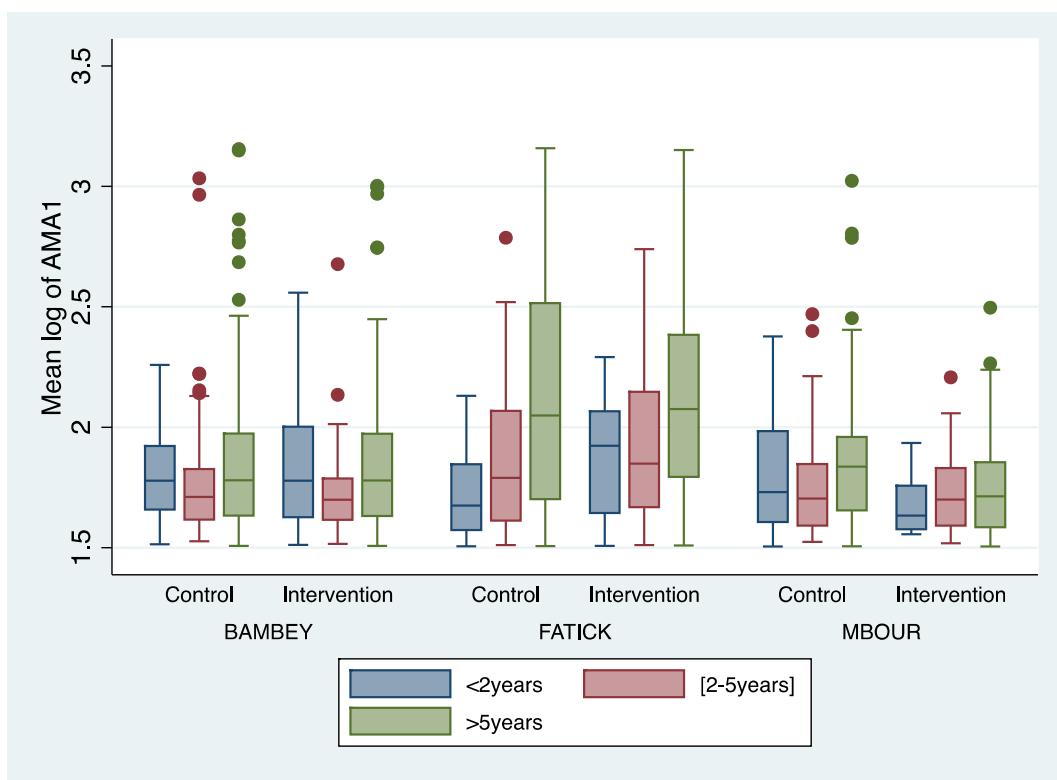
**Table III:** Factors influencing the production of antibodies to AMA-1

AMA-1				
	Effectif (%)	IC95%	aOR (IC95%)	p value
<b>Catégorie d'âge</b>				
<b>Moins de 2 ans (n=717)</b>	140 (19,53)	16,4-23,0	1	
<b>2 à 5 ans (n=1563)</b>	332 (21,24)	19,0-23,7	1,09 (0,87-1,36)	0,41
<b>Plus de 5 ans (n=2230)</b>	752 (33,72)	31,3-36,2	2,08 (1,70-2,56)	0,0001
<b>Manquants (n=530)</b>	131 (24,72)	20,6 – 29,30	1,60 (1,21-2,11)	0,001
<b>Sexe</b>				
<b>Garçons (n=2562)</b>	711 (27,75)	25,7-29,8	1	
<b>Filles (n=2440)</b>	644 (26,39)	24,4-28,5	0,94 (0,82-1,07)	0,40
<b>District</b>				
<b>Bambey (n=1830)</b>	558 (30,49)	28,0-33,1	1	
<b>Fatick (n=1628)</b>	486 (29,85)	25,0-30,2	1,00 (0,86-1,17)	0,91
<b>Mbour (n=1544)</b>	311 (20,14)	18,0-22,5	0,58 (0,49-0,69)	0,0001
<b>Zone d'étude</b>				
<b>Zone sans PSP (n=2453)</b>	652 (26,58)	24,0-28,7	1	
<b>Zone avec PSP (n=2549)</b>	703 (27,58)	25,6-29,7	1,04 (0,91-1,20)	0,47
<b><i>Plasmodium falciparum</i></b>	1347 (27,10)	25,7-28,6	1	
<b>Négatifs (n=4970)</b>				
<b>Positifs (n= 32)</b>	8 (25)	10,8-49,2	1,04 (0,91-1,20)	0,47

With respect to age, according to districts and interventions, the average production MSP1 and AMA1 antibodies is higher in children 5 years and older except in the District of Mbour where MSP1 production is higher in the age group between 2 and 5 years in both the control area (2.02 for age 2-5 years versus 1.96 among others) and the intervention area (1.78 in 2-5 years against 1.72 in the 0 to 2 years and 1.74 for those above 5 years) (figures 5 et 7).



