



**HAL**  
open science

# Dynamique des infections submicroscopiques par *Plasmodium falciparum* pendant la grossesse au Bénin : déterminants et impact des stratégies de lutte

Cornélia Hounkonnou

## ► To cite this version:

Cornélia Hounkonnou. Dynamique des infections submicroscopiques par *Plasmodium falciparum* pendant la grossesse au Bénin : déterminants et impact des stratégies de lutte. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS239 . tel-03375053

**HAL Id: tel-03375053**

**<https://theses.hal.science/tel-03375053v1>**

Submitted on 12 Oct 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITE**

Spécialité **EPIDEMIOLOGIE**

École doctorale Pierre Louis de santé publique  
ED 393 Épidémiologie et Sciences de l'Information Biomédicale

Thèse préparée dans le cadre du Réseau doctoral en santé publique animé par l'EHESP

Présentée par

**Mme. Cornélia Priscile Ayèssi HOUNKONNOU**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de SORBONNE UNIVERSITE**

**DYNAMIQUE DES INFECTIONS SUBMICROSCOPIQUES PAR *PLASMODIUM FALCIPARUM* PENDANT LA GROSSESSE AU BENIN : DETERMINANTS ET IMPACT DES STRATEGIES DE LUTTE**

Soutenue le 15 Décembre 2020

Devant le jury composé de :

M. le Dr Michel Cot  
M. le Dr Gilles Cottrell  
Mme. le Dr Valériane Leroy  
M. le Dr Olivier Marcy  
Mme. le Dr Huynh Bich-Tram  
Mme. le Dr Raquel Gonzalez  
M. le Pr Pascal Astagneau

Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur

Thèse préparée dans le cadre du réseau doctoral en santé publique animé par l'École des  
Hautes Études en Santé Publique (EHESP)



Je dédie ce travail

A ma princesse d'amour Maeva,

A mes parents Norbert et Lidwine,

A ma sœur Doriane et,

A mon frère Mehdy

# Remerciements

L'aboutissement de ce travail de thèse n'aurait pas pu se faire sans l'aide et le concours de tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont soutenu tout le long de ce travail de recherche. Je tiens à leur témoigner ma reconnaissance à travers ces remerciements.



**Aux femmes de la commune de Sô-Ava et d'Abomey-Calavi,**



**A mon directeur de thèse Michel COT,**

Je te remercie pour avoir accepté de m'encadrer au cours de cette thèse. Tu as su me conseiller et me guider grâce à ta grande expertise dans le domaine des maladies infectieuses. Ta disponibilité et ta confiance en moi m'ont amené à aller toujours plus loin. J'ai énormément appris à tes côtés. Merci d'avoir permis la réalisation de cette thèse dans de bonnes conditions. La fin de ma thèse a coïncidé avec ton départ à la retraite. Merci d'avoir continué à être disponible malgré ton départ. Agréable retraite !!!



**A mon codirecteur de thèse Gilles Cottrell,**

Je te remercie très chaleureusement de m'avoir prise sous ton aile et soutenu depuis cinq ans. J'ai fait l'heureuse expérience de te côtoyer dans le cadre de différents travaux et je pus affirmer que ta disponibilité, ta simplicité et ta rigueur au travail malgré tes nombreuses occupations professionnelles, font de toi un homme charismatique. Tes précieux conseils, ton investissement et ta patience au cours de ces trois dernières années prouvent la chance que j'ai eu de t'avoir comme mentor. Trouve en ces quelques mots l'expression de ma grande admiration et le témoignage renouvelé de ma profonde gratitude.



**Au Dr Valérie Briand**

Je te remercie pour l'accueil que tu m'as fait sur ton étude, ton attention et les discussions scientifiques enrichissantes qui ont permis d'améliorer ce travail de thèse. Ta nature ouverte et joviale ainsi que ta disponibilité ont été des courants d'air frais au cours de mon parcours et ont toujours suscité mon admiration.



**Aux membres du jury,**

Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant de consacrer votre temps à ce travail : Valériane LeRoy, Olivier Marcy pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette

thèse ; Pascal Astagneau, Raquel Gonzalez et Huynh Bich-Tram pour avoir accepté d'examiner cette thèse. Je reste persuadée que vos critiques, conseils et recommandations contribueront à améliorer ce travail.



**A ma famille, ma fille, mes parents, ma sœur et mon frère,**

Les mots ne suffiront jamais assez pour vous exprimer toute ma fierté de vous avoir comme famille. Votre soutien, votre amour inconditionnel et votre présence tout au long de ce parcours m'ont été d'un grand recours. Je vous dédie ce travail parce qu'il s'inscrit dans la réalisation de l'un des espoirs que vous nourrissez à mon égard.



**Au Dr Gino Agbota,**

Merci pour ton amitié depuis nos études de médecine et ta complicité. Ton soutien et ta joie de vivre m'ont beaucoup aidé particulièrement au cours des derniers mois de la thèse. La distance n'a entaché en rien cette solidarité qui nous unit.



**A ma collègue et amie Edwige APETOH,**

Ta présence au laboratoire m'a beaucoup aidé pendant les débuts de ma thèse. J'ai trouvé en toi une grande sœur. Merci pour le soutien indéfectible et pour l'amitié qui continue au-delà des frontières du doctorat.



**A mon amie Tchadine DJAOGOL,**

Une amitié qui dure depuis notre master à l'ISPED. Nous nous sommes beaucoup soutenu pendant nos années de PhD malgré la distance Marseille-Paris. Tu es une sœur de cœur. Brillante carrière à toi !



**A mes amies Marina Sokenou Alagbe, Sandra Atidegla, Nolwenn Hounsou,**

Sans être de mon domaine, vous avez su me soutenir pendant les périodes difficiles. Mes périodes de sautes d'humeur, de stress, de joie de vivre, vous les avez traversés avec moi avec un soutien indéfectible (Marina en a le plus « bavé »). Je ne vous remercierai jamais assez pour votre présence et espère pouvoir toujours répondre présente à vos côtés.



**A mes amis de l'ED393, Cécile, Romain, Rila, Jean-Marius, Amanda, Pindy,**

Votre amitié et soutien ont participé à la réalisation de cette thèse.



**A mes collègues devenus amis que j'ai rencontré au labo, Manfred, Maria-Louisa, Atikath, Sissoko, Romain, Emilie, Laurine, Diana, Antoinette, Léonidas, Margaux, Fall, Stéphanie, Euripide, Abdoulaye ...**

Je ne pourrai pas tous vous citer mais votre amitié a été pour moi d'un grand réconfort.



**A mes « colocataires » du haut au laboratoire, Brigitte, Jean-Christophe, Jean-Gérard, Laure, Jean-Yves, Jacqueline, Audrey,**

Merci pour votre soutien au cours de ces trois années de thèse. C'est un réel plaisir de vous connaître.



**A tous les doctorants, post-doctorants et stagiaires de l'unité que j'ai connue,**

Je vous remercie pour votre soutien et vous souhaite du courage pour la suite.



**A l'équipe de l'UMR 261 de Paris et Cotonou et du CERPAGE,**

Je vous remercie du fond du cœur pour vos précieux conseils. Je remercie particulièrement le Dr Adrian J. F. Luty pour son appui en anglais lors de la rédaction de mes articles de thèse et Laura OLIVEIRA MARTINS pour son aide administrative.



**A l'école doctorale Pierre et Louis de Santé Publique et à la Sorbonne Université,**

Merci de m'avoir octroyé mon contrat doctoral et m'avoir permis de réaliser ma thèse dans une école doctorale aussi réputée. Je remercie également Magali MOULIE pour sa disponibilité dans toutes les démarches administratives.



**Au réseau doctoral de l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique,**

Je vous remercie pour les formations et les possibilités de mobilité qui m'ont été fournies au cours de mon parcours de thèse. Je remercie tout particulièrement Mme Karine Laboux pour sa disponibilité et son aide constantes.

## Résumé

Chaque année, environ 11 millions de femmes sont exposées au paludisme gestationnel en Afrique sub-Saharienne (ASS). Les principales conséquences du paludisme gestationnel sont connues depuis des décennies et consistent notamment en des risques plus élevés d'anémie maternel et de faible poids de naissance du nouveau-né (<2500g), lui-même associé à un sur-risque de morbidité et de mortalité pendant la petite enfance. De ce fait, l'OMS recommande en zone de forte transmission, l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILDA), et depuis le début des années 2000, un traitement préventif intermittent (TPI) pour les femmes enceintes, qui consiste en la prise répétée d'un traitement antipaludique à base de sulfadoxine-pyriméthamine (SP) à partir du second trimestre de la grossesse qu'elles soient infectées ou non. Le recours à cette stratégie combinée a permis de faire baisser substantiellement la prévalence de la maladie au niveau mondial. Néanmoins, la résistance à la SP augmente depuis environ 20 ans en Afrique pour atteindre un niveau dépassant 80% dans certains pays, ce qui menace fortement l'efficacité à court ou moyen terme du TPI à la SP.

La Polymerase Chain Reaction (PCR) plus sensible que les méthodes classiques comme la lecture de la goutte épaisse (GE) au microscope ou les tests de diagnostic rapides (TDRs) ont apporté un nouveau regard sur la proportion réelle des populations infectées par le paludisme. Ceci a montré que les infections détectées par la PCR et dites « submicroscopiques » pourraient constituer une part importante de la population considérée comme « non infectée » jusqu'alors. De plus, leur importance en termes de gravité pour la santé des populations reste mal connue. Il est particulièrement important de s'intéresser aux infections submicroscopiques (IS), jusqu'alors négligées en raison de leur faible expression clinique, chez les femmes enceintes. Certaines études sur la question ont montré que la prévalence de l'infection révélée par PCR dans cette population pouvait être deux à trois fois supérieure à la

prévalence estimée par la GE ou le TDR. Ces infections pourraient ainsi constituer un réservoir de transmission du paludisme non négligeable, qu'il faudra prendre en compte dans les interventions visant à interrompre la transmission de la maladie. Par ailleurs, les résultats de certaines études longitudinales semblent montrer que ces infections submicroscopiques étaient associées à une augmentation des risques d'anémie maternelle et de faible poids de naissance du nouveau-né venant corroborer des résultats déjà obtenus sur des études transversales à l'accouchement. Dès lors, ces infections submicroscopiques au cours de la grossesse prennent une importance de santé publique majeure.

L'objectif de cette thèse est de caractériser la dynamique des IS aux différents trimestres de la grossesse et d'évaluer l'efficacité des moyens de prévention actuels, précisément le Traitement Préventif Intermittent (TPI) sur ces infections pendant la grossesse. Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes basés sur les données d'une cohorte de 273 femmes enceintes ayant été suivies de la période pré-conceptionnelle jusqu'à l'accouchement dans le Sud du Bénin. L'infection palustre était détectée mensuellement par la goutte épaisse et la PCR. Les femmes infectées et détectées par GE/TDR étaient automatiquement traitées. Les PCR ont été réalisées à la fin de l'étude.

Dans un premier temps, nous avons montré que les infections submicroscopiques constituent un large réservoir comparé aux infections microscopiques pendant la grossesse. Leur prévalence était plus élevée au cours du premier trimestre. Les jeunes femmes (< 26 ans) ayant une infection submicroscopique avant grossesse étaient plus à risque de développer des infections aussi bien submicroscopiques que microscopiques aux différents trimestres de la grossesse avec le plus grand risque encouru pendant le premier trimestre de grossesse. Une plus grande proportion de femmes enceintes (29,2%) avait une infection submicroscopique pendant le premier trimestre de la grossesse comparativement au reste de la grossesse (29,1% au deuxième et 20,5% au troisième trimestre). Nous avons également prouvé que les femmes

étaient mal protégées au premier trimestre par les MIILDA tels qu'utilisés actuellement. De plus, les femmes ayant une infection submicroscopique au premier trimestre sont plus à risque de développer des infections aux deuxième et troisième trimestres de grossesse malgré l'utilisation du TPI à la SP. Nous avons constaté que l'utilisation actuelle du TPI était sous-optimale et que l'administration précoce du TPI (< 21,2 semaines d'aménorrhées) permettrait de réduire le nombre d'infections submicroscopiques à partir du deuxième trimestre de grossesse. Ceci nous amène à recommander une stratégie de prévention combinée qui débiterait dès le début de la grossesse voire en période pré-conceptionnelle. Cette stratégie pourrait combiner l'utilisation d'un TPI à base d'une molécule sûre et efficace au premier trimestre de grossesse à celle des MIILDA. Elle viendrait en appui aux stratégies déjà existantes (pulvérisation intra domiciliaire, traitement des cas...). Le challenge pour la réalisation optimale de cette recommandation sera d'avoir accès aux femmes dès le début de la grossesse.

Mots-clés : Infections submicroscopiques, grossesse, *P. falciparum*, 1<sup>er</sup> trimestre, cohorte, Afrique, Bénin

## Abstract

Each year, in sub-Saharan Africa (SSA), approximately 11 million women are exposed to malaria in pregnancy (MiP). The main consequences of MiP have been known for decades and include higher risks of maternal anemia and low birth weight (LBW <2500g), which is itself associated with an over-risk of morbidity and mortality in early childhood. As a result, WHO recommends the use of long-lasting insecticidal nets (LLINs) in areas of high transmission, and since the early 2000s, intermittent preventive treatment (IPT) for pregnant women. The IPT consists of repeated antimalarial treatment with sulfadoxine-pyrimethamine (SP) starting in the second trimester of pregnancy for all pregnant women infected or not. The use of this combined strategy has led to a substantial reduction in the global burden of the disease. Nevertheless, the resistance to SP has been increasing over the past 20 years in Africa, reaching levels exceeding 80% in some countries, which poses a major threat to the short- to medium-term efficacy of IPT with SP.

Polymerase Chain Reaction (PCR), which is more sensitive than conventional methods such as thick drop or Rapid Diagnostic Tests (RDT), has provided a new insight into the actual proportion of populations infected with malaria. This showed that the infections detected by PCR and called "submicroscopic" could constitute a significant part of the population considered as "uninfected" until then. Moreover, their importance in terms of severity for the health of populations remains poorly known. It is particularly important to focus on submicroscopic infections (SI), which have been neglected due to their low clinical expression in pregnant women. Some studies on the subject have shown that the prevalence of infection revealed by PCR in this population may be two to three times higher than the prevalence estimated by thick drop or RDT. These infections could thus constitute a significant reservoir of malaria transmission, which should be taken into account in interventions to interrupt the malaria transmission. In addition, the results of some

longitudinal studies seem to show that these submicroscopic infections were associated with an increased risk of anemia in pregnant women and LBW, corroborating results already obtained from cross-sectional studies at delivery. Therefore, these submicroscopic infections during pregnancy has a major public health importance.

The objective of this thesis is (i) to characterize the dynamics of SI in the different trimesters of pregnancy and (ii) to evaluate the effectiveness of current prevention strategies, especially Intermittent Preventive Treatment (IPT) on these infections during pregnancy. To achieve this objective, we used data from a cohort of 273 pregnant women with a follow-up from the preconception to delivery in southern Benin. Malaria infection was detected monthly by thick drop or RDT and PCR. Women infected and detected positive by thick drop (or RDT when applicable) were automatically treated. The PCRs were performed at the end of the study.

In a first step, we showed that submicroscopic infections constitute a large reservoir compared to microscopic infections during pregnancy. Their prevalence was higher in the first trimester. Young women (< 26 years) with a submicroscopic infection before pregnancy were at higher risk of submicroscopic and microscopic infections in different trimesters of pregnancy with the highest risk in the first trimester of pregnancy. A higher proportion of pregnant women (29.2%) had a submicroscopic infection in the first trimester of pregnancy compared to the rest of the pregnancy (29.1% in the second and 20.5% in the third trimester). We also showed that women were sub-optimally protected in the first trimester by LLINS as currently used. In addition, women who had a submicroscopic infection at the first trimester had an increased risk of infections in the second and third trimesters of pregnancy despite the use of IPT. We found that current use of IPT was suboptimal and that early administration of IPT (< 21.2 weeks of gestation) would reduce the number of submicroscopic infections in the second trimester. This leads us to recommend a combined prevention strategy that would begin early in pregnancy or even during the preconception. This strategy could combine the use of IPT

based on a safe and effective molecule in the first trimester of pregnancy with the LLIN. It would support others strategies as indoor residual spraying, treatment of cases. The challenge for the optimal implementation of this recommendation is to have access to women from the beginning of pregnancy.

Keywords: Submicroscopic infections, pregnancy, *P. falciparum*, 1<sup>st</sup> trimester, cohort, Africa, Benin

# Laboratoire d'accueil

MERIT UMR 261- Mère et enfant en milieu tropical : pathogènes, système de santé et transition épidémiologique

Institut de Recherche pour le Développement

Université Paris Descartes

Faculté de pharmacie-laboratoire de parasitologie

4, avenue de l'observatoire

75006 Paris

# Sommaire

Liste des abréviations .....	16
Liste des tableaux .....	18
Liste des figures .....	19
Liste des articles publiés au cours de la thèse .....	20
Liste des communications orales et posters au cours de la thèse .....	21
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	23
<b>II. GÉNÉRALITÉS</b> .....	27
2.1. Généralités sur le paludisme .....	28
2.1.1. Transmission du paludisme .....	28
2.1.1.1. Cycle du paludisme .....	28
2.1.1.2. Répartition géographique et différentes zones épidémiologiques .....	28
2.1.1.3. Facteurs liés à l'infection palustre et à la gravité du paludisme .....	29
2.1.2. Parasitémies et symptomatologie .....	31
2.1.2.1. Définition de la parasitémie .....	31
2.1.2.2. Lien entre parasitémie et aspects cliniques .....	31
2.1.3. Diagnostic biologique .....	32
2.1.3.1. Prélèvement .....	32
2.1.3.2. Techniques de diagnostic biologique .....	33
2.1.4. Particularités du paludisme associé à la grossesse ou paludisme gestationnel (PG) .....	35
2.1.4.1. Epidémiologie du paludisme gestationnel .....	36
2.1.4.2. Physiopathologie .....	38
2.1.4.3. Spécificités du paludisme submicroscopique par <i>Plasmodium falciparum</i> ...	39
2.1.4.4. Stratégie de lutte contre le paludisme gestationnel en zone d'endémie palustre stable .....	41
2.2. Généralités sur le Bénin .....	44
2.2.1. Contexte géographique .....	44
2.2.2. Contexte sociodémographique .....	45
2.2.3. Contexte économique .....	45
2.2.4. Contexte sanitaire .....	45
2.2.5. Indicateurs de santé au Bénin .....	45
<b>III. PROBLÉMATIQUE</b> .....	48
3.1. Situation du problème .....	49
3.2. Objectifs de la thèse .....	49
<b>IV. METHODOLOGIE</b> .....	53
4.1. Zone d'étude .....	54
4.2. Population et design d'étude .....	55
4.3. Cadre de l'étude .....	56
4.4. Protocole de recueil de données .....	57
4.4.1. Période pré-conceptionnelle (cohorte primaire) .....	58
4.4.2. Période gestationnelle (cohorte secondaire) .....	59
4.5. Techniques de laboratoire .....	64
4.5.1. Diagnostic microscopique de l'infection palustre .....	64
4.5.2. Diagnostic submicroscopique de l'infection palustre .....	64
4.5.3. Dosage du taux d'hémoglobine .....	64
4.6. Gestion des événements morbides .....	64
4.7. Gestion des données .....	66

4.8.	Analyses statistiques.....	67
4.9.	Aspects éthiques .....	69
4.10.	Implication personnelle dans le projet .....	69
V.	<i>RESULTATS</i> .....	71
5.1.	Article 1 : Hounkonnou CPA et al. Dynamics of Submicroscopic Plasmodium falciparum Infections Throughout Pregnancy: A Preconception Cohort Study in Benin. Clin Infect Dis. doi:10.1093/cid/ciz748. ....	72
5.1.1.	Problématique de l'article .....	72
5.1.2.	Résumé et commentaire de l'article .....	73
5.1.3.	Hounkonnou <i>et al.</i> , Clinical Infectious Disease 2019 .....	78
5.2.	Article 2 : Hounkonnou CPA et al. Sub-optimal Intermittent Preventive Treatment in pregnancy (IPTp) is associated with an increased risk of submicroscopic P. falciparum infection in pregnant women: a prospective cohort study in Benin. Clin Infect Dis. doi:10.1093/cid/ciaa1355. ....	88
5.2.1.	Problématique de l'article .....	88
5.2.2.	Résumé et commentaire de l'article .....	89
5.2.3.	Hounkonnou <i>et al.</i> , Clinical Infectious Disease 2020 .....	91
5.3.	Article 3: Hounkonnou C. et al. Impact of the use and efficacy of long lasting insecticidal net on malaria infection during the first trimester of pregnancy - a pre-conceptional cohort study in southern Benin. BMC Public Health. 2018;18:683. ....	120
5.3.1.	Problématique de l'article .....	120
5.3.2.	Résumé et commentaire de l'article .....	121
5.3.3.	Hounkonnou <i>et al.</i> , BMC Public Health 2018 .....	123
VI.	<i>DISCUSSION</i> .....	131
6.1.	Rappel des principaux résultats obtenus.....	132
6.2.	Les infections submicroscopiques par P. falciparum pendant la grossesse.....	134
6.3.	Utilisation des stratégies de lutte actuelles dans l'étude RECIPAL .....	141
6.4.	Limites .....	148
6.5.	Intérêts et forces de l'étude.....	151
6.6.	Enjeux de santé publique et recommandations.....	152
6.7.	Perspectives .....	157
VII.	<i>CONCLUSION</i> .....	158
VIII.	<i>REFERENCES</i> .....	160
IX.	<i>ANNEXES</i> .....	177
	Annexe 1 : Fichiers supplémentaires de l'article 1 .....	178
	Annexe 2 : Fichiers supplémentaires de l'article 2 .....	180
	Annexe 3: Distribution de la parasitémie en pré-grossesse et aux différents trimestres de la grossesse chez les femmes ayant une parasitémie positive .....	184
	Annexe 4: Quelques photos du terrain EVALMOUS .....	185

## Liste des abréviations

<b>AG</b>	Âge gestationnel
<b>ASS</b>	Afrique sub-Saharienne
<b>ATCD</b>	Antécédent
<b>CNHU-HKM</b>	Centre national hospitalo-universitaire Hubert-Koutoukou-Manga
<b>CPN</b>	Consultation prénatale
<b>CTA</b>	Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine
<b>CUGO</b>	Clinique universitaire de gynéco-obstétrique
<b>DDR</b>	Date des dernières règles
<b>EDSB-V</b>	5 <sup>ème</sup> enquête démographique de la santé du Bénin
<b>EVALMOUS</b>	EVALuation de l'utilisation et de l'efficacité des MOUSTiquaires par les femmes enceintes et les membres de leur foyer en début de grossesse au Bénin
<b>FPN</b>	Faible poids de naissance
<b>FS</b>	Frottis sanguin
<b>GE</b>	Goutte épaisse
<b>Hb</b>	Hémoglobine
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen
<b>HRP2</b>	Histidine Rich Protein-2
<b>HTA</b>	Hypertension artérielle
<b>IMC</b>	Indice de masse corporelle
<b>INSAE</b>	Institut national de la statistique et de l'analyse économique
<b>IRRa</b>	Incidence rate ratio ajusté
<b>IS</b>	Infections submicroscopiques
<b>ISBA</b>	Institut des Sciences Biomédicales Appliquées

<b>MILDA</b>	Moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action
<b>MiP</b>	Malaria in Pregnancy
<b>NV</b>	Naissances vivantes
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PCR</b>	Polymérase Chain Reaction
<b><i>P. falciparum</i></b>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<b>PfEMP1</b>	Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1
<b>PG</b>	Paludisme gestationnel
<b>pLDH</b>	Plasmodium lactates déshydrogénases
<b>RECIPAL</b>	REtard de Croissance Intra-utérin et PALudisme
<b>RGPH-4</b>	4 <sup>ème</sup> recensement général de la population et de l'habitation
<b>SA</b>	Semaine d'aménorrhée
<b>SP</b>	Sulfadoxine-pyriméthamine
<b>TDR</b>	Test de diagnostic rapide
<b>TPIg</b>	Traitement préventif intermittent pendant la grossesse

## Liste des tableaux

Tableau 1: Effets cliniques du paludisme associé à la grossesse .....	38
Tableau 2: Principaux indicateurs de santé maternelle au Bénin issus des données de l'EDSB-V (2017-2018).....	46
Tableau 3: Principaux indicateurs de santé infantile au Bénin issus des données de l'EDSB-V (2017-2018).....	47
Tableau 4: Comparaison des caractéristiques générales des femmes enceintes des études EVALMOUS et RECIPAL (N=411), 2014-2017, Bénin .....	63
Tableau 5: Déterminants associés à la survenue d'une infection palustre trimestrielle, régression binomiale négative, N=273, RECIPAL 2014-2017, Bénin .....	75

## Liste des figures

Figure 1: Anophèle se gorgeant de sang .....	28
Figure 2: Physiopathologie du paludisme au niveau du placenta .....	39
Figure 3: Carte du Bénin .....	44
Figure 4: Pyramide de la population béninoise, 2018 .....	45
Figure 5: Conception des cohortes RECIPAL et EVALMOUS .....	52
Figure 6: Présentation des études RECIPAL et EVALMOUS .....	57
Figure 7: Procédures de suivi et de collecte de données des études RECIPAL et EVALMOUS .....	62
Figure 8: Diagramme de flux de l'étude .....	66

## Liste des articles publiés au cours de la thèse

1. **Houkonnou C**, Djèntonin A, Egbinola S, Houngbegnon P, Bouraima A, Soares C, et al. Impact of the use and efficacy of long lasting insecticidal net on malaria infection during the first trimester of pregnancy - a pre-conceptional cohort study in southern Benin. *BMC Public Health*. 2018;18:683.

2. **Houkonnou CPA**, Briand V, Fievet N, Accrombessi M, Yovo E, Mama A, et al. Dynamics of Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infections Throughout Pregnancy: A Preconception Cohort Study in Benin. *Clin Infect Dis*. doi:10.1093/cid/ciz748.

3. **Houkonnou CPA**, Ndam NT, Fievet N, Accrombessi M, Yovo E, Mama A, et al. Sub-optimal Intermittent Preventive Treatment in pregnancy (IPTp) is associated with an increased risk of submicroscopic *P. falciparum* infection in pregnant women: a prospective cohort study in Benin. *Clin Infect Dis*. doi:10.1093/cid/ciaa1355.

## Liste des communications orales et posters au cours de la thèse

### ❖ Communications orales

- Cornélia Hounkonnou, Michel Cot, Valérie Briand, Gilles Cottrell : **Déterminants de la dynamique des infections submicroscopiques par le paludisme pendant la grossesse, impact des stratégies de lutte et conséquences sur la santé de la mère et du nouveau-né au Bénin**

Journées de l'Ecole Doctorale Pierre Louis de Santé Publique Epidémiologie et Sciences de l'Information Biomédicale. Saint Malo (France), 23-25 Octobre 2017

- Cornélia Hounkonnou, Gilles Cottrell : **Les infections asymptomatiques par *P. falciparum*: un défi majeur dans la perspective de l'élimination du paludisme en Afrique**

Séminaire scientifique « Santé et Sociétés au Sud : des transitions plurielles » de l'IRD, Marseille (France), 9 Novembre 2018

### ❖ Posters

- Cornélia Hounkonnou, Michel Cot, Gilles Cottrell : **Déterminants des infections submicroscopiques par *P. falciparum* : Cohorte RECIPAL, Bénin**

Journées de l'Ecole Doctorale Pierre Louis de Santé Publique Epidémiologie et Sciences de l'Information Biomédicale. Saint Malo (France), 22-24 Octobre 2018

- Cornélia Hounkonnou, Armel Djènontin, Valérie Briand, Gilles Cottrell : **Impact of impregnated net's use and efficacy on malaria during the pregnancy's first trimester, Benin**

European Public Health Conference. Ljubljana (Slovénie), 30 Novembre 2018

- Cornélia Hounkonnou, Valérie Briand, Michel Cot, Gilles Cottrell : **Les infections submicroscopiques par le *P. falciparum* pendant la grossesse au Bénin : dynamique et déterminants**

Rencontres scientifiques du Réseau Doctoral en Santé publique de l'EHESP. Paris (France),  
26 Mars 2019

- Cornélia Hounkonnou, Valérie Briand, Michel Cot, Gilles Cottrell : **Impact du Traitement Préventif Intermittent sur les infections submicroscopiques par *P. falciparum* pendant la grossesse : Cohorte RECIPAL, Bénin**

Journées de l'Ecole Doctorale Pierre Louis de Santé Publique Epidémiologie et Sciences de l'Information Biomédicale. Saint Malo (France), 21-23 Octobre 2019

❖ Animation scientifique

Co-organisatrice du séminaire interdisciplinaire « Inégalités géographiques d'accès aux soins en France » à Paris le 13 juin 2019, dans le cadre des séminaires interdisciplinaires du Réseau doctoral en Santé Publique de l'EHESP.

## *I. INTRODUCTION*

Le paludisme est une maladie parasitaire constituant un important problème de santé publique du fait de son impact sur la charge mondiale de la morbidité et de la mortalité [1]. La gravité de ses manifestations cliniques peut varier, allant d'un accès palustre simple au décès de l'individu infecté. De plus, le paludisme constitue un frein majeur au développement économique des pays où il sévit. Ce frein est dû au coût élevé en dépenses de santé publique qu'il engendre, ensuite des pertes de revenus et de productivité des personnes malades et enfin des pertes en vies humaines [2]. Au niveau mondial, 228 millions de cas et 405 000 décès ont été estimés au cours de l'année 2018 [3], avec 93 % des cas et 94 % des décès survenus dans la région Afrique de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Afrique subsaharienne (ASS) ne représentant que 13 % de la population mondiale.

Depuis les années 2000, une stratégie globale de lutte intégrée a été instituée par l'OMS. Cette stratégie intégrée consiste en l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILDA) par les populations, la détection des cas de paludisme par des tests de diagnostic rapide (TDR) et leur traitement systématique ainsi que l'administration d'un traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPIg) [4, 5]. Cette stratégie a permis de réaliser des progrès considérables dans la lutte contre la maladie [6–8] avec une amélioration nette de la morbidité et de la mortalité mondiale attribuable au paludisme entre les années 2000 et 2015 [3, 9, 10]. Cependant, il faut noter que les données de la période 2015-2017 mettent en exergue une stagnation des progrès dans la lutte contre le paludisme [11]. Cette stagnation des progrès a amené à se questionner sur l'acceptabilité et l'efficacité des stratégies de lutte et de prévention existantes et d'envisager des pistes jusqu'alors inexplorées, telles que les infections asymptomatiques. Ainsi, un intérêt croissant a commencé à être porté au réservoir humain des infections palustres asymptomatiques [9]. Des méthodes de diagnostic moléculaire récentes comme la Polymerase Chain Reaction (PCR) plus sensibles que les méthodes classiques, que sont la microscopie et le test de diagnostic rapide

(TDR), ont permis de mettre en exergue l'ampleur du réservoir infectieux asymptomatique [12, 13]. Malheureusement, la majeure partie du réservoir humain des parasites réside chez des patients asymptomatiques. Les infections asymptomatiques étant des infections se traduisant par le portage de parasites dans le sang, n'entraînant pas de symptômes cliniques et n'amenant donc pas le patient à recourir aux soins [9, 14]. Grâce à la PCR, la détection d'infections avec de très faibles densités parasitaires chez des individus ne présentant aucun signe clinique a permis la mise en évidence d'un réservoir auparavant insoupçonné d'infections dites submicroscopiques (et asymptomatiques le plus souvent) [15]. Les infections submicroscopiques étant plus susceptibles d'être asymptomatiques [9]. Les infections asymptomatiques remettent donc en cause le fardeau et l'épidémiologie actuels du paludisme au niveau mondial, du fait qu'elles constituent un réservoir silencieux et maintiennent la transmission du parasite en communauté [16, 17, 14]. Un défi majeur pour le contrôle et l'élimination du paludisme au niveau mondial reste donc le diagnostic précis des infections palustres, en particulier des infections asymptomatiques et plus précisément des infections submicroscopiques.

Les infections submicroscopiques (IS) affectent une part importante de la population considérée comme « non infectée » jusqu'alors [15], en particulier les femmes enceintes [18]. Les femmes enceintes constituent, avec les enfants âgés de moins de cinq ans et les personnes immunodéprimés [19, 20], la population la plus à risque de contracter le paludisme en Afrique. La grossesse rend les femmes plus susceptibles de contracter le paludisme pour des raisons immunitaires, hormonales ainsi que pour la spécificité des souches parasitaires qui infectent la femme enceinte en Afrique. Les principales conséquences du paludisme associé à la grossesse encore appelé paludisme gestationnel (PG) sont connues depuis des décennies et consistent notamment en des risques plus élevés d'anémie maternelle et de faible poids de naissance du nouveau-né (<2500g) [20–25], lui-même associé à un sur-risque de morbidité et

de mortalité pendant la petite enfance [26]. Plus récemment, la découverte de la relation entre le PG et une susceptibilité accrue de l'enfant au paludisme fait des enfants une population encore plus vulnérable au paludisme [27–31].

La contribution des infections submicroscopiques dans la stagnation des progrès de lutte contre le paludisme demeure encore mal explorée. Leur importance en termes de gravité pour la santé des populations, en particulier pour la femme enceinte, reste également mal connue. Cependant, certaines études suggèrent fortement la possibilité de survenue d'issues de grossesse défavorables spécifiquement dues aux infections submicroscopiques [18, 32, 33].

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié la problématique des infections submicroscopiques par *P. falciparum* survenant au cours de la grossesse. Cette thèse apporte plus spécifiquement des informations inédites sur la dynamique des IS aux différents trimestres de la grossesse, leur impact sur la santé de la mère et du nouveau-né et évalue l'efficacité des moyens de prévention actuels, précisément le Traitement Préventif Intermittent (TPI) sur ces infections pendant la grossesse.

## *II. GÉNÉRALITÉS*

## 2.1. Généralités sur le paludisme

### 2.1.1. Transmission du paludisme

La transmission du paludisme se fait par la piqûre d'un moustique de la famille des *Culicidae* du genre *Anopheles* [1, 34], dont seule la femelle est hématophage. Lors de la piqûre,



**Figure 1: Anophèle se gorgeant de sang**

l'anophèle transmet à l'homme un protozoaire du genre *Plasmodium* qui est l'agent pathogène [1]. *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus virulente, la plus largement répandue dans le monde et principalement en Afrique subsaharienne (ASS) à 99 % [3]. Il est également responsable des formes cliniques les plus graves voire mortelles [35].

