

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



ANNEE 2018

N° 146

ANALYSE QUANTITATIVE DE LA PERSISTANCE POST-TRAITEMENT DE L'HRP2 DANS LES ZONES DE FORTE ET FAIBLE PREVALENCE DU PALUDISME AU SENEGAL

MEMOIRE DE MASTER II DE BIOLOGIE ET CONTROLE DES PARASITES

Présenté et soutenu le 01 Août 2018

Par

M. Modou DIOP

Né le 29 Novembre 1984 à Santhiou Pire (THIES)

MEMBRES DU JURY

Président :

Pr Babacar FAYE

Professeur Titulaire / UCAD

Membres :

Pr Fatou Diallo AGNE

Maître de conférence agrégé / UCAD

Pr Roger Clément Kouly TINE

Maître de conférence agrégé /UCAD

Dr Khadime SYLLA

Maître-Assistant / UCAD

Directeur de Mémoire : **Pr Babacar FAYE**

Professeur Titulaire / UCAD

DEDICACES

A ALLAH LE TOUT PUISSANT, Je ne vis et n'œuvre que par TA GRACE, je prie que TU me Donnes la SANTE, la FORCE et la CONNAISSANCE qui me permettrons de TE Glorifier éternellement.

*Paix et salut sur le Prophète
MUHAMMAD (PSL)*

Je dédie ce travail

A mes défauts grands-parents: Thierno DIOP, Cheikh NDOYE, Diodio TALL et Arame SENE,

Que Firdaws soit votre demeure

A mes parents Abdou Khafor DIOP et Fatou NDOYE,

Aucune expression ne saurait démontrer l'amour, la reconnaissance, le respect et l'estime que je porte envers vous.

Votre présence et votre protection m'ont toujours réconfortée.

Vous avez consenti tant de sacrifices, de patience, de bienveillance, d'investigation et d'encouragement à mon éducation et ma formation.

J'espère que ce jour puisse être votre fierté une fois de plus.

Qu'Allah Le Tout Puissant vous procure santé et longue vie.

A mes frères Talla, Ablaye,

A mes sœurs Ndiakhate, Mbayang, Kiné, Mame Diarra, Ndèye

Pour tout l'amour, le soutien et le bonheur que vous réveillez en moi,

J'ai toujours apprécié l'affection que vous portez à mon égard,

Que ce travail soit le témoignage de mon amour et ma gratitude envers vous.

A mes oncles et tantes, pour tous les principes que vous m'avez transmis.

A mes cousins et cousines, pour votre présence constante à mes côtés.

A mes camarades de Promotion: Ibrahima NDIAYE, Aliou NDOUR, Dr Ibou GUEYE, Dr Habibou SARR, Dr Lamine DIOUF et Aïda NDIME.

A tous mes amis avec qui j'ai partagé des moments de peine et de joie.

A toute l'équipe qui a travaillé sur ce projet.

REMERCIEMENTS

*Tout d'abord, je tiens à remercier **Pr Babacar FAYE** de m'avoir confié ce travail et accepté de le diriger. C'est un honneur pour moi d'avoir été guidé par vos connaissances dans le domaine de la Parasitologie. Je vous remercie sincèrement du fond du cœur.*

L'occasion m'est également donnée de pouvoir remercier les équipes avec qui je travaillais sur le terrain:

- *L'équipe de Kédougou: Dr Cheikh Binetou FALL, Dr Ibrahima NDAO, Souleymane Diédhiou, Billo DIALLO et Talla DIAGNE*
- *L'équipe de Keur Socé: Dr Kouakou FOLY, Ousmane NDIAYE et Père THIOMBANE*

A tout le personnel du service de parasitologie de l'UCAD

Votre adoption chaleureuse et spontanée m'a permis de m'épanouir dans un cadre de travail convivial. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je ne trouve pas les mots qu'il faut pour vous exprimer toute ma reconnaissance. Merci pour vos conseils et votre appui pour la réalisation de ce travail.

A Dr Doudou SOW, Dr Khadime SYLLA, Dr Maguette NDIAYE, Dr Massamba Syll, Dr Isaac MANGA, Dr Lélo, Aida GAYE, Aminata LAM, Marie Pierre DIOUF, Moufid, Carole, Marie Huguette NDIAYE, Fatou Ndiaye et Major THIOUNE

Vous m'avez témoigné votre amitié à plusieurs reprises et dans de nombreuses circonstances. Vos conseils et encouragements ont toujours été là pour me pousser à finir ce travail. Je voudrai profiter de cette occasion pour vous témoigner toute ma reconnaissance.

Merci à tous...

Table des matières

INTRODUCTION	1
GENERALITES	4
1. DEFINITION.....	5
2. EPIDEMIOLOGIE	5
2.1. Agents pathogènes	5
2.1.1. Taxonomie	5
2.1.2. Morphologie des <i>Plasmodium</i>	6
2.2. Réservoir de parasites	7
2.3. Mode de contamination.....	7
2.4. Vecteurs	7
2.5. Cycle biologique des plasmodes humaines.....	8
2.6. Indices paludométriques	9
2.6.1. Chez l'Homme	9
2.6.2. Chez l'anophèle	10
2.7. Facteurs favorisants	10
2.8. Répartition géographique.....	10
2.9. Immunité dans le paludisme	11
2.9.1. Immunité innée	11
2.9.2. Immunité acquise : Prémunition	12
3. DIAGNOSTIC DU PALUDISME.....	12
3.1. Diagnostic clinique	12
3.1.1. Accès simple de primo-invasion	12
3.1.2. Accès de reviviscence schizogonique à fièvre périodique	13
3.1.3. Paludisme de la femme enceinte.....	13
3.2. Diagnostic biologique	14
3.2.1. Modifications hématologiques et biochimiques non spécifiques.....	14
3.2.2. Diagnostic parasitologique.....	14
3.2.3. La technique microscopique par fluorescence	17
3.2.4. Diagnostic immunologique spécifique.....	17
3.2.5. Diagnostic moléculaire	20
4. TRAITEMENT DU PALUDISME	21
4.1. Traitement du paludisme simple	21
4.2. Traitement du paludisme grave et compliqué	21
5. PROPHYLAXIE DU PALUDISME	21

5.1.	Chimio prophylaxie	21
5.1.1.	Chimioprophylaxie des expatriés et des voyageurs	21
5.1.2.	Traitements préventifs intermittents	21
5.2.	Lutte antivectorielle	22
	METHODOLOGIE.....	23
1.	CADRE DE L'ETUDE.....	24
1.1.	Poste de santé de Keur Socé	24
1.2.	Poste de santé de Mako.....	25
2.	TYPE ET PERIODE D'ETUDE.....	26
3.	POPULATION D'ETUDE	26
3.1.	Taille de l'échantillon	26
3.2.	Critères d'inclusion.....	26
3.3.	Critères d'exclusion	26
4.	COLLECTE DE DONNEES	27
4.1.	Outils de collectes	27
4.2.	Suivi des sujets.....	27
5.	MATERIELS ET METHODES DE LABORATOIRE	27
5.1.	Tests de diagnostic rapide	27
5.2.	PCR	28
5.3.	Test de HRP2 Luminex.....	29
6.	SAISIE, ANALYSE ET GESTION DES DONNEES	29
6.1.	Saisie et Analyse des données.....	29
6.2.	Gestion des données.....	29
7.	ASPECTS ETHIQUES	30
	RÉSULTATS.....	32
1.	LA POPULATION DE L'ETUDE	32
2.	CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES DES PATIENTS INCLUS.....	33
2.1.	Age.....	33
2.2.	Sexe.....	33
3.	RESULTATS DE BASE	33
3.1.	Parasitémie	33
3.2.	Concentration de HRP2	33
3.3.	Corrélation entre la parasitémie et la concentration de HRP2	34
4.	RESULTATS DU SUIVI	35
4.1.	Temps de clairance quantitative de HRP2	35
4.2.	Temps de clairance qualitative de HRP2	36

DISCUSSION	38
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	41
BIBLIOGRAPHIE	44

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	: Degrés Celsius
%	: Pourcent
µL	: microlitre
µm	: micromètre
µM	: micromole
ADN	: Acide Désoxyribo-Nucléique
Ag	: Antigène
An	: Anopheles
ARN	: Acide Ribonucléique
AVS	: Antigène Variant de Surface
CIH-BPC	: Conférence Internationale sur l'Harmonisation-Bonne Pratique Clinique
CNERS	: Comité National d'éthique de Recherche en Santé
CPS	: Chimioprévention du Paludisme Saisonnier
CRF	: Case Report Form (cahier d'observation)
CTA	: Combinaison Thérapeutique à base de dérivés d'Artémisinine
DBS	: Dried Blot Spot (Tache de sang séché)
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Dosage immuno-enzymatique sur support solide)
FS	: Frottis Sanguin
g	: Gramme
GE	: Goutte Epaisse
H	: Heure
HbAS	: Hémoglobine AS
HRP2	: Histidine Rich Protein-2
IC	: Intervalle de confiance
IG	: Indice gamétocytaire
IM	: Intramusculaire
IP	: Indice Plasmodique
IS	: Indice Splénique
ISGlobal	: Global Health Institute Barcelona

IV	: Intraveineuse
J	: Jour
LDH	: Lactico-Déshydrogénase
Max	: Maximum
Min	: Minimum
MSP/RESA	: Mérozoïte Surface Protein/ Ring infected erythrocyte surface antigen
ML	: Millilitre
Mm	: Millimole
N	: Nombre
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
P.	: <i>Plasmodium</i>
PBS	: Tampon phosphate salin
PI/H/an	: Piqûre infectante/Homme/An
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PVE	: Paludisme Viscéral Evolutif
QBC	: Quantitative Buffy Coat
TIE	: Taux d'Inoculation Entomologique
TDR	: Test de Diagnostic Rapide
TPI	: Traitement Préventif Intermittent
VIH	: Virus d'Immunodéficience Humaine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Classification des plasmadies.....	5
Tableau II: Critères d'identification des espèces de Plasmodium.....	6
Tableau III: Classification des anophèles	7
Tableau IV: Sensibilité des différentes méthodes diagnostiques du paludisme.....	19
Tableau V: Caractéristiques de la population de l'étude.....	33

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle évolutif du Plasmodium falciparum chez l'homme et l'anophèle	9
Figure 2: Répartition du paludisme dans le monde	11
Figure 3: diagnostic différentiel des espèces plasmodiales à la microscopie.....	16
Figure 4: Recherche de plasmodium par la technique QBC Malaria	17
Figure 5: Exemple de test de diagnostic rapide de paludisme.....	18
Figure 6: Situation géographique de Keur Socé	24
Figure 7: Situation de Mako dans la région de Kédougou	25
Figure 8: Aperçu des participants à l'étude.....	32
Figure 9: Distribution de la parasitémie et de la concentration de HRP2 au départ.....	34
Figure 10: Corrélation entre la parasitémie et la concentration de HRP2 au départ	34
Figure 11: Répartition des participants arrêtés en fonction des jours de suivi	35
Figure 12: Diagramme de spaghetti de la clairance de la concentration de HRP2 au fil du temps, tel que déterminé par Luminex (n = 87)	35
Figure 13: Corrélation entre la concentration initiale de HRP2 et le dernier jour de positivité par Luminex	36
Figure 14: positivité post-traitement des TDR SD et TDR HS	37
Figure 15: Courbe de positivité de la survie de TDR SD, TDR HS et PCR	37

INTRODUCTION

Le paludisme pose toujours un problème majeur de Santé Publique dans les pays en développement malgré tous les moyens déployés pour lutter contre cette maladie.

L’Organisation Mondiale de la Santé, dans son rapport de 2017, fait état de 216 millions de cas notés dans le monde en 2016. En dépit de ces progrès, l’incidence du paludisme a augmenté de façon significative entre 2014 et 2016 dans la région Amériques de l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS), et de manière plus marginale, dans les régions Afrique, Asie du Sud-Est et Pacifique occidental de l’OMS. Le nombre de décès dus au paludisme a été estimé à 445 000, contre 446 000 en 2015 [56].

Cependant depuis 2010, l’Organisation mondiale de la Santé recommande que tout cas suspect de paludisme soit confirmé par un test de diagnostic parasitologique pour informer la décision de traitement [40]. Les tests de diagnostic recommandés sont, notamment, l’examen au microscope optique de frottis sanguins et la détection d’antigènes du parasite par des tests de détection rapide (TDR). Depuis leur introduction dans les années 1990, les TDR ont considérablement facilité le diagnostic des cas cliniques de paludisme et ils représentent aujourd’hui le principal moyen de diagnostic du paludisme dans le monde [40]. En 2016, 312 millions de tests de diagnostic rapide (TDR) ont été livrés dans le monde, dont 269 millions dans la région Afrique de l’OMS. Le nombre de TDR distribués par les PNLP a augmenté entre 2010 et 2015, mais a baissé entre 2015 et 2016, passant de 247 à 221 millions. Cette diminution était uniquement causée par la baisse des livraisons en Afrique subsaharienne sur cette période, de 219 millions de TDR en 2015 à 177 millions en 2016. [56].

De manière générale, les TDR offrent une limite de détection similaire à celle de la microscopie optique, avec l’avantage qu’ils sont plus simples à effectuer et que leur temps de réponse est plus court.

En effet la grande majorité des TDR utilisés pour le diagnostic de *Plasmodium falciparum* sont fondés sur la détection de la protéine riche en histidine 2 (HRP2). Cette protéine est spécifique à *P. falciparum* et elle est secrétée à une concentration relativement élevée par les globules rouges infectés. Cette sécrétion facilite la détection du parasite parce que la protéine s’accumule dans le plasma pendant l’infection et elle permet de détecter une infection même lorsque le parasite est séquestré hors de la circulation périphérique et devient difficile à détecter par la microscopie. L’un des inconvénients de ce biomarqueur est la persistance de sa circulation après l’élimination du parasite qui empêche l’utilisation de TDR basés sur l’HRP2 pour le suivi de l’efficacité du traitement et qui peut produire des

résultats cliniques faux positifs (c'est à dire la détection de la protéine HRP2 en l'absence de parasites *P. falciparum*).

