

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Phylogénie des <i>Plasmodium</i> des primates non humains (PNH) et de l'Homme .....	5
Figure 2 : Cycle biologique de <i>Plasmodium spp</i> .....	9
Figure 3 : Espèces d'Anophèles identifiées par régions au Sénégal .....	10
Figure 4 : Répartition géographique mondiale du paludisme .....	11
Figure 5 : Evolution de la morbidité et mortalité proportionnelles de 2015 à 2019 au Sénégal .....	12
Figure 6 : Evolution de la morbidité et de la mortalité proportionnelle chez les femmes enceintes au Sénégal de 2013 à 2019.....	15
Figure 7 : frottis mince et goutte épaisse avant et après coloration .....	16
Figure 8 : Différents résultats possible avec un TDR .....	17
Figure 9 : Evolution des indicateurs du TPI de 2015 à 2019 .....	21
Figure 10 : Régions ciblées (en couleur) par la campagne CPS au Sénégal.....	22
Figure 11 : Chronogramme de l'apparition de résistances à différentes molécules antipaludiques. ....	24
Figure 12 : Mécanisme d'action des antimétabolites.....	26
Figure 13 : Répartition géographique des zones de chloroquinorésistance .....	27
Figure 14 : Carte administrative du Sénégal.....	32
Figure 15 : Taux d'inoculation entomologique de deux espèces d'Anophèles dans des districts suivis. ....	33
Figure 16 : Réseau hydrographique de la région de Sédiou .....	34
Figure 17 : Façade extérieure du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Aristide Le Dantec .....	35
Figure 18 : Spots sanguins déposés sur du papier filtre .....	37
Figure 19 : Confettis de sang parasité dans un tube Eppendorf.....	37
Figure 21 : Appareil de HRM « LightCycler 96 ».....	39
Figure 23 : Plaque dans le réceptacle du LightCycler96 .....	40
Figure 22 : préparation de la plaque de réaction.....	40
Figure 24 : Aperçu de l'interface du logiciel LightCycler96 décrivant les étapes d'un programme de génotypage .....	41

Figure 25 : interface d'analyse et interprétation des courbes de fusion sur le logiciel « lightcycler96 Application » .....	42
Figure 26 : Variation de la fluorescence en fonction de la température .....	42
Figure 27 : Profil des courbes de fusion représentant les allèles sauvages (à droite) et les allèles mutants (à gauche).....	43
Figure 28 : Répartition de la population d'étude en fonction des tranches d'âge. .....	45
Figure 29 : Répartition des patientes en fonction du stade de la grossesse.....	45
Figure 30 : Prévalence des mutations combinées dans les différentes régions... 48	

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau Ia : Caractéristiques morphologiques des principales espèces pathogènes .....	6
Tableau II : Définition d'un paludisme à <i>P.falciparum</i> grave .....	14
Tableau III : Classification des principaux antipaludiques en fonction des stades parasitaires.....	18
Tableau IV : Mécanismes d'action et de résistance aux principaux antipaludiques.....	25
Tableau V : Médicaments antipaludiques et marqueurs de résistance associés.	30
Tableau VI : Séquence des amorces et sondes utilisées pour l'analyse des marqueurs .....	39
Tableau VII : Composantes et volumes du mélange réactionnel amorces-sonde .....	40
Tableau VIII : Différents contrôles sauvages et mutants spécifiques aux codons génotypés .....	41
Tableau IX : Prévalence des mutations au niveau des gènes <i>pfdhps</i> et <i>pfdhfr</i> . .	47

## **LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS**

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**An.** : *Anophèles*

**ANSO** : Agence Nationale pour la Statistique et la Démographie

**AQ** : Amodiaquine

**° C** : Degrés Celsius

**CPS** : Chimioprophylaxie du Paludisme Saisonnier

**CTA** : Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine

**DHFR** : Dihydrofolate réductase

**DHPS** : Dihydroptéroate synthétase

**ELISA**: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

**h**: heure

**HALD**: Hôpital Aristide le Dantec

**HRM**: High Resolution Melting

**HRP2**: Histidin Rich Protein 2

**IFI**: Immuno Fluorescence Indirecte

**L**: litre

**LAMP** : Loop mediated isothermal amplification

**LPM** : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie

**MILDA** : Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée d'Action

**mm** : millimètres

**ml** : millilitre

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**P. falciparum**: *Plasmodium falciparum*

**Pfcrt** : *P. falciparum Chloroquine Resistance Transporter*

**Pfdhfr** : *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase*

**Pfdhps** : *Plasmodium falciparum dihydropteroate synthase*

**Pfmdr 1:** *Plasmodium falciparum multidrug resistance 1*

**PLDH :** *Plasmodium lactate dehydrogenase*

**PNLP :** Programme National de Lutte contre le Paludisme

**QBC :** Quantitative Buffy Coat

**PSN :** Plan Stratégique National

**Spp :** *Sous espèce*

**µl :** Microlitre

**SP :** Sulfadoxine-Pyriméthamine

**TIE :** Taux d'inoculation Entomologique

**TDR:** Test de Diagnostic Rapide

**TPIg:** Traitement Préventif Intermittent pendant la grossesse

**WHO:** World Health Organisation

## **TABLE DES MATIÈRES**

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	v
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	vii
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	viii
<b>INTRODUCTION .....</b>	1
<b>CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LE PALUDISME ET LA RÉSISTANCE AUX MÉDICAMENTS ANTIPALUDIQUES.....</b>	4
<b>    SOUS-CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LE PALUDISME .....</b>	5
<b>        I.    Epidémiologie du paludisme .....</b>	5
<b>            I. 1. Agents pathogènes .....</b>	5
<b>                I. 1. 1. Classification .....</b>	5
<b>                I.1.2. Caractères morphologiques des principales espèces pathogènes.....</b>	5
<b>                I.1. 3. Cycle biologique du parasite .....</b>	7
<b>                    I. 1. 3.1. Chez l'homme .....</b>	7
<b>                    I. 1. 3. 2. Chez l'anophèle .....</b>	8
<b>            I. 2. Le vecteur .....</b>	9
<b>            I.3. Transmission du paludisme .....</b>	10
<b>                I.3.1. Modes de transmission .....</b>	10
<b>                I.3.2. Facteurs favorisants.....</b>	10
<b>            I.4. Répartition géographique du paludisme dans le monde .....</b>	11
<b>            I.5. Epidémiologie du paludisme au Sénégal.....</b>	11
<b>                I.5.1. Espèces responsables du paludisme .....</b>	11
<b>                I.5.2. Morbidité et mortalité du paludisme.....</b>	12
<b>        II.     Manifestations cliniques du paludisme .....</b>	12
<b>            II.2. Paludisme grave .....</b>	13
<b>            II.3. Paludisme et grossesse .....</b>	14
<b>        III. Immunité anti-palustre.....</b>	15

<b>IV. Diagnostic du paludisme .....</b>	15
<b>IV.1. Diagnostic clinique .....</b>	16
<b>IV.2. Diagnostic biologique.....</b>	16
<b>V. Traitement du paludisme .....</b>	17
<b>V.1. Classification des médicaments antipaludiques .....</b>	18
<b>V.2. Principe des combinaisons thérapeutiques antipaludiques .....</b>	19
<b>VI. Prophylaxie du paludisme .....</b>	19
<b>VI.1. Lutte antivectorielle .....</b>	19
<b>VI.2. La chimioprévention.....</b>	20
<b>VI.2.1. Le traitement préventif intermittent (TPI) chez la femme enceinte .....</b>	20
<b>VI.2.2. Chimioprophylaxie du paludisme saisonnier .....</b>	22
<b>VI.2.3. Chimioprophylaxie du voyageur .....</b>	22
<b>VII. Vaccination.....</b>	23
<b>SOUS-CHAPITRE II : GÉNÉRALITES SUR LA RÉSISTANCE AUX MÉDICAMENTS ANTIPALUDIQUES.....</b>	24
<b>I. Définition.....</b>	24
<b>II. Facteurs favorisants .....</b>	24
<b>III. Mécanismes de la chimiorésistance .....</b>	25
<b>III.1. Mécanisme de résistance aux antimétabolites : la Sulfadoxine-Pyriméthamine .....</b>	26
<b>III.1.1. La pyriméthamine .....</b>	26
<b>III.1.2. La Sulfadoxine .....</b>	26
<b>III.2. Mécanisme de résistance aux autres antipaludiques : les lysosomotropes...</b>	27
<b>III.2.1. La Chloroquine.....</b>	27
<b>III.2.2. L'Amodiaquine.....</b>	28
<b>III.2.3. La Luméfantrine .....</b>	28
<b>III.2.4. Les dérivés de l'Artémisinine .....</b>	28
<b>IV. Méthodes de surveillance de l'efficacité des antipaludiques.....</b>	28

<b>IV.1. Tests <i>in vivo</i> .....</b>	29
<b>IV.2. Tests <i>in vitro</i> .....</b>	29
<b>IV.3. Etude des marqueurs moléculaires de résistance .....</b>	29
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .....</b>	31
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....</b>	32
<b>I. Cadre d'étude .....</b>	32
<b>I.1. Région médicale de Kédougou .....</b>	32
<b>I.2. Région médicale de Kolda .....</b>	33
<b>I.3. Région Médicale de Sédiou.....</b>	34
<b>I.4. Région médicale de Tambacounda.....</b>	34
<b>II. Population d'étude.....</b>	36
<b>II.1. Critères d'inclusion .....</b>	36
Les patients inclus dans notre étude ont été sélectionnés selon les critères suivants : .....	36
<b>II. 2. Critères de non-inclusion .....</b>	36
<b>II.3. Considération éthique .....</b>	36
<b>III. Méthodologie.....</b>	36
<b>III.1. Extraction de l'ADN parasitaire .....</b>	37
<b>III.2. Génotypage par High Resolution Melting (HRM).....</b>	38
<b>III.2.1. Principe .....</b>	38
<b>III.2.2. Mode opératoire.....</b>	38
<b>III.2.3. Analyse et interprétation des résultats .....</b>	41
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	44
<b>I. Résultats.....</b>	45
<b>I.1 Caractéristiques de la population d'étude.....</b>	45
<b>I.2. Prévalence des mutations au niveau des marqueurs moléculaires spécifiques ...</b>	46
<b>I.2.1. Prévalence des mutations au niveau des codons 437, 540, 581 du gène <i>Pfdhps</i></b>	46
<b>I.2.1.1. Au niveau du codon 437 .....</b>	46
<b>I.2.1.2. Au niveau du codon 581 .....</b>	46
<b>I.2.1.3. Au niveau du codon 540 .....</b>	46

<b>I.2.2. Prévalence des mutations au niveau des codons 108, 51, 59 et 164 du gène</b>	
<i>Pfdhfr</i> .....	46
<b>I.2.2.1. Au niveau du codon 108 .....</b>	46
<b>I.2.2.2. Au niveau du codon 51 .....</b>	47
<b>I.2.2.3. Au niveau du codon 59 .....</b>	47
<b>I.2.2.4. Au niveau du codon 164 .....</b>	47
<b>I.3. Prévalence des mutations combinées dans les régions de Kolda, Kédougou, Sédiou et Tambacounda .....</b>	47
<b>II. Discussion .....</b>	49
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	52
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	54

## **INTRODUCTION**

Le paludisme est une parasitose grave potentiellement mortelle causée par un protozoaire du genre *Plasmodium* et transmise à l'Homme par piqûre d'anophèle femelle. Des cinq espèces qui infectent l'Homme, *Plasmodium falciparum* est la plus redoutable car responsable des formes cliniques graves et de la majorité de la mortalité associée au paludisme (1). Bien que d'importants moyens pour le traitement et la prévention soient mis en œuvre, le paludisme continue de demeurer un problème de santé publique à l'échelle mondiale.

En 2019, on estime à 229 millions le nombre de cas recensés et à 409000 le nombre de décès imputables au paludisme dans le monde. La même année, 94% des cas et des décès ont été enregistrés en Afrique (2).

Parmi les groupes de population les plus susceptibles d'être gravement atteints on retrouve les jeunes enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes, dont près de 11,6 millions vivant en Afrique sub-saharienne ont été exposées à une infection palustre en 2019. Ces dernières ont donné naissance à environ 822 000 enfants présentant un faible poids à la naissance. L'Afrique de l'Ouest a enregistré la plus forte prévalence d'insuffisance pondérale chez le nouveau-né liée au paludisme pendant la grossesse (3).

Dans le cadre de la prévention du paludisme chez les femmes enceintes vivant en zone d'endémie, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) recommande la mise en œuvre d'un protocole thérapeutique complet d'antipaludiques administrés lors de visites prénatales systématiques, indépendamment de la présence de ladite infection chez la bénéficiaire. Ainsi chaque femme, à partir de la 16<sup>ème</sup> semaine de grossesse, doit recevoir au moins 3 doses de sulfadoxine-pyriméthamine chacune à au moins un mois d'intervalle, celle-ci pouvant être administrée sans danger jusqu'à l'accouchement. Le traitement préventif intermittent (TPI) a pour objectifs de réduire : les épisodes de paludisme chez la mère, l'anémie maternelle et fœtale, la parasitémie placentaire, le risque de faible poids de naissance et la mortalité néonatale. Sur 36 pays africains ayant communiqué des données de couverture en TPI en 2018, 31% des femmes enceintes éligibles ont reçu au moins trois doses de SP contre 22% en 2017 et 2% en 2010 (3).

Au Sénégal, le TPI mis en place par le PNLP depuis 2003 commence à porter ses fruits. Selon de récentes statistiques, de 2015 à 2019, les indicateurs de couverture en TPI chez les femmes enceintes ont connu une évolution favorable. La couverture en TPI 2 est ainsi

passée de 70% en 2015 à 71% en 2019 ; la couverture en TPI 3 a augmenté de 25,5% en passant de 42% en 2015 à 53,6% en 2019. De ce fait, une réduction significative de 46,6% de la morbidité proportionnelle palustre chez les femmes enceintes a été enregistrée passant ainsi de 1,90% en 2015 à 1,01% en 2019. Dans la même tendance, la mortalité proportionnelle palustre chez les femmes enceintes est passée de 1,90% en 2015 à 0,68% en 2019 marquant ainsi une diminution de 64% (4). Outre le TPI, le PNLP a décliné depuis sa création en 1995, plusieurs plans quinquennaux à partir desquels différentes interventions ont été menées, allant du retrait de la chloroquine en 2003 à l'introduction des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) en 2006, suivie des pulvérisations intra-domiciliaires en 2007, de même que les tests de diagnostic rapide (TDR) ; Puis l'adoption de la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) en 2014, en passant par la couverture universelle en moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) en 2013 (5).

Malgré les efforts déployés pour la découverte de médicaments antipaludiques efficaces, l'espèce *P. Falciparum* en particulier, s'adapte et développe des résistances. Cela peut s'expliquer non seulement par la grande diversité génétique du parasite et l'apparition spontanée de mutations, mais également par des facteurs extérieurs tels que la pression médicamenteuse, l'automédication, la consommation de produits contrefaits sous-dosés, etc. C'est pourquoi les stratégies de contrôle du paludisme doivent nécessairement prendre en compte le phénomène de résistance qui constitue une menace sérieuse susceptible d'entraver le chemin vers l'élimination du paludisme. Ainsi l'OMS, considère la surveillance du paludisme comme une intervention de base et recommande de ce fait aux pays d'endémie palustre de procéder à une surveillance régulière des marqueurs moléculaires de résistance afin de pouvoir ajuster les politiques en matière de traitement et de prévention (4).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés de réaliser cette étude dont l'objectif général est de contribuer à la surveillance des marqueurs moléculaires associés à la résistance aux molécules antipaludiques utilisées au Sénégal avec pour objectifs spécifiques :

- Déterminer la prévalence des mutations ponctuelles au niveau des gènes *Pfdhps* et *Pfdhfr* associés à la résistance à la Sulfadoxine-Pyriméthamine utilisée dans le TPI, dans des isolats de *P. falciparum* obtenus à partir de prélèvements de sang chez des femmes enceintes impaludées au Sénégal.
- Déterminer la prévalence des mutations combinées *Pfdhfr/Pfdhps* dans ces isolats.

Notre travail s'articule ainsi autour de trois grands chapitres :

- 1<sup>er</sup> Chapitre : généralités sur le paludisme et la résistance aux antipaludiques.
- 2<sup>ème</sup> Chapitre : matériel et méthodes.
- 3<sup>ème</sup> Chapitre : résultats et discussion.

## **CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LE PALUDISME ET LA RÉSISTANCE AUX MÉDICAMENTS ANTIPALUDIQUES**

## Sous-chapitre I : GÉNÉRALITÉS SUR LE PALUDISME

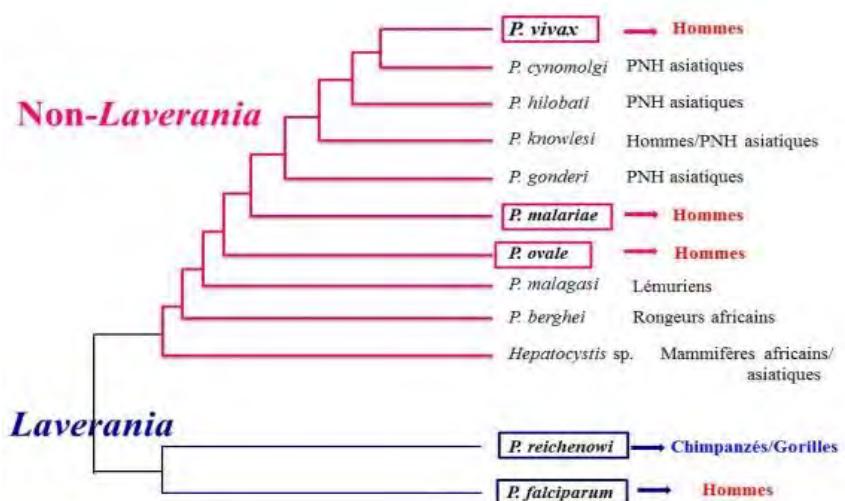
### I. Epidémiologie du paludisme

#### I. 1. Agents pathogènes

##### I. 1. 1. Classification

Le parasite est un protozoaire appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoa*, à l'ordre des *Haemosporidae*, à la famille des *Plasmodiidae* et au genre *Plasmodium*. Cet embranchement est caractérisé morphologiquement par la présence d'un complexe apical constitué d'un ensemble d'organites qui interviennent dans la mobilité et les processus d'invasion du parasite (6).