D'autres modes de transmission sont possibles du fait de la phase sanguine du cycle du *Plasmodium* : transmission congénitale, transfusionnelle, par greffe d'organe ou accidentelle chez des personnels de santé manipulant du sang contaminé. Notons que ces modes de transmission demeurent tout de même exceptionnels [34, 36].

#### 2.1.1.1. Cycle du paludisme

Le cycle se déroule successivement en deux étapes. La première étape dite phase asexuée chez l'être humain (hôte intermédiaire) et la seconde étape ou phase sexuée chez l'anophèle qui est l'hôte. L'augmentation de la parasitémie a lieu au cours de la phase asexuée ce qui entraîne ainsi l'apparition des symptômes caractéristiques des accès palustres. La période d'incubation est d'environ 12 à 14 jours après la piqûre infectante.

#### 2.1.1.2. Répartition géographique et différentes zones épidémiologiques

La distribution géographique du paludisme varie en fonction de l'espèce parasitaire impliquée. Le plus lourd fardeau de la maladie est porté par les pays tropicaux et

subtropicaux. L'Afrique sub-Saharienne porte toujours une très grande part du fardeau de la morbidité et de la mortalité palustre avec respectivement 93% des cas et 94% des décès ainsi qu'une grande prévalence des conséquences maternelles et infantiles liées au PG [3]. L'intensité de la transmission du paludisme varie en fonction de la longévité, des habitudes de piqûres et de l'efficacité du moustique vecteur [35].

### 2.1.1.3. Facteurs liés à l'infection palustre et à la gravité du paludisme

Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'épidémiologie du paludisme. Ces facteurs sont relatifs au parasite, au vecteur et à l'hôte, mais également à l'environnement (zone géographique, conditions climatiques, facteurs socio-économiques) ...[37]. L'influence de ces facteurs agit sur la gravité du paludisme.

#### ➤ **Facteurs liés au parasite**

La sévérité des signes de l'infection palustre dépend de l'espèce plasmodiale, de la virulence de la souche du parasite, de la quantité des formes infectantes inoculée par le moustique, de la densité parasitaire. Le *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus virulente responsable des formes graves du paludisme pouvant conduire à la mort de l'individu. La virulence de la souche parasitaire peut être déterminée par son taux de réplication : plus le parasite se réplique, plus vite la densité parasitaire augmentera et aboutira ainsi à une gravité de la maladie. La relation entre la quantité de formes infectantes et la sévérité de la maladie est exponentielle [37].

#### ➤ **Facteurs liés au vecteur**

Les habitudes et préférences alimentaires de l'anophèle déterminent l'apparition de la maladie. Comme autres facteurs, nous avons : la température, l'humidité, la capacité de vol du moustique. L'augmentation de la température et l'humidité favorisent la prolifération des anophèles et donc une augmentation de la transmission de la maladie [37], faisant ainsi des zones tropicales et subtropicales les lieux de prédilection du paludisme.



### **Facteurs liés à l'Homme**

Comme facteurs de l'hôte, nous avons la réceptivité individuelle due à des facteurs génétiques participant à l'existence ou non de l'infection ou de certaines formes cliniques de l'infection (trait drépanocytaire avec par exemple un sujet hétérozygote AS, le groupe HLA, ethnie), l'âge, l'immunité, l'existence d'une grossesse ou d'autres affections (co-infection helminthique), le niveau socio-économique [9, 37]. Ces différents facteurs peuvent participer à la protection ou l'aggravation des manifestations cliniques du paludisme chez l'individu. La majorité des Africains ont un groupe HLA de type I ou II qui a été trouvé associé à une protection contre les formes graves de paludisme [37, 38]. Les individus portant le trait drépanocytaire S sont protégés contre les formes graves du paludisme du fait que la croissance du *Plasmodium* dans un environnement pauvre en oxygène est ralentie limitant ainsi la densité parasitaire et donc la gravité des signes. Des études menées en Afrique de l'Ouest ont montré une réduction de 90% des formes graves de paludisme chez des porteurs de traits drépanocytaires [37, 39, 40]. Les individus d'ethnie Peulhs seraient plus protégés contre le paludisme comparativement à d'autres ethnies d'Afrique et auraient ainsi une sensibilité amoindrie au paludisme [41]. Des études ont démontré l'impact de la co-infection helminthique sur la gravité du paludisme. Cet impact est soit protecteur soit aggravant en fonction du parasite en cause. Ainsi, l'existence d'une ankylostomiase serait un facteur aggravant alors que l'ascaridiose protégerait contre la gravité du paludisme [9, 42].

Les femmes enceintes constituent un groupe à fort risque de paludisme quel que soit le niveau de stabilité de la zone de transmission, avec des manifestations cliniques dangereuses pour la femme et le fœtus variant en fonction de ce niveau de stabilité. Au cours de cette thèse, je m'intéresserai à ce groupe à risque en zone de paludisme stable.

## 2.1.2. Parasitémies et symptomatologie

### 2.1.2.1. Définition de la parasitémie

Le diagnostic du paludisme se fait en se basant sur l'existence ou non d'une parasitémie palustre. La parasitémie palustre est définie par la présence de parasites du genre *Plasmodium* dans le sang [43]. Elle est quantifiée par la densité parasitaire qui est le nombre de formes parasitaires asexuées par unité de volume de sang total ou par nombre d'hématies totales.

### 2.1.2.2. Lien entre parasitémie et aspects cliniques

Les signes cliniques du paludisme, communs à toutes les espèces, sont liés au cycle asexué érythrocytaire du parasite. Suite à la libération des mérozoïtes dans le sang, la parasitémie augmente au cours du cycle érythrocytaire, ce qui conduit aux manifestations cliniques, influence la gravité de la symptomatologie ainsi que le pronostic vital de l'infecté [44, 45]. L'évolution de l'infection par *P. falciparum* peut évoluer suivant plusieurs trajectoires [46]. L'infection symptomatique peut arriver d'emblée ou après un laps de temps suite à une infection asymptomatique. De ce fait, la réponse clinique à l'existence des parasites dans le sang est variable allant de l'infection asymptomatique à un accès grave pouvant entraîner le décès. On peut constater des signes cliniques attribuables à un paludisme aigu nécessitant des soins appropriés [47]. La variation de la densité parasitaire et par la même occasion la symptomatologie du paludisme est déterminée par les effets directs de la destruction des hématies parasitées mais également par le niveau d'immunité acquise par l'hôte infecté [35, 48]. Cette immunité n'étant pas stérilisante, elle n'empêche pas l'apparition d'une nouvelle infection mais est impliquée dans le contrôle de l'évolution de la maladie en diminuant la gravité des symptômes en cas de nouvelle infection [44, 49, 50]. De plus, en fonction du niveau de prémunition de l'individu infecté, la densité parasitaire peut être faible ou élevée (submicroscopique ou microscopique). Ceci explique que dans les zones d'endémie palustre

stable (transmission modérée à élevée), la gravité du paludisme dépend de l'âge de l'individu. Le paludisme grave survient surtout chez les enfants âgés de moins de 5 ans et devient moins fréquent avec l'âge en raison de l'acquisition d'une immunité protectrice partielle suite à une exposition fréquente au parasite [44, 51, 52] ; la prémunition leur permettant de contrôler leurs densités parasitaires et donc d'avoir de faibles parasitémies. Dans les zones de faible endémicité, cette immunité n'est pas acquise et la sévérité du paludisme peut survenir à tous les âges [35, 48].

Les signes cliniques du paludisme ne sont pas spécifiques de la maladie. Les signes évidents possibles retrouvés au cours d'un épisode de paludisme sont la fièvre, les céphalées, la fatigue, les douleurs musculaires, des nausées, des vomissements, une anémie, les signes de gravité pouvant aller de la détresse respiratoire au coma [35, 47, 48]. Par ailleurs, le seuil pyrogène, défini comme étant la densité des parasites asexués suffisante pour entraîner des réponses immunitaires et la fièvre, varie en fonction de l'intensité de la transmission du paludisme d'un point de vue géographique. Ce seuil pyrogène est ainsi plus élevé dans un environnement à transmission élevée que dans un environnement à faible transmission [53, 54].

### **2.1.3. Diagnostic biologique**

Le diagnostic biologique direct du paludisme peut se faire par différentes méthodes détaillées ci-dessous.

#### **2.1.3.1. Prélèvement**

Le prélèvement se fait par le recueil d'une ou deux goutte(s) de sang, sur une lame porte-objet de microscope, suite à la piqûre au doigt (face latérale de l'annulaire), au lobe d'oreille ou au talon chez l'enfant [55].

### 2.1.3.2. Techniques de diagnostic biologique

#### ➤ Méthodes de diagnostic conventionnelles

Elles consistent en la mise en évidence du parasite dans le sang. Comme méthodes, nous avons la goutte épaisse et le frottis sanguin réalisées à partir d'une goutte de sang périphérique recueilli sur une lame de lecture [56].

#### ✓ La goutte épaisse

Il s'agit de l'examen de référence de l'OMS. Il est le plus utilisé pour le diagnostic de routine. Son seuil de détection est de 10 à 20 hématies parasitées/ $\mu$ l, 10 fois plus élevé que celui du frottis mince [55–57].

#### ✓ Le frottis sanguin

Cette méthode permet l'étude morphologique des hématozoaires et le diagnostic des espèces plasmodiales en cause. Sa sensibilité est de 100 à 200 hématies parasitées/ $\mu$ l [55–57].

Dans le but d'une simplification du diagnostic biologique du paludisme, surtout en zone d'endémie, d'autres techniques ont été développées dont les tests de diagnostic rapide par immunochromatographie sur bandelette.

#### ➤ Tests de diagnostic rapide (TDR) immunochromatographiques

Les TDR du paludisme sont peu coûteux, faciles à utiliser et rapides. Ils sont très pratiques dans les zones isolées et conditionnés en emballages unitaires. Ils permettent d'avoir un résultat en moins de 30 minutes avec la mise en évidence de protéines parasitaires sur un faible volume sanguin [58]. Les réactifs utilisés avec les TDR sont basés sur la détection immunochromatographique d'antigènes plasmodiaux [55]:

- L'Histidine Rich Protein-2 (HRP2) spécifique de *P. falciparum* ;
- Les Plasmodium lactates déshydrogénases (pLDH) soit :
  - Spécifiques de *P. falciparum* (Pf-pLDH) ou de *P. vivax* (Pv-pLDH),
  - Communes aux quatre espèces de *Plasmodium* humains (pan-pLDH);

- L'aldolase (commune à toutes les espèces)

La détection du *P. falciparum* par l'HRP2 reste la plus performante avec une sensibilité de détection d'environ 100 parasites/ $\mu$ l.

Un échantillon de sang est prélevé et appliqué au niveau de la zone dédiée au niveau de la carte de test. Un réactif y est ensuite appliqué, puis l'on observe la migration du prélèvement. Les antigènes, s'il en existe, sont capturés par des anticorps monoclonaux fixés sur la membrane. Les antigènes sont ensuite révélés par de nouveaux anticorps monoclonaux couplés à une particule colorée révélatrice de leur présence. Cette présence se manifeste par des bandes spécifiques dans la fenêtre de la carte de test dédiée et indique ainsi l'infection palustre du patient ainsi que l'espèce plasmodiale en cause [59]. La détermination de la densité parasitaire n'est pas possible avec cette méthode diagnostique.

#### ➤ **Réaction de Polymérisation en chaîne ou "Polymerase Chain Reaction" (PCR)**

Cette technique consiste en l'amplification d'un segment d'ADN par une réaction enzymatique répétée. Elle permet, par identification des souches plasmodiales, la détection des infections à très faibles densités parasitaires appelées infections « submicroscopiques » qui ne sont pas détectées par la microscopie. C'est une technique à la fois quantitative et qualitative permettant une différenciation des différentes espèces plasmodiales. Son utilisation est fréquente en recherche dans des études portant sur de grands effectifs. Le coût élevé des équipements et réactifs nécessaires à sa réalisation, le temps de réalisation (8 heures) ainsi que la qualification obligatoire du technicien constituent des limites à son utilisation en routine [60].

#### ➤ **Loop mediated isothermal amplification (LAMP)**

C'est une nouvelle méthode d'amplification de l'ADN parasite qui ne nécessite pas d'ADN purifié. Elle a une capacité de détection de la densité parasitaire comparable à celle de la PCR

avec un temps d'exécution plus court et un coût réduit [61–64]. Cette technique n'est cependant pas utilisée en routine. La LAMP est moins polyvalente que la PCR. L'utilisation de la température ambiante dans la LAMP limite son utilisation dans plusieurs types d'expériences comme par exemple l'amplification de plusieurs gènes différents qui est possible avec la PCR du fait de ces différentes étapes se faisant avec des changements de température.

Au vu de la faible performance des tests de diagnostic usuels (GE et TDR) à détecter les faibles parasitémies et l'impraticabilité des tests d'ADN en routine surtout dans des pays à ressources limitées, un besoin d'outils de diagnostic sensibles et pratiques s'est fait ressentir. C'est dans cet objectif que des TDR ultrasensibles sont actuellement développés afin de détecter les infections parasitaires de faible densité de façon rapide et à moindre coût [65–67].

#### 2.1.4. Particularités du paludisme associé à la grossesse ou paludisme gestationnel (PG)

Le paludisme est fréquent chez les femmes enceintes quel que soit la zone d'endémie. La survenue du paludisme au cours de la grossesse génère deux risques : un risque d'accès grave chez la femme enceinte mais également un risque pour le fœtus voire le nouveau-né. Cette gravité résulte du fait de la diminution physiologique des défenses immunitaires au cours de la grossesse. Le PG est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité maternelle, périnatale et infantile, particulièrement en ASS [20, 68–70]. En fonction de l'intensité de la transmission du paludisme, la gravité des manifestations cliniques diffère. En 2018, 11 millions de femmes enceintes, représentant 29% de toutes les femmes enceintes à risque de PG, étaient infectées par le paludisme en ASS [3].

#### 2.1.4.1. Epidémiologie du paludisme gestationnel

Le PG constitue une priorité de santé publique parce qu'il constitue une importante cause de risques accrus pour la santé de la mère et du fœtus [68, 71]. Les risques liés au PG constituent un problème dans le monde entier, mais ses conséquences ainsi que sa symptomatologie dépendent de la zone de transmission du paludisme [72, 73].

##### ➤ Zone de transmission stable

En zone d'endémie stable, la symptomatologie du PG est influencée par quatre facteurs principaux : l'exposition antérieure continue de la femme au paludisme depuis son enfance, la concentration des globules rouges parasités dans le placenta, la parité et l'âge de la femme enceinte. Les multigestes ont moins de risque de survenue de PG comparativement aux primigestes/secondigestes à cause de l'existence d'une immunité protectrice acquise au cours des grossesses consécutives [32, 22, 74–76]. Les femmes les plus jeunes ( $\leq 25$ ans) ont un plus grand risque de développer un PG que les plus âgées [32, 68, 75, 77–82]. Le contrôle du PG passerait donc aussi bien par l'immunité acquise au fil des ans mais également par l'immunité conférée par de multiples grossesses. De ce fait, dans ces zones de forte transmission, la femme enceinte a un faible risque de survenue d'accès graves et est plus sujette à des infections asymptomatiques [18, 72, 73, 83].

En zone d'endémie stable, les conséquences du PG sont aussi bien maternelles que fœtales. Comme conséquences maternelles, on distingue l'anémie [72, 84–87] et l'infection placentaire [22, 72, 88–90] . L'infection placentaire atteint 10-34% des femmes [72]. Un contraste existe entre la parasitémie du sang maternel périphérique et l'hyperparasitémie placentaire due à la séquestration des globules rouges parasités dans le placenta [91]. La conséquence fœtale retrouvée le plus souvent dans ce contexte est le retard de croissance intra-utérin (RCIU), qui associé à la prématurité, induit à terme un faible poids de naissance du nouveau-né (FPN) [88]. Le FPN se retrouve être un facteur de sur-risque de la mortalité

infantile [18, 32, 92–94]. Le PG cause environ 35% de tous les FPN évitables pendant la grossesse et contribue à 75 000 à 200 000 décès infantiles par an [18, 95]. De plus, des études ont montré que les nouveau-nés issus de mères ayant été infectées pendant leur grossesse ont une susceptibilité individuelle accrue au paludisme les premiers mois de leur vie [27–31]. Les conséquences maternelles et fœtales du PG prédominent chez les primigestes [18, 96]. L'ASS représente la principale zone géographique de paludisme stable.

➤ **Zone de transmission instable**

Le PG est fonction du niveau d'immunité acquis par la femme enceinte. La morbidité et la mortalité dues au PG est plus importante dans ces zones de faible endémicité. Les infections y sont majoritairement symptomatiques avec une évolution vers des accès graves plus fréquents que chez les autres adultes [97]. Le faible niveau de transmission entraîne une faible prévalence des infections placentaires dans ces zones. Malgré la rareté de ces infections, elles sont graves aussi bien pour la mère (quel que soit la parité) que pour le fœtus. Chez la femme enceinte, les complications les plus graves du PG sont l'anémie maternelle, le paludisme cérébral ou l'œdème pulmonaire (pouvant entraîner des décès maternels) et qui affectent les femmes ayant les niveaux d'immunité les plus faibles. Pour le fœtus, les conséquences les plus fréquentes sont l'avortement, la mort fœtale in utéro et le FPN. Le tableau 1 récapitule les manifestations du PG en fonction de la zone de transmission.

**Tableau 1: Effets cliniques du paludisme associé à la grossesse**

		<i>Paludisme stable</i>	<i>Paludisme instable</i>
	Paludisme grave (Avec une issue parfois mortelle)	-	+
<b>Mère</b>	Anémie	++ (principalement des primigestes)	+++ (toutes parités)
	Hyperpyrexie	+	+++
	Infection placentaire	+++ (principalement des primigravides)	+
<b>Foetus / nouveau-né</b>	Avortement / mortinaissance	-	++
	Paludisme congénital symptomatique	-	+
	FPN	+++ (principalement des primigestes)	+++ (toutes parités)

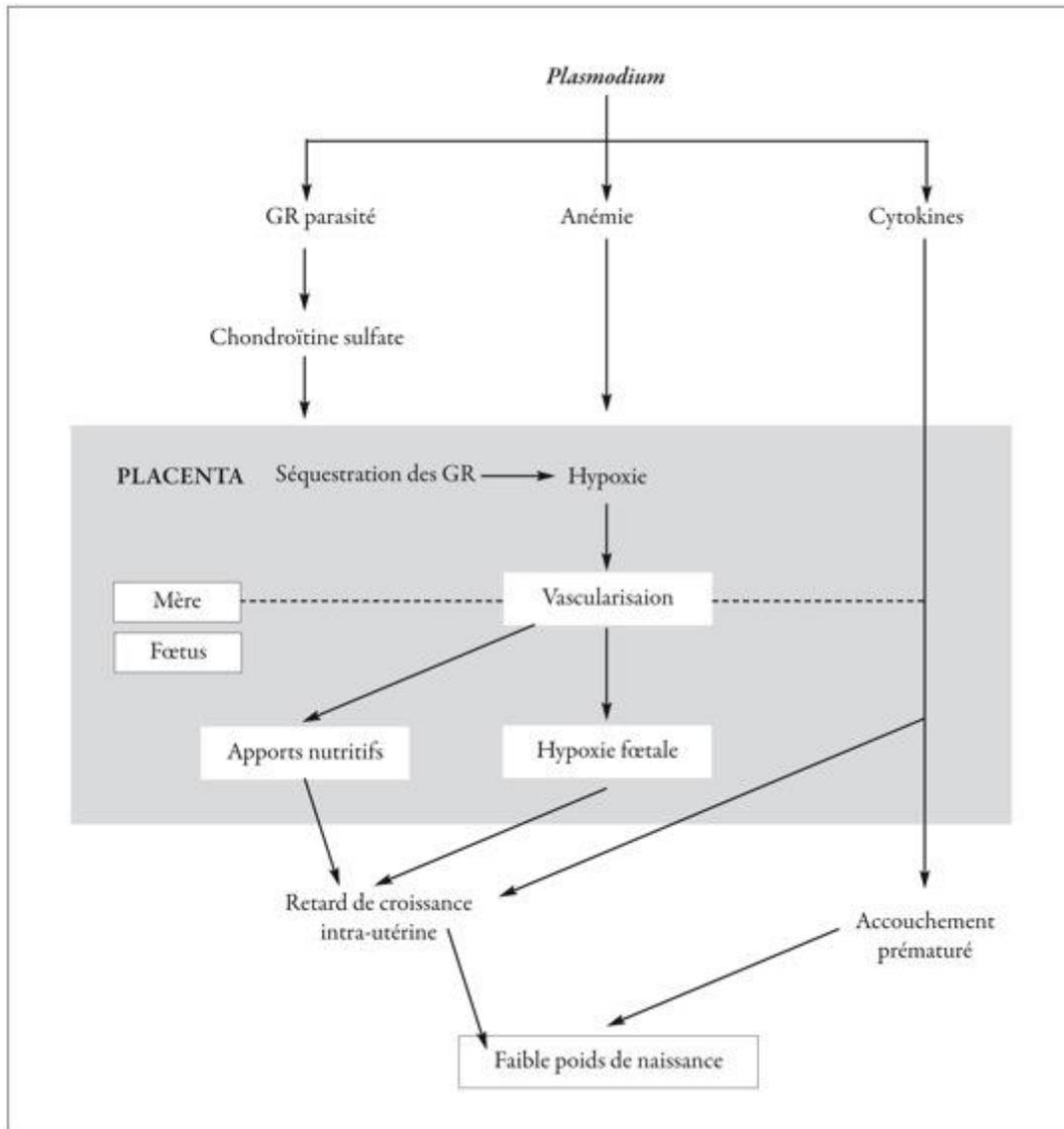
Abréviations : +++, très fréquent; ++, commun; +, peu fréquent; -, rare.

Source : Cot M. *et al.*, 2003

#### 2.1.4.2. Physiopathologie

Lors de la grossesse, les globules rouges infectés par le parasite s'accumulent massivement au niveau du placenta. Cette accumulation se fait par l'interaction d'une protéine parasitaire située à la surface des hématies, le PfEMP1 (Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1), et d'une molécule placentaire, la chondroïtine sulfate A (CSA), servant de point d'ancrage [32, 98]. Après une première grossesse, les femmes infectées acquièrent des anticorps protecteurs anti-VAR2CSA qui bloquent cette adhésion, protégeant la femme pour les grossesses suivantes [99]. La lyse des hématies parasitées entraîne une anémie maternelle [100]. Ensuite, on assiste à une altération de l'intégrité du placenta entraînant ainsi une réduction des échanges gazeux et nutritionnels foeto-maternels [101, 102]. Cette baisse

d'échanges peut provoquer la survenue d'un retard de croissance intra-utérin, d'une prématurité et par conséquent du faible poids de naissance du nouveau-né [18, 103–105].



**Figure 2: Physiopathologie du paludisme au niveau du placenta**

Source: Bourée P *et al.*, Revue Francophone des Laboratoires 2008

#### 2.1.4.3. Spécificités du paludisme submicroscopique par *Plasmodium falciparum*

Une grande majorité des infections par *Plasmodium falciparum* survenant au cours de la grossesse ne sont pas détectées par les outils de diagnostic habituels microscopiques ou le test

de diagnostic rapide [32]. Les nouvelles technologies de biologie moléculaire, plus sensibles que les méthodes usuelles, que sont la PCR conventionnelle, la nested PCR [32, 49, 106–112] ou la PCR en temps réel [32, 113–115] permettent la détection de ces infections qui sont dites submicroscopiques. La mise en lumière des infections submicroscopiques par la PCR a permis de révéler la forte prévalence de ces infections [12, 15] pendant la grossesse [13, 18] comparativement aux infections microscopiques étudiées depuis des décennies. En effet, ces infections submicroscopiques ont une prévalence deux à trois fois plus élevée que les infections microscopiques [13, 18]. Les femmes enceintes ayant des infections submicroscopiques sont donc à tort considérées comme « non infectées » par les méthodes de diagnostic classiques. Ces infections submicroscopiques sont asymptomatiques dans la quasi-totalité des cas [14] et passent donc inaperçues, les femmes ne consultant pas car n'ayant pas de symptômes. Cependant, certaines études récentes montrent que ces infections submicroscopiques (i) jouent un rôle dans la transmission du paludisme aux moustiques [14, 116, 117] et (ii) pourraient entraîner certaines conséquences néfastes pendant la grossesse, avec un impact sur la santé de la mère et du nouveau-né, comme l'anémie maternelle et le faible poids de naissance [18, 32, 33]. L'impact de la survenue des infections submicroscopiques au cours des premiers mois de grossesse serait beaucoup plus important sur les issues de la grossesse que ce qui est déjà démontré [18]. Cela pourrait s'expliquer par l'exposition précoce des femmes enceintes au risque palustre [23, 118–120] avec une susceptibilité particulière des femmes en début de grossesse, mais également par la mauvaise protection de ces femmes au début de leur grossesse. En effet, des études ont montré que le premier trimestre est une période critique de la grossesse mal protégée par les moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MIILDA) [121, 122] qui constituent actuellement le seul outil de prévention contre le paludisme.

Peu de données existent sur la prévalence réelle des infections submicroscopiques au premier trimestre de grossesse et leur impact sur la grossesse. Une explication à ce manque d'informations peut être dû à la difficulté d'avoir accès au début de la grossesse des femmes en ASS. La majorité des femmes enceintes en ASS consultent tardivement en première consultation prénatale (CPN), en moyenne à partir du second trimestre de grossesse pour des raisons souvent socio-culturelles [123–126]. Ainsi, l'inclusion des femmes dans ces études, aussi bien longitudinales que transversales [18, 32], se fait souvent à la fin du premier trimestre voire au début du second trimestre de grossesse. Ce retard dans la réalisation de la première CPN n'encourage souvent pas les investigateurs d'études à s'intéresser à cette période de la grossesse.

Notre sujet de thèse s'est donc concentré sur le paludisme gestationnel submicroscopique avec un intérêt particulier sur les infections du premier trimestre de grossesse.

#### 2.1.4.4. Stratégie de lutte contre le paludisme gestationnel en zone d'endémie palustre stable

La lutte contre le PG, en zone d'endémie stable, passe par une combinaison de stratégies recommandées par l'OMS. Il s'agit d'une lutte anti vectorielle associée à un traitement médicamenteux à titre préventif et curatif [4, 95, 127–129].

##### ➤ **Stratégie curative**

La première stratégie de lutte contre le PG passe par le traitement adéquat de tous les cas de paludisme détectés par le personnel soignant. Le traitement recommandé par l'OMS chez la femme enceinte est fonction du trimestre de la grossesse et de la forme clinique en cause.

##### ✓ **Accès palustre simple** [130, 131, 128]

###### ▪ **1<sup>er</sup> trimestre de grossesse**

En 1<sup>ère</sup> intention, le traitement doit se faire par l'association de la quinine (8 mg/kg, 3 fois par jour) et de la clindamycine (10 mg/kg, 2 fois par jour) pendant 7 jours. La monothérapie à

base de quinine est conseillée en cas d'indisponibilité ou de prix inabordable de la clindamycine. En cas d'échec du traitement de 1<sup>ère</sup> intention, il est recommandé en 2<sup>ème</sup> intention une association à base d'artésunate (4 mg/kg par jour en seule prise) et de clindamycine (10 mg/kg, 2 fois par jour) pendant 7 jours.

- **2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres de grossesse**

En 1<sup>ère</sup> intention, le traitement se fait avec les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). En 2<sup>ème</sup> intention, il est recommandé d'utiliser soit de l'artésunate (4 mg/kg par jour en seule prise) associée à la clindamycine (10 mg/kg, 2 fois par jour), soit de la quinine (8 mg/kg, 3 fois par jour) associée à de la clindamycine (10 mg/kg, 2 fois par jour) pendant 7 jours. L'utilisation de la monothérapie est possible en cas d'indisponibilité de la clindamycine.

- ✓ **Paludisme grave [128]**

Quel que soit le trimestre de grossesse, le traitement se fait par voie parentérale en intraveineuse ou intramusculaire avec de l'artésunate. Ce traitement parentéral se fait pendant au moins 24 heures jusqu'à ce que le patient puisse supporter le traitement oral. Le traitement oral se fera ensuite avec un CTA pendant 3 jours. En cas d'indisponibilité de l'artésunate, le traitement peut se faire par de l'artéméther en 1<sup>er</sup> choix ou de la quinine en 2<sup>nd</sup> choix.

- **Stratégie préventive**

Dans les zones d'endémie stable, la majorité des infections palustres est asymptomatique. La lutte contre le paludisme passe donc essentiellement par la prévention [95].

- ✓ **Moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action (MIILDA)**

Principaux outils de lutte anti vectorielle, les MIILDA sont recommandées par l'OMS aux femmes enceintes dès le tout début de la grossesse, tout le long de la grossesse jusqu'à l'accouchement et même en période post-partum. De nombreuses études ont démontré l'efficacité des MIILDA sur la réduction de la morbidité et de la mortalité liées au PG [4, 6, 7,

132–134]. Une étude réalisée par ter Kuile *et al.* dans l'ouest du Kenya a montré en 2003 que les femmes ayant utilisé des MIILDA chaque nuit au cours de leurs premières grossesses ont un risque diminué de 25 % d'avoir des enfants prématurés ou de faible poids de naissance comparativement aux femmes n'en n'ayant pas utilisé [4, 135]. Actuellement, les MIILDA constituent le seul outil de prévention pendant le 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse [122]. Bien qu'on ait remarqué une augmentation du taux de couverture des MIILDA au fil des années en ASS, ce taux demeure toujours faible (< 42%) comparativement aux 80% de couverture recommandés par l'OMS [136, 137]. Une sous-utilisation de cet outil de prévention laisse donc les femmes enceintes vulnérables pendant la grossesse et particulièrement au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse.

#### ✓ **Traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPIg)**

En 1984, une chimioprophylaxie à base de chloroquine était recommandée par l'OMS pour lutter contre les conséquences du PG. Devant la mauvaise observance et la résistance croissante des parasites à la chloroquine, l'OMS a mis en œuvre une nouvelle méthode de prévention reposant sur des traitements intermittents [23]. La stratégie préventive médicamenteuse la plus efficace depuis lors est le traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPIg). Le TPIg est basé sur l'utilisation d'un médicament antipaludique administré en doses de traitement à des intervalles prédéfinis entre chaque prise [4]. La Sulfadoxine-pyriméthamine (SP) est actuellement le médicament antipaludique à dose unique le plus efficace pour prévenir le PG dans les régions d'ASS où la transmission des infections par *P. falciparum* est stable avec une faible résistance à la SP. La SP est contre-indiquée au 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse à cause de possibles effets tératogènes sur le fœtus [138–140]. L'OMS recommande depuis 2012, l'administration du TPIg à partir de la 13<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée, en traitement directement observé par un personnel soignant, d'une dose curative (3 comprimés) de SP. Les femmes enceintes doivent recevoir un minimum de trois

doses avec un mois d'intervalle au minimum entre deux prises et ce jusqu'à l'accouchement quel que soit leur statut infectieux palustre [4, 95, 140]. Maintes études ont prouvé l'efficacité du TPIg à la SP sur la santé de la mère et du nouveau-né. Il réduit considérablement la prévalence de l'anémie maternelle, du paludisme placentaire et du faible poids de naissance du nouveau-né [4, 141–146]. Jusqu'en 2012, la recommandation était d'un minimum de deux doses de TPIg pendant le suivi prénatal. Malgré son impact bénéfique pendant la grossesse et la simplicité de la stratégie, le taux de couverture d'un minimum de deux doses de TPIg reste assez faible en ASS (en moyenne 50% en 2017) [137, 147] pour de multiples raisons qui sont logistiques, financières, politiques, et humaines [148, 149].

### ✓ Vaccination

De nombreuses études ont montré la protection conférée aux femmes enceintes par les anticorps anti-*VAR2CSA* [99, 150–152]. Le développement d'un vaccin à utiliser en pré-grossesse afin de protéger les femmes en âge de procréer est en cours de réalisation [151, 153]. Ce vaccin a pour but de reproduire des anticorps anti-*VAR2CSA* qui inhibent la capacité adhésive des hématies parasités empêchant ainsi l'accumulation du parasite dans le placenta et donc les conséquences du PG chez la femme enceinte et le fœtus. Il pourrait donc être d'une grande utilité de par la protection des primigestes mais également de toutes les femmes dès le tout début de leur grossesse.

## 2.2. Généralités sur le Bénin

### 2.2.1. Contexte géographique



Le Bénin est un pays d'Afrique de l'Ouest situé dans la zone tropicale entre l'équateur et le tropique du cancer. Il partage des frontières avec le Niger au Nord, le Burkina-Faso au Nord-Ouest, le Togo à l'Ouest,

Figure 3: Carte du Bénin

le Nigéria à l'Est et l'Océan Atlantique au Sud. Le territoire a une superficie de 114 763 km<sup>2</sup> et s'étend du Nord au Sud sur 700 km.

### 2.2.2. Contexte sociodémographique

La population béninoise est estimée en 2013 à 10 008 749 habitants résidents dont 51.2 % de femmes selon le dernier recensement général de la population et de l'habitation (RGPH-4).

Les femmes en âge de procréer représentent 18 % de la population totale du pays (INSAE-EDSB-V) et la majorité de la population (52,7 %) vit en zone rurale [154].

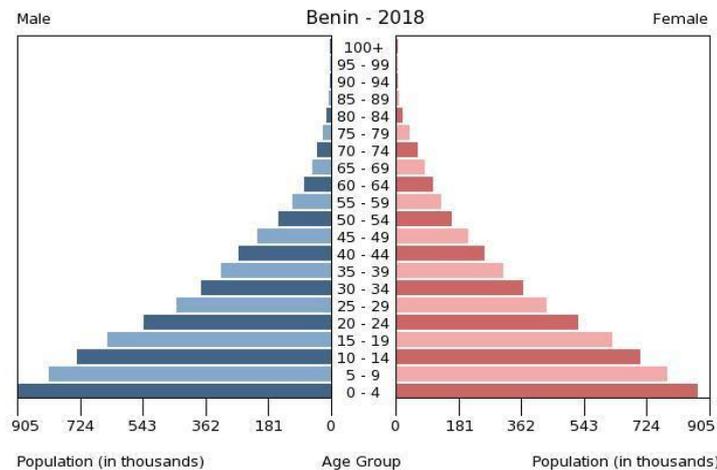


Figure 4: Pyramide de la population béninoise, 2018

### 2.2.3. Contexte économique

Le Bénin est un pays à faible revenu. Les dépenses de santé représentaient 4,6 % du produit intérieur brut (PIB) du pays en 2014 [155]. L'activité économique dominante est l'agriculture occupant 45,1 % de la population active.

