

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



ANNEE 2019

N° 324

Le paludisme à *Plasmodium ovale* au Sénégal : diagnostic et études moléculaires

DIPLOME DE MASTER DE BIOLOGIE ET CONTRÔLE DES PARASITES

Présenté et soutenu publiquement

Le 05 janvier 2019

Par

Dr Mamadou Alpha DIALLO

(Ancien Interne des Hôpitaux de Dakar)

Né le 27 septembre 1984 à Dakar (SENEGAL)

Jury

<u>Président :</u>	M.	Matar	SECK	Professeur
<u>Membres :</u>	M.	Daouda	NDIAYE	Professeur
	Mlle	Aida Sadikh	BADIANE	Maître de Conférences Agrégé
	M.	Mouhamadou	NDIAYE	Maître de Conférences Agrégé
<u>Directeur :</u>	M.	Daouda	NDIAYE	Professeur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement tout le personnel du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital Aristide le Dantec.

Merci aux membres de mon jury d'avoir bien voulu se pencher quelques moments sur mon travail afin de l'enrichir de leurs critiques et commentaires.

Merci à ma famille pour tout ce que vous avez fait et continuer de faire pour moi. Merci.

Merci à ma chère épouse et à ma chère fille pour votre chaleureuse présence et pour votre soutien aussi.

Pour finir, merci à tout le personnel du laboratoire de Parasitologie Mycologie pour tout le soutien et pour votre esprit d'équipe. Ce travail est le vôtre.

Nous remercions l'ensemble des partenaires du LPM grâce à qui ce travail a été possible : le PNL, l'UCAD, la SLAP de Thiès, les postes de santé Tomboronkoto, Dalaba, Makko et le centre de santé de Kédougou, l'hôpital Youssou Mbargane Diop de Rufisque, le poste de santé « Deggo » de Pikine et le poste de santé de Diamniado.

A NOS MAITRES ET JUGES

**A notre Maître et Directeur de mémoire,
Le Professeur Daouda NDIAYE**

Cher Maître vous avez accepté dès le premier contact de diriger ce travail.

Nous avons bénéficié d'un encadrement sans faille et d'une disponibilité constante pour l'élaboration de ce travail.

Votre rigueur scientifique, votre goût du travail bien fait et vos grandes qualités humaines forcent l'administration et font de vous un enseignant hors de pair.

Soyez rassurés, Cher Maître, de notre profond respect et de notre reconnaissance inqualifiable.

**A notre Maître et juge
le Professeur Matar SECK**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger dans notre jury. Votre disponibilité, vos qualités scientifiques et humaines forcent l'admiration.

Soyez rassurés de notre parfaite reconnaissance Cher Maître.

**A Notre Maître et juge,
Le Professeur Mouhamadou NDIAYE**

Merci pour votre précieuse contribution à ce travail, pour votre rigueur scientifique, votre pertinence et votre disponibilité qui ont permis d'apporter des améliorations significatives à ce travail.

Les mots les plus forts nous manquent pour vous exprimer notre gratitude.

Soyez rassurés de notre parfaite reconnaissance Cher Maître.

LISTE DES ABREVIATIONS

- CDC** : centers for disease control and prevention
- CTA** : combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine
- EDTA** : Ethylene-diaminetetraacetate
- ELISA** : Enzyme-linked Immunosorbent Assay
- HRM** : high resolution melting
- LAMP** : loop-mediated isothermal amplification
- MM** : marqueur de poids moléculaire
- MSP** : merozoite surface protein
- Pb** : paire de base
- PNLP** : programme national de lutte contre le paludisme
- SLAP** : section de lutte antiparasitaire
- TDR** : test de diagnostic rapide
- TIE** : taux inoculation entomologique
- UV** : ultraviolet

LISTE DES FIGURES

Figure 1: cycle évolutif des plasmodies (CDC, 2015).....	4
Figure 2: Répartition géographique du paludisme à <i>Plasmodium ovale</i> (CDC, 2016)	7
Figure 3: Différents stades évolutifs de <i>P. ovale</i> sur frottis mince (Collins WE, 2005)	11
Figure 4: Frottis mince coloré au Giemsa montrant la morphologie du parasite : des trophozoïtes de <i>P. ovale</i> infectant A et B) des hématies de tailles agrandies et frangées, C) parfois amiboïdes. D) un gamétocyte dans une hématie frangée donnant un aspect de pinceau	19
Figure 5: Image d'un gel d'électrophorèse montrant les tailles des fragments du gène <i>potra</i> : 245 pb pour <i>P. ovale wallikeri</i> (Pow) et 299 pb pour <i>P. ovale curtisi</i> (Poc).	20

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I - Séquences des amorces et paramètres du thermocycleur pour l'amplification du gène <i>potra</i>	17
Tableau II - Répartition des espèces de <i>P. ovale</i> selon les sites et les densités parasitaires ..	21

SOMMAIRE

INTRODUCTION	9
PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	1
1. Généralités	3
2. Cycle évolutif	3
3. Vecteurs.....	5
4. Répartition géographique	5
5. Symptomatologie	7
5.1. Phase d'incubation	7
5.2. Phase symptomatique.....	7
5.3. Reviviscence.....	9
6. Diagnostic biologique	9
6.1. Diagnostic microscopique	9
6.2. Diagnostic moléculaire.....	12
7. Traitement	13
7.1. Traitement de l'accès palustre	13
7.2. Traitement des reviviscences.....	13
8. Études moléculaires	14
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL	3
1. Méthodologie.....	16
1.1. Sites et type d'étude	16
1.2. Population d'étude	16
1.3. Techniques.....	16
1.3.1. Prélèvement des échantillons	16
1.3.2. Microscopie.....	16
1.3.3. PCR	16
1.3.4. Génotypage de <i>P. ovale</i>	17
1.4. Éthique	17
2. Résultats	18
2.1. Microscopie	18
2.2. PCR.....	19
2.3. Génotypage.....	20

3. Discussion	22
CONCLUSION	16
REFERENCES.....	25

INTRODUCTION

Malgré son endémicité en Afrique, le paludisme à *Plasmodium ovale* est rarement rapporté. Au Sénégal, le programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) concentre ses efforts de lutte contre le paludisme en ciblant spécifiquement l'espèce *Plasmodium falciparum* ; cette dernière est la plus redoutable en raison de la forme grave de paludisme qu'elle peut entraîner. Le paludisme à *P. ovale* est rarement rapporté dans les laboratoires exerçant la microscopie du paludisme.

Quelques facteurs contribuent à la perception que cette espèce est relativement rare. L'évolution clinique est relativement courte et relativement modérée (très peu de cas de morbidité ou de mortalité ont été observés), la densité parasitaire est généralement faible, l'espèce est souvent mal diagnostiquée dans les zones où *P. ovale* n'est pas connu pour être endémique et, enfin, un diagnostic précis par examen microscopique, en particulier la goutte épaisse, est difficile ; En outre, les tests de diagnostic rapide (TDR) distribués par le PNLN sont spécifiques de *P. falciparum* ; ce qui laisse une forte probabilité que des cas de paludisme à *P. ovale* et d'autres espèces plasmodiales non-falciparum sont sous-estimées dans ces structures. Ces obstacles peuvent être contournés par l'introduction de techniques moléculaires sensibles. Celles-ci ont fourni la première indication que la prévalence et l'aire de répartition géographique de *P. ovale* avaient probablement été sous-estimées [1–3].

La détection par méthode moléculaire a également révélé un dimorphisme dans les gènes de petite sous-unité de l'ARNr de type A de *P. ovale* (psuARNr) [4,5], qui s'étendaient à d'autres gènes [4,6]. Une étude multicentrique de séquences d'isolats d'origines géographiques diverses a abouti à la proposition selon laquelle il y aurait en réalité deux espèces, *P. ovale curtisi* (type classique) et *P. ovale wallikeri* (type variant) [7].

Dans le contexte d'un objectif à long terme visant à éliminer le paludisme, il est donc important de comprendre l'épidémiologie de *P. ovale*, une espèce plus répandue qu'on ne le pensait auparavant et qui partagerait avec *P. vivax* la formation d'hypnozoïtes à l'origine des

reviviscences [1]. En outre, des observations récentes suggèrent que les deux espèces pourraient présenter des profils de reviviscence différents [8].

L'objectif général de ce travail est de contribuer à la compréhension de l'épidémiologie du paludisme à *P. ovale* au Sénégal.

Les objectifs spécifiques sont : 1) déterminer, par des experts microscopistes, la prévalence et la répartition géographique des infections palustres à *P. ovale* chez les patients avec syndrome palustre mais dont le TDR est négatif, 2) génotyper les souches de *P. ovale* identifiées par la microscopie en ciblant le dimorphisme du gène *P. ovale* tryptophan-rich antigen (*potra*).

PREMIERE PARTIE :
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Généralités

Quatre espèces plasmodiales sont couramment reconnues pathogènes chez l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*, auxquelles s'ajoute désormais *P. knowlesi*, espèce zoonotique du singe responsable d'un nombre important d'infections humaines en Asie du Sud-Est. *P. falciparum* est, à la fois, la plus fréquemment rencontrée (90% des cas en Afrique, 50% en Asie et en Amérique) et responsable de la forme grave du paludisme.

Plasmodium ovale était le dernier des parasites du paludisme humain à être décrit. Les granulations prononcées de l'érythrocyte infecté et sa périodicité tertiaire ont conduit les premiers chercheurs à le considérer comme une variante de *Plasmodium vivax*.

Stephens [9] a observé dans le sang d'un patient d'Afrique de l'Est des érythrocytes ovales et à bords frangés. En 1922, il publia une description complète des formes dans le sang et nomma le parasite *P. ovale* en reconnaissance de la forme ovale de certains érythrocytes infectés.

