



PaluFerlo

Etude bio-culturelle du paludisme chez les populations rurales du Ferlo au Sénégal

Rapport final

15/09/2015

Responsables scientifiques :

Thierry LEFEVRE

UMR 5290 Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle
thierry.lefevre@ird.fr

Babacar FAYE

Service de Parasitologie – Mycologie. Faculté de Médecine, Pharmacie et Odonto-Stomatologie.
Université Cheikh Anta DIOP, Dakar
bfaye67@yahoo.fr

Sommaire

Sommaire	2
Résumé succinct du projet	3
1. Informations générales concernant le projet.....	4
2. Contexte problématique initial	5
3. Méthodologie	5
4. Résultats	8
5. Discussion	9
Conclusion	9

Résumé succinct du projet

L'objectif de ce projet était d'initier des recherches sur les maladies infectieuses au sein des populations rurales du Ferlo au Sénégal en se concentrant dans un premier temps sur l'épidémiologie du paludisme dans cette région. Des gouttes épaisses et des confettis sanguins ont réalisées en Aout 2014 au cours de l'Université d'été de Widou (10 au 20 Aout) afin de caractériser la diversité spécifique ainsi que l'abondance des parasites *Plasmodium* responsables du paludisme humain. En parallèle, des facteurs biologiques (e.g. âge, sexe), socioéconomiques et comportementaux/culturels ont été récoltés. Enfin, des phlébotomes, insectes vecteurs des leishmanioses, ont été capturés afin de déterminer la présence possible de cette maladie dans la région.

La prévalence du paludisme dans les populations de la région de Widou en Aout 2014 était de 0% toutes classes d'âge confondues. Les captures de phlébotomes ont révélé une diversité et une abondance importante ainsi que la présence de *Leishmania infantum*, parasite responsable de la forme cutanée de la leishmaniose.

Au moins deux facteurs non-exclusifs peuvent expliquer l'absence de Paludisme dans cette région à cette période. D'abord le retard des pluies nécessaires au développement des moustiques anophèles responsables de la transmission du paludisme. D'autre part, un investissement et un effort massif de la part des pouvoirs publics Sénégalais pour la lutte intégrée contre le paludisme. La présence du parasite responsable de la leishmaniose cutanée est préoccupante et justifie des études complémentaires. En particulier, de futures études dans cette région se concentreront sur les rongeurs (principaux réservoirs des parasites des leishmanioses), ainsi que sur le degré de contact hommes-phlébotomes. Enfin, les parasitoses intestinales et la bilharziose urinaire chez les enfants (et les mollusques, hôtes intermédiaires de cette maladie, dans les mares) seront recherchés.

Mots clés : Maladies Infectieuses, Paludisme, Leishmaniose, Ecologie de la Santé

1. Informations générales concernant le projet

Responsable(s) scientifique(s) et Participants

Nom-Prénom	Fonctions et laboratoire	Spécialité
LEFEVRE Thierry	Chargé de Recherches au CNRS UMR MIVEGEC Montpellier Responsable scientifique thierry.lefevre@ird.fr (+226 72 82 83 55)	Ecologie, Evolution, Parasitologie, Entomologie, Maladies vectorielles
FAYE Babacar	Professeur à l'UCAD Service de Parasitologie-Mycologie, UCAD, Dakar Responsable scientifique bfaye67@yahoo.fr (+221 77 639 49 52)	Médecine, Parasitologie, Paludisme, Leishmanioses
BOETSH Gilles	Directeur de Recherches au CNRS. UMI 3189 ESS, Dakar	Anthropologie, Ecologie de la Santé.
RENAUD François	Directeur de Recherches au CNRS. UMR MIVEGEC Montpellier	Ecologie, Evolution, Parasitologie, Ecologie de la Santé, Médecine Evolutionniste
DUBOSQ Priscilla	Chargé de Recherches au CNRS UMI 3189 ESS, Dakar.	Anthropologie, Ecologie de la Santé.