### 2.2.4. Contexte sanitaire

Le taux brut de natalité est de 40,5 ‰ et le taux global de fécondité est de 197 ‰ chez les femmes âgées de 15-49 ans (INSAE-EDSB-V).

### 2.2.5. Indicateurs de santé au Bénin

#### 2.2.5.1. Indicateurs maternels

Le Tableau 2 regroupe les principaux indicateurs de santé maternelle disponibles pour le Bénin, spécifiquement pour le département de l'Atlantique dans lequel notre étude s'est déroulée (INSAE-EDSB-V).

**Tableau 2: Principaux indicateurs de santé maternelle au Bénin issus des données de l'EDSB-V (2017-2018)**

Indicateurs de santé maternelle	Bénin	Département de l'Atlantique	
<b>Suivi prénatal</b>			
Aucune CPN	10,90%	1,20%	
1 CPN	6,50%	nd	
≥ 4 CPN	52,10%	nd	
1 <sup>ère</sup> CPN précoce (< 4 mois de grossesse)	50,60%	nd	
Nombre médian de mois de grossesse à la 1 <sup>ère</sup> CPN	3,7	nd	
≥ 1 échographie obstétricale	49,40%	67,10%	
Anémie pendant la grossesse (<11 g/dl)	57,70%	60,20%	
<b>Accouchement</b>			
Dans un établissement de santé	83,90%	97,70%	
Césarienne	5,10%	8,90%	
<b>Indicateurs de mortalité</b>			
Mortalité maternelle	391/105 NV	nd	
<b>Problèmes d'accès aux centres de santé</b>			
Financiers	60,40%	66,50%	
Distance géographique	53,30%	57,70%	
	31,10%	27,60%	
<b>Outils de prévention</b>			
Possession d'une moustiquaire	Traitée ou non	92,80%	95,60%
	Imprégnée	91,50%	94,60%
Utilisation déclarée de la moustiquaire la veille	Traitée ou non	80,40%	86,50%
	Imprégnée	79,30%	83,00%
	≥ 2 doses de TPI à la SP	33,40%	37,20%
	≥ 3 doses de TPI à la SP	13,30%	13,60%

Abréviations : CPN, Consultations pré-natales ; nd, non disponible ; NV, Naissances vivantes ; TPI, Traitement préventif intermittent ; SP, Sulfadoxine-Pyriméthamine.

### 2.2.5.2. Indicateurs infantiles

Le Tableau 3 regroupe les principaux indicateurs de santé infantile disponibles pour le Bénin spécifiquement pour le département de l'Atlantique dans lequel notre étude s'est déroulée (INSAE-EDSB-V).

**Tableau 3: Principaux indicateurs de santé infantile au Bénin issus des données de l'EDBSB-V (2017-2018)**

Indicateurs de santé infantile	Bénin	Département de l'Atlantique	
<b>Naissance</b>			
Faible poids de naissance	11,60%	11,30%	
<b>Indicateurs de mortalité</b>			
Mortalité périnatale	33/1000	45/1000	
Mortalité néonatale	30	nd	
Mortalité infantile	55	nd	
Mortalité infanto-juvénile	96	nd	
<b>Indicateurs de morbidité</b>			
Paludisme	TDR	36,40%	23,70%
	GE	39,10%	34,20%
Anémie (<11 g/dl)		71,50%	67,50%

Abréviations : nd, non disponible ; TDR, Test de diagnostic rapide du paludisme ; GE, Goutte épaisse.

### *III. PROBLÉMATIQUE*

### 3.1. *Situation du problème*

Les infections submicroscopiques (IS) prennent une importance majeure en santé publique car suspectées de participer à la transmission du paludisme [156–158] et donc de freiner l'élimination mondiale du paludisme. Les études réalisées jusque-là, en zone d'endémie, ont montré la forte prévalence des infections submicroscopiques en population générale [15]. Une étude prospective montre que la survenue précoce de ces infections pourrait augmenter le risque d'anémie maternelle et de faible poids de naissance du nouveau-né [18].

Dans un contexte d'élimination du paludisme au niveau mondial, il est nécessaire de comprendre tous les freins pouvant influencer sur la réussite de l'atteinte de cet objectif. Dans les zones de forte transmission, les pays en sont encore à l'objectif de réduction de la transmission de la maladie avant de passer à l'étape d'élimination. Les IS semblent constituer l'un des freins à la réduction de la prévalence de la maladie dans les pays les plus à risque de par leur contribution à la transmission du paludisme aux moustiques et leur possible impact sur la santé de la mère et de l'enfant. La problématique actuelle repose donc sur (i) le diagnostic des IS; (ii) une meilleure compréhension des IS, considérées jusqu'alors d'importance secondaires dans la lutte contre le paludisme ; (iii) la dynamique réelle des IS non détectées et donc non traitées pendant toute la grossesse et (iv) l'impact des stratégies de lutte actuelles sur les IS.

### 3.2. *Objectifs de la thèse*

L'objectif de ce travail de thèse est d'analyser aux différents trimestres de la grossesse, la dynamique, les déterminants et l'impact des stratégies de lutte actuelles sur les infections par *P. falciparum*, plus spécifiquement les infections submicroscopiques. Plus spécifiquement, il s'agit de:

- Caractériser la dynamique des infections par *P. falciparum* (submicroscopiques et microscopiques) aux différents trimestres de la grossesse;

- Etudier les déterminants influençant la dynamique du réservoir de ces infections par *P. falciparum*;
- Evaluer l'impact des stratégies de prévention notamment le Traitement Préventif Intermittent sur ces infections.

Cette thèse s'est déroulée dans le cadre d'un projet de recherche coordonné par l'Unité mixte de recherche (UMR) 261 de l'Institut de recherche pour le développement (IRD) et mené au Bénin entre 2014 et 2017. Il s'agit du projet RECIPAL.

Le projet RECIPAL “ REtard de Croissance Intra-utérin et PALudisme ” a permis le suivi mensuel d'une cohorte de 411 femmes enceintes recrutées depuis la période pré-conceptionnelle jusqu'à l'accouchement. Ce projet a reçu un financement de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JSV1-0004, financement 2013-2018) et de la fondation Simone Beer sous l'auspice de la Fondation de France (00074147, financement 2017).

Nous avons également travaillé sur des données du projet EVALMOUS “EVALuation de l'utilisation et de l'efficacité des MOUSTiquaires par les femmes enceintes et les membres de leur foyer en début de grossesse au Bénin”. Ce projet qui est une étude ancillaire du projet RECIPAL a permis le suivi d'un sous-échantillon de 240 femmes enceintes du projet RECIPAL afin d'évaluer l'impact des moustiquaires sur les infections par *P. falciparum* survenant au cours du premier trimestre de grossesse. EVALMOUS a été financé par Expertise France –Initiative 5%” (Mission n°15SANIN110).

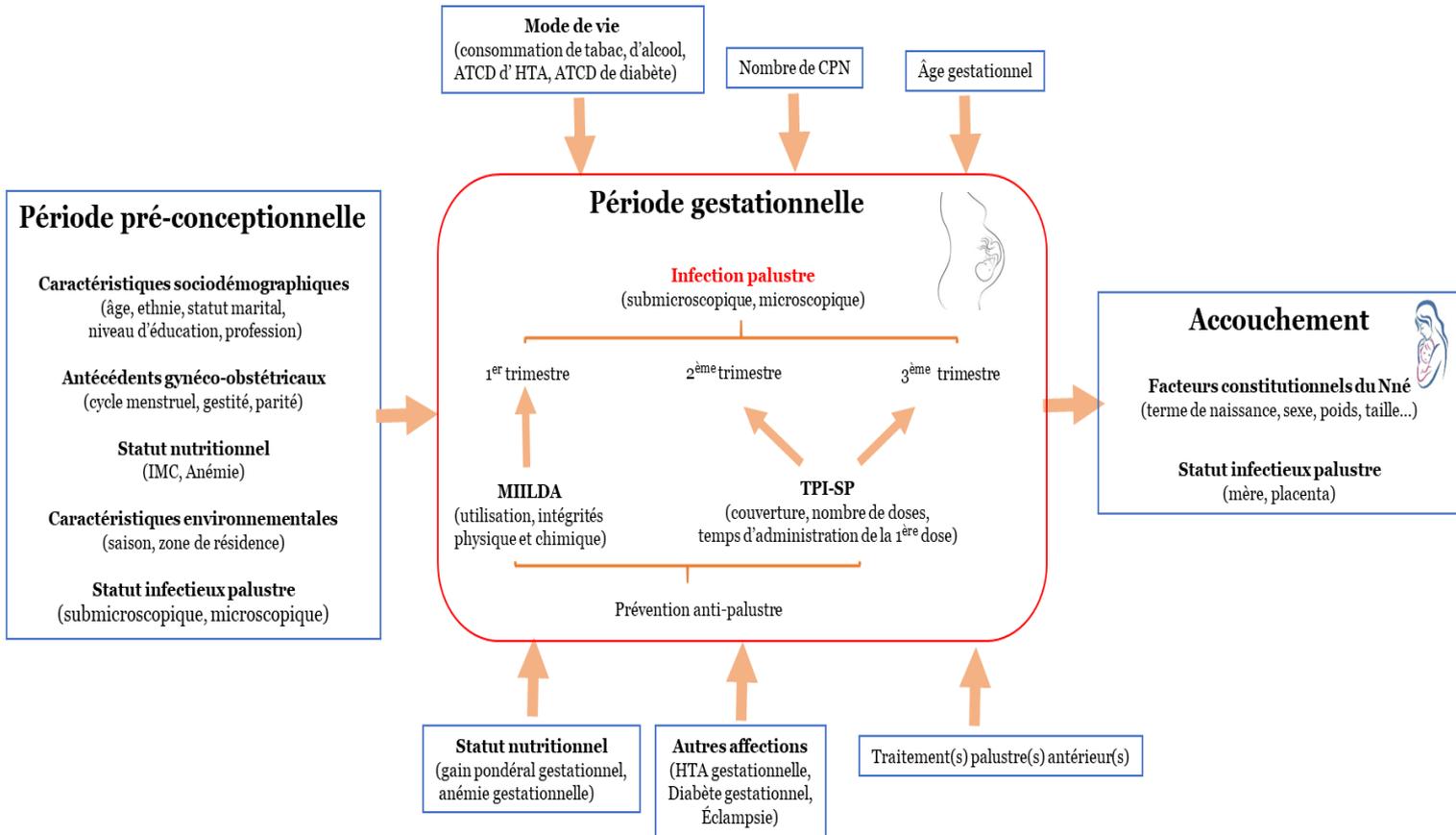
La figure 5 présente le protocole des études RECIPAL et EVALMOUS incluant les principaux déterminants et évènements de santé évalués. L'évènement de santé principal étudié était le statut infectieux palustre (submicroscopique et microscopique) au cours de la grossesse avec un accent particulier sur le premier trimestre de grossesse.

Dans un premier article publié dans « Clinical Infectious Disease » en 2019, nous avons décrit la dynamique des infections par *P. falciparum*, aussi bien submicroscopiques que

microscopiques, au cours de la grossesse. Nous avons ensuite déterminé les principaux facteurs de risque de survenue des infections par *P. falciparum* pendant les trois trimestres de grossesse. Cela a permis de dégager un groupe de femmes à fort risque de survenue d'infections par *P. falciparum* au cours de la grossesse, plus particulièrement au premier trimestre de la grossesse.

Dans un second article sous presse dans « Clinical Infectious Disease » en 2020, nous avons évalué l'impact du TPI sur les infections par *P. falciparum*, aussi bien submicroscopiques que microscopiques, au cours de la grossesse. Nous avons ainsi pu déceler l'impact du délai de la prise de la première dose du TPI sur le nombre d'infections submicroscopiques et microscopiques par *P. falciparum* au cours de la grossesse.

Au cours de la thèse, nous avons également publié un article faisant suite aux résultats analysés lors de notre master 2 en nous basant sur le projet EVALMOUS. Il a été publié dans « BMC Public Health » en 2018 (Annexe1). Dans cet article, nous avons évalué l'impact de l'utilisation et de l'efficacité des moustiquaires imprégnées sur les infections microscopiques par *P. falciparum* survenues au cours du premier trimestre de grossesse. Nous avons ainsi montré la nécessité d'associer les indicateurs d'intégrités physique et biochimique des moustiquaires aux indicateurs de possession et d'utilisation déclarée lors des études d'évaluation de l'efficacité des moustiquaires. Nous avons également constaté que les femmes n'étaient pas protégées de manière optimale contre les risques d'infections par *P. falciparum* au cours du premier trimestre de grossesse.



ATCD: antécédent; CPN: consultation prénatale; HTA: hypertension artérielle; IMC: indice de masse corporelle; MILDA: moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action; TPI-SP: traitement préventif intermittent à la sulfadoxine-pyriméthamine; Nné: nouveau-né;

**Figure 5: Conception des cohortes RECIPAL et EVALMOUS**

## *IV. METHODOLOGIE*

#### 4.1. Zone d'étude

Notre projet de thèse se base sur une cohorte mère-enfant de l'étude RECIPAL et d'une de ses études ancillaires EVALMOUS. RECIPAL s'est déroulé entre juin 2014 et septembre 2017 et EVALMOUS a débuté en juin 2015 et pris fin en octobre 2016. Les deux études se sont déroulées au Sud du Bénin, dans les communes mitoyennes de Sô-Ava et d'Abomey-Calavi, situées à 25 km de Cotonou, capitale économique du pays. Quatre arrondissements (Sô-Ava, Vekky, Houédo dans la commune de Sô-Ava et Akassato dans la commune d'Abomey-Calavi) ont été sélectionnés pour l'étude. Cette sélection s'est faite en fonction (i) de la densité de la population dans les arrondissements, (ii) du nombre moyen de consultations prénatales et d'accouchements mensuels dans les principales maternités publiques de ces arrondissements et (iii) pour des raisons logistiques via la proximité des laboratoires de l'équipe de recherche.

La commune de Sô-Ava est une zone rurale et lacustre tandis que Abomey-Calavi est une zone semi-urbaine et terrestre. Les principales sources rémunératrices sont l'agriculture (maïs, manioc...) et la pêche respectivement à Abomey-Calavi et à Sô-Ava.

Au Sud du pays, le climat est subéquatorial avec deux saisons des pluies s'étendant d'avril à juillet et de septembre à novembre, avec une pluviométrie annuelle moyenne d'environ 1200 mm. La commune de Sô-Ava, cité lacustre située au niveau du lac Nokoué, connaît chaque année une période de crue qui s'étend généralement d'août à novembre.

Le paludisme est pérenne toute l'année et sévit de façon hyper endémique dans la zone d'étude. La transmission du paludisme y est continue et intense avec des pics généralement observés après les saisons pluvieuses. Le Sud du Bénin est une zone de paludisme stable. L'espèce parasitaire du paludisme la plus fréquente est *Plasmodium falciparum* (97% des cas) [159] et le taux d'inoculation entomologique moyen est de 2,1 piqûres infectantes d'anophèles/personne/100 nuits [160]. Les principales espèces de vecteur de paludisme sont *Anopheles arabiensis*, *Anopheles gambiae ss* et *Anopheles funestus* [71, 161, 162].

## 4.2. Population et design d'étude

La population d'étude est constituée des femmes en âge de procréer, vivant en zone d'endémie et recrutées en population générale. Un suivi mensuel à domicile des femmes s'est fait pendant la période pré-conceptionnelle constituant ainsi la cohorte primaire. Une fois enceintes, les femmes entraient dans la cohorte secondaire. Le suivi de la cohorte secondaire dans l'étude RECIPAL s'est poursuivi jusqu'à l'accouchement à la maternité ; dans le cadre de l'étude EVALMOUS, après leur inclusion lors d'une visite à domicile avant grossesse, les femmes une fois enceintes étaient visitées 2 fois à domicile pendant le premier trimestre de grossesse à 1 mois d'intervalle minimum. Dans le cadre des deux projets, des communications orale et écrite ont été utilisées pour fournir des informations complètes à la femme et à son conjoint. Les formulaires de consentement étaient traduits en langue locale pour une meilleure compréhension.

Un total de 1214 femmes en âge de procréer ont été recrutées et suivies mensuellement à domicile dans la cohorte primaire de l'étude RECIPAL. Parmi elles, 411 sont passées dans la cohorte secondaire de l'étude (c'est-à-dire qu'elles sont tombées enceintes et ont pu être suivies pendant leur grossesse). Une population de 273 femmes enceintes a bénéficié d'un suivi complet à la maternité lors des consultations prénatales jusqu'à l'accouchement au cours de l'étude RECIPAL. Un sous-échantillon de 240 femmes enceintes a été inclus dans la cohorte secondaire de l'étude EVALMOUS dont 203 suivis complets pendant le premier trimestre de grossesse.

Les critères d'inclusion des femmes dans l'étude RECIPAL étaient les suivants :

- Avoir un âge compris entre 18 et 45 ans ;
- Avoir un test de grossesse urinaire négatif le jour du recrutement ;
- N'avoir suivi aucune contraception durant la période de suivi ;

- N'avoir aucun antécédent médical connu d'hypofertilité (aménorrhée primaire ou secondaire, incapacité à concevoir depuis 10 ans ou plus, maladie abortive) ;
- Avoir un désir de maternité ;
- N'avoir aucun voyage prévu pendant plus de 2 mois au cours des 18 mois suivant l'inclusion ;
- Accepter le protocole de l'étude RECIPAL et donner son consentement éclairé.

Les critères d'inclusion des femmes dans l'étude EVALMOUS étaient les suivants :

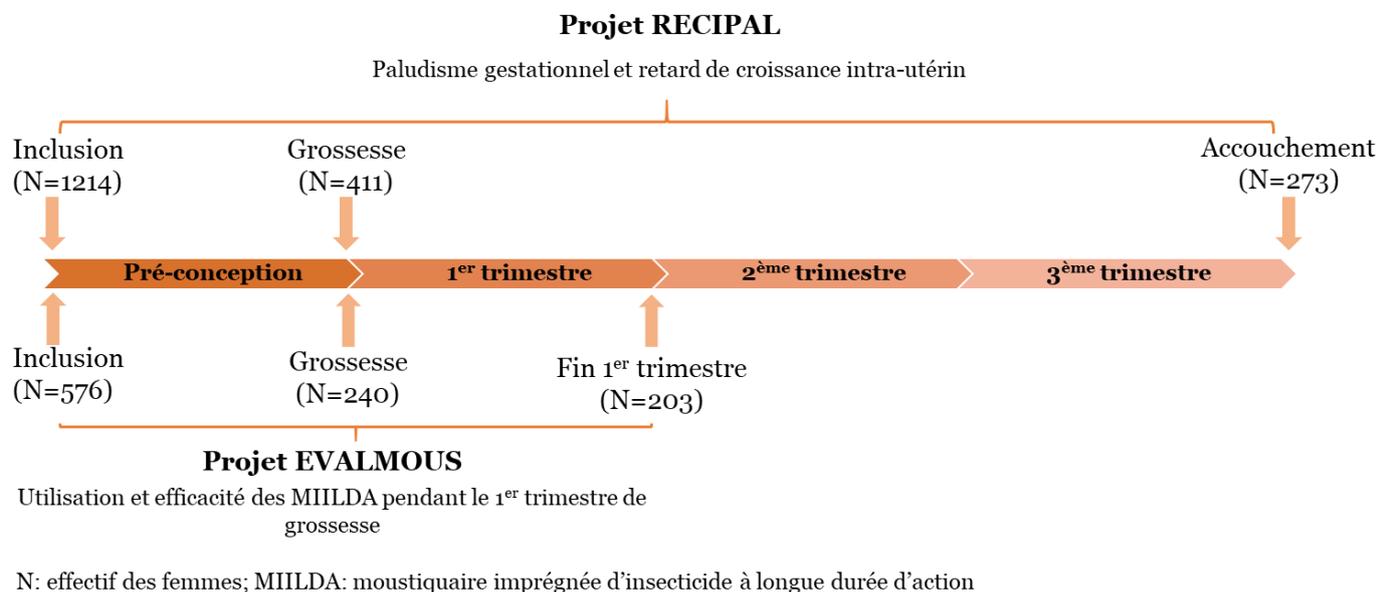
- Appartenir à la cohorte RECIPAL ;
- Accepter le protocole de l'étude EVALMOUS et donner son consentement éclairé écrit.

#### **4.3. Cadre de l'étude**

L'objectif principal de l'étude RECIPAL était d'évaluer les conséquences du paludisme précoce au cours de la grossesse sur la santé de la mère et de l'enfant. Plus spécifiquement, il s'agissait : (i) d'évaluer l'effet des infections palustres microscopiques et submicroscopiques par *P. falciparum* au cours des 3 premiers mois de grossesse sur la croissance fœtale, la durée de la grossesse et l'anémie maternelle; (ii) de déterminer si l'effet du paludisme sur le fœtus était modifié par le statut nutritionnel de la femme qui constitue un autre déterminant important de la croissance fœtale.

L'étude EVALMOUS a été conçue pour mesurer l'utilisation et l'efficacité des moustiquaires des femmes enceintes au premier trimestre de grossesse. Plus spécifiquement, il fallait: (i) définir des indicateurs d'utilisation, d'intégrité physique et d'efficacité chimique des moustiquaires ; (ii) étudier la relation entre ces trois indicateurs et l'infection palustre gestationnelle au premier trimestre de grossesse.

La figure 6 présente les deux études et montre leur complémentarité dans l'atteinte des différents objectifs de notre thèse.



**Figure 6: Présentation des études RECIPAL et EVALMOUS**

#### 4.4. Protocole de recueil de données

Le suivi a été pré-conceptionnel puis gestationnel. La méthodologie utilisée dans l'étude RECIPAL est originale. Sa conception a permis (i) le recrutement de femmes avant la grossesse, donnant ainsi l'opportunité de détecter les infections palustres microscopiques et submicroscopiques avant et au début de la grossesse, d'avoir des informations sur différentes expositions précoces avant la grossesse et en tout début de la grossesse, (ii) la datation précise de l'âge de la grossesse grâce aux échographies réalisées, (iii) d'étudier l'impact de ces différentes expositions précoces sur le déroulement de la grossesse et la survenue de conséquences néfastes sur la santé de la mère et le développement du fœtus. Cette approche méthodologique a également permis d'étudier partiellement l'implémentation des stratégies de prévention contre le paludisme au Bénin et de mettre en évidence les possibles freins majeurs liés à la mise en œuvre de la stratégie de lutte contre le paludisme gestationnel.

L'étude EVALMOUS a permis d'avoir des informations sur l'utilisation, l'intégrité physique et l'efficacité biochimique des MIILDA utilisées par les femmes enceintes au début de la grossesse.

#### 4.4.1. Période pré-conceptionnelle (cohorte primaire)

##### ✓ RECIPAL

Les femmes ont été suivies mensuellement pendant 24 mois au maximum dans la cohorte primaire de l'étude RECIPAL.

A l'inclusion dans l'étude RECIPAL, un recueil systématique des données sociodémographiques (âge, statut marital, lieu de résidence, ethnie, niveau d'éducation, statut professionnel de la femme et du conjoint), anthropométriques (poids, taille, périmètre brachial...), économiques (biens possédés, moyens de communication utilisés) et les caractéristiques de l'habitat (électricité, eau...) était réalisé chez les femmes recrutées. Un dépistage pour l'infection palustre était également réalisé par la GE et la PCR ainsi qu'un dosage du taux d'hémoglobine (Hb).

Suite à leur inclusion dans RECIPAL, les femmes étaient suivies mensuellement à domicile par des enquêteurs formés (infirmiers et/ou sages-femmes), assistés par des relais communautaires. Ils collectaient, au cours de ces visites mensuelles, des informations sur la date des dernières règles (DDR) et réalisaient un test urinaire de grossesse (One-Step; International Holding, Germany).

Après 12 mois de suivi sans dépistage d'une grossesse, les femmes recevaient des conseils médicaux pour aider à la conception. Elles étaient invitées à la maternité pour un examen gynécologique précis en cas de signes en faveur d'une infection génitale. Après 24 mois, le suivi des femmes qui n'avaient pas pu concevoir s'arrêtait. Elles étaient ensuite orientées, si elles le souhaitaient, vers un gynécologue pour une évaluation de leur fertilité.

##### ✓ EVALMOUS

Les femmes incluses dans RECIPAL et répondant aux critères d'inclusion d'EVALMOUS étaient incluses dans l'étude EVALMOUS. A l'inclusion, une première visite à domicile avait lieu avec le recueil de données sociodémographiques, d'indicateurs des MIILDA (possession, utilisation, intégrité physique) utilisées par les femmes et les membres de leur foyer. Les données cliniques et biologiques étaient recueillies auprès de l'étude RECIPAL.

#### 4.4.2. Période gestationnelle (cohorte secondaire)

##### ✓ RECIPAL

Une fois enceintes, les femmes de la cohorte secondaire étaient suivies mensuellement à la maternité en consultation prénatale (CPN) et par l'équipe de RECIPAL jusqu'à l'accouchement. Un test de dépistage du VIH était effectué chez les femmes à la première CPN. Des données cliniques, anthropométriques, obstétricales et liées à la prévention d'affections pendant la grossesse (utilisation de MIILDA, administration du TPIg, supplémentation en micronutriments, fer et acide folique) étaient collectées à chaque CPN. Par ailleurs, un dépistage du paludisme par une GE et une PCR ainsi que la recherche d'une infection urinaire par l'utilisation d'une bandelette urinaire étaient systématiquement réalisés à chaque CPN mensuelle. En cas de survenue de symptômes en faveur d'un paludisme, les femmes consultaient en urgence. Un test de diagnostic rapide du paludisme (Pf+pan rapid test SD Bioline Ag, IDA foundation, Netherlands; BioSynex, France) était alors effectué et la femme était automatiquement prise en charge dès confirmation de la maladie. Un échantillon de sang veineux était prélevé aux 1<sup>er</sup> et au 3<sup>ème</sup> trimestres de grossesse afin de doser le taux d'Hb.

Au moins cinq échographies-doppler étaient réalisées pour chaque femme enceinte, la première étant réalisée avant 15 semaines d'aménorrhée pour une datation précise de la grossesse. L'estimation de l'âge gestationnel (AG) s'est faite en semaines d'aménorrhée.

L'AG de datation final retenu était basé sur les résultats de la date des dernières règles (DDR) ou de l'échographie. Il correspondait à l'AG basé sur la DDR si la différence entre les deux mesures (DDR-échographie) était inférieure à 7 jours et à l'AG basé sur l'échographie de datation dans le cas contraire (différence supérieure à 7 jours).

A l'accouchement, les données anthropométriques du nouveau-né étaient recueillies ainsi qu'un échantillon veineux de la mère, du cordon et du placenta à la recherche d'une infection palustre.

Les équipes de la maternité et de l'étude travaillaient harmonieusement en collaboration pour le suivi prénatal des femmes. Un suivi gestationnel était considéré complet lorsque la femme était suivie jusqu'à l'accouchement. Un suivi était considéré incomplet, dans les deux périodes du suivi, en cas de perte de vue (2 à 3 visites consécutives manquées avant conception et aucune information disponible pendant plus de 3 mois au cours de la grossesse), de migration hors de la zone d'étude, et en absence de données à l'accouchement, le plus souvent à la suite d'une fausse couche.

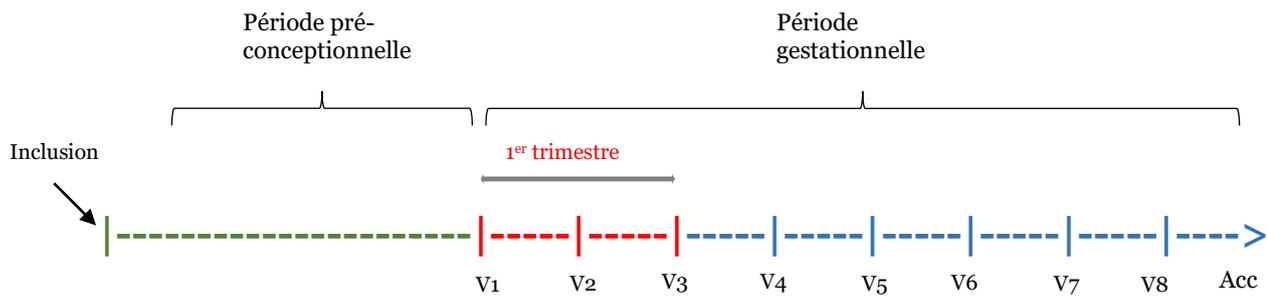
#### ✓ EVALMOUS

Au cours du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse, les femmes incluses dans l'étude EVALMOUS bénéficiaient de deux visites à domicile (une au début et une autre en fin de trimestre) avec le recueil des mêmes informations qu'à la visite pré-conceptionnelle. A la dernière visite (fin du 1<sup>er</sup> trimestre), la MIILDA de la femme enceinte et l'une des MIILDA du foyer, tirée au sort (si applicable), étaient récupérées (si accepté par la famille) puis testées au laboratoire pour une évaluation biochimique. Par ailleurs, les MIILDA retirées dans chaque foyer étaient automatiquement remplacées par de nouvelles offertes par l'étude.

Le suivi EVALMOUS était considéré complet lorsque la femme avait bénéficié des 3 visites prévues dans le protocole. Le suivi était considéré incomplet en cas de fausses couches, de

migrations hors de la zone d'étude, de pertues de vues (dernière visite gestationnelle non réalisée) ou de retraits de consentement.

La figure 7 récapitule les procédures de suivi et de collecte des données dans le cadre de notre thèse.



### Inclusion

#### ➤ **RECIPAL**

- Données sociodémographiques et économiques
- Caractéristiques du logement et de l'environnement
- Biens d'équipement du ménage
- Antécédents obstétricaux
- Anthropométrie de la femme (poids, taille...)
- Dépistage infection palustre (GE-FS/PCR)
- Dosage du taux d'Hb

#### Visites à domicile mensuelles

- Test urinaire de grossesse, DDR/aménorrhée
- Anthropométrie/3 mois
- Apports alimentaires (x2)

#### ➤ **EVALMOUS**

- Localisation GPS
- Données de possession, utilisation, intégrité physique de la MIILDA

### Visites EVALMOUS

- Données de possession, utilisation, intégrité physique de la MIILDA (visites début et fin du 1<sup>er</sup> trimestre)
- Données d'efficacité chimique des MIILDA (fin du 1<sup>er</sup> trimestre)

### CPN mensuelles RECIPAL

- Suivi clinique, nutritionnel...
- 5 échographies obstétricales (1<sup>ère</sup> entre 9 et 14 SA)
- Dépistage infection palustre (GE-FS/PCR)
- Dosage du taux d'Hb (CPN2&6)
- Dépistage du VIH (CPN1)

### Suivi passif (consultation d'urgence)

- TDR+/- GE si température  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  ou antécédent de fièvre (<24h)

### Accouchement

- Mère : dépistage infection palustre (GE-FS/PCR)
- Nouveau-né : anthropométrie (poids, taille, PC), dépistage infection palustre sang du cordon (GE-FS/PCR)
- Placenta : poids, infection palustre (Apposition-FS, PCR)

GE : Goutte épaisse

Hb : Hémoglobine

V : Visite de grossesse

TDR : Test de diagnostic rapide

PC : Périmètre crânien

FS : Frottis sanguin

DDR : Date des dernières règles

MIILDA : Moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action

Acc : Accouchement

PCR : Polymerase chain reaction

GPS : Global positioning system

SA : Semaine d'aménorrhée

**Figure 7: Procédures de suivi et de collecte de données des études RECIPAL et EVALMOUS**

Le Tableau 4 présente la comparaison des caractéristiques générales des femmes de l'étude EVALMOUS aux autres femmes de l'étude RECIPAL non incluses dans EVALMOUS. Les femmes des deux groupes étaient similaires pour quasiment toutes les caractéristiques sociodémographiques mais également pour le statut infectieux avant grossesse. Une différence est par contre notée au niveau ethnique. Une majorité des femmes d'ethnie « Toffin » ne sont pas incluses dans l'étude EVALMOUS (85%) en comparaison de celles incluses dans l'étude (65%). Cette différence peut s'expliquer par la taille de l'échantillon plus large des femmes de l'étude RECIPAL faisant suite à la durée plus longue de l'étude comparativement à l'étude EVALMOUS. Le recrutement a donc permis d'inclure un plus grand nombre de femmes, la majorité des femmes incluses vivant en zone lacustre et étant d'ethnie Toffin.

**Tableau 4: Comparaison des caractéristiques générales des femmes enceintes des études EVALMOUS et RECIPAL (N=411), 2014-2017, Bénin**

Caractéristiques		Femmes enceintes de l'étude RECIPAL incluses dans EVALMOUS (N=240)	Femmes enceintes de l'étude RECIPAL non incluses dans EVALMOUS (N=171)	p-value
		Moyenne (min-max) ou proportion (IC 95%)		
Age (années)		26,6 [26,0-27,4]	27 [26,1-27,8]	0,66
Gestité	≤ 3 grossesses	37,8 [30,6-45,5]	40,6 [33,4-48,2]	0,6
	> 3 grossesses	62,2 [54,5-69,3]	59,4 [51,8-66,6]	
Statut marital	Cohabitation	4,6 [1,9-7,2]	8,2 [4,9-13,5]	0,13
	Mariée	95,4 [91,2-98,0]	91,8 [86,5-95,1]	
Niveau d'éducation	Illettrée	67,1 [61,1-73,1]	75,9 [68,8-81,8]	0,19
	Lettree	32,9 [26,9-38,9]	24,1 [18,2-31,2]	
Ethnie	Toffin	65,0 [58,9-71,1]	84,7 [78,4-89,4]	0,01
	Autres <sup>a</sup>	35,0 [28,9-41,1]	15,3 [10,6-21,6]	
Infection palustre avant conception	Négative	73,0 [65,8-79,4]	65,9 [58,4-72,7]	0,17
	Submicroscopique	22,6 [16,7-29,7]	25,3 [19,3-32,4]	
	Microscopique	4,4 [1,7-7,1]	8,8 [5,4-14,2]	

Abréviations : N, effectif de femmes ; min, minimum ; max, maximum ; IC95%, Intervalle de confiance à 95% ; <sup>a</sup>, Autres groupes ethniques inclus (Fon, Aizo, Yoruba, Adja, Goun, Ahoussa, Mahi et Sahouè).