Cinq espèces de *Plasmodium* sont retrouvées en pathologie humaine : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*. *P. falciparum* et *P. vivax* sont les plus prévalents ; cependant *P. falciparum* reste l'espèce la plus redoutable. *P. knowlesi* est une espèce zoonotique qui peut infecter aussi bien l'Homme que le singe (1).



**Figure 1 :** Phylogénie des *Plasmodium* des primates non humains (PNH) et de l'Homme (7)

##### I.1.2. Caractères morphologiques des principales espèces pathogènes

La morphologie du *Plasmodium* varie selon l'espèce et le stade de développement. Les tableaux Ia et Ib suivants donnent une description des aspects évolutifs des principales espèces pathogènes.

**Tableau Ia :** Caractéristiques morphologiques des principales espèces pathogènes (8)

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
<b>JEUNE TROPHOZOÏTE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Petits anneaux délicats.</li> <li>Petit grain de chromatine relié à la bande de cytoplasme.</li> <li>La chromatine peut être double ou triple.</li> <li>Formes accolées.</li> <li>On peut en retrouver plus d'un dans les globules rouges.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Petits anneaux compacts présentant ou non une petite vacuole.</li> <li>Chromatine plus grosse.</li> <li>Formes en bande occasionnelles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Petits anneaux avec une vacuole claire et 1 ou 2 grains de chromatine.</li> <li>Ont tendance à présenter une forme amiboïde.</li> <li>Peuvent contenir de faibles granulations.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Petits anneaux réguliers avec une vacuole claire.</li> <li>Ressemblent à <i>P. malariae</i>.</li> </ul>
<b>TROPHOZOÏTE EN CROISSANCE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anneaux semblables aux jeunes trophozoïtes mais plus gros.</li> <li>Le cytoplasme forme un anneau complet et la chromatine se retrouve souvent dans la vacuole.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Forme régulière sauf pour les formes en bande.</li> <li>Vacuole présente ou absente.</li> <li>Le pigment peut être retrouvé dans le cytoplasme.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NOMBREUSES formes amiboïdes avec une grosse vacuole.</li> <li>Cellules infectées agrandies et de forme bizarre</li> <li>Granulations abondantes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Forme régulière.</li> <li>Cellules infectées sensiblement agrandies.</li> <li>Granulations abondantes.</li> </ul>
<b>TROPHOZOÏTE ÂGÉ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Occupent souvent les 2/3 de la cellule.</li> <li>Pigment noir évident.</li> <li>Vacuole petite ou absente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Taille moyenne et de forme régulière.</li> <li>Occupent toute ou presque toute la cellule.</li> <li>Petite vacuole présente ou absente.</li> <li>Pigment noir évident.</li> <li>Granulations rarement visibles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Occupent presque toute la cellule.</li> <li>Vacuole importante ou presque absente.</li> <li>Granulations et pigment noir évidents.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Légèrement plus gros que <i>P. malariae</i> au même stade.</li> <li>Forme régulière.</li> <li>N'occupent pas plus des 2/3 de la cellule agrandie.</li> <li>Granulations et pigment noir évidents.</li> </ul>
<b>SCHIZONTES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rarement observés. Leur présence indique une infection sévère.</li> <li>Lorsque présents, petits et immatures, avec 2-4 merozoïtes et des agrégats de pigment.</li> <li>À maturité, les merozoïtes sont disposés de façon irrégulière: 8 à 40, généralement entre 16 et 24.</li> <li>Pigment : masse noire ou brun doré unique.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Occupent souvent toute la cellule hôte.</li> <li>Présence de 8 à 12 merozoïtes, généralement 8 ou 10.</li> <li>Formes en rosette fréquentes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Occupent généralement toute la cellule agrandie; des formes plus petites peuvent être observées.</li> <li>Les formes à maturité ont 12 à 24 merozoïtes, généralement 14 ou 20.</li> <li>Pigment brun doré présent en amas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plus gros que <i>P. malariae</i>.</li> <li>N'occupent pas plus des 2/3 de la cellule agrandie.</li> <li>Pigment brun doré présent généralement en amas.</li> <li>Merozoïtes disposés de façon irrégulière : 6 à 12, généralement 10.</li> <li>Granulations abondantes.</li> </ul>

**Tableau I b :** Caractéristiques morphologiques des principales espèces pathogènes (**suite et fin**) (8)

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
<b>GAMÉTOCYTES IMMATURES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rarement observés dans la circulation périphérique, seulement rencontrés dans les infections sévères.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ne peuvent se distinguer des trophozoïtes âgés.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semblables aux trophozoïtes âgés, mais absence de vacuole et chromatine plus grosse.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semblables aux trophozoïtes âgés.</li> </ul>
<b>GAMÉTOCYTES FEMELLES (macro)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Formes en croissant ou en saucisse.</li> <li>Coloration plus foncée ou plus bleue, noyau central plus compact, entouré de pigments.</li> <li>Cellule hôte étirée en forme de croissant.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Difficiles à distinguer des trophozoïtes âgés.</li> <li>Occupent toute la cellule.</li> <li>Noyau en périphérie.</li> <li>Coloration plus foncée.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gros, occupent toute ou presque toute la cellule.</li> <li>Coloration plus foncée que pour le mâle, noyau compact en périphérie.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Parasites plus petits, n'occupent pas toute la cellule agrandie.</li> <li>Souvent difficiles à distinguer de <i>P. vivax</i>.</li> </ul>
<b>GAMÉTOCYTES MÂLES (micro)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Formes similaires mais croissant moins accentué que pour la femelle.</li> <li>Chromatine diffuse dans le cytoplasme.</li> <li>Plus rouge que la femelle, bleu en périphérie.</li> <li>Pigment plus diffus.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Chromatine diffuse retrouvée au centre.</li> <li>Couleur rouge brique au centre.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semblables aux gamétoctyes femelles mais chromatine diffuse, plus centrale.</li> <li>Rouge au centre, bleu en périphérie.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Chromatine diffuse retrouvée au centre.</li> <li>Semblables à <i>P. vivax</i>.</li> </ul>
<b>APPARITION DANS LE SANG</b>	7-12 jours	7-14 jours	3-5 jours	12-24 jours

### I.1.3. Cycle biologique du parasite

Le cycle de développement des plasmodes fait intervenir 2 hôtes (dixène) avec une phase asexuée qui se déroule chez l'Homme qui est l'hôte intermédiaire et une phase sexuée qui se déroule chez l'anophèle qui est l'hôte définitif (Figure 2).

#### I. 1.3.1. Chez l'homme

La phase asexuée fait intervenir 2 stades : le stade pré-érythrocytaire (phase intra-hépatique) et le stade érythrocytaire.

- **Stade pré-érythrocytaire**

Lors d'un repas sanguin chez l'Homme, l'anophèle femelle infestée inocule des sporozoïtes dans le sang. A travers les vaisseaux, ils sont acheminés vers le foie où ils envahissent les hépatocytes. Une fois à l'intérieur de l'hépatocyte, le parasite se multiplie par schizogonie et donne des schizontes hépatiques (30-40). La rupture de schizontes mûrs conduit à la libération de mérozoïtes qui passent dans la circulation sanguine et infectent les hématies.

Cette étape asymptomatique dite phase d'incubation, dure sept à quinze jours (9).

Pour les espèces *P. vivax* et *P. ovale*, certains parasites peuvent rester dans le foie sous une forme quiescente appelée « hypnozoïte » durant des semaines voire des mois ou des années. Ces formes hypnozoïtes pourront être responsables d'accès de reviviscence (10).

- **Stade érythrocytaire**

Les merozoïtes hépatiques ainsi libérés passent dans le sang et envahissent les érythrocytes. Une fois dans l'hématie, le merozoïte se transforme en trophozoïte qui à maturité forme un schizonte endoérythrocytaire ; le schizonte mature se lyse et libère de nouveaux merozoïtes qui vont infecter d'autres hématies : c'est le cycle endoérythrocytaire. Il dure 48h chez *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* et 72h chez *P. malariae*. La libération des merozoïtes suite à l'éclatement des hématies est à l'origine des manifestations cliniques de la maladie (11).

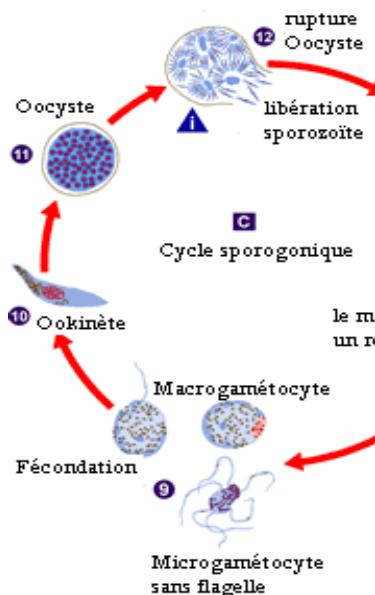
Au cours de ces cycles successifs d'invasion de nouveaux érythrocytes et de libération de merozoïtes, certains parasites se différencient en gamétocytes mâles ou femelles. L'engagement vers la différenciation sexuelle semble être déclenché par le surpeuplement parasitaire, un stress métabolique ou par traitement antipaludique (9).

### I. 1. 3. 2. Chez l'anophèle

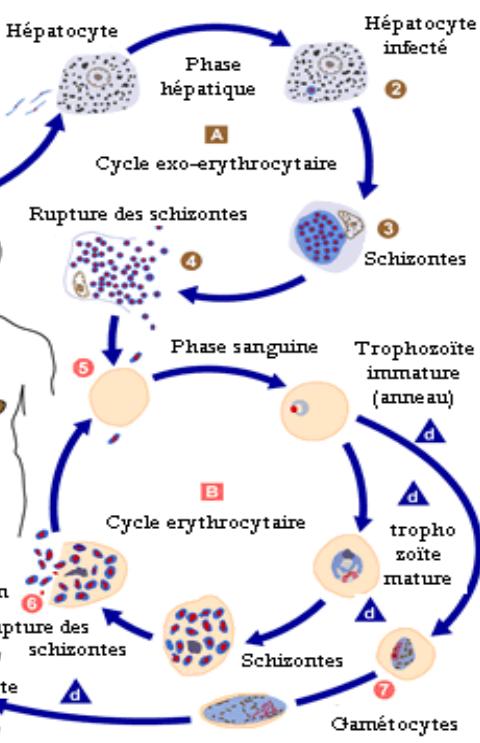
Lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté, l'anophèle femelle ingère du sang contenant des gamétocytes mâle et femelle et s'infeste à son tour. La fécondation se fait dans le tractus digestif et donne un ookinète qui se transforme dans la paroi de l'estomac en oocyste puis en sporocyste. Le sporocyste éclate, libère des sporozoïtes qui migrent jusqu'aux glandes salivaires du moustique et seront injectés à un nouvel individu lors d'une prochaine piqûre (12).

**▲** = Etape infectieuse  
**d** = Etape diagnostique

### Etape de l'anophèle



### Etape humaine

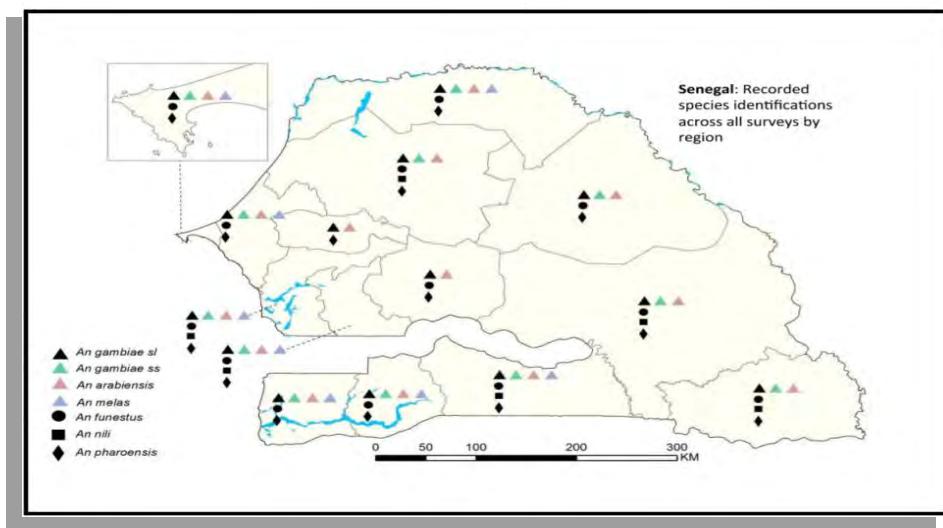


**Figure 2 :** Cycle biologique de *Plasmodium spp* (13).

## I. 2. Le vecteur

Le vecteur du paludisme est un moustique femelle appartenant au genre *Anopheles*. Les anophèles appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, à la classe des Insectes, à l'ordre des Diptères, à la famille des *Culicidae* et à la sous-famille des *Anophélinae*. Plus de 400 espèces d'anophèles sont à ce jour décrites, environ une soixantaine sont des vecteurs du paludisme et une vingtaine sont responsables de la plupart des cas (14).

Au Sénégal, *An. gambiae* est présente dans tout le pays avec une prédominance dans les zones humides du Sud tandis que l'espèce *An. Arabiensis* également représentée dans toutes les régions est prédominante dans les zones sèches, du Centre et du Nord. *An. melas* est localisée sur le Littoral dans la mangrove et le long de certains cours d'eau. *An. pharoensis* est surtout abondante dans la basse vallée du fleuve Sénégal au Nord (5).



**Figure 3 :** Espèces d’Anophèles identifiées par régions au Sénégal (5)

Le cycle biologique de l’anophèle comprend deux (2) phases :

- ✓ Une phase aquatique pour les stades immatures : œuf, larves (4 stades larvaires entrecoupés chacun d'une mue) et nymphe.
- ✓ Une phase aérienne pour le stade adulte avec des mâles et des femelles. Le mâle se nourrit exclusivement de jus sucrés tandis que la femelle est essentiellement hématophage.

Les anophèles piquent habituellement la nuit, du crépuscule au lever du soleil et se reproduisent dans des nappes d'eau douce peu profondes et stagnantes comme les flaques d'eau, les marigots, les rizières (12).

### I.3. Transmission du paludisme

#### I.3.1. Modes de transmission

Le paludisme peut être transmis à l'Homme de différentes manières, la plus répandue est l'inoculation des parasites par l'anophèle femelle infestée au cours de son repas sanguin. Le parasite peut également être transmis par voie congénitale de la mère au fœtus à travers le sang placentaire chez une femme enceinte porteuse du parasite ou par transfusion sanguine à partir d'un donneur plus ou moins anciennement infesté.

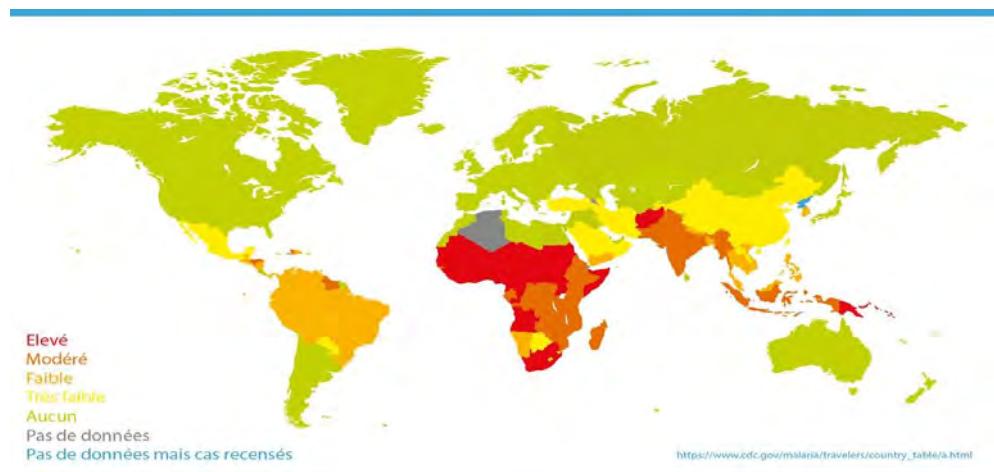
#### I.3.2. Facteurs favorisants

Plusieurs facteurs contribuent à la transmission du paludisme : la présence du vecteur, l'écosystème : la température optimale pour le cycle de développement du vecteur se situe

entre 18°C et 35°C, l'abondance des précipitations favorisent la création de gites larvaires, l'humidité et le couvert végétal propices à la survie de l'anophèle (15).

#### I.4. Répartition géographique du paludisme dans le monde

La transmission du paludisme est élevée dans toute la zone intertropicale entre le 30° de latitude Nord et le 30° de latitude Sud. La figure 4 ci-dessous montre la répartition du paludisme à travers le monde.



**Figure 4 :** Répartition géographique mondiale du paludisme (13)

#### I.5. Epidémiologie du paludisme au Sénégal

Le Sénégal est un pays situé sur la pointe extrême Occidentale du continent africain entre 12,5° et 16,5° de Latitude Nord et 12° et 17° de Longitude Ouest. Il abrite un grand nombre d'écosystèmes différents et la transmission du paludisme est depuis de nombreuses années étroitement liée au rythme des pluies. Cette période correspond à celle de forte densité des populations vectorielles. De façon générale les pluies commencent entre juin et juillet, plus tôt au Sud qu'au Nord et se poursuivent jusqu'en octobre. Le pic de transmission se trouve entre les mois d'octobre et novembre (5).