Certains chercheurs ont tardé à reconnaître *P. ovale* comme une espèce distincte. Cependant, des études ultérieures détaillées ont confirmé la validité de l'espèce. Après la mise en place de la souche Donaldson du parasite pour le traitement du paludisme chez les patients atteints de neurosyphilis, des études supplémentaires détaillées sur la morphologie et la périodicité du parasite ont été réalisées [10,11].

P. ovale est rarement observé sauf en Afrique subsaharienne et sur certaines îles du Pacifique occidental. Le mouvement des populations humaines pose la possibilité de sa présence et de son établissement dans d'autres régions tropicales où des vecteurs sensibles peuvent être présents [2,10,12].

Nous présentons ici une revue de la biologie, de l'épidémiologie, du diagnostic, du traitement et des études moléculaires du parasite.

2. Cycle évolutif

Plasmodium ovale a des cycles de développement chez l'hôte humain et chez le moustique vecteur. Après l'introduction de sporozoïtes par la piqûre de moustiques infestés, ces formes envahissent rapidement le foie où, dans une seule cellule parenchymateuse, le parasite mûrit en 9 jours environ. Ainsi, plusieurs centaines de mérozoïtes sont produits. Lors de leur libération, ces mérozoïtes envahissent les réticulocytes et initient le cycle érythrocytaire. Le développement de certains parasites dans les cellules du foie est ralenti ou suspendu sous forme d'hypnozoïtes, parfois pendant plusieurs mois, voire années. Après un cycle de développement dans les érythrocytes qui dure en moyenne 49 h, 8 à 20 mérozoïtes sont libérés pour réinfecter

d'autres érythrocytes. Comme pour les autres espèces de Plasmodium infectant l'homme, certains des mérozoïtes qui envahissent les érythrocytes se développent en deux formes de gamétocytes. Le temps de développement jusqu'à la maturité des gamétocytes est le même que celui du stade asexué, soit environ 49 heures.

Lors du repas sanguin, les moustiques absorbent à la fois les microgamétocytes et les macrogamétocytes. Une exflagellation du microgamétocyte se produit dans l'intestin du moustique, entraînant la formation de huit microgamètes au maximum. Après la fécondation du macrogamète, il se forme un ookinète mobile qui pénètre dans la membrane péritrophique et se rend à la paroi externe de l'intestin du moustique. Là, sous la membrane basale, l'oocyste se développe. Après une période de plusieurs semaines, selon la température, des centaines de sporozoïtes sont produites dans chaque oocyste. Les oocystes se rompent et des sporozoïtes sont libérés dans l'hémocèle du moustique. La circulation entraîne les sporozoïtes dans les glandes salivaires, où les sporozoïtes envahissent et se concentrent dans les cellules acinales. Au cours de l'alimentation, des sporozoïtes sont introduits dans le canal salivaire et sont injectés dans les veinules de l'homme piqué, et le cycle recommence [10].

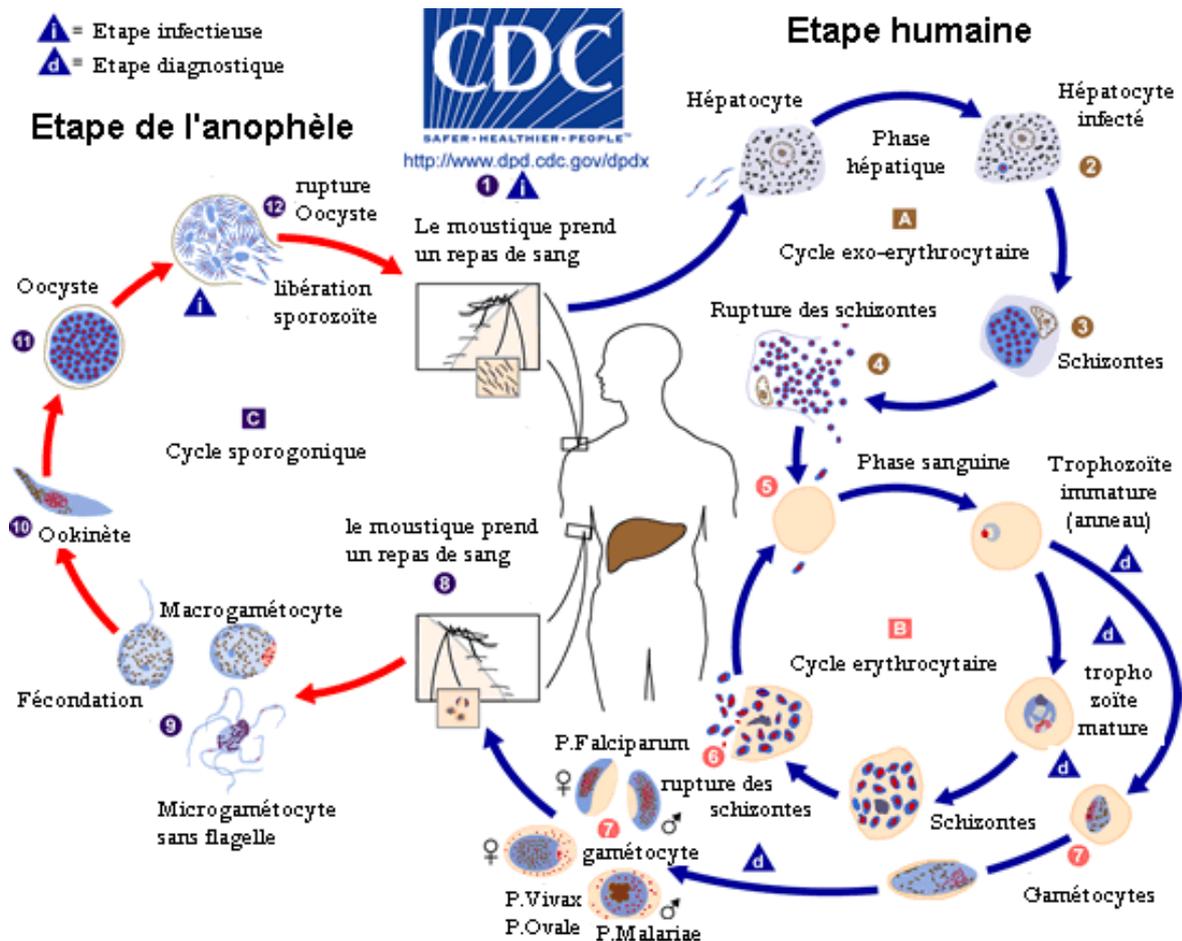


Figure 1: cycle évolutif des plasmodies (CDC, 2015)

3. Vecteurs

Anopheles gambiae et *A. funestus* sont des vecteurs naturels probables, ceci étant fondé sur la détection de moustiques infectés par le test ELISA; ces infections ont été démontrées en travaillant avec des chimpanzés en Gambie [13]. À titre expérimental, il a été démontré que *A. atroparvus* était un hôte efficace et pouvait transmettre l'infection à l'homme. Parmi les autres hôtes expérimentaux avérés, on peut citer *A. albimanus*, *A. quadrimaculatus*, *A. freeborni*, *A. maculatus* et *A. subpictus*; *A. stephensi* et *A. balabacensis balabacensis* (= *A. dirus*) se sont également avérés infectés expérimentalement. Dans les études portant sur la souche Donaldson de *P. ovale*, *A. quadrimaculatus* était le plus sensible à l'infection, suivi de *A. albimanus* de Florida Keys et de *A. albimanus* de Panama. Dans les études comparatives avec la souche ouest-africaine, *A. stephensi* était la plus susceptible, suivie de *A. freeborni*, *A. dirus*, *A. quadrimaculatus*, *A. maculatus* et *A. albimanus*. *Anopheles farauti* a également été infecté à titre expérimental par *P. ovale* [10,14].

Le taux de développement des oocystes de *P. ovale* chez cinq espèces de moustiques anophèles (*Anopheles balabacensis* [= *A. dirus*], *A. maculatus*, *A. freeborni*, *A. quadrimaculatus* et *A. stephensi*) a été déterminé. Une fois maintenus à 25 ° C, les sporozoïtes étaient présents dans les glandes salivaires après 13 à 14 jours. Les mesures du diamètre moyen des oocystes ont indiqué que *P. ovale* était plus petit que *P. vivax* et *P. schwetzi* (un parasite des chimpanzés et des gorilles) [10,15].

Le développement d'anticorps monoclonaux pour détecter les moustiques infectés par *P. ovale* a permis un certain nombre d'études entomologiques longitudinales de déterminer la présence et la biologie des vecteurs de ce parasite. Konate et al. ont mené au Sénégal une enquête longitudinale sur *Anopheles gambiae sensu lato* et *A. funestus* dans une zone de savane de type soudanais. Le typage des sporozoïtes a indiqué que 8,2% des glandes salivaires infectées étaient infectées par *P. ovale*. Ceci a été calculé pour représenter huit piqûres infestantes par humain la première année d'observation et 25 piqûres infestantes la deuxième année. Dans un autre rapport sur la même étude, il a été estimé que le taux d'inoculation entomologique (TIE) de *P. ovale* était de 0,04 piqûres infestantes par personne et par nuit [16].