**Figure 6:** MSP 1 production among study participants stratified by age group, district and intervention area.



**Figure 7:** AMA 1 production among study participants stratified by age group, district and intervention area.

## **Discussion**

Malaria is an endemic parasitic disease in developing countries. Children and pregnant women are the most vulnerable targets of this disease. A prevention strategy has therefore been recommended by WHO to reduce the burden of malaria in these groups, namely IPT with SP in pregnant women and infants (14). For children under 10 years, no strategy has been chosen despite malaria-induced mortality being still high in this age group. This study is part of a large-scale evaluation of a strategy called seasonal malaria chemoprevention in children using two drugs, SP combined with amodiaquine. These drugs are administered at curative doses during the three months of malaria transmission in Senegal in September, October and November. The proven effectiveness of this strategy on malaria morbidity allowed its adoption by WHO this year (15). However we wanted to evaluate the impact of this strategy on the acquisition of antimalarial immunity in these children. Indeed the absence of malaria infection in these children might affect the production of protective antibodies and make them more vulnerable to malaria. Hence, the importance of studying the impact of SMC on the acquisition of antimalarial immunity. It has been shown that immunity develops after years of exposure, and although it never provides full protection, it reduces the risk of malaria infection causing severe disorders. This is why most malaria deaths in Africa occur in young children in areas of high transmission, whereas in areas of low transmission, where the population is not immune, all age groups are exposed. The naturally acquired immunity against the disease is mainly observed in areas of high malaria endemicity where parasite density decreases with age and clinical manifestations of malaria are generally more common in children (16). Studies have shown that antibodies against the antigens of *P. falciparum* induced partial protection in *Saimiri sciureus* monkeys(17) and have been associated with protection against malaria in humans (18). Several studies have shown that immunization antigens such as MSP-1 and AMA-1 elicit protective immune responses (19, 20, 21). These antigens have a role in the parasite invasion process (22, 23) and are potential vaccine candidates. They are expressed on the surface of infected erythrocytes. Indeed, they lead to the production of protective antibodies in children living in areas with frequent contact with *Plasmodium falciparum* and that is the reason why we have chosen these two markers (24). We have seen fewer cases of malaria in the intervention area compared to the control area with a rate of 0.21% against 1.37% ( $p = 0.0001$ ). This could be explained by the introduction of SMC in the area of intervention which significantly reduced the rate of parasite carrier children. Sokhna et al, in a study performed in Senegal showed that the SMC allowed an 86% reduction the incidence of malaria in this age group (25). A study in Ghana points in the same

direction, showing that SMC reduced by 59% the malaria episodes and was more effective when it was taken earlier ie at 3 months (26). In Mali, a 40% reduction in malaria cases in children below five years who benefited from two doses of SP during the rainy season was observed (27).

During our study, we noted a higher production of antibodies anti MSP-1<sub>19</sub> in the control area than in the intervention area with 16.05% and 11.52%, respectively ( $p = 0.0001$ ). SMC seems to be a factor affecting the production of anti MSP-1<sub>19</sub> antibody (aOR = 0.71 with 95% CI between 0.60 and 0.84).

The variation in the production of anti-AMA-1 antibodies is not significant between the SMC area (26.58%) and the non-SMC area (27.58%) ( $p = 47$ ). However, we found that the production of AMA-1 antibodies was higher than that of MSP-1<sub>19</sub>. Stewart et al came to similar findings (28). A study by Boulanger et al. showed that children with SMC had a lower level of production of antiplasmodial IgG antibodies than those who received placebo, with a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) (29).

Despite the effectiveness of this strategy on malaria morbidity, it turns out, in the light of our results and those of the few studies that have evaluated the impact of the acquisition of protective antibodies, that it is important to follow up on these children to avoid the rebound effect. Boulanger et al. (24) warn against long-term risks on the immunological status of these children. Indeed, the delay in the acquisition of protective immunity exposes children above 10 years who are no longer eligible for SMC to an increased risk of contracting the disease with a higher possibility of severe forms. Protective measures such as the use of LLINs, vector control but also active surveillance with rapid response (rapid and accurate diagnosis and effective treatment) should be implemented in children over 10 years to reduce morbidity and mortality in this population group.

## Conclusion

Malaria remains a major public health hazard and the fight against this disease must be waged in various ways, including prevention in target groups such as pregnant women and children. For the latter group, the SMC is a new and effective strategy to significantly reduce the burden of malaria in areas of seasonal transmission. However, this may delay the development of protective immunity against malaria in non-eligible children. Hence the need

for the integration of SMC in the strategies for prevention and support already in place in the fight against malaria.

### **Competing interests**

The authors declared that they have no competing interests concerning the work reported in this paper.

### **Authors' contributions**

BC, BF and PM conceived and designed the study. AA and AL was responsible of the ELISA analysis. CD and RT analysed the data. AL and AA drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

Bill & Melinda Gates Fondation, Ministry of Health, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Research for Development Institute, Communities of Mbour, Bambey and Fatick

## References

- 1.WHO: **World Health Organization report.** 2009. [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report/en/index.html](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report/en/index.html)
2. PNLP 2009: **Rapport d'activités 2009.**
- 3.WHO, 2010: **Guidelines for the treatment of malaria.** Second edition. Geneva, Switzerland
- 4.WHO Policy recommandation: *Seasonal Malaria Chemoprevention (SMC) for Plasmodium falciparum malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-regions in Africa.* WHO Global Malaria Programme, March 2012.
- 5.Asa O, Onayade AA et al 2008. **Efficacy of intermittent preventive treatment of malaria with SP in preventing anaemia in pregnancy among Nigerian women.** *Matern Child Health J* 12 (6) : 692-698.
- 6.Cooper JA. **Merozoite surface antigen-I of plasmodium.** *Parasitol Today.* 1993; 9:50–54.
- 7.Crewther PE, Culvenor JG, Silva A, Cooper JA, Anders RF. ***Plasmodium falciparum:* two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry.** *Exp Parasitol.* 1990; 70:193–206.
- 8.Good MF, Kaslow DC, Miller LH. **Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine.** *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:57–87.
- 9.Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. **A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies.** *J Exp Med.* 1990; 172:379–382.
- 10.Triglia T, Healer J, Caruana SR, Hodder AN, Anders RF, et al. **Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species.** *Mol Microbiol.* 2000; 38:706–718.
- 11.Cisse B, Sokhna C, Boulanger D, Milet J, Ba el H, Richardson K, Hallett R, Sutherland C, Simondon K, Simondon F, et al: **Seasonal intermittent preventive treatment with artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial.** *Lancet* 2006, 367:659-667.
- 12.Lo AC, Faye B, Ba E H, Cisse B, Tine R, et al, 2013. **Prevalence of molecular markers of drug resistance in an area of seasonal malaria chemoprevention in children in Senegal.** *Malaria Journal* 2013, 12:137
- 13.Patrick H Corran, Jackie Cook, Caroline Lynch, Heleen Leendertse, Alphaxard Manjurano, Jamie Griffin, Jonathan Cox, Tarekegn Abeku, Teun Bousema, Azra C Ghani,