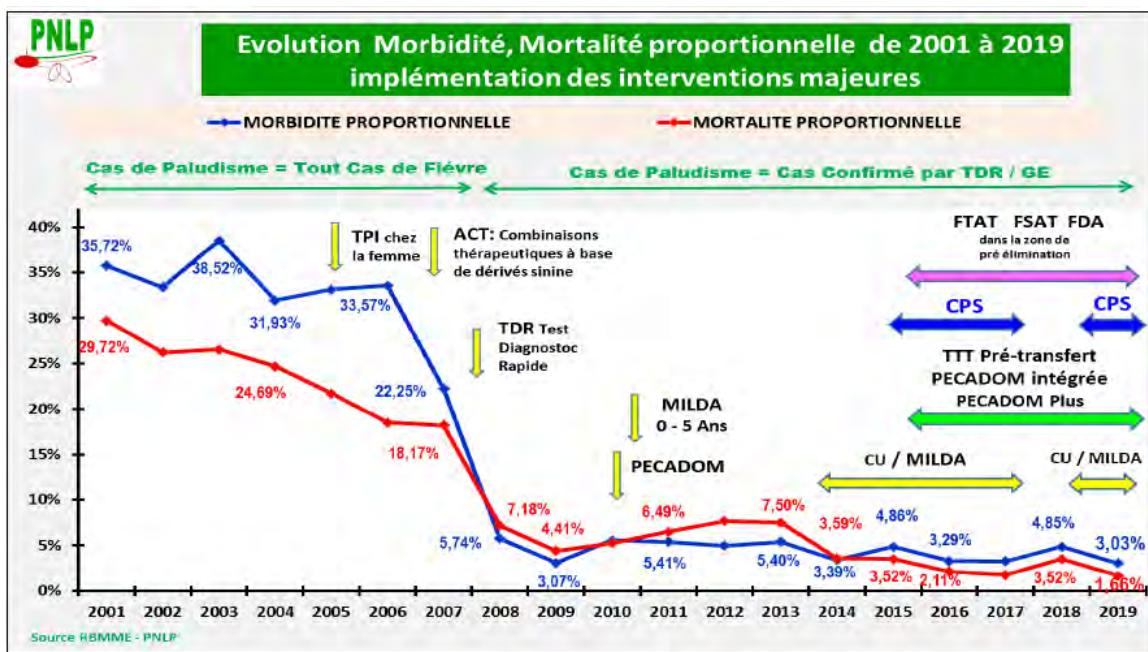
##### I.5.1. Espèces responsables du paludisme

L'espèce *P. falciparum* est la plus répandue, pratiquement partout en Afrique. Elle est à l'origine de près de 98 % des cas de paludisme au Sénégal. *P. falciparum* est la seule espèce responsable des formes graves susceptibles d'entrainer des décès. D'autres espèces existent au

Sénégal, il s'agit de *P. malariae* et *P. ovale wallikeri* qui représentent environ 2% des cas. *P. vivax* et *P. knowlesi* n'ont pas encore été formellement identifiées au Sénégal (16 ; 17).

### I.5.2. Morbidité et mortalité du paludisme

Avec l'implémentation progressive et l'intensification des interventions à haut impact (figure 5), une baisse régulière de la morbidité et de la mortalité palustres a été enregistrée au Sénégal. Ainsi, la morbidité proportionnelle palustre est passée de 4,86% en 2015 à 3,03% en 2019 soit une réduction de 37,6% et la mortalité proportionnelle palustre est passée de 3,52% en 2015 à 1,66% en 2019 soit une réduction de 52,7% (4).



**Figure 5 :** Evolution de la morbidité et mortalité proportionnelles de 2015 à 2019 au Sénégal (4)

## II. Manifestations cliniques du paludisme

Le paludisme est une affection fébrile aigue. Les symptômes apparaissent généralement une dizaine de jour après la piqûre infectieuse chez des sujets non immuns, la période d'incubation pouvant être beaucoup plus longue chez des sujets ayant acquis un certain degré d'immunité.

## **II.1. Paludisme simple**

Après une période d'incubation de durée variable selon l'espèce, le malade entre dans une phase d'invasion. Celle-ci débute de façon brutale par des frissons associés à une sensation de malaise général, suivis en quelques heures d'une fièvre élevée supérieure à 39°C. Ces symptômes sont généralement accompagnés de céphalées, sueurs profuses, myalgies et de troubles digestifs (diarrhée, vomissements). Ces signes caractérisent l'accès de primo-invasion chez des sujets non immuns ; chez des sujets ayant une prémunition, ces symptômes peuvent être absents. Par ailleurs, il existe des accès intermittents qui se caractérisent par des frissons, de la chaleur, des sueurs ; ces accès peuvent se répéter tous les 2 jours : fièvre tierce maligne à *P.falciparum* ou bénigne à *P.vivax* et *P.ovale* ou tous les 3 jours : fièvre quarte bénigne à *P.malariae* (7 ; 8).

## **II.2. Paludisme grave**

Il est dû à *P. falciparum* essentiellement. Il touche le plus souvent les sujets non immuns c'est-à-dire les jeunes enfants en zone d'endémie, les femmes enceintes, les voyageurs, les expatriés. Le paludisme grave peut être pernicieux (atteinte cérébrale) ou non. L'accès pernicieux ou neuropaludisme peut avoir un début brutal ou progressif. Le paludisme grave pernicieux se caractérise par les signes énumérés dans le **tableau II** suivant.

**Tableau II : Définition d'un paludisme à *P.falciparum* grave (18)**

<b>Présence de formes sexuées de <i>Plasmodium falciparum</i> dans le sang (GE et frottis positifs) et d'une ou plusieurs des manifestations suivantes</b>	
01	Neuropaludisme. (coma stade II ou plus)
02	Crises convulsives généralisées répétées (plus de 2 / 4 heures, plus de 15 mn de phase post-critique)
03	Anémie grave (hémoglobine < 6g / dl. Et hématocrite < 20%)
04	Insuffisance rénale (diurèse < 400 ml ou 12 ml / kg / 24h ; créatininémie > 265 µmol / l)
05	Œdème pulmonaire (ou syndrome de détresse respiratoire)
06	Hypoglycémie (< 2 mmol / l ou 0,4 g / l)
07	Collapsus respiratoire
08	Hémorragie diffuse (ou CIVD)
09	Hémoglobinurie massive
10	Acidose sanguine (pH artériel < 7,25 ou bicarbonates < 15 mmol / l)
11	Obnubilation ou prostration (coma stade I)
12	Parasitémie élevée (> 5% chez un sujet non immun)
13	Ictère clinique
14	Hyperthermie (> 41°C) ou hypothermie (< 36°C)

La présence d'un seul de ces critères cliniques ou biologiques associés à la présence de *P. falciparum* dans le sang fait porter le diagnostic d'accès palustre grave (19).

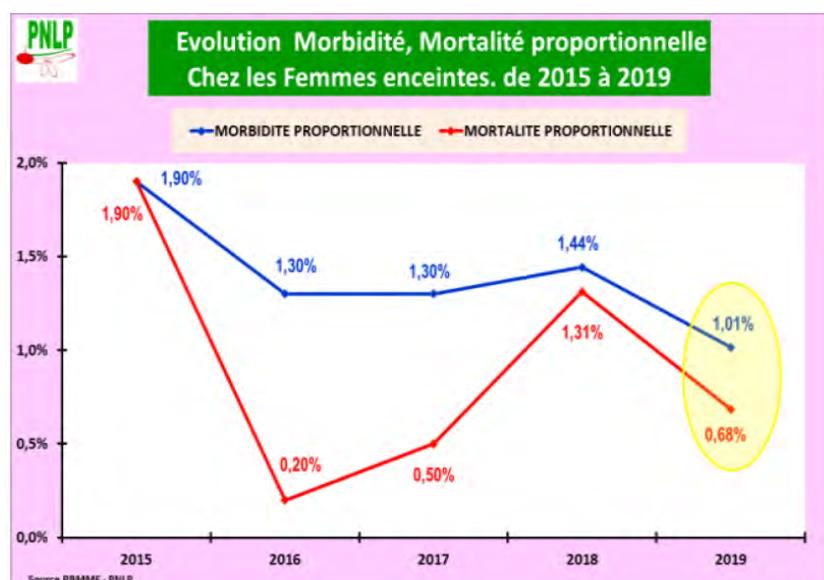
### **II.3. Paludisme et grossesse**

Les symptômes et les complications liés au paludisme pendant la grossesse varient en fonction de l'intensité de la transmission palustre dans une zone géographique donnée, ainsi que du niveau individuel de prémunition.

- Dans les zones de forte transmission, où les niveaux de prémunition (immunité acquise) ont tendance à être élevés, l'infection par l'espèce *P. falciparum* est habituellement asymptomatique pendant la grossesse. Toutefois, les plasmodes peuvent être présentes dans le placenta, atteindre le fœtus et contribuer à une anémie maternelle même en l'absence d'une parasitémie périphérique avérée. Dans ces mêmes zones, les effets indésirables d'une infection par *P. falciparum* pendant la grossesse sont plus prononcés chez les femmes primigestes.
- Dans des environnements de faible transmission, où les femmes en âge de procréer ont une immunité acquise relativement faible contre le paludisme, une infection palustre pendant la grossesse est associée à une anémie prononcée, un risque accru de

paludisme grave, et peut provoquer un avortement spontané, une mortinaissance, une prématurité et un faible poids de naissance (11).

Au Sénégal, entre 2015 et 2019 la morbidité et la mortalité proportionnelles palustres chez les femmes enceintes ont connu des réductions significatives respectives de 46,6% et de 64% (4).



**Figure 6 :** Evolution de la morbidité et de la mortalité proportionnelle chez les femmes enceintes au Sénégal de 2013 à 2019 (4).

### III. Immunité anti-palustre

Il est courant d'observer chez des individus vivant en zone d'endémie une certaine résistance au paludisme, il s'agit de prémunition. Elle s'acquiert progressivement et lentement (6 à 15 ans) en situation d'exposition continue mais n'empêche pas d'être de nouveau contaminé et ne permet pas de se débarrasser totalement du parasite. En revanche elle évite la survenue de formes cliniques graves. Cela explique que, en zone de transmission intense, les jeunes enfants payent le plus lourd tribut à la maladie (lorsque la protection maternelle transmise diminue). L'immunité anti-palustre est transmissible (nouveau-nés) ; en revanche elle n'est jamais totale et définitive (20 ; 21).

### IV. Diagnostic du paludisme

Le diagnostic du paludisme est une urgence. Tout accès palustre survenant chez un sujet non immun peut évoluer en quelques heures vers un paludisme grave potentiellement mortel. Tous

les cas cliniquement suspects doivent faire l'objet d'un examen parasitologique pour confirmer le diagnostic et permettre une prise en charge rapide et efficace de la maladie (22).

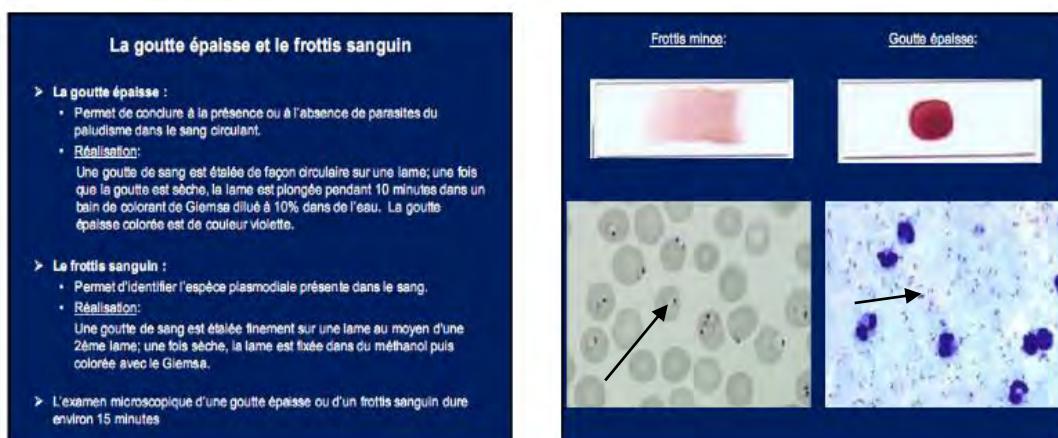
#### IV.1. Diagnostic clinique

Les signes cliniques accompagnant un accès palustre simple sont très variables et peuvent être les mêmes que ceux décrits dans certaines pathologies telles que la grippe, la méningite. De façon générale, le malade présente les symptômes suivants : fièvre, maux de tête, myalgies, perte d'appétit, diarrhée, vomissements.

#### IV.2. Diagnostic biologique

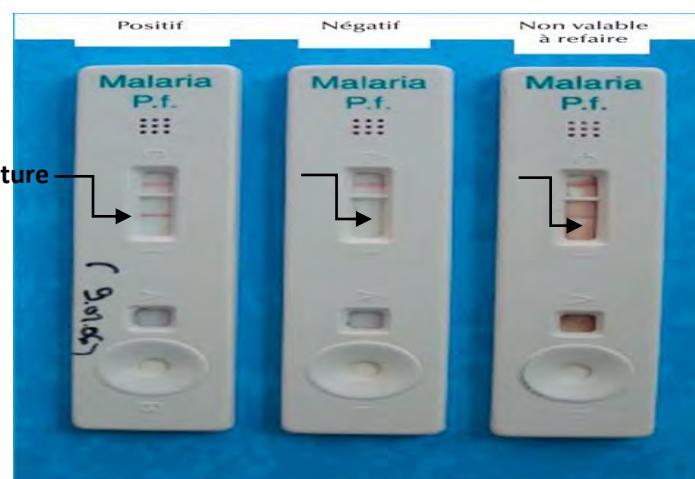
Il permet de mettre en évidence la présence du parasite, de son ADN ou de ses antigènes par des techniques de diagnostic direct (Goutte épaisse, frottis mince, TDR, PCR, Illumigen malaria) ou de détecter des anticorps spécifiquement dirigés contre le parasite par des méthodes de diagnostic indirect (ELISA, IFI).

➤ **La goutte épaisse et le frottis mince** (Figure 7) représentent les techniques de référence. Ce sont les méthodes microscopiques les plus utilisées du fait de leur simplicité, de leur faible coût, leur capacité à détecter des parasites, à les identifier et à les quantifier. La sensibilité de ces méthodes est relative et dépend en grande partie de l'opérateur. Les limites de détection varient de 10 à 20 parasites/ $\mu\text{l}$  de sang pour la goutte épaisse et de 100 à 200 parasites/ $\mu\text{l}$  de sang pour le frottis mince (23).



**Figure 7 :** frottis mince et goutte épaisse avant et après coloration (24)

➤ Le TDR est un dispositif qui détecte un antigène plasmodial dans une petite quantité de sang (environ 5µl), par dosage immuno-chromatographique avec des anticorps monoclonaux. Ces derniers sont dirigés contre l'antigène du parasite cible et imprégnés sur une bande de test. Le résultat apparaît sous forme de bande colorée au bout de 5 à 20 minutes (figure 8). Les antigènes plasmodiaux couramment ciblés sont le HRP-2 (histidine rich protein 2), la pLDH (*Plasmodium* lactate déshydrogénase), et l'aldolase. Le TDR n'exige aucun investissement en capital ou en électricité. Il est simple à réaliser et facile à interpréter. Son utilisation présente un intérêt particulier sur le terrain, dans les zones ayant un accès limité à des services d'examen microscopique de bonne qualité (25).



**Figure 8 :** Différents résultats possible avec un TDR (24)

Par ailleurs il existe d'autres techniques biologiques dont certaines sont beaucoup plus sensibles mais de complexité variable : la PCR (Polymerase Chain Reaction), Illumigen-Malaria LAMP (Loop mediated isothermal amplification), ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), Immunofluorescence indirecte (IFI).

## V. Traitement du paludisme

Le paludisme est une maladie évitable et traitable. L'objectif premier du traitement est d'obtenir la guérison complète, c'est-à-dire l'élimination rapide et totale des plasmodes dans le sang du patient, pour éviter qu'un paludisme simple n'évolue vers une forme grave

potentiellement mortelle. Du point de vue de la santé publique, le traitement a pour but de réduire la transmission de l'infection en diminuant le réservoir infectieux.

### V.1. Classification des médicaments antipaludiques

Les antipaludiques peuvent être classés en fonction des stades parasitaires sur lesquels ils agissent ; on distingue :

- Les schizonticides actifs sur les formes endo-érythrocytaires du cycle schizogonique. Ils regroupent les schizonticides d'action rapide (amino 4-quinoléine, amino-alcools, dérivés de l'artémisinine), les antimétabolites d'action plus lente et plus accessoirement certains antibiotiques (sulfonamides).
- Les gamétocytocides qui inhibent la transformation des gamétoocytes et bloquent la transmission de l'espèce plasmodiale. Ils sont partiellement actifs sur les parasites intra-hépatiques. Ils sont représentés essentiellement par la tafénoquine et la primaquine dont la toxicité limite l'utilisation (26).