4. Répartition géographique

De nombreux cas ont été rapportés sur la présence de *P. ovale* dans le monde. Cependant, une analyse critique de ces rapports a montré que son aire de répartition naturelle se situe en Afrique subsaharienne et dans les îles du Pacifique occidental (Figure 2). Le parasite a été signalé en

Nouvelle-Guinée et aux Philippines ; il est apparemment rare aux Philippines et ne se trouve que sur l'île de Palawan. Il a également été signalé à Timor (Indonésie) pour la première fois en 1975. Le parasite a été signalé en Irian Jaya, deux sites situés à l'ouest de Flores et au Timor oriental, en Indonésie, mais non présent à Sumatra, Kalimantan, Java et Sulawesi. Des rapports provenant d'Asie du Sud-Est suggèrent que *P. ovale* a été introduit dans des régions telles que le Vietnam, la Thaïlande et l'Inde .

Il existe de nombreuses études sur sa distribution en Afrique subsaharienne. Dès 1958 on a signalé la présence de *P. ovale* chez 25 enfants en Afrique équatoriale française. Dans les environs de Brazzaville, en République du Congo, de 1978 à 1979, des enquêtes auprès d'écoliers ont révélé un taux d'infection à Plasmodium de 24,5% (dont 1,9% de *P. ovale*). Au Gabon, chez les enfants âgés de 5 à 10 ans, *P. ovale* a été trouvé dans 2,4% des cas d'infection à Plasmodium, alors que dans l'ensemble, la prévalence des infections à Plasmodium était de 30%. Dans la région forestière de Manyemen au Cameroun, la prévalence de *P. ovale* était de 10,5%. Le parasite a été signalé à plusieurs reprises au Nigéria. En Sierra Leone, des infections par le paludisme auraient été causées par *P. ovale* chez 0,5 à 1,0% des personnes infectées [10]. En raison de la résistance relative des personnes du groupe sanguin Duffy négatif à l'infection par *P. vivax* et de la prévalence élevée de la négativité de ce récepteur dans les populations d'Afrique de l'Ouest, les enquêtes sur *P. vivax* pourraient en réalité représenter des infections par *P. ovale*. Environ 2% des cas au Libéria étaient dus à *P. vivax*. Il est probable qu'il s'agissait en réalité de cas de *P. ovale*. Des études dans une région du Libéria ont révélé un taux de prévalence chez les enfants pour *P. ovale* de 9%. Il a été rapporté une prévalence de 2,7% d'infections par le paludisme dues à *P. ovale* lors d'une enquête menée au Ghana.

P. ovale serait extrêmement rare dans le sud du Soudan et absent dans le nord. Une étude a été menée en Ouganda où, parmi les 251 infections à *P. ovale*, le parasite était plus souvent observé chez les nourrissons et les adolescents [7].

Au Sénégal, l'Institut de Recherche et de Développement (IRD) et l'institut Pasteur de Dakar (IPD) ont retrouvé le parasite dans les zones de Ndiop et Dielmo dès le début des années 90 avec une prévalence de 5%. Mais le parasite s'est raréfié suite aux mesures de lutte qui ont été mis en place [17]. Récemment, une étude menée à Kédougou a consisté à l'extraction d'ADN à partir de TDR négatifs ; les résultats de la PCR ont montré une prévalence de 1,39% de *P. ovale* [3].



Figure 2: Répartition géographique du paludisme à *Plasmodium ovale* (CDC, 2016)

5. Symptomatologie

5.1. Phase d'incubation

L'homme est le seul hôte naturel de *P. ovale*. Une grande partie des connaissances sur ce parasite a été obtenue lors du traitement antipaludique chez des patients naïfs il y a plus de 70 ans. La période d'incubation correspond à l'intervalle entre l'inoculation de sporozoïtes et la première détection de parasites dans le sang périphérique. Certains auteurs ont rapporté une période d'incubation moyenne d'environ 15 jours, alors que d'autres, travaillant avec six souches différentes du parasite, ont noté une moyenne de 13,6 jours.

5.2. Phase symptomatique

L'accès palustre simple désigne généralement les infections pour lesquelles le risque de séquelles irréversibles ou de décès est presque nul. Historiquement, on a considéré que *P. ovale* ne causaient que des infections simples, qui ne se diagnostiquent généralement pas par la présentation clinique. Comme le paludisme à *P. falciparum*, le premier signe de suspicion est la fièvre dans un contexte de séjour en zone d'endémie.

Il a été rapporté que 15% des patients présentaient au moins 10 épisodes fébriles. Avec la souche Donaldson, seulement 10% des patients présentaient plus de 10 épisodes avec des pics

de température supérieurs à 39,4 °C. La fièvre maximale moyenne était de 40,7 °C. L'intervalle médian entre les pics de fièvre a indiqué que la périodicité (durée de chaque cycle de développement) était d'environ 49 h. Un examen rétrospectif des dossiers d'infections induites a révélé que 47,1% des épisodes de fièvre étaient ≥ 40 °C. Les patients réinfectés par *P. ovale* avaient rarement une fièvre ≥ 40 °C [10,18,19].

Outre la fièvre, les symptômes et les signes d'un paludisme simple peuvent également inclure des frissons, malaises, fatigue, diaphorèse, céphalées, toux, anorexie, nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée, arthralgies, myalgies, convulsions fébriles (qui doivent être distinguées des convulsions du paludisme cérébral), de la tachycardie, tachypnée, splénomégalie, hépatomégalie, anémie, thrombocytopenie et hépatite légère [20].

Les densités parasitaires maximales sont généralement faibles comparées à celles des patients infectés par *P. falciparum* ou *P. vivax*, cela reflète sans doute la restriction de *P. ovale* au développement chez les érythrocytes plus jeunes. Une étude a montré des densités parasitaires maximales comprises entre 380 et 27600 / μl . La moyenne géométrique était de 6 944 parasites/ μl pour les infections induites par les sporozoïtes et de 7310/ μl pour les infections induites par les trophozoïtes [10,19].

Une infection antérieure par *P. ovale* n'empêche pas la réinfection mais entraînerait une réduction des niveaux de parasitémie et de fièvre. Une infection antérieure par *P. vivax*, *P. falciparum* et *P. malariae* n'a pas empêché l'infection; la fréquence et l'intensité de la fièvre et du nombre de parasites ont été quelque peu réduites. Des auteurs ont examiné les archives de 80 infections induites par *P. ovale* chez des patients non immunisés en ce qui concerne la taille de l'inoculum et la gravité du paludisme résultant. Les patients avec des périodes d'incubation plus courtes avaient des pics de fièvre plus élevés et plus nombreux et des infections de plus longue durée.

Le groupe sanguin Duffy ne semble pas être un facteur déterminant pour les infections à *P. ovale* contrairement à *P. vivax*. Il ne semble pas y avoir de différence de sensibilité à l'infection entre Caucasiens et Africains [8,19,21].

Bien que *P. ovale* soit responsable de formes simples du paludisme, quelques rares cas de paludisme grave associée à cette espèce ont été rapportés dans la littérature ; parmi ces cas le syndrome de détresse respiratoire était le plus fréquent [20,22] tandis que quelques cas d'anémie sévère et de rupture splénique ont été rapportés [23,24].

5.3. Reviviscence

P. ovale est un parasite qui conduirait à une reviviscence en ce sens que des infections secondaires peuvent être causées par des parasites latents du foie. Il s'agit souvent d'infections asymptomatiques détectées uniquement par l'examen continu des frottis sanguins périphériques. Des rechutes sont survenues aussi tôt que 17 jours après le traitement du premier accès palustre et jusqu'à 255 jours. Les accès retardés se produisent lorsque l'accès primaire a été éliminé, généralement avec des médicaments antipaludiques. De telles infections ont été signalées après 4 ans. Une rechute de *P. ovale* après 45 mois d'incubation a été rapportée. Cependant, des auteurs ont rapporté que sur 200 cas de *P. ovale* induits expérimentalement par une piqûre de moustique, un seul patient avait une rechute détectable de l'infection [1,14]. Toutefois, il faut noter que les hypnozoïtes de *P. ovale* n'ont pas encore été démontrés sans équivoque chez l'hôte. Un total de 18 cas de rechute de *P. ovale* signalés dans la littérature en près de 100 ans ne fournissent pas de preuves solides de la théorie actuelle des reviviscences. D'autre part, des expériences de traitement antipaludique chez des patients atteints de neurosyphilis ont montré qu'en cas d'inoculation répétitive avec la même souche, l'immunité à cette souche se développe rapidement et les infections ultérieures restent souvent asymptomatiques [1,18]. On peut donc supposer qu'une véritable rechute peut entraîner des symptômes atténués ou même être asymptomatique.

6. Diagnostic biologique

6.1. Diagnostic microscopique

Le diagnostic de *P. ovale* est généralement effectué par l'examen de frottis sanguins colorés au Giemsa. La différenciation avec *P. vivax*, est extrêmement difficile. Une comparaison détaillée a été faite par Wilcox et al. de deux souches de *P. vivax* (Chesson et St. Elizabeth) et de la souche Donaldson de *P. ovale*. L'élargissement cellulaire est une caractéristique des deux espèces. Les érythrocytes contenant les stades annulaires de *P. vivax* ont montré des agrandissements de 10%, alors que chez *P. ovale*, les cellules parasitées étaient les mêmes que les cellules non infectées. Avec le schizonte binucléé, la taille de *P. vivax* a augmenté de 52,9%, et celle de *P. ovale* de 26,8%. Le nombre moyen de mérozoïtes pour *P. vivax* était de 17,3 et pour *P. ovale* de 7,8. Ainsi, en comparaison avec *P. vivax*, *P. ovale* n'agrandit pas autant l'érythrocyte infecté et produit beaucoup moins de mérozoïtes.