Temporalité

Date de début des travaux : Aout 2014

Date de fin des travaux pour la rédaction du rapport : Septembre 2015

Poursuite de l'étude en cours : Oui

Demande de soutien financier à l'OHM pour l'année 2015 : Oui

2. Contexte problématique

Le contexte actuel des changements globaux suscite un besoin urgent d'examiner et de mieux comprendre les relations entre l'environnement, l'homme et ses maladies. L'écologie de la santé constitue à ce titre une discipline émergente résolument interdisciplinaire, associant les sciences de l'écologie, les sciences médicales et les sciences sociales.

L'Unité Mixte Internationale 3189 «Environnement, Santé, Sociétés » développe actuellement un important programme de recherche sur la compréhension intégrée de l'impact de la Grande Muraille Verte (GMV, mise en place pour répondre aux diverses crises écologiques et humaines consécutives aux épisodes de sécheresse au sahel) sur la dynamique des sols et de l'eau, la biodiversité, les systèmes sociaux et de santé et la prévalence d'un certain nombre de maladie chronique non transmissible. Malgré l'importance des agents infectieux transmissibles en termes de santé publique et vétérinaire, l'étude des interactions entre les pathogènes, leurs hôtes et leur environnement, reste limitée. Le développement des recherches à l'interface entre l'écologie et la santé est donc prioritaire dans le cadre de l'OHMi Tébékéré afin de mettre en place des stratégies de prévention et de contrôle adaptées face à l'émergence et la réémergence des maladies infectieuses transmissibles dans les populations humaines et animales qui accompagnent les changements écosystémiques dans la zone du Ferlo.

L'objectif général de cette proposition est d'engager des recherches sur les maladies transmissibles dans la zone sahélienne du Ferlo, région en pleine mutation avec l'implantation de la GMV. Ces recherches s'appuieront sur une approche pluridisciplinaire incluant les variables biologiques, sociales, culturelles et comportementales des populations concernées (i.e. études bio-culturelles). Dans un premier temps, cela se traduira par un objectif plus spécifique visant à évaluer l'effet de plusieurs variables bio-culturelles sur la diversité et l'abondance des espèces plasmodiales présentes dans les populations humaines.

3. Méthodologie

Le diagnostic du paludisme s'est déroulé au cours du bilan médical organisé au centre de santé de Widou Thiengoly. Un numéro est attribué à chaque sujet désirant obtenir son bilan de santé puis un questionnaire est administré. Une mesure de la tension artérielle est effectuée ainsi que les mesures de poids, taille et glycémie. Une goutte épaisse et un frottis mince ont été réalisés sur chaque sujet pour le diagnostic microscopique du paludisme. La goutte épaisse consiste en un prélèvement de 1 à 2 gouttes de sang sur le bout du doigt à l'aide d'un vaccinostyle. Le sang est ensuite étalé de façon homogène par mouvements circulaires avec le coin d'une seconde lame. La goutte épaisse permet la détection et la quantification des parasites *Plasmodium*. Pour le frottis mince, une goutte de sang est déposée sur la même lame et étalée de manière très fine en glissant avec le bord d'une seconde lame de manière à obtenir une couche unicellulaire d'éléments figurés du sang. Le frottis mince permet de déterminer l'espèce de *Plasmodium* présent dans le sang du sujet. Une fois le sang séché, le frottis est fixé au méthanol puis la goutte épaisse et le frottis sont colorés au Giemsa 10%. En parallèle, deux confettis sanguins (dépôt de 2 gouttes de sang sur un papier buvard) par sujet ont été confectionnés, l'un pour le diagnostic moléculaire du paludisme, l'autre pour la réalisation de la technique de western blot pour le dépistage des leishmanioses. De retour au laboratoire du service de Parasitologie – Mycologie à l'UCAD, Université Cheikh Anta DIOP, Dakar, les gouttes épaisses, la lecture des lames s'effectue au microscope optique à fond clair en utilisant l'objectif X100. Le seuil de détection de la goutte épaisse est d'environ 10 à 20 parasites/ μ l de sang.