Chris Drakeley and Eleanor Riley. **Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies.** *Malaria Journal* 2008, 7:195 doi:10.1186/1475-2875-7-195

14.WHO, **seasonal malaria chemoprevention with sulfadoxine-pyrimethamine plus amodiaquine in children:** A field guide; July 2013. ISBN 978 92 4 150473 7.

15.McGregor IA. **The development and maintenance of immunity to malaria in highly endemic areas.** *Clinics Trop Med Commun Dis.* 1986; 1:29–53.

16.Snow RW, Craig M, Deichmann U, Marsh K. **Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population.** *Bull World Health Organ.* 1999; 77: 624–640.

17.Carvalho LJ, Oliveira SG et al. 2004. **Immunisation of Saimiri sciureus monkeys with Plasmodium falciparum merozoite surface protein-3 and glutamate-rich protein suggests that protection is related to antibody levels.** *Scand J Immunol* 59 (4): 363-372.

18.Barry AE, Schultz L et al, 2009. **Contrasting population structures of the genes encoding ten leading vaccine-candidate antigens of the human malaria parasite, Plasmodium falciparum.** *PLoS One* 4 (12): e8497.

19.Newbold CI. **Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: Mechanisms and consequences.** *Curr. Opin. Microbiol.* 2:420-425, 1999

20.Sokhna C, Cisse B, Ba El H, Milligan P, Hallett R, Sutherland C, Gaye O, Boulanger D, Simondon K, Simondon F, Targett G, Lines J, Greenwood B, J-F Trape, 2008. **A Trial of the Efficacy, Safety and Impact on Drug Resistance of Four Drug Regimens for Seasonal Intermittent Preventive Treatment for Malaria in Senegalese Children.** *PLoS One* 3: e1471.

21.Robin Kobbe, Samuel Adjei, Christina Kreuzberg, Benno Kreuels, Benedicta Thompson, Peter A Thompson, Florian Marks, Wibke Busch, Meral Tosun, Nadine Schreiber, Ernest Opoku, Ohene Adjei, Christian G Meyer5 and Juergen May. **Malaria incidence and efficacy of intermittent preventive treatment in infants (IPTi).** *Malaria Journal* 2007, 6:163 doi:10.1186/1475-2875-6-163

22.Dicko A, Sagara S, Sissoko MS, Guindo O, Diallo ABI, et al. (2004). **Impact of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine targeting the transmission season on the incidence of clinical malaria in children aged 6 months to 10 years in Kambila, Mali.** *Amer J Trop Med Hyg* 71 (Suppl): 6.

23.Stewart L, Gosling R, Griffin J, Gesase S, Campo J, et al. **Rapid Assessment of Malaria Transmission Using Age-Specific Sero-Conversion Rates.** 2009. *PLoS ONE* 4(6): e6083. doi:10.1371/journal.pone.0006083

24.Denis Boulanger, Jean Biram Sarr, Florie Fillol, Cheikh Sokhna, Badara Cisse, Anne-Marie Schacht, Jean-François Trape, Gilles Riveau, François Simondon, Brian Greenwood, Franck Remoué. **Immunological consequences of intermittent preventive treatment against malaria in Senegalese preschool children.** *Mal. J.* 2010; 1475-2875 (9): 363.

## **TROISIEME PARTIE :**

Discussion générale, Conclusion et Perspectives

## **Discussion générale**

L'élimination du paludisme est maintenant considérée comme un objectif réalisable pour un nombre croissant de pays (Greenwood 2009). Mais cela nécessite un contrôle de l'infection dans les groupes les plus à risque, à savoir les femmes enceintes (Desai *et al.*, 2007) et les enfants (Snow *et al.*, 1999). Le TPI peut être particulièrement utile dans les zones de transmission saisonnière du paludisme où la prise du médicament porte sur une période limitée lorsque la transmission et le risque de paludisme sont maximaux. D'où l'implantation de la Chimioprévention du paludisme saisonnier dans ces zones. Cependant cette stratégie peut retarder le développement de l'immunité acquise naturellement à cause de l'élimination d'un grand nombre de parasites circulants, et par conséquent le nombre de contacts normalement requis (Moormann 2009). Dans le but de déterminer l'impact de cette stratégie sur les marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques mais aussi sur l'acquisition des anticorps dirigés contre le paludisme, nous avons menés des études dans 3 districts sanitaires.

La résistance à la SP est bien plus établie en Afrique de l'Est qu'en Afrique de l'Ouest principalement en raison de la faible prévalence de la mutation au niveau du codon 540E de *pfdhps*.