Environ 20% des érythrocytes infectés par *P. vivax* étaient elliptiques, 2% étant nettement allongés. En revanche, 35% des érythrocytes infectés par *P. ovale* étaient elliptiques et 16%

avaient une forme nettement longue, étroite, ovale ou autrement allongée. Lorsque les érythrocytes infectés par un anneau ont été examinés pour la présence de granulations de Schüffner, elles étaient beaucoup plus nombreuses et grosses chez *P. ovale* que chez l'une ou l'autre des souches de *P. vivax*. Pour cette différence au sein des granulations, celles de *P. ovale* ont été renommées granulations de James [10,11].

Comme décrit par les premiers auteurs (Figure 3), les formes en anneau jeunes de *P. ovale* ont un noyau circulaire saillant avec un filet de cytoplasme. Au fur et à mesure que le parasite se développe, l'érythrocyte grossit; Les trophozoïtes plus âgés occupent environ la moitié des érythrocytes. La cellule hôte peut apparaître ovale avec des bords frangés. Le pigment se présente initialement sous la forme de grains poussiéreux qui se rejoignent ensuite pour former des perles brun verdâtre; finalement, ils se massent en taches jaunâtres. La caractéristique la plus distinctive est le type de granulations. Cela apparaît tôt et devient intense à mesure que le parasite se développe. La granulation est plus intense que celle de *P. vivax* [10,11].

Les gamétocytes se développent pour remplir la cellule hôte agrandie. Les macrogamétocytes se colorent en bleu au Giemsa. Le pigment est en forme de granulés disposés comme une chaîne de perles. La granulation est saillante et est organisé en anneau autour du parasite. Les microgamétocytes prennent une tache plus claire et le noyau occupe la moitié du parasite. La coloration au Giemsa apparaît rose pâle vers le bord. Le parasite est complètement enfermé dans un cercle de pointillés éosinophiles [10,11].

Il faut noter que si on laisse *P. ovale* (*P. vivax* aussi) dans un tube EDTA plus d'une demi-heure avant la confection du frottis sanguin, les éléments parasitaires ressembleront beaucoup à ceux de *P. malariae*, ce qui est une raison importante pour alerter le laboratoire immédiatement qu'un échantillon de sang est prélevé afin que l'échantillon soit traité rapidement.

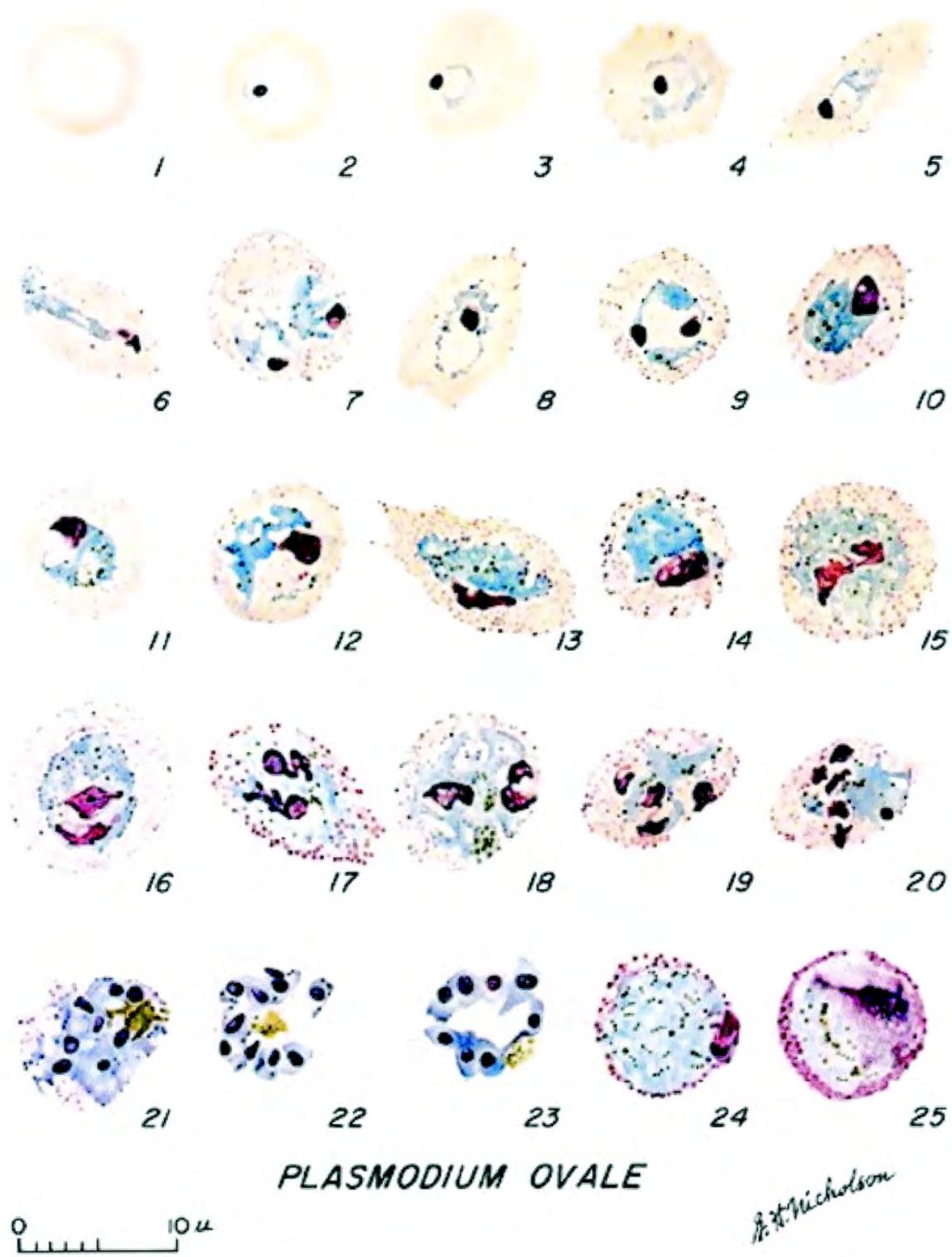


Figure 3: Différents stades évolutifs de *P. ovale* sur frottis mince (Collins WE, 2005)

6.2. Diagnostic moléculaire

Des techniques moléculaires de différenciation de *P. ovale* par rapport à d'autres espèces de parasites du paludisme humain ont été développées à l'aide de la PCR. Snounou et al. [25] ont été les premiers à appliquer la technique de PCR nichée en deux étapes à la séparation des quatre espèces infectantes humaines à l'aide des amorces *P. ovale* rOVA 1 (ATC TCT TTT GCT ATC TTT TCT TTT TAG TAT TGG AGA) et rOVA 2 (GGA AAA GGA CAC AT AT TGT ATC CTA GTG). Dans la première étape (PCR1), l'ADN extrait est amplifié à l'aide d'amorces spécifiques au genre; dans la deuxième étape (PCR2), le produit d'amplification de la PCR1 est encore amplifié en utilisant des amorces spécifiques à l'espèce. Ensuite, chaque produit d'ADN amplifié par la PCR 2 est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, coloré au bromure d'éthidium et visualisé par illumination UV. La position de migration sur le gel identifie l'espèce de Plasmodium présente. Les amorces de *P. ovale* décrites sur le site Web du centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC) aux Etats Unis sont celles présentées par Snounou et al [25].

Par la suite, une PCR multiplex en temps réel a été développée. Un ensemble d'amorces génériques ciblant une région hautement conservée du gène de l'ARNr 18S du genre Plasmodium a été conçu; l'ensemble d'amorces était suffisamment polymorphe à l'intérieur pour concevoir quatre sondes spécifiques d'espèce pour *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. La PCR en temps réel avec des sondes spécifiques à une espèce a détecté une copie de plasmide de *P. ovale* en particulier. La sonde utilisée était marquée avec 5'VIC (Ovaprobe: 5VIC-CGAAAGGAATTTTCTTATT) [26].

Récemment, deux techniques ont été décrites pour la détection simultanée des deux espèces de *P. ovale*. Un nouvel ensemble d'amorces (rOVA1WC et rOVA2WC) a été conçu, qui se lie à la fois à *P. ovale wallikeri* et à *P. ovale curtisi* sans se lier à d'autres parasites du paludisme humain. De plus, une PCR multiplex associant les amorces NP-1993 (rOVA1 et rOVA2) aux amorces NP-2005 (rOVA1v et rOVA2v) a donné des résultats adéquats pour la détection de *P. ovale sp.*

7. Traitement

7.1. Traitement de l'accès palustre

La chloroquine a été le traitement recommandé contre le paludisme à *P. ovale* pendant de nombreuses années. Dans la dernière recommandation pour le traitement du paludisme, l'OMS recommande fortement de traiter *P. ovale* et d'autres espèces de Plasmodium non-falciparum avec les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine ou de la chloroquine sur la base de preuves solides [27]. Avec un traitement approprié, les symptômes disparaissent généralement en 2 à 4 jours.

Pas un seul essai clinique contrôlé randomisé sur le paludisme à *P. ovale* n'a été publié dans la littérature scientifique. En effet, la plus grande étude recrutant 30 patients a évalué le traitement par l'artésunate. Bien que les auteurs l'aient qualifié d'essai randomisé, ni un groupe placebo ni un second groupe de traitement n'ont été décrits [1].

Cette conclusion est corroborée par un rapport de Visser et al. [28]. Bien que la chloroquine ait été testée lors de petits essais prospectifs non contrôlés, on peut se demander si ce petit nombre de participants et le manque de groupes de contrôle dans toutes les études fournissent suffisamment de preuves pour recommander un traitement sans équivoque.

Deux essais cliniques ont en outre réalisé des tests de sensibilité au médicament *in vitro*. Les analyses interprétables n'ont montré aucune résistance de *P. ovale* à l'amodiaquine, à l'artésunate, à la chloroquine, à la méfloquine, à la pipéraquine ou à la pyronaridine [29,30].