## 4.5. Techniques de laboratoire

### 4.5.1. Diagnostic microscopique de l'infection palustre

Le diagnostic microscopique s'est fait par goutte épaisse - frottis sanguin. La parasitémie microscopique a été quantifiée par la technique de Lambaréné qui consiste en la lecture de la totalité de l'étalement sanguin effectué à partir d'une goutte de volume calibré [163–165]. Cette technique a un seuil de détection estimé à 5 parasites/ $\mu$ l et a une sensibilité meilleure que celle de la goutte épaisse classique [163].

Au cours de l'étude, chaque lame a été lue par deux microscopistes qualifiés et indépendants. Les résultats des prélèvements étaient reportés en aveugle par chacun des microscopistes. Un microscopiste senior n'était sollicité qu'en cas de discordance entre les résultats des deux microscopistes.

### 4.5.2. Diagnostic submicroscopique de l'infection palustre

La détection des infections par *P. falciparum* a également été faite par une réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (qPCR) qui a ciblé le gène 18S de l'ADN ribosomial [166, 167].

### 4.5.3. Dosage du taux d'hémoglobine

Le taux d'hémoglobine était déterminé par une méthode photométrique à l'aide d'un hémoglobinomètre (HemoCue®) nécessitant 8-10  $\mu$ l de sang.

## 4.6. Gestion des événements morbides

Les événements morbides survenus chez les femmes enceintes étaient pris en charge par l'étude conformément aux recommandations du Ministère de la Santé du Bénin. Les cas de paludisme simple et d'anémie modérée (taux d'Hb entre 7 et 11 g/dl) étaient pris en charge au niveau des maternités de l'étude. Par contre, les cas de paludisme grave et d'anémie sévère (taux d'Hb < 7 g/dl) étaient référés vers l'hôpital de zone en première intention. En cas d'insuffisance du plateau technique à l'hôpital de zone ou d'événements morbides au cours de

l'étude RECIPAL, la référence des participantes se faisait vers les centres hospitalo-universitaires de Cotonou: la clinique universitaire de gynéco-obstétrique (CUGO) du centre national hospitalo-universitaire Hubert-Koutoukou-Manga (CNHU-HKM) et le centre hospitalo-universitaire (CHU-MEL). Tous les médicaments administrés pour le traitement des infections/affections détectées au cours de l'étude (paludisme, schistosomiase urinaire, infections sexuellement transmissibles, anémie), ainsi que les affections en relation avec la grossesse et survenues au cours du suivi ont été pris en charge financièrement par le projet.

A l'inclusion, pendant la période pré-conceptionnelle, les femmes infectées par *P. falciparum*, qu'elles soient symptomatiques ou non, ont été traitées par de l'artéméther-luméfantrine (96/480 mg) deux fois par jour pendant 3 jours. Les femmes anémiées (taux d'Hb < 120 g/L) ont reçu des comprimés de fer (200 mg) et d'acide folique (10 mg) deux fois par jour pour un traitement de 3 mois. Les femmes très dénutries (IMC <17 kg/m<sup>2</sup>) avant conception, ont bénéficié de conseils alimentaires, d'un monitoring mensuel du poids et ont été orientées vers des structures de référence pour un bilan étiologique.

Pendant la grossesse, en cas de paludisme non compliqué au 1<sup>er</sup> trimestre, les femmes étaient traitées avec de la quinine par voie orale (10 mg/kg/8 heures) pendant 7 jours. En dehors de la première prise, l'observance au traitement n'a pas été vérifiée. En cas de paludisme sévère, l'artésunate par voie intraveineuse a été utilisé jusqu'à ce que le traitement oral soit toléré (relais par les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine). Les infections aux 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres ont été traitées avec de l'artéméther-luméfantrine pendant 3 jours. Les femmes recevaient 200 mg de sulfate de fer, deux fois par jour pendant 3 mois en cas d'anémie modérée ou étaient référées vers un hôpital de référence en cas d'anémie sévère. Par ailleurs, selon les recommandations nationales, toutes les femmes ont reçu une supplémentation en fer (200 mg/jour) et en acide folique (5 mg/jour) jusqu'à l'accouchement pour prévenir l'anémie gestationnelle.

Le diagramme de flux de l'étude est présenté par la figure 8.

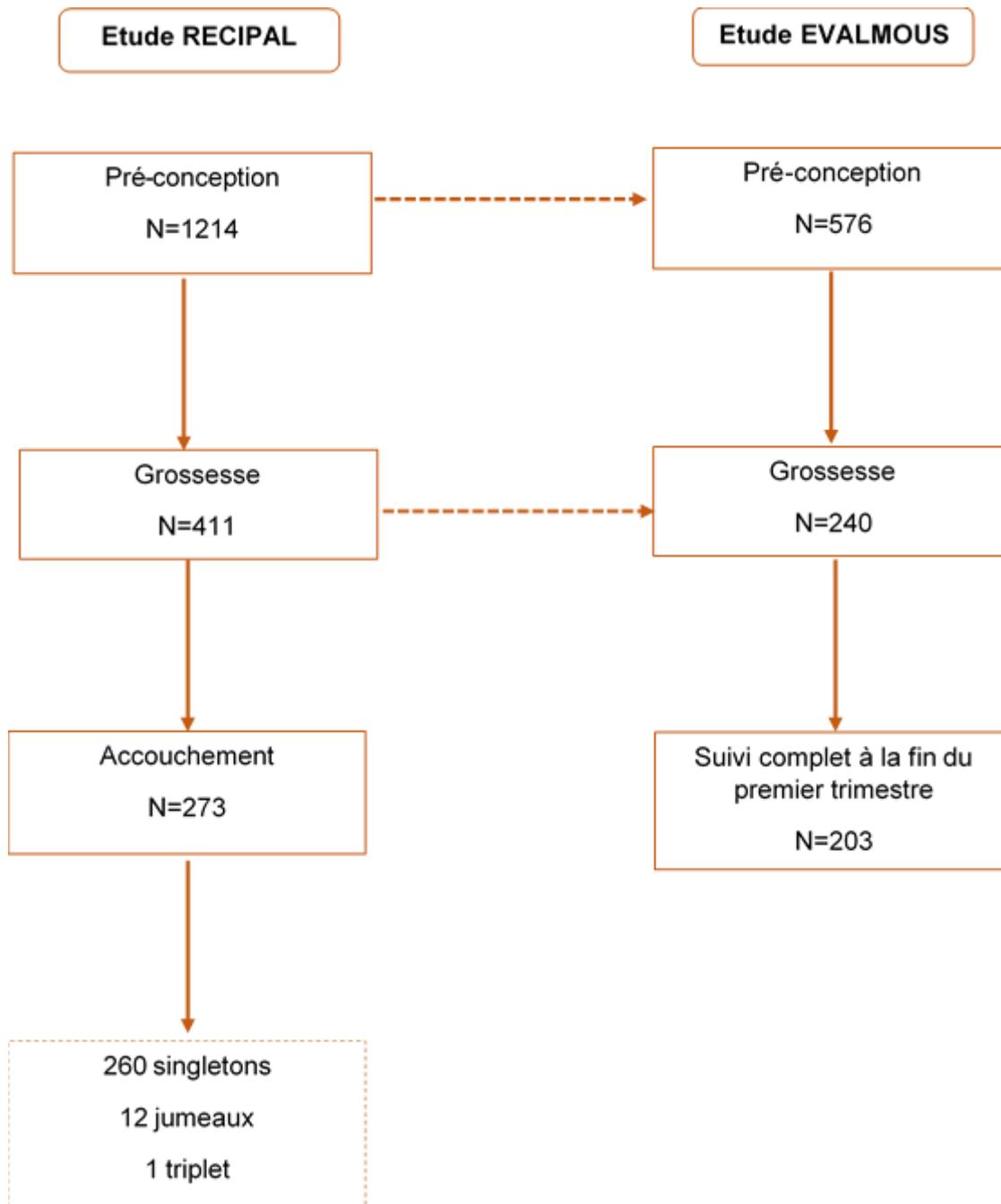


Figure 8: Diagramme de flux de l'étude

#### 4.7. Gestion des données

La gestion des données (base de données, saisie, monitoring et nettoyage) des femmes avant et pendant grossesse a été effectuée dans chaque étude par l'équipe de coordination de l'étude.

Les données ont été saisies sur le logiciel Access (Microsoft, version 2007) pour l'étude RECIPAL et pour l'étude EVALMOUS, une base de données a été créée sur le logiciel Epi Info.

Sur EVALMOUS, le médecin superviseur se chargeait de la vérification hebdomadaire des CRFs, comme sur RECIPAL, ainsi que de la double validation des données saisies avec l'établissement d'un rapport notant les différentes incohérences. Ce rapport permettait dès lors la correction des erreurs directement avec les agents enquêteurs.

#### **4.8. Analyses statistiques**

Un nettoyage de notre base de données brute a été réalisé. Nous avons ensuite créé toutes les variables nécessaires à nos analyses.

Notre variable d'intérêt était l'infection palustre qui a été définie comme suit :

Tout d'abord l'infection palustre était une variable ordinale à trois catégories (négative, submicroscopique ou microscopique). Elle a été définie à chaque visite réalisée et à chaque trimestre de grossesse ( $\leq 14$  SA, 15-27 SA, et  $\geq 28$  SA pour respectivement le premier, deuxième et troisième trimestre de grossesse) en nous basant sur les résultats des tests de diagnostics que sont la GEDP, le TDR et la PCR.

A chaque visite, l'infection était définie comme « négative » quand la GEDP ou le TDR et la PCR étaient négatifs. Elle était « submicroscopique » quand la GEDP ou le TDR était négatif et la PCR positive. Elle était « microscopique » quand la GEDP ou le TDR était positif.

A chaque trimestre, l'infection était « négative » quand la GEDP ou le TDR et la PCR étaient négatifs à toutes les visites du trimestre. L'infection était submicroscopique quand la GEDP ou le TDR était négatif et la PCR positive à au moins une visite du trimestre. Elle était microscopique quand la GEDP ou le TDR était positif à au moins une visite du trimestre.

Le nombre d'infections palustres était la somme de toutes les infections palustres (microscopiques et submicroscopiques) contractées par la femme pendant une période de la

grossesse. Le nombre d'infections palustres submicroscopiques était la somme des infections palustres submicroscopiques contractées par la femme pendant une période de la grossesse.

Une fois qu'une base de données propre a été obtenue, nous avons exécuté nos différentes analyses pour l'atteinte de nos objectifs. En premier lieu, nous avons à chaque fois réalisé une analyse descriptive de notre population d'étude avant de répondre aux différents objectifs. La description a porté sur les caractéristiques générales des femmes de l'étude à savoir les caractéristiques sociodémographiques, les caractéristiques liées à l'exposition de la femme (statut infectieux, utilisation des moyens de prévention contre le paludisme ...). Les variables qualitatives ont été estimées par des fréquences avec leur intervalle de confiance à 95% et les variables quantitatives par des moyennes avec les valeurs minimales et maximales. Le test de Chi2 et le t-test ont été utilisé pour comparer respectivement les proportions et les moyennes entre les différents groupes de femmes.

Pour l'analyse de nos données, nous avons mis en œuvre des modèles de régression adaptés à la question posée dans chaque article. Les tests d'hypothèses adaptés à chaque modèle de régression utilisé ont été réalisés. Ces modèles sont justifiés pour chaque article dans la partie « Discussion ». Nos analyses ont porté sur les 273 femmes enceintes qui ont accouché dans le cadre de l'étude RECIPAL. Nous avons d'abord testé en analyse univariée, la relation brute existant entre la variable d'intérêt liée à chaque article et les variables explicatives. Toutes les variables ayant une valeur p inférieure à 0,2 dans les analyses univariées ont été incluses dans les modèles multivariés. Dans nos analyses multivariées, un ajustement sur les variables explicatives définies est réalisé dans nos différents modèles de régression. Ensuite, nous avons utilisé une procédure de sélection pas-à-pas descendante et les variables ayant une valeur p inférieure à 0,1 ont été retenues dans les différents modèles multivariés finaux. La version 13 de Stata pour Windows (Stata Corp., College Station, TX) a été utilisée pour toutes les analyses statistiques.

#### **4.9. Aspects éthiques**

Les projets RECIPAL et EVALMOUS ont été approuvés par le comité éthique de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) de Cotonou et ont reçu la clairance éthique du comité consultatif de déontologie et d'éthique de l'IRD. Ainsi, deux types de consentements éclairés étaient signés, l'un dans le cadre du projet RECIPAL permettant le suivi des femmes avant et pendant la grossesse et l'autre dans le cadre du projet EVALMOUS pour le suivi des femmes et l'utilisation des MIILDA avant la grossesse et au premier trimestre de grossesse. Avant chaque inclusion, l'étude était expliquée à la participante, en français ou en langue locale (Toffin, Aizo, Fon) pour celles qui ne comprenaient pas le français. En cas d'accord de participation aux études, une notice d'information était remise à la femme et le consentement éclairé signé par la femme (ou par un témoin impartial en cas d'illettrisme) était recueilli. Une copie des documents était remise à la femme et l'autre conservée au niveau du site de l'étude. Pendant toute l'étude, le retrait de consentement des femmes de l'étude était volontaire et libre.

#### **4.10. Implication personnelle dans le projet**

Au cours de ma thèse, j'ai :

- Valorisé les résultats de mon master 2 portant sur EVALMOUS, que j'ai supervisé sur le terrain dans le cadre de mon stage de M2, par la rédaction et la publication d'un article scientifique;
- Réalisé un nettoyage des données de l'étude RECIPAL portant sur les infections submicroscopiques ;
- Construit ma base de travail ;
- Réalisé toutes les analyses statistiques pour répondre aux objectifs de la thèse;
- Rédigé deux articles scientifiques portant sur les infections submicroscopiques survenues au cours de l'étude RECIPAL.

L'ensemble de mon travail de thèse a été réalisé sous la supervision du Dr Gilles Cottrell et du Dr Michel Cot. Mon travail a été rendu possible grâce au soutien financier de l'école doctorale Pierre Louis de Santé Publique : Epidémiologie et Sciences de l'Information Biomédicale (ED393) par laquelle j'ai obtenu un contrat doctoral de 3 ans.

## *V. RESULTATS*

5.1. Article 1 : Hounkonnou CPA et al. Dynamics of Submicroscopic Plasmodium falciparum Infections Throughout Pregnancy: A Preconception Cohort Study in Benin. Clin Infect Dis. doi:10.1093/cid/ciz748.

5.1.1. Problématique de l'article

Les conséquences néfastes du paludisme gestationnel sur la santé maternelle et périnatale sont déjà connues depuis des décennies [20, 23–25]. Des études ont également montré l'association entre les infections microscopiques palustres survenant au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse et la survenue de mauvais indicateurs de santé maternelle et foétale comme l'anémie maternelle et le FPN [118, 119, 168]. Malgré cela, en 2018, environ 11 millions de femmes enceintes étaient encore exposées au paludisme en Afrique sub-saharienne (ASS) [169].

Par ailleurs, des méthodes de diagnostic moléculaire récentes (PCR) beaucoup plus sensibles que les méthodes usuelles (GE et TDR) révèlent une forte prévalence des infections à *P. falciparum* dites « submicroscopiques » en population générale [15] et plus précisément chez les femmes enceintes [18]. Ceci amène à porter un nouveau regard sur la proportion réelle des femmes considérées jusqu'alors comme « non infectées » par *P. falciparum*. En effet, ces infections submicroscopiques sont asymptomatiques et passent donc inaperçues lors des diagnostics classiques. Or, certaines études récentes suggèrent que la survenue précoce de ces infections au cours de la grossesse pourrait être également associées à des risques d'anémie maternelle et de FPN [18, 32, 33]. Ces infections prennent donc une importance majeure en santé publique.

L'objectif de cet article était d'étudier plus précisément la dynamique ainsi que les facteurs de risque des infections par *P. falciparum*, aussi bien submicroscopiques que microscopiques tout au long de la grossesse. La particularité de notre étude est l'accès aux femmes dès le

début de la grossesse donnant ainsi la possibilité d'étudier le 1<sup>er</sup> trimestre, période critique de la grossesse, cette période de la grossesse étant rarement étudiée en ASS.

## 5.1.2. Résumé et commentaire de l'article

### 5.1.2.1. Résultats

#### **Caractéristiques générales des femmes ayant accouché au cours de l'étude RECIPAL**

Les femmes étaient majoritairement jeunes avec une moyenne d'âge à 26,8 ans. La prévalence des infections submicroscopiques avant grossesse était de 24.9%. En moyenne, les femmes étaient vues à 7 SA pour leur première CPN, accouchaient à 39 SA et ont bénéficié d'environ 8.3 CPN durant le suivi. Environ 9 femmes sur 10 (97.8%) ont déclaré posséder une MIILDA, 9% d'entre elles étaient primigestes et les trois-quarts d'entre elles appartenaient à l'ethnie Toffin.

#### **Infections palustres durant le suivi et facteurs de risque**

La prévalence des infections submicroscopiques avant et à toutes les visites de la grossesse étaient environ deux fois supérieure à celle des infections microscopiques. Une plus forte proportion d'infections aussi bien microscopiques que submicroscopiques est observée au cours des premières CPN correspondant au premier trimestre de grossesse par rapport au reste de la grossesse. Nous avons noté l'existence d'une interaction de second ordre entre l'infection avant grossesse, l'âge maternel et le trimestre de grossesse. Comparées aux femmes âgées (>26 ans) sans infection avant grossesse, les jeunes femmes (<26ans) ayant contracté une infection palustre, submicroscopique ou microscopique, avant la grossesse sont plus à risque de développer une infection tout le long de la grossesse avec un risque plus élevé au premier trimestre et qui diminue au deuxième puis au troisième trimestre de grossesse.

### 5.1.2.2. Discussion

Nous avons décrit la dynamique des infections palustres chez les femmes enceintes de la cohorte RECIPAL. La description brute de la dynamique des infections chez la population à risque que sont les femmes enceintes est assez complexe. En effet, du fait de leur vulnérabilité, les femmes enceintes sont protégées par les MIILDA et le TPIg. L'existence de ces moyens de protection, jugés efficaces dans la lutte contre le paludisme, influe obligatoirement sur la dynamique des infections le long de la grossesse. L'influence du TPIg sur cette dynamique se reflète très bien sur la courbe de la dynamique des infections par visite avec une baisse conséquente des infections à partir du 2<sup>ème</sup> trimestre (moment théorique de début de prise du TPIg). Pour tenir compte de cet impact des MIILDA et du TPI sur la dynamique des infections palustres aux différents trimestres de grossesse, nous avons réalisé une analyse multivariée ajustée sur leurs utilisations par les femmes enceintes et d'autres co-variables d'ajustement.

Dans nos analyses, l'événement d'intérêt principal est l'infection palustre aux trois trimestres de grossesse. Un modèle de régression adapté pour tenir compte de cette dépendance potentielle des données est le modèle mixte.

Afin d'identifier l'effet propre de chaque variable explicative sur le statut infectieux de la femme, qui dans notre cas est ordonné (négatif, submicroscopique et microscopique), nous avons opté pour une régression logistique ordinale. Nous avons donc jugé pertinent de mettre en œuvre un modèle logistique ordinal mixte.

Le modèle de régression logistique ordinal (modèle classique) se base sur une hypothèse de risques proportionnels qui est restrictive lorsque l'hypothèse est violée. Il existe cependant une extension de ce modèle ne nécessitant pas la validation de l'hypothèse de risques proportionnels [170, 171].

Nous avons tout d'abord testé, par un test de Brant [171], l'hypothèse des risques proportionnels. L'hypothèse des risques proportionnels étant respectée, le modèle classique a été utilisé pour nos analyses.

La réalisation du modèle d'analyse a permis d'obtenir un odds-ratio par facteur d'ajustement.

Les résultats obtenus avec le modèle sont consignés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 5: Déterminants associés à la survenue d'une infection palustre trimestrielle, régression binomiale négative, N=273, RECIPAL 2014-2017, Bénin**

Variables	Infection palustre trimestrielle		
	ORa	IC 95%	pvalue
<26ans*pas d'infection palustre avant grossesse*trimestre1	1		0,005
<26ans*infection palustre submicroscopique avant grossesse*trimestre1	7,41	[2,71-20,23]	
<26ans*infection palustre microscopique avant grossesse*trimestre1	19,61	[4,47-85,94]	
<26ans*infection palustre microscopique avant grossesse*trimestre2	5,29	[1,01-27,58]	
<26ans*infection palustre submicroscopique avant grossesse*trimestre2	3,2	[0,82-12,38]	
Terme d'interaction au 2ème degré: âge*infection palustre avant grossesse* trimestre	<26ans*pas d'infection palustre avant grossesse*trimestre2	1,71	[0,70-4,17]
	<26ans*infection palustre submicroscopique avant grossesse*trimestre3	1,87	[0,52-6,75]
	<26ans*infection palustre microscopique avant grossesse*trimestre3	1,18	[0,24-5,81]
	<26ans*pas d'infection palustre avant grossesse*trimestre3	1,33	[0,48-3,70]
≥26ans*no malaria before pregnancy*trimestre1	0,98	[0,48-1,98]	
≥26ans*infection palustre submicroscopique avant grossesse*trimestre1	2,6	[1,04-6,52]	
≥26ans*infection palustre microscopique avant grossesse*trimestre1	0,43	[0,03-5,57]	

	≥26ans*infection palustre microscopique avant grossesse*trimestre2	2,39	[0,31-18,34]	
	≥26ans*infection palustre submicroscopique avant grossesse*trimestre2	2,14	[0,66-7,00]	
	≥26ans*pas d'infection palustre avant grossesse*trimestre2	1,48	[0,61-3,58]	
	≥26ans*infection palustre submicroscopique avant grossesse*trimestre3	1,25	[0,35-4,44]	
	≥26ans*infection palustre microscopique avant grossesse*trimestre3	4,5	[0,35-58,03]	
	≥26ans*pas d'infection palustre avant grossesse*trimestre3	1,5	[0,54-4,17]	
Nombre de doses de TPI	0	1		0,015
	1	0,63	[0,33-1,18]	
	2	0,32	[0,15-0,66]	
	3	0,38	[0,13-1,07]	
Infection palustre le trimestre précédent	Négative	1		0,002
	Submicroscopique	2,11	[1,14-3,90]	
	Microscopique	0,88	[0,31-2,47]	
Ethnie	Toffin	2,13	[1,29-3,52]	0,003

L'interprétation des résultats de ce modèle n'est pas aisée. En effet, L'OR obtenu met en contraste, pour un seuil donné de la variable à expliquer, le rapport des risques des catégories au-dessus du seuil versus les catégories inférieures de la variable d'intérêt.

Prenons l'exemple du nombre de doses de TPI pour interpréter les résultats obtenus avec ce modèle de régression. Les catégories de notre infection palustre trimestrielle (variable d'intérêt) sont « négative », « submicroscopique » et « microscopique », la catégorie « négative » étant la référence. L'interprétation se fera par exemple comme suit : Comparées aux femmes ayant eu 0 dose de TPI pendant la grossesse, celles ayant eu 2 doses ont 68% moins de risques de contracter une infection trimestrielle négative qu'une infection palustre trimestrielle submicroscopique ou microscopique combinée. L'hypothèse de proportionnalité des risques étant respectée, on dira également que comparées aux femmes ayant eu 0 dose de

TPI pendant la grossesse, celles ayant eu 2 doses ont 68% moins de risques de contracter une infection trimestrielle microscopique qu'une infection palustre trimestrielle négative ou submicroscopique combinée. Cependant, l'interprétation qui nous intéresse concerne l'OR de chaque classe unique notamment celle des infections submicroscopiques par rapport à la catégorie de référence (négative), et l'évaluation directe de l'effet propre de la prise de 2 doses de TPI sur la survenue des infections submicroscopiques par rapport à l'absence d'infection uniquement (catégorie de référence) est donc difficile. Ces ORa ne nous permettant pas d'atteindre notre objectif d'évaluer l'impact des facteurs de risque sur la dynamique propre des infections submicroscopiques, nous avons décidé de rendre ces résultats plus compréhensibles [172]. Pour cela, nous avons estimé les probabilités prédites, par notre modèle de régression, de survenue de l'infection palustre chez les femmes en fonction du statut infectieux submicroscopique avant grossesse et de leur âge.

La découverte d'un groupe à haut risque de survenue d'infections palustres pendant la grossesse avec un risque plus élevé au premier trimestre montre la nécessité de cibler les jeunes femmes en âge de procréer dans la lutte contre la maladie. Nous avons démontré la vulnérabilité des femmes au premier trimestre de grossesse. D'un point de vue de santé publique, cibler cette population de jeunes femmes en âge de procréer pour une stratégie préventive permettrait de réduire considérablement le fardeau de la maladie chez les personnes les plus vulnérables que sont les femmes enceintes et les nouveau-nés. Ces stratégies préventives devraient cibler la pré-grossesse mais également la grossesse notamment le 1<sup>er</sup> trimestre. En pré-grossesse, la vaccination des jeunes femmes en âge de procréer, si elle s'avère efficace, pourrait être une bonne stratégie [151, 153]. Le 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse devrait être couvert par une méthode préventive supplémentaire aux MIILDA pour une meilleure protection des femmes enceintes. La mise en place de telles stratégies devra passer par l'organisation de séances d'information et de sensibilisation mais également

l'adhésion du personnel de santé et de la population à ces stratégies. En effet, il faudrait pouvoir avoir accès aux jeunes femmes en pré-conception et également dès les tous premiers mois de la grossesse dans un contexte où la majorité des femmes ne consultent qu'à partir du 2<sup>ème</sup> trimestre de grossesse [123–126].

### 5.1.3. Hounkonnou *et al.*, Clinical Infectious Disease 2019

# Dynamics of Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infections Throughout Pregnancy: A Preconception Cohort Study in Benin

Cornélie P. A. Houkokoou,<sup>1,2,3</sup> Valérie Briand,<sup>1</sup> Nadine Fievet,<sup>1</sup> Manfred Accrombessi,<sup>2</sup> Emmanuel Yovo,<sup>4</sup> Alikalon Mama,<sup>4</sup> Darius Sossou,<sup>4</sup> Bertin Vianou,<sup>4</sup> Achille Massougbodji,<sup>4</sup> Nicaise Tékoué Ndam,<sup>1</sup> Michel Cot,<sup>1</sup> and Gilles Cottrel<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Université de Paris, Méso et enfant en milieu tropical: pathogènes, système de santé et transition épidémiologique, Institut de Recherche pour le Développement, and <sup>2</sup>Sorbonne Université, Université Pierre et Marie-Curie, Paris, France; <sup>3</sup>Institut de Recherche Clinique du Bénin, Abomey-Calavi, and <sup>4</sup>Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance (CERPAGE), Cotonou, Bénin

**Background.** In the context of global malaria elimination efforts, special attention is being paid to submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections. In pregnant, sub-Saharan African women, such infections are more prevalent than microscopic infections, and are thought to have adverse effects on both mothers' and newborns' health. However, no study has studied the dynamics and determinants of these infections throughout pregnancy. Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme (RECIPAL), a preconception cohort study carried out in Benin between 2014 and 2017, represented a unique opportunity to assess this issue.

**Methods.** We used data from 273 pregnant Beninese women who were followed-up from preconception to delivery. We studied the dynamics of and factors influencing submicroscopic (and microscopic) *P. falciparum* infections during the 3 trimesters of pregnancy, using an ordinal logistic mixed model.

**Results.** The incidence rate of submicroscopic *P. falciparum* infections during pregnancy was 12.7 per 100 person-months (95% confidence interval [CI] 10.8–14.9), compared to 6.7 per 100 person-months (95% CI 5.5–8.1) for microscopic infections. The prevalences were highest in the first trimester for both submicroscopic and microscopic infections. After adjustment for potential confounding factors, we found that those of young age and those with a submicroscopic *P. falciparum* infection prior to pregnancy were at significantly higher risks of submicroscopic and microscopic infections throughout pregnancy, with a more pronounced effect in the first trimester of pregnancy.

**Conclusions.** The first trimester of pregnancy is a particularly high-risk period for *P. falciparum* infection during pregnancy, especially for the youngest women. Malaria prevention tools covering the preconception period and early pregnancy are urgently needed to better protect pregnant women and their newborns.

**Keywords.** dynamic; submicroscopic *P. falciparum* infections; pregnancy; preconception cohort; sub-Saharan Africa.

Approximately 30 million pregnant women are exposed to malaria every year [1, 2] in sub-Saharan Africa. Many studies have highlighted the impact of malaria in pregnancy (MiP), with adverse consequences such as maternal anemia, prematurity, and low birth weight [3–6] associated with a high risk of maternal and infant mortality [7]. To protect women against MiP, the World Health Organization recommends different strategies, such as intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp) with sulfadoxine-pyrimethamine and insecticide-treated nets, which have led to substantial improvements in birth outcomes [8–10] and reductions of malaria-related mortality and morbidity rates

[11]. However, these policies remain suboptimal, in particular because the first trimester of pregnancy currently remains unprotected for different reasons. Firstly, IPTp with sulfadoxine-pyrimethamine is contraindicated in the first trimester due to possible teratogenic effects [12]. Secondly, in sub-Saharan Africa, pregnant women habitually attend their first antenatal consultation only in the second trimester [13, 14]. Therefore, little is known about the actual infection risk during the first trimester, which is likely an under-protected period [15, 16]. This is critical, since malaria in early pregnancy has been shown to be associated with deleterious pregnancy outcomes [17–19].

Moreover, in the last decade, several studies have revealed a high prevalence of carriage of submicroscopic infections, detected by polymerase chain reaction (PCR)-based molecular methods that are more sensitive than the standard malaria detection tools, and shedding new light on the real prevalence of malaria infections [20], especially in pregnant women [21]. In addition, such submicroscopic infections—especially those occurring early in pregnancy [21] are suspected to adversely affect women's and newborns' health [21–23], but are nevertheless

Received 3 June 2019; editorial decision 10 July 2019; accepted 5 August 2019; published online XXXX XX, XXXX.

Correspondence: G. Cottrel, IRD Cotonou, 08 BP 841 Cotonou, Bénin (gilles.cottrel@ird.fr).

**Clinical Infectious Diseases**® 2019;XX(XX):1–9  
 © The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com  
 DOI: 10.1093/cid/ciz748

usually asymptomatic and, thus, remain untreated during pregnancy.

The Retard de Croissance Intra-uterin et Paludisme (RECIPAL) study, a cohort study of malaria in pregnant women followed-up from preconception to delivery in Benin, was a unique opportunity to assess the dynamics and determinants of submicroscopic (and microscopic) infections throughout pregnancy, particularly in the first trimester.

## METHODS

### Study Design

RECIPAL is a preconception cohort study that assessed the effects of malaria infection (microscopic and submicroscopic) during pregnancy on the mother and the fetus. The study design has been described elsewhere [15]. Briefly, it was conducted in southern Benin from June 2014 to August 2017. A total of 1214 women of reproductive age (WRA) were recruited (primary cohort). The subsample of women who became pregnant was then followed-up monthly in the study's health facilities throughout pregnancy, until delivery (secondary cohort). During the study, infections with *Plasmodium falciparum* were detected by both thick blood smears (TBSs) and PCRs. Only infected women (detected by TBS and rapid diagnostic test [RDT], when applicable) were treated. PCRs were performed later. The project provided all treatments given for any infection occurring during pregnancy [24].

### Preconception Follow-up: Primary Cohort

The study was introduced to the local authorities and various approaches were used to recruit WRA, including repeated awareness sessions, participation of the community's leaders, and door-to-door recruitment. Another study (Clinical development of a VAR2CSA-based Placental Malaria Vaccine [PlacMaVac]), which concerned the development of a Variant surface antigen 2 chondroitin sulfate A-based vaccine against placental malaria, was implemented in the same area and included exclusively primigravidae [25]. The women enrolled in the vaccine-related study were no longer eligible for RECIPAL.

At enrollment, demographics, socioeconomic characteristics, and reproductive histories were collected and all women were screened for malaria. Women were visited at home monthly to record the first day of the last menstrual period and a urinary pregnancy test was performed on all women who did not have a until pregnancy was confirmed with a maximum of 24 months.

### Gestational Follow-up: Secondary Cohort

Once the pregnancy was confirmed, the women were followed-up monthly until delivery. Clinical, obstetrical, and anthropometric data, as well as malaria infection screening data, were collected. A gestational age (GA) estimation was based either on the last menstrual period or first ultrasound scan [26]. A TBS and an RDT were performed in the case of a fever or malaria-like symptoms. According to recommendations in Benin (at least 2 doses during pregnancy), IPTp was given from the second trimester.

### Laboratory Procedures

*P. falciparum* was (1) quantified by the Lambaréné technique, with a detection threshold estimated at 5 parasites/ $\mu$ L [24, 27]; and (2) tested by real-time quantitative PCR that targeted the 18S ribosomal ribonucleic acid gene [28, 29]. A negative control with no DNA template was run in all reactions. The RDT used was the Pf + pan rapid test (SD Bioline Ag, IDA Foundation; BioSynex) [15].

### Ethics Statement

The Ethics Committee of the Institut des Sciences Biomédicales Appliquées approved this study, as did the Ministry of Health in Benin. Before any enrollment, the study was explained in the local language to the woman, and her freely given consent was obtained.

### Statistical Analysis

Our main objective was to study the dynamics and the determinants of submicroscopic (as well as microscopic) *P. falciparum* infections during pregnancy, with a particular focus on the first trimester.