**Tableau III :** Classification des principaux antipaludiques en fonction des stades parasitaires (27)

SCHIZONTICIDES						
		Action rapide	Action lente (antimétabolite)			Antibiotiques
Amino-4 quinoléines	Amino- alcools	Sesquiterpènes	Antifoliques	Antifoliniques	Naphtoquinone	Antibiotiques
Chloroquine	Méfloquine	Artéméther	Sulfadoxine	Pyriméthamine	Atovaquone	Doxycycline
Amodiaquine	Halofantrine	Artésunate		Proguanil		
	Alcaloïdes de la quinine	Artéminol				
GAMETOCYDES (Amino-8-quinoléines)						
Primaquine (ATU)						

## V.2. Principe des combinaisons thérapeutiques antipaludiques

Les combinaisons thérapeutiques antipaludiques consistent à utiliser simultanément deux ou plusieurs schizonticides sanguins ayant des modes d'action indépendants et donc des cibles biochimiques différentes chez le parasite. Ces dernières décennies, à la suite de l'apparition de résistances à plusieurs antipaludiques utilisés en monothérapie (chloroquine, amodiaquine, mèfloquine) les pays d'endémie palustre ont adopté sur recommandation de l'OMS des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). Ce sont, actuellement, les antipaludéens les plus efficaces, recommandés dans le traitement de l'accès palustre simple à *P.falciparum*. Parmi les CTA disponibles au Sénégal nous avons :

- Arthéméter-Luméfantrine : **COARTEM®**
  - Artésunate-Amodiaquine : **COARSUCAM®**
  - Dihydroartémisinine-Pipéraquine : **MALACUR®, DUO-COTEXIN®**
  - Artésunate-Mèfloquine : **ARTEQUIN®**
  - Artésunate- sulfaméthoxypyrazine/Pyriméthamine : **CO-ARINATE FDC®**
- CTA  
recommandées en  
1<sup>ère</sup> intention par le  
PNLP pour le  
traitement du  
paludisme simple  
**(5)**

Concernant le paludisme à *P.vivax*, la chloroquine pendant 3 jours reste le traitement de référence dans les zones où la chloroquinorésistance n'a pas été signalée (28).

En cas de paludisme grave, il est impératif qu'un traitement efficace par voie parentérale (injection intra-veineuse ou intra-musculaire) soit administré. Les médicaments recommandés par le PNLP au Sénégal pour la prise en charge du paludisme grave sont :

- L'artésunate injectable en première intention (au minimum 24h, suivi d'un relai par une CTA pendant 3jours) ;
- L'artéméther injectable en deuxième intention ;
- La Quinine injectable en troisième intention (5).

## VI. Prophylaxie du paludisme

### VI.1. Lutte antivectorielle

C'est l'ensemble des moyens physiques, biologiques, chimiques et génétiques, qui permettent de réduire au maximum la densité des populations vectrices dans le but de réduire la morbidité et la mortalité palustres. C'est un volet essentiel de la lutte contre le paludisme et

son élimination. Il existe 3 interventions majeures de la lutte anti vectorielle mises en œuvre par le PNLP : la moustiquaire (Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée d’Action dite MILDA), l’aspersion intra-domiciliaire et la lutte anti-larvaire (LAL) (5).

## **VI.2. La chimioprévention**

Les stratégies de traitement préventif sont des éléments clés pour réduire la charge de morbidité et la transmission. La chimioprévention, consistant à une prise de médicaments à titre préventif, est recommandée chez les groupes les plus vulnérables représentés par les femmes enceintes, les enfants de moins de 5 ans, les sujets neufs voyageurs et migrants dans les zones où la transmission est endémique (29).

### **VI.2.1. Le traitement préventif intermittent (TPI) chez la femme enceinte**

La femme enceinte est une cible vulnérable au paludisme du fait des conséquences graves aussi bien pour elle que pour le fœtus qu’elle porte.

- Définition**

Le TPI chez la femme enceinte est une méthode de prévention du paludisme basée sur l’administration d’une dose curative d’un antipaludique (celui préconisé à l’heure actuelle étant l’association Sulfadoxine-Pyriméthamine) de façon intermittente au cours de la grossesse.

- Principe du TPI**

Le traitement préventif intermittent (TPI) du paludisme pendant la grossesse se base sur l’hypothèse que toute femme qui habite une zone de transmission stable (élevée) du paludisme a dans le sang ou dans le placenta des plasmodes, qu’elle présente ou non des symptômes de l’infection. L’OMS recommande, de ce fait que toutes les femmes enceintes reçoivent au moins trois (3) doses de Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) après l’apparition des premiers mouvements du fœtus (5). Le fait d’empêcher les parasites de s’attaquer au placenta permet au fœtus de se développer normalement et évite une insuffisance pondérale à la naissance.

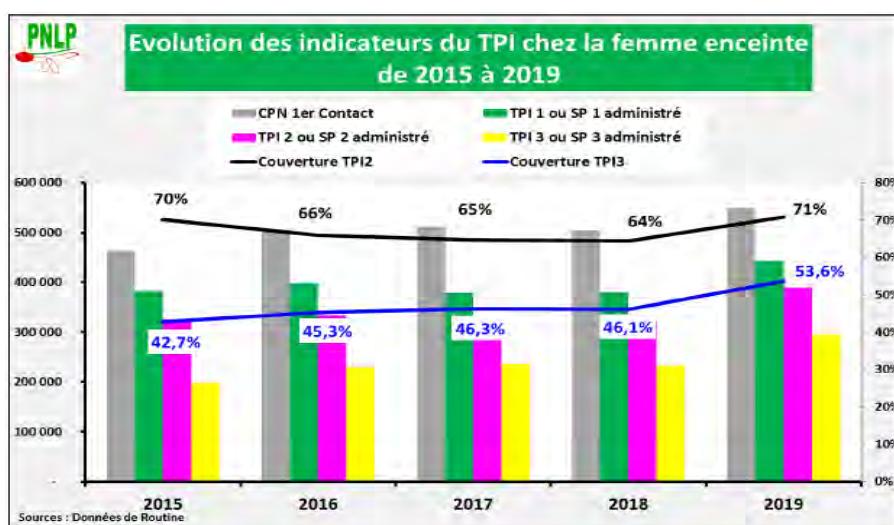
- **Modalités et administration du TPI**

La SP se présente généralement sous forme de comprimés dosés à 500 mg Sulfadoxine et 25 mg de Pyriméthamine qui doivent être administrés à la femme enceinte en une seule prise (3 comprimés). La prise pouvant être faite à jeun ou avec des aliments.

L'administration se fera lors des consultations pendant les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre ; La 1<sup>ère</sup> prise à partir de la 16<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée ou dès perception des mouvements actifs du fœtus par la gestante et la 2<sup>ème</sup> prise au moins un mois après la première prise.

**NB :** La SP est contre-indiquée chez la femme enceinte séropositive au VIH sous cotrimoxazole. Un intervalle d'au moins un mois doit être respecté entre deux prises de SP à cause de sa longue demi-vie, la SP pourrait avoir un effet cumulatif et exacerber les risques d'effets secondaires (réaction cutanée allergique, leucopénie, thrombopénie, troubles gastro-intestinaux). La SP ne doit pas être administrée à des femmes ayant des antécédents d'hypersensibilité ou d'allergie aux médicaments à base de sulfamide.

Globalement, la prévention du paludisme au cours de la grossesse au Sénégal s'est améliorée au cours des dernières années. La couverture en TPI chez la femme enceinte, est passée de 36% en 2010 à 66% en 2014 (**30**). Depuis l'introduction de la 3<sup>ème</sup> dose, les indicateurs de couverture en TPI chez les femmes enceintes ont connu une nette amélioration. Ainsi, le nombre de femmes vues en consultation prénatale et ayant reçu 2 doses de SP (TPI2) est passé de 70% en 2015 à 71% en 2019 ; le nombre de femmes vues en consultation prénatale et ayant reçu 3 doses de SP (TPI3) est passé de 42% en 2015 à 53,6% en 2019 (**4**) (Figure 9).



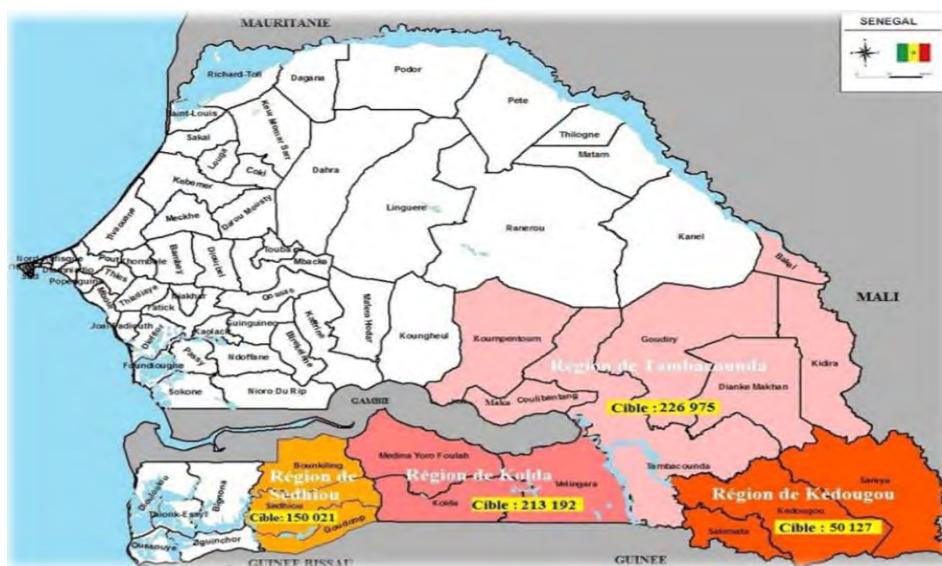
**Figure 9 :** Evolution des indicateurs du TPI de 2015 à 2019 (**4**)

## VI.2.2. Chimioprophylaxie du paludisme saisonnier

- Définition et intérêts

La Chimioprévention du Paludisme Saisonnier (CPS) est l'administration mensuelle d'un traitement complet de Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) + Amodiaquine (AQ) pendant la saison de transmission de la maladie aux enfants de 3 à 59 mois (jusqu'à 120 mois au Sénégal). L'objectif étant de maintenir des concentrations thérapeutiques de médicaments antipaludiques efficaces dans le sang pendant la période où le risque est le plus élevé afin de prévenir ou de traiter le paludisme, dans les régions de forte transmission saisonnière de la maladie.

Le Sénégal a introduit depuis 2013 cette intervention dans sa politique de prévention et de prise en charge du paludisme. Les régions ciblées par la CPS à l'heure actuelle sont : Kédougou, Kolda, Sédiou et Tambacounda (**5**) (Figure 10).



**Figure 10 :** Régions ciblées (en couleur) par la campagne CPS au Sénégal (**5**)

## VI.2.3. Chimioprophylaxie du voyageur

Dans la catégorie des voyageurs on retrouve le sujet neuf n'ayant jamais vécu en zone d'endémie palustre et le sujet ayant déjà vécu dans une zone endémique et venant d'une zone non endémique après un séjour permanent de plus de deux ans. Les médicaments utilisés en chimioprophylaxie sont : la méfloquine, la doxycycline, les associations telles que Chloroquine-Proguanil (**SAVARINE®**) ou Atovaquone-Proguanil (**MALARONE®**).

**NB** : La chimioprophylaxie ne dispense pas des mesures destinées à empêcher les piqûres de moustiques : port de vêtements longs après le coucher du soleil, utilisation de répulsifs anti-moustiques, de moustiquaires (31).

## VII. Vaccination

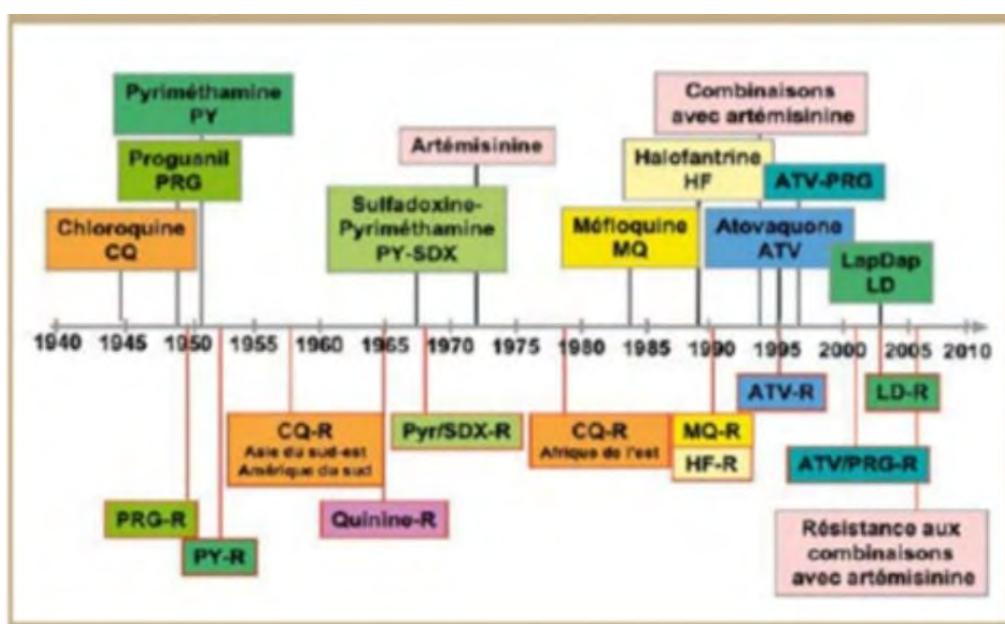
Beaucoup d'efforts ont été consacrés à la mise au point d'un vaccin antipaludique. Plus de 30 vaccins candidats contre le paludisme à *P.falciparum* sont en phase d'évaluation clinique ou préclinique avancée (32). Le RTS, S/AS01(HTS, S) est le premier vaccin et le seul jusqu'à présent, ayant montré une efficacité pour réduire significativement le nombre des cas de paludisme, et de paludisme grave menaçant le pronostic vital, chez de jeunes enfants vivant en Afrique. Il est en phase d'étude pilote depuis 2019 au Ghana, au Kenya et au Malawi sous la coordination de l'OMS (33).

## **Sous-chapitre II : GÉNÉRALITES SUR LA RÉSISTANCE AUX MÉDICAMENTS ANTIPALUDIQUES.**

### **I. Définition**

La chimiorésistance dans le paludisme a été définie par l'OMS comme « la capacité d'une souche parasitaire à survivre ou à se multiplier en dépit de l'administration et de l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées mais comprises dans les limites de tolérance du médicament ». La forme active du médicament doit pouvoir atteindre le parasite ou accéder à l'intérieur du globule rouge infecté pendant la durée nécessaire à la normale. La résistance concerne essentiellement *P.falciparum* mais aussi *P. vivax* et *P. malariae* (34).

L'émergence et la propagation de résistances aux médicaments antipaludiques posent un sérieux problème de santé publique avec un risque de recrudescence de la maladie.



**Figure 11 :** Chronogramme de l'apparition de résistances à différentes molécules antipaludiques (34)

### **II. Facteurs favorisants**

La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques s'explique d'abord du fait de sa grande diversité génétique et par les masses très importantes de parasites portés par les individus infectés (34).

Les facteurs qui favorisent l'émergence de la chimiorésistance sont :

- La mauvaise utilisation des antipaludiques : la pression médicamenteuse liée soit à l'automédication, à des prescriptions irrationnelles ou alors à une mauvaise observance.
- L'indisponibilité des médicaments efficaces (présence de médicaments contrefaits sur le marché) ou le déploiement inadéquat des médicaments sous forme de monothérapie.
- La production rapide de gamétocytes porteurs du gène de résistance (35).

### III. Mécanismes de la chimiorésistance

Selon leur mécanisme d'action (**Tableau IV**), les médicaments antipaludiques peuvent être classés en deux groupes :

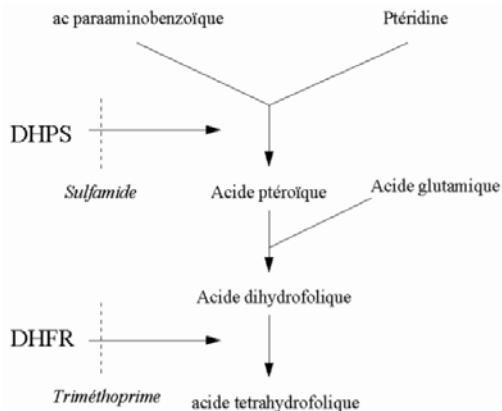
- Les lysosomotropes ayant pour cible les enzymes de la vacuole digestive du parasite érythrocytaire.
- Les antimétabolites qui sont des substances qui inhibent la voie de synthèse des pyrimidines, donc celle de l'acide désoxyribonucléique (ADN) indispensable à la croissance des plasmodes. Ces mécanismes d'action sont à l'origine de deux mécanismes de résistance (36).

**Tableau IV** : Mécanismes d'action et de résistance aux principaux antipaludiques (37)

Molécules	Amino-4-quinolénines Amino-alcools	Dérivés de l'artémisinine	Antifoliques	Antifoliques	Atovaquone	Doxycycline
Site d'action	Vacuole digestive	Vacuole digestive	Cytoplasme	Mitochondrie	Ribosome 70S	
Mécanisme d'action	Accumulation dans la vacuole digestive du parasite.  Augmentation du pH vacuolaire.  Inhibition de l'hème polymérase impliquée dans la polymérisation de la ferriprotoporphyrine IX en pigment insoluble	Molécules de structure endopéroxides.  Production de radicaux libres après interaction avec l'hème	Inhibition compétitive des enzymes de la voie de synthèse de l'acide folique  Dihydroptéroate Dihydrofolate synthétase réductase  DHFS DHFR	Inhibition de la Dihydroorotate deshydrogénase (DHOD)  Altération du transport des électrons au niveau du cytochrome bc1	Fixation à la sous-unité 30S du ribosome  Action lente  Parasitostatique	
Effet final	Accumulation de ferriprotoporphyrine IX toxique pour les membranes du parasite	Stress oxydant avec altération des protéines, des organites et des membranes du parasite.	Inhibition de la production d'acide folique.  Altération de la synthèse des pyrimidines	Inhibition de la respiration mitochondriale et altération de la synthèse des pyrimidines.	Inhibition de la synthèse protéique.	
Apparition de la résistance	Lente	Non décrite	Rapide		Non décrite	
Mécanisme de résistance	Diminution accumulation vacuolaire  Facteurs multigéniques	-	Mutations des enzymes cibles (DHFS, DHFR, DHOD)		Utilisation thérapeutique en association	

### III.1. Mécanisme de résistance aux antimétabolites : la Sulfadoxine-Pyriméthamine

Les antimétabolites sont des substances qui inhibent la voie de synthèse des pyrimidines, donc celle de l'ADN indispensable à la croissance des plasmodes.