En résumant tous les rapports publiés et l'expérience clinique, il s'avère que les médicaments antipaludiques utilisés pour *P. falciparum* sont également efficaces pour *P. ovale*.

Cependant, il manque actuellement des preuves scientifiquement valables à ce sujet.

7.2. Traitement des reviviscences

Le concept de traitement des reviviscences tardives de *P. ovale* avec une 8-aminoquinoléine est basée sur l'observation que la quinine associée à la pamaquine (la première molécule synthétique de 8-aminoquinoléine) étaient plus efficaces dans le traitement de certains cas de paludisme que la quinine seule [1].

Lorsque Sinton et Bird ont observé que la pamaquine réduisait le taux de rechute du paludisme à *P. vivax*, plusieurs dérivés de 8-aminoquinoléine ont été synthétisés et testés à cette fin. La primaquine a finalement montré un effet anti-rechute plus important que la pamaquine, avec une toxicité réduite, mais son efficacité pour les récives de *P. ovale* n'a depuis lors été que présumée et jamais démontrée [31].

D'un point de vue méthodologique, pour prouver l'efficacité d'un médicament, il est nécessaire de démontrer d'abord sans équivoque l'existence de la maladie à traiter - dans ce cas présent, une rechute induite par les hypnozoïtes.

8. Études moléculaires

Des analyses ont montré qu'il existe deux types de *P. ovale* basés sur des délétions et des substitutions de nucléotides dans le gène de l'ARNr 18S, et que ces parasites coexistent dans plusieurs pays endémiques. Un certain nombre d'isolats identifiés au microscope comme *P. ovale* n'a pas pu être détecté par la PCR classique en raison de variations de séquence dans la cible du gène de la psuARNr. Depuis lors, il a été démontré que le dimorphisme en types d'ARN classiques et variants s'étendait à d'autres gènes, notamment le locus mitochondrial cytochrome b et les gènes nucléaires codant à la fois la lactate déshydrogénase, les antigènes de surface de l'ookinete mais aussi du gène *P. ovale* tryptophane-rich antigène (*potra*). Les gènes suivants ont été utilisés pour la discrimination moléculaire entre *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*.

Petite sous unité de l'ARNr (psuARNr) – Les gènes des petites sous-unités de l'ARNr nucléaire sont connus pour être des régions hautement conservées qui conviennent non seulement aux études phylogénétiques, mais également à la détection moléculaire des parasites du paludisme humain. Le nombre de copies de ce gène varie de 4 à 8. Sur la base des séquences partielles de la psuARNr, *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* diffèrent au moins sur 26 loci. De plus, *P. ovale wallikeri* a montré une variabilité intraspécifique. Bien que plusieurs variations interspécifiques aient été décrites, ce gène est celui qui est le plus couramment utilisé pour l'analyse PCR [5–8].

Cytochrome b (Cytb) – Une conservation stricte de séquences de ce gène mitochondrial a été observée chez *P. falciparum* et *P. vivax*. Cependant, certains auteurs ont décrit des divergences entre *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*. Ils ont rapporté une divergence de 12 pb dans une séquence partielle de 1035 pb. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs études, dont l'une analysait et comparait les séquences partielles de *cytb* de *P. ovale* de 357 pb, différenciant clairement deux génotypes de *cytb* mitochondriaux.

MSP-1 – Des auteurs ont décrit une faible diversité de séquences entre la protéine de surface mérozoitaire 1 de *P. ovale curtisi* (PocMSP-1) et celle de *P. ovale wallikeri* (PowMSP-1). Trois segments répétés imparfaits dans le premier et un dans le dernier ont été observés. Des différences entre *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* ont été observées dans les domaines

variables interspécifiques de MSP-1. Les gènes complets de MSP-1 diffèrent par la taille: 5 181 pb pour *P. ovale curtisi* et 5016 à 5043 pb pour *P. ovale wallikeri*. De plus, des variations intraspécifiques spécifiques aux séquences de PoMSP-1 ont été observées. La scission de PocMSP-1 et de PowMSP-1 semble être relativement récente par rapport à d'autres espèces de paludisme humain [5–8].

P. ovale tryptophan-rich antigen (potra) – Oguike et al. ont publié une méthode de PCR nichée utilisant le gène *potra* qui permet de distinguer les deux espèces de *P. ovale*. Dans l'étape 1, les paires d'amorces PoTRAfwd3 et PoTRAreV3 lient un fragment de 787 pb. Par l'utilisation d'amorces internes PoTRAfwd5 et PoTRAreV5, *P. ovale wallikeri* et *P. ovale curtisi* (245 à 355 pb) peuvent être différenciées. Bien que cette technique se soit révélée spécifique à *P. ovale sp.*, il a été observé que les tailles des fragments amplifiés différaient également en raison des différences dans le nombre d'unités répétées, limitant ainsi la discrimination entre espèces: pour *P. ovale wallikeri*, 245, 299 et 335 pb, et pour *P. ovale curtisi*, 299, 317 et 353 pb. Récemment, une méthode de PCR semi-nichée spécifique pour la discrimination des deux espèces de *P. ovale* a été présentée (étape 1; amorces PoTRA-F et PoTRAreV3). Dans la réaction 2, l'amorce PoTRA-F est combiné à des amorces spécifiques de *P. ovale wallikeri* (amorce PowTRA-R; 389, 443 et 479 pb) et de *P. ovale curtisi* (amorce PocTRA-R; 443, 461, et 497 pb). Cette technique permet non seulement la discrimination des deux espèces de *P. ovale*, mais également l'analyse phylogénétique de ces parasites sur la base de variations spécifiques au sein de l'espèce [7,32]. En outre, l'équipe de Tanomsing a suggéré que le nombre de variations de taille de fragments pourrait être supérieur à celui évalué [33].

Autres gènes – Des dimorphismes ont également été observés dans des gènes codant pour la cytochrome c oxydase 1 (*cox1*; au moins 12 locus); lactate déshydrogénase (*ldh*), antigènes de surface de l'ookinète, *P. ovale reticulocyte binding protein 2 (porbp2)*, *P. ovale glyceraldehyde-3-phosphatase (pog3p)*, *P. ovale dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (podhfr-ts)*, *P. ovale cysteine proteinase (pocysp)* [34,35].

DEUXIEME PARTIE :
TRAVAIL EXPERIMENTAL

1. Méthodologie

1.1. Sites et type d'étude

Les sites représentatifs des strates épidémiologiques du paludisme ont été choisis pour mener cette étude. Au niveau de la région centre ouest de Dakar, il s'agit des postes de santé de Deggo à Pikine, du poste de santé de Diarniadiou ; pour la région de Thiès qui est située à 70 km de Dakar, il s'agit de la section de lutte antiparasitaire (SLAP). Au Sud, les postes de santé de Tomboronkoto et Dalaba de la région de Kédougou étaient choisis. Au nord du pays, l'hôpital de Richard était le site.

L'étude s'est déroulée durant la période de transmission palustre entre Juillet et Décembre 2016.

Pour chaque patient sélectionné, un prélèvement de sang permet de procéder au TDR, à la microscopie et à la biologie moléculaire.

1.2. Population d'étude

Tous les patients qui se présentaient au niveau des structures sanitaires pour consultation et chez qui un TDR et/ou une goutte épaisse/frottis mince étaient demandés.

1.3. Techniques

1.3.1. Prélèvement des échantillons

Le sang des patients ayant rempli les critères de sélection est collecté directement sur tube avec anticoagulant (EDTA) et sur papier buvard.

1.3.2. Microscopie

Pour chaque patient qui a bénéficié d'un TDR fourni par PNLP (une seule bande, spécifique de *P. falciparum*), nous avons confectionné un autre TDR à 2 bandes (falciparum et non-falciparum) et deux lames de goutte épaisse/frottis mince. Les lames étaient colorées au Giemsa et lues par deux experts microscopistes certifiés niveau 1 par l'OMS. Les espèces étaient identifiées sur la base des caractéristiques morphologiques des parasites observées au frottis mince. Les densités parasitaires étaient effectuées en assumant 8000 leucocytes/ μ l pour chaque échantillon.

1.3.3. PCR

Une confirmation moléculaire était effectuée sur les échantillons positifs à la microscopie. Nous avons utilisé la PCR à temps réel ciblant le gène de l'ARN ribosomal 18S.

L'ADN a été extrait à partir de papier filtre en utilisant le kit QIAGEN en suivant les instructions du fournisseur.

Le protocole de PCR a été réalisé tel que décrit par Rougemont et *al* [36–39].

1.3.4. Génotypage de *P. ovale*

Pour les échantillons positifs à *P. ovale* à la microscopie et confirmés par la PCR Rougemont, nous avons effectué le typage pour distinguer les deux espèces *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*. Pour cela, nous avons utilisé une PCR nichée ciblant le gène *potra* (*P. ovale* tryptophan rich antigen) [7].

L'extraction de l'ADN a été réalisée avec le kit Qiagen selon les instructions du fournisseur.