La persistance de la HRP2 après le traitement et l'élimination du parasite a été décrite par de nombreuses études [5, 8, 26, 28, 30, 52]. Des études in vitro ont également été effectuées pour mesurer la production et la sécrétion d'HRP2 sur des échantillons de culture de *P. falciparum* en laboratoire, et ont été utilisées pour des études de modélisation [19, 20, 36]. Cependant, aucune évaluation de la persistance post-traitement d'HRP2 n'a encore été faite de manière quantitative et au-delà de 42 jours de suivi puisque les études réalisées sont souvent associées à des études d'efficacité de médicaments qui, généralement, n'excèdent pas ce délai. En effet, de manière générale, les études évoquent la persistance d'HRP2 sous l'angle qualitatif uniquement, sur la base de la positivité des TDR seulement jusqu'à 28 ou 42 jours après traitement. La quantification d'HRP2 a été rapportée dans une étude transversale de Dondorp et al mais sans qu'un suivi n'ait été effectué pour mesurer l'élimination d'HRP2 de manière quantitative [20].

Nous nous proposons de combler ce gap dans notre connaissance de *P. falciparum* en conduisant une étude longitudinale qui nous a permis de mesurer quantitativement la persistance d'HRP2 après le traitement de cas cliniques de paludisme à *P. falciparum* confirmés et l'élimination du parasite. Cette étude s'est appuyé sur le test sérologique nouvellement développé qui affiche une limite de détection dans la plage de pictogramme, qui offre un niveau de sensibilité beaucoup plus élevé (TDR HS) que les tests d'immuno-absorption enzymatiques (ELISA) classiques [47].

Objectif principal: Quantifier la persistance post-traitement de l'HRP2 chez des individus avec une infection à *P. falciparum* confirmée.

Objectif secondaire: Mesurer la période de latence de positivité des TDR après traitement par rapport aux niveaux de HRP2 et de parasitémie à l'inclusion.

GENERALITES

1. DEFINITION

Le paludisme (du latin palus = marais) ou malaria (mauvais air), est une maladie parasitaire due à des protozoaires, hématozoaires du genre *Plasmodium* responsables d'une érythrocytopathie, transmise d'homme à homme par la piqûre infectée d'un insecte vecteur appartenant au genre *Anopheles*.

2. EPIDEMIOLOGIE

2.1. Agents pathogènes [6, 9, 11, 14, 16, 22, 23, 37]

2.1.1. Taxonomie

Les plasmodes appartiennent au règne des protozoaires [43]. La classification est détaillée au tableau I:

Tableau I: Classification des plasmodes

Phylum :	Apicomplexa
Classe :	Sporozoea
Sous classe :	Coccidiásina
Ordre :	Eucoccidiida
Sous ordre :	Haemosporina
Famille :	Plasmodiidae
Genre :	<i>Plasmodium</i>
Espèces :	<i>Plasmodium falciparum</i> <i>Plasmodium vivax</i> <i>Plasmodium ovale</i> <i>Plasmodium malariae</i> <i>Plasmodium knowlesi</i>

Les espèces plasmoidiales ont des caractéristiques différentes sur les plans morphologiques, biologiques et génétiques, des manifestations cliniques dont elles sont responsables, de leur comportement vis-à-vis des antipaludiques, et de leur répartition géographique.

2.1.2. Morphologie des *Plasmodium*

Les *Plasmodii* sont des protozoaires dont la forme et les dimensions sont très variables, allant de 1 µm à 60 µm, suivant les stades évolutifs. Certaines de ces formes sont multinucléées et constituent de véritables plasmodes, d'où dérive la dénomination du genre.

La morphologie des formes intra-érythrocytaires, seules utiles au diagnostic parasitologique, est différente selon l'espèce (**Tableau II**).

Tableau II: Critères d'identification des espèces de Plasmodium

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
Hématies parasités	Taille identique aux hématies non parasités	Plus grandes que les hématies non parasités Déformés irrégulièrement	Plus grandes que les hématies non parasités Forme ovale ou frangée	Plus petites que les hématies non parasités
Trophozoïte (forme jeune : forme en bague)	Anneau cytoplasmique mince. Petit noyau souvent divisé	Anneau cytoplasmique épais Gros noyau	Anneau cytoplasmique mince	Anneau cytoplasmique épais Gros noyau
Trophozoïte (forme âgée)	Forme en bague plus élargie voire déformée	Corps amoéboïde : cytoplasme digité ou fragmenté + gros noyau +/- déformé + fin pigment noir	Corps amoéboïde : cytoplasme et noyau fragmentés	Forme en bague très épaisse ou forme en drapeau (rectangulaire) Gros pigment noir
Pigments	Tache de Maurer (tache rouge sombre en coup d'ongle à la surface de l'hématie	Granulations de Schüffner à la surface de l'hématie (granulations fines)	Granulations de Schüffner à la surface de l'hématie (granulations volumineuses)	
Gamétocytes	Forme caractéristique en banane (10µm), amas central de granulations nucléaires (rouge) et de pigment (noir)	Arrondi (10-12µm), cytoplasme bleu pâle ou mauve, fin pigment noir dispersé	Arrondi (7-8µm), cytoplasme bleu pâle ou mauve, fin pigment noir peu abondant	Arrondi (5-6µm), cytoplasme bleu pâle ou mauve, pigment noir en grains volumineux et abondants
Schizontes (corps en rosace)	Absent (leur présence est un signe de gravité)	Volumineux (10-14µm), 12-24 noyaux fins, pigment noir fin +/- dispersé	Taille moyenne (10µm), 6-11 noyaux volumineux, gros pigment noir +/- dispersé	Petit (5-6µm), 6-8 noyaux disposés en rosette. Gros pigment noir au centre

2.2. Réservoir de parasites

L'homme est le principal réservoir de parasites, le seul ayant un intérêt épidémiologique. L'anophèle femelle où se déroule le cycle sexué est considéré comme l'hôte définitif.

2.3. Mode de contamination

Les circonstances de la contamination sont représentées par l'inoculation lors de la piqûre d'anophèles femelles infectées [43].

Il peut aussi se faire par injection de sang provenant de donneurs infectés. Le stade parasitaire infectant est alors le trophozoïte. Ce mode de transmission est observé dans les paludismes post-transfusionnels et chez les toxicomanes.

La transmission peut aussi se faire par voie transplacentaire chez le fœtus, pouvant réaliser un paludisme congénital.

2.4. Vecteurs

Les vecteurs, du paludisme, appartiennent au règne des métazoaires (**Tableau III**). Seules les anophèles femelles peuvent héberger le cycle extrinsèque des parasites [42].

Parmi les plus de 450 espèces d'anophèles, environ 70 à 80 sont vectrices.

Tableau III: Classification des anophèles

Phylum	Arthropodes
Classe	Insectes
Ordre	Diptères
Sous ordre	Nématocères
Famille	<i>Culicidae</i>
Sous famille	<i>Anophelinae</i>
Genre	<i>Anopheles</i>
Espèces	<i>An gambiae ss, An funestus, An arabiensis</i>

Les anophèles mâles se nourrissent exclusivement de suc des plantes.

Seule les femelles sont hématophages.

Le cycle de reproduction comporte quatre stades : trois stades pré-imaginaux aquatiques (œuf, larve, nymphe) et un stade aérien, l'adulte ou imago.

Après fécondation, elles doivent effectuer un repas de sang pour permettre la maturation des œufs qu'elles déposent dans les collections d'eau où ils se transforment en larves puis en nymphes. La durée du cycle de reproduction des anophèles est de 10 jours à 25°C.

La durée du cycle gonotrophique, qui correspond à la période comprise entre deux piqûres de l'anophèle, est de 48 à 72 heures. La durée de vie des femelles est de 2 à 4 semaines.

Les principaux caractères du comportement des anophèles qui interviennent dans leurs rapports avec l'homme sont les suivants:

- préférences trophiques : anthropophilie, amphophilie, zoophilie
- lieu du repas sanguin : endophagie ou exophagie
- lieu de repos : endophilie ou exophilie
- activité dans le nycthémère : nocturne (23H à 3H),
- situation des gîtes larvaires : péridomestique ou dans la nature
- dispersion : la dispersion autour des gîtes conditionne les contacts Homme-anophèle et permet aussi la colonisation de nouveaux gîtes

Les espèces anophéliennes les plus efficaces sont les espèces anthropophiles, endophages, exophiles (car se soustraient à l'action des insecticides intra-domiciliaires) et dont les gîtes larvaires sont péridomestiques.

2.5. Cycle biologique des plasmodies humaines

Le cycle évolutif comprend une phase de multiplication asexuée (schizogonie) et une phase de multiplication sexuée (sporogonie) [37, 43]. Il nécessite 2 hôtes: l'homme, dans l'organisme duquel a lieu la multiplication asexuée et le début de la multiplication sexuée (ou gamogonie); et l'anophèle, dans le corps duquel se termine la sporogonie (**figure1**).

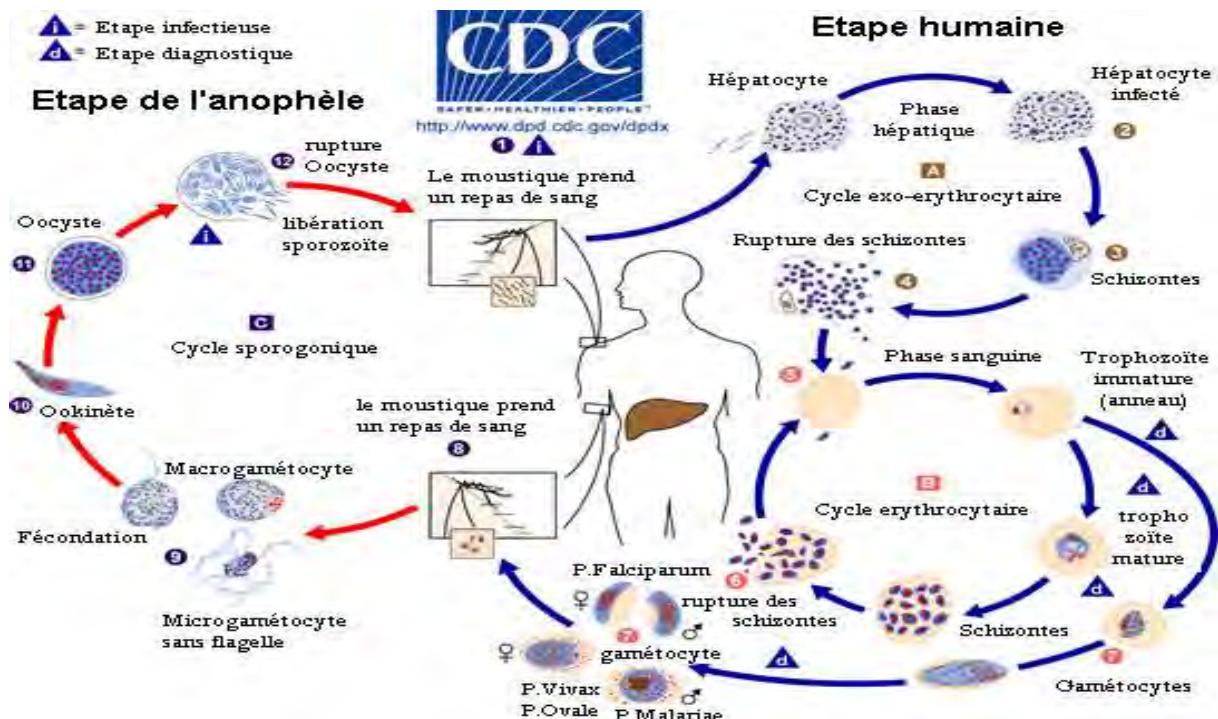


Figure 1: Cycle évolutif du Plasmodium falciparum chez l'homme et l'anophèle

2.6. Indices paludométriques

Ils constituent des indicateurs de l'infection palustre et permettent d'évaluer les niveau d'endémicité de l'infection dans des zones géographiques différentes.

2.6.1. Chez l'Homme

Deux indices permettent de mesurer l'infection plasmodiale chez l'homme

- **L'indice plasmodique (IP)** qui donne une photographie de l'infection dans une population humaine. Il est défini par la proportion de porteurs de formes asexuées des parasites dans le sang périphérique au sein d'une population, à un moment donné, dans une zone géographique déterminée.

Pour classer les régions palustres on se réfère à l'IP selon les propositions de Matselaar et Van Thiel en 1959. Les zones d'endémicité sont classées selon la valeur de l'IP des enfants de 2 à 9 ans comme suit:

- | | |
|------------------------|----------------------|
| - IP inférieur à 10% : | zone hypo-endémique |
| - IP entre 11 et 50% : | zone méso-endémique |
| - IP entre 51 et 75% : | zone hyper-endémique |
| - IP supérieur à 75% : | zone holo-endémique |

- **L'indice splénique (IS)**: c'est le pourcentage d'enfants examinés présentant une splénomégalie. Il est apprécié chez les enfants de 2 à 9 ans non soumis à une chimiothérapie.
- **L'indice gamétocytaire (IG)** qui permet d'évaluer le potentiel parasitaire d'infection de la population humaine. Il est défini par la proportions de porteurs de formes sexuées (gamétocytes) du parasite dans une population, à un moment donné, dans une zone géographique déterminée.

2.6.2. Chez l'anophèle

L'importance du rôle des anophèles dans la transmission est évaluée par deux indices:

- **L'indice sporozoïtique (IS)** qui permet de mesurer le potentiel parasitaire d'infection de la population anophélienne. Il est défini par la proportion d'anophèles femelles ayant des sporozoïtes dans les glandes salivaires. On détermine préférentiellement cet indice chez les femelles d'anophèles capturées sur homme.
- **Le taux d'inoculation entomologique (TIE)** est un indicateur de la transmission de l'infection. Il est défini par le nombre de piqûres infectées d'anophèles reçues par un individu dans une unité de temps déterminée (**PI/H/an**). Il est le meilleur indicateur de la dynamique de la transmission du paludisme. Selon le niveau de la transmission, les zones d'endémicité ont été classées dans la zone afro-tropicale en Facies épidémiologiques (Mouchet, 1993).
- **L'indice oocystique (IO):** c'est le pourcentage d'anophèles disséquées hébergeant des oocystes.