**Figure 12** : Mécanisme d'action des antimétabolites (38)

#### III.1.1. La pyriméthamine

La pyriméthamine est un inhibiteur sélectif de la dihydrofolate réductase (DHFR) une enzyme du *Plasmodium* participant à la synthèse de l'ADN à travers la voie des folates. La résistance à cette molécule antipaludique est conférée par des mutations au niveau du gène *Pfdhfr* situé sur le chromosome 4. Il s'agit pour l'essentiel des mutations N51I, C59R, S108N. La triple mutation des codons 108, 51 et 59 est souvent observée en Afrique ou en Asie chez les souches résistantes à la SP. Elle est considérée comme un facteur prédictif de la résistance *in vivo* à la SP. La détection de la mutation S108N est quant à elle souvent prédictive de la présence des deux autres (39).

#### III.1.2. La Sulfadoxine

La dihydroptéroate synthétase (DHPS) est une enzyme de la voie des folates qui est inhibée par la sulfadoxine dont elle est la cible moléculaire (40). L'analyse des séquences du gène de la DHPS montre des différences d'acides aminés entre les souches sensibles et résistantes à la sulfadoxine. Les mutations ponctuelles S436A, S436F, A437G, K540E du gène *Pfdhps* confèrent une résistance à la sulfadoxine.

Cependant, la mutation isolée A437G et la double mutation A437G+K540E sont associées à une multiplication du risque de résistance *in vivo*. Les mutations A581G et A613T sont rares en particulier en Afrique mais pourraient être associées à des degrés élevés de résistance.

**NB :** La combinaison de la triple mutation du gène *Pfdhfr* S108N + N51I + C59R et de la double mutation du gène *Pfdhps* A437G+ K540E ("quintuple mutation") multiplie le risque de résistance *in vivo* à la SP (41).

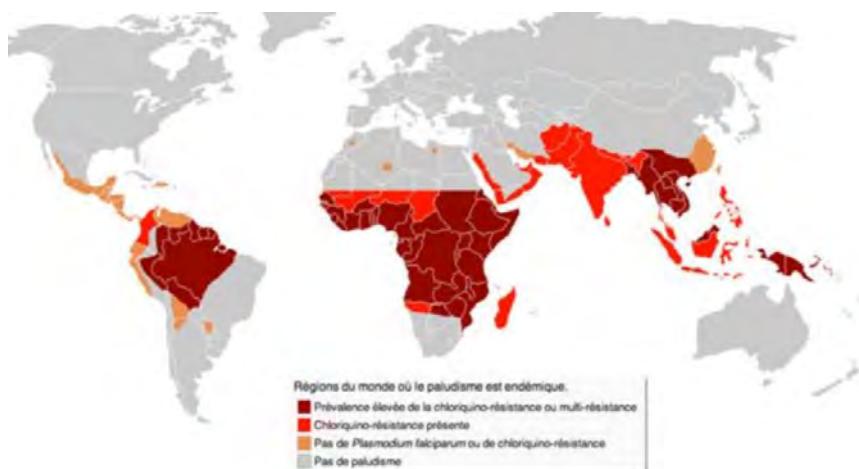
### III.2. Mécanisme de résistance aux autres antipaludiques : les lysosomotropes

Les lysosomotropes sont des schizonticides, ayant pour cible la vacuole digestive du parasite. Ils comprennent toutes les molécules possédant un noyau quinoléine (Chloroquine, Amodiaquine, pipéraquine), les amino-alcools (Quinine, Mefloquine et halofantrine) et les dérivés de l'Artémisinine.

#### III.2.1. La Chloroquine

La chloroquine est un antipaludique de synthèse mise sur le marché en 1934, son activité est liée à ses propriétés d'accumulation sélective dans l'hématie parasitée et sa localisation préférentielle dans la vacuole digestive.

Le principal mécanisme de résistance à la chloroquine est l'efflux de médicament (expulsion de la substance active) par la protéine de transport membranaire appelée PFCRT (*Plasmodium falciparum* Chloroquinorésistance Transporter). Cette dernière est codée par le gène *Pfcrt* localisé sur le chromosome 7. La mutation K76T au niveau de ce gène est associée à la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine (41 ; 42).



**Figure 13 :** Répartition géographique des zones de chloroquinorésistance (42)

### **III.2.2. L'Amodiaquine**

L'amodiaquine a récemment connu un regain d'intérêt dans le traitement de l'accès palustre simple, en association avec les dérivés de l'artémisinine et plus particulièrement l'artésunate. Son mode d'action étant quasiment similaire à celui de la chloroquine, son accumulation est corrélée à celle de la chloroquine et est aussi diminuée chez les isolats chloroquinorésistants (43). Les mutations N86Y, Y184F et D1246Y, au niveau du gène *Plasmodium falciparum multidrug resistance protein1(Pfmdr1)* ont été associées à une sensibilité réduite à l'amodiaquine (44).

### **III.2.3. La Luméfantrine**

C'est un schizonticide sanguin dirigé contre les stades érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*. Elle est administrée en association avec l'artéméther pour une efficacité améliorée.

La chimiorésistance de *P. falciparum* à la luméfantrine est liée à des modifications au niveau du gène *Pfmdr1*. Les mutations N86Y, Y184F, D1246Y ont été associées à une sensibilité réduite de *P. falciparum* à la luméfantrine (34).

### **III.2.4. Les dérivés de l'Artémisinine**

Dans les CTA, les dérivés de l'artémisinine confèrent une efficacité rapide et puissante. Leur taux élevé de clairance plasmatique (demi-vie < à 1heure) est compensé par un antipaludique à demi-vie plasmatique plus longue (luméfantrine, méfloquine, amodiaquine, pipéraquine) en tant que médicament associé. La résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine se traduit par une réduction importante de la vitesse d'élimination des parasites chez les patients traités (demi-vie de clairance parasitaire) par un dérivé d'artémisinine seul ou en association avec une molécule partenaire (CTA) (45 ; 46).

Cette clairance parasitaire retardée est due au nombre accru de jeunes trophozoïtes qui entrent dans un état de quiescence lors de l'exposition aux dérivés de l'artémisinine. Cette capacité est conférée par des mutations au niveau du gène *Pfk13* localisé sur le chromosome 13 (47).

## **IV. Méthodes de surveillance de l'efficacité des antipaludiques**

L'évaluation permanente du niveau d'efficacité des molécules antipaludiques est indispensable pour optimiser les recommandations thérapeutiques et prophylactiques

nationales en fonction des résistances parasitaires observées. Afin de permettre un suivi épidémiologique mondial des résistances, l'OMS préconise une standardisation et une coordination des protocoles d'évaluation. Trois approches différentes et complémentaires sont utilisées :

- Les tests *in vivo* visant à évaluer l'efficacité des médicaments chez les patients.
- Les tests *in vitro* pour évaluer la sensibilité des parasites aux médicaments.
- L'étude des marqueurs moléculaires permettant de détecter des mutations génétiques validées (48).

#### **IV.1. Tests *in vivo***

Les tests *in vivo* fournissent des informations sur l'efficacité du médicament étudié chez les patients. Néanmoins, ils sont difficiles à réaliser en raison de la lourdeur de la logistique et du coût. La technique consiste à prescrire la dose requise de médicament antipaludique aux patients infestés par des parasites. Après avoir reçu un traitement approprié, les patients sont suivis par des évaluations parasitologiques et cliniques pendant un nombre de jours spécifiés (de 28 à 63 jours en fonction de la demi-vie du médicament évalué) (48).

#### **IV.2. Tests *in vitro***

Ils permettent une bonne appréciation de la sensibilité du parasite à l'antipaludique car ils sont basés sur la culture de parasites en présence de médicaments à des concentrations variables pour déterminer l'effet inhibiteur de croissance de ces derniers ou en exposant les parasites à une concentration élevée d'un antipaludique spécifique pendant une période relativement courte ; La croissance du parasite si elle a lieu peut être mesurée à l'aide de diverses techniques (49). Toutefois, ces tests nécessitent une infrastructure de laboratoire adéquate et un personnel hautement qualifié.

#### **IV.3. Etude des marqueurs moléculaires de résistance**

Les marqueurs moléculaires validés sont très pertinents pour détecter et surveiller en temps réel la résistance. Leur prévalence dans une population parasitaire est un bon indicateur du niveau de résistance clinique. L'étude des gènes associés à la résistance permet d'éliminer les facteurs humains et est très fiable pour détecter les vraies résistances. Le principe de base de la plupart des techniques développées pour évaluer les marqueurs de résistance connus repose

sur l'amplification du gène ou des loci d'intérêt. Aussi, plusieurs marqueurs peuvent être testés avec seulement quelques microlitres ( $\mu$ l) de sang sur un papier filtre (commodité dans le transport et la conservation des échantillons) ; Toutefois l'analyse des marqueurs moléculaires, nécessite une infrastructure spécifique et un personnel hautement qualifié (50). Les marqueurs moléculaires retrouvés associés à la résistance de *P. falciparum* aux différentes molécules antipaludiques sont (**Tableau V**) :

- *Plasmodium falciparum multidrug résistance 1 (Pfmdr1)* situé sur le chromosome 5
- *Plasmodium falciparum chloroquinorésistance (Pfcrt)* situé sur le chromosome 7
- *Plasmodium falciparum dihydrofolate réductase (Pfdhfr)* situé sur le chromosome 4
- *Plasmodium falciparum dihydrofolate synthéase (Pfdhps)* situé sur le chromosome 8 (34).
- *Plasmodium falciparum Cytochrome b (PfCyt b)*
- *Plasmodium falciparum kelch propeller (PfK13)* situé sur le chromosome 13 (51).

**Tableau V** : Médicaments antipaludiques et marqueurs de résistance associés (45).

Classe chimique	Nom commun	Stade parasite ciblé	Marqueur de résistance de <i>Plasmodium falciparum</i>
<b>Sesquiterpene lactone</b>	Artemisinin	Tous les stades du parasite	pfkkelch13
<b>Endoperoxides</b>	Artesunate	Tous les stades du parasite	pfkkelch13
	Artemether	Tous les stades du parasite	pfkkelch13
	Dihydroartemisinin	Tous les stades du parasite	pfkkelch13
	Chloroquine	Stades sanguins (trophozoïte et schizonte)	pfcrt
<b>4-Aminoquinolines</b>	Amodiaquine	Stade sanguin (trophozoïte et schizonte)	pfcrt, pfmdr1
	Piperaquine	Stade sanguin (trophozoïte et schizonte)	pflpm2, pfcrt
	Pyronaridine	Stade sanguin (anneau, trophozoïte et schizonte)	Pfcrt
	Naphthoquine	Stades sanguins (trophozoïte et schizonte)	Unknown
	Quinine	Stades sanguins (trophozoïte et stades I à III des gametocytes)	pfcrt, pfmdr1
	Mefloquine	Stades sanguins (trophozoïte et schizonte)	pfmdr1
<b>Amino alcohols</b>	Lumefantrine	Stades sanguins (trophozoïte et schizonte)	pfcrt, pfmdr1
	Halofantrine	Stades sanguins (trophozoïte et schizonte)	pfcrt, pfmdr1
<b>8-Aminoquinoline</b>	Primaquine	Formes sanguins (gamete) et hépatiques (schizonte)	Unknown
	Pyrimethamine	Schizonte sanguin et hépatique et oocystes	Pfdhfr
<b>Antifolates</b>	Sulfadoxine	Blood and liver schizont	Pfdhps
	Proguanil	Stades sanguins (schizonte et gamete) Schizonte hépatique	pfdhfr
<b>Naphthoquinone</b>	Atovaquone	Stades sanguins (schizonte et gamete) Schizonte hépatique	Pfcytb
	Clindamycin	Stades sanguins	Cible Apicoplast
<b>Antibiotics</b>	Doxycycline	Stades sanguins	Cible Apicoplast
	Tetracycline	Stades sanguins	Cible Apicoplast

## **CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

*Rapport-gratuit.com*   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

### I. Cadre d'étude

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la surveillance des marqueurs moléculaires de résistance associés au Traitement Préventif Intermittent (TPI) chez les femmes enceintes au Sénégal. Pour ce faire, nous avons utilisé des échantillons de sang collectés au cours de l'année 2019 dans des postes de santé appartenant à quatre régions médicales différentes :

- Kabendou dans la région de Kolda.
- Goudomp dans la région de Sédiou.
- Dialacoto dans la région de Tambacounda.
- Tomboronkoto dans la région de Kédougou.



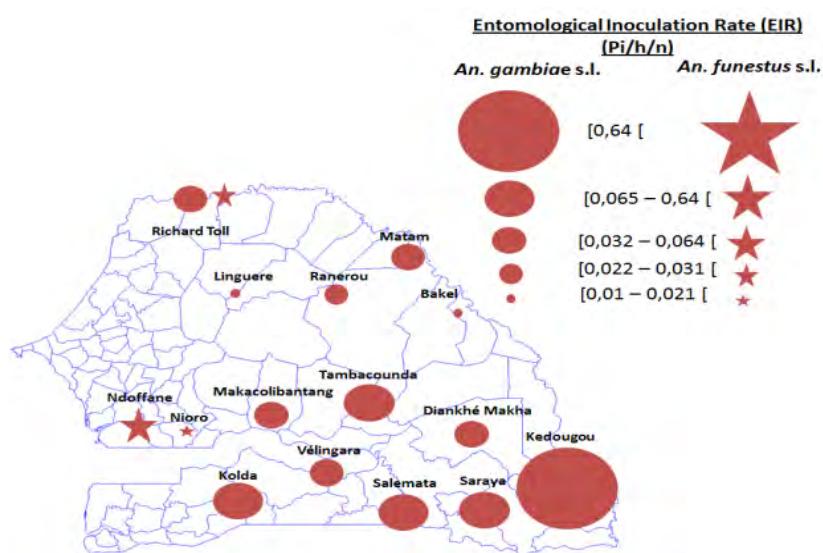
✖ : Régions abritant les sites de collecte en rapport avec notre étude.

**Figure 14** : Carte administrative du Sénégal (54)

#### I.1. Région médicale de Kédougou

Kédougou est une région située dans le Sud du Sénégal à 702km de Dakar, la capitale. La population est estimée à 184273 habitants (Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie, 2019) (53). Cette région abrite un climat de type soudano-sahélien avec deux saisons : une saison sèche allant de décembre à mai et une saison des pluies allant de juin à novembre et se caractérise par la présence de nombreuses collines et d'une végétation luxuriante. Le paludisme y est endémique avec une recrudescence saisonnière.

Selon le bulletin épidémiologique annuel du PNLP pour l'année 2019, le cumul pluviométrique au 31 octobre fait état de 1426mm de précipitations, situation excédentaire par rapport à la normale régionale estimée à 1161,7mm, favorisant ainsi le développement de gîtes larvaires. La même année, Kédougou a enregistré le taux moyen d'inoculation entomologique (TIE) le plus important reporté au Sénégal à raison de 0,64 piqûres infectantes par Homme et par nuit. Du point de vue statistique, 67941 des 354708 cas de paludisme au Sénégal en 2019 soient 19,15% ont été enregistrés dans la région. 23,22% des cas de paludisme chez les femmes enceintes y ont été enregistrés et 8,46% (22/260) des cas de décès liés au paludisme y ont été recensés (4).



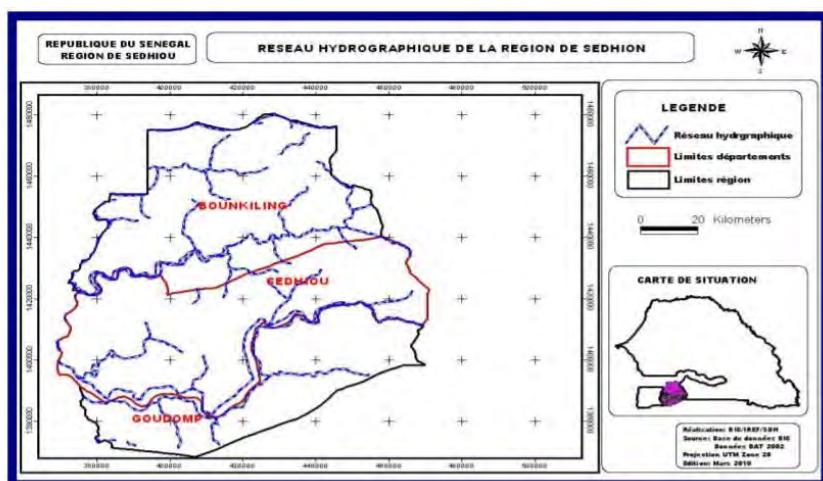
**Figure 15 :** Taux d'inoculation entomologique de deux espèces d'Anophèles dans des districts suivis (4)

## I.2. Région médicale de Kolda

Kolda est une région du Sud située à 670 km de la capitale, en Haute-Casamance à proximité de la frontière avec la Guinée-Bissau. Sa population est de 796583 habitants (53). Cette région est caractérisée par une pluviométrie importante et une végétation abondante. Selon le bulletin épidémiologique annuel du PNLP de l'année 2019, le cumul pluviométrique au 31 octobre fait état de 1104,4mm de précipitations, marquant une légère hausse par rapport à la normale régionale annuelle estimée à 1001,5mm. Du point de vue statistique, 116983 des 354708 cas de paludisme avérés au Sénégal en 2019 soient 32,98% y ont été enregistrés. 35,03% des cas de paludisme chez les femmes enceintes y ont été enregistrés et 16,53% (43/260) des cas de mortalité palustre y ont été recensés (4).