Pour la réalisation de la PCR, le programme suivant a été suivi (Tableau I):

Tableau I - Séquences des amorces et paramètres du thermocycleur pour l'amplification du gène *potra*

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Produit de PCR (pb)	Programme de PCR
PoTRA fwd3	5'-GCACAAAAATGGTGCTAACC-3'	787	95 °C pour 2 min; (95 °C pour 30 s; 58 °C pour 45 s; 72 °C pour 1 min) x 44 cycles;
PoTRA rev3	5'-ATCCATTACCTTCCATTGC-3'		72 °C pour 5 min
PoTRA fwd5	5'-ACGGCAAACCCGATAAACAC-3'	245 à 355	95 °C pour 2 min; (95 °C pour 30 s; 52 °C pour 45 s; 68 °C pour 1 min) x 44 cycles;
PoTRA rev5	5'-GTGTTGTAGTATTTACAGG-3'		68 °C pour 5 min

A la première amplification, les amorces sens PoTRAfwd3 et anti-sens PoTRAre3 initient l'amplification d'un fragment de 787 pb du gène *potra*. L'utilisation d'amorces internes PoTRAfwd5 et PoTRAre5 sur le produit de la première amplification permet d'obtenir des fragments dont la taille varie de 245 à 355 pb. La taille du fragment observé permet de distinguer ainsi les deux espèces *P. ovale wallikeri* et *P. ovale curtisi*.

1.4. Éthique

Cette étude a reçu l'approbation du comité d'éthique du Ministère de la Santé et de l'Action Sociale du Sénégal.

2. Résultats

2.1. Microscopie

Parmi les 406 échantillons prélevés, 235 étaient positifs avec 228 cas de *P. falciparum* (97,0%), 3 cas de *P. malariae* (1,3%) et 4 cas de *P. ovale* (1,7%) (Error! Reference source not found.).

Parmi les 4 échantillons positifs à *P. ovale*, les trois étaient diagnostiqués dans des postes de santé ne disposant pas d'appareillage pour faire des examens biologiques complémentaires de routine.

Par contre, un patient était admis à l'unité de pédiatrie de l'hôpital Aristide Le Dantec. L'enfant habitait à Keur Massar et il n'y avait pas de notion de voyage à l'interrogatoire.

Deux patients étaient adultes (29 et 35 ans), 1 patient était adolescent (14 ans) et un patient était un enfant (6 ans).

Les densités parasitaires étaient respectivement 860, 4214, 24643 et 438 parasites/ μ l.

Après trois (3) jours de traitement avec trois (3) doses de l'association artésunate/lumefantrine (Coartem), l'évolution était favorable pour les 4 patients. Toutefois, les patients n'ont pas bénéficié d'un traitement à base de primaquine pour prévenir d'éventuelles rechutes ; cette molécule n'étant pas disponible au Sénégal.

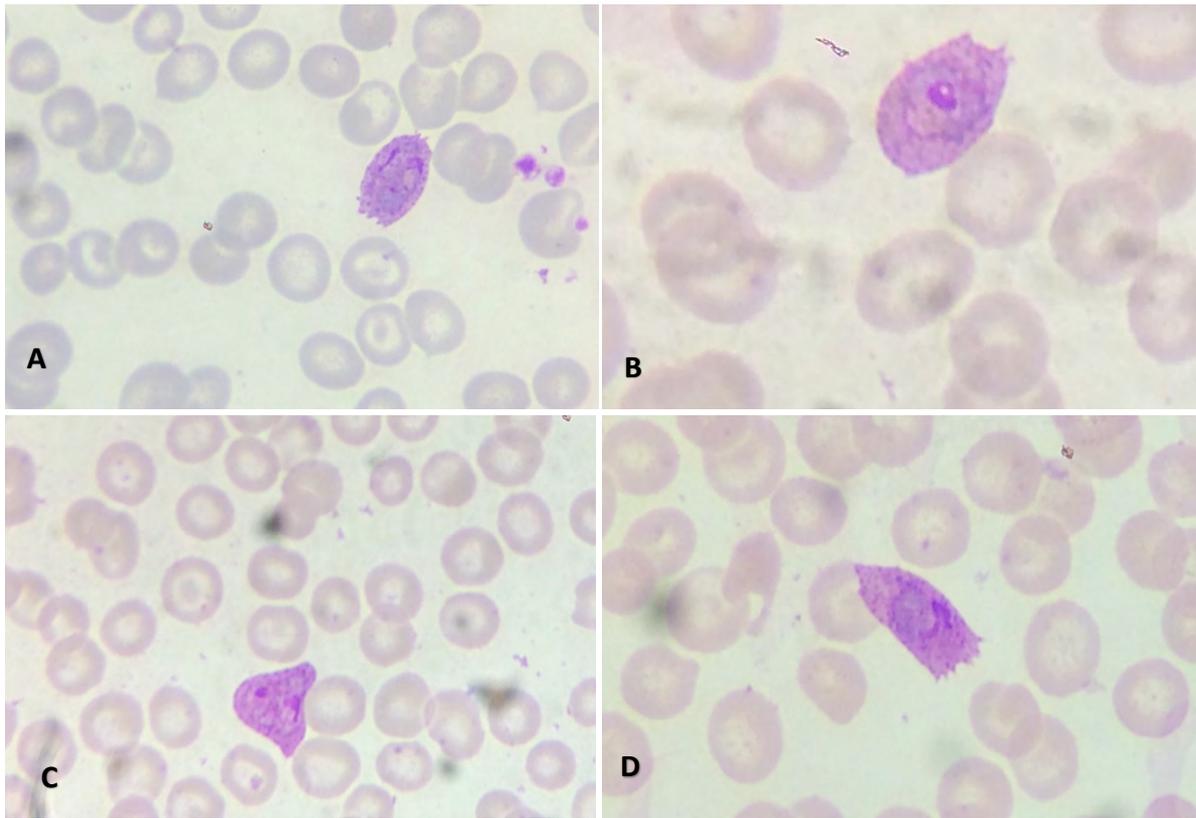


Figure 4: Frottis mince coloré au Giemsa montrant la morphologie du parasite : des trophozoïtes de *P. ovale* infectant A et B) des hématies de tailles agrandies et frangées, C) parfois amiboïdes. D) un gamétocyte dans une hématie frangée donnant un aspect de pinceau.

2.2. PCR

La PCR Rougemont en temps réel a permis de noter une confirmation à 100% les résultats obtenus par la microscopie. En outre, la PCR a permis de détecter sur un échantillon une infection mixte *P. falciparum* et *P. malariae*. Les infections à *P. ovale* n'étaient pas associées à d'autres espèces plasmodiales.

2.3. Génotypage

Le typage moléculaire a permis d'identifier trois cas de *P. ovale wallikeri* et un cas de *P. ovale curtisi* (Figure 5).

Les cas de *P. ovale wallikeri* provenaient du poste de santé de Diamniado, de la SLAP de Thiès et de l'hôpital Aristide Le Dantec tandis que le seul cas de *P. ovale curtisi* provenait de Kédougou (Tableau II).

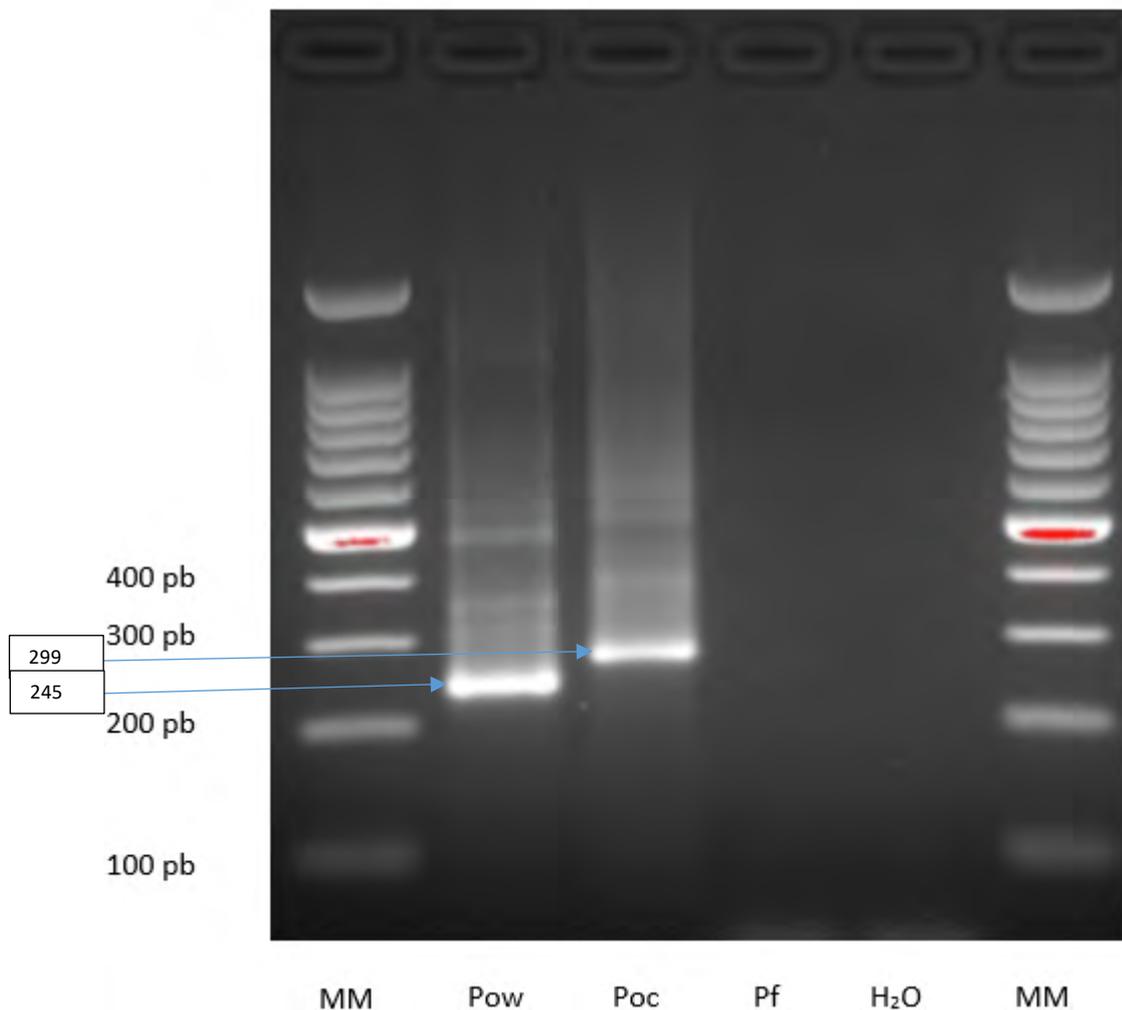


Figure 5: Image d'un gel d'électrophorèse montrant les tailles des fragments du gène *potra* : 245 pb pour *P. ovale wallikeri* (Pow) et 299 pb pour *P. ovale curtisi* (Poc).