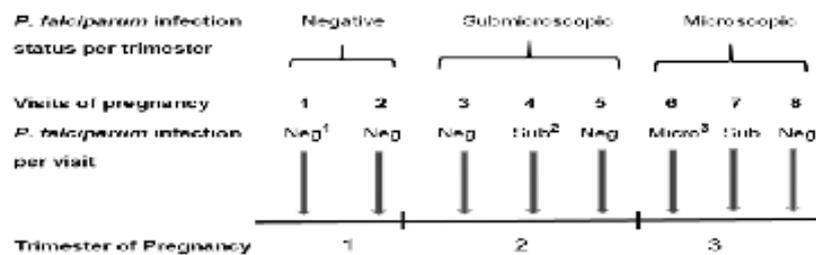
Our analysis sample was the 273 women followed-up from preconception until delivery, allowing for the definition of their *P. falciparum* infection status during the 3 trimesters of pregnancy.

Our dependent variable was a time-dependent, ordinal variable with 3 classes (negative, submicroscopic, and microscopic infection status), summarizing the *P. falciparum* infection status of the woman in each trimester. This variable was built in 2 steps. First, at each visit, the *P. falciparum* infection was defined as negative if all tests (TBS, PCR, and RDT, when applicable) were negative; as a submicroscopic infection if the TBS (and RDT, when applicable) was negative but the PCR was positive; and as a microscopic infection if the TBS or RDT (when applicable) was positive whatever the PCR was positive or negative.

Second, in each trimester, the *P. falciparum* infection status was defined as the sum of *P. falciparum* infections during the visits of the trimester. Thus, for a given trimester, the *P. falciparum* infection status of a woman was either:

1. Negative (no *P. falciparum* infection), if the woman was diagnosed as negative at all visits during the trimester;
2. A submicroscopic *P. falciparum* infection, if the woman was diagnosed as having a submicroscopic infection during at least 1 visit and was not diagnosed as having a microscopic infection at any visit during the trimester; or
3. A microscopic *P. falciparum* infection, if the woman was diagnosed as having a microscopic infection during at least 1 visit during the trimester.

An example is shown (Figure 1) of a hypothetical pregnant woman who would have attended 8 visits during the 3 trimesters.



**Figure 1.** Construction of the *Plasmodium falciparum* infection status per trimester variable, in a hypothetical pregnant woman who would have attended 2 visits in the first trimester, 3 visits in the second trimester, and 3 visits in the third trimester. If at the 2 visits in the first trimester the woman was diagnosed as negative, in the second trimester she was diagnosed as negative/submicroscopic/negative, and at least at 1 of the 3 visits in the third trimester she was diagnosed as microscopic, she was therefore classified, respectively, as having a negative infection status, submicroscopic infection status, and microscopic infection status for the first, second and third trimesters. Abbreviations: Micro, microscopic *P. falciparum* infection at the visit; Neg, no *P. falciparum* infection (negative) at the visit; Sub, submicroscopic *P. falciparum* infection at the visit.

As explanatory variables, we considered sociodemographic characteristics, including maternal age (2 classes, according to the median of our sample: 26 years old), marital status, residence area, ethnicity, and education level. We also considered clinical characteristics, including the presence of a *P. falciparum* infection before pregnancy (ie, at inclusion in the primary cohort; negative, submicroscopic, microscopic); gravidity; number of IPTp doses during pregnancy until the current trimester (time-dependent variable varying according to the trimester); trimesters of pregnancy ( $\leq 14$  weeks of gestation [wg], 15–27 wg, and  $\geq 28$  wg for the first, second, and third trimesters, respectively); *P. falciparum* infection status from the previous trimester (set to negative for the first trimester); and season at delivery.

#### Statistical Model

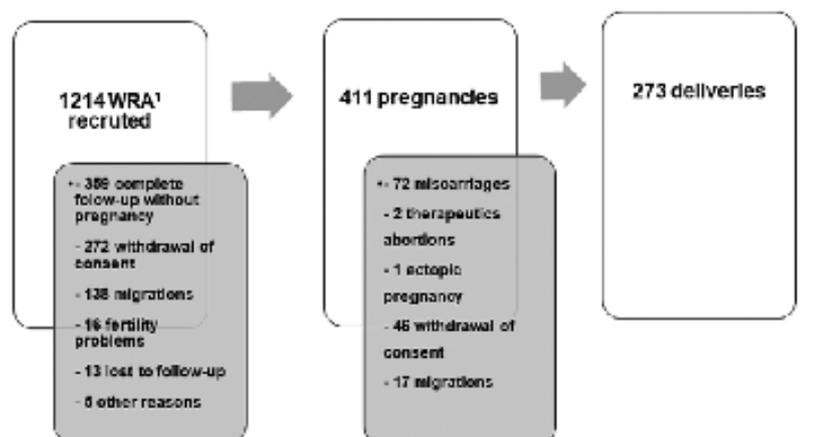
Since our dependent variable was a repeated (at the 3 trimesters) ordinal variable, we performed a classic, ordinal, logistic, mixed model to assess the determinants of *P. falciparum* infection

status' dynamics according to the trimesters of pregnancy. The hypothesis of the parallel lines was tested and was not violated for any covariate. The variables for which the *P* values were less than 0.20 in a univariate analysis were introduced in the multivariate model.

A preliminary analysis showed a possible interaction between having a *P. falciparum* infection before pregnancy and maternal age, which depended on the trimester of pregnancy. For this reason, we introduced in our model a second-order interaction term between *P. falciparum* infections before pregnancy, maternal age, and trimester.

We performed a step-by-step backward selection to eliminate the nonsignificant, independent variables introduced in the initial multivariate model. The variables for which the *P* values were less than 0.05 were retained in the final multivariate model.

In an ordinal logistic mixed model, the estimated odds ratios are cumulative, and then do not allow for a comparison of the risk of a submicroscopic (or microscopic) infection status



**Figure 2.** Flow chart of Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme (RECIPAL) study, June 2014–August 2017, Benin. Abbreviation: WRA, women of reproductive age.

versus a negative status according to the covariates. Therefore, we derived from the model the predicted probabilities (risk) of a *P. falciparum* infection status according to the submicroscopic infection status before pregnancy and maternal age.

Stata version 13 for Windows (Stata Corp., College Station, TX) was used for all statistical analyses.

## RESULTS

During follow-up (Figure 2), 1214 WRA were included. Among them, 411 women (33.8%) became pregnant and 273 (66.4%) delivered with a complete follow-up. We compared the 138 lost to follow-up and the 273 pregnant women included in our analysis according to maternal age, gestational rank, and *P. falciparum* infection status before pregnancy, and found no significant difference (Supplementary Table 1). Out of the 138 pregnant women lost to follow-up, the main causes were miscarriages (52.17%) and withdrawals of consent (33.33%).

### Pregnant Women's Characteristics and Malaria Infection During the Follow-up

Table 1 presents the general characteristics of the pregnant women. More than three-quarters of the women were under 30 years of age, and 8.8% of them were primigravidae. The first antenatal consultation occurred, on average, at 7.1 wg and the mean GA at delivery was 39.2 wg. The majority of pregnant women (74.3%) belonged to the Toffin ethnic group. Almost 1 in 4 women (24.9%) were carrying submicroscopic *P. falciparum* infections before pregnancy. All but 10 women received at least 1 dose of IPTp during the follow-up. Out of the 263 pregnant women who received IPTp, the average GA at the first intake of IPTp was at 23 wg  $\pm$  5 wg.

Figure 3 shows the evolution of submicroscopic and microscopic *P. falciparum* infections from preconception to delivery in the study. At each visit, the proportion of submicroscopic *P. falciparum* infections was higher than the proportion of microscopic *P. falciparum* infections. Both submicroscopic and microscopic *P. falciparum* infections were at their highest level during the first trimester. The overall incidence rates of submicroscopic and microscopic *P. falciparum* infections during pregnancy were 12.7 (95% confidence interval [CI] 10.8–14.9) and 6.7 (95% CI 5.5–8.1) per 100 persons-months, respectively.

Figure 4 shows the proportions of women with microscopic and submicroscopic infections at each trimester. The proportion with submicroscopic infections was always higher than the proportion with microscopic infections (29.2% vs 20.2% for the first trimester, respectively; 29.1% vs 17.3% for the second trimester, respectively; and 20.5% vs 17.2% for the third trimester, respectively).

### Factors Contributing to the *Plasmodium falciparum* Infection Dynamics

In the final multivariate model, the statistically significant factors contributing to *P. falciparum* infection status

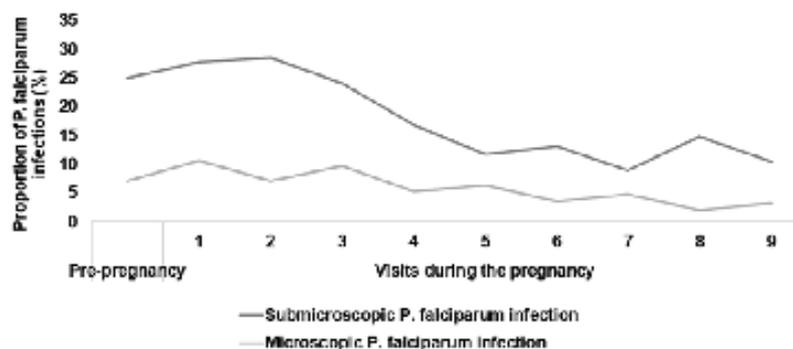
**Table 1. General Characteristics of the Pregnant Women Followed-up Until Delivery in the Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme (RECIPAL) Study, N = 273, Benin, 2014–2017**

Characteristics	Total	Mean $\pm$ SD or proportion (95% CI)
Age, years	273	26.8 $\pm$ 4.9
<23	66	20.1 (16.8–26.4)
23–30	166	60.4 (54.5–66.1)
>30	63	19.4 (16.1–24.6)
Gestational age at the first ANC, wg	273	7.1 $\pm$ 2.5
ITN possession	267	97.8 (96.2–99.0)
Gravidity	273	...
Primigravida	24	8.8 (5.9–12.8)
Secondigravida	40	14.6 (10.9–19.4)
Multigravida	209	76.6 (71.1–81.2)
Ethnic group, n	273	
Toffin	203	74.35 (68.6–77.2)
Fon	21	7.7 (6.0–11.6)
Atzo	39	14.28 (12.0–16.5)
Others	10	3.7 (1.5–6.8)
Education level, n	273	
Illiterate	196	71.4 (66.7–76.5)
Literate	78	28.6 (23.5–34.2)
Professional status, n	273	
Active	261	95.6 (92.4–97.5)
Not active	8	2.9 (1.5–5.8)
In training	4	1.5 (0.5–3.9)
Marital status, n	273	
Cohabitation	18	6.6 (4.2–10.2)
Married	255	93.4 (89.7–95.8)
<i>P. falciparum</i> infection before pregnancy, n	273	
Negative	188	68.9 (63.1–74.1)
Submicroscopic	68	24.9 (20.1–30.4)
Microscopic	17	6.2 (3.9–9.8)
Gestational age at delivery, wg	273	39.2 $\pm$ 2.2
Number of ANC visits (scheduled and unscheduled) during pregnancy	273	8.3 $\pm$ 1.3
Number of IPTp doses	273	
0	10	3.7 (2.0–6.7)
1	64	19.8 (15.4–25.0)
2	171	62.6 (58.7–68.2)
3	38	13.9 (10.3–18.6)

Abbreviations: ANC, antenatal consultation; CI, confidence interval; IPTp, intermittent preventive treatment in pregnancy; ITN, insecticide-treated nets; *P. falciparum*, *Plasmodium falciparum*; SD, standard deviation; wg, weeks of gestation.

(submicroscopic and microscopic) dynamics were ethnicity ( $P = .04$ ), cumulative number of IPTp doses ( $P = .01$ ), and submicroscopic *P. falciparum* infection status for the previous trimester ( $P < .001$ ). In addition, the second-order interaction term between maternal age, *P. falciparum* infection status before pregnancy, and trimester was also significant ( $P < .001$ ).

The predicted probabilities of having a *P. falciparum* infection according to maternal age and having a *P. falciparum* infection before pregnancy were performed (only the results regarding the submicroscopic infection class are shown, in Figures 5 and



**Figure 3.** Dynamics of *Plasmodium falciparum* infections before and during pregnancy, Retard de Croissance Intra-uterin et Paludisme (RECIPAL) 2014–2017, Benin.

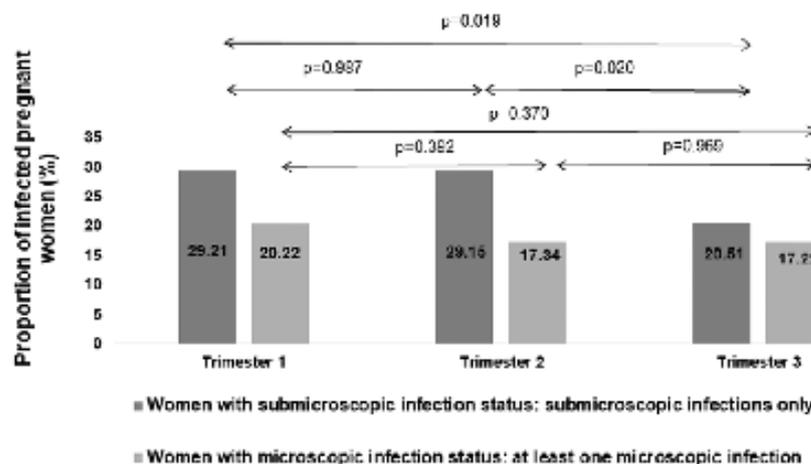
6). Figures 5 and 6 show, respectively, the predicted probabilities of having submicroscopic and microscopic infections for each trimester. Younger women with a submicroscopic *P. falciparum* infection before conception had the highest probability of harboring a submicroscopic or microscopic *P. falciparum* infection throughout pregnancy. More specifically, this interaction between age and infection status before pregnancy was significant at each trimester. The highest risk was found in young women with a submicroscopic infection before pregnancy at each trimester, and this risk was higher in the first and second trimesters, compared to the third trimester.

#### DISCUSSION

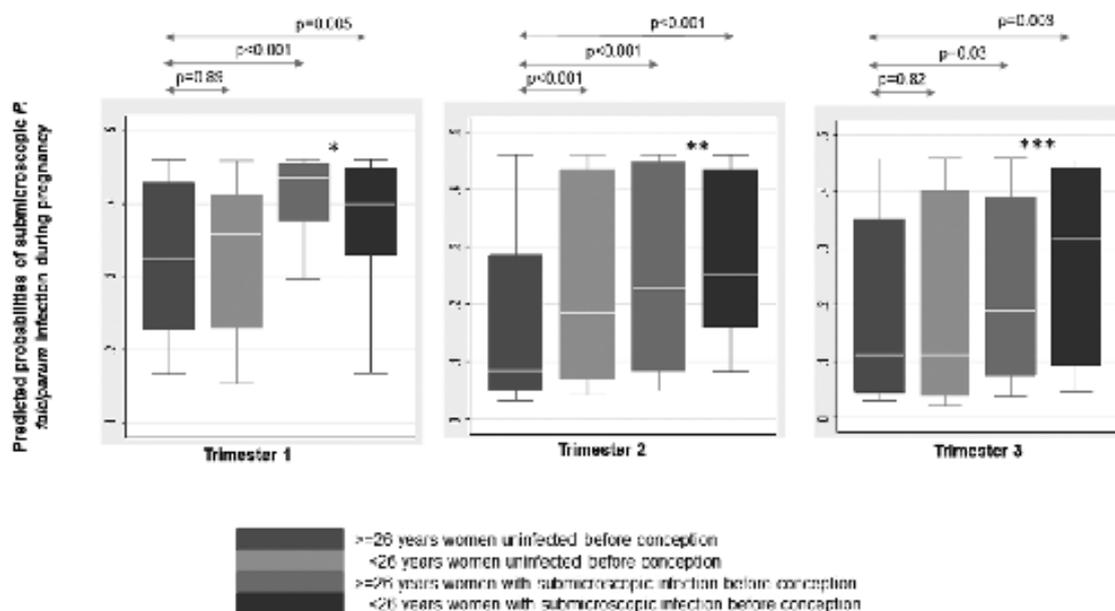
To our knowledge, RECIPAL is the first longitudinal study of malaria in sub-Saharan Africa to follow women from pre-conception right through to delivery. This was an excellent

opportunity to study the dynamics of submicroscopic (as well as microscopic) *P. falciparum* infections and their determinants throughout pregnancy, starting from the first trimester. We observed that the proportions of women with submicroscopic *P. falciparum* infections were consistently higher than those of women with microscopic *P. falciparum* infections during pregnancy, with a cumulative incidence rate for submicroscopic infections that was twice that of microscopic infections. This is consistent with several other studies in pregnant women [21, 30–32]. In addition to this confirmation of previous findings, the study revealed that the proportion of infected women was highest in the first trimester.

We also found that being a young age and having a submicroscopic infection prior to pregnancy were associated with increased risks of both submicroscopic and microscopic infections in the different trimesters of pregnancy. The first result



**Figure 4.** Proportion of women with submicroscopic and microscopic infection status in each trimester of pregnancy, Retard de Croissance Intra-uterin et Paludisme (RECIPAL) 2014–2017, Benin. P values are from Chi-square tests.



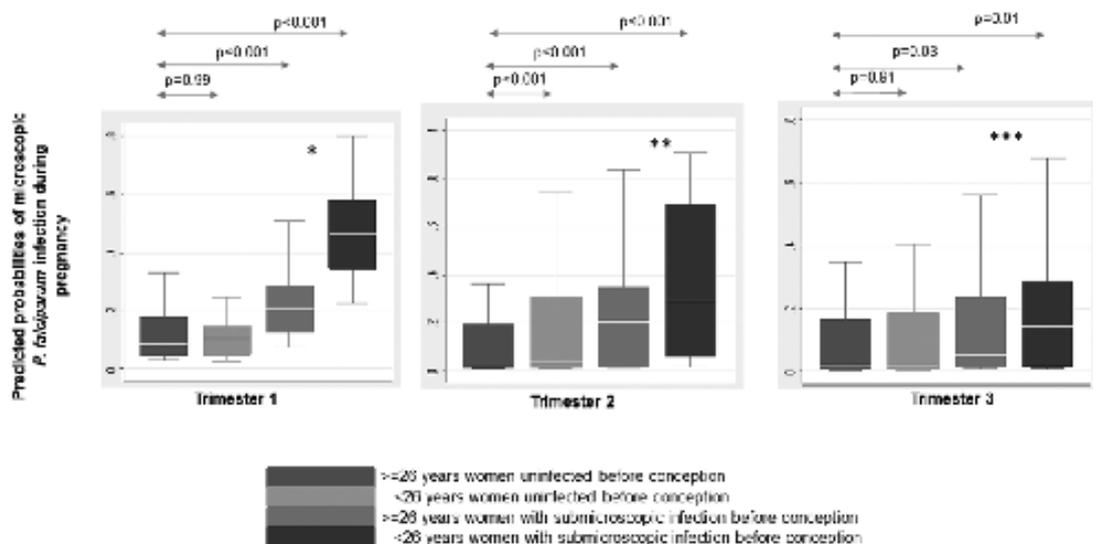
**Figure 5.** Predicted probabilities from the ordinal logistic mixed model of the occurrences of submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections per trimester, according to maternal age and presence of submicroscopic *P. falciparum* infection before conception (Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme [RECIPAL] 2014–2017, Benin). P-values correspond to the F-test comparisons. \*Indicates a F-test comparison between the predicted probabilities of having a submicroscopic *P. falciparum* infection at the first trimester of pregnancy for the youngest women (Pvalue = .1069). \*\*Indicates a F-test comparison between the predicted probabilities of having a submicroscopic *P. falciparum* infection at the second trimester of pregnancy for the youngest women (Pvalue = .5212). \*\*\*Indicates a F-test comparison between the predicted probabilities of having a submicroscopic *P. falciparum* infection at the third trimester of pregnancy for the youngest women (Pvalue = .3554).

is well known. Indeed, possible explanations could be that (1) younger women, in which primi- and secondgravidae are overrepresented [25], have low or no immunity to the relevant parasite antigens, compared to the older group [12, 33–35]; and (2) women exhibited different behavior, with respect to malaria prevention tools during pregnancy (the use of bed nets, for example), in relation to age. To our knowledge, the relationship between having a submicroscopic infection before pregnancy and the risk of infection during pregnancy has never been shown. This extends preliminary results of the RECIPAL study on microscopic infections [36] that showed that women infected before pregnancy were more at risk of having an infection in the first trimester. This finding is important in public health terms, since it suggests that the preconception period should be considered as a vulnerable period, just as much as pregnancy itself. A recent study that was conducted on another subset of primigravidae [25] in the same area showed that infections occurring during the first trimester were predominantly (70%) composed of persistent *P. falciparum* genotypes that were contracted before pregnancy. This seems to confirm that infections, even at a submicroscopic level (and then untreated, as most probably not accompanied by symptoms), that have occurred before pregnancy may persist until (at least) the early stage of pregnancy [36], and then be a source of infection during the first trimester.

Additionally, a more thorough analysis showed (1) an interaction between those 2 factors (young age and *P. falciparum* infection status before pregnancy); and (2) a different impact of the interaction itself, depending on the trimester of pregnancy. Overall, the effects of these factors and their interactions were found to be highest in the first trimester, and then to gradually decrease in the second and third trimesters. Specifically, the youngest women with submicroscopic infections before pregnancy remained at significantly higher risks of *P. falciparum* infection (both submicroscopic and microscopic) during all 3 trimesters, compared to the oldest women with no infection before pregnancy.

Whereas the importance of *P. falciparum* infections (submicroscopic and microscopic) during pregnancy was already known [15, 21–23, 31], we found that the first trimester was a period of a higher prevalence of *P. falciparum* infections than the rest of pregnancy. Due to the critical importance of *P. falciparum* infections on early pregnancy [3, 16–18, 37] aggravated by the suboptimal protection of pregnant women during this period, this result highlights the excess risks faced by pregnant women and, therefore, the necessity of improved protection in this period.

As expected, we found a significant impact of the number of IPTp doses on the risk of having a *P. falciparum* infection.



**Figure 6.** Predicted probabilities from the ordinal logistic mixed model of the occurrence of microscopic *Plasmodium falciparum* infections per trimester, according to maternal age and presence of submicroscopic *P. falciparum* infection before conception (Fetard de Croissance Intra-uterin et Paludisme [RECIPAL] 2014–2017, Benin). *P* values correspond to the *F*-test comparisons. \*Indicates a *F*-test comparison between the predicted probabilities of having a microscopic *P. falciparum* infection at the first trimester of pregnancy for the youngest women (*P*value < .0001). \*\*Indicates a *F*-test comparison between the predicted probabilities of having a microscopic *P. falciparum* infection at the second trimester of pregnancy for the youngest women (*P*value = .0810). \*\*\*Indicates a *F*-test comparison between the predicted probabilities of having a microscopic *P. falciparum* infection at the third trimester of pregnancy for the youngest women (*P*value = .5404).

The proportions of women with microscopic and submicroscopic infections decreased after the first trimester, and the minimum was reached in the third trimester. Nevertheless, we observed a consistently higher proportion of submicroscopic, *P. falciparum* infections, and the proportion of women with a submicroscopic infection remained non-negligible throughout pregnancy. In this study, more than three-quarters of the women received at least 2 doses of IPTp (only 14% had 3 doses), which is higher than the coverage reported in Benin [38] and Africa [11], probably due to the monthly follow-up.

We also found that ethnicity was associated with a woman's *P. falciparum* infection status. This could be related to a higher exposure to *Anopheles* by the Toffin, who are located in the lake area that is more favorable for transmission of the parasite. A woman with a submicroscopic infection at a given trimester (first or second) was also significantly more susceptible to infection (submicroscopic/microscopic infection) in the next trimester. This suggests that infections frequently persist during pregnancy.

Overall, the results highlight the particular role of submicroscopic infections in the dynamics and persistence of *P. falciparum* infections during pregnancy.

Our study has some limitations. First, the relatively high number of those lost to follow-up during pregnancy (mainly

because of miscarriages, migrations, and withdrawal of consent due to some refusals of blood and/or placental sampling [39]). This could lead to a selection bias. However, a comparison of those lost to follow-up and our analysis sample showed no significant differences. Additionally, the proportion of primigravidae was low, compared to the proportions in other African malaria studies (8.79% vs the 15–25% usually mentioned) [21, 30, 31]. This could be explained by the PlacMalVac vaccine-related study, which was conducted simultaneously in the same area and included exclusively primigravidae [25]. This underrepresentation of primigravidae may have led to a lack of power and may explain why the primigravid group did not show significant differences with multigravidae, but is unlikely to have impacted our results to a large degree.

In conclusion, the RECIPAL study allowed us to study the complete dynamics of submicroscopic (as well as microscopic) infections throughout pregnancy, with a particular focus on the first trimester. It also made it possible to evaluate various factors contributing to these dynamics, and their complex interactions. We demonstrated for the first time the existence of a large reservoir of submicroscopic infections in the first trimester, starting from the very beginning of pregnancy. This is of public health importance, since infections in early pregnancy are known to be associated with serious pregnancy outcomes. In addition, our results seem to confirm

the link between submicroscopic infections before conception and infections occurring both in early pregnancy and throughout pregnancy. Finally, we found that the youngest women with submicroscopic infections before pregnancy were a particularly high-risk group for infection not only in the first trimester, but also in the rest of pregnancy. Hence, focusing on research concerning preconception prevention strategies is paramount, including the development of a vaccine for nulligravidae [40], to protect women/fetuses against the damaging consequences of MiP.

### Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Clinical Infectious Diseases* online. Constituting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyrighted and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

### Notes

**Author contributions.** N. T. N., M. C., and G. C. contributed equally to this work. V. B. was the principal investigator. A. Massougbodji, M. C., and V. B. conceived of and designed the study. M. A., E. Y., N. E., D. S., B. V., and V. B. collected the data. C. P. A. H. and G. C. conducted the statistical analyses. C. P. A. H., V. B., M. C., and G. C. wrote the manuscript. N. T. N., A. Mama, D. S., B. V., and N. E. conducted the biology and molecular analyses. All authors read and approved the final manuscript.

**Acknowledgments.** The authors thank all the pregnant women and their families who participated in the Retard de Croissance Intra-uterin et Paludisme (RECIPAL) study; the health center and field workers; the local authorities of Sô-Ava and Akassato Districts; the RECIPAL team, including researchers, engineers, technicians, and managers; the Sorbonne Université for PhD scholarship of C. P. A. H.; the doctoral network of École des Hautes Études en Santé Publique; and Mr. Adrian J. E. Luty for proofreading the article before submission.

**Financial support.** This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (grant number ANR-13-JSV1-0004) and the Fondation Simone Beer, under the auspices of the Fondation de France (grant number 00074147).

**Potential conflicts of interest.** No conflict declared. All authors report no potential conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

### References

- World Health Organization. Des vies en danger: le paludisme pendant la grossesse. Available at: <https://www.who.int/fr/actualites/2003/04b/07/>. Accessed 13 March 2019.
- Dellouour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, Kafle PO, et al. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. *PLOS Med* 2010; 7:e1000221.
- Cottrell G, Mary JY, Barro D, Cot M. The importance of the period of malarial infection during pregnancy on birth weight in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76:849–54.
- Schantz-Dunn J, Nour NM. Malaria and pregnancy: a global health perspective. *Rev Obstet Gynecol* 2009; 2:186–92.
- Ayoola OO, Whalmore A, Balogun WO, Jarrett OO, Cruickshank JK, Clayton PE. Maternal malaria status and metabolic profiles in pregnancy and in cord blood: relationships with birth size in Nigerian infants. *Malar J* 2012; 11:75.
- Huyh BT, Cottrell G, Cot M, Briand V. Burden of malaria in early pregnancy: a neglected problem? *Clin Infect Dis* 2015; 60:598–604.
- Cuyati HJ, Snow RW. The epidemiology and burden of *Plasmodium falciparum*-related anaemia among pregnant women in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64:36–44.
- Briand V, Cottrell G, Massougbodji A, Cot M. Intermittent preventive treatment for the prevention of malaria during pregnancy in high transmission areas. *Malar J* 2007; 6:160.

- Lengder C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; CD000363. doi:10.1002/14651858.CD000363.pub2
- Gamble C, Elowaru PJ, Garner P, ter Kuile FO. Insecticide-treated nets for the prevention of malaria in pregnancy: a systematic review of randomised controlled trials. *PLOS Med* 2007; 4:e107.
- World Health Organization. *Point(s) essentiels: Rapport sur le paludisme dans le monde 2017*. Available at: <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/fr/>. Accessed 13 March 2019.
- Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:93–104.
- Oudraogo S, Koura GK, Accrombessi MM, Bodeau-Livinec F, Massougbodji A, Cot M. Maternal anaemia at first antenatal visit: prevalence and risk factors in a malaria-endemic area in Benin. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87:418–24.
- Mkandawire P, Alari O, Kangmenang J, Arku G, Lughaah I, Bowa J. Pregnancy intention and gestational age at first antenatal care (ANC) visit in Rwanda. *Midwifery* 2019; 68:30–8.
- Accrombessi M, Yovo E, Cottrell G, et al. Cohort profile: effect of malaria in early pregnancy on fetal growth in Benin (RECIPAL preconceptional cohort). *BMJ Open* 2018; 8:e019014.
- Houkonnou C, Djénontin A, Eghtola S, et al. Impact of the use and efficacy of long-lasting insecticidal net on malaria infection during the first trimester of pregnancy – a pre-conceptional cohort study in southern Benin. *BMC Public Health* 2018; 18:683.
- Valea I, Tinto H, Drabo MK, et al; Fonds de Solidarité Prioritaire/Micronutriments et Santé de la Mère et de l'Enfant Study Group. An analysis of timing and frequency of malaria infection during pregnancy in relation to the risk of low birth weight, anaemia and perinatal mortality in Burkina Faso. *Malar J* 2012; 11:71.
- Huyh BT, Flevet N, Gbaguidi G, et al. Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anaemia in Benin. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85:214–20.
- Schmiegelow C, Malondo S, Minja DTR, Resende M, Pehrson C, Nielsen BB, et al. *Plasmodium falciparum* infection early in pregnancy has profound consequences for fetal growth. *J Infect Dis* 2017; 216:1601–10.
- Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis* 2009; 200:1509–17.
- Cottrell G, Mousillou A, Luty AJ, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections are associated with maternal anaemia, premature births, and low birth weight. *Clin Infect Dis* 2015; 60:1481–8.
- Adognika AA, Verweij JJ, Agnandji ST, et al. Microscopic and sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75:798–803.
- Malhotra I, Dent A, Mungal P, Muchiri E, King CL. Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3630–5.
- Accrombessi M, Yovo E, Flevet N, et al. Effects of malaria in the first trimester of pregnancy on poor maternal and birth outcomes in Benin. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2018. doi:10.1093/cid/ciy1073
- Takue Ndam N, Toromyigah B, Doucou AY, et al. Persistent *Plasmodium falciparum* infection in women with an intent to become pregnant as a risk factor for pregnancy-associated malaria. *Clin Infect Dis* 2018; 67:1890–6.
- Papageorgiou AT, Sarris I, Ioannou C, et al; International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21<sup>st</sup> Century. Ultrasound methodology used to construct the fetal growth standards in the INTERGROWTH-21<sup>st</sup> Project. *BJOG* 2013; 120(Suppl 2):27–32, v.
- Swesen C, Vekermans J, Bruls M, et al; Clinical Trials Partnership Committee. Development of standardized laboratory methods and quality processes for a phase III study of the RTS, S/AS01 candidate malaria vaccine. *Malar J* 2011; 10:223.
- Tran TM, Aghlil A, Li S, et al. A nested real-time PCR assay for the quantification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from dried blood spots. *Malar J* 2014; 13:393.
- Diallo A, Ndam NT, Mousillou A, et al. Asymptomatic carriage of *Plasmodium* in urban Dakar: the risk of malaria should not be underestimated. *PLOS One* 2012; 7:e31100.
- Rantala AM, Taylor SM, Trotman PA, et al. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malar J* 2010; 9:269.
- Mockenhaupt FP, Rong B, Thi H, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections in pregnancy in Ghana. *Trop Med Int Health* 2000; 5:167–73.
- Uncke CJ. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy in sub-Saharan Africa: the challenges and public health implications. *Parasitol Res* 2006; 102:333–42.
- Eghtola S, Hoidalgo I, Chedraui P. The effect of malarial infection on maternal-fetal outcome in Ecuador. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 18:101–5.

34. Walker-Abbey A, Djokam RR, Eno A, et al. Malaria in pregnant Cameroonian women: the effect of age and gravidity on submicroscopic and mixed-species infections and multiple parasite genotypes. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72:229–35.
35. Rogerson SJ, van den Broek NR, Chaluluka E, Qongwane C, Mhango CG, Molyneux ME. Malaria and anaemia in antenatal women in Blantyre, Malawi: a twelve-month survey. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62:335–40.
36. Accrombessi M, Flevel N, Yovo E, et al. Prevalence and associated risk factors of malaria in the first trimester of pregnancy: a preconceptional cohort study in Benin. *J Infect Dis* 2018; 217:1309–17.
37. Schmiegelow C, Msemo OA, Møller SL, et al. Preconceptional factors associated with haemoglobin concentration in early pregnancy: a community-based cohort study in rural Northeastern Tanzania. *Trop Med Int Health* 2019; 24:596–607.
38. Enquête Démographique et de Santé au Bénin (EDSB) de 2017-2018. Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique (INSAE). Enquête Démographique et de Santé au Bénin (EDSB) de 2017-2018. Available at [https://www.insae-bj.org/images/docs/Inscas-statistiques/enquetes-recensements/EDS/Enqu%C3%AAs%20D%C3%A9mographique%20et%20de%20Sant%C3%A9%20au%20B%C3%A9nin%20\(EDSB%20de%202017-2018\).pdf](https://www.insae-bj.org/images/docs/Inscas-statistiques/enquetes-recensements/EDS/Enqu%C3%AAs%20D%C3%A9mographique%20et%20de%20Sant%C3%A9%20au%20B%C3%A9nin%20(EDSB%20de%202017-2018).pdf). Accessed 13 March 2019.
39. Abuda EK, Inyang-Eloh EC, Etzagu UB. Pregnant women perception of placenta donation for biomedical research- experience at a Nigerian Tertiary Health Care Institution. *Savannah J Med Res Pract*. 2015;4:8–14–14.
40. Gbédandé K, Flevel N, Viwami F, et al; Multi-Centre Research Paper. Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine PAMVAC: quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in Beninese primigravidae. *Vaccine* 2017; 35:3474–81.