Une augmentation générale de la prévalence de tous les haplotypes mutants à la SP a été notée dans notre étude. Cette 'augmentation des haplotypes mutants est observée aussi bien dans la zone sous SMC que dans la zone de contrôle. Toutes les dernières études réalisées à travers l'Afrique ont montré une progression de la mutation du gène *pfdhfr* et *pfdhps* (Cissé *et al.*, 2007 ; Faye *et al.*, 2011 et Dicko *et al.*, 2010). Nos résultats montrent que la sélection de la résistance n'est pas due à la SMC uniquement. Par contre, au cours du Traitement Préventif Intermittent avec la SP chez les nourrissons en Mozambique, la quintuple mutation *pfdhfr/pfdhps* a été presque doublée dans le groupe sous TPI par rapport au groupe placebo (Mayor A 2008). Malgré leur présence en Afrique de l'Est, les mutations aux niveaux des codons 164 de *pfdhfr* et 540 *pfdhps*, n'ont pas été observé dans notre étude.

Concernant les gènes *pfcrt*, nous avons constaté que globalement la prévalence de mutation de *pfcrt* de 2008 à 2010 n'est pas très élevée par rapport aux données antérieures obtenues. Entre 2004 et 2006, elle était environ 60% au Sénégal et au Kenya (Sarr *et al.*, 2008 : Leah *et al* 2009) et nous avons obtenus 30% de mutation de *pfcrt* dans la zone sous SMC et 40% dans

la zone de contrôle si on regroupe les trois années d'étude. Ceci peut être du fait qu'au Sénégal, la Chloroquine a été abandonnée comme médicament de première ligne du traitement du paludisme depuis 2002 au profit de l'association SP + AQ puis à partir de 2006 par les ACT. Une diminution importante de la prévalence des mutations au niveau du gène *Pfcrt* plusieurs années après abandon de la chloroquine a été observée au Malawi par Kublin *et al.*, 2003 et Mita *et al.*, 2003. Une prévalence de mutation similaire de *pfcrt* (codon 76) a été observée en Inde récemment par Goswani *et al.*, 2013. Mais avec l'utilisation de l'amodiaquine comme c'est le cas au Sénégal avec l'association AS+AQ qui est l'ACT de première ligne dans le traitement, la surveillance régulière du niveau de prévalence de *pfcrt* devient une nécessité. Ainsi d'après notre étude, un impact négatif important de la Chimioprévention du paludisme saisonnier sur les marqueurs moléculaires n'est pas pour le moment constaté.

Toutefois, l'effet potentiellement négatif du TPI sur le développement de l'immunité naturellement acquise contre le parasite a été soulevé (Greenwood 2006).

Les résultats obtenus dans notre étude confirment cette hypothèse. Au niveau des zones sans intervention, la production d'immunoglobuline (IgG) dirigés contre les antigènes de *P. falciparum* MSP1 ou AMA1 était plus importante qu'au niveau des zones d'intervention. En tenant compte des groupes d'âges, il a été révélé que se sont les enfants de 5 ans et plus qui秘rètent plus d'anticorps tant dans les zones SMC que dans celles sans SMC.

Ainsi nous avons constaté que la production d'anticorps (IgG) anti-AMA1 était plus élevée que ceux dirigés contre l'antigène MSP-1<sub>19</sub>. Stewart et al retrouvaient des résultats similaires (Stewart et al 2009). Le niveau élevé d'immunoglobulines dirigées contre les antigènes MSP1 et AMA1 chez les enfants non porteurs du parasite, suggère que ces derniers dans les zones de transmission saisonnière du paludisme acquièrent et maintiennent les réponses immunitaires contre le paludisme en l'absence d'infection détectable au microscope telle est démontré par Mamo et al (Mamo et al. 2013).

Chez les enfants ayant reçu une chimioprophylaxie, les taux d'anticorps antiplasmodiques sont généralement significativement diminués, mais la diminution est moindre lorsque la chimioprophylaxie est longue ; par contre, les proliférations lymphocytaires et les taux d'IFN-gamma sont en général augmentés ce qui suggère qu'une réduction du nombre d'accès permet le développement de réponses immunes à médiation cellulaire plus efficaces (Impact Malaria 2012).

Dans une situation où la chimioprophylaxie de masse est associée à une autre forme de prophylaxie (moustiquaires imprégnées, par exemple), il est concevable que les chances d'infection puissent être tellement réduites que le développement de l'immunité ne pourra se faire.

Ainsi malgré que le TPI chez les enfants en zone d'endémie entraîne une réduction de 60% des accès palustres et de 50% des cas d'anémie grave, son impact sur le développement de l'immunité n'est pas encore assez documenté. Une surveillance plus longue est nécessaire.

## ***Conclusion et Perspectives***

La propagation des souches de *P. falciparum* résistantes aux différents antipaludiques pourrait entraver les progrès réalisés dans la lutte contre du paludisme. Ainsi à travers les stratégies adaptées par l'OMS à savoir le TPI avec la SP chez le nourrisson et la femme enceinte, la surveillance de l'évolution éventuelle des marqueurs moléculaires à ces antipaludiques devient une obligation. Plusieurs études effectuées ont montré que les marqueurs de résistance à la SP (pfdhfr et pfdhps) et à l'AQ (pfCRT et pfMDR1) sont en mesure de donner les informations nécessaires quant à survenue et la progression de la résistance de *P. falciparum* à ces molécules. De notre étude, il en ressort une prévalence aussi importante de ces marqueurs que dans les précédentes études effectuées au Sénégal et en Afrique. Cependant en faisant une comparaison entre la zone sous SMC et la zone de contrôle, nous avons constaté que malgré une augmentation progressive des mutations associées à la résistance à SP et AQ, la différence n'est pas significative. Ce qui suggère que pour le moment cette stratégie n'entraîne pas une sélection des parasites résistants à ces molécules.