MM : Marqueurs de poids moléculaire de 100 paires de bases

Contrôles négatifs : Pf (*P. falciparum*) ; H₂O (eau distillée)

Tableau II - Répartition des espèces de *P. ovale* selon les sites et les densités parasitaires

Sites	Age du patient (années)	Espèces	Densité parasitaire (parasites/μl)
Le Dantec	6	<i>P. ovale wallikeri</i>	860
SLAP Thiès	14	<i>P. ovale wallikeri</i>	4214
Diamniado	35	<i>P. ovale wallikeri</i>	24643
Kédougou	29	<i>P. ovale curtisi</i>	438

3. Discussion

Au Sénégal, très peu d'études ont porté une attention particulière à *P. ovale*. Les études qui ont concerné ce parasite l'ont été essentiellement au sud du pays avec l'Institut Pasteur de Dakar et l'Institut de Recherche et Développement (IRD) au cours d'une étude longitudinale dans le village de Dielmo [19,40]. Sur le plan épidémiologique, *P. ovale* est endémique en Afrique sub-saharienne [10]. A Dielmo la prévalence était estimée à 5,5% au début des années 90 [41]. Par la suite, cette prévalence a drastiquement diminué et le parasite n'était plus retrouvé depuis 2010, ceci en relation avec les politiques de lutte contre le paludisme de ces dernières décennies [1]. Au cours des enquêtes de supervision du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), il était rare que *P. ovale* soit mentionné dans les registres de résultats et dans les rares cas où le parasite est mentionné, il était impossible de retrouver la lame pour contre-lecture par un expert microscopiste.

Le seul cas de *P. ovale curtisi* retrouvé mérite d'être discuté. En effet, Diamniadio est une ville carrefour situé à la sortie de la ville de Dakar où de nombreuses populations humaines venant de différents régions et pays voisins se rencontrent ; ainsi il existerait deux sources possibles de transmission du parasite: existence d'un foyer de faible transmission de *P. ovale* près de Diamniadio, ou que la source de l'infection provenait d'une autre région ou de pays voisins. Par contre, à Kédougou, où la transmission est encore élevée et où des vecteurs efficaces circulent, il n'est pas surprenant de retrouver *P. ovale* avec un tel taux de prévalence. En effet, récemment, une étude moléculaire a révélé la présence de *P. ovale* à Kédougou seulement sous forme d'infections mixtes avec *P. falciparum* à une prévalence de 11,5% [3]. Toutefois, notre étude ne consistait pas à rechercher systématiquement le parasite par la biologie moléculaire. Notre approche était de rechercher les cas cliniquement suspects et diagnostiqués par la microscopie et enfin, nous procédions à une confirmation moléculaire ; ceci expliquerait la prévalence plus faible.

Sur le plan clinique, *P. ovale* est rarement rapporté comme étant responsable de paludisme grave [22,24,42]. Très souvent, l'infection est asymptomatique ou se présente sous une forme cliniquement modérée [2]. On estime que le parasite est associé à la présence de fièvre dans seulement 1% des cas d'infections [41]. Par ailleurs, les densités parasitaires sont souvent faibles, se situant en dessous de 50 parasites/ μ l et dépassant rarement 27000 parasites/ μ l [19]. Cette tendance à des densités parasitaires faibles fait partie des éléments qui expliquent la faible

virulence du parasite. En effet, on considère que pour les signes cliniques se manifester, il faudrait dépasser un seuil de 800 parasites/ μ l [19,40].

Dans un premier temps, *P. ovale curtisi* (type classique) et *P. ovale wallikeri* (type variant) ont été considérés comme étant deux sous types ou sous espèces de l'espèce *P. ovale* mais à partir de 2010, il est apparu qu'il s'agit de deux espèces distinctes au sein de *P. ovale*. Ces deux espèces auraient divergé il y a entre 1 et 3 millions d'années et ont été rapportées comme étant sympatriques dans l'espace et dans le temps [43]. Il faut noter qu'il est impossible de les distinguer à la microscopie. Toutefois, il semble que les deux espèces ont des périodes de latence différentes [7].

Au Sénégal, le génotypage de *P. ovale* est très peu documenté [3,44]. Habituellement, le gène de la petite sous unité de l'ARNr est le plus ciblé pour effectuer un tel génotypage. Dans notre étude, nous avons ciblé le gène *P. ovale tryptophan-rich antigen (potra)* pour génotyper les deux espèces. C'est un gène qui présente un dimorphisme entre les deux espèces. En effet, une différence de taille de la séquence du gène *potra* a été observée entre *P. ovale wallikeri* et *P. ovale curtisi* [7]. Ce dimorphisme au niveau du gène a été exploité dans une PCR nichée où les amorces ciblent des régions conservées du gène et les espèces sont identifiées sur la base de la taille des fragments amplifiés (299 pb ou 317 pb pour *P. ovale curtisi*; 245 bp pour *P. ovale wallikeri*). Toutefois, il a été noté plus tard que la bande de 299 pb pourrait chevaucher entre les deux espèces mais ce problème a été résolu par une méthode de PCR semi-nichée [33].

Le génotypage de *P. ovale* peut présenter un intérêt pour plusieurs raisons. De récentes études ont suggéré que les deux espèces peuvent présenter des caractéristiques de rechutes différentes [32]. Il semblerait aussi que *P. ovale wallikeri* serait sensiblement plus virulent [45] ; c'est ainsi que la thrombopénie sévère a été associée à *P. ovale wallikeri* comparativement à *P. ovale curtisi* [46], il en est de même de la densité parasitaire élevée [45]. Toutefois cette dernière donnée reste controversée [46].

Par ailleurs, il devient très probable qu'il existe un foyer de transmission de *P. ovale* au niveau de la région du centre ouest du Sénégal [44]. En effet, les 3 cas ont été répertoriés dans cette région.

Il devient ainsi nécessaire de rechercher la notion d'exposition par des techniques sérologiques spécifiques des espèces non-falciparum afin de connaître l'étendue de l'épidémiologie de ces espèces.

En outre, il est indispensable de disposer de la chloroquine dans l'arsenal thérapeutique, qui est le médicament de choix dans le traitement du paludisme due aux espèces non-

falciparum quoique les ACT ont montré leur efficacité [47]; il en est de même de la primaquine pour la prévention des rechutes.

CONCLUSION

Nous estimons que la prévalence du paludisme à *P. ovale* reste faible au Sénégal. Toutefois, les infections à Plasmodium non-falciparum ont tendance à être sous diagnostiqué au niveau des structures sanitaires. Il est nécessaire de tenir compte de ces espèces dans la lutte contre le paludisme. Leur négligence mène souvent à un diagnostic erroné. Le retard diagnostique qui en résulte peut conduire à la demande d'une batterie d'examen complémentaires et des traitements médicamenteux non nécessaires et une augmentation de la morbidité liée au parasite. Le PNLN ne doit plus se limiter à fournir des TDR spécifiques uniquement de *P. falciparum*. En outre, les microscopistes du paludisme doivent être suffisamment formés et certifiés pour reconnaître de telles espèces. Mieux, avec les nouvelles techniques moléculaires simplifiées telles que la loop-mediated isothermal amplification (LAMP) qui est une technique d'amplification moléculaire en condition isothermale, le dépistage des espèces non-falciparum devient plus aisé. Le génotypage peut être plus fiable par l'utilisation de la technique HRM pour distinguer *P. ovale wallikeri* et *P. ovale curtisi*.

Avec ces dernières techniques, on pourrait également acquérir une nouvelle perspective sur la gestion adéquate du paludisme à *P. ovale* - un parasite négligé, qui pourrait à l'avenir gagner en importance pour la santé publique dans l'optique d'une élimination contre le paludisme.

REFERENCES

1. **Groger M, Fischer HS, Veletzky L, Lalremruata A, Ramharter M.** A systematic review of the clinical presentation, treatment and relapse characteristics of human *Plasmodium ovale* malaria. *Malar J.* 2017;16:1–16.
2. **Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC.** *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* – the ‘bashful’ malaria parasites. *Trends Parasitol.* 2007;23:278–83.
3. **Daniels RF, Deme AB, Gomis JF, Dieye B, Durfee K, Thwing JI, et al.** Evidence of non-*Plasmodium falciparum* malaria infection in Kédougou, Sénégal. *Malar J.* 2017;16:9.
4. **Fuehrer HP, Noedl H.** Recent advances in detection of *Plasmodium ovale*: Implications of separation into the two species *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi*. *J. Clin. Microbiol.* 2014.
5. **Tachibana M, Tsuboi T, Kaneko O, Khuntirat B, Torii M.** Two types of *Plasmodium ovale* defined by SSU rRNA have distinct sequences for ookinete surface proteins. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;
6. **Zhou R, Liu Y, Li S, Zhao Y, Huang F, Yang C, et al.** Polymorphisms analysis of the *Plasmodium ovale* tryptophan-rich antigen gene (*potra*) from imported malaria cases in Henan Province. *Malar J.* 2018;
7. **Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al.** Two Nonrecombining Sympatric Forms of the Human Malaria Parasite *Plasmodium ovale* Occur Globally. *J Infect Dis.* 2010;201:1544–1550.
8. **Laval F De, Oliver M, Rapp C, Santi VP De, Mendibil A, Deparis X, et al.** The challenge of diagnosing *Plasmodium ovale* malaria in travellers : report of six clustered cases in french soldiers returning from West Africa. *Malar J.* 2010;9:358.
9. **Stephens J.** A new malaria parasite of man. *Ann Trop Med Parasitol.* 1922;16:383–8.
10. **Collins WE, Jeffery GM.** *Plasmodium ovale* : Parasite and Disease. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:570–81.