5.2. *Article 2 : Hounkonnou CPA et al. Sub-optimal Intermittent Preventive Treatment in pregnancy (IPTp) is associated with an increased risk of submicroscopic P. falciparum infection in pregnant women: a prospective cohort study in Benin. Clin Infect Dis. doi:10.1093/cid/ciaa1355.*

### 5.2.1. Problématique de l'article

Le moyen de prévention actuellement recommandé par l'OMS chez la femme enceinte en ASS, en plus de la MIILDA, est le TPIg à base de sulfadoxine-pyriméthamine (SP). Le TPIg à la SP consiste en une administration de 3 comprimés de SP à partir de la 13<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (SA) à intervalle d'un mois jusqu'à l'accouchement. Ce traitement a montré son efficacité dans la protection de la femme enceinte et du nouveau-né contre les effets négatifs du paludisme gestationnel. Au Bénin, les recommandations nationales préconisent l'administration du TPIg à partir de la 16<sup>ème</sup> SA.

Le constat d'une variabilité dans la mise en œuvre de cette recommandation aux niveaux nationaux (à l'intérieur des pays) et régional (entre les pays de la région Afrique de l'Ouest) nous a interpellés. Nous nous sommes donc intéressés à l'implémentation réelle du TPIg au Bénin, ainsi qu'à l'impact de son implémentation actuelle sur la protection des femmes enceintes contre les infections palustres en général mais plus spécialement contre les infections submicroscopiques.

Traditionnellement, les valeurs de la p-value sont basées sur des tests bilatéraux. Nous avons inclus dans notre deuxième article les valeurs obtenues selon une hypothèse bilatérale. Néanmoins, notre hypothèse de travail est clairement unilatérale : le TPI diminue le nombre d'infections palustres au cours de la grossesse. Le TPI réduit par conséquent la survenue des conséquences liées aux infections palustres pendant la grossesse ; cette hypothèse a été établie

par de nombreuses études [6, 136–141]. Dans le résumé ci-dessous, nous avons donc reporté les valeurs de la p-value unilatérale pour une meilleure compréhension de nos conclusions.

## 5.2.2. Résumé et commentaire de l'article

### 5.2.2.1. Résultats

Parmi les 273 femmes ayant accouchées, plus des  $\frac{3}{4}$  ont reçu au moins deux doses de TPIg pendant leur grossesse. Le nombre d'infections palustres moyen chez les femmes ayant reçu le plus grand nombre de doses de TPI ( $\geq 2$ ) pendant la grossesse était inférieur à celui des femmes ayant reçu une dose ou aucune (2,7 contre 3,2 infections,  $p=0.03$ ).

La prévalence des infections submicroscopiques est toujours plus élevée que celle des infections microscopiques indépendamment de la période de la grossesse et du nombre de doses reçues pendant le suivi. Plus de la moitié des femmes de l'étude étaient présentes en CPN à un âge gestationnel où elles étaient éligibles à la 1<sup>ère</sup> prise de TPI et ne l'ont pourtant pas reçu.

Une première dose tardive de TPIg ( $>21,2$  SA) ainsi qu'un faible nombre de dose de TPI (0 et 1 dose) ont été associés à un nombre accru d'infections par *P. falciparum* (IRRa=1,3 ;  $p=0,049$  et IRRa=1,5 ;  $p=0,004$  respectivement). La prise tardive de la première dose de TPIg est également associée à un nombre plus élevé d'infections submicroscopiques par *P. falciparum* (IRRa=1,7 ;  $p=0,04$ ). Le nombre de doses de TPIp-SP n'était pas associé au nombre d'infections submicroscopiques (IRRa = 1,2,  $p = 0,27$ ). Le nombre de doses de TPI et le moment de la première prise étant liés, nous avons regardé l'impact de la première prise chez le groupe de femmes ayant eu deux doses de TPIg (63% des femmes de l'étude). Nous avons ainsi pu confirmer l'augmentation de risque induite par la première prise tardive du TPIg pendant la grossesse. Le risque de survenue d'un nombre élevé d'infections par *P. falciparum* et d'infections submicroscopiques est respectivement de IRRa = 1,48,  $p = 0,04$  et IRRa = 2,11,  $p = 0,04$ .

Du fait de notre hypothèse de travail unilatérale et de la taille non négligeable de l'impact représenté par le rapport des taux d'incidence ajustés, nous avons de solides arguments en faveur du fait que le retard dans l'administration de la 1<sup>ère</sup> dose de TPI est un facteur de risque d'infection aussi bien microscopique que submicroscopique chez les femmes enceintes.

#### **5.2.2.2. Discussion**

Notre but était d'évaluer l'impact de l'utilisation du traitement préventif intermittent à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (TPI-SP) sur la survenue de l'infection palustre pendant la grossesse. Pour cette évaluation, nous avons utilisé comme variable dépendante le nombre d'infections palustres survenues après la 17<sup>ème</sup> SA pendant la grossesse. Le nombre d'infections palustres nous permettait de prendre en compte toutes les infections survenues chez les femmes pendant toute la période où le TPI est utilisé, i.e. du début du deuxième trimestre de grossesse à l'accouchement. Un modèle de comptage de type Poisson semblait donc pertinent pour la réalisation de nos analyses. Cependant, le modèle de Poisson fait une hypothèse d'égalité de la variance et de la moyenne. Cette hypothèse n'étant pas toujours plausible, une alternative consiste en l'utilisation du modèle de régression binomiale négative qui avec l'ajout d'un terme aléatoire permet de tenir compte de la possible surdispersion des données. Nous avons donc décidé d'utiliser une régression binomiale négative pour nos analyses statistiques.

L'implémentation actuelle du TPI n'est pas optimale pour permettre une stérilisation complète du foyer infectieux du paludisme pendant la grossesse. La prise tardive de la 1<sup>ère</sup> dose de TPI (>21,2 SA) entraîne un sur-risque d'infections palustres (microscopiques et submicroscopiques) pendant la grossesse. De plus, l'existence d'une infection palustre submicroscopique au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse augmente le risque de survenue d'infections aux 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres de grossesse indépendamment de la prise de TPI. Ces éléments prouvent que l'implémentation actuelle du TPI est source d'une protection sous-optimale des

femmes enceintes pendant la grossesse, surtout au 1<sup>er</sup> trimestre, ce trimestre se trouvant être une période de vulnérabilité extrême de la femme enceinte. Du fait de la mauvaise protection des femmes au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse et des bienfaits d'une prise précoce de la 1<sup>ère</sup> dose de TPI sur la protection des femmes enceintes, il devient nécessaire d'évaluer l'efficacité d'une nouvelle molécule de TPI pouvant être administré dès le 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse. Des évaluations sur la possibilité d'utilisation des ACT notamment de l'association moléculaire dihydroartémisine-pipéraquline (DHA-PQ) au premier trimestre de grossesse est en cours [173–175]. La validation de cette molécule en tant que TPI permettra une administration précoce du TPI après la mise en œuvre de stratégies permettant d'avoir accès aux femmes dès les 1ers mois de leur grossesse. La mise à contribution des agents de santé communautaires, en plus du personnel soignant exerçant dans les centres de santé, pourrait permettre un ciblage aisé des femmes et une administration précoce en communauté du TPIg [176].

### 5.2.3. Hounkonnou *et al.*, Clinical Infectious Disease 2020

**Sub-optimal Intermittent Preventive Treatment in pregnancy (IPTp) is associated with an increased risk of submicroscopic *P. falciparum* infection in pregnant women: a prospective cohort study in Benin**

Cornélia P. A. Hounkonnou<sup>1,2</sup>, Nicaise Tuikue Ndam<sup>1</sup>, Nadine Fievet<sup>1</sup>, Manfred Accrombessi<sup>3,4</sup>, Emmanuel Yovo<sup>3</sup>, Atikatu Mama<sup>3</sup>, Darius Sossou<sup>3</sup>, Bertin Vianou<sup>3</sup>, Achille Massougbodji<sup>3</sup>, Valérie Briand<sup>5\*</sup>, Michel Cot<sup>1\*</sup>, Gilles Cottrell<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Paris, MERIT, IRD, F-75006 Paris, France

<sup>2</sup> Sorbonne Université, Université Pierre et Marie-Curie, F-75006 Paris, France

<sup>3</sup> Institut de Recherche Clinique du Bénin, Abomey-Calavi, Bénin

<sup>4</sup> Faculty of Infectious and Tropical Diseases, Disease Control Department, London School of Hygiene and Tropical Medicine, WC1E 7HT London, United Kingdom

<sup>5</sup> IRD, Inserm, Université de Bordeaux, IDLIC team, UMR 1219, Bordeaux, France

\* Contributed equivalently to the work

Corresponding author: Gilles Cottrell, [gilles.cottrell@ird.fr](mailto:gilles.cottrell@ird.fr)

**Summary:** In a cohort study, increased numbers of *P. falciparum* infections were found in pregnant women with a sub-optimal number of IPTp-SP doses, and in those whose first dose was late. The timing of IPTP-SP primarily affects the submicroscopic infections.

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

## Abstract

**Background:** Harmful maternal and neonatal health outcomes result from malaria in pregnancy, the prevention of which primarily relies on intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine (IPTp-SP). WHO recommends IPTp-SP in sub-Saharan Africa, but implementation is highly heterogeneous and often sub-optimal in terms of the number of doses and their timing. In this study, we assessed the impact of this heterogeneity on malaria in pregnancy, mainly with respect to submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections.

**Methods:** We used data from 273 Beninese women followed throughout pregnancy. Screening for *P. falciparum* infections, using both microscopy- and polymerase chain reaction (PCR) -based methods, was performed monthly, and information on IPTp-SP dose was collected. Gestational age was estimated by repeated ultrasound scans. Using a negative binomial model, we investigated the effect of IPTp-SP doses and timing, after 17 weeks of gestation, on the number of *P. falciparum* infections, focusing on submicroscopic infections detectable only by PCR.

**Results:** At least two IPTp-SP doses were taken by 77.3% of the women. The median gestational age at first IPTp-SP dose was 22 weeks. A late first IPTp-SP dose (>21.2 weeks) was marginally associated with an increased number of *P. falciparum* infections (adjusted incidence rate ratio [aIRR] =1.3; p=0.098). The number of IPTp-SP doses was not associated with the number of submicroscopic infections (aIRR=1.2, p=0.543).

**Conclusion:** A late first IPTp-SP dose fail to provide optimal protection against *P. falciparum*, especially submicroscopic infections. This highlights the need for a new antimalarial drug for IPTp that could be taken early in pregnancy.

**Keywords:** Submicroscopic *P. falciparum* infection, pregnancy, intermittent preventive treatment, prospective cohort, sub-Saharan Africa.

## Introduction

In 2018, around 11 million women were exposed in sub-Saharan Africa (SSA) to malaria in pregnancy (MiP) [1], the adverse effects of which have been well documented [2–6]. To protect pregnant women from MiP in areas of stable malaria transmission the WHO recommends combined strategies including intermittent preventive treatment in pregnancy with sulfadoxine-pyrimethamine (IPTp-SP) [7–9]. IPTp-SP has succeeded in reducing malaria-related mortality and morbidity [10].

IPTp-SP is recommended for all pregnant women (infected or not), although contraindicated in the first trimester because of possible teratogenic effects. It comprises repeated administrations one-month apart, of a curative dose of SP starting at the beginning of the second trimester of pregnancy (13 weeks of gestation (wg)) and continuing until delivery. In 2004, WHO recommended two doses of IPTp-SP during pregnancy to be taken at antenatal care (ANC) visits. It was revised eight years later to at least three recommended doses [7]. Since its implementation, there is substantial evidence that IPTp-SP helps to prevent the adverse effects of MiP [11, 12]. At the initiation of our study in Benin in 2014, the national guidelines recommended two doses of IPTp-SP after the 16<sup>th</sup> wg [13, 14]. This was modified in 2016 to recommend three doses [15].

Despite this clear policy, IPTp-SP implementation is highly heterogeneous across SSA. Thus IPTp-SP coverage varies greatly between countries and districts [13]. In 2017–2018, across different Benin districts, for example, coverage of at least two doses varies from 21.7% in Borgou to 55.6% in Mono with an average of 33.4% for the whole country [15]. Furthermore, pregnant women's gestational age (GA) at first ANC visit varies greatly, leading to variations in both timing and number of IPTp-SP doses. In West African countries like Benin, there is little data on IPTp-SP heterogeneity in terms of timing and number of doses and only few studies in SSA have assessed this question [16]. Such heterogeneity probably has consequences on women's protection against MiP, and is thus an important factor to assess. Moreover, the high prevalence of carriage of submicroscopic *P. falciparum* infections

[17], especially in pregnancy [18], contributes to the transmission of malaria [19] and increases the risk of infections during pregnancy [20]. Investigating the impact of the heterogeneity of IPTp-SP implementation on the occurrence of submicroscopic infections during pregnancy is thus essential.

The "REtard de Croissance Intra-uterin et PALudisme (RECIPAL)" study, a prospective cohort with the follow-up of women from early pregnancy to delivery in Benin allowed to study in detail IPTp-SP implementation (number of doses and timing) and its impact on *P. falciparum* infections, both microscopic and submicroscopic, throughout pregnancy.

## Methods

### Study design

The RECIPAL study was conducted from June 2014 to August 2017 in southern Benin and was designed as a preconception cohort [21]. Women of reproductive age were first enrolled and followed-up monthly until they became pregnant. The pregnant women were then followed up at monthly ANC visits. During these visits, clinical, obstetrical and malaria infection screening data (by thick blood smear [TBS]) were collected. Dried blood spots were also collected monthly for PCR assays that were performed after the follow-up. Additionally, a TBS and a rapid diagnostic test (RDT) were performed in case of acute illness for rapid diagnosis and treatment. Five ultrasound scans were completed, the first conducted between 9 and 14 wg, ensuring accurate estimates of GA. IPTp-SP administrations at the health center were reported from ANC medical records of pregnant women. Infected women (detected by TBS or RDT, when applicable) were given appropriate antimalarial treatment according to the national guidelines applicable at the time of the study.

### Laboratory procedures

Parasitaemia was i) quantified by the Lambaréné technique with a detection threshold estimated at 5 parasites/ $\mu$ L [22, 23] and ii) tested by real-time quantitative PCR that targeted the 18S rDNA [24, 25]. A negative control with no DNA template was ran in all reactions. The RDT used was Pf+pan rapid test SD Bioline Ag (IDA Foundation, Netherlands; BioSynex, France) for immediate diagnosis [21].

### Ethics Statement

The Ethics Committee of the "Institut des Sciences Biomédicales Appliquées" and the Ministry of Health in Benin approved this study. Before enrolment, the study was explained to each participant in the local language, and her voluntary informed consent was obtained. All treatments administered for acute illnesses during pregnancy were paid for by the project.

### Statistical analysis

We used a negative binomial model to assess the effect of IPTp-SP use on the number of (i) both microscopic and submicroscopic and (ii) submicroscopic *P. falciparum* infections occurring during pregnancy with an adjustment for the confounding variables. The assumption supporting the analyses was that not only the number of IPTp-SP doses, but also their timing (especially the first administration), could play an important role in the protection against *P. falciparum* infections, [16]. As shown Figure 1, different scenarios involving these two variables show either the potential impact of the number of IPTp-SP doses (first two scenarios) or the impact of the delay between the onset of pregnancy and intake of the first dose (last two scenarios) on the protective effect of IPTp-SP during pregnancy, knowing in addition that timing and number of doses are correlated (the later a woman receives her first dose, the lower the possible number of doses).

Because IPTp-SP was recommended after 16 wg in Benin at the start of RECIPAL, we assumed that the first IPTp-SP dose should theoretically have been administered to all pregnant women from 17 wg. Our outcome variable was thus the number of *P. falciparum*

infections detected between 17 wg and delivery. In order to estimate the impact of the timing of the first IPTp-SP dose, a binary variable « early/late first dose of IPTp-SP » was defined according to the first quartile of the distribution of the women's GA at first dose (around 21.2 wg).

*P. falciparum* infection was defined, at each visit, as follows: "negative" if all tests (TBS, PCR, and RDT when applicable) were negative, "submicroscopic" if TBS (and RDT when applicable) were negative whereas PCR was positive, and "microscopic" if TBS or RDT (when applicable) was positive. Then, to assess the impact of IPTp-SP use on MiP, the number of *P. falciparum* infections occurring during the pregnancy was defined as the sum of *P. falciparum* infections (either submicroscopic or microscopic) at all the visits for each pregnant woman. In a second step, we restricted the sample to the women who did not present any microscopic infections during their pregnancy (i.e. either negative or submicroscopically infected at all visits) to evaluate the IPTp-SP effect on submicroscopic infections.

We defined two IPTp-SP-related explanatory variables: i) the number of doses received ("0-1" vs "2-3") over the period of theoretical IPTp-SP protection during pregnancy (from 17 wg to delivery) and ii) the timing of the first dose ("before 21.2 wg" vs "after 21.2 wg").

The potential confounding factors included maternal socio-demographic characteristics; *P. falciparum* infection during the first trimester of pregnancy ( $\leq 14$  wg) defined as "negative" at each visit, "submicroscopic" if only submicroscopic infections were diagnosed during the trimester and "microscopic" if at least one microscopic infection was detected during the trimester; use of Insecticide Treated bed Nets (Yes/No); gravidity and the season at delivery. To take into account the different number of ANC visits for the detection of *P. falciparum* infections for each woman during the follow-up, the log of the number of visits was used as an offset in the model.

Variables were eliminated by a step-by-step backward selection procedure. We retained variables with a p-value less than 0.1. Statistical analyses were carried out with STATA software version 13.1.

## Results

Of the 273 pregnant women, 10 (3.7%) did not receive any IPTp-SP. One, two and three doses of IPTp-SP were taken by, respectively, 19%, 63% and 14% of the women throughout pregnancy.

### *Pregnant women's characteristics*

Table 1 shows that maternal age, gestational rank and marital status were similar between women as a function of the number of IPTp-SP doses (0-1 versus 2-3). Women were on average 26 years old. Women with at least two doses had more ANC visits after the 17<sup>th</sup> wg, were more educated, and had a lower average number of infections than the ones with 0-1 IPTp-SP dose during pregnancy (2.7 vs 3.2).

Figure 2 shows the proportion of *P. falciparum* infections during pregnancy before and after the first IPTp-SP dose according to the number of doses. Whatever the period of gestation, the proportion of submicroscopic infections was always higher than microscopic infections (chi2 test, all  $p < 0.001$ ). We observed a higher proportion of *P. falciparum* infections (both microscopic and submicroscopic) in pregnant women who had one dose of IPTp-SP (32.7%) compared to those with at least two (13.9%) ( $p < 0.001$ ).

Overall, the median GA at first IPTp-SP dose was 22.6 wg. Median GA was respectively 27.6, 22.6 and 20.4 wg for women who had one, two or three IPTp-SP doses during pregnancy. Regardless of the number of doses (Figure 3), at least 70% of women had their first IPTp-SP dose administered after 17 wg (right-hand graphs). However, most women had their previous visit at a GA at which they were eligible for IPTp-SP but did not receive it

(left-hand graphs). Indeed, 75% of the women who had one IPTp-SP dose could have received it earlier.

#### ***Factors contributing to the number of *P. falciparum* infections***

In Table 2 (final multivariate model), a low number of doses and a late first dose of IPTp-SP were associated with a higher number of *P. falciparum* infections after 17 wg ( $p=0.009$  and  $p=0.098$ , respectively). In the 173 women who received two IPTp-SP doses, a late first IPTp-SP dose was also positively associated with a higher number of *P. falciparum* infections ( $p=0.084$ , Table 3).

We then focused the analysis on the women with no microscopic infection after 17 wg. These women were similar to those who had at least one microscopic infection according to gravidity, sociodemographic characteristics, number of ANC visits after 17 wg (on average 5) and the timing of the first dose. In contrast, most of them (83.4%) had at least two IPTp-SP doses during pregnancy vs 69% in pregnant women who harbored at least one microscopic infection (Table 4). In this subsample, the proportion of women with at least one submicroscopic infection after 17 wg was 52.9% (83/157), the remaining being uninfected at all visits.

In this sub-sample, the same factors contributed to the number of submicroscopic infections except, the number of IPTp-SP doses (tables 5 and 6). In addition, the association between a late GA at first IPTp-SP dose ( $> 21.2$  wg) and an increased number of submicroscopic infections seemed to be more pronounced than in the total sample.

## Discussion

Many clinical trials have demonstrated the efficacy of IPTp-SP in MiP in Africa. Most studies [9, 15, 26, 27] have described the impact of the number of doses but very few have described the impact of the timing of IPTp-SP [16], especially with respect to submicroscopic infections. We showed that a sub-optimal number of IPTp-SP doses, as well as a delay in administration of the first dose of SP are associated with an increased risk of *P. falciparum* infection, particularly submicroscopic, during pregnancy.

The proportion of women with at least two IPTp-SP doses (77.3%) was higher than the coverage officially reported in the study area based on the Demographic and Health Survey (39.2% in 2017-2018) [15]. This may be partially due to the regular visits planned in this study. The proportion of pregnant women who received 3 doses (13%) was below the WHO report estimations for the whole SSA (18% in 2015 and 19% in 2016) [10]. In Benin, the official recommendation of three IPTp-SP doses was implemented in 2016, near the end of the RECIPAL study, which probably explains (at least partially) this low proportion. Of important note, although the two-dose recommendation was implemented 10 years ago in Benin, there were still 25% of pregnant women who received no or only one dose, in a study with on average 8 ANC visits and monitoring since the first trimester. We observed also that women received on average their first dose much later than recommended by the Benin national guidelines (median 22.6 wg vs 16 wg as recommended) [15]. Such a delay could imply that women did not attend ANC visits early enough to have their first dose on time, but our data contradict this assumption, showing that the vast majority of women (around 75%) attended an ANC visit at a time (GA) at which they were indeed eligible to receive the first dose, but were not given the drug. This raises the question of the health staff's understanding of and adherence to the IPTp-SP policy. Several reasons are reported in the literature concerning inappropriate administration of the first IPTp-SP dose the most plausible argument being stock-outs [28, 29]. During the study, there were indeed some SP stock-out issues, but in such situation, SP was provided to the women by the study, then

this could not adequately explain such a late first dose. Thus, sub-optimal IPTp-SP administration is a reality and unfortunately a common occurrence.

We assessed the consequences of this sub-optimal administration on the protection of women against MiP. We confirmed that a low number of IPTp-SP doses was significantly associated with a higher risk of *P. falciparum* infection during pregnancy; which is consistent with the literature [9, 15, 26, 27]. In addition, the late timing of the first dose was associated with an increased risk of infection, independently of the number of doses. A delayed first dose (as well as a low number of doses), shortening the duration of the period of protection against infection, leaves women more vulnerable to MiP [16]. Additionally, our results have shown a non-negligible proportion of women infected during their pregnancy, even in those who received two or three doses of IPTp. One possible hypothesis could be the resistance of the parasites to SP, but in Benin the majority of mutants contain triple or quadruple mutations which do not seem to cause a lack of efficacy of SP [34]. Resistance to SP therefore does not seem to be the major hypothesis explaining this.

Our focus on the subsample of women with no microscopic infections is particularly valuable as they would be classified “negative” by the usually diagnostic methods (TBS or RDT). Interestingly, we found that most of them (53%) had at least one submicroscopic infection after 17 wg, making these women a potential reservoir of malaria transmission [19] with an increased risk of adverse consequences [18, 30, 31]. Our results suggested that a higher number of IPTp-SP doses was less efficient in clearing submicroscopic infections than microscopic infections. In addition, taking the first dose comparatively early seems important for prevention of the occurrence of both submicroscopic and microscopic infections. As the study period overlapped with the period during which the Beninese national policy was revised to apply the new WHO strategy (3 doses or more), it would clearly be interesting to strengthen our results by other studies with the current recommendations of IPTp-SP3+.

Furthermore, we also found a substantial impact of *P. falciparum* infections (submicroscopic and microscopic) detected in the first trimester (a known critical and non-

optimally protected period [20, 32, 33]) on the number of *P. falciparum* infections occurring after 17 wg, independently of IPTp-SP administration. An explanation could be that those women may be the most exposed during the overall pregnancy. This result suggests that a preventive measure starting early in pregnancy or even before pregnancy such as malaria vaccine would be of particular public health relevance. Thus, initiatives like IPTp community delivery (by community health workers) may be an interesting option for improving early IPTp administration [34, 35]. Later, it could lead to an easier access to IPTp in the community with a drug safe in the first trimester [36].

Our study has limitations. First, our conclusions about the sub-optimal IPTp-SP implementation may not be generalizable. However, such sub-optimal levels of IPTp-SP implementation have been reported in multiple Benin districts [15] as well as in several other SSA countries [37–39]. This suggests that sub-optimal administration, in terms of number of doses as well as adequate timing (the two being linked) is probably not just a local but could also be national or even regional issue. The monthly monitoring conducted as part of the study protocol increased the number of ANC visits compared to real-life settings, and could thus be considered as a second limitation since it could have impacted on IPTp-SP implementation. However, in this case in real-life, the gaps in IPTp-SP implementation may be more pronounced than in this study with a likely higher impact on MiP.

Our study has also several strengths. The follow-up of women since the early pregnancy allowed the collection of prospective data related to IPTp-SP administration (number and timing of doses) and avoided the memory bias inherent to retrospective studies. The study design also allowed for the detection of first trimester malaria infections, revealing their impact on the occurrence of infections from the second trimester onwards despite IPTp-SP. Moreover, accurate GA dating substantially increased the fidelity of our results. Finally, diagnosis by PCR allowed to assess the impact of IPTp-SP administration on the reservoir of submicroscopic infections, which remain untreated routinely, as usually asymptomatic.

We highlighted the association between a sub-optimal IPTp-SP administration and the increased risk of MiP. An important result is that a late first dose of IPTp-SP decreases the prophylactic effect of IPTp-SP and precludes the full clearance of *P. falciparum* infections (both submicroscopic and microscopic) during pregnancy. It is therefore urgent, as a public health target, to increase access to early IPTp administration, preferably with a drug tolerated during the first trimester of pregnancy. The major challenge will be to reach pregnant women in SSA early in the first months of pregnancy, a time when they are generally reluctant to attend ANC visit.

Accepted Manuscript

## Notes

### Authors' contributions:

Study conception and design: M.A., A.M., M.C., and V.B. (Principal Investigator)/Data collection: M.A., E.Y., N.F., D.S., B.V. and V.B./Statistical analyses: C.P.A.H. and G.C./Manuscript writing: C.P.A.H., V.B., M.C., and G.C./Biology and molecular analyses: N.T.N., A.M., D.S., B.V. and N.F. /All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgments:

The authors acknowledge all the women and their families; the health center; the field workers and the local authorities of Sô-Ava and Akassato Districts who participated in the Retard de Croissance Intra-uterin et Paludisme (RECIPAL) study, the RECIPAL team including researchers, engineers, technicians and managers; the Sorbonne University for PhD scholarship of C.P.A.H.; the doctoral network of "Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique" (EHESP) and Mr Adrian J. F. Luty for proofreading the article before submission.

### Financial support:

This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (grant number: ANR-13-JSV1-0004) and the Fondation Simone Beer under the auspices of the Fondation de France (grant number: 00074147).

### Potential conflict of Interest:

No conflict declared. All authors report no potential conflict of interest. All authors have submitted the ICMJE Form of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

1. WHO. World malaria report 2019. :232.
2. Cottrell G, Mary J-Y, Barro D, Cot M. The importance of the period of malarial infection during pregnancy on birth weight in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76:849–54.
3. Schantz-Dunn J, Nour NM. Malaria and Pregnancy: A Global Health Perspective. *Rev Obstet Gynecol.* 2009;2:186–92.
4. Ayoola OO, Whatmore A, Balogun WO, Jarrett OO, Cruickshank JK, Clayton PE. Maternal malaria status and metabolic profiles in pregnancy and in cord blood: relationships with birth size in Nigerian infants. *Malar J.* 2012;11:75.
5. Huynh B-T, Cottrell G, Cot M, Briand V. Burden of malaria in early pregnancy: a neglected problem? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2015;60:598–604.
6. Guyatt HL, Snow RW. The epidemiology and burden of *Plasmodium falciparum*-related anemia among pregnant women in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64:36–44.
7. OMS. Document d'orientation en matière de politiques de l'OMS: Traitement préventif intermittent pour le paludisme lors de la grossesse à la sulfadoxine-pyriméthamine – TPIp-SP. WHO. [https://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy\\_brief\\_iptp\\_sp\\_policy\\_recommendation/fr/](https://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy_brief_iptp_sp_policy_recommendation/fr/). Accessed 7 Aug 2019.
8. WHO. A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the African region. WHO. [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/afr\\_mal\\_04\\_01/en/](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/afr_mal_04_01/en/). Accessed 10 Sep 2019.
9. Kayentao K, Garner P, van Eijk AM, Naidoo I, Roper C, Mulokozi A, et al. Intermittent preventive therapy for malaria during pregnancy using 2 vs 3 or more doses of sulfadoxine-pyrimethamine and risk of low birth weight in Africa: systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2013;309:594–604.
10. WHO. Points essentiels: Rapport sur le paludisme dans le monde 2017. WHO. <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/fr/>. Accessed 13 Mar 2019.
11. Eisele TP, Larsen DA, Anglewicz PA, Keating J, Yukich J, Bennett A, et al. Malaria prevention in pregnancy, birthweight, and neonatal mortality: a meta-analysis of 32 national cross-sectional datasets in Africa. *Lancet Infect Dis.* 2012;12:942–9.
12. Menéndez C, Bardají A, Sigauque B, Sanz S, Aponte JJ, Mabunda S, et al. Malaria prevention with IPTp during pregnancy reduces neonatal mortality. *PLoS One.* 2010;5:e9438.
13. Henry M, Florey L, Youll S, Gutman JR. An analysis of country adoption and implementation of the 2012 WHO recommendations for intermittent preventive treatment for pregnant women in sub-Saharan Africa. *Malar J.* 2018;17:364.
14. d'Almeida TCDA, Agboton-Zoumenou M-A, Garcia A, Massougbdji A, Briand V, Imorou Y, et al. Field evaluation of the intermittent preventive treatment of malaria during pregnancy (IPTp) in Benin: evolution of the coverage rate since its implementation. *Parasit Vectors.* 2011;4:108.
15. INSAE. Enquête Démographique et de Santé du Bénin, 2017-2018.

16. Huynh B-T, Fievet N, Briand V, Borgella S, Massougbdji A, Deloron P, et al. Consequences of gestational malaria on birth weight: finding the best timeframe for intermittent preventive treatment administration. *PLoS One*. 2012;7:e35342.
17. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*. 2009;200:1509–17.
18. Cottrell G, Moussiliou A, Luty AJF, Cot M, Fievet N, Massougbdji A, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infections Are Associated With Maternal Anemia, Premature Births, and Low Birth Weight. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2015;60:1481–8.
19. Lin JT, Saunders DL, Meshnick SR. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends Parasitol*. 2014;30:183–90.
20. Hounkonnou CPA, Briand V, Fievet N, Accrombessi M, Yovo E, Mama A, et al. Dynamics of Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infections Throughout Pregnancy: A Preconception Cohort Study in Benin. *Clin Infect Dis*. doi:10.1093/cid/ciz748.
21. Accrombessi M, Yovo E, Cottrell G, Agbota G, Gartner A, Martin-Prevel Y, et al. Cohort profile: effect of malaria in early pregnancy on fetal growth in Benin (RECIPAL preconceptional cohort). *BMJ Open*. 2018;8:e019014.
22. Accrombessi M, Yovo E, Fievet N, Cottrell G, Agbota G, Gartner A, et al. Effects of Malaria in the First Trimester of Pregnancy on Poor Maternal and Birth Outcomes in Benin. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2018.
23. Swysen C, Bruls M, Oyakhrome S, Drakeley C, Okech B, Carter T, et al. Development of standardized laboratory methods and quality processes for a phase III study of the RTS, S/AS01 candidate malaria vaccine. *Malar J*. 2011;10:223.
24. Tran TM, Aghili A, Li S, Ongoiba A, Kayentao K, Doumbo S, et al. A nested real-time PCR assay for the quantification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from dried blood spots. *Malar J*. 2014;13:393–393.
25. Diallo A, Ndam NT, Moussiliou A, Santos SD, Ndonky A, Borderon M, et al. Asymptomatic Carriage of *Plasmodium* in Urban Dakar: The Risk of Malaria Should Not Be Underestimated. *PLOS ONE*. 2012;7:e31100.
26. Diakite OS, et al. Superiority of 3 over 2 doses of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for the prevention of malaria during pregnancy in mali: a randomized controlled trial. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765069>. Accessed 6 Sep 2019.
27. Gutman J, Mwandama D, Wiegand RE, Ali D, Mathanga DP, Skarbinski J. Effectiveness of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine during pregnancy on maternal and birth outcomes in Machinga district, Malawi. *J Infect Dis*. 2013;208:907–16.
28. Hill J, Hoyt J, van Eijk AM, D'Mello-Guyett L, Ter Kuile FO, Steketee R, et al. Factors affecting the delivery, access, and use of interventions to prevent malaria in pregnancy in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2013;10:e1001488.
29. Webster J, Kayentao K, Bruce J, Diawara SI, Abathina A, Haiballa AA, et al. Prevention of malaria in pregnancy with intermittent preventive treatment and insecticide treated nets in Mali: a quantitative health systems effectiveness analysis. *PLoS One*. 2013;8:e67520.