### I.3. Région Médicale de Sédiou

La région de Sédiou est située au Sud-Est de la capitale et au centre de la Casamance ; elle fait partie des dernières régions créées en 2008. Sa population est de 553005 habitants (53). Elle est arrosée par le fleuve Casamance et ses affluents, ce qui lui confère un réseau hydrographique dense et crée des conditions favorables au développement et à l'entretien de gîtes larvaires. Le climat est de type soudano-guinéen, caractérisé par des précipitations qui s'étalent de juin à octobre et une saison sèche qui couvre la période de novembre à mai. La moyenne des précipitations tourne autour de 1000mm par an. Les statistiques épidémiologiques du paludisme en 2019 révèlent que 5678 cas de paludisme soient 1,6% des cas totaux avérés au Sénégal ont été identifiés dans cette région. En outre, 1,17% des cas de paludisme chez les femmes enceintes y ont été enregistrés et 4,61% des cas de mortalité palustre y ont été notifiés (4).



**Figure 16 :** Réseau hydrographique de la région de Sédiou (54)

### I.4. Région médicale de Tambacounda

Tambacounda est la plus grande ville de l'Est du Sénégal. Elle est située à 467 km de la capitale et compte environ 841516 habitants (53). Tambacounda possède un climat sahélien et la moyenne pluviométrique annuelle est estimée à 709,7mm de précipitations. Le cumul pluviométrique au 31 octobre 2019 fait état de 654mm de précipitations. Les statistiques épidémiologiques du paludisme en 2019 révèlent que 101077 cas de paludisme soient 28,49% des cas totaux avérés au Sénégal ont été décomptés dans cette région. En outre, 30,63% des cas de paludisme chez les femmes enceintes y ont été enregistrés et 14,23% des cas de mortalité palustre y ont été notifiés (4).

L'ensemble des échantillons de sang veineux collectés par des équipes du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital Aristide-le-Dantec (LPM/ HALD) présentes sur place, ont été acheminés dans des conditions permettant leur conservation optimale, par voie terrestre au LPM, où nous avons effectué nos principales manipulations.

- **Description du LPM/HALD**

Le LPM/HALD a pour vocation d'aider au diagnostic des maladies parasitaires et fongiques. Il abrite aussi un Centre International de Recherche et de Formation sur les Agents Infectieux et la Génomique qui permet de renforcer les capacités en matière de recherche et de diagnostic. Le laboratoire dispose : d'un hall d'accueil, d'un secrétariat, de bureaux du personnel et des chefs de service, d'une salle de conférence, d'une salle de prélèvement, d'une grande salle de microscopie (pour les analyses diverses), d'une salle de séquençage, d'une salle de génotypage, d'une annexe externe (rattachée au service de bactériologie/virologie) où se font les extractions d'ADN et les cultures parasitaires, d'un magasin pour le stockage du matériel et de toilettes.



**Figure 17 :** Façade extérieure du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Aristide Le Dantec (55)

## **II. Population d'étude**

Nous avons réalisé une étude transversale dans la période allant du mois d'août 2019 (date du début des prélèvements au niveau des sites de collecte) au mois d'octobre 2020 (date de clôture de l'ensemble de nos manipulations au niveau du LPM/HALD).

Les échantillons collectés ont été obtenus à partir de prélèvements sanguins de patients venus en consultation au niveau des postes de santé précités avec des signes cliniques évoquant une infection palustre et dont le diagnostic parasitologique a été effectué.

### **II.1. Critères d'inclusion**

Les patients inclus ont été sélectionnés selon les critères suivants :

- Une mono-infection à *P. falciparum*, confirmée par TDR et microscopie (GE et FM).
- Consentement libre et éclairé.

**NB :** Parmi tous les échantillons collectés nous avons réalisé un tri spécifique et n'avons retenu pour notre étude que ceux correspondant à des parturientes impaludées.

### **II. 2. Critères de non-inclusion**

- Co-infection avec d'autres espèces plasmodiales.
- Absence de consentement du malade.
- Signes de paludisme grave.

### **II.3. Considération éthique**

Le protocole de notre étude a été soumis au Comité National d'Ethique et de Recherche en Santé du Sénégal (CNERS SEN19/49) qui a donné un avis favorable pour son déroulement.

## **III. Méthodologie**

Après confirmation du diagnostic de paludisme et obtention du consentement, un prélèvement de sang capillaire au bout du doigt a été effectué sur chaque patient éligible. Cinq (5) spots de sang ont été déposés sur un papier filtre Whatmann®3MM CHR CAT N°3030-662 pour chaque patient. Ces papiers filtres ont été conservés dans des étuis en cellophane renfermant chacun un sachet de gel de silice dont le rôle est d'absorber toute forme d'humidité. (Figure 18)

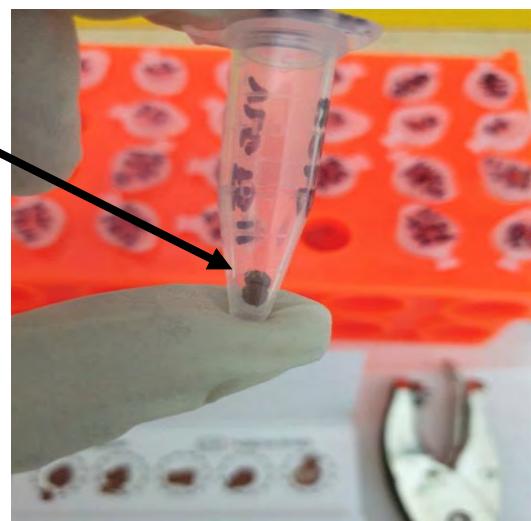


**Figure 18 :** Spots sanguins déposés sur du papier filtre (55)

A partir des spots de sang et en s’aidant d’un « hole-puncher » (perforateur) des confettis d’environ 3 mm de diamètre ont été réalisés pour chaque échantillon afin d’extraire l’ADN parasitaire dont le génotypage a été effectué par la technique de High Resolution Melting (HRM).

### III.1. Extraction de l’ADN parasitaire

L’extraction s’est faite conformément au protocole fourni dans le Mini kit QIAamp DNA (QIAGEN, Valencia, CA, USA) à partir des confettis de sang parasité déposés dans le fond de tubes Eppendorf (**Figure 19**).



**Figure 19 :** Confettis de sang parasité dans un tube Eppendorf (55)    **Figure 20** Mini Kit d’extraction d’ADN QIAamp DNA (55)



L'ensemble du matériel (colonnes de centrifugation, colonnes d'élution, tubes collecteurs) et des réactifs (Tampons, Protéinase K) fournis par le fabricant permettent après les différentes étapes de lyse membranaire, de précipitation et d'élution d'obtenir des extraits purs E1 et E2 d'ADN qui sont conservés au congélateur à - 20°C. Une fois l'ADN parasitaire extrait, nous avons procédé au génotypage par HRM afin d'étudier les marqueurs moléculaires de résistance suivants : *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthétase *Pfdhps* et *Plasmodium falciparum* dihydrofolate réductase *Pfdhfr* impliqués dans la résistance à la Sulfadoxine-Pyriméthamine.

### **III.2. Génotypage par High Resolution Melting (HRM)**

#### **III.2.1. Principe**

La High Résolution Melting (HRM) ou courbe de fusion à haute résolution est une technique de biologie moléculaire utilisée entre autres, pour détecter des variations au niveau de la séquence d'ADN. Elle se fait en deux étapes : d'abord l'amplification de l'extrait d'ADN par une PCR en temps réel couplée à l'intégration d'un fluorochrome intercalant dans l'ADN amplifié ; ensuite, l'augmentation de la température programmée et progressive entraîne une dénaturation de l'ADN caractérisée par la séparation des brins de l'amplicon. Cette dénaturation provoque l'élimination du fluorochrome et induit une décroissance progressive de la fluorescence. Chaque séquence d'ADN sera caractérisée par une température et une signature lumineuse spécifiques représentées par la courbe de fusion. Un changement, même mineur de la séquence conduit à une variation de la cinétique de fusion et peut être détecté grâce à la haute résolution utilisée.

Pour une mutation inconnue, la technique de séquençage s'avère nécessaire pour confirmer le résultat.

#### **III.2.2. Mode opératoire**

L'appareil utilisé pour effectuer la réaction est le LightCycler 96 (figure 21). C'est un instrument destiné à réaliser une PCR rapide et précise, associée à la détection en ligne et en temps réel de colorant fluorescent se liant à l'ADN ou de sondes marquées, permettant la quantification ou la caractérisation d'un acide nucléique cible.



**Figure 21** : Appareil de HRM « LightCycler 96 » (55)

Nous avons utilisé des sondes, des amorces sens et anti-sens spécifiques à chaque codon des gènes étudiés. La PCR est asymétrique, elle consiste à utiliser 5 fois plus d'amorces anti-sens que d'amorces sens.

**Tableau VI** : Séquence des amorces et sondes utilisées pour l'analyse des marqueurs

Gène/Codons	Amorces Sens	Amorces Anti-sens	Sonde
<b>Pfdhfr 51/59</b>	ACATTTAGAGGTCTAGGAATA AAGGAGT	ATATTTACATCTTATATTCA ATTTTTCATATTTGATTCA TC	AAATGTAATTCCCTAGATATGA AATATTTTG CAG-block
<b>Pfdhfr 108</b>	CTGTGGATAATGTAATGATAT GCCTAATTCTA	GACAATATAACATTATCCTAT TGCTTAAAGGT	GGAAGAACAGCTGGAAAGC AT-block
<b>Pfdhps 540</b>	GTTTGATAATGATTTAGTTGA TATATTAATGATATTAGTGC	GTTTATCATTGTATGTGGATT TCCTCTT	TAATCCAGAAATTATAAAA TTAAAAAAA AAC-block
<b>Pfdhps 437</b>	GAATGTTGAAATGATAATGA AGGTGCTA	CAGGAAACAGCTATGACGAAA TAATTGTAATACAGGTACTACT AAATCTCT	ATCCTCTGGTCCTTTGTATAC C-block
<b>Pfdhps 581</b>	CTTGTATTAAATGGAATACCTC GTTATAGGA	AGTGGATACTCATCATACAT GTATATTTGTAAG	TTGGATTAGGATTGCGAAGAA ACATGAT CA-block

Avant de lancer une réaction HRM il faut au préalable procéder à une dilution de l'ADN extrait avec de l'eau stérile (Nuclease free water), ensuite préparer le mélange réactionnel.

Le mélange réactionnel (Mx) est constitué du colorant le « LightScanner Master Mix » et d'un mélange amorces-sondes (Primer/probe). Ce dernier (Primer/probe) est obtenu en

additionnant les amorces sens et anti-sens, la sonde spécifique au codon étudié, l'eau distillée (Reagent grade water) dans des proportions précisées dans le **tableau VII**.

**Tableau VII** : Composantes et volumes du mélange réactionnel amorces-sonde

Réactifs	Volumes
H <sub>2</sub> O (grade water)	92 µl
Amorce sens (forward)	1 µl
Amorce anti-sens (reverse)	5 µl
Sonde (probe)	2 µl

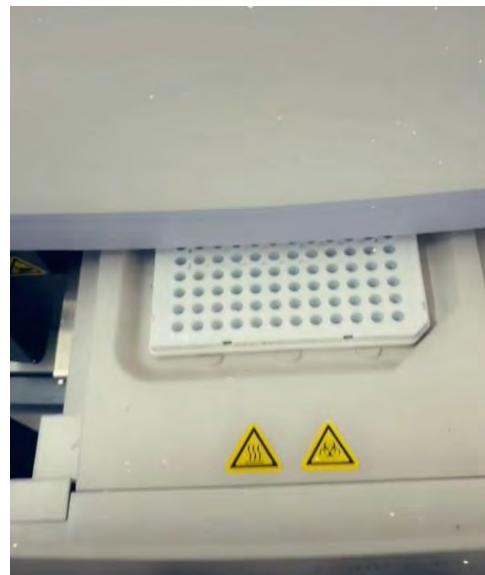
Les échantillons sont distribués sur une plaque de 96 puits. Chaque puits doit contenir 2,5 µl d'ADN dilué et 2,5 µl du mélange réactionnel (Mx).

La plaque doit être brièvement centrifugée avant son introduction dans l'appareil. Des contrôles sauvages et mutants utilisés lors de la manipulation servent à l'interprétation des résultats.

Plaque  
réactionnelle



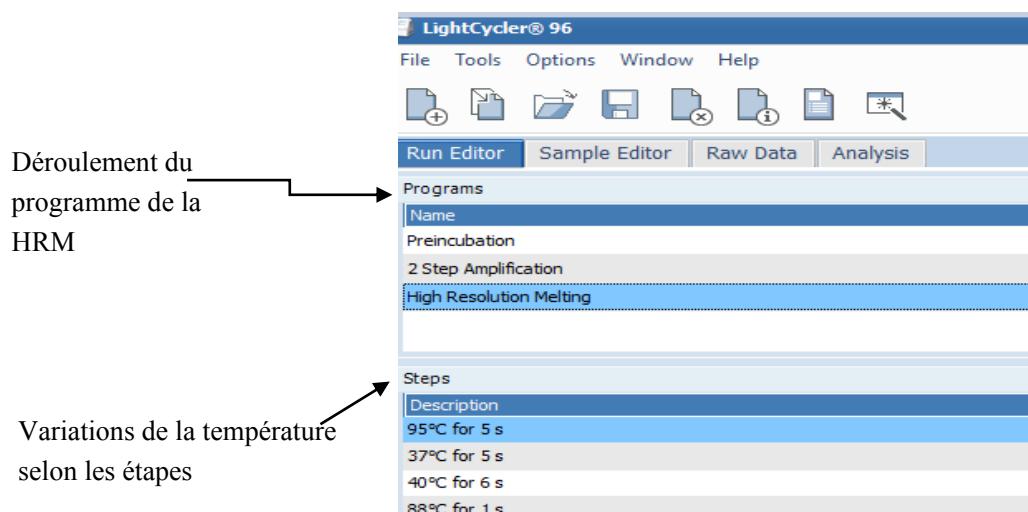
**Figure 23** : préparation de la plaque de réaction (55)



**Figure 22** : Plaque dans le réceptacle  
du LightCycler96 (55)

**Tableau VIII** : Différents contrôles sauvages et mutants spécifiques aux codons génotypés

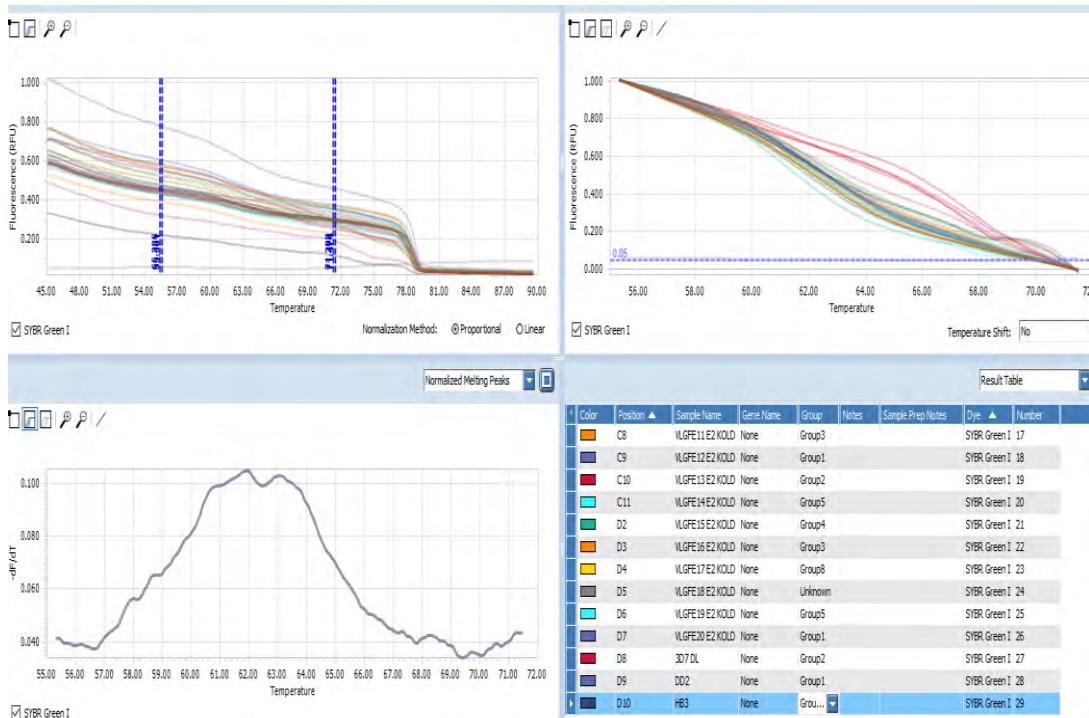
Gènes	Codons	Contrôles sauvages	Contrôles mutants
	437	3D7	Dd2
<i>Pfdhps</i>	581	3D7	Tm90
	540	3D7	---
	108	3D7	Dd2, HB3
<i>Pfdhfr</i>	51/59	3D7	Dd2, 7G8, Tm90
	164	3D7	Tm90



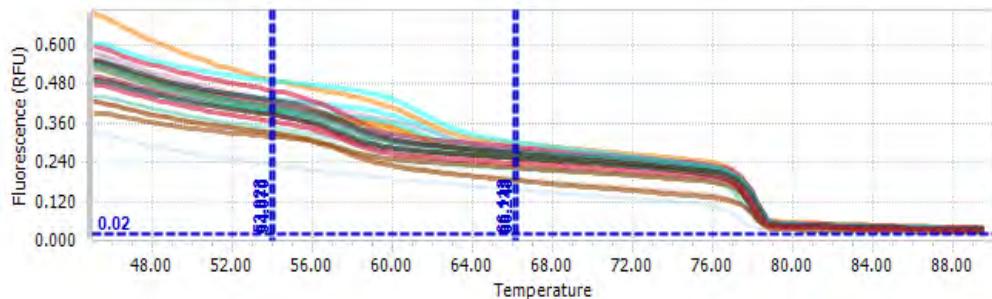
**Figure 24** : Aperçu de l'interface du logiciel LightCycler96 décrivant les étapes d'un programme de génotypage (56)

### III.2.3. Analyse et interprétation des résultats

A la fin de la réaction dont la durée varie entre 1h15 mn et 1h30 mn, les courbes de fusion traduisant la variation de la fluorescence en fonction de la température sont exploitées et analysées à l'aide du logiciel Light Cycler Application version 1.1.0.1320.