Les résultats de nos études en plus d'autres menées à travers l'Afrique ont permis à l'OMS d'adopter en plus du TPI chez la femme enceinte et le nourrisson, la SMC et de la recommander dans les zones où la transmission du paludisme est saisonnière (WHO Marsh 2012).

Cependant malgré l'efficacité prouvée de ces stratégies de prévention, elles semblent retarder l'acquisition d'une immunité contre le paludisme.

Avec l'adoption de la SMC, nous envisageons en perspective de suivre son impact sur les marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques utilisés à long terme et sur l'immunité protectrice dans les années qui suivront son implantation.

Mais aussi de participer à la rechercher d'autres molécules efficaces pour éviter un effet rebond surtout au cas où la quintuple mutation *pfdhfr/pfdhps* commence à s'étendre dans le pays.

## **QUATRIEME PARTIE**

## **BIBLIOGRAPHIE**

## Bibliographie

1. **Aponte JJ, Schellenberg D, Egan A, et al, 2009.** Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants: a pooled analysis of six randomised, placebocontrolled trials. *Lancet*; 374:1533-42.
2. **Ba-Fall Fatou, 2000.** Le paludisme en zone mésoendémique : relation entre la transmission, l'infection et la morbidité palustre à Ndiop (Sénégal). Thèse de Troisième cycle de Biologie Animale 51 : 10-14.
3. **Basco L. K., Eldin De Pecoulas P., Wilson C., Lebras J. et Mazabraud A., 1995.** Point mutation in the dihydrofolate reductase gene as the molecular basis for pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* ; 69 : 135-138 pp.
4. **Basco LK et Ringwald P, 2001.** Analysis of the key pfcr7 point mutation and in vitro and in vivo response to chloroquine in Yaounde, Cameroun. *J Infect Dis* 183 (12): 1828-1831.
5. **Bjorkman A, Phillips-Howard PA, 1990.** The epidemiology of drug- resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 84:177-80
6. **Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA, 1990.** A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med.* 172:379–382.
7. **Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P, 1990.** Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med.* ;172:1633–1641.
8. **Brasseur P, Agnamey P, Ekobo AS, et al, 1995.** Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to amodiaquine and chloroquine in central Africa : a comparative study in vivo and in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* ; 89: 528-30.
9. **Brasseur P, Guiguemde R, Diallo S, et al, 1999.** Amodiaquine remains effective for treating uncomplicated malaria in west and central Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 93:645-50.

10. **Bray P. G., Mungthin M., Ridley R. G. et Ward S. A., 1998.** Access to hematin: the basis of chloroquine resistance. *Molec. Pharmacol.* ; 54 : 170-179 pp.
11. **Bray PG, Hawley SR., Ward SA, 1996.** 4-aminoquinoline resistance of *Plasmodium falciparum*: insights from the study of amodiaquine uptake. *Mol Pharmacol*; 50:1551-8.
12. **Brooks D, Wang P, Read M, et al, 1994.** Sequence variation in the hydroxymethyl dihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem*; 224: 397-405.
13. **Carlton J., Mackinnon M. et Walliker D., 1998.** A chloroquine resistance locus in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Mol Biochem Parasitol.* ; 93 : 57-72 pp.
14. **Carrara VI, Zwang J, Ashley EA, et al, 2009.** Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the Northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment. *PlosOne*; 4:4451.
15. **Chen N et Russel B, 2001.** Sequence polymorphisms in pfcrf are strongly associated with cloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 183 (10): 1543-1545.
16. **Chen Qj, Schlichtherle M, Whalen M ; 2000.** Molecular aspects of severe malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 13 : 439-450
17. **Cisse B, Cairns M, Faye E, Ndiaye O, Faye B, Cames C, Cheng Y, Ndiaye M, LO AC, Simondon K, Trape JF, Faye O, Ndiaye JL, Gaye O, Greenwood B and Milligan P, 2009.** Randomized trial of Piperaquine with Sulfadoxine-Pyrimethamine or Dihydroartemisinin for malaria intermittent preventive treatment in children. *Plos One*; 4: 7164.
18. **Cissé B, Faye S, Dial Y, Faye O, Gaye O, 2007.** Pilot study of the implementation of seasonal intermittent preventive treatment in children (IPTc) with community participation in Senegal. Abstract 025-40. *Trop Med Intl Hlth* 12 suppl 1: 46.
19. **Cisse B, Sokhna C, Boulanger D, Milet J, Ba E, Richardson K, Hallett R, Sutherland C, Simondon K, Simondon F, Alexander N, Gaye O, Targett G, Lines J, Greenwood B and Trape JF, 2006.** Seasonal intermittent preventive treatment with Artesunate and Sulfadoxine-Pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet*; 367:659-67.