Une confirmation de la lecture microscopique a été réalisée par une technique de biologie moléculaire (qPCR) basée sur la détection d'une séquence spécifique d'acides nucléiques du parasite dans le sang absorbé sur le confetti. Elle permet un diagnostic plus fin avec un seuil de détection inférieur à 1 parasite/ μ l de sang.

Concernant l'étude de la leishmaniose, plusieurs techniques de piégeages de phlébotomes ont été utilisées : le piégeage adhésif, le piégeage lumineux de type CDC et les pulvérisations intradomiciliaires avec insecticides.

Le piégeage adhésif :

Le piège adhésif consiste en une feuille de papier blanc de 20 cm de côté, de faible épaisseur mais assez rigide, enduite d'huile de Ricin sur les deux faces. Le piège est disposé à l'entrée de terriers et autres petits trous du sol, dans les trous des termitières, les anfractuosités au niveau des arbres et des murs, etc. Il doit être disposé de telle sorte qu'il permette l'entrée et la sortie des animaux qui ont élu domicile dans les terriers, sans la moindre gêne, ceci pour éviter qu'il soit déplacé.

Ce piégeage est le mieux adapté pour recenser le peuplement phlébotomien d'une localité. Il permet une bonne étude de la distribution géographique de ces insectes (Niang, 1992).

Durant nos prospections, 30 à 40 papiers huilés ont été utilisés chaque jour dans les périmètres de reboisement. Les pièges ont été posés entre 18 et 19 heures pour être relevés le lendemain entre 7 et 9 heures du matin. Ils ont ensuite été regroupés par station dans des chemises.

Le dépouillement des pièges s'effectue sous la loupe binoculaire, à l'aide d'une fine aiguille montée. Il est nécessaire de procéder minutieusement au prélèvement des phlébotomes pour ne pas les détériorer. Une étiquette est introduite dans chaque flacon, portant mention au crayon à mine, du nom ou numéro de la station, de la date, du type de piégeage et du nombre d'individus.

Le piégeage lumineux de type CDC

Le piège est constitué d'un cylindre en plastique, muni d'un système d'aspiration composé d'un petit moteur relié à un ventilateur. Une lampe de faible éclairage est située au-dessus du moteur. Ce cylindre est relié à son extrémité à cage en tulle moustiquaire ; cette dernière permet de recueillir les individus aspirés à l'intérieur par le ventilateur.

Cette méthode de piégeage, qui présente l'avantage de capturer des phlébotomes vivants, est basée sur le phototactisme positif de ces insectes. Les échantillons obtenus sont généralement en bon état et permettent de faire des études efficaces toutes sortes : systématiques, taxonomiques, parasitologiques. Les pièges ont été placés à l'intérieur des cases, à l'entrée des terriers ou à proximité des habitations, suspendus par un support à l'aide de ficelle, soit en position normale soit en position renversée.

Au cours de nos prospections, les pièges ont été placés le soir entre 17 et 19 heures et ont été relevés le lendemain matin entre 7 et 9 heures ; cet intervalle de temps englobe les deux périodes d'intenses activités des phlébotomes : le crépuscule et l'aube.

Les insectes ont été ensuite récupérés et gardés dans de l'alcool à 70° pour leurs futurs montages et détermination au laboratoire..

Les pulvérisations intra-domiciliaires

La méthode est basée sur les propriétés asphyxiantes de la pyrèthrine, principe actif du produit insecticide "Yotox" qui a été utilisé ici. Après pulvérisation avec les bonbonnes de "Yotox", la pièce est fermée pendant une douzaine de minutes, le temps nécessaire pour permettre à la pyrèthrine d'agir sur les insectes. Un drap blanc étalé sur tout le plancher de la pièce permet de recueillir les insectes tués ou assommés.

Les pulvérisations se déroulent entre 8 et 11 heures du matin, période pendant laquelle les phlébotomes sont encore présents dans les habitations.

Cette méthode de capture permet d'avoir une bonne idée de la diversité spécifique des espèces endophiles. Les individus capturés sont soit morts, soit endormis.