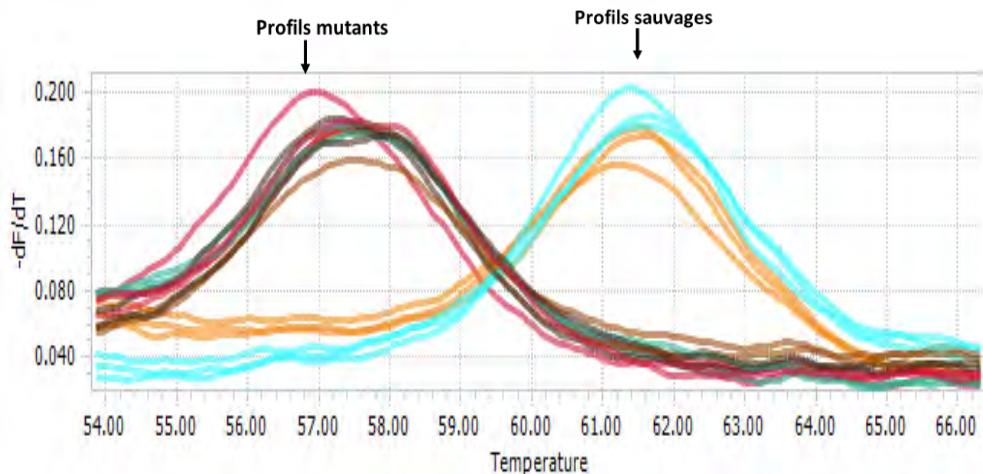


**Figure 25 :** Interface d'analyse et interprétation des courbes de fusion sur le logiciel « lightCycler96 Application ». (56)



**Figure 26 :** Variation de la fluorescence en fonction de la température (56)

L'analyse et l'interprétation des résultats sont effectuées à partir des courbes de fusion au niveau de la sonde. Ainsi après normalisation, le profil de la courbe de chaque échantillon est comparé aux profils des contrôles mutants et sauvages utilisés lors de la réaction. La comparaison des profils permet de déduire si l'échantillon présente une mutation ou non. Cependant, les échantillons ayant des profils autres que ceux des contrôles devront être séquencés afin d'identifier la mutation.



**Figure 27 :** Profil des courbes de fusion représentant les allèles sauvages (à droite) et les allèles mutants (à gauche) (56)

### **CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

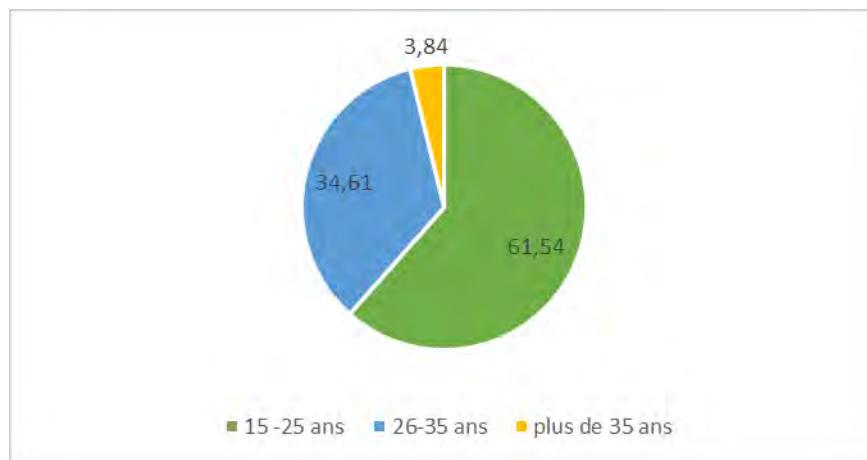
## **CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

---

### **I. Résultats**

#### **I.1 Caractéristiques de la population d'étude**

Notre population d'étude était constituée au total de 26 parturientes dont l'âge variait entre 15 et 36 ans. Parmi cette population, la majorité soit 61,54 % avait entre 15 et 25 ans ; 34,61 % de la population avait entre 26 et 35 ans et 3,84 % avait plus de 35 ans. L'âge moyen étant de 23,27 ans.



**Figure 28 :** Répartition de la population d'étude en fonction des tranches d'âge.

Le stade de grossesse était le premier trimestre pour 42,30% des patientes, le second trimestre pour 34,61% et le troisième trimestre pour 15,38% des patientes. Dans 7,69% des cas le stade de la grossesse n'était pas renseigné.



**Figure 29 :** Répartition des patientes en fonction du stade de la grossesse.

Parmi les 26 patientes enceintes et impaludées, une seule (1) soit 3,84 % a affirmé avoir eu recours au traitement préventif intermittent en recevant une dose de Sulfadoxine-Pyriméthamine. 23 patientes soient 88,46 % ont révélé n'avoir pas eu recours au TPI et pour 2 d'entre elles soit 7,69 % cette information n'a pas été rapportée.

## **I.2. Prévalence des mutations au niveau des marqueurs moléculaires spécifiques**

### **I.2.1. Prévalence des mutations au niveau des codons 437, 540, 581 du gène *Pfdhps***

L'analyse des échantillons a été faite avec succès pour chacun des codons du gène *Pfdhps* (Tableau IX).

#### **I.2.1.1. Au niveau du codon 437**

Parmi les échantillons génotypés, 65,38% (17/26) soit plus de la moitié portaient l'allèle sauvage A437, 23,07% (6/26) portaient l'allèle mutant 437G et 11,23% (3/26) des échantillons analysés portaient l'allèle mixte.

#### **I.2.1.2. Au niveau du codon 581**

Aucun allèle porteur de mutation n'a été détecté parmi les 26 échantillons génotypés. Il y avait ainsi 100% (26/26) échantillons porteurs de l'allèle sauvage A581.

#### **I.2.1.3. Au niveau du codon 540**

Tous les échantillons analysés (26/26) soient 100% étaient porteurs de l'allèle sauvage K540. Aucun allèle mutant ni mixte n'a été détecté après analyse.

Pour le gène *Pfdhps*, la majorité des échantillons génotypés a montré une prévalence d'allèles sauvages, largement supérieure à celle des allèles mutants et mixtes qui étaient très faiblement représentés.

## **I.2.2. Prévalence des mutations au niveau des codons 108, 51, 59 et 164 du gène *Pfdhfr***

L'analyse des échantillons a été réalisée avec succès pour chacun des codons du gène *Pfdhfr* (Tableau IX).

#### **I.2.2.1. Au niveau du codon 108**

Parmi les 26 échantillons génotypés, 23 d'entre eux soient 88,46% étaient porteurs de l'allèle mutant 108N ; 2 soient 7,69% étaient porteurs de l'allèle mixte et seulement un (1) d'entre eux soit 3,84% portait l'allèle sauvage S108.

### I.2.2.2. Au niveau du codon 51

Parmi tous les échantillons génotypés, 23 soient 88,46% étaient porteurs de l'allèle mutant 51I ; 2 soient 7,69 % étaient porteurs de l'allèle mixte et seulement un (1) d'entre eux soit 3,84% portait l'allèle sauvage N51.

### I.2.2.3. Au niveau du codon 59

Parmi les 26 échantillons analysés, 23 soient 88,46% étaient porteurs de l'allèle mutant 59R ; 2 soient 7,69% étaient porteurs de l'allèle mixte et seulement un (1) d'entre eux soit 3,84% portait l'allèle sauvage C59.

### I.2.2.4. Au niveau du codon 164

Aucun allèle mutant ni mixte n'a été détecté après analyse. Il y avait de ce fait 26 échantillons soient 100% porteurs de l'allèle sauvage I164.

Pour le gène *Pfdhfr*, la prévalence des allèles mutants détectés après analyse des différents codons était plus importante que celle des allèles sauvages et mixtes.

**Tableau IX** : Prévalence des mutations au niveau des gènes *pfdhps* et *pfdhfr*.

Gènes	Codons	Allèles sauvages (%)	Allèles mutants (%)	Allèles mixtes (%)
<i>Pfdhfr</i>	N51I	<b>3,84</b> (1/26)	<b>88,46</b> (23/26)	<b>7,69</b> (2/26)
	C59R	<b>3,84</b> (1/26)	<b>88,46</b> (23/26)	<b>7,69</b> (2/26)
	S108N	<b>3,84</b> (1/26)	<b>88,46</b> (23/26)	<b>7,69</b> (2/26)
	I164L	<b>100</b> (26/26)	<b>0,00</b> (0/26)	<b>0,00</b> (0/26)
<i>Pfdhps</i>	A437G	<b>65,38</b> (17/26)	<b>23,07</b> (6/26)	<b>11,53</b> (3/26)
	K540E	<b>100</b> (26/26)	<b>0,00</b> (0/26)	<b>0,00</b> (0/26)
	A581G	<b>100</b> (26/26)	<b>0,00</b> (0/26)	<b>0,00</b> (0/26)

## I.3. Prévalence des mutations combinées dans les régions de Kolda, Kédougou, Sédiou et Tambacounda

Dans notre population d'étude et sur l'ensemble des régions, les différentes mutations combinées ont été réparties comme suit (figure 30) :

- ✓ Les triples mutations (**N51IC59RS108N**) représentaient 64,70% (11/17) du nombre total des mutations combinées détectées. Ces triples mutations étaient les plus fréquentes avec 83,33% pour la région de Kolda et 66,66% pour la région de Kédougou ;
- ✓ Les quadruples mutations (**N51IC59RS108NA437G**) représentaient 35,29% (6/17) du nombre total des mutations combinées rapportées. Elles ont été détectées dans les quatre (4) localités de notre étude avec les prévalences suivantes : Kédougou 33,33%, Kolda 16,67%, Tambacounda 100% et Sédiou 100%.
- ✓ Aucune mutation combinée double ni simple n'a été observée.



**Figure 30 :** Prévalence des mutations combinées dans les différentes régions.

## II. Discussion

Le paludisme continue de demeurer la maladie parasitaire la plus meurtrière dans le monde (57). Bien que la moitié de la population mondiale soit exposée au risque de contracter cette maladie, la plupart des cas d'infections palustres et des décès qui y sont liés surviennent en Afrique subsaharienne. Certains groupes de population tels que les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes sont considérés comme les plus vulnérables à cette maladie et courent le risque d'être gravement atteints. L'infection palustre pendant la grossesse représente un problème de santé publique majeur pouvant induire des conséquences graves pour la mère, le fœtus puis le nouveau-né. Les programmes nationaux de lutte contre le paludisme des pays concernés ont la responsabilité de prendre les mesures adéquates pour assurer la protection de ces groupes particulièrement à risque (58).

Au Sénégal, le traitement préventif intermittent (TPI) à la Sulfadoxine-pyriméthamine (SP) ainsi que les autres initiatives prises par le PNLP et ses partenaires dans le cadre de la prévention du paludisme chez les femmes enceintes ont montré des résultats favorables au cours des cinq dernières années (4). De ce fait, il s'avère essentiel de consolider les efforts fournis pour le suivi de la mise en œuvre du TPI et le renforcement des systèmes de surveillance des marqueurs de résistance associés à la SP.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés de réaliser une étude de surveillance des marqueurs de résistance associés à la SP en procédant au génotypage de 26 isolats de *P. falciparum* obtenus à partir de prélèvements sanguins de femmes enceintes dans quatre régions du Sénégal. L'analyse des isolats effectuée par High Resolution Melting nous a permis d'obtenir des résultats assimilables et des résultats contradictoires à ceux d'autres études menées auparavant au Sénégal et ailleurs.

Dans notre population d'étude, 50% (13/26) des patientes étaient à un stade gestationnel compris entre le deuxième et le troisième trimestre et une seule patiente soit 3,84% (1/26) a affirmé avoir eu recours au TPI à la SP ; ce résultat évoque des statistiques rapportées dans une étude réalisée au Sud-Ouest du Nigéria par **Olusola Ojurongbe et al.**(2018) (59), dans laquelle seulement 20,5% des patientes d'une cohorte de 200 femmes enceintes avaient utilisé la SP à des fins de prévention du paludisme. Cela pourrait susciter des interrogations sur le niveau d'adhésion des femmes enceintes à la stratégie du TPI dans les campagnes ou les zones rurales.

Parmi les échantillons génotypés, 23,07% portaient les allèles mutants 437G au niveau du gène *Pfdhps* ; ces résultats sont comparables à ceux de l'étude conduite par **Hong Quan et al.**, (2019) (60) à Lagos au Nigéria dans laquelle une prévalence plus prononcée de 95,8% l'allèle mutant 437G, était mise en cause dans la diminution progressive de la sensibilité de *P.falciparum* à la sulfadoxine.

L'allèle mutant 540E du gène *Pfdhps* n'a pas été détecté dans nos isolats contrairement aux travaux de **Chauvin P. et al.** (2015) (61) au Cameroun et de **Koukouikila-Koussouda F. et al.** (2015) (62) au Congo-Brazzaville dans lesquels la présence de ce dernier a été rapportée à des fréquences respectives de 13,6% et 55,2% à l'issue du génotypage d'isolats de *P. falciparum*. Selon **Dzinjalama et al.**, (2002) (63) la mutation ponctuelle K540E, qui affecte particulièrement la dihydroptéroate synthétase (DHPS) est un marqueur épidémiologique utile de la « quintuple mutation » en Afrique, et peut donc être utilisée comme indicateur de la résistance parasitaire à la SP. En outre, aucune mutation au niveau du codon 581 du gène *Pfdhps* n'a été rapportée dans notre étude. Ces résultats sont en adéquation avec ceux relatés à l'issue de travaux menés au Sénégal par **Mze Papa N. et al.** (2015) (64) et dans lesquels les codons 581 et 540 du gène *Pfdhps* portaient tous des allèles de type sauvage.

Concernant le gène *Pfdhfr*, après génotypage des isolats, 88,46% portaient l'allèle mutant 108N, 88,46% portaient l'allèle mutant 51I et 88,46% portaient l'allèle mutant 59R. Aucun d'entre eux ne portait la mutation I164L. Ces résultats sont assimilables à ceux rapportés par une étude menée par **Olusola Ojurongbe et al.** (2018) (59) au Nigéria portant sur la prévalence des mutations du gène *Pfdhfr* et dans laquelle étaient données les prévalences respectives de 88%, 85% et 71,9% des allèles mutants 108N, 51I et 59R. Parallèlement, en 2003 au Gabon, **Aubouy et al.** (65) rapportent les résultats suivants : 63%, 83,3%, et 67,8% de mutations ponctuelles respectivement pour les codons 108, 51 et 59. Des études réalisées par **Biswas et al.** (2000) (66) et **Gregson et Plowe** (2005) (67) ont souligné que les parasites portant dans leur génome des mutations additionnelles N51I et C59R associées à la mutation S108N avaient une sensibilité à la pyriméthamine beaucoup moins marquée que ceux portant la mutation S108N seule. Dans le même ordre d'idée, des travaux antérieurs tels que de ceux de **Basco et al.**, (68) en 1998 ont permis de constater qu'au Cameroun, les isolats présentant les allèles triples mutants du gène *Pfdhfr* (108N, 51I, 59R), avaient une réponse clinique faible à la spécialité FANSIDAR® (Sulfadoxine-Pyriméthamine).

Dans notre étude, les mutations combinées ont été rapportées avec une prévalence globale de 65,38% représentant de ce fait, plus de la moitié des isolats génotypés (17/26). Aucune

mutation simple ni double n'a été détectée, contrairement à l'étude réalisée par **Abiola A. et al.** (2008) (69) au Sénégal dans laquelle la mutation simple représentait 36% des échantillons et touchait 3 localités. Des triples et quadruples mutations ont été rapportées dans notre étude avec des prévalences respectives de 64,70% (11/17) et 35,30% (6/17). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus à Thiès au Sénégal par **Ndiaye D. et al.**, (2013) (70) à l'issue de travaux qui faisaient état d'une nette augmentation de la prévalence des triples et quadruples mutations impliquant les gènes *Pfdhfr/Pfdhps* entre les années 2003 et 2011. Dans le même ordre d'idée **Faye B. et al.**, (2011) (71) ont rapporté dans une étude faite au Sud du Sénégal que les mutations triples et quadruples des gènes *Pfdhfr/Pfdhps* étaient enregistrées, la fréquence des mutations triples étant nettement plus marquée.

La triple mutation, dans notre étude a touché les localités de Kédougou et Kolda avec des prévalences respectives de 66,66% et de 83,33%. La quadruple mutation a été rapportée à la fois à Kédougou, Kolda, Tambacounda et Sédiou avec les prévalences respectives de 33,33%, 16,67%, 100%, et 100%. Les trois premières localités citées ont porté l'essentiel de la charge du paludisme au Sénégal en 2019 (4), ce qui pourrait suggérer que la pression médicamenteuse liée à l'endémicité prononcée du paludisme dans ces zones serait un facteur favorisant pour la survenue de mutations chez le parasite. Il est utile de souligner que pour l'isolat de *P. falciparum* obtenu à partir du prélèvement de la seule patiente ayant effectivement eu recours à la SP à des fins préventives, une quadruple mutation *Pfdhfr/Pfdhps* a été détectée. Ce résultat, bien que de puissance statistique insuffisante pourrait s'apparenter à ceux obtenus suite à l'étude menée à Mukono au Centre de l'Ouganda par **Mbonye A. K. et al.** (2015) (72) et qui démontrait une augmentation de la prévalence des mutations combinées allant de 3,9% à 16,7% après la prise d'une ou de deux doses de Sulfadoxine-Pyriméthamine par les femmes enceintes suivies.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---

L'infection palustre pendant la grossesse peut avoir des conséquences dévastatrices aussi bien pour la femme enceinte que pour le fœtus, puis le nouveau-né. Au Sénégal, bien que les indicateurs de couverture en Traitement Préventif Intermittent TPI 2 et TPI 3 chez les femmes enceintes aient connu une évolution positive de 2015 à 2019 (4), de nombreux efforts restent à fournir pour l'atteinte des objectifs stratégiques formulés par le PNLP en vue de la pré-élimination du paludisme. Ainsi il s'avère primordial non seulement de veiller à la mise en œuvre effective du TPI dans les régions les moins accessibles mais également d'être des garants de l'efficacité de la stratégie en procédant à la surveillance des marqueurs associés à la résistance du parasite à la Sulfadoxine-Pyriméthamine. Dans ce contexte, notre étude axée sur le génotypage de 26 isolats de *P. falciparum* obtenus à partir d'échantillons de femmes enceintes impaludées, a permis de mettre en évidence une prévalence élevée d'allèles mutants du gène *Pfdhfr* (108N, 51I, 59R), et la présence de mutations triples et quadruples *Pfdhfr/Pfdhps*. Par ailleurs, nous n'avons pas détecté la présence d'allèles mutants tels que 581E et 540E, habituellement considérés comme des signes prédictifs d'une diminution de la sensibilité à la SP. Leur absence étant de ce fait, révélatrice du caractère résiduel de l'efficacité de la Sulfadoxine-Pyriméthamine et de son intérêt protecteur pour les femmes enceintes et leur progéniture dans le cadre de la prévention du paludisme au cours de la grossesse.