2.7. Facteurs favorisants

- ✓ Facteurs environnementaux: Température et humidité élevées, Pluviométrie, présence de gîtes larvaires,
- ✓ Facteurs socioéconomiques: Faible niveau de développement
- ✓ Facteurs anthropiques: Irrigations, bassins de rétention, aménagements,

2.8. Répartition géographique

Le paludisme sévit à l'état endémique du 35^{ème} degré de latitude nord au 25^{ème} degré de latitude sud (**figure 2**) [17, 39, 41].

- En Afrique, le paludisme sévit en Afrique du nord sous formes de foyers où existent surtout *P. vivax*, et très rarement *P. malariae*. Il est endémique dans toute l'Afrique intertropicale où l'on rencontre *P. falciparum* responsable de 80 à 100% des accès, *P. malariae* et plus rarement *P. ovale*. *P. vivax* est quasi absent sauf à Madagascar.
- En Amérique, on le trouve en Amérique centrale et en Amérique du sud, dans la zone amazonienne. *P. falciparum* et *P. vivax* est le plus souvent en cause.
- En Asie, il existe pratiquement partout (Moyen Orient, Inde, Indonésie, Asie centrale et du sud-est) où prédominent *P. falciparum* et *P. vivax*.

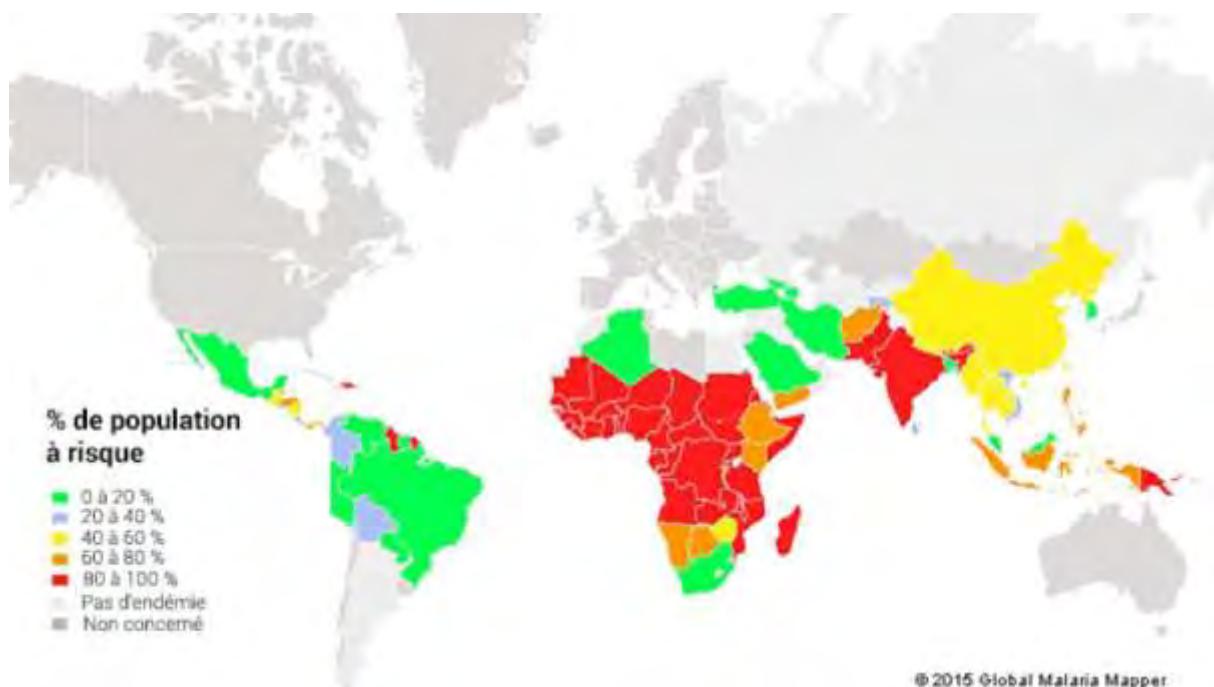


Figure 2: Répartition du paludisme dans le monde

2.9. Immunité dans le paludisme

2.9.1. Immunité innée

L'immunité innée se distingue de l'immunité acquise par le fait qu'elle s'active très rapidement, sans immunisation, sans vaccination préalable. Elle se met en place dès le début de toute infection et se maintient jusqu'à la mise en place de l'immunité acquise. L'immunité innée est ainsi considérée comme la première ligne de défense de l'organisme. Elle aide à la mise en place de l'immunité acquise qui est plus ciblée et spécifique du pathogène.

Elle se voit chez les porteurs d'hémoglobinopathies: **HbAS, Thalassémie, hémoglobine foetale**

L'hémoglobine S et C protègent des formes sévères par diminution de la cytoadhérence des hématies parasitées. Le groupe sanguin O diminue le rosetting.

2.9.2. Immunité acquise : Prémunition

C'est une immunité acquise progressivement dans le temps en 5 ans et plus (au prix d'une mortalité infantile élevée), labile, qui disparaît en 12 à 24 mois chez le sujet immun qui quitte la zone d'endémie.

Les populations semi-immunes sont ainsi moins sujettes aux accès simples et mieux protégées contre l'évolution vers un accès grave.

Elle n'empêche pas la présence de parasites dans l'organisme : c'est justement cette présence régulière, renouvelée ou renforcée à chaque piqûre infectante qui la fonde. Plus la transmission du paludisme dans une zone est importante, c'est-à-dire plus les piqûres infectantes sont nombreuses, plus la prémunition développée par la population sera forte.

La prémunition fait totalement défaut aux sujets « neufs », expatriés et voyageurs venant de zones sans paludisme, et en zone d'endémie palustre, partiellement défaut aux femmes enceintes, aux enfants, aux personnes atteintes de déficits immunitaires (VIH notamment) et les splénectomisés. Elle est également peu développée chez les sujets vivant en zone de paludisme instable.

Elle est incomplète et transitoire. Elle persiste seulement par les ré-infestations en un temps variable selon les faciès épidémiologiques.

3. DIAGNOSTIC DU PALUDISME

3.1. Diagnostic clinique

3.1.1. Accès simple de primo-invasion

Il survient chez les sujets non immuns, enfants de 4 mois à 4 ans en zone d'endémie de paludisme stable.

La symptomatologie clinique de l'accès palustre simple est celle d'une gastro-entérite fébrile céphalalgique:

- fièvre > 39°C, continue en plateau ou rémittente,
- malaise général : céphalées, sueurs, frissons, myalgies,
- troubles digestifs : anorexie, nausées, vomissements, diarrhée.

L'accès simple, correctement et rapidement traité, évolue vers la guérison en 48 heures [3, 9, 24]. En l'absence de traitement la fièvre persiste et évolue vers l'accès de reviviscence schizogonique.

3.1.2. Accès de reviviscence schizogonique à fièvre périodique

Ils sont liés à l'éclatement synchrone de schizontes mûrs.

Ils sont caractérisés par une fièvre intermittente dont la périodicité dépend de l'espèce en cause :

- Pour *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* elle est de 48 heures (fièvre tierce)
- Pour *P. malariae* elle est de 72 heures (fièvre quarte).

Le déroulement des accès est stéréotypé [4] :

- Frissons qui durent une heure au cours de laquelle la température augmente
- Chaleur, période de 3 à 4 heures pendant laquelle la température continue de s'élever jusqu'à 40-41°C
- Sueurs qui durent de 2 à 4 heures au cours desquelles se produit une défervescence, la température tombant < 37°C, avec parfois une hypothermie.

Le traitement amène une guérison rapide.

Des rechutes ou accès de reviviscence tardive peuvent survenir dans un délai de 2 à 5 ans en cas d'infection à *P. ovale* et *P. vivax*. Des recrudescences ont été observées dans un délai de plus de 10 ans pour *P. malariae*. Elles sont exceptionnelles pour *P. falciparum*.

En cas d'infection à *P. falciparum*, en l'absence de prise en charge thérapeutique rapide et efficace, l'évolution peut se faire à tout moment vers un paludisme grave (d'où le nom de fièvre tierce maligne). C'est un tableau de neuropaludisme avec convulsions, splénomégalie, pâleur des muqueuses (traduction de l'hémolyse aiguë) et hépatomégalie.

3.1.3. Paludisme de la femme enceinte

Tout paludisme chez une femme enceinte doit être pris en charge rapidement pour éviter les complications materno-fœtales. Lorsqu'il s'accompagne de vomissements il doit être considéré comme un paludisme grave.

La fièvre reste le maître symptôme de l'infection. Les motifs de consultations sont médicaux dans la moitié des cas : fièvre isolée ou associée à des vomissements, ictere, anémie.

Mais ils peuvent aussi être obstétricaux : la fièvre est alors associée à une manifestation obstétricale : par ordre de fréquence des contractions utérines, une rupture prématurée des membranes, des métrorragies ou plus rarement une éclampsie.

3.2. Diagnostic biologique

3.2.1. Modifications hématologiques et biochimiques non spécifiques

Les modifications hématologiques concernent les trois lignées sanguines :

- ✓ Diminution du taux d'hémoglobine : anémie normochrome, mais souvent hypochrome à cause des carences nutritionnelles associées chez les enfants en zone intertropicale
- ✓ Hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles chez l'enfant, parfois présence de myéloblastose, puis monocytose. La présence de polynucléaires et/ou mononucléaires pigmentés (contenant de l'hémozoïne) est fréquemment observée. Elle est associée au paludisme grave mais peut aussi témoigner d'un accès palustre traité.
- ✓ Thrombopénie (une thrombopénie < 150000 plaquettes/ μ L de sang est souvent associée au paludisme et < 100000/ μ L au paludisme sévère).

Les modifications des constantes biochimiques portent sur les fonctions hépatiques et rénales et dépendent de la gravité du paludisme:

- Élévation des transaminases hépatiques
- Augmentation de la bilirubinémie
- Hypoglycémie

3.2.2. Diagnostic parasitologique

✓ Prélèvements

Le prélèvement sanguin est réalisé au moment de l'accès thermique par piqûre au bout du doigt ou par ponction veineuse dans un tube contenant un anticoagulant (par exemple EDTA).

✓ Technique

Elle repose sur l'examen microscopique d'un frottis sanguin (FS) mince ou épais et/ou d'une goutte épaisse (GE) colorés par le Giemsa.

Le FS a l'avantage de pouvoir être coloré et lu rapidement. La GE permet une concentration parasitaire. Les délais de coloration et de lecture sont plus longs. Le résultat d'un FS peut être obtenu en quelques minutes, celui d'une GE requiert au moins 30 minutes.

✓ Résultats

L'examen du FS et de la GE permet de mettre en évidence les formes sexuées et asexuées des parasites intra-érythrocytaires et de porter un diagnostic d'espèce plasmodiale. La fiabilité du résultat nécessite un technicien bien entraîné, et un équipement de bonne qualité.

Pour faire le diagnostic d'espèce des plasmodies plusieurs caractéristiques sont prises en compte : la taille et les modifications morphologiques de l'hématie-hôte d'une part et, d'autre part les caractéristiques des hématozoaires. Le stade (ou les stades) évolutif(s) des parasites, leur forme, l'abondance et l'aspect de l'hémozoïne ou pigment palustre, l'aspect morphologique des différents stades évolutifs, trophozoïtes, schizontes et gamétocytes sont étudiés pour aboutir au diagnostic d'espèce. (**Figure 3**)

L'examen révèle la présence soit de trophozoïtes, soit de trophozoïtes avec des gamétocytes, soit de gamétocytes seuls ne signe pas l'accès palustre. Elle témoigne soit d'un traitement récent pour un accès palustre, soit de la circulation des gamétocytes chez l'hôte, réservoir de parasites.

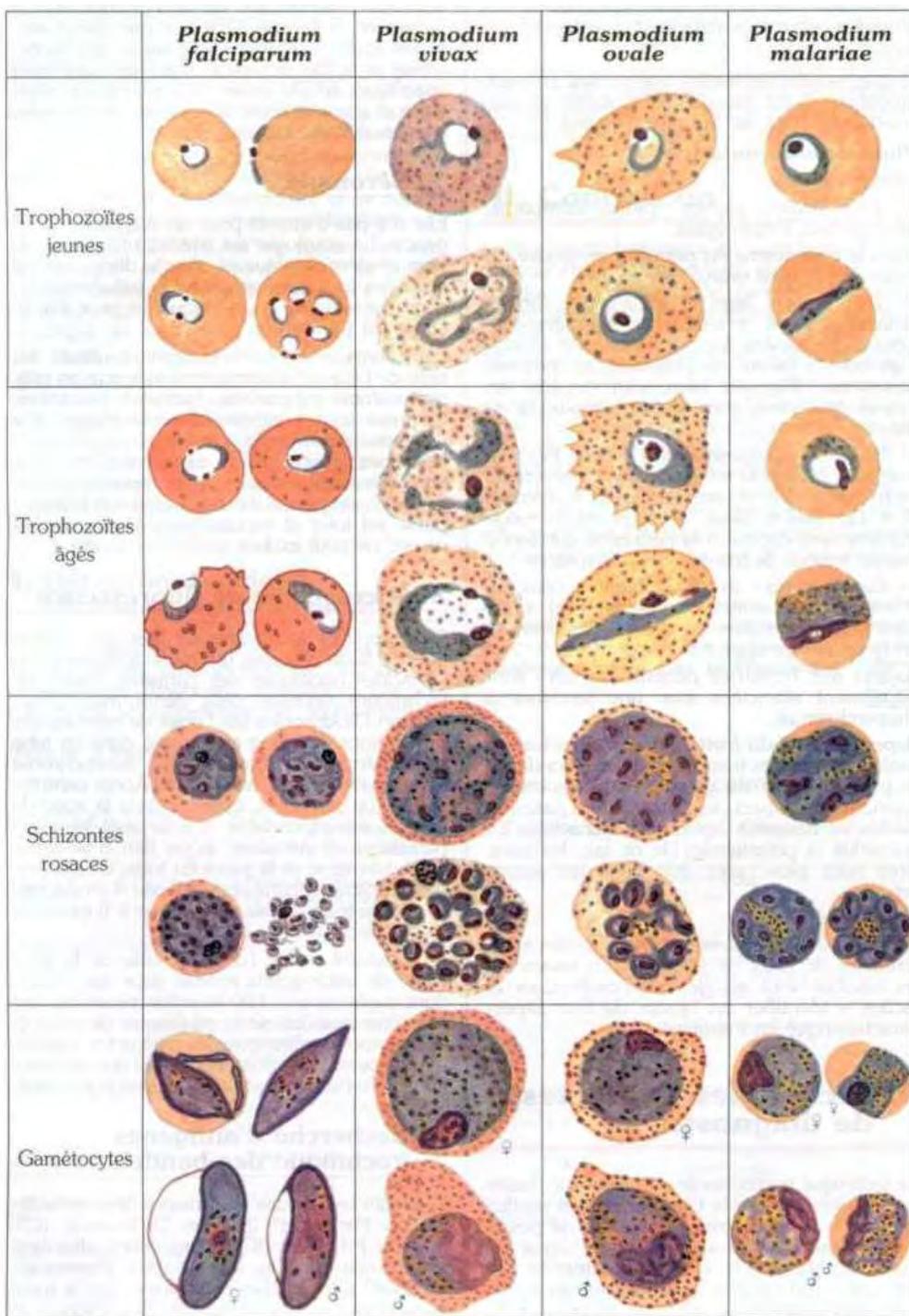


Figure 3: diagnostic différentiel des espèces plasmodiales à la microscopie

✓ Intérêt

Il permet un diagnostic de certitude du paludisme.