20. **Clyde DF, Shute GT, 1957.** Resistance of *Plasmodium falciparum* in Tanganyika to pyrimethamine administered at weekly intervals. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 51:505-13.
21. **Cohen S, McGregor IA, Carrington S, 1961.** Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature (Lond)* 192:733-737,7.
22. **Cooper JA, 1993.** Merozoite surface antigen-I of plasmodium. *Parasitol Today*. ; 9:50–54.
23. **Cowman AF, Morry MJ, 1988.** Amino acid changes linked to pyriméthamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(23): 9109-9113.
24. **Crewther PE, Culvenor JG, Silva A, Cooper JA, Anders RF, 1990.** *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp Parasitol*. ; 70:193–206.
25. **Curd FHS, Davey DG, Rose FL, 1945.** Studies on synthetic antimalarial drugs. X. Some biguanide derivatives as new types of antimalarial substances with both therapeutic and causal prophylactic activity. *Ann Trop Med Parasitol*; 39:208-16.
26. **Currier J, Sattabongkot J, Good MF, 1992.** Natural T cells responsive to malaria, Evidence implicating immunological cross-reactivity in the maintenance of TCR + malaria-specific responses from non-exposed donors. *Int. Immunol.* 4:985-994,
27. **Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoah K, Brabin B, Newman RD, 2007:** Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis Lancet Infect Dis*, 7:93-104.
28. **Diagne N., Fontenille D., Konaté L., Faye O., Lamizana M. T., Legros F., Molez J. F. et Trape J. F., 1994.** Les Anophèles du Sénégal : liste commentée et illustrée. *Bull. Soc. Path.* ; 87 : 267-277 pp.
29. **Dicko A, Sagara I, Djimdé AA, Touré SO, de Sousa A, Doumbo OK, 2010.** Molecular markers of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine one year after implementation of intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali. *Malar J*; 9:9.
30. **Dondorp A, Nosten F, Yi P, et al, 2009.** Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*;361:455-67.
31. **Duarte EC, Fontes CJ, Gyorkos TW, et al, 1996.** Randomized controlled trial of artesunate plus tetracycline versus standard treatment (quinine plus tetracycline) for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*; 54:197-202.
32. **Eastman RT, Fidock DA, 2009.** Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat Rev Microbiol* 7: 864-74.
33. **Falco EA, Goodwin LG, Hitchings GH, et al, 1951.** 2:4-diaminopyrimidines - a new series of antimalarials. *Br J Pharmacol Chemotherap*; 6:185-200.

34. **Faye B, Ndiaye M, Ndiaye JL, Annie A, Tine RC, Lo AC, Ndiaye M, Sow D, De Sousa A, Gaye O, 2011:** Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine-pyrimethamine during the intermittent preventive treatment in infants coupled with the expanded program immunization in Senegal. *Parasitol Res*, 109:133–138.
35. **Fidock DA, Nomura T, Talley AK, et al, 2000.** Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*; 6:861-71.
36. **Fontanet AL, Johnston DB, Walker AM, et al, 1993.** High prevalence of mefloquine-resistant *falciparum* malaria in eastern Thailand. *Bull World Health Organ*; 71:377-83.
37. **Geary TG, Jensen JB, 1983.** Lack of cross-resistance to 4-aminoquinolines in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Parasitol*; 69:97-105.
38. **Giboda M., Denis MB, 1988.** Response of Kampuchean strains of *Plasmodium falciparum* to antimalarials: in-vivo assessment of quinine and quinine plus tetracycline; multiple drug resistance in vitro. *J Trop Med Hyg*; 91:205-11.
39. **Good MF, Kaslow DC, Miller LH, 1998.** Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol*. ; 16:57–87.
40. **Goswami D, Dhiman S, Bipul R, Kumar D, Baruah I, Veer V, Bhola RK and Sharma DK, 2013.** High prevalence of pf crt K76T and *mdr1* N86Y mutations in Sonitpur district of Assam, India. *Paras Dis*; 12639-013-0298-1.
41. **Greenwood B, 2009.** Can malaria be eliminated? *Trans R Soc trop Med Hyg*, 103 (Sup1): S2-5.
42. **Greenwood B, Bojang K, Chandramohan D, Cisse B, Kweku M, and Milligan P, 2008:** Response to Buffet et al: Intermittent preventive anti-malarial treatment to children (IPTc): firebreak or fire trap? *Trends Parasitol*, 24:485-486.
43. **Greenwood B: Review, 2006:** Intermittent preventive treatment--a new approach to the prevention of malaria in children in areas with seasonal malaria transmission. *Trop Med Int Health*, 11:983-991.
44. **Greenwood BM, David PH, Otoo-Forbes LN, Allen SJ, Alonso PL, Armstrong Schellenberg JR, Byass P, Hurwitz M, Menon A, Snow RW, 1995:** Mortality and morbidity from malaria after stopping malaria chemoprophylaxis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89:629-633.
45. **Greenwood BM, Greenwood AM, Bradley AK, 1988.** Comparison of two strategies for control of malaria within a primary health care programme in the Gambia. *Lancet*; 1: 1121-17.
46. **Grobusch MP, Egan A, Gosling RD, Newman RD, 2007:** Intermittent preventive therapy for malaria: progress and future directions. *Curr Opin Infect Dis*, 20:613-620.

47. **Gushimana Y, Doepner B, Martinez-Hackert E, et al, 1993.** Kinetics of quinine-deuterohemin binding. *Biophys Chem*; 47:153-62.
48. **Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, et al, 2006.** Association between mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and *P. falciparum* multidrug resistance 1 genes and in vivo amodiaquine resistance in *P. falciparum* malaria-infected children in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg*; 75:155-61.
49. **Harinasuta T, Bunnag D, Lasserre R, 1990.** Quinine resistant *falciparum* malaria treated with mefloquine. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 21:552-7.
50. **Hogh B., Marbiha NT, Burghaus P.A., Andersen P.K. 1995**-Relationship between maternal lyderived anti-*Plasmodium falciparum* antibodies and risk of infection and disease in infants living in an area of Liberia, West Africa, in which malaria is highly endemic. *Infect. Immun.* 63 : 4034-4038.
51. **Holmgren G, Gil J.P, Ferreira PM, et al, 2006.** Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of pfcrf 76T and pfmrd1 86Y. *Infect Gen Evol*; 6:309-14.
52. **Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, et al, 2007.** Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* mdr1 gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother*; 51:991-7.
53. **Hyde J, 2005.** Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop* 94:191-206.
54. **Impact Malaria 2012:** les grandes lignes de la réponse immune. [www.ImpactMalaria.com](http://www.ImpactMalaria.com) aout 2012. *PubMed*.
55. **Jelinek T, Schelbert P, Löscher T, et al, 1995.** Quinine resistant falciparum acquired in east Africa. *Trop Med Parasitol*; 46:38-40.
56. **Kitua A.Y., Smith T., Alonso P.L. 1996-** *Plasmodium falciparum* malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission. *Trop. Med. Int. Health*; 1: 475-484.
57. **Kremsner PG, 1990.** Clindamycin in malaria treatment. *J. Antimicrob Chemother*; 25:9-14.
58. **Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RA, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimde AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV, 2003:** Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis*, 187:1870-1875.
59. **Le Bras J, Durand R et al, 1998.** Considering disparities in resistance of *Plasmodium falciparum* in Africa in chemoprevention decisions. *Press Med* 27 (28) : 1419-1423.