11. **James SP, Nicol WD, Shute PG.** Plasmodium ovale Stephens 1922. Parasitology. 1933;
12. **Focus M, Ovale ONP.** Recent Advances in Detection of Plasmodium ovale : Implications of Separation into the Two Species Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium ovale curtisi. 2014;52:387–91.
13. **Beier MS, Schwartz IK, Beier JC, Perkins P V., Onyango F, Koros JK, et al.** Identification of malaria by ELISA in sporozoite and oocyst infected Anopheles from western Kenya. Am J Trop Med Hyg. 1988;
14. **Collins WE, Sullivan JS, Nace D, Williams T, Sullivan JJ, Galland GG, et al.** Experimental infection of Anopheles farauti with different species of Plasmodium. J Parasitol. 2002;
15. **Lim YAL, Mahmud R, Chew CH, Thiruventhiran T, Chua KH.** Plasmodium ovale infection in Malaysia : first imported case. 2010;1–6.
16. **Konate L, Diagne N, Brahim K, Faye O, Legros F, Rogier C, et al.** Biologie des vecteurs et transmission de Plasmodium falciparum, P. malariae et P. ovale dans un village de savane d’Afrique de l’Ouest (Dielmo, Sénégal). Parasite. 1994;1:325–33.
17. **Roucher C, Rogier C, Sokhna C, Tall A, Trape JF.** A 20-year longitudinal study of Plasmodium ovale and Plasmodium malariae prevalence and morbidity in a West African population. PLoS One. 2014;
18. **Collins WE, Jeffery GM.** A retrospective examination of sporozoite-induced and trophozoite-induced infections with Plasmodium ovale: Development of parasitologic and clinical immunity during primary infection. Am J Trop Med Hyg. 2002;
19. **Faye FBK, Spiegel A, Tall A, Sokhna C, Fontenille D, Rogier C, et al.** Diagnostic Criteria and Risk Factors for Plasmodium ovale Malaria. J Infect Dis. 2002;186:690–5.

20. **Maguire JD, Baird JK.** The ‘ non-falciparum ’ malarias : the roles of epidemiology , parasite biology , clinical syndromes , complications and diagnostic rigour in guiding therapeutic strategies. *Ann Trop Med Parasitol.* 2010;104:283–301.
21. **Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, et al.** The Dielmo project: A longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;
22. **Lau Y, Lee W, Tan L, Kamarulzaman A, Faridah S, Omar S, et al.** Acute respiratory distress syndrome and acute renal failure from *Plasmodium ovale* infection with fatal outcome. *Malar J [Internet]. Malaria Journal;* 2013;12:1–8. Available from: *Malaria Journal*
23. **Cinquetti G, Banal F, Rondel C, Plancade D, Roman CD Saint, Adriamanantena D, et al.** Splenic infarction during *Plasmodium ovale* acute malaria : first case reported. *Malar J.* 2010;9:288.
24. **Lemmerer R, Unger M, Voßen M, Forstner C, Jalili A, Starzengruber P, et al.** Case report: spontaneous rupture of spleen in patient with *Plasmodium ovale* malaria. *Cent Eur J Med.* 2015;1–5.
25. **Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN.** Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;58:283–92.
26. **Rougemont M, Saanen M Van, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K, et al.** Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5636–43.
27. **WHO.** Guidelines For The Treatment of Malaria - 3rd edition. World Heal. Organization. Geneva; 2015.

28. **Visser BJ, Wieten RW, Kroon D, Nagel IM, B elard S, Van Vugt M, et al.** Efficacy and safety of artemisinin combination therapy (ACT) for non-falciparum malaria: A systematic review. *Malar. J.* 2014.
29. **Siswantoro H, Russel B, Ratcliff A, Prasetyorini B, Chalfein F, Marfurt J, et al.** In vivo and in vitro efficacy of chloroquine against *Plasmodium malariae* and *P. ovale* in Papua, Indonesia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;
30. **Ringwald P, Bickii J, Same-Ekobo A, Basco LK.** Pyronaridine for treatment of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;
31. **Phillips-Howard PA.** Malaria. Principles and Practice of Malariology. Vol 1 & 2. *J R Soc Med.* 1989;
32. **Nolder D, Oguike M, Maxwell-Scott H, Niyazi H, Smith V, Chiodini P, et al.** An observational study of malaria in British travellers: *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* differ significantly in the duration of latency. *BMJ Open.* 2013;3:e002711.
33. **Tanomsing N, Imwong M, Sutherland CJ, Dolecek C, Hien TT, Nosten F, et al.** Genetic Marker Suitable for Identification and Genotyping of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri*. *J Clin Microbiol.* 2013;51:4213–6.
34. **Fuehrer HP, Habler VE, Fally MA, Harl J, Starzengruber P, Swoboda P, et al.** *Plasmodium ovale* in Bangladesh: Genetic diversity and the first known evidence of the sympatric distribution of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* in southern Asia. *Int J Parasitol.* 2012;
35. **Joste V, Kamaliddin C, Kendjo E, Hubert V, Argy N, Houz e S.** Distinction of *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* using quantitative Polymerase Chain Reaction with High Resolution Melting revelation. *Sci Rep.* 2018;

- 36. Bretagne S.** Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: Limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003. p. 505–11.
- 37. Farcas G a, Zhong KJY, Mazzulli T, Kain KC.** Evaluation of the RealArt Malaria LC Real-Time PCR Assay for Malaria Diagnosis Evaluation of the RealArt Malaria LC Real-Time PCR Assay for Malaria Diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2004;42:636–638.
- 38. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, et al.** Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1214–9.
- 39. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K.** Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5636–43.
- 40. Roucher C, Rogier C, Sokhna C, Tall A, Trape J-F.** A 20-Year Longitudinal Study of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* Prevalence and Morbidity in a West African Population. *PLoS One.* 2014;9:1–13.
- 41. Trape J, Tall A, Sokhna C, Ly AB, Diagne N, Ndiath O, et al.** The rise and fall of malaria in a west African rural community , Dielmo , Senegal , from 1990 to 2012 : a 22 year. *Lancet Infect Dis.* 2014;14:476–88.
- 42. Strydom K, Ismail F, Freaun J.** *Plasmodium ovale* : a case of not-so-benign tertian malaria. *Malar J.* 2014;13:1–5.
- 43. Chiaka M, Betson M, Burke M, Nolder D, Stothard JR, Kleinschmidt I, et al.** *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. *Int J Parasitol.* 2011;41:677–83.
- 44. Diallo MA, Badiane AS, Diongue K, Deme A, Lucchi NW, Gaye M, et al.** Non-falciparum malaria in Dakar: a confirmed case of *Plasmodium ovale wallikeri* infection. *Malar J.*

2016;15:4

- 45. Rojo-marcos G, Rubio-muñoz JM, Ramírez-olivencia G, García-bujalance S, Elcuaz-romano R, Díaz-menéndez M, et al.** Comparison of Imported Plasmodium ovale curtisi and P. ovale wallikeri Infections among patients in Spain. Emerg Infect Dis. 2014;20:2005–11.
- 46. Rojo-marcos G.** Plasmodium ovale infection: description of 16 cases and a review [in Spanish]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29:204–8.
- 47. Mombo-ngoma G, Kleine C, Basra A, Würbel H, Diop DA, Capan M, et al.** Prospective evaluation of artemether-lumefantrine for the treatment of non-falciparum and mixed-species malaria in Gabon. Malar J. 2012;11:1–6.

**Le paludisme à *Plasmodium ovale* au Sénégal : intérêt du diagnostic dans la lutte
contre le paludisme**

Résumé

Introduction

Le paludisme à *Plasmodium ovale* est souvent mal diagnostiqué, ceci lié à la méconnaissance de ce parasite et de la négligence dont il fait l'objet. L'objectif de cette étude était de rechercher activement les cas de de *P. ovale* qui passeraient inaperçus dans les structures de santé.

Méthode

La microscopie a été effectuée par des experts microscopistes chez des patients suspects de paludisme. Les résultats ont été corrigés par la PCR. Les cas positifs à *P. ovale* ont été génotypés en ciblant le gène *potra*.

Résultats

406 échantillons ont été prélevés. La microscopie a permis de noter 228 cas de *P. falciparum* (97,0%) et 4 de *P. ovale* (1,7%).

Les cas de *P. ovale* observés à la microscopie ont été confirmés par la PCR en temps réel. Le génotypage de *P. ovale* a révélé 3 cas de *P. ovale wallikeri* et 1 cas de *P. ovale curtisi*.

Conclusion

La prévalence du paludisme à *P. ovale* reste faible au Sénégal. Toutefois, il convient de former les microscopistes du paludisme à la reconnaissance des espèces non-falciparum pour éviter les retards diagnostiques et les bilans inutiles.

Mots-clés : Paludisme, *Plasmodium ovale*, Sénégal