La numération des formes asexuées (trophozoïtes) de *P. falciparum* sur le FS ou la GE avant l'administration du traitement antipaludique est indispensable, non seulement pour le

diagnostic, mais aussi pour la classification de l'accès palustre et le suivi des échecs thérapeutiques.

3.2.3. La technique microscopique par fluorescence

La coloration fluorescente des acides nucléiques par l'acridine orange : le malaria-test QBC (quantitative buffy-coat) (**Figure 4**). Cette technique nécessite un équipement particulier. Sa sensibilité est de 5 hématies parasitées/ μL [32, 49].

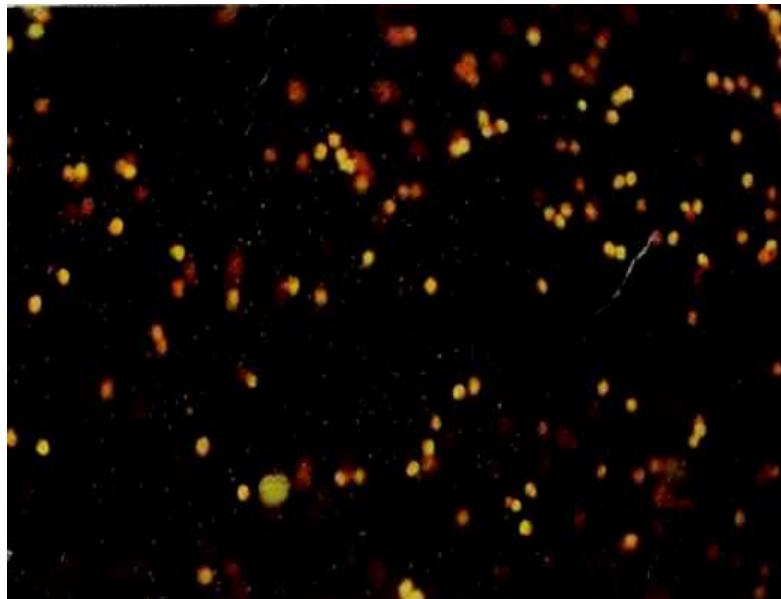


Figure 4: Recherche de plasmodium par la technique QBC Malaria

3.2.4. Diagnostic immunologique spécifique

- ✓ **Recherche d'antigènes par immunochromatographie (Tests de Diagnostic Rapide, TDRs)**

➤ Principe

Ils se sont basées sur la mise en évidence soit de l'Histidine Rich Protein 2, spécifique de *P. falciparum*, soit de la Lactate Déshydrogénase du parasite, soit de l'Aldolase [10].

Des anticorps monoclonaux dirigés contre ces enzymes sont fixés sur une bandelette de nitrocellulose. Après la mise en contact avec le sang, la présence de l'antigène est visualisée par action d'un deuxième anticorps révélateur (mono ou polyclonal selon le test utilisé).

La réponse est rapide (moins de 15 minutes), visuelle sous forme d'un trait sur la bandelette et ne nécessite donc pas d'être réalisée par un technicien qualifié (**Figure 5**).

Le prélèvement est identique à celui effectué pour la réalisation d'un FS, par ponction de sang capillaire au bout du doigt.

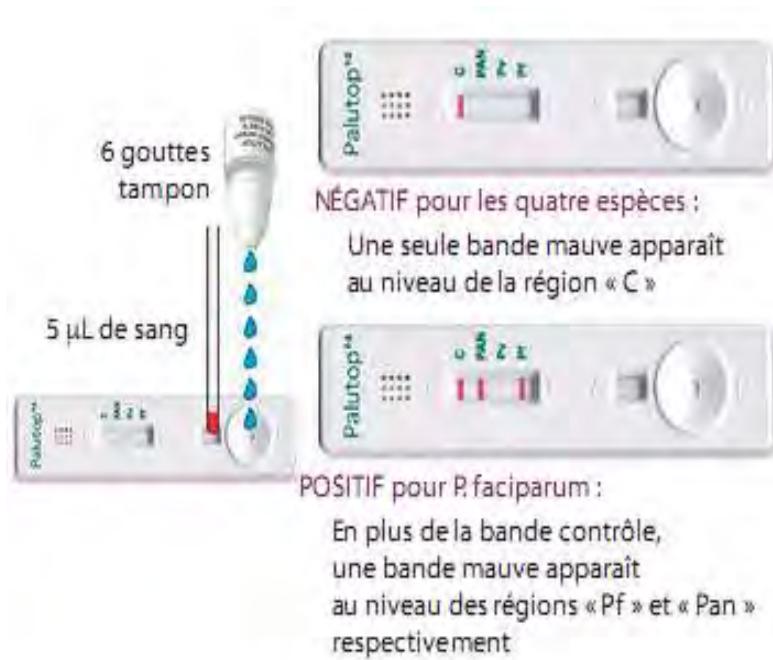


Figure 5: Exemple de test de diagnostic rapide de paludisme

➤ Les antigènes détectés

- **HRP2** (Histidine Rich Protéine 2) est une glycoprotéine spécifique de *P. falciparum*. Présente dans la membrane et le cytoplasme du parasite, elle est aussi sécrétée et se retrouve dans le plasma [11]. Elle est produite uniquement par les formes asexuées et les gamétocytes jeunes [12]. En revanche, cette glycoprotéine peut persister plus de 15 jours dans le sang périphérique après un traitement bien conduit, ce qui exclut une surveillance post-traitement basée sur sa détection [13]. Les premiers anticorps monoclonaux anti-HRP2 étaient des IgG, ce qui a conduit à de faux diagnostics positifs en présence de facteurs rhumatoïdes [14]. Avec les tests actuels, ce phénomène a été drastiquement réduit par utilisation de monoclonaux IgM. La sensibilité des TDR est de l'ordre de 100 parasites/µL. Cette sensibilité est variable car la production d'HRP2 peut varier selon les clones parasitaires, de surcroît, il existe des variantes antigéniques, expliquant certaines baisses d'affinité de l'anticorps monoclonal anti-HRP2. Ils seraient plus fréquents dans la zone Asie-Pacifique [15].
- **pLDH** (Plasmodium lactate déshydrogénase) est une enzyme glycolytique produite par les formes asexuées et sexuées de tout âge [16]. Son activité est proportionnelle à la parasitémie, et sa clairance rapide rend possible le suivi post-thérapeutique [17]. Il existe

plusieurs iso- enzymes de la pLDH. Les trousse commerçales détectent la pLDH de *P. falciparum*, celle de *P. vivax*, ainsi que la Pan pLDH commune aux quatre espèces. Leur sensibilité pour la détection de *P. falciparum* et *P. vivax* serait de l'ordre de 100 à 300 parasites/ μL , comparable à celle du frottis et donc acceptable [18]. En revanche, leur pouvoir de détection des paludismes à *P. ovale* et *P. malariae* est médiocre [19]. En conséquence, il n'est pas rare, en cas d'infection par une de ces deux espèces, d'avoir un frottis positif et un test immuno-chromatographique négatif.

- **Aldolase** est une enzyme du cycle glycolytique des plasmodes. Parmi les différentes iso enzymes existantes, seule celle de *P. vivax* et celle commune aux quatre espèces sont détectées. Concernant le paludisme à *P. vivax*, les tests détectant l'aldolase apparaissent moins performants que ceux recherchant les pLDH. Pour les infections à *P. ovale* et *P. malariae*, la détection de la pan-al dolase a de mauvaises performances, similaires à celles obtenues avec la recherche des pLDH parasitaires

➤ Techniques

Plusieurs techniques sont disponibles actuellement: Parasight[®], ICT Malaria P.f. Test[®], OptiMal[®], SD antigen[®], SD Bioline Malaria[®]. Certains tests ne mettent en évidence que *P. falciparum*, alors que d'autres permettent le diagnostic des quatre espèces.

➤ Résultats

La sensibilité des TDRs est bonne, en comparaison avec la GE, pour des parasitémies > 50/ μL de sang (**Tableau IV**). Actuellement, de nombreux tests sont mis sur le marché. Ils doivent être validés avant d'être mis à la disposition des structures de santé en terme de sensibilité et de spécificité.

Tableau IV: Sensibilité des différentes méthodes diagnostiques du paludisme

Méthode	Seuil de détection de la parasitémie pour <i>P. falciparum</i>	
	Nombre de parasites/ μL	Pour 100 hématies
Frottis (20 min/200 champs)	100	0,002
Goutte épaisse (n champs/500 leucocytes)	10-50	0,0002-0,001
QBC malaria	10-50	0,0002-0,001
Antigène HRP-2 ¹ (<i>P. falciparum</i>)	100	0,002
pLDH ¹ (panmalariaque) ± pfLDH ¹ (<i>P. falciparum</i>)	100-150	0,002-0,01
Aldolase ¹ (panmalariaque)	500	0,01
PCR	5	0,0001

➤ Intérêt

Ils permettent un diagnostic rapide du paludisme ne nécessitant aucun équipement lourd. Leur réalisation n'exige pas de technicien bien entraîné mais requiert seulement une formation qui ne demande pas de compétences particulières. L'intérêt du test de détection de la LDH est de permettre un suivi de l'évolution de la maladie après traitement car il n'est positif que si les parasites sont vivants. Bien que le coût reste, pour certains, encore très élevé, une bonne utilisation des TDRs permettrait d'éviter les diagnostics de paludisme par excès dans les fièvres et diminuerait la charge financière des traitements administrés inutilement.

✓ Recherche des anticorps spécifiques

Elle n'a aucun intérêt pour le diagnostic d'urgence. Elle est réservée aux enquêtes épidémiologiques et à la détection du paludisme dans les poches de sang avant la transfusion.

Elle a une utilité pour le diagnostic du paludisme viscéral évolutif (PVE) [18].

L'immunofluorescence indirecte, en utilisant comme antigène des frottis sanguins de sujets parasités, est la technique la plus courante.

3.2.5. Diagnostic moléculaire

✓ La PCR

C'est la technique la plus sensible qui permet de détecter de très faibles parasitoses de l'ordre de 0.3 parasite/ μ l de sang avec une possibilité de quantification de l'ADN plasmodial. Elle est d'un apport appréciable dans l'identification des espèces plasmodiales, le suivi post-thérapeutique et l'étude des gènes impliqués dans la résistance aux antipaludiques. Ses exigences en matériel et son coût font qu'elle soit encore réservée aux laboratoires spécialisés.

✓ Amplification isotherme de l'ADN induite par boucle: LAMP

Il s'agit d'un test moléculaire qui s'appuie sur la technologie *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP - technologie d'amplification isotherme médiée par des boucles) qui amplifie l'ADN et détecte la présence du parasite du paludisme [25]. Il est simple et rapide et peut se réaliser sur l'Illumipro-10TM (*Illumigene® Malaria*) [33].

4. TRAITEMENT DU PALUDISME [6, 12, 13, 45]

4.1. Traitement du paludisme simple

Le traitement repose sur les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA).

Les CTA utilisés sont peu nombreux: Artésunate-Amodiaquine (AS-AQ); Artéméther-Luméfantrine; Artésunate-Méfloquine. Ces médicaments sont indiqués exclusivement à visée curative. Le traitement se fait en trois jours et la dose est fonction de la CTA.

4.2. Traitement du paludisme grave et compliqué

Artésunate 2,4 mg/kg de poids corporel administrés par voie intraveineuse (IV) ou intramusculaire (IM) à l'admission ($t = 0$), puis 12 h et 24 h plus tard et, par la suite, une fois par jour jusqu'à ce que le patient puisse prendre ses médicaments par voie orale.

Si l'on n'a pas d'artésunate injectable, il peut être remplacé par l'artéméther ou la quinine [41] :

- Artéméther : 3,2 mg/kg de poids corporel à l'admission puis 1,6 mg/kg par jour
- Dichlorhydrate de quinine : 20 mg de sel de quinine/kg (dose de charge) à l'admission, puis 10 mg/kg toutes les 8 h.

5. PROPHYLAXIE DU PALUDISME

5.1. Chimio prophylaxie

5.1.1. Chimioprophylaxie des expatriés et des voyageurs

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

La durée de la chimio prophylaxie a été modifiée : jusqu'ici limitée aux trois premiers mois de séjour, elle a été prolongée à six mois.