Montage et identification

L'ensemble des individus capturés (mâles et femelles), ont été regroupés par village et par piège dans des tubes contenant de l'alcool à 70 % puis identifiés au laboratoire. C'est la méthode d'identification rapide qui a été utilisée. Seuls la tête et le génitalia ont été montés sur la lame. Ils ont tout d'abord été séparés du reste du corps. Ils ont été ensuite immergés dans une goutte du liquide Marc André portée à ébullition grâce à la flamme d'un bec de gaz. Après cette étape, ils ont été bien étalés sur la lame, dans une goutte de liquide de montage la face ventrale de la tête vers le haut. L'identification a été faite morphologiquement au microscope (Abonnec, 1972) juste après la pose de la lamelle ou plusieurs jours après.

Le reste du corps des femelles (thorax et abdomen) a été gardé à - 20°c pour l'extraction d'ADN et les PCR diagnostiques de Leishmania.

Extraction et PCR diagnostique Leishmania

Le diagnostic de Leishmania a été réalisé sur l'ADN de chaque femelle de phlébotome en suivant la méthode utilisée par Noyes et al. (1998). Cette méthode est une PCR nichée spécifique des espèces de Leishmania qui consiste en une amplification de la région des minicercles de l'ADN kinétoplastique. Elle est très sensible en raison de sa cible, une région hyper répétée, et de son

caractère « nichée ». Elle permet de distinguer clairement les espèces de l'Ancien Monde et en particulier : *L. major*, *L. tropica* et *L. infantum*. De manière intéressante, elle permet d'amplifier les sauroleishmanies et de donner un profil distinct des espèces du genre *Leishmania*. Le protocole utilisé est celui décrit dans Noyes et al. (1998). Les amplifications sont vérifiées par électrophorèse en gel d'agarose à 1,6%.

Commentaire [t1]: Babacar, peux-tu stp compléter cette section ou demander à Massila.

4. Résultats

4.1 Paludisme

607 sujets ont été diagnostiqués par microscopie (goutte épaisse) et qPCR (sang récolté sur confetti) correspondant à 204 sujets ≤ 5 ans, 102 > 5 ans et 401 > 15 ans. La prévalence du paludisme au sein de ces différentes classes d'âges était de 0%. En d'autres termes, aucun cas de paludisme n'a été diagnostiqué par l'approche microscopique en Aout 2014 à Widou-Thiengholy.

4.2. Phlébotomes

Un total de 636 phlébotomes ont été capturés :

- 439 par papier huilée: (terriers)
- 173 par piège CDC:
 - 79 en intra domiciliaire
 - 102 en extra domiciliaire (champs)
- 10 par pulvérisation intra domiciliaire

Parmi ces 636 phlébotomes, 337 mâles et 285 femelles ont pu être identifiés (14 NA).

Le tableau ci-dessous décrit la diversité spécifique des phlébotomes capturés.

Espèces	Mâle (%)	Femelles (%)	Totaux (%)
<i>S. clydei</i>	311 (92.5)	217 (77)	528 (85.4)
<i>S. schwetzi</i>	19 (5.7)	57 (20)	76 (12.3)
<i>P. dubosqi</i>	1 (0.3)	0	1 (0.2)
<i>S. ghesquierei</i>	0	1 (0.4)	1 (0.2)
<i>S. adleri</i>	5 (1.5)	3 (1.1)	8 (1.2)
<i>S. antennata</i>	0	1 (0.4)	1 (0.2)
<i>S. buxtoni</i>	0	1 (0.4)	1 (0.2)
<i>S. dubia</i>	0	2 (0.7)	2 (0.3)
Totaux	336 (100)	282 (100)	618 (100)

Enfin, deux phlébotomes (1 *S. schwetzi* et 1 *S. clydei*) étaient infectés par *Leishmania infantum*, l'agent pathogène responsable de la leishmaniose cutanée.