- 60. Leah M KS, Abdirahman A, Pole L, Rippert A, Diriye A, Bull P, Marsh K, Borrman S, Nzila A. 2009:** In vitro Activities of Piperaquine, Lumefantrine and Dihydroartemisinin in Kenyan *Plasmodium falciparum* isolates and Polymorphisms in PfCRT and PfMDR1. . *Antimicrob Agents Chemother*,: 5069-5073.
- 61. Logie D.E., Macgregor I.A., Rowe D.S., Billewicz W.Z, 1973.** -Plasma immunoglobulin concentrations in mothers and newborn children with special reference to malaria. Studies in the Gambia, Nigeria and Switzerland. *Bull. WHO* ; 49 : 547-554.
- 62. Looareesuwan S, Wilairatana P, Vanijanonta S, et al, 1992.** Efficacy of quinine-tetracycline for acute uncomplicated *falciparum* malaria in Thailand. *Lancet*; 339:369.
- 63. Maegraith B. G., Deegan T., Sherwood Jones E, 1952.** Suppression of malaria *Plasmodium berghei*, by milk. *Br. Med. J.* 2:1382-1384.
- 64. Mamo H, Esen M, et al. (2013).** Humoral immune response to *Plasmodium falciparum* vaccine candidate GMZ2 and its components in populations naturally exposed to seasonal malaria in Ethiopia. *Malar J*; 12 (1): 51.
- 65. Marfurt J, Muller I, Sie A, et al, 2008.** The usefulness of twenty-four molecular markers in predicting treatment outcome with combination therapy of amodiaquine plus sulphadoxine-pyrimethamine against falciparum malaria in Papua New Guinea. *Malar J*; 7:61.
- 66. Marsh K 1992.** A neglected disease? *Parasitology* 104:S53-S69, 2.
- 67. Mayor A, Sanz S, Aponte JJ, Macete E, mandomando I, Puyol L, Berzosa P, Dobano C, Aide P, Sacarlal J, Benito A, Alonso P, Menendez C, 2008.** Molecular markers of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine during intermittent preventive treatment for malaria in Mozambican infants. *J. Infect Dis.* 197(12):1737-42.
- 68. McGregor IA, 1963.** Carrington SC, Cohen S. Treatment of East African *Plasmodium falciparum* malaria with West African human gammaglobulin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 57:170-175, 2
- 69. McGregor IA, 1986.** The development and maintenance of immunity to malaria in highly endemic areas. *Clinics Trop Med Commun Dis.* 1:29–53.
- 70. Mita T, Kaneko A, Lum JK, Bwijo B, Takechi M, Zungu IL, Tsukahara T, Tanabe K, Kobayakawa T, Bjorkman A, 2003.** Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg*, 68:413-415.
- 71. Mohan K, Stevenson MM, 1998.** Acquired immunity to asexual blood stages; in Sherman IW (ed): *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. Washington, ASM Press, pp. 467-493,

72. **Moormann AM, 2009**: How might infant and paediatric immune responses influence malaria vaccine efficacy? *Parasite Immunol*, 31:547-559. *PubMed Abstract/ Publisher Full Text/ PubMed Central Text*
73. **Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D. and Sircoulon J. 2004**. Biodiversité du paludisme dans le monde.
74. **Muller O, Van Hensbroek MB, Jaffar S, et al, 1996**. A randomized trial of chloroquine, amodiaquine, and pyrimethamine/sulfadoxine in Gambian children with uncomplicated malaria. *Trop Med Int Health* 1:124-32.
75. **Nawaz F, Nsobya SL, Kiggundu M, et al, 2009**. Selection of parasites with diminished drug susceptibility by amodiaquine-containing antimalarial regimens in Uganda. *J Infect Dis*; 200:1650-7
76. **Newbold CI; 1999**. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: Mechanisms and Consequences. *Curr. Opin. Microbiol.* 2 : 420-425.
77. **Noedl H, Se Y, Schaecher K, et al, 2008**. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med*; 359:2619-20.
78. **Nosten F, White NJ, 2007**. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*; 77 (suppl 6):181-92.
79. **Nyarango PM, Gebremeskel T, Mebrahtu G, et al, 2006**. A steep decline of malaria morbidity and mortality trends in Eritrea between 2000 and 2004: the effect of combination of control methods. *Malar J*; 5:33.
80. **Olliaro P, Nevill C, LeBras J, et al, 1996**. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. *Lancet*; 348:1196-201.
81. **Orago AS, Facer CA, 1991**. Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizontes: Stimulation by cytokines and inhibition by neomycin. *Clin. Exp. Immunol.* 86:22-29,
82. **Palmer KJ, Holliday SM, Brogden RN, 1993**. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy Drugs; 45:430-75.
83. **Parikh S, Rosenthal PJ, 2010**. Intermittent preventive therapy for malaria in pregnancy: is sulfadoxine-pyrimethamine the right drug? *Clin Pharmacol Ther*; 87:169-2.
84. **Pasvol G., Weatherall D.J., Wilson R.J.M, 1977**. - Effects of foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. *Nature*; 270: 171-173.
85. **Peterson DS, Walliker D, 1988**. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyriméthamine in *falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (23): 9114-9118.