5.1.2. Traitements préventifs intermittents

Les traitements préventifs recommandés par l'OMS comprennent le traitement préventif intermittent (TPI) pour les femmes enceintes, le traitement préventif intermittent des enfants (TPIn), et la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS). L'objectif de ces interventions est de prévenir l'infection palustre en conservant des taux sanguins thérapeutiques pendant la période où le risque de transmission est le plus élevé.

5.2. Lutte antivectorielle

- ✓ Aménagements de l'environnement destiné à diminuer le nombre de gîtes anophéliens ;
- ✓ Aspersions intra-domiciliaires d'insecticides à effet rémanent ;
- ✓ Moustiquaires imprégnées d'insecticides (deltaméthrine, perméthrine);
- ✓ Ports de vêtements imprégnés de perméthrine (utilisés par les armées);
- ✓ Répulsifs (insecticides ou répellents). Beaucoup de répulsifs sont disponibles sur le marché. Deux produits sont recommandables en pratique : le DEET et le KBR 3023.
- ✓ Technique de l'insecte stérile : elle permet l'éradication ou la diminution d'une population d'insectes, les mâles irradiés par un rayonnement gamma (bombe au Cobalt 60) deviennent sexuellement stériles à cause de mutations dominantes au niveau du sperme.

5.3. Vaccination

Les vaccins candidats sont basés sur les divers antigènes issus des différents stades du cycle évolutif parasitaire [2]:

- ✓ Vaccin anti-stade pré-érythrocytaire: le vaccin RTS, S/AS01 (Mosquirix®); le plus avancé des vaccins, actuellement en phase 3 de test [1];
- ✓ Vaccin anti-stade sanguin asexué: (vaccin MSP/RESA);
- ✓ Vaccin bloquant la transmission.

Les antigènes variant de surface (AVS) exprimés par les parasites adhérents au placenta (AVS-PAP) sont des candidats prometteurs pour une vaccination spécifique contre le paludisme de la femme enceinte [7, 21, 46, 48, 50, 53].

METHODOLOGIE

1. CADRE DE L'ETUDE

L'étude a été menée aux niveaux des postes de santé de Mako (zone méso-endémique avec taux de prévalence parasitaire > 10%) et de Keur Socé (zone hypo-endémique avec taux de prévalence parasitaire < 10%).

1.1. Poste de santé de Keur Socé

Il est situé dans la zone de responsabilité du district sanitaire de Ndoffane, dans la zone centre du Sénégal, à environ 20 kilomètres de la ville de Kaolack (**Figure 6**).

Le climat est de type soudano-sahélien avec des températures oscillantes entre 24°C et 40°C ; des extrêmes de 15°C en janvier et 44°C en juillet. La pluviométrie est en moyenne de 632,7 millimètres par an.

La transmission du paludisme au niveau de cette localité est strictement saisonnière, durant la saison pluvieuse. Les principaux vecteurs appartiennent au complexe *Anopheles gambiae*.

La zone de Keur Socé présente un relief plat avec des dépressions inondables en saison pluvieuse constituant de potentiels gîtes larvaires pour les anophèles. Dans cette localité sévit un paludisme saisonnier avec une recrudescence pendant l'hivernage.

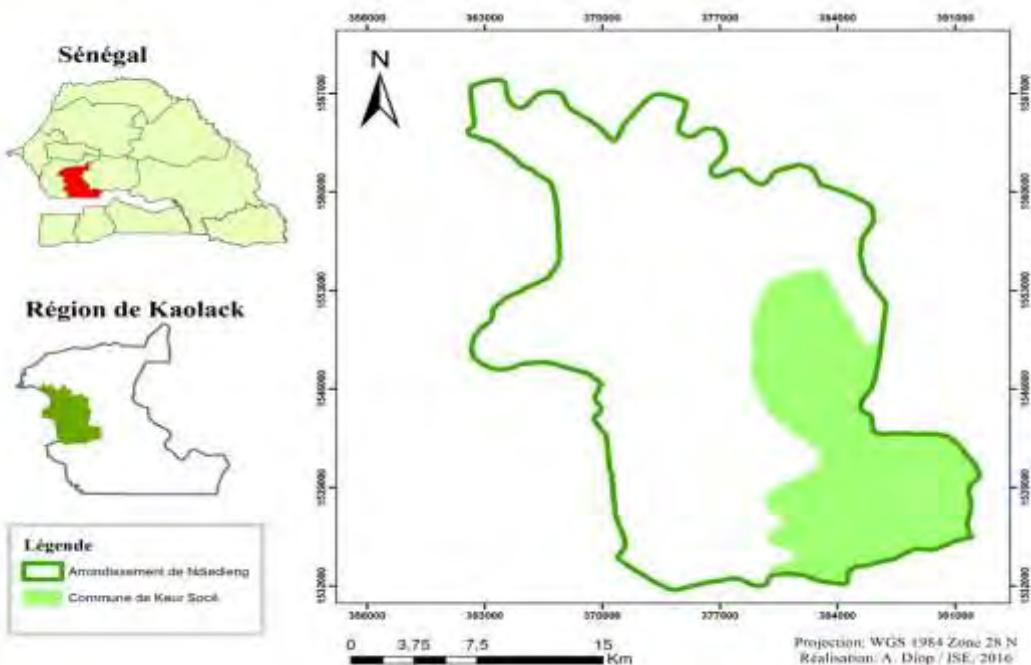


Figure 6: Situation géographique de Keur Socé

1.2. Poste de santé de Mako

Le site à transmission élevée choisi était le poste de Santé de Mako. Il appartient au District Sanitaire de Kédougou qui est situé dans le département de Kédougou qui fait office de chef-lieu de région. Il a une superficie de 6149 km² et une densité de 10,6 hbts/Km². Ce département est situé à l'extrême sud-est du Sénégal (**Figure 7**).

La zone est constituée principalement de pistes souvent non praticables durant l'hivernage. Topographiquement, le district de Kédougou présente un relief très accidenté, c'est une succession de plateaux, de cours d'eau, de cascades et de collines. Le réseau routier est défectueux, les routes nationales ainsi que les routes secondaires et les pistes sont en très mauvais état. Les moyens de transport sont rares. Pendant la saison des pluies, certains villages restent isolés pendant plus de trois mois.

La zone est comprise dans les zones climatiques soudano sahélienne et soudano guinéenne, avec une moyenne pluviométrique de 1199,7 mm/an, la plus élevée du Sénégal après Ziguinchor. La saison des pluies dure 4 à 5 mois. Il est soumis au Harmattan d'Octobre à Avril.

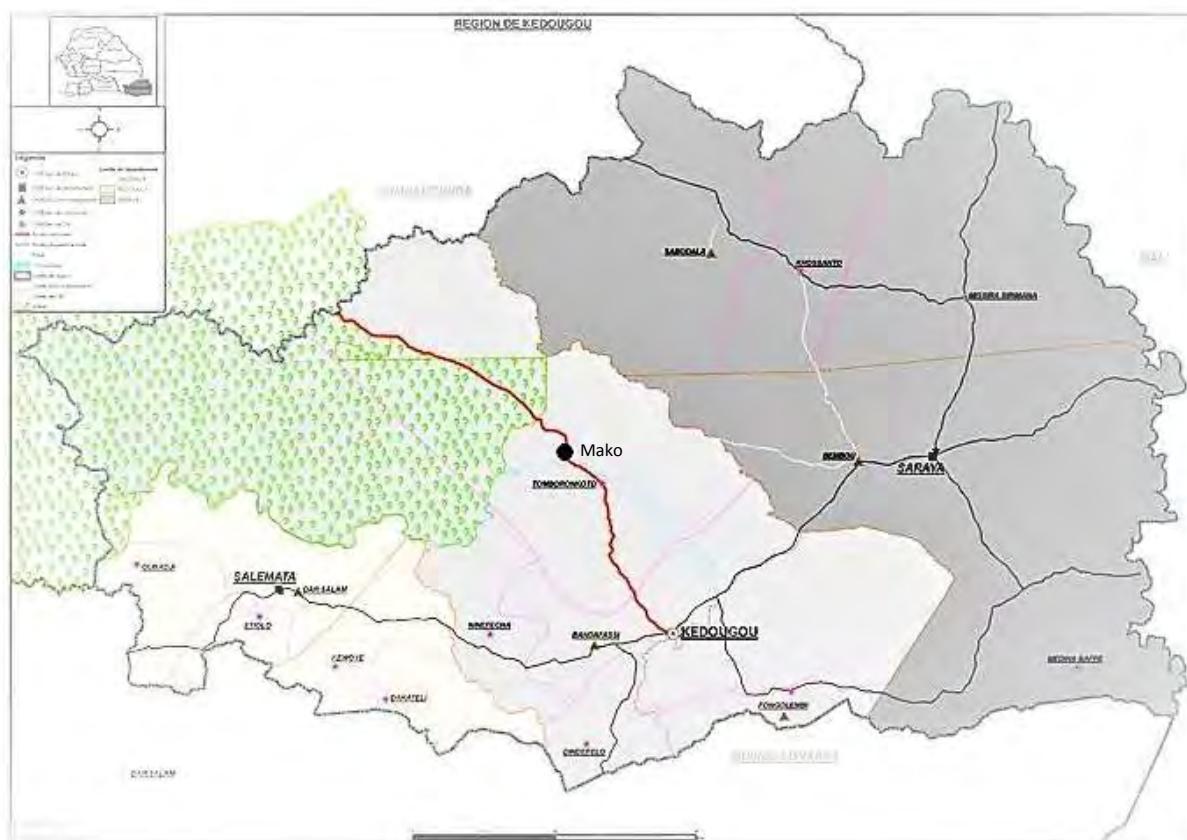


Figure 7: Situation de Mako dans la région de Kédougou

2. TYPE ET PERIODE D'ETUDE

Il s'agissait d'une étude longitudinale qui s'est déroulée du 2 octobre au 9 décembre 2017.

3. POPULATION D'ETUDE

3.1. Taille de l'échantillon

La taille de l'échantillon de la population retenue pour l'étude a été fixée à 120 individus, avec un ratio de 1:1 entre les zones de transmission élevée et les zones de faible transmission.

Il n'y a pas de vérification d'hypothèse associée à cette étude et, par conséquent, aucun calcul de taille de l'échantillon n'a été fait. Le choix de la taille retenue est fondé sur la nécessité de produire des données liées à la persistance d'HPR2 à partir d'un nombre relativement élevé d'individus pour générer des résultats présentant une bonne validité externe.

3.2. Critères d'inclusion

Etaient inclus dans l'étude des individus:

- Agés de 10 ans ou plus
- Les femmes non-enceintes
- Présentant une infection à *P. falciparum* confirmée par TDR et microscopie
- Avec une parasitémie inférieure à 100,000 p/ μ L
- Ne présentant pas de paludisme compliqué

3.3. Critères de non inclusion

Etait exclus dans cette étude tout individu:

- De moins de 10 ans
- Toute femme enceinte
- Avec un TDR négatif et/ou une microscopie négative
- Avec une parasitémie égale ou supérieure à 100,000 p/ μ L
- Avec un paludisme sévère

3.4. Critères d'exclusion

- Etaient exclus de l'analyse des données les participants:
- Perdus de vue
- Présentant une recrudescence ou une réinfection
- Ayant retiré leur consentement
- Ayant une délétion *Pf*HRP2/3

4. COLLECTE DE DONNEES

4.1. Outils de collectes

L'outil de collecte de données était représenté par le formulaire de rapport de cas (CRF) qui était destinée à recueillir les informations sociodémographiques et biologiques des patients.

4.2. Suivi des sujets

Chaque participant s'est vu attribuer des rendez-vous de suivi au deuxième jour suivant le recrutement (J2), à J4, J6, J10, J14, J18, J22, J26, J30, J34, J38, J42, D42, J46, J50, J54, J58 et J62. A chacune de ces visites de suivi, un échantillon de sang capillaire a été recueilli au doigt afin d'effectuer immédiatement deux TDR (standard et haute sensibilité) et un frottis sanguin (approximativement une goutte de sang). Deux confettis de sang séché (correspondant approximativement à deux gouttes de sang) ont été également préparés.

En cas de résultat négatif du TDR-HS après trois visites de suivi consécutives, le suivi est interrompu pour le participant concerné.

5. MATERIELS ET METHODES DE LABORATOIRE

5.1. Tests de diagnostic rapide

Le TDR standard (SD), actuellement recommandé au Sénégal, est le TDR utilisé pour cette étude: SD Bioline Malaria Ag *P.f*(05FK50).

Le TDR HS est l'Alere™ Malaria Ag *P.f* Ultra Sensitive (05FK140): c'est un test *in vivo*, qualitatif ultra sensif permettant de détecter de très faible concentration de HRP2 à l'ordre de 0.08 ng/ml. Il a une sensibilité de 99% et une spécificité de 98.6% (IC 95%).

Les TDR ont été utilisés conformément aux instructions du fabricant et les résultats ont été enregistrés qualitativement comme positifs ou négatifs.

5.2. PCR

L'échantillon de sang recueilli dans le papier filtre de Watman a été centralisé en laboratoire. L'ADN de *P. falciparum* a été extrait du papier filtre Watman par la méthode chelex décrite par Wooden [54]:

- Porter des gants stériles pour minimiser les contaminations.
- Numéroter les tubes de 500 µl conformément aux numéros des papiers filtres à traiter.
- Avant de découper les confettis de sang suivant il faut:
 - ✓ Toujours nettoyer les ciseaux avec de l'alcool et de l'eau stérile.
 - ✓ Sécher les ciseaux avec du coton.
- Découper approximativement 3mm² des confettis et le placer dans le tube Eppendorf correspondant.
- Ajouter 0,8 ml de saponine 0,5% (soit 0,5g de saponine dans 100 ml d'eau distillée)
- Centrifuger les tubes à 150 tours pendant 10 minutes.
- Fermer les tubes et laisser incuber durant toute la nuit à température ambiante
- Enlever le surnageant et laver 2 fois avec du PBS 1X pendant 5minutes
- Ajouter 150 µl d'eau et 75µl de chelex 20% dans chaque tube (5g de chelex dans 25ml d'eau).
- Chauffer les tubes sur plaque pendant 8 minutes à 100°C en les vortexant toutes les 4 minutes.
- Laisser refroidir les tubes puis centrifuger au maximum pendant 5 minutes
- Transvaser le surnageant qui contient l'ADN dans de nouveaux tubes en prenant soin de noter tous les numéros.
- Stocker les ADN ainsi extraits dans un congélateur à -20°C après les avoir refroidi à la température ambiante.