Au terme de ce travail, nous constatons qu'il serait judicieux de mener cette étude à une échelle plus importante incluant toutes les régions de forte endémicité palustre du Sénégal, avec pour objectifs :

- ✓ Contribuer au contrôle de l'observance du TPI par les femmes enceintes dans certaines zones reculées.
- ✓ Avoir une meilleure appréciation de la portée des mutations ponctuelles en procédant en parallèle à une surveillance continue aussi bien de la sensibilité que de l'efficacité *in-vivo* et *ex-vivo* dans les zones où le TPI est mis en œuvre.
- ✓ Analyser l'étendue de la pression de la S.P au niveau du génome de *P. falciparum*.

Bien que les études moléculaires constituent un signal d'alarme fiable pour alerter les décideurs politiques quant aux choix de stratégies en matière de prévention ou de traitement

du paludisme, la mise en circulation, à large échelle d'un vaccin efficace pourrait s'avérer être le meilleur moyen de lutte et de protection contre cette maladie.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Thiaw A. B. (2019). Surveillance des marqueurs moléculaires de *Plasmodium falciparum* associés à la résistance aux molécules antipaludiques dans la région de Kédougou, Sénégal. 41p.
2. OMS rapport 2020 sur le paludisme dans le monde. Disponible sur : <https://www.who.int/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2020> Consulté le 01-12-2020.
3. OMS 2019 Rapport sur le paludisme dans le monde 2019 en un clin d'œil.
4. PNLP 2020. Bulletin épidémiologique annuel 2019 du paludisme au Sénégal.
5. PNLP/ PSN Plan Stratégique National de Lutte contre le paludisme 2016-2020.
6. Molez J. F. (1993). La phylogénie des coccidiea. *Bull liais Doc*, 26, 87-92.
7. Raynel et al., 2011.
8. Kokoskin E. 1997 Centre des Maladies tropicales de l'Université McGill, Montréal Canada
9. White, N.J., Pukrittayakamee S., Hien T.T., Faiz M.A., Mokuolu O.A. et Dondorp A.M. (2013). *Malaria The Lancet* 383 (9918): 723-35.
10. Saïssy J.M., B. Rouvin, P. Koulmann (2003): Le paludisme grave en réanimation en 2003. *Med Trop* ; 63 : 258-266.
11. OMS (2016). Paludisme, aide-mémoire ; 94 : 861-936.
12. Pages F. Orlandi-Pradines E., Corbelec V. (2007). Vecteurs du paludisme : biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine et Maladies infectieuses*, 37(3), 153-161
13. Center for Disease Control and prevention (CDC), 2017.
14. Diagne N., Fontenille D., Konate L., Faye O., Legros F., et Lamizana M.T. (1994). Les anophèles du Sénégal. *Bull Soc Path Exot* ; 87 : 267-77.
15. Mouchet J., Carnevale P., Coosman M. Julvez J. (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde.
16. Roucher C., Rogier C., Sokhna C., Tall A. (2014). A 20 year longitudinal study of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* prevalence and morbidity in a west african population. *PLoS ONE*, 9(2) : 1-13.
17. Diallo M., Badiane A., Diongue K., Deme A., Lucchi N. W., Gaye M., Ndiaye D. (2016). Non-falciparum malaria in Dakar : a confirmed case of *Plasmodium ovale wallikeri* infection. *Malaria Journal*, 1-6.
18. WHO (2000). Severe falciparum malaria, Third edition.
19. Aubry P., Gauzère B-A. (2017). Paludisme actualités 2016. *Medecine Tropicale*, 26.

- 20. Sergent E. (1963)** Latent infection and premuniton. Some definitions of microbiology and immunology in a immunity to protozoan.
- 21. Druilhe P., Pérignon J.L.,** (1997). A hypothesis about the chronicity of malaria infection. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 13(9), 353-7.
- 22. ANOFEL (2014).** Paludisme. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. Disponible sur « <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf> ». Consulté le 04-08-2020.
- 23. Milne L.M., Kyi M.S., Chiodini P.L. et Warhurst D.C. (1994).** Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *Journal of clinical pathology* 47 (8): 740-42.
- 24. frottis mince et goutte épaisse avant et après coloration.** Disponible sur « [www.bioltrop.org](http://www.bioltrop.org) ». Consulté le 16-08-2020.
- 25. Moody A. H., Chiodini P. L.,** (2002). Non-microscopic method for malaria diagnosis using optimal IT, a second generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. *Br J Biomed Sci*, 228-231.
- 26. Thirumalai V. (2015).** Anti protozoal and anti malarial drugs.
- 27. Mécanisme d'action des principaux antipaludiques** Disponible sur « [www.campus.cerimes.fr/parasitologie](http://www.campus.cerimes.fr/parasitologie) ». Consulté le 09-08-2020.
- 28. PNLP (2018).** Bulletin épidémiologique annuel 2017 du paludisme au Sénégal. 40p.
- 29. OMS (2013).** Rapport mondial 2014 sur le paludisme.
- 30. PNLP (2015).** Plan stratégique national de lutte contre le paludisme au Sénégal 2016-2020. 171p.
- 31. Vidal (2015)** Maladies, recommandations sur le paludisme et la prophylaxie.
- 32. WHO (2015).** Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization. 317p.
- 33. WHO (2020).** Malaria Vaccine implementation Programm (MVIP)
- 34. Pradines B., Dormoi J., Briolant S., Bogreau H., Rogier C.,** (2010). La résistance aux antipaludiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, (422), 51-62.
- 35. Mbaye A. (2014).** Chimioprophylaxie des souches de *Plasmodium falciparum* isolées à Thiès en 2012 et 2013 et à Pikine en 2014 : approche phénotypique et moléculaire.
- 36. Le Bras J., Musset L. et Clain J. (2006).** Les résistances aux médicaments antipaludiques. *Med M Infect* 36 (8): 401-5.
- 37. Mécanisme d'action des principaux antipaludiques** disponible sur « [www.campus.cerimes.fr/parasitologie](http://www.campus.cerimes.fr/parasitologie) ». Consulté le 09-08-2020.
- 38. Lebras J. (2010)** Cours Master 1 Infectiologie / Unité d'enseignement : Parasitologie.

- 39.** Gregson A., et Plowe C.V. (2005). Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacological reviews* 57 (1): 117-45.
- 40.** Sibley C. H., Sims J.E., Plowe C. (2001) Pyriméthamine-Sulfadoxine resistance in *P. falciparum* : what next. *Trends in parasitology*, 17 (12), 582-8.
- 41.** Picot S., Olliari P., Monbrison F., Bienvenu A., Price R., Ringwald P. A., (2009). 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.
- 42.** Djimdé A., Douumbo O.K., Cortese J.F., Kayentao K., Douumbo S., Diourté Y., Coulibaly D., Dicko A., Su X., et Nomura T. (2001). A molecular marker for Chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 344 (4): 257-63.
- 43.** Bray P.G., Hawley S.R., et Ward S.A. (1996). 4-Aminoquinoline resistance of *Plasmodium falciparum*: insights from the study of Amodiaquine uptake. *Molecular Pharmacology* 50 (6): 155-58.
- 44.** Durrand V., Berry A., Sem R., Glaziou P., Beaudou J., et Fandeur T. (2004). Variations in the sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* Chloroquine resistance transporter (*Pfcrt*) and their relationship to Chloroquine resistance in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 136 (2) : 273-85.
- 45.** Haldar K., Bhattacharjee S. et Safeukui I. (2018). Drug resistance in *Plasmodium*. *Nature Reviews Microbiology* 16 (3): 156.
- 46.** Flegg J.A., Guerin P.J., White N.J. et Stepniewska K. (2011). Standardizing the measurement of parasite clearance in *falciparum* malaria: the parasite clearance estimator. *Malar J* 10 (1): 339.
- 47.** Ashley E.A., Dhorda M., Fairhurst R.M., Amaratunga C., Lim P., Suon S., Sreng S., Anderson J.M., Mao S., et Sam B. (2014). Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 371 (5): 411-23.
- 48.** WHO (2010). Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. <https://doi.org/10.1054/drup.1999.0090>
- 49.** Nsanzabana C., Djalle D., Guérin P.J., Ménard D. et González I.J. (2018). Tools for surveillance of anti-malarial drug resistance: an assessment of the current landscape. *Malar J* 17 (1): 75.
- 50.** Petersen I., Eastman F. et Lanzer M. (2011). Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS letters* 585 (11): 1551-62.
- 51.** Ariey F., Witkowski B., Amaratunga C., Beghain J., Langlois A., ..., Ménard D., (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 505 (7481), 50-55.
- 52.** Cartographie du Sénégal. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/wiki/regions/du/senegal>  
Consulté le 15-11-2020

- 53.** Agence Nationale pour la Statistique et la Démographie **ANSO** (2019).
- 54.** **ANSO**, 2017. Situation Economique et sociale Régionale de Sédiou 2014.
- 55.** **Nkada E. S. V.** (2020) photo prise au LPM/HALD.
- 56.** Logiciel d'exploitation du LightCycler96, captures d'écran faites au LPM/HALD par S. Nkada.
- 57.** **Nosten F.** (2009). Malaria in pregnancy : a therapeutic dilemma ; *Med Sci*, Paris ; 25 : 867-869.
- 58.** **OMS** rapport 2017. Disponible sur [https://www.who.int/malaria/areas/preventive\\_therapies/pregnancy/fr/](https://www.who.int/malaria/areas/preventive_therapies/pregnancy/fr/) Consulté le 15novembre 2020
- 59.** **Olusola Ojurongbe, Nguetse C. N., Fayemiwo S. A., Falade O. C., Thomas N. B., Meyer C. G.,** (2018). High prevalence of dihydrofolate reductase gene mutations in Plasmodium falciparum parasites among pregnant women in Nigeria after reported use of sulfadoxine-pyrimethamine. *Pathog Glob Health Mar* ;112(2):86-92.
- 60.** **Hong Quan, Igbari U., Oyibo W., Omilabu S., Chen S-B., Okolie S., Zhou X-N.** (2020) High multiple mutations of Plasmodium falciparum-resistant genotypes to sulphadoxine-pyrimethamine in Lagos, Nigeria. *Infect Dis Poverty* 2020 Jul 11 ;9(1) :91.
- 61.** **Chauvin P., Menard S., Iriart X., Nsango S. E., Tchioffo M. T., Abate L., Morlais I.** (2015) Prevalence of Plasmodium falciparum parasites resistant to sulfadoxine/pyrimethamine in pregnant women in Yaoundé, Cameroon: emergence of highly resistant pfdhfr/pfdhps alleles. *J Antimicrob Chemother* 2015 Sep ;70(9) :2566-71.
- 62.** **Koukouikila-Koussouna F., Bakoua D., Fesser A., Nkombo M., Vouyoungui C.** (2015) High prevalence of sulphadoxine-pyrimethamine resistance-associated mutations in Plasmodium falciparum field isolates from pregnant women in Brazzaville, Republic of Congo *Infect Genet Evol* 2015 Jul;33:32-6.
- 63.** **Dzinjalama F., Kamwendo D., Snounou G., Kanjala M., Chisale G Mhango, Malcolm E Molyneux** (2002), Plasmodium falciparum : PCR detection and genotyping of isolates from peripheral, placental and cord blood of pregnant Malawian women and their infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* ; 2002, 96(2) : 145-9.
- 64.** **Mze Papa N., Ndiaye Yaye D., Diedhiou C., Rahamatou S., Dieye B., Daniels Rachel F., Ndiaye I., Hamilton E., Ndiaye D.** (2015) RDTs as a source of DNA to study Plasmodium falciparum drug resistance in isolates from Senegal and the Comoros Islands. *Malar J* 2015 Sep 29;14:373.
- 65.** **Aubouy A., Olagnier D., Bertin G., Ezinmegnon S., Majorel C., Mimar S...Coste A.** (2015) Nrf2-driven CD36 and HO-1 gene expression in circulating monocytes correlates with favourable clinical outcome in pregnancy-associated malaria. *Malar J*. 2015 Sep 18;14:358.

- 66. Biswas S., Escalante A., Chaiyaroj S., Angkasekwinai P., Lal A. A.** (2000) Prevalence of point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes of Plasmodium falciparum isolates from India and Thailand : a molecular epidemiologic study. *Trop Med Int Health* 2000 Oct ;5(10) :737-43.
- 67. Gregson A., Plowe C.** (2005) Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol Rev* 2005 Mar ;57(1) :117-45.
- 68. Basco L. K., Ringwald P.** (1999) Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon IV. Evolution of pyrimethamine resistance between 1994 and 1998. *Am J Trop Med Hyg*. Nov ;61(5).
- 69. Abiola A.** (2008) Prévalence des mutations de la DHFR et de la DHPS, marqueurs moléculaires de la résistance de plasmodium falciparum à la sulfadoxine-pyriméthamine étude menée dans quatre districts sanitaires du Sénégal janvier 2007. Thèse pharmacie.
- 70. Ndiaye D., Dièye B., Ndiaye Y. D., Van Tyne D., Daniels R., ..., Volkman S.** (2013) Polymorphism in dhfr/dhps genes, parasite density and ex vivo response to pyrimethamine in Plasmodium falciparum malaria parasites in Thies, Senegal. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2013 Aug 12 ; 3 :135-42.
- 71. Faye B., Ndiaye M., Ndiaye J-L., Abiola A., Tine R. C., Collé Lo A., 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* 2011 Jul ;109(1):133-8.
- 72. Mbonye Anthony K., Birungi J., Yanow S. K., Shokoples S., Malamba S., Alifrangis M.** (2015) Prevalence of Plasmodium falciparum resistance markers to sulfadoxine-pyrimethamine among pregnant women receiving intermittent preventive treatment for malaria in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother* 2015 Sep ;59(9):5475-82.

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie

Département de Pharmacie

Mémoire De Master

**Master :** Biologie et Contrôle des parasites

**Noms et prénoms du Candidat :** NKADA Ebolo Suzie Vanessa

**Titre du mémoire :** Etude des marqueurs moléculaires associés à la résistance au Traitement Préventif Intermittent (TPI) chez les femmes enceintes au Sénégal

**Date de soutenance :** 23 Janvier 2021

### Résumé

L'émergence et la propagation de la résistance aux médicaments représentent l'un des plus grands défis pour la lutte contre le paludisme dans les régions d'endémie. La Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) est actuellement déployée dans plusieurs pays dont le Sénégal, comme traitement préventif intermittent (TPI) pour prévenir les conséquences potentiellement graves d'une infection palustre au cours de la grossesse. La surveillance des marqueurs moléculaires de résistance est un aspect important permettant de prédire ou de détecter l'émergence d'une chimiorésistance. A partir d'isolats de *P. falciparum* provenant de prélèvements de femmes enceintes au Sénégal et génotypés par High Resolution Melting (HRM), nous avons procédé à l'évaluation de la prévalence des mutations ponctuelles et combinées sur les gènes *Pfdhps* et *Pfdhfr* associés à la résistance au TPI. Une forte prévalence des mutations du gène *Pfdhfr* au niveau des codons **51,59** et **108** a été notée. Les triples et quadruples mutations *Pfdhfr/Pfdhps* ont été rapportées avec une prévalence nettement supérieure de la mutation triple. La mutation **A437G** du gène *Pfdhps* a été détectée mais, aucun des isolats ne portait l'allèle hautement mutant **540E**, prédictif d'une diminution de la sensibilité de *P.falciparum* à la Sulfadoxine-Pyriméthamine.

**Mots-clés :** Paludisme, Femmes Enceintes, Traitement Préventif Intermittent, Marqueurs de résistance.

### Abstract

The emergence and spread of drug resistance is one of the biggest challenges in the fight against malaria in endemic areas. Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP) is currently being deployed in several countries, including Senegal, as intermittent preventive therapy (IPT) to prevent the potentially serious consequences of malaria infection during pregnancy. Monitoring for molecular markers of resistance is an important aspect in predicting or detecting the emergence of drug resistance. Using *P. falciparum* isolates from samples taken from pregnant women in Senegal and genotyped by High Resolution Melting (HRM), we evaluated the prevalence of isolated and combined mutations on the *Pfdhps* and *Pfdhfr* genes associated with resistance to IPT. A high prevalence of mutations in the *Pfdhfr* gene at the level of codons **51, 59** and **108** was noted. Triple and quadruple *Pfdhfr/Pfdhps* mutations have been reported with a markedly higher prevalence of the triple mutation. The **A437G** mutation of the *Pfdhps* gene was detected but none of the isolates carried the highly mutant **540E** allele, predicting a sensitivity decrease of *P.falciparum* to Sulfadoxine-Pyrimethamine

**Keywords :** Malaria, Pregnant women, Intermittent Preventive Therapy, Resistance markers.