5. Discussion

Aucune infection palustre n'a été enregistrée au cours de l'université d'été à Widou en Aout 2014. La région médicale de Louga (nord) est actuellement dans une phase de pré-élimination du paludisme avec un nombre de cas de paludisme inférieur à cinq pour mille habitants. En particulier, 274 cas de paludisme ont été recensés au premier trimestre de l'année 2015, chez les 109.056 malades consultés dans les huit districts sanitaires de la région, soit 0,25 %. Ces résultats sont excellents comparés aux autres pays de la sous région et sont le fruit d'efforts massifs consentis par les pouvoirs publics et les partenaires internationaux dans le cadre du Programme de Lutte National contre le Paludisme (PNLP). Le PNLN a mis en œuvre une approche intégrée de la prévention et de la lutte au travers :

- (i) La distribution de moustiquaires imprégnées à longue durée d'action,
- (ii) Le test de diagnostic rapide gratuit
- (iii) La disponibilité des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisine (ACT)
- (iv) L'accès aux soins facilité par l'accroissement du nombre des centres de santé ainsi que la formation d'équipes de santé mobiles.
- (v) Le traitement intermittent préventif pendant la grossesse et chez les enfants de moins de cinq ans (cf la campagne de chimio-prévention du paludisme saisonnier en 2015).

Tous ces facteurs ont contribué ensemble à la diminution significative des cas de paludisme dans la région du Ferlo. Par contre une inquiétude apparaît : cette baisse de prévalence s'accompagne d'un déclin rapide de l'immunité naturelle acquise par les populations locales les rendant ainsi plus vulnérables aux parasites. Ainsi les efforts de prévention et de lutte doivent être maintenus et étendus aux autres pays frontaliers afin de ne pas voir la mortalité s'accroître au cours des prochaines années.

Enfin, il ne faut pas exclure les facteurs climatiques locaux pour expliquer l'absence de cas de paludisme en Aout 2014 à Widou. Cette année là, les pluies étaient exceptionnellement tardives (première grosse pluie le 20 Aout i.e. dernier jour de l'Université d'été). Ainsi les marigots, gîtes larvaires indispensables au développement des moustiques anophèles vecteurs du paludisme, étaient asséchés. La densité des anophèles vecteurs était très basse (observation personnelle) limitant ainsi la transmission du parasite.

Par ailleurs, un autre résultat important de notre étude est la présence de *Leishmania infantum* chez deux espèces de phlébotomes *S. schwetzi* et *S. clydei*. Il sera important à l'avenir d'établir la fréquence de contact de ces vecteurs avec l'homme. En outre, des recherches visant à identifier les réservoirs animaux de ces parasites (rongeurs, chiens) sont indispensables.

Conclusion

Les populations rurales du Ferlo semblent être très peu concernées par le paludisme. Les efforts de prévention et de lutte doivent être maintenus au risque de voir la mortalité palustre s'accroître dans les prochaines années suite à un déclin des défenses naturelles. La présence, chez les phlébotomes, de parasites responsables de Leishmanioses justifie la poursuite des recherches sur ce système vectoriel (réservoirs, homme, vecteurs, parasites).

Enfin ce projet a rempli son objectif général d'engager des recherches sur les maladies transmissibles avec la mise en place d'une collaboration entre équipes aux compétences complémentaires, approche indispensable pour répondre aux questions se situant à l'interface entre l'environnement, les sociétés humaines et la santé.

Production associée au projet

Le projet PaluFerlo de l'OHMi Tésékéré 2014 découlera sur deux publications :

1/ Incidence palustre au Sahel : le cas du Burkina Faso et du Sénégal

En parallèle de l'étude sur les populations rurales du Ferlo nos équipes ont également procédé à des diagnostics de paludisme (même méthodologie que celle décrite ici) dans les populations rurales du Nord Burkina (populations de Oursi, Gorom-Gorom et Déou).

2/ Phlébotomes

Un article reportant les résultats des captures de Phlébotomes (abondance, diversité spécifique) dans le cadre du projet OHMi couplés aux résultats des captures de phlébotomes au Nord Burkina à la même période.

Valorisation (Colloques, conférences, ouvrages de vulgarisation)

Commentaire [t2]: J'ai demandé à Priscilla l'initulé du talk qu'elle avit donné sur ces résultats.