Les échantillons d'ADN extraits ont été amplifiés par une PCR quantitative avec l'appareil Apply Biosystem 7300 en utilisant:

- ✓ Amorces sens (5'GTAATTGGAATGATAGGAATTACAGGT3')
- ✓ Amorces anti-sens (5'TCAACTACGAACGTTAACTGCAAC3')
- ✓ Sonde TaqMan® (5'-FAM-AACAATTGGAGGGCAAG-NFQ-MGB-3') spécifique des gènes de l'ARN ribosomique 18S multicopie.

Chaque réaction de 25 µl contient:

- 5,0 µl d'eau Milli-Q;
- 1,0 µl d'amorces 18S Pf Forw (stock 10µM)
- 1,0 µl d'amorces 18S Pf Rev (stock 10µM)
- 0,5µl d'une sonde TaqMan®,
- 12,5µl de l'Universal Probe PCR Master Mix (2x),
- 5µl d'échantillons.

Le programme qPCR défini dans la machine Apply Biosystem 7300 comprenait les étapes suivantes:

- Etape AMPerase: 50°C pendant 2 minutes,
- Dénaturation: 95°C pendant 10 minutes,
- Cyclage (dénaturation): 95°pendant 15 secondes
- Hybridation et extension: 60°C pendant 1 minute
- Répétez le cycle 45 fois.

Chaque plaque de PCR comprenait 2 réplicats d'eau en tant que contrôle sans matrice (NTC), 2 réplicats de chaque étalon et les échantillons d'ADN extraits également en double.

5.3. Test de HRP2 Luminex

Un test Luminex développé à ISGlobal a été utilisé pour la détection et la quantification de HRP2 à partir de taches de sang séché (DBS).

6. SAISIE, ANALYSE ET GESTION DES DONNEES

6.1. Saisie et Analyse des données

Les données obtenues au cours de notre étude ont été analysées par Excel et le logiciel Stata. Les variables quantitatives ont été décrites en termes de moyenne, médiane, écart-type et interquartile. Des comparaisons intergroupes ont été effectuées en utilisant le test Anova ou Mann-Withney en fonction des conditions d'application. Les variables qualitatives ont été décrites en termes d'effectif et de pourcentage. Le seuil de signification des tests statistiques était de 5 %.

6.2. Gestion des données

A la fin de l'étude, tous les cahiers d'observation étaient acheminés au service de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Dakar. Les données sources étaient conservées sous la responsabilité de l'investigateur principal qui devrait prendre toutes les mesures nécessaires

pour empêcher toute destruction accidentelle ou prématuée de ces documents. L'investigateur conserve tous les enregistrements et toutes les données source pendant quinze (15) ans à compter de la date de fin de l'étude. Les lames de GE et frottis et les papiers filtres réalisés pour PCR seront conservées pour la même durée.

7. ASPECTS ETHIQUES

Le protocole de notre étude avait été soumis et approuvé par le Comité National d'éthique de Recherche en Santé (CNERS) le 16 août 2017.

Cette étude a été réalisée conformément au texte de la Déclaration d'Helsinki adopté par la 18^{ème} Assemblée Médicale Mondiale en 1964 et à ses amendements et aux Bonnes pratiques cliniques issues de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation (CIH -BPC) E6(R1).

RESULTATS

RÉSULTATS

1. LA POPULATION DE L'ETUDE

Un total de 120 personnes a été inscrit à l'étude, 60 à chaque site. Le recrutement et le suivi sont résumés à la **figure 8**. En raison d'une perte de vue ou d'un retrait de consentement 13 personnes ont été exclues de l'étude laissant un total de 107 personnes suivies. Parmi celles-ci, un certain nombre d'individus ont été exclus de l'analyse finale soit en raison d'échantillons manquants ($n=1$), de suspicion de délétion de *PfHRP2* ou de *PfHRP3* ($n=11$), de recrudescence ou de réinfection démontrée par un deuxième pic de HRP2 après J2 ($n=7$) ou combinaison de ces observations ($n=1$). Au total, à ce stade, 87 individus ont été inclus pour l'analyse des données.

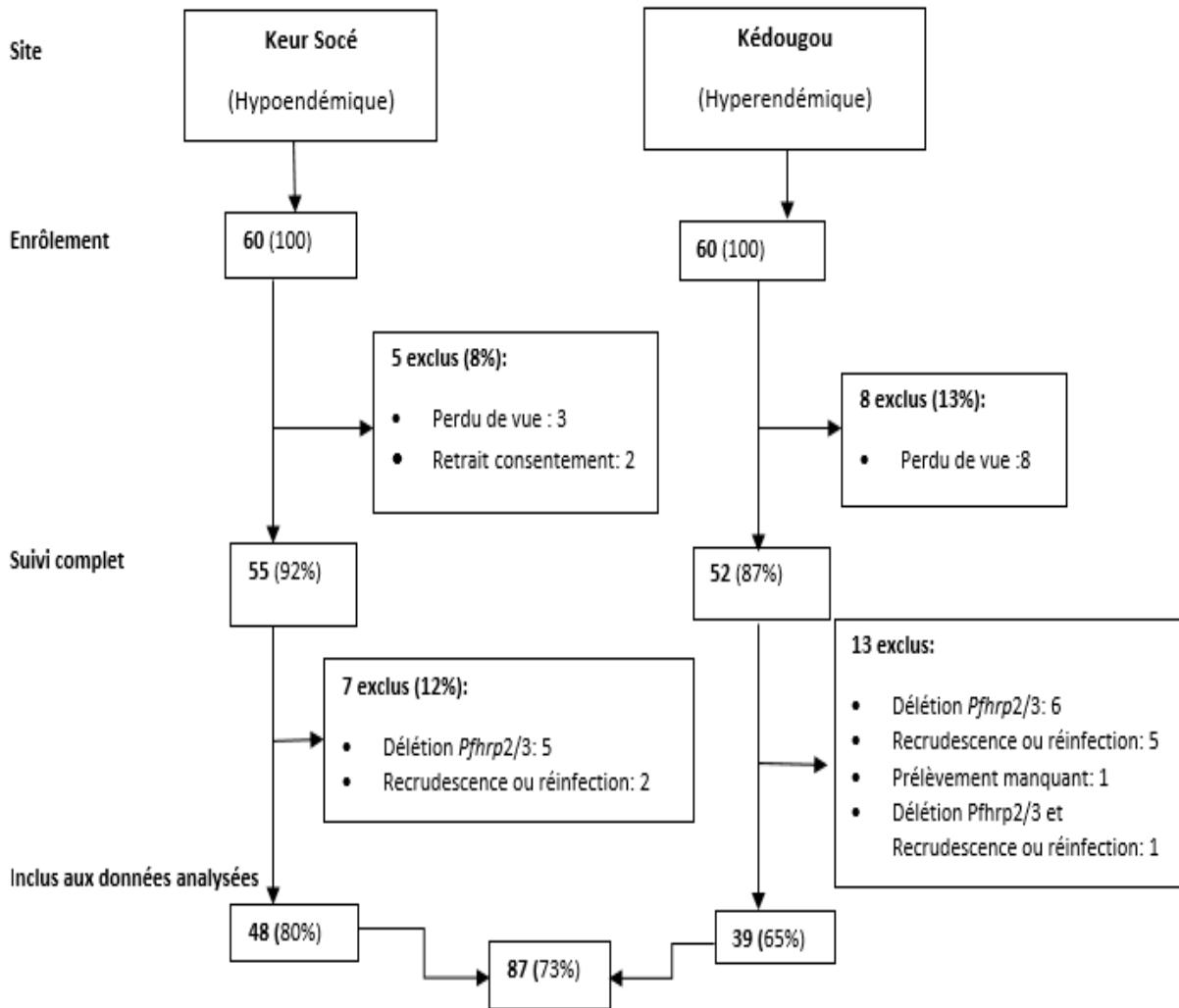


Figure 8: Aperçu des participants à l'étude

2. CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES DES PATIENTS INCLUS

2.1. Age

L'âge médian des patients inclus à l'étude est de 16 ans avec un minimum et un maximum de 10 ans et 54 ans respectivement.

2.2. Sexe

La majorité des patients inclus dans l'étude était de sexe masculin avec un sex ratio de 1,03. Mais dans le site de Kédougou, les patients de sexe féminin sont plus représentés à 62,5%.

Les données démographiques de base sont indiquées dans le **tableau V**.

Tableau V: Caractéristiques de la population de l'étude

Site	Study participants [n (%)]	Age [median (min – max)]	Sex ratio [% male / % female]
Keur Socé	60 (50%)	15.2 (10 – 53)	1.8
Kédougou	60 (50%)	15.8 (10 – 54)	0.6
Total	120 (100%)	16 (10 – 54)	1.03

3. RESULTATS DE BASE

Tous les participants étaient fébriles avec une infection palustre à *P. falciparum* confirmé au moment du recrutement.

3.1. Parasitémie

A l'inclusion, les densités parasitaires moyennes étaient de :

- 8587 p/ μ L [IC 95%: 4635 p/ μ L - 15909 p/ μ L] de moyenne à Keur Socé (n = 48)
- 5496 p/ μ L [IC 95%: 3362 p/ μ L - 8987 p/ μ L] moyenne à Kédougou (n = 39)

3.2. Concentration de HRP2

Les concentrations initiales de HRP2 se sont avérées très similaires aux deux sites:

- 107,6 ng/ml médiane à Keur Socé (n = 48)
- 109,8 ng/ml médiane à Kédougou (n = 39)

Comme sur la **figure 9** la distribution de la parasitémie (A) au départ est identique pour Keur-Socé (n = 48) et Kédougou (n = 39) de même que celle de la HRP2 (B).

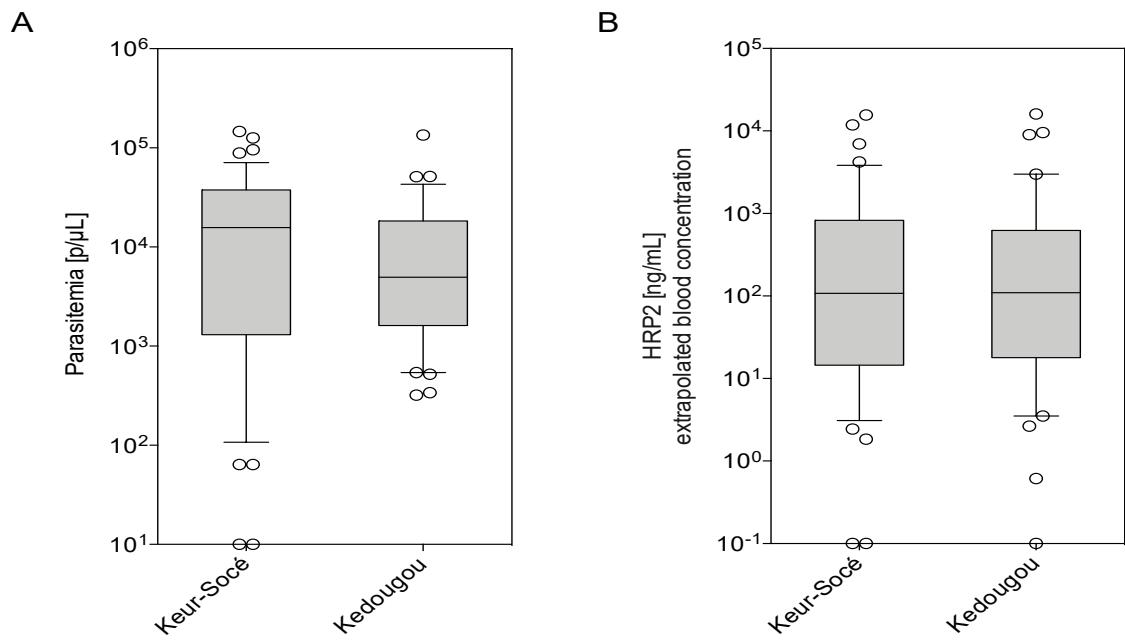


Figure 9: Distribution de la parasitémie et de la concentration de HRP2 au départ

3.3. Corrélation entre la parasitémie et la concentration de HRP2

Une faible corrélation positive a été observée entre la parasitémie et la concentration de HRP2 au départ (**Figure 10**). Une grande partie de la variance de la concentration de HRP2 n'est pas directement expliquée par la parasitémie de référence ($R^2 = 0,29$).