30. Adegnikaa AA, Verweij JJ, Agnandji ST, Chai SK, Breitling LP, Ramharter M, et al. Microscopic and sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75:798–803.
31. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Muchiri E, King CL. Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3630–5.
32. Accrombessi M, Fievet N, Yovo E, Cottrell G, Agbota G, Massougbdji A, et al. Prevalence and Associated Risk Factors of Malaria in the First Trimester of Pregnancy: A Preconceptional Cohort Study in Benin. *J Infect Dis.* 2018;217:1309–17.
33. Hounkonnou C, Djènontin A, Egbinola S, Houngbegnon P, Bouraima A, Soares C, et al. Impact of the use and efficacy of long lasting insecticidal net on malaria infection during the first trimester of pregnancy - a pre-conceptional cohort study in southern Benin. *BMC Public Health.* 2018;18:683.
34. WHO. WHO recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience. WHO. [http://www.who.int/reproductivehealth/publications/maternal\\_perinatal\\_health/anc-positive-pregnancy-experience/en/](http://www.who.int/reproductivehealth/publications/maternal_perinatal_health/anc-positive-pregnancy-experience/en/). Accessed 12 Aug 2019.
35. TIPTOP - Advancing Prevention of Malaria in Pregnancy. TIPTOP. <https://www.tiptopmalaria.org/news/>. Accessed 30 Mar 2020.
36. McGready R, Nosten F, Barnes KI, Mokuolu O, White NJ. Why is WHO failing women with falciparum malaria in the first trimester of pregnancy? *The Lancet.* 2020;395:779.
37. Annuaire statistique burkina faso 2017 - - Recherche Google. <https://www.google.com/search?q=Annuaire+statistique+burkina+faso+2017+-&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab>. Accessed 24 Aug 2020.
38. Enquête démographique et de santé burundi 2018 - Recherche Google. <https://www.google.com/search?q=Enqu%C3%AAted%C3%A9mographique+et+de+sant%C3%A9+burundi+2018&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab>. Accessed 24 Aug 2020.
39. Enquête démographique et de santé cameroun 2018 - - Recherche Google. <https://www.google.com/search?q=Enqu%C3%AAted%C3%A9mographique+et+de+sant%C3%A9+cameroun+2018+-&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab>. Accessed 24 Aug 2020.

## Abbreviations

ANC:	Antenatal care
IPTp:	Intermittent Preventive Treatment in pregnancy
IPTp-SP:	Intermittent Preventive Treatment in pregnancy with sulfadoxine-pyriméthamine
MiP:	Malaria in Pregnancy
PCR:	Polymerase Chain Reaction
<i>P. falciparum</i> :	<i>Plasmodium falciparum</i>
qPCR :	quantitative Polymerase Chain Reaction
RECIPAL:	REtard de Croissance Intra-uterin et PALudisme
SP:	Sulfadoxine-Pyriméthamine
SSA:	Sub-Saharan Africa
TBS:	Thick Blood Smear
Wg:	Week of Gestation
WHO:	World Health Organization

### Figure legends

Figure 1: Example of four hypothetical scenarios illustrating the different possible impacts of number of doses and timing of IPTP-SP on the pregnant women's protection against *P. falciparum* infection

#### Legend:

We assumed that the theoretical protection period of the pregnant women started from the 17th wg. Scenarios 1 and 2 consider two pregnant women taking respectively three and one doses of IPTP-SP, with the first dose at the same time. The effect of IPTP-SP remains high for the first woman, but decreases over time for the second one, showing the likely relationship between the number of doses and the protective effect during pregnancy. Scenarios 3 and 4 show two pregnant women with the same number of IPTP-SP doses but a different timing for the first dose. Scenario 4 (late first dose) implies a longer unprotected period between 17w.g. and the first dose, and therefore a greater susceptibility to *P. falciparum* infection, illustrating the possible relationship between the timing of the first dose and the protection of women against *P. falciparum* infections.

\*: Theoretical maximum period of IPTP-SP doses coverage; #: Unprotected period; + + - : Evolution of the IPTP-SP' effect on the protection of pregnant women against infection with *P. falciparum* infections

Figure 2: Proportion of *P. falciparum* with or without infection before and after the first IPTp dose for the 273 pregnant women, RECIPAL 2014-2017, Benin

P: p-value corresponding to the chi-square test

Figure 3: Distribution of the gestational age, at the visit preceding the first IPTP-SP dose and at the visit of the first IPTP-SP dose, according to the total number of the IPTP-SP dose per women during pregnancy, RECIPAL 2014-2017 (N=263), Benin

Legend:

The numbers at the right of the 17th wg correspond to (i) the proportion of visits where pregnant women were eligible to receive IPTP-SP but did not (left-hand graphs) and (ii) the proportion of pregnant women who received their first IPTP-SP dose after the 17th wg.

Accepted Manuscript

Table 1: General characteristics of the 273 pregnant women included in the analysis comparing those who had 0 or 1 IPTp (n=62) versus 2 or 3 IPTp (n=211) during the pregnancy. RECIPAL cohort, 2014-2017, Benin

Characteristics		Pregnant women who received 0 or 1 IPTp dose (N=62)	Pregnant women who received 2 or 3 IPTp doses (N=211)	p-value
		Mean or proportion (CI 95 %)	Mean or proportion (CI 95 %)	
Age (years)		26.2 [25.1-27.4]	26.9 [26.2-27.6]	0.34
Gestational rank	< 3 pregnancies	33.9 [22.7-46.8]	40.3 [33.8-47.1]	0.36
	>= 3 pregnancies	66.1 [53.2-77.0]	59.7 [52.9-66.2]	
Marital status	Cohabitation	8.1 [3.3-18.3]	6.2 [3.6-10.4]	0.59
	Married	91.9 [81.6-96.7]	93.8 [89.6-96.4]	
Ethnicity	Toffin	83.9 [72.2-91.2]	71.1 [64.5-76.8]	0.04
	Others	16.1 [8.7-27.8]	28.9 [23.1-35.4]	
Education level	Illiterate	80.6 [68.5-88.8]	68.7 [62.1-74.6]	0.07
	Literate	19.3 [11.1-31.4]	31.3 [25.3-37.9]	
Number of ANC visits	Between 17 and 21 wg	2.5 [2.0-2.9]	2.7 [2.4-2.9]	0.42
	After 17 wg	4.9 [4.8-5.2]	5.2 [5.1-5.4]	0.001
Proportion of women with at least one <i>P. falciparum</i> infections (microscopic+ submicroscopic) during pregnancy*		83.9%	69.2%	0.13
Number of <i>P. falciparum</i> infections (microscopic+ submicroscopic) during pregnancy*		3.2 [2.6-3.7]	2.7 [2.5-3.0]	0.07

Abbreviations: IPTp, intermittent preventive treatment in pregnancy; N, number of pregnant women; RECIPAL, Retard de croissance intra-utérin et paludisme; ANC, antenatal consultation; CI, confidence interval; wg, weeks of gestation; p-values correspond to the t-test and chi-square tests for respectively continuous and categorical variables.

\*: Proportion of women with at least one *P. falciparum* infections (microscopic+ submicroscopic) detected at scheduled and emergency ANC visits during pregnancy

\*: Number of *P. falciparum* infections for women with at least one infection during pregnancy

Table 2: Factors associated with the number of *P. falciparum* infections (microscopic+submicroscopic) after the 17th week of gestation (Multivariate negative binomial model, N=273), RECIPAL 2014-2017, Benin

Variables	Number of <i>P. falciparum</i> infection(s)				
	N	aIRR	CI 95%	p-value	
Microscopic <i>P. falciparum</i> infection at the first trimester of pregnancy	55	1.52	[1.07-2.15]	0.019	
Submicroscopic <i>P. falciparum</i> infection at the first trimester of pregnancy	79	1.75	[1.28-2.38]	<0.001	
Total number of IPTp doses during the pregnancy	2&3	211	1		
	0&1	62	1.50	[1.11-2.03]	0.009
Ethnicity	Toffin	202	1.62	[1.12-2.33]	0.010
Timing (wg) of the first IPTp intake	≤ 21.2	68	1		
	>21.2	205	1.34	[0.95-1.88]	0.098

Abbreviations: N, number of pregnant women; RECIPAL, Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme; aIRR, adjusted incidence rate ratio; wg, weeks of gestation.

Accepted Manuscript

Table 3: Factors associated with the number of *P. falciparum* infections (microscopic+submicroscopic) after the 17th week of gestation for women receiving 2 IPTp doses during the pregnancy (Negative binomial model, N=173), RECIPAL 2014-2017, Benin

Variables	Number of <i>P. falciparum</i> infection(s)			
	N	aIRR	CI 95%	p-value
Microscopic <i>P. falciparum</i> at the first trimester of pregnancy	35	1.99	[1.28-3.11]	0.002
Submicroscopic <i>P. falciparum</i> infection at the first trimester of pregnancy	51	1.99	[1.32-2.99]	0.001
Ethnicity Toffin	125	1.91	[1.20-3.04]	0.007
Timing of the first IPTp dose				
≤ 21.2 wg	40	1		
>21.2 wg	133	1.48	[0.95-2.32]	0.084

Abbreviations: N, number of pregnant women; RECIPAL, Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme; aIRR, adjusted incidence rate ratio; IPTp, intermittent preventive treatment in pregnancy; wg, weeks of gestation.

Accepted Manuscript

Table 4: Comparison of the characteristics of pregnant women with or without microscopic *P. falciparum* infection, N=273, RECIPAL 2014-2017, Benin

Characteristics		Pregnant women without microscopic <i>P. falciparum</i> infections during the pregnancy (N=157)	Pregnant women with at least one microscopic <i>P. falciparum</i> infection during the pregnancy (N=116)	p-value *
		Mean or proportion (CI 95 %)	Mean or proportion (CI 95 %)	
Age (years)		27.3 [27.0-27.6]	26.1 [25.7-26.3]	0.04
Ethnicity	Toffin	68.2 [60.4-75.0]	81.9 [73.7-88.0]	0.01
	Others	31.8 [24.9-39.6]	18.1 [12.0-26.3]	
Gravidity	< 3 pregnancies	36.9 [18.2-55.7]	41.4 [29.5-46.1]	0.46
	≥ 3 pregnancies	63.1 [44.3-81.8]	58.6 [53.9-70.5]	
Marital status	Cohabitation	6.4 [3.4-11.5]	6.9 [3.5-13.3]	0.86
	Married	93.6 [88.5-96.6]	93.1 [86.7-96.5]	
Education level	Illiterate	68.8 [61.0-75.6]	75.0 [66.2-82.1]	0.26
	Literate	31.2 [24.4-39.0]	25.0 [17.9-33.8]	
Total number of ANC visits after 17 wg		5.0 [4.8-5.2]	5.3 [5.0-5.5]	0.06
Total number of IPTp doses during the pregnancy	0&1	16.6 [11.5-23.3]	31.0 [23.2-40.1]	0.005
	2&3	83.4 [76.7-88.5]	69.0 [59.8-76.8]	
Timing of the first IPTp dose	≤ 21.2 wg	27.4 [20.9-35.0]	21.6 [14.9-30.1]	0.27
	>21.2 wg	72.6 [65.0-79.1]	78.4 [70.0-85.1]	

Abbreviations: N, number of pregnant women; RECIPAL, Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme; aIRR, ANC, antenatal care; wg, weeks of gestation.

\*Student's t-test and  $\chi^2$  test were used for comparing continuous and categorical variables, respectively.

Women with at least one submicroscopic infection after 17 weeks of gestation in the group of women with at least one microscopic infection during pregnancy were 84.4% (98/116).

Table 5: Factors associated with the number of submicroscopic *P. falciparum* infections after the 17th week of gestation during the pregnancy (Multivariate negative binomial model, N=157). Sub-sample of pregnant women without microscopic *P. falciparum* infections from the 17<sup>th</sup> wg, RECIPAL 2014-2017, Benin

Variables	Number of <i>P. falciparum</i> infection(s)			
	N	aIRR	CI 95%	p-value
Submicroscopic <i>P. falciparum</i> infection at the first trimester of pregnancy	49	2.02	[1.23-3.31]	0.005
Total number of IPTp doses during the pregnancy	2&3	131	1	
	0&1	26	1.22	[0.64-2.34] 0.543
Ethnicity	Toffin	107	1.76	[0.96-3.24] 0.068
Timing of the first IPTp dose	≤ 21.2 wg	43	1	
	>21.2 wg	114	1.72	[0.94-3.14] 0.081

Abbreviations: wg, weeks of gestation; N, number of pregnant women; RECIPAL, Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme; aIRR, adjusted incidence rate ratio; IPTp, intermittent preventive treatment in pregnancy.

Table 6: Factors associated with the number of submicroscopic *P. falciparum* infections after the 17th week of gestation for women receiving 2 IPTp doses during the pregnancy (Negative binomial model, N=105). Sub-sample of pregnant women without microscopic *P. falciparum* infections from the 17<sup>th</sup> wg, RECIPAL 2014-2017, Benin

Variables	Number of <i>P. falciparum</i> infection(s)				
	N	aIRR	CI 95%	p-value	
Submicroscopic <i>P. falciparum</i> at the first trimester of pregnancy	36	2.06	[1.10-3.87]	0.024	
Ethnicity	Toffin	71	1.93	[0.90-4.13]	0.091
Timing of the first IPTp dose	≤21.2 wg	25	1		
	>21.2 wg	80	2.11	[0.90-4.94]	0.087

Abbreviations: N, number of pregnant women; RECIPAL, Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme; aIRR, adjusted incidence rate ratio; IPTP, intermittent preventive treatment in pregnancy; wg, weeks of gestation.

Accepted Manuscript

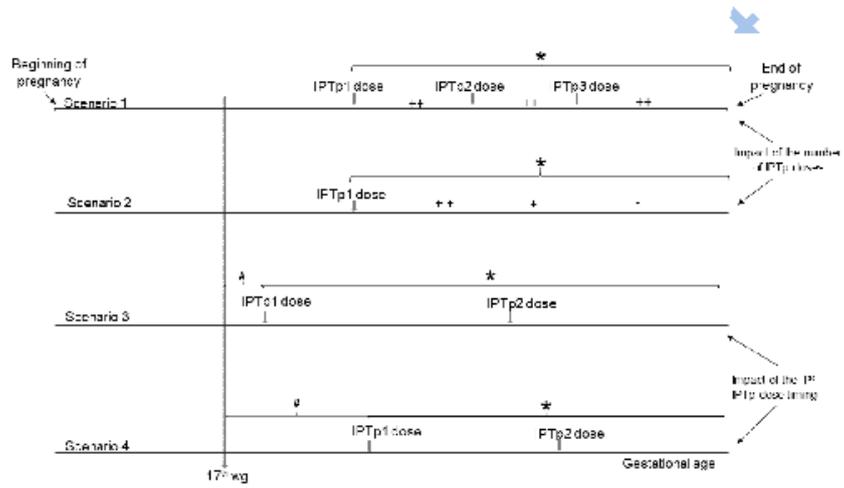


Figure 1. Example of four hypothetical scenarios illustrating the different possible impacts of number of doses and timing of IPTp-SP on the pregnant women's protection against *P. falciparum* infection

Acces

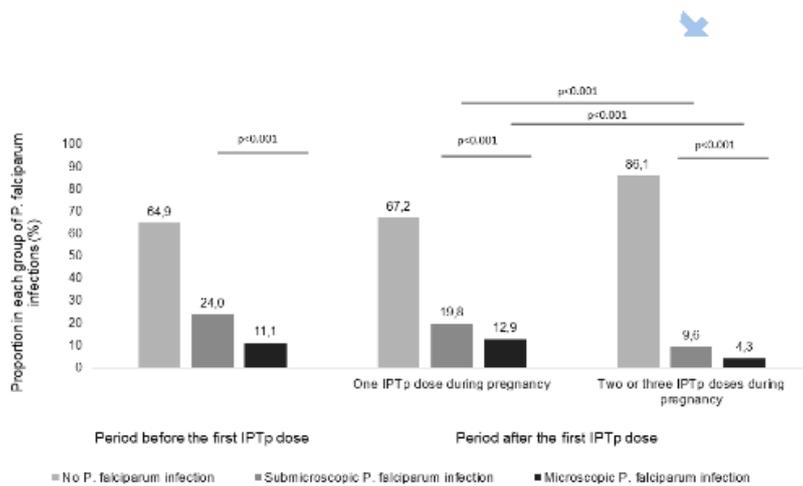


Figure 2: Proportion of *P. falciparum* with and without infection before and after the first IPTp dose for the 273 pregnant women. RECIPAL 2014-2017, Benin

ACC

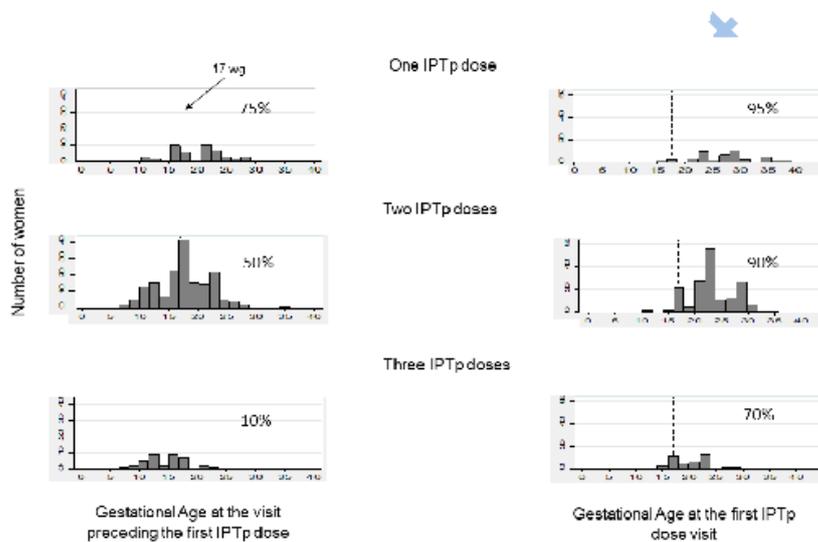


Figure 3: Distribution of gestational age, at the visit preceding the first IPTp dose and at the first IPTp dose visit, according to the total number of IPTp doses per woman during pregnancy, RECIPAL 2014-2017 (N=263), Benin

AC

5.3. *Article 3: Hounkonnou C. et al. Impact of the use and efficacy of long lasting insecticidal net on malaria infection during the first trimester of pregnancy - a pre-conceptional cohort study in southern Benin. BMC Public Health. 2018;18:683.*

#### 5.3.1. Problématique de l'article

Les mesures de lutte contre le PG consistent en l'utilisation de MIILDA dès le début de la grossesse, l'utilisation du TPIg et le traitement des cas de paludisme [4, 5]. La majorité des études montre l'effet positif du TPIg sur les indicateurs de santé maternel et fœtal. Cependant, le TPIg est contre-indiqué au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse, montrant ainsi l'absence de traitement préventif au cours de cette période. La MIILDA reste donc le seul outil de prévention disponible pouvant être utilisé au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse.

Des études ont montré que les infections par *P. falciparum* étaient plus fréquentes en début qu'en fin de grossesse et que leur survenue précoce (avant 4 mois de grossesse) était associée à un fort risque de survenue d'anémie maternelle et de FPN [118, 119, 168]. Par ailleurs, en ASS, la majorité des femmes consulte à partir du deuxième trimestre de grossesse [123, 124] pour des raisons souvent socio-culturelles. On se rend donc compte de la vulnérabilité des femmes en ASS face aux infections par *P. falciparum* au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse.

De plus, certains résultats contradictoires montrent un décalage important entre la possession, l'utilisation déclarée des MIILDA et la prévalence de l'infection palustre au Bénin [2] exposant la nécessité d'étudier les indicateurs habituellement utilisés pour estimer la protection réelle conférée par les MIILDA contre les infections microscopiques, habituellement détectées.

Aucune étude, n'a cherché à montrer l'impact réel de l'utilisation des MIILDA au cours de la grossesse et plus précisément pendant le premier trimestre. Par ailleurs, la seule utilisation d'indicateurs recueillis uniquement sur la déclaration des utilisateurs nous semblait biaisée.

Dans cet article valorisant les résultats du Master 2, nous nous sommes proposés d'étudier la protection réelle conférée par les MIILDA pour lutter contre l'infection microscopique par *P. falciparum*, détectée en routine, au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse.

Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les indicateurs usuels mais également appesantis sur d'autres indicateurs de MIILDA, l'intégrité physique et l'efficacité chimique, qui ne sont pas habituellement utilisés lors de l'appréciation de l'efficacité de cet outil de lutte.

Les données analysées dans cet article proviennent de l'étude EVALMOUS qui a permis un suivi des femmes et la collecte des données sur les MIILDA pendant le 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse.

### 5.3.2. Résumé et commentaire de l'article

#### 5.3.2.1. Résumé

Les femmes à l'inclusion avaient en moyenne 26,6 ans avec un minimum de 18 ans et un maximum de 40 ans. Environ  $\frac{3}{4}$  des femmes étaient multigestes, les primigestes et secundigestes étaient majoritairement les plus jeunes avec une moyenne d'âge de 23 ans. Les  $\frac{2}{3}$  des femmes vivaient en zone lacustre et étaient d'ethnie Toffin.

Une bonne possession des MIILDA a été observée au cours de l'étude. Environ huit femmes sur dix ont déclaré utiliser leur MIILDA la semaine précédant les visites au cours de l'étude.

Approximativement 60 % des MIILDA inspectées avaient une bonne intégrité physique mais à peine 6 % de ces MIILDA ont atteint le seuil de bio efficacité chimique recommandé par l'OMS.

L'infection microscopique par *P. falciparum* a été détectée chez 18,3% des femmes enceintes au cours du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse. Le taux d'incidence de l'infection par *P. falciparum* était de 7,18 cas pour 100 personnes-mois (IC 95%: 5.36–9.62).

Dans l'analyse multivariée, nous avons prouvé que les indicateurs d'utilisation des MIILDA par les femmes enceintes, d'intégrité physique et de bio efficacité chimique des MIILDA étaient liés au délai de survenue de la première infection par *P. falciparum* au cours du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse (HRa=0,38 ; IC95% : [0,18-0,80] ; p<0,001 ; HRa=0,59 ; IC95% : [0,29-1,19] ; p=0,07 et HRa=0,97 ; IC95% : [0,94-1,00] ; p=0,04 respectivement pour l'utilisation, l'intégrité physique et la bio efficacité des MIILDA). Nous avons également confirmé, en tenant compte de toutes les infections survenues au cours du suivi, que ces indicateurs protégeaient la femme enceinte contre la survenue d'un nombre élevé d'infections microscopiques par *P. falciparum* au cours de cette période critique de la grossesse (HRa=0,40 ; IC95% : [0,20-0,78 ] ; p<0,001 ; HRa=0,44 ; IC95% : [0,24-0,81] ; p=0,07 et HRa=0,98 ; IC95% : [0,95-0,99 ] ; p=0,04 respectivement pour l'utilisation, l'intégrité physique et la bio efficacité des MIILDA).

#### 5.3.2.2. Discussion

Cet article valorisant les résultats du master 2 nous semble intéressant pour la bonne compréhension de l'implémentation des MIILDA au premier trimestre de grossesse dans la zone d'étude de RECIPAL. Il tient uniquement compte des infections microscopiques par *P. falciparum* mais démontre de la protection non optimale des femmes enceintes par cet outil de prévention pendant cette période critique de la grossesse.

Notre but était d'étudier l'effet de trois indicateurs que sont l'utilisation, l'intégrité physique et l'efficacité biochimique des MIILDA sur l'infection palustre gestationnelle au premier trimestre de grossesse. Le premier trimestre de grossesse est défini du début de la grossesse jusqu'à 14 semaines d'aménorrhées révolues. Pour cela, nous avons étudié l'effet de ces trois

indicateurs sur le délai de survenue de la première infection palustre mais également sur le nombre d'infections palustres au premier trimestre de grossesse. Nous avons donc mis en œuvre un modèle de Cox et une régression de Poisson. Notre variable d'intérêt est la première infection palustre et le nombre d'infections palustres au premier trimestre de grossesse pour la mise en œuvre respective des modèles de Cox et de Poisson. Le modèle de Cox nous permettait d'avoir des informations sur le délai de survenue de la première infection palustre pendant la grossesse. Dans le but de compléter les informations du modèle de Cox qui ne tient compte que de la première infection dans sa mise en œuvre et donc exclu les autres infections survenues au cours du trimestre, nous avons réalisé une régression de Poisson en prenant en compte toutes les infections survenues au premier trimestre de grossesse. Ces modèles complémentaires ont permis de noter l'importance d'associer la possession et l'utilisation des MIILDA à leur intégrité physique et bio efficacité pour une protection optimale des femmes enceintes au premier trimestre de grossesse.

### 5.3.3. Hounkonnou *et al.*, BMC Public Health 2018

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Impact of the use and efficacy of long lasting insecticidal net on malaria infection during the first trimester of pregnancy - a pre-conceptional cohort study in southern Benin

Cornélia Hounkonnou<sup>1,2\*</sup>, Arnel Djènonlin<sup>3,4</sup>, Seun Egbinola<sup>5</sup>, Parfait Houngbègnon<sup>2</sup>, Aziz Bouraima<sup>4</sup>, Christophe Soares<sup>4</sup>, Nadine Fievet<sup>1</sup>, Manfred Accrombessi<sup>1,2</sup>, Emmanuel Yovo<sup>2</sup>, Valérie Briand<sup>1</sup> and Gilles Cottrell<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Malaria in pregnancy is prevalent in Sub-Saharan Africa. The first trimester of pregnancy is a critical period and the best preventive measure is Long Lasting Insecticidal Nets (LLIN). Unfortunately, few studies have been conducted which focuses on the usage and efficacy of LLIN on malaria prevention during the first trimester.

**Methods:** We assessed the use and effectiveness of LLIN in early pregnancy in Benin and its impact on malaria infection risk. We followed-up a cohort of 240 pregnant women from pre-conception to the end of the first trimester of pregnancy in Southern Benin. Parasitological, maternal and LLIN data were actively collected before, at the beginning and end of the first trimester of pregnancy. A Cox regression model was used to determine the relationship between the time to onset of the first malaria infection and the use, physical integrity, and bio-efficacy of the LLIN, adjusted for relevant covariables.

**Results:** The good use, good physical integrity and biological efficacy of LLIN were associated with a decreased risk of occurrence of the first malaria infection in early pregnancy (HRa = 0.38; (0.18–0.80);  $p < 0.001$ ; HRa = 0.59; (0.29–1.19);  $p < 0.07$ ; HRa = 0.97; (0.94–1.00);  $p < 0.04$  respectively), after adjustment for other covariates. Primi/secundigravidity and malaria infection before pregnancy were associated with a risk of earlier onset of malaria infection.

**Conclusion:** The classically used LLIN's indicators of possession and use may not be sufficient to characterize the true protection of pregnant women in the first trimester of pregnancy. Indicators of physical integrity and bio-efficacy should be integrated with those indicators in evaluation studies.

**Keywords:** Gestational malaria, First trimester, Long lasting impregnated nets, Use, Physical integrity indicator, Biological efficacy indicator

\* Correspondence: nelismila@yahoo.fr; gilles.cottrell@ird.fr

<sup>1</sup>UMR216-MERIT, French National Research Institute for Sustainable Development (IRD), Université Paris Descartes, 75006 Paris, France  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

Malaria in pregnancy results in an increased risk of low birth weight (LBW) [1–3], maternal anemia and perinatal mortality [1, 4]. World Health Organization (WHO) has implemented a prevention policy specific to this vulnerable population [5, 6], based on sulfadoxine-pyrimethamine (SP) intermittent preventive treatment in pregnant women (IPTp) and the use of Long Lasting Impregnated Nets (LLIN) from the onset of pregnancy. The IPTp comprises monthly intakes of a curative dose of SP during antenatal care visits from the second trimester of pregnancy for all pregnant women (whether infected or not). Numerous studies have shown the effectiveness of IPTp in improving maternal and child health outcomes [7–10]. However, IPTp is contraindicated in the first trimester of pregnancy leaving women in the first trimester unprotected by this control tool. Moreover, several studies have shown that the first trimester of pregnancy is a critical period during which malaria infection is associated with an increased risk of low birth weight and maternal anemia [11–13]. LLIN is the only preventive tool available for pregnant women during this period. However, it is known that pregnant women attend the maternity clinic mostly after the first trimester of pregnancy in sub-Saharan Africa [14]. Consequently, the first trimester of pregnancy is a period badly covered by the malaria prevention policy. There is evidence for the efficacy of LLIN in preventing malaria infection during pregnancy [15], to improve babies' birth weight [16]. No study has yet focused on the specific protection conferred by LLIN in the first trimester of pregnancy. In this work, using data from the follow-up of a pre-conceptional cohort carried out in South-Benin in 2015–2016, we evaluated the association between the indicators of use, physical integrity and bio-efficacy of LLINs used by pregnant women and malaria incidence during the first trimester of pregnancy.

## Methods

### Study design

EVALMOUS is a cohort study nested in the RECIPAL project, carried out in South Benin [17]. Between June 2014 and August 2017, 1214 women of childbearing age and willing to become pregnant (primary cohort) were included in a cohort follow-up. All women were screened for malaria using thick blood smear (TBS) at their inclusion and monitored monthly using a urinary pregnancy test until the identification of 411 pregnant women among them (secondary cohort). The pregnant women were then monitored monthly until delivery at the maternity clinic, where they benefited from a clinical, parasitological (by TBS), nutritional and ultrasound follow-up. Lambarene technique was used to quantify parasitaemia and the detection threshold with this method has been estimated to be 5 parasites/ $\mu$ L [18]. In addition, in the event of fever or symptoms suggestive to malaria, pregnant women were

screened using Rapid Diagnostic Tests (RDT) and treated with Artemisinin-based Combination Therapies (ACT) when tested positive for malaria according to the national guidelines [19].

EVALMOUS study held between 1st June 2015 and 31st October 2016 and aimed to assess the effectiveness of mosquito nets used by pregnant women and other members of their household in preventing malaria. The first 576 women from the RECIPAL primary cohort who agreed to participate were included in EVALMOUS study before their pregnancy and the first 240 of them to become pregnant were followed throughout the first trimester of pregnancy. Women were visited at three home visits: a first visit was performed before pregnancy and two visits during the first trimester of pregnancy. During these visits, a questionnaire was administered to the women in order to evaluate the indicators related to LLIN, namely: possession, use and physical integrity. At the last visit the mosquito net used by the pregnant women was taken for laboratory testing to assess their bio-efficacy and replaced by new ones provided by the study. Physical integrity and bio-efficacy of the LLINs were determined by the field workers using the standard WHO protocol [20].

### Variables

#### Outcome variable

Malaria infection during the first trimester of pregnancy was defined as a positive blood smear and/or a positive RDT before 15 weeks of gestation (estimated by early ultrasound scan). Timing of malaria infection was determined based on gestational age.

#### Independent variables

At each visit during the study (before pregnancy and during the first trimester of pregnancy), the use of mosquito net was defined as a binary variable, "good" if LLIN was reported to be used every day of the week preceding the visit and if it was properly installed after inspection by the investigator.

The physical integrity of nets was characterized by a hole index (hi) resulting from the characterization of the holes according to WHO protocol [20]. A mosquito net with a hi between 0 and 64 was considered as in "good" condition, a hi between 65 and 642 as in an "acceptable" state and a hi greater than 643 as in a "bad" state.

Bio-efficacy of LLIN was based on both kd60 (knock-down 60 min) and 24 h-death (mortality after 24 h) of female *Anopheles gambiae* "Kisumu strain" 2–5 days after exposure to LLIN through standard WHO cone. A LLIN was declared bio-effective when the kd60 rate induced by this LLIN is greater than or equal to 95% or when the mortality rate induced by it is greater than or equal to 80% [20].

### Statistical analysis

First, we did a descriptive analysis of the general characteristic of the women at baseline (sociodemographic, the characteristics of the LLINs and the malaria before pregnancy).

### Univariable analysis

We studied the relationship between the time to onset of the first malaria infection in the first trimester of pregnancy and each of the independent variables by a univariable Cox regression model. For each covariate, the proportional risk hypothesis was verified using the overall "p" of the Schoenfeld residue-based test. For the continuous covariates, the linearity hypothesis was verified. The comparison between the Kaplan-Meier curves of the different categories of qualitative variables was carried out by a log rank test.

### Multivariable analysis

The malaria infection and the LLINs indicators were available for 190 pregnant women out of the 240. We compared the 190 pregnant women included in the multivariable analysis and the 50 excluded women according to the age (t-test), the gestational rank, the residence area and the malaria infection before pregnancy. The comparison of the age in the two groups was performed by a t-test whereas the categorical variables were compared using a Chi2 test.

A multivariable Cox regression model was used. Adjustment factors were age (in years) of the pregnant women (quantitative variable recoded in quartiles); the gestational rank (less than 3 pregnancies/more than 3 pregnancies); marital status (unmarried/married); pre-pregnancy malaria infection during the pre-pregnancy visit; ethnicity (Tofin/other); level of education (literate/illiterate); occupational status (employed/unemployed) and residential area (lake area/land area).

First, all covariates were introduced in the model and a backward step-by-step strategy was performed to eliminate non-significant cofactors. At the end of the analysis, only the cofactors associated with the variable to be explained at the 5% *p*-value threshold were retained in the final model in addition to the LLIN indicator variables. As we considered in this study one-sided alternative hypotheses (i.e. better use, better physical integrity and better bio-efficacy would confer protection against malaria), we used one-sided *p*-values with a threshold of significance at 5%.

During the study, six pregnant women had at least 2 malaria infections during the first trimester of pregnancy. In order to assess the determinants of the number of infections, we performed a multivariable Poisson regression model, regressing the same covariates (as in the Cox model) on the number of infections in the first trimester. In addition, in order to take into account the

different number of measures between the women, an offset (the log of the number of visits) has been introduced in the model.

The analyses were carried out with STATA software version 13.1 (STATA Corporation, Texas).

### Results

Five hundred and seventy-six pregnant women were included in the EVALMOUS study. Figure 1 shows the flow chart during follow-up of these women. We included 240 pregnant women. At the end of the eighteen months of follow-up, the proportion of drop-out, miscarriages, and refusals was 0.42%; 8.33 and 5% respectively. The bioassays were carried out in the laboratory on 324 LLINs at the end of the first trimester.

The characteristics of the pregnant women included in the study are shown in Table 1. Among the 240 women, the prevalence of malaria infection before pregnancy was 4.41% and the proportion of infected pregnant women during the first trimester of pregnancy was 18.33%. All women except one had an LLIN.

During pregnancy, all but one of the women had LLINs. Most of pregnant women (83.25%) had used their LLIN properly during the week prior to the visits. About 60% of the LLINs inspected were in good physical condition. On the other hand barely 6% of LLINs tested in the laboratory were bio-effective. Table 2 recapitulates the characteristics of the LLINs indicators inspected.