86. **Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, et al, 2009.** A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. *Malar J*; 8:89.
87. **Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellemes TE, 1995.** Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 52:565-568.
88. **PNLP 2009:** Rapport d'activités 2009.
89. **PNLP 2010.** Programme National de Lutte contre le Paludisme/Plan stratégique national 2011-2015.
90. **Pradines B, 2009.** ABC proteins involved in protozoan parasite resistance. In ABC Transporters and Multidrug Resistance, Boumendjel A., Boutonnat J., Robert J. (eds), *J Wiley & Sons Inc.*, , 195-238
91. **Pradines B, Pistonne T, Ezzedine K, et al, 2010.** Quinine-resistant malaria in traveler returning from Senegal. *Emerg Infect Dis*;16:546-8.
92. **Raman J \*, Little F, Roper C, Kleinschmidt I, Cassam Y, Maharaj R, and Barnes K I, 2010.** Five Years of Large-Scale *dhfr* and *dhpS* Mutation Surveillance Following the Phased Implementation of Artesunate Plus Sulfadoxine-Pyrimethamine in Maputo Province, Southern Mozambique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82(5), pp. 788-794
93. **Rasheed F.N., Bulmer J.N., DE Francisco A. et Coll. 1995**-Relationships between maternal malaria and malaria immune response in mothers and neonates. *Parasite Immunol.*; 17 : 1-10.
94. **Ridley R. G., 1998.** Malaria : dissecting chloroquine resistance. *Current Biology* ; 8 : 346-349 pp.
95. **Rogers WO, Sem R, Tero T, et al. 2009,** Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J*; 8:10.
96. **Sano G, Morimatsu K, Horii T. 1994,** Purification and characterization of dihydrofolate reductase of *Plasmodium falciparum* expressed by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol*; 63:265-73.
97. **Sarr JB, Remoue F, Samb B, Dia I, Guindo S, Sow C, Maiga S, Tine S, Thiam C, Schacht AM, Simondon F, Konate L, Riveau G, 2007:** Evaluation of antibody response to *Plasmodium falciparum* in children according to exposure of *Anopheles gambiae* or *Anopheles funestus* vectors. *Malar J*, 6:117.

98. **Sarr O, Ahouidi AD, LyO, Daily JP, Ndiaye D, Ndir O, Mboup S, Wirth DF (2008).** Mutations in pfCRT K76T do not correlate with sulfadoxine-pyrimethamine-amodiaquine failure in Pikine, Senegal. *Parastol Res*; 103: 765-769.
99. **Schreiber N, Kobbe R, Adjei S, Adjei O, Klinkert MQ, May J, 2007:** Immune responses after single-dose sulphadoxine-pyrimethamine indicate underestimation of protective efficacy of intermittent preventive treatment in infants. *Trop Med Int Health*, 12:1157- 1163.
100. **Shah NK, Akler AP, Sem R, et al, 2008.** Molecular surveillance for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*, Cambodia. *Emerg Infect Dis*; 14:1637-40.
101. **Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, et al, 2001.** Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol*; 17:582-8
102. **Sirawaraporn W, Sathitkul T, Sirawaraporn R, et al, 1997.** Antifolateresistant mutants of Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1124-9.
103. **Slater AF et Cerami A, 1992.** Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* 355 (6356) : 167-169.
104. **Snow RW, Craig M, Deichmann U, Marsh K, 1999.** Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Health Organ*. 77:624–640.
105. **Stewart L, Gosling R, Griffin J, Gesase S, Campo J, et al, 2009.** Rapid Assessment of Malaria Transmission Using Age-Specific Sero-Conversion Rates. *PLoS ONE* 4(6): e6083. doi:10.1371/journal.pone.0006083
106. **Tish KN, Pillans PI, 1997.** Recrudescence of *Plasmodium falciparum* malaria contracted in Lombok, Indonesia after quinine/doxycycline and mefloquine: case report. *N Z Med J* :110: 255-6.
107. **Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Buddji A, Ndiaye P, Brahimi K, Faye D, Druilhe P, da Silva LP, 1994.** The Dielmo project: A longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51:123-137
108. **Triglia T, Cowman AF, 1994.** Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91:7149-53.
109. **Triglia T, Healer J, Caruana SR, Hodder AN, Anders RF, et al, 2000.** Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol*. 38:706–718.
110. **Triglia T, Menting JGT, Wilson C, et, 1997al.** Mutations of dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94: 13944-9.

111. **Triglia T. et Cowman A. F., 1999.** The mechanism of resistance to sulfa drugs in *Plasmodium falciparum*. *Drug resist update* ; 2 : 15-19 pp.
112. **WHO 2012:** Policy recommandation: Seasonal Malaria Chemoprevention (SMC) for *Plasmodium falciparum* malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-regions in Africa. WHO Global Malaria Programme, March 2012.
113. **WHO, 2010:** Guidelines for the treatment of malaria. Second edition. Geneva, Switzerland
114. **WHO, 2013,** seasonal malaria chemoprevention with sulfadoxine-pyrimethamine plus amodiaquine in children: A field guide; July 2013. ISBN 978 92 4 150473 7.
115. **Wongsrichanalai C, Meshnick SR, 2008.** Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis*; 14:716-9.
116. **Zhang Y, Meshnick SR, 1991.** Inhibition of *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthetase and growth in vitro by sulfa drugs. *Antimicrob Agents Chemother*; 35:267-71.