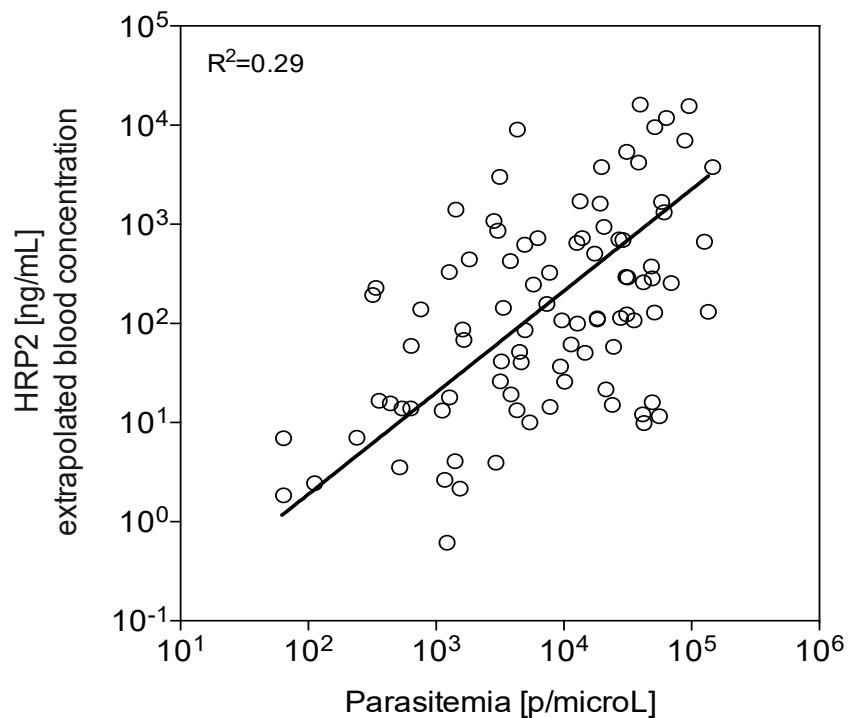


Figure 10: Corrélation entre la parasitémie et la concentration de HRP2 au départ

4. RESULTATS DU SUIVI

En raison de la règle d'arrêt mentionnée ci-dessus (le suivi a été interrompu après trois résultats HS-RDT négatifs consécutifs), tous les participants à l'étude n'ont pas été suivis pendant 62 jours. La distribution des jours de suivi est illustrée à la **Figure 11**.

Nous avons 20 participants qui ont été suivis jusqu'au jour 62. Cependant certains individus ont arrêté à J30 ($n = 14$) ou plus tôt ($n = 21$). Ces résultats indiquent que les échantillons recueillis au-delà du jour 42 sont informatifs même après avoir exclu les cas de réinfection ou de recrudescence.

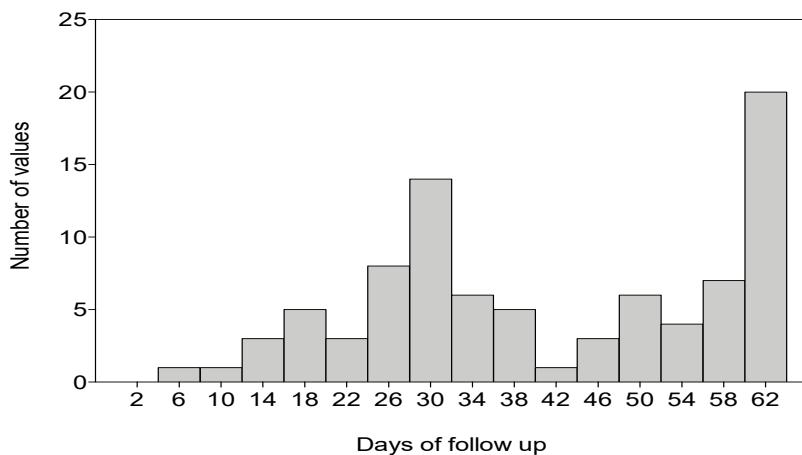


Figure 11: Répartition des participants arrêtés en fonction des jours de suivi

4.1. Temps de clairance quantitative de HRP2

La clairance de HRP2 après traitement pour chacun des 87 individus inclus dans les analyses de données est montrée dans la **Figure 12**. La demi-vie médiane résultante est de 1,1 jour avec un intervalle interquartile de 0,47 et 3,4 jours.

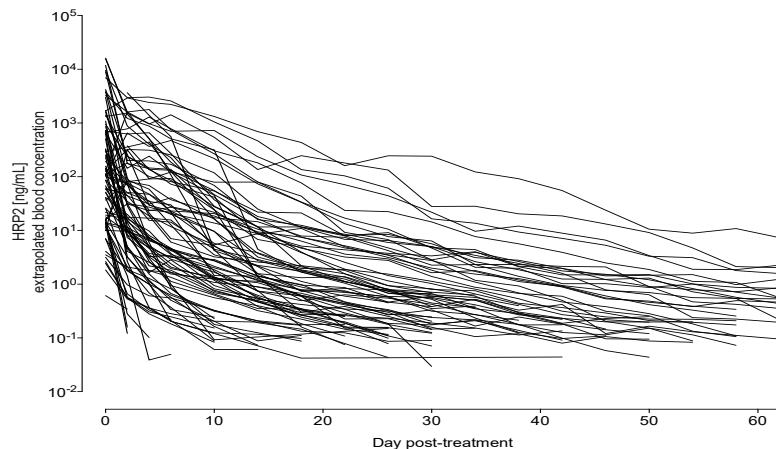


Figure 12: Diagramme de spaghetti de la clairance de la concentration de HRP2 au fil du temps, tel que déterminé par Luminex ($n = 87$)

La une positivité plus longue de HRP2 est positivement corrélée avec la concentration de HRP2 au départ, bien que faiblement (**Figure 13**).

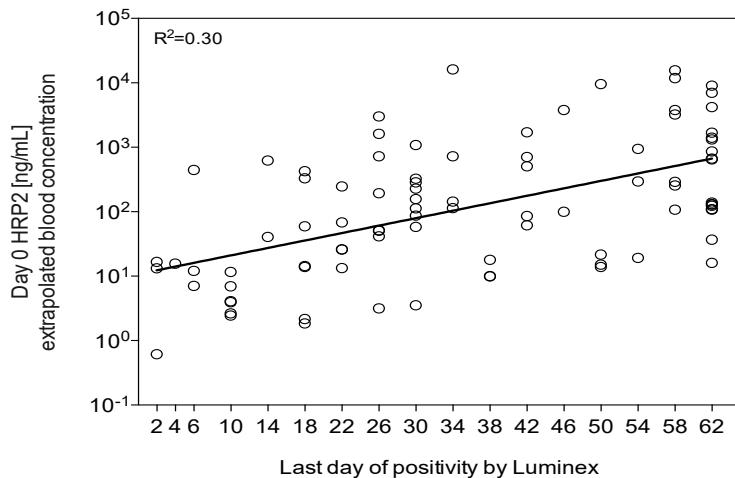


Figure 13: Corrélation entre la concentration initiale de HRP2 et le dernier jour de positivité par Luminex

4.2. Temps de clairance qualitative de HRP2

La positivité du TDR SD et du TDR HS au cours de la clairance de HRP2 après traitement est illustrée à la **Figure 14**. Trois (3) individus présentaient des résultats positifs de TDR SD et HS jusqu'au jour 62. Treize (13) autres individus présentaient un TDR HS positif seul (sans TDR SD) jusqu'au jour 62.

A l'autre extrême, une seule personne a montré des résultats négatifs au TD SD et au TDR HS au jour 6 où le suivi a été arrêté.

La durée moyenne de la positivité au TDR SD et au TDR HS est de 13,3 et 24,9 jours, respectivement, en excluant les 16 patients présentant des résultats positifs au 62ème jour. La différence moyenne de positivité est de 11,6 jours, allant de 0 à 40 journées.

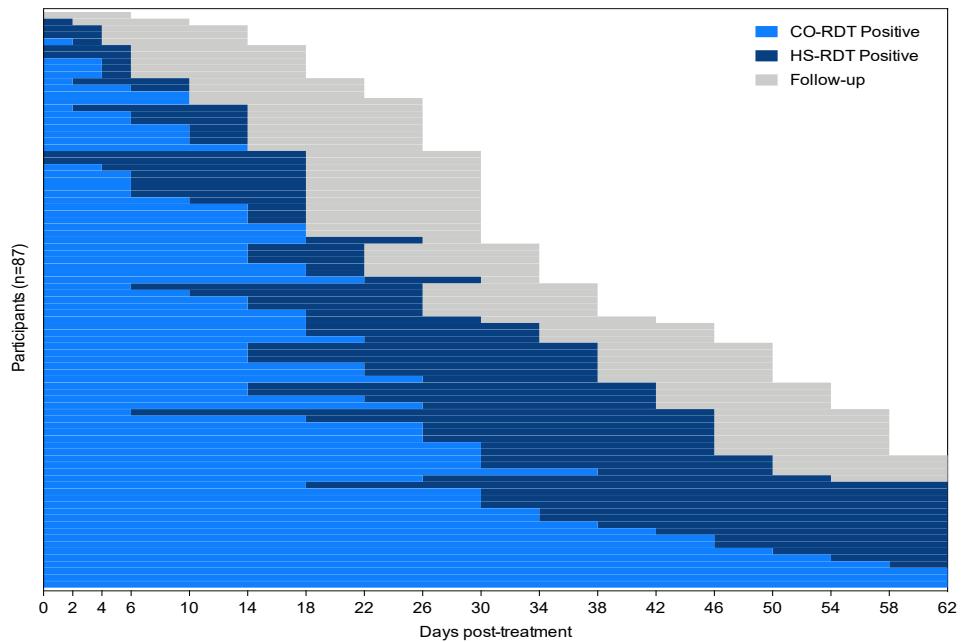


Figure 14: positivité post-traitement des TDR SD et TDR HS

Superposition de la positivité du TDR SD (bleu clair) et du TDR HS (bleu foncé) et du suivi total pour chacun des 87 participants à l'étude inclus dans les analyses de données. Tous les échantillons positifs par TDR SD étaient également positifs par TDR HS (données superposées).

Les courbes de Kaplan-Meier illustrant une analyse de survie de la positivité de PCR, TDR SD, et TDR HS post-traitement sont montrées sur la **Figure 15**.

Le temps de survie médian est de 2 jours pour PCR, 18 jours pour le TDR SD, et 30 jours pour le TDR HS.

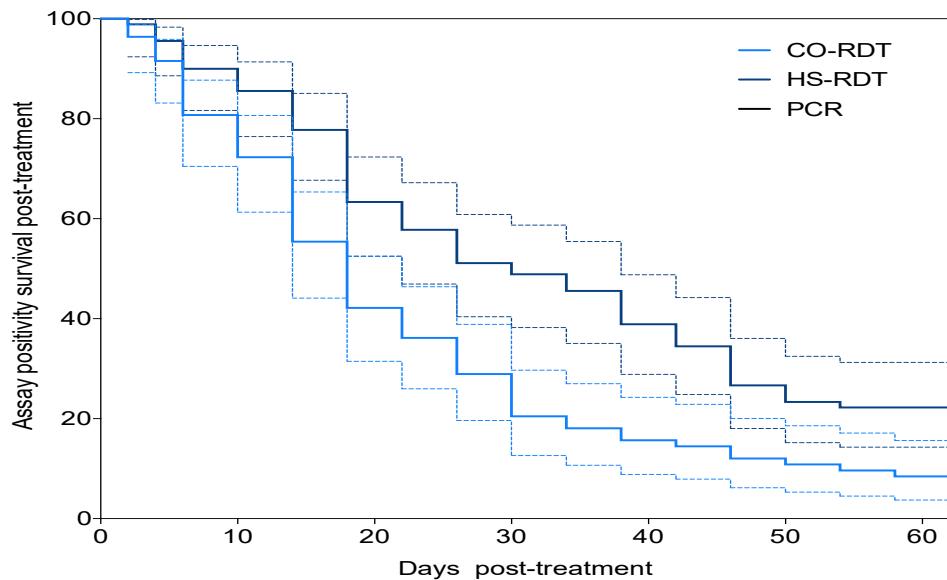


Figure 15: Courbe de positivité de la survie de TDR SD, TDR HS et PCR

DISCUSSION

Discussion

La grande majorité des tests de détection rapide (TDR) existant pour le diagnostic *Plasmodium falciparum* reposent sur la détection de l'antigène de la protéine riche en histidine 2 (*PfHR2*). Lorsqu'elle est secrétée, cette protéine spécifique au *P. falciparum* facilite la détection des individus infectés. Cependant, on sait qu'elle reste persistante dans le sang pendant plusieurs semaines après l'élimination du parasite. Cela empêche le suivi du traitement par des TDR basés sur la détection de l'HRP2. Cette persistance peut entraîner de faux positifs chez des patients récemment infecté par le *P. falciparum*.

Les résultats de notre étude montrent pour la première fois que de faibles niveaux de HRP2 résiduels peuvent circuler dans le sang total jusqu'à 62 jours après le traitement. Des études in vitro ont également été effectuées pour mesurer la production et la sécrétion de HRP2 sur des échantillons de culture de *P. falciparum* en laboratoire, qui ont été utilisées pour des études de modélisation [5, 20, 44]. La quantification d'HRP2 a été rapportée dans une étude transversale de Dondorp *et al* mais sans qu'un suivi n'ait été effectué pour mesurer l'élimination de HRP2 de manière quantitative [5]. Cependant, autant que nous sachions, aucune évaluation de la persistance post-traitement de HPR2 n'a encore été faite de manière quantitative et au-delà de 42 jours de suivi puisque ces études sont souvent associées à des études d'efficacité de médicaments qui, généralement, n'excèdent pas ce délai. En effet, de manière générale, les études évoquent la persistance de HRP2 sous l'angle qualitatif uniquement, sur la base de la positivité des TDR seulement jusqu'à 28 ou 42 jours après traitement.

Conformément aux études précédentes, une faible corrélation positive a été observée entre la parasitémie et la concentration de HRP2 au départ. Une grande partie de la variance de la concentration de HRP2 n'est pas directement expliquée par la parasitémie de référence ($R^2 = 0,29$). Dans une étude mesurant le taux de HRP2 dans le sang et le plasma, Desakorn V *et al* ont montré que les taux de HRP2 dans le sang total étaient significativement corrélés avec la parasitémie d'admission ($r = 0,76$, $p < 0,001$) et le stade de développement du parasite ($r = 0,43$, $P < 0,01$) [19].

La demi-vie médiane résultante est de 1,1 jour avec un intervalle interquartile de 0,47 et 3,4 jours. Ceci semble être significativement plus court que les résultats précédemment publiés au Sénégal avec une demi-vie de clairance médiane de 3,0 jours avec un intervalle interquartile de 2,1 et 4,5 jours [44].

La positivité plus longue de HRP2 est positivement corrélée avec la concentration de HRP2 au départ. Les données de clairance de HRP2 semblent suivre une désintégration de premier ordre, comme précédemment rapporté par certaines études [36, 44].

Le temps de positivité médian est de 2 jours pour PCR, 18 jours pour le TDR SD, et 30 jours pour le TDR HS.

La durée moyenne de la positivité du TDR SD et du TDR HS est de 13,3 et 24,9 jours, respectivement. La différence moyenne de positivité est de 11,6 jours, allant de 0 à 40 journées.

La persistance de la HRP2 après le traitement et l'élimination du parasite a été décrite par de nombreuses études [8, 26, 28, 30, 52]. Dans une étude pédiatrique menée à Zanzibar avec une période de suivi de 42 jours après le traitement d'infections non compliquées à *P. falciparum*, le temps moyen de clairance d'HRP2, déterminé par la positivité de TDR, a été établie à 28 jours [30]. Il est intéressant de noter qu'il n'a pas été trouvé de corrélation entre la parasitémie au moment du recrutement des patients (située entre 2000 et 250 000 parasites par μL de sang) et le temps d'élimination de HRP2. On ne connaît cependant pas le rapport qui est fait dans cette étude entre la parasitémie et le niveau de HRP2. Les temps moyens de clairance étaient de 28 (07 à > 42) jours pour les TDR basés sur HRP2 et 02 (01 à 28) jours pour la PCR en temps réel. [5].

Les résultats de notre étude ont également montré l'absence de différence biologique ou épidémiologique entre les deux zones.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Le paludisme constitue la première endémie des régions tropicales du globe où il pose un problème majeur de santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, on estime que le nombre de cas de paludisme est passé de 233 millions en 2000 à 216 millions en 2016. Selon les estimations, le nombre de décès imputables au paludisme a reculé de 985000 en 2000, à 445000 en 2016. Une baisse de la charge de morbidité palustre a été observée dans presque toutes les régions du monde.

Malgré les progrès de lutte contre ce fléau, la maladie reste pourtant endémique surtout en Afrique. Au Sénégal plus particulièrement, des défis demeurent encore, notamment ceux en rapport avec l'accès universel aux interventions majeures comme l'utilisation des Moustiquaires Imprégnées à Longue Durée d'Action (MILDA) et le traitement par les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) jusqu'au niveau communautaire après un diagnostic avec les tests de diagnostic rapide (TDR).

La plupart des TDR, reposant sur la détection de la protéine riche en histidine (HRP2), offrent une limite de détection similaire à celle de la microscopie optique, avec l'avantage qu'ils sont plus simples à effectuer et que leur temps de réponse est plus court. Mais l'inconvénient de ce biomarqueur est sa persistance dans le sang après l'élimination du parasite. Peu de données sont disponibles en ce qui concerne la clairance de la HRP2.

C'est dans ce contexte que nous nous proposons de combler cette lacune dans notre connaissance du *P. falciparum* en conduisant une étude longitudinale qui nous permettra de mesurer quantitativement la persistance d'HRP2 après le traitement de cas cliniques de paludisme à *P. falciparum* confirmés et l'élimination du parasite.

Un total de 120 individus fébriles se présentant spontanément dans les deux postes de santé a été recrutés dans cette étude pour évaluer la persistance de HRP2 sur une longue période de suivi de 62 jours (du 2 octobre au 9 décembre 2017) et profiter d'un test basé sur Luminex pour quantifier les taux sanguins de HRP2. À ce stade, des données provenant de 87 individus ont été incluses pour l'analyse des données.

Les résultats de l'étude montrent pour la première fois que de faibles niveaux de HRP2 résiduels peuvent circuler dans le sang total jusqu'à 62 jours après le traitement. Les analyses biostatistiques préliminaires indiquent une demi-vie d'élimination médiane de HRP2 de 1,1 jour.

Comme prévu, la sensibilité analytique accrue du TDR HS se traduit par une positivité post-traitement plus longue par rapport au TDR SD utilisé dans cette étude, de 11,6 jours en moyenne. Ce phénomène devra être pris en compte lors de la planification des interventions de dépistage et de traitement basées sur le TDR HS.

A la fin de notre étude et au vue des résultats obtenus, il nous paraît important d'émettre certaines recommandations :

- Toujours chercher le dernier épisode de paludisme ;
- S'il y'a un épisode récent, confirmer le TDR positif par un examen microscopique ;
- Doter toutes les structures de santé d'un microscope et d'un technicien.

BIBLIOGRAPHIE

1. **ABDULLA S et al.** (2008) Safety and immunogenicity of RTS, S/AS02D malaria vaccine in infants. *N Engl J Med.* 359(24):2533-44
2. **ALONSO PL et al.** Efficacy of the RTS, S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet.* 2004 Oct 16-22; 364(9443):1380-3.
3. **AMBROISE TP et al.** Le Paludisme Encycl. Med. Chir. (Paris), *Maladies infectieuses* 8089, 1984; 9: A10 et A20.
4. **AUBREY P, GAÜZERE BA:** Paludisme Actualités 2015, Mise à jour le 03/10/2015, Médecine tropicale.
5. **AYDIN-SCHMIDT B et al.:** Usefulness of Plasmodium falciparum-specific rapid diagnostic tests for assessment of parasite clearance and detection of recurrent infections after artemisinin-based combination therapy. *Malar J.* 2013;12:349.
6. **BARENNES et al.** La quinine injectable diluée par voie intra-rectale : une solution pour le traitement précoce du paludisme grave de l'enfant ? Bilan des études cliniques sur les accès graves Archives Centre Muraz Bobo Dioulasso, B. Faso 07/02/00.
7. **BARFOD L et al.** Chondroitin Sulfate A-Adhering *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes Express Functionally Important Antibody Epitopes Shared by Multiple Variants. *J Immunol;* 2010. 185. 12:7553-7561.
8. **BELL DR, WILSON DW, MARTIN LB.** False-positive results of a Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2-detecting malaria rapid diagnostic test due to high sensitivity in a community with fluctuating low parasite density. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:199–203.
9. **BERGAL S et al.** Paludisme: Préparation aux certificats et au concours de l'internat. *Editions SPECIA,* 6/1986 n°5626.
10. **BERRY A, IRIART X, MAGNAVAL JF** (2009). Nouvelles méthodes de diagnostic du paludisme. *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES.* 416: 65-70.
11. **BOUREE P, TANGOURDEAU PH, VAN NG, ANH** Le paludisme. *Editions Dopamine SA,* 1993 ; Laboratoires Smithkline Beecham.
12. **BRISKIER A, LABRO MT.** Paludisme et médicaments. *Editions Arnette,* 1988; 101-113.
13. **COULAUD J P.** La prophylaxie du paludisme. *Cahiers Santé,* 1993 ; 3 : 315-322.
14. **DANIS M, MOUCHET J.** Paludisme. *Editions Marketing Ellipses/AUPELF,* Paris, 1991.
15. **DAS S et al.** Performance of an ultra-sensitive Plasmodium falciparum HRP2-based rapid diagnostic test with recombinant HRP2, culture parasites, and archived whole blood samples. *Malar J.* 2018;17:118.

16. DANSOKHO EF, KI-ZERBO G, BADIANE S. Prise en charge diagnostique et thérapeutique de l'accès palustre simple dans la région de Dakar au Sénégal. *Ann Soc Belge Med Trop*, 1994 ; 291-300.
17. DAVIS R, ICKE G. Le paludisme RPH. *Laboratory Med*. 1998 – 2002.
18. DELUOL AM, LEVILLAYER H, POIROU JL Hôpital Saint-Antoine, Paris: Diagnostic du paludisme (<http://www.ledamed.org/IMG/html/doc-10811.html>).
19. DESAKORN V *et al.*: Stage-dependent production and release of histidine-rich protein 2 by Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg. Oxford University Press*; 2005;99:517–24.
20. DONDORP AM *et al.*: Estimation of the Total Parasite Biomass in Acute Falciparum Malaria from Plasma PfHRP2. Krishna S, editor. PLoS Med. Public Library of Science; 2005;2:e204.
21. DUFFY PE, FRIED M. Antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* adhesion to chondroitin sulfate A are associated with increased birth weight and the gestational age of newborns. *Infect Immun* 2003. 71, 11, 6620–6623.
22. FARGIER J.J *et al.* Reduction of coma by quinine loading dose in falciparum cerebral malaria. *The Lancet*, vol 338: Oct. 5, 1991.
23. FRIEDMAN M J *et al.* Plasmodium falciparum: physiological inter actions with the human sickle cell. *Exp. Parasitol.*, 1979; 47: 73.
24. GENTILLINI M. Médecine Tropicale. *Flammarion Médecine-Sciences*, Paris: 5ème édition, 1993.
25. HOPKINS H *et al.* (2013) Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria endemic setting : Performance of a new loop mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. *Journal of infectious diseases*. 208(4) : 645-52.
26. HOUZE S *et al.*: PfHRP2 and PfLDH antigen detection for monitoring the efficacy of artemisinin-based combination therapy (ACT) in the treatment of uncomplicated falciparum malaria. *Malar J. BioMed Central*; 2009;8:211.
27. HUONG NM *et al.* (2002) Comparison of three antigen detection methods for diagnosis and therapeutic monitoring of malaria: a field study from southern Vietnam. *Tropical Medicine & International Health* 7,304–308.
28. IQBAL J *et al.* (2004) Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate dehydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of Plasmodium falciparum monoinfection. *J Clin Microbiol*. 42:4237–41.
29. KATTENBERG JH *et al.* (2012): New developments in malaria diagnostics: monoclonal antibodies against Plasmodium dihydrofolate reductase-thymidylate synthase, heme detoxification protein and glutamate rich protein. *Monoclonal Antibodies* 4, 120–126.
30. KATTENBERG JH *et al.*: Antigen persistence of rapid diagnostic tests in pregnant women in Nanoro, Burkina Faso, and the implications for the diagnosis of malaria in pregnancy. *Trop Med Int Health*. 2012;17:550–7.

31. **KYABAYINZE DJ et al.** (2008): Operational accuracy and comparative persistent antigenicity of HRP2 rapid diagnostic tests for Plasmodium falciparum malaria in a hyperendemic region of Uganda. *Malaria Journal* 7,221.
32. **LEVINE RA, WARDLAW SC, PATTON CL.** (1989): Detection for hemoparasite using QBC analysis tubes. *Parasitol. Today*, 5: 132-134.
33. **LUCCHI NW et al.** (2016): Evaluation of the *Illumigene malaria LAM*: A Robust Molecular Diagnostic Tool for Malaria parasites. *Scientific Reports*. 6: 36808. doi :10.1038
34. **LYKE K et al.** (2017): *PfSPZ* vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled humanmalaria infection. PNAS DOI : 10.1073/pnas.1615324114
35. **MARQUART et al.** 2012: Modelling the dynamics of Plasmodium falciparum histidine-rich protein2 in human malaria to better understand malaria rapid diagnostic test performance. *Malaria Journal* 11:74.
36. **MAYXAY M et al.** (2001) Persistence of Plasmodium falciparum HRP-2 in successfully treated acute falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95,179–182.
37. **MAZIER D.** (1991): Le paludisme: cycle et biologie des plasmodiums. *Ed. Market., Ellipses/Aupelf.* 25-34.
38. **METSELAAR D, VAN THIEL PH** (1959): Classification of malaria. *Trop Geogr Med* 11: 157–161.
39. **MOUCHET J, CARNEVALE P.** (1991): Le paludisme : répartition et classification écologique. *Edition Marketing / AUPELF*; 77-83.
40. **OMS.** Accès universel aux tests diagnostiques du paludisme: manuel pratique; 2012
41. **ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE** (2003). Severe falciparum malaria. *WHO/HTM/RBM/2003.50.*
42. **PAGES F, ORLANDI-PRADINES E, CORBEL V.** (2007) vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Méd Mal Infect*; 37: 153-61.
43. **PARASITOLOGIE MYCOLOGIE ANN O'FEL** Edition C et R, 1987, 3^{ème} Edition
44. **PLUCINSKI MM et al.**: Posttreatment HRP2 Clearance in Patients with Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria. *J Infect Dis.* 2nd éd. Oxford University Press; 2018;217:685–92.
45. **PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME.** Plan stratégique de lutte contre le paludisme au Sénégal 2011- 2015. *Doc Minist de la santé et de la prév méd.*
46. **ROGERSON SJ et al.** Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Exp Med* 1995;182: 15–20.

47. **ROGIER E et al.** Bead-based immunoassay allows sub-picogram detection of histidine-rich protein 2 from *Plasmodium falciparum* and estimates reliability of malaria rapid diagnostic tests. *Barillas-Mury C, editor. PLoS ONE. Public Library of Science; 2017;12:e0172139.*
48. **SALANTI A et al.** Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Expl Med 2004; 200: 1197–1203.*
49. **SECARDIN Y, LE BRAS J.** Essai de diagnostic d'espèce des plasmodii humains par la technique de QBC. *Med trop 1999 ; 59 : 276-78.*
50. **STAALSOE T et al.** Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy associated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet, 2004; 363; 9405, 283–289.*
51. **SINGH N, SHUKLA MM** (2002). Short report: field evaluation of post treatment sensitivity for monitoring parasite clearance of *Plasmodium falciparum* malaria by use of the determine malaria pf test in central India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 66,314–316.*
52. **TJITRA E et al.** Persistent ICT malaria *P.f/P.v* panmalarial and HRP2 antigen reactivity after treatment of *Plasmodium falciparum* malaria is associated with gametocytemia and results in false-positive diagnoses of *Plasmodium vivax* in convalescence. *J Clin Microbiol. American Society for Microbiology; 2001;39:1025–31.*
53. **VERHOFF FH et al.** An analysis of intra-uterine growth retardation in rural Malawi. *Eur. J. Clin. Nutr. 55:682-687, 2001.*
54. **WOODEN J, KYES S, SILBLEY CH.** PCR and strain identification in. *Parasitol Today. 1993 Aug; 9 (8):303-5.*
55. **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva: *WHO Press, 2009*
56. **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** World malaria report 2017. WHO. *World Health Organization; 2017.*