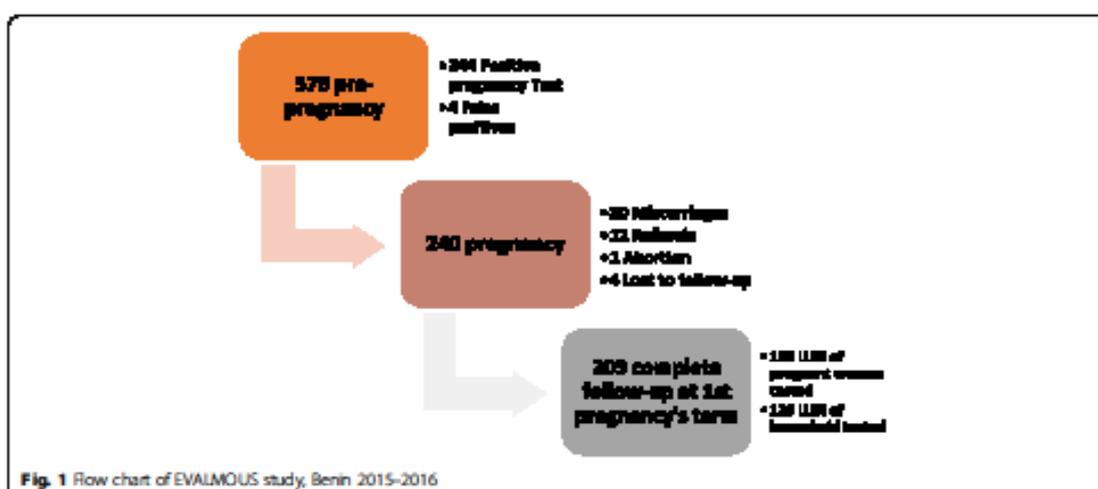
Table 3 shows the different proportions of malaria infection during the different visits of the first trimester of pregnancy. The median time between onset of malaria before pregnancy and the beginning of pregnancy was 7.6 months with an interquartile range of (4.9–8.5).

Figure 2 shows the probability of non-occurrence of malaria infection in pregnant women as a function of time during the first trimester of pregnancy. The incidence rate of malaria infections was 7.18 cases per 100 person-months (95% CI: 5.36–9.62).

The group of women not included in the multivariate analysis did not differ significantly from the included pregnant women, according to the 4 variables: age, residence area, gestational rank and malaria before pregnancy (respective *p*-values = 0.48; 0.29; 0.24 and 0.58 respectively). Based on those results, excluding the 50 women from the multivariable model does not seem to have led to a major selection bias.

The variables selected in the final multivariate model respected the proportional hazard assumption according to the Schoenfeld residuals method.

Additional file 1: Table S1 and Table 4 respectively summarize the univariate Cox regression model and the final multivariate Cox model. After adjustment, the use of LLIN by pregnant women was marginally significant, whereas the physical integrity, the LLIN's quantitative



**Table 1** Characteristics of pregnant women at the inclusion, Sô-Ava and Akassato, Benin 2015–2016 ( $N = 240$ )

Characteristics	Pre-pregnancy	
	Total	Mean or proportion (95% CI)
Age (years)	240	26.61 ± 4.78
Gestational rank	240	
Primigravida	22	9.17 (5.49; 12.84)
Secundigravida	36	15.00 (10.45; 19.55)
Multigravida	182	75.83 (70.38; 81.29)
Ethnic Group	240	
Tofin	156	65.00 (58.92; 71.08)
Others	84	35.00 (28.92; 41.08)
Education level	240	
Illiterate	161	67.08 (61.09; 73.07)
Literate	79	32.92 (26.93; 38.90)
Occupational status	240	
Employed	221	92.08 (88.64; 95.52)
Unemployed	19	7.92 (4.48; 11.36)
Marital status	240	
Cohabitation	11	4.58 (1.92; 7.25)
Married (monogamy)	159	66.25 (60.22; 72.27)
Married (polygamy)	70	29.17 (23.37; 34.96)
Residence area	240	
Lake area	156	65.00 (58.92; 71.08)
Land area	84	35.00 (28.92; 41.08)
Pre-pregnancy malaria	227	
Yes	10	4.41 (1.72; 7.10)
No	217	95.59 (92.90; 98.28)

bio-efficacy and malaria infection in pre-pregnancy were significantly associated with the time to onset of the first malaria infection in the first trimester of pregnancy.

We also performed a Poisson model to study the effect of the three indicators of LLIN on the number of malaria infections occurring during the first trimester of pregnancy adjusted for the same covariates. In this analysis (Additional file 2: Table S2), the three indicators of the LLINs (the use, the physical integrity and the quantitative bio-efficacy) were significantly associated with the incidence of malaria infection during the first trimester of pregnancy, (IRRa = 0.40; (0.20–0.78);  $p < 0.003$ ; IRRa = 0.44; (0.24–0.81);  $p < 0.0004$ ; IRRa = 0.98; (0.95–0.99);  $p < 0.02$  respectively), confirming the results of the Cox model.

## Discussion

The peculiarity of our study was the ability to have followed the women from the pre-conceptional period until the end of the first trimester of pregnancy. This study identified two sets of essential results, i) the refined characterization of the protection given to the pregnant women by the LLIN against malaria infection during the first trimester of pregnancy and ii) new important elements in the reflection on the different indicators of LLIN's efficiency that characterize properly the real protection of pregnant women against malaria during this critical period.

We observed a general high possession and good use of LLIN by the study pregnant women. This is probably an indication of the success of the LLIN mass distribution campaigns carried out previously in Benin in 2011 and 2014. In all, the Cox model confirmed our working hypothesis that the different indicators were significantly related to the delay in malaria infection. Precisely, good

**Table 2** Indicators of possession, use, physical integrity and chemical efficacy of LLINs inspected during follow-up, Sô-Ava and Akassatq, Benin 2015–2016 (N = 240)

Characteristics	Pre-pregnancy		Pregnancy visit 1		Pregnancy visit 2	
	Total	Mean or proportion (95% CI)	Total	Mean or proportion (95% CI)	Total	Mean or proportion (95% CI)
Possession of at least one LLIN/household	240		240		203	
Yes	237	98.75 (96.17; 97.60)	239	99.53 (97.06; 99.94)	202	99.51 (96.53; 99.93)
No	3	1.25 (0.40; 3.83)	1	0.42 (0.06; 2.94)	1	0.49 (0.07; 3.47)
Possession of LLIN according to WHO standards (1 LLIN/2 people)	237		239		202	
Yes	178	75.11 (69.16; 80.23)	185	77.41 (71.63; 82.30)	164	81.19 (75.14; 86.03)
No	59	24.89 (19.77; 30.84)	54	22.59 (17.70; 28.37)	38	18.81 (13.96; 24.85)
Use of LLIN by pregnant women	237		239		202	
Yes	199	83.97 (78.69; 89.13)	203	84.94 (79.78; 88.96)	178	88.12 (82.83; 91.93)
No	38	16.03 (11.86; 21.31)	36	15.06 (11.04; 20.22)	24	11.88 (8.06; 17.17)
Physical integrity of pregnant woman's LLIN	237		239		202	
Good	156	65.82 (59.51; 71.62)	145	60.67 (54.29; 66.70)	115	56.93 (49.95; 63.64)
Bad	81	34.18 (28.38; 40.49)	94	39.33 (33.30; 45.71)	87	43.07 (36.36; 50.05)
Physical integrity of household's LLIN	169		195		164	
Good	101	59.76 (52.12; 66.90)	117	60.00 (52.91; 66.70)	96	58.54 (50.77; 77.90)
Bad	68	40.24 (33.04; 47.88)	78	40.00 (33.30; 47.09)	68	41.46 (34.10; 49.23)
Bio-efficacy of pregnant women's LLIN					198	
Yes	–		–		12	6.06 (3.46; 10.41)
No	–		–		186	
Bio-efficacy of household's LLIN					126	
Yes	–		–		7	5.56 (2.64; 11.30)
No	–		–		119	94.44 (88.70; 97.36)

use, good physical integrity and the quantitative bio-efficacy of the LLIN were found to be associated with a later occurrence of the first malaria infection during the first trimester of pregnancy. In this model the physical integrity of the LLIN was associated only marginally significantly with the delay of the first malaria infection but showed significant associations in the Poisson regression model. Five pregnant women had malaria infection twice in our study. Two studies did not find any association between LLIN usage by pregnant women and the risk of malaria infection [21, 22]. Since the effectiveness of LLIN to reduce the malaria burden has been extensively established [23] including in pregnant women [15, 24–28], those result show probably the

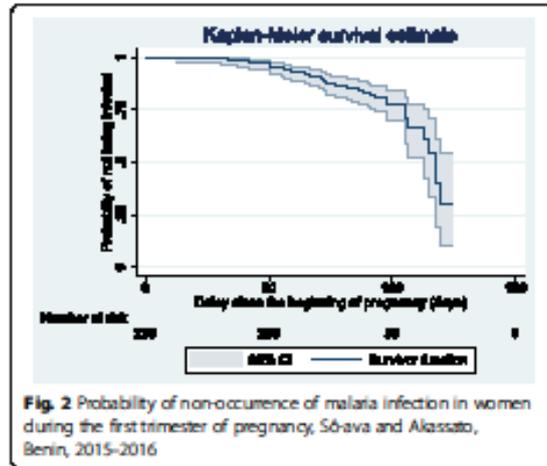
limit of the two classical indicators of ownership and reported LLIN use the previous night to characterize adequately the optimal protection of the pregnant woman against the occurrence of a malaria infection. All these elements point out the need to consider, in addition to the classical ownership and reported use indicators, the physical integrity and bio-efficacy indicators should be taken into account in evaluation studies of LLIN efficiency to reduce the malaria burden in pregnant women.

In our study, the high proportions of good use and LLINs with good physical integrity are in favor of a good physical barrier conferred by LLIN to the pregnant women during the first trimester of pregnancy. Nevertheless, a more worrying result was the small minority of

**Table 3** Proportion of pregnant women infected during the first trimester of pregnancy, Sô-Ava and Akassatq, Benin 2015–2016

Malaria infection	Pre-pregnancy visit		Visit 1		Visit 2		Visit 3	
	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)
Total	227		234		199		180	
Yes	10	4.41 (2.37; 8.03)	14	5.98 (3.56; 9.88)	10	5.02 (2.71; 9.13)	17	9.44 (5.92; 14.73)

A total of 239 pregnant women were followed during 624.63 person-months, with a median follow-up time of 88 days (interquartile interval 65–95)



LLIN reaching the bio-efficacy threshold set by the WHO recommendations. This raises the highly important question of the duration of the LLINs bio-efficacy in field conditions. Given that optimal protection by the LLIN is provided by the combination of its physical barrier and chemical efficacy, we can conclude that the extreme majority of women in the study were not optimally protected against malaria in the first trimester of their pregnancy by the LLIN they used. This important conclusion would have been missed if only based on the ownership and usage classical indicators.

**Table 4** Factors associated with the time to onset of the first malaria infection during the first trimester of pregnancy (multivariate Cox model,  $N = 190$  pregnant women); Sô-Ava and Akassato, Benin 2015–2016

Variables (terms)	Multivariable Cox model			
	N	HRa	CI 95%	pvalue
Use of LLIN by the woman the week before the visit	190			
	No	36	1	
	Yes	154	0.38 (0.18–0.80)	<0.001
Physical integrity of the pregnant woman's LLIN	190			
	Bad	78	1	
	Good	112	0.59 (0.29–1.19)	0.07
Quantitative bio-efficacy <sup>a</sup> of the pregnant woman's LLIN	190	0.97	(0.94–1.00)	0.04
Malaria before pregnancy	190			
	Yes	9	1	
	No	181	0.27 (0.09–0.74)	0.01

*N* Total; *HRa* Hazard ratio adjusted; *CI* 95% Confidence Interval at 95%; *LLIN* Long Lasting Impregnated bedNets; *pvalue* one-sided *pvalue*

<sup>a</sup>Quantitative bio-efficacy is defined as the proportion of female anophelids who died 24 h after exposure to the LLIN

A strength of our study is that for the first time in a malaria cohort, the women were seen at a pre-conceptional stage which allowed to follow them on the very beginning of their pregnancy. This is an important strength compared to non preconceptional studies. Although our results indicate minimal selection bias, the moderate size of our sample and the particular facies of the study area (lake zone) impose some caution on the representativeness of the results.

## Conclusion

Our study demonstrated for the first time an overall good physical protection against the malaria vector conferred by LLIN in pregnant women in their first trimester of pregnancy, but low chemical protection in our study area. An important conclusion is that, in addition to the traditional indicator of possession of LLINs by pregnant women, it is essential to take into account other indicators such as actual use, physical integrity and bio-efficacy of LLIN, since all these indicators reflect independently from each other the real protection against malaria of this population. Further studies are then needed to assess the generalizability of our results and also to control the duration of the chemical effectiveness of the LLIN distributed on the territory.

## Additional files

**Additional file 1:** Table S1. Factors associated with delay in the first malaria infection during the first trimester of pregnancy, univariate Cox analysis ( $N = 240$ ); Sô-ava and Akassato, Benin 2015–2016. (DOCX 23 kb)

**Additional file 2:** Table S2. Factors associated with the number of malaria infections during the first trimester of pregnancy (multivariate Poisson regression model,  $N = 194$  pregnant women); Sô-ava and Akassato, Benin 2015–2016. (DOCX 16 kb)

## Abbreviations

ACT: Artemisinin Combined Therapy; CER/ISBA: Ethics Committee of the Institute of Applied Biomedical Sciences; HRa: Hazard Ratio adjusted; IPTp: Intermittent Preventive Treatment in Pregnant women; IRa: Incidence Rate Ratio adjusted; LBW: Low Birth Weight; LLIN: Long Lasting Insecticidal Nets; RDT: Rapid Diagnostic Tests; SP: Sulfadoxine - Pyrimethamine; TBS: Thick Blood Smear; WHO: World Health Organization

## Acknowledgements

We acknowledge all the pregnant women, health center and field workers and the local authorities of Sô-Ava and Akassato Districts who participated in the EVALMOUS study.

## Funding

This work was supported by "Expertise France – Initiative 516" (Mission n° 15SANINI1Q, "Fondation Simone Beer" under the aegis of "Fondation de France" and the French "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-13-SV1-004-01).

## Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Authors' contributions

Project management: CH, AD, VB and GC (Principal Investigator). Field, Epidemiology and data collection: CH, AD, MA, EY and GC. Biology and

molecular analyses: NF, LUN's laboratory tests: AB, CS and AD. Mapping: SE, CH and GC. Statistical analysis: CH, AD, PH and GC. Manuscript writing: CH, AD, SE, PH, AB, CS, NF, MA, EY, VB and GC. All authors read and approved the final manuscript.

#### Ethics approval and consent to participate

The RECAPAL and EVALMOUS studies have received the ethical approval from the Ethics Committee of the Institute of Applied Biomedical Sciences (CER-ISA: n° 60 of the 06/01/2015) and the Ministry of Health in Benin as well as from the Comité Consultatif de Déontologie et d'Éthique (CCDE) from IRD in France. Before any inclusion in the study, free and informed consent was obtained from each woman after the study had been presented to her in the local language.

#### Consent for publication

Not Applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Author details

<sup>1</sup>UMR216-MERIT, French National Research Institute for Sustainable Development (IRD), Université Paris Descartes, 75006 Paris, France. <sup>2</sup>Centre d'étude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance (CERPAGE), Faculté des Sciences de la Santé, Cotonou, Bénin. <sup>3</sup>Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin. <sup>4</sup>Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Cotonou, Bénin. <sup>5</sup>University of Ibadan, Ibadan, Nigeria.

Received: 10 January 2018 Accepted: 23 May 2018

Published online: 31 June 2018

#### References

- Schantz-Dunn J, Nour NM. Malaria and Pregnancy: a Global Health perspective. *Rev Obstet Gynecol.* 2009;2(3):186–92.
- Ayoala OQ, Whitmore A, Balogun WQ, Jarret OC, Cruickshank JK, Clayton PE. Maternal malaria status and metabolic profiles in pregnancy and in cord blood: relationships with birth size in Nigerian infants. *Malar J.* 2012;11:75.
- Menéndez C, Romagosa C, Small MR, Cantlho C, Saute F, Osman N, et al. An Autopsy Study of Maternal Mortality in Mozambique: The Contribution of Infectious Diseases. *Wright L, editor. PLoS Med.* 2008;5(2):e44.
- Guyatt HL, Snow RW. The epidemiology and burden of plasmodium falciparum-related anaemia among pregnant women in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64(1 suppl):36–44.
- WHO | Malaria in pregnant women. Available from: [http://www.who.int/malaria/areas/high\\_risk\\_groups/pregnancy/en/](http://www.who.int/malaria/areas/high_risk_groups/pregnancy/en/). Accessed 17 Aug 2017.
- WHO-HIM-GMP-2017-4-frepdf. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254913/1/WHO-HIM-GMP-2017-4-frepdf?ua=1>. Accessed 28 Apr 2017.
- Briand V, Cottrell G, Massougbodji A, Cot M. Intermittent preventive treatment for the prevention of malaria during pregnancy in high transmission areas. *Malar J.* 2007;6(1):160.
- Shulman CE, Dorman EK, Cutts F, Kawuondo K, Bulmer JN, Peshu N, et al. Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 1999;353(9153):632–6.
- Njagi JK, Magnussen P, Estambale B, Ouma J, Mugo B. Prevention of anaemia in pregnancy using insecticide-treated bednets and sulfadoxine-pyrimethamine in a highly malarious area of Kenya: a randomized controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(3):277–82.
- Schultz LJ, Steketee RW, Macheso A, Kazembe P, Chitsulo L, Wirima JJ. The efficacy of antimalarial regimens containing Sulfadoxine-Pyrimethamine and/or chloroquine in preventing peripheral and placental plasmodium falciparum infection among pregnant women in Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51(5):515–22.
- Valea I, Tinto H, Drabo MK, Huybregts L, Sorgho H, Ouedraogo J-B, et al. An analysis of timing and frequency of malaria infection during pregnancy in relation to the risk of low birth weight, anaemia and perinatal mortality in Burkina Faso. *Malar J.* 2012;11:71.
- Huyeh B-T, Fievet N, Gbaguidi G, Dachavame S, Borgella S, Guézo-Mévo B, et al. Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anaemia in Benin. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(2):214–20.
- Cottrell G, Mary J-Y, Baro D, Cot M. The importance of the period of malarial infection during pregnancy on birth weight in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(5):849–54.
- Ouedraogo S, Koura GK, Accrombessi MM, Bodeau-Livinec F, Massougbodji A, Cot M. Maternal anaemia at first antenatal visit: prevalence and risk factors in a malaria-endemic area in Benin. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(3):418–24.
- Gamble C, Bwari P, Garner P, ter Kuile FO. Insecticide-treated nets for the prevention of malaria in pregnancy: a systematic review of randomised controlled trials. *PLoS Med.* 2007;4(3):e107.
- Bennett A, Smith SJ, Yambasu S, Jambai A, Alemu W, Kabano A, et al. Household possession and use of insecticide-treated mosquito nets in Sierra Leone: 6 months after a national mass-distribution campaign. *PLoS One.* 2012;7(5):e37927.
- Accrombessi M, Yovo E, Cottrell G, Agbota G, Garner A, Martin-Prevel Y, et al. Cohort profile: effect of malaria in early pregnancy on fetal growth in Benin (RECAPAL pre-conceptional cohort). *BMJ Open.* 2018;8(1):8.
- Planche T, Krishna S, Kombila M, Engel K, Faucher J-F, Nguu-Mwama E, et al. Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(5):599–602.
- WHO Guidance for MIP Prevention and Treatment.pdf. Available from: [http://www.mchp.net/sites/default/files/03\\_920620WHO920Guidance920for920MIP920Prevention920and920Treatment.pdf](http://www.mchp.net/sites/default/files/03_920620WHO920Guidance920for920MIP920Prevention920and920Treatment.pdf). Accessed 19 Jan 2017.
- World Health Organization, others. Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions. *Guidel Monit Durab Long-Lasting Insecticidal Mosq Nets Oper Cond.* 2011. Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44610>. Accessed 9 May 2017.
- Famanta A, Diakité M, Diawara S, Diakité SA, Daumbia S, Traoré K, et al. Prévalence du paludisme maternel, placentaire et du petit poids de naissance au cours du travail d'accouchement et en post-partum en milieu perturbé à Bamako (Mali). *Santé.* 2011;21(1):3–7.
- Ouattara AF, Dagnogo M, Ollano R, Rao G, Tanner M, Utzinger J, et al. Plasmodium falciparum infection and clinical indicators in relation to net coverage in central Côte d'Ivoire. *Parasit Vectors.* 2014;7(1):306.
- Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015. *Nature.* 2015;526(7572):207–11.
- Shulman CE, Dorman EK, Talisuna AQ, Lowe BS, Nevill C, Snow RW, et al. A community randomized controlled trial of insecticide-treated bednets for the prevention of malaria and anaemia among primigravid women on the Kenyan coast. *Tropical Med Int Health.* 1998;3(3):197–204.
- Lengeler C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;2CD000063.
- Ter Kuile FO, Terlouw DJ, Phillips-Howard PA, Hawley WA, Friedman JF, Kariki SK, et al. Reduction of malaria during pregnancy by permethrin-treated bed nets in an area of intense perennial malaria transmission in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69:50–60.
- Browne EN, Maude GH, Birka FN. The impact of insecticide-treated bednets on malaria and anaemia in pregnancy in Kasena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. *Trop Med Int Health TMIH.* 2001;6(9):667–76.
- Kayentao K, Garner P, van Bjik AM, Naidoo J, Roper C, Mulkozi A, et al. Intermittent preventive therapy for malaria during pregnancy using 2 vs 3 or more doses of sulfadoxine-pyrimethamine and risk of low birth weight in Africa: systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2013;309(6):594–604.

## *VI. DISCUSSION*

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes basée sur une cohorte de 273 femmes enceintes dans le but, d'une part d'étudier finement la dynamique et les déterminants des infections submicroscopiques par *P. falciparum* au cours des différents trimestres de la grossesse avec un accent particulier sur le premier trimestre et, d'autre part, d'évaluer l'impact des différents moyens de prévention actuellement recommandés pendant la grossesse sur ces infections. L'aspect particulier de notre étude consiste en un suivi des femmes depuis la préconception jusqu'à l'accouchement, permettant ainsi l'obtention de données (en particulier sur les infections par *P. falciparum*) dès le début de la grossesse.

Les infections submicroscopiques par *P. falciparum* constituent actuellement un problème majeur de santé publique au niveau mondial, dans les zones à basse comme forte transmission palustres, de par sa contribution (i) à la transmission de la maladie [14, 17], (ii) à l'augmentation du risque de développement des infections microscopiques [46] mais également (iii) à la morbidité maternelle et périnatale [18, 32, 33].

Dans un premier temps, nous discuterons de la pertinence de l'étude des infections submicroscopiques par *P. falciparum* pendant la grossesse et de l'apport de nos résultats sur la compréhension de ce sujet. Suite à cela, nous présenterons les forces et limites de l'étude, puis une mise en perspective des résultats et terminerons par une analyse des enjeux de santé publique qui en découlent afin d'aboutir à quelques recommandations.

### **6.1. Rappel des principaux résultats obtenus**

Cette étude nous a permis de dégager des résultats essentiels. Nous avons confirmé l'existence d'un large réservoir d'infections submicroscopiques par *P. falciparum* chez les femmes enceintes pendant la grossesse avec une proportion plus élevée au premier trimestre comparativement aux deux derniers trimestres de la grossesse. L'existence de ces infections submicroscopiques avant la grossesse augmente le risque de survenue d'infections

microscopiques et submicroscopiques tout le long de la grossesse avec un risque plus élevé au premier trimestre de grossesse. Ceci laisse supposer l'existence de la persistance des infections de la pré-grossesse pendant les premiers mois de grossesse en plus de potentielles nouvelles infections acquises au cours de la grossesse. Un groupe particulièrement à risque de survenue d'infections palustres aux différents trimestres de la grossesse a été identifié. Il s'agit des jeunes femmes (<26 ans) en âge de procréer ayant une infection submicroscopique avant le début de la grossesse. Face à cela, la question des moyens de lutte actuels se pose. Nos résultats montrent que l'utilisation actuelle des MIILDA, seul outil de prévention pendant le premier trimestre de grossesse, ne permet pas une protection optimale des femmes au premier trimestre de grossesse, période critique [122]. La persistance des infections de la pré-grossesse pendant la grossesse prouve l'inefficacité de la MIILDA à protéger optimalement la femme enceinte en début de grossesse.

De plus, l'implémentation et l'utilisation actuelle du TPIg recommandé à partir du deuxième trimestre de grossesse est sous-optimale. D'une manière générale, certains indicateurs des outils de prévention qui ne sont actuellement pas pris en compte dans l'évaluation de la protection des femmes enceintes contre le paludisme nous ont paru jouer un rôle important. Pour les MIILDA, il s'agit en plus de leur possession et utilisation vérifiée, de la nécessité de tenir compte de leur bonne intégrité physique et efficacité chimique. Pour le TPIg, il s'agit d'accentuer les pratiques sur la prise précoce de la première dose en plus du nombre de doses recommandé pendant la grossesse. Enfin, nous avons montré la nécessité de comprendre les freins liés à la mise en application effective des distributions du TPIg aux femmes enceintes et de sensibiliser aussi bien les femmes que le personnel soignant.

## 6.2. *Les infections submicroscopiques par P. falciparum pendant la grossesse*

Dans l'actuel contexte d'élimination du paludisme au niveau mondial, les infections submicroscopiques par *P. falciparum* constituent un important problème de santé publique. La compréhension de leur dynamique ainsi que des différents déterminants agissant sur cette dynamique pourrait permettre de trouver des solutions appropriées dans la lutte contre la maladie. Les données scientifiques existant sur le sujet montrent une participation à la transmission du paludisme [16, 17, 14], une prévalence plus élevée de ces infections comparativement aux infections microscopiques diagnostiquées en routine et une participation probable à la survenue d'issues défavorables de grossesse. Un manque de connaissances sur ces infections submicroscopiques réside dans le fait que les données existantes ne proviennent pas d'études conçues dans le but d'évaluer l'impact des infections submicroscopiques survenant dès le début de la grossesse sur l'épidémiologie de la maladie. L'étude RECIPAL, étant une étude préconceptionnelle, a permis d'obtenir des données scientifiques rigoureuses sur les infections survenant au cours de la grossesse et en particulier dès le tout début de la grossesse.

Notre étude a montré que la proportion d'infections submicroscopiques était plus élevée que celle des infections microscopiques tout le long de la grossesse. Ceci est en cohérence avec les résultats d'autres études prouvant la grande importance du réservoir d'infections submicroscopiques par rapport à celle prédite par les infections microscopiques [15, 18]. Le taux d'incidence cumulée des infections submicroscopiques était deux fois plus élevé que celui des infections microscopiques au cours de la grossesse. D'autre part, la dynamique des infections submicroscopiques n'était pas constante aux différents trimestres de la grossesse. Au cours de l'étude, nous avons constaté que la prévalence des infections submicroscopiques était plus élevée au cours du premier trimestre de grossesse comparativement aux deuxième et

troisième trimestres de la grossesse. La différence de risque d'infections palustres aux différents trimestres de grossesse pourrait s'expliquer par la coexistence de deux phénomènes : la persistance des infections de la pré-grossesse pendant les premiers mois de grossesse et l'apparition de nouvelles infections en début de grossesse dues à une exposition précoce des femmes enceintes au paludisme au cours de la grossesse.

L'hypothèse d'une susceptibilité précoce des femmes enceintes à contracter le paludisme est en accord avec des études menées au Bénin et au Malawi qui ont montré une plus forte prévalence des infections submicroscopiques survenues avant 4 mois de grossesse comparativement au reste de la grossesse [18, 178, 179].

Nous avons constaté que les infections submicroscopiques survenant en période pré-conceptionnelle augmentaient le risque de survenue des infections par *P. falciparum* du premier trimestre. Des études réalisées en ASS ont déjà suggéré voire montré que les femmes infectées avant la grossesse étaient plus exposées au risque d'être infectées au premier trimestre [121, 178, 180]. Une étude récente, réalisée dans la même zone d'étude que RECIPAL au Sud du Bénin, portant sur les femmes nulligestes suivies pendant leur première grossesse, a montré que les infections survenant au cours du premier trimestre étaient principalement (70%) composées de génotypes persistants de *P. falciparum* contractés avant la grossesse [178]. Dans ce même ordre d'idées, le génotypage des 66 échantillons provenant de l'étude RECIPAL avec des résultats de PCR positives aussi bien lors de la visite avant la conception que lors de la première visite prénatale a révélé qu'environ 50% des infections détectées en début de grossesse étaient similaires à celles d'avant la grossesse [181] témoignant donc d'une persistance des infections de la pré-grossesse pendant les premiers de la grossesse. Cela confirme que les infections survenues avant la grossesse peuvent persister jusqu'au début de la grossesse [121, 178, 181]. Ces infections de la pré-conception constituent

alors une part importante de la proportion d'infections du premier trimestre en plus des nouvelles infections que les femmes pourraient contracter en cette période.

Par ailleurs, il a été démontré que les femmes enceintes étaient mal protégées au cours du premier trimestre de grossesse [122, 182]. Ceci est dû (i) au faible taux d'utilisation des MIILDA par les femmes enceintes surtout par les primigestes et (ii) à la mauvaise protection conférée par les MIILDA utilisées par les femmes au cours de leur grossesse [122]. Les recommandations nationales stipulent que les MIILDA doivent être distribuées aux femmes enceintes lors de leur première CPN. La distribution tardive des MIILDA aux femmes lors des CPN [183, 184] en partie due aux consultations tardives des femmes africaines (souvent à partir du deuxième trimestre de grossesse) [123–125] empêche leur protection optimale au cours du premier trimestre de grossesse. Au cours du suivi régulier de notre étude, nous avons quand même découvert une très bonne utilisation des MIILDA par les femmes enceintes (99%) au cours du premier trimestre de grossesse, leur conférant ainsi une protection physique relativement bonne, sachant que l'intégrité physique de ces MIILDA n'est pas forcément optimale [122]. Malheureusement, la protection biochimique propre aux MIILDAs était très faible (7% des MIILDA des femmes étant bio-efficaces), diminuant ainsi la protection réelle que doivent procurer les MIILDAs aux femmes enceintes. Cela a permis de démontrer que la protection des MIILDAs, passant aussi bien par la barrière physique que par l'efficacité biochimique, impacte le délai de survenue de la première infection palustre au premier trimestre de grossesse [122]. Par ailleurs, l'utilisation actuelle des MIILDA n'empêche pas (i) la persistance des infections submicroscopiques survenues avant grossesse pendant le premier trimestre de grossesse [181] ou (ii) leur aggravation en infections microscopiques au cours du premier trimestre de grossesse [178].

L'implication des infections de la pré-grossesse sur le risque de survenue des infections au premier trimestre de grossesse ainsi que la mauvaise protection des femmes au début de la

grossesse pourraient donc expliquer, au moins en partie, la forte prévalence des infections par *P. falciparum* au premier trimestre de grossesse.

Au cours de la grossesse, nous avons noté une diminution marquée de la prévalence des infections submicroscopiques à partir du deuxième trimestre dans la dynamique des infections par *P. falciparum*. Cette diminution du risque de survenue des infections semble coïncider avec la période d'utilisation du TPIg. En effet, le TPIg à la SP est contre-indiqué au premier trimestre à cause des possibles effets tératogènes sur le fœtus [138–140, 185, 186] et recommandé dès le second trimestre de grossesse. Des études ont déjà montré le rôle joué par le moment d'administration du TPIg sur le risque d'infections palustres pendant la grossesse [187, 188]. Le TPIg à la SP est reconnu pour ses effets curatif (élimination des parasites placentaires) et post-prophylactique sur les infections microscopiques au cours de la grossesse [189, 190]. Nous avons suggéré dans nos résultats que la prise tardive de la première dose de TPIg augmentait le nombre d'infections submicroscopiques à partir du second trimestre de grossesse. Nous avons également montré une augmentation du risque de survenue d'un nombre élevé d'infections par *P. falciparum* après 17 SA, indépendamment de l'utilisation du TPIg, chez une femme ayant un antécédent d'infection submicroscopique au premier trimestre, suggérant un déficit d'action du TPIg sur les infections submicroscopiques.

Une manière d'évaluer un tant soit peu l'évolution des infections après la prise de TPIg a été de voir la proportion de femmes infectées pendant et après la prise de TPIg. Nous avons ainsi remarqué que 14% des 263 femmes ayant eu un TPIg pendant la grossesse étaient indemnes d'infection à la CPN d'une prise de TPIg et ont eu une infection (submicroscopique ou microscopique) à la CPN suivant la prise dudit TPIg. De plus, 8% des 263 femmes avaient une infection lors de la prise de TPIg et étaient toujours infectées à la CPN suivant la prise de TPIg. Ceci montre que le TPIg n'est pas efficace de façon optimale pour empêcher la survenue de nouvelles infections ou pour nettoyer complètement toutes les infections déjà

existantes. Des données de géotypages, non disponibles pendant notre thèse, permettraient de voir si les nouvelles infections et les infections persistantes sont dues à de nouveaux clones de souches parasitaires ou à la réactivation d'anciennes souches parasitaires. Pour avoir une idée de l'impact du nombre de doses sur la survenue de nouvelles ou la persistance des infections après le TPIg, nous avons estimé la proportion de femmes infectées après la prise de deux doses de TPIg. Ce sous-échantillon de femmes ayant deux doses de TPIg correspond à la majorité des femmes de notre étude, soit 63%, ayant reçu le TPIg pendant le suivi. Nous avons noté que parmi les femmes ayant eu deux doses de TPIg pendant la grossesse, 7% se sont réinfectées et 4% ont eu une infection persistante après une prise de TPIg. Une proportion non négligeable de femmes ayant reçu deux doses de TPI se retrouvent donc infectées après la prise de la SP. Ceci montre le manque d'efficacité de l'effet post-prophylactique et curatif de la SP au vu de l'émergence des phénomènes de résistance à la SP en Afrique. Du fait que la demi-vie de la sulfadoxine est de 7 jours et celle de la pyriméthamine de 3 jours et de l'augmentation des résistances à la SP en Afrique [190], la survenue de nouvelles infections ou la persistance d'infections entre deux prises de TPIg (en médiane 6 semaines dans notre étude) n'est pas étonnant. Dans tous les cas, cela amène à réfléchir sur la nécessité de recommander une molécule capable d'avoir une action aussi bien curative que prophylactique sur les infections submicroscopiques et microscopiques afin de protéger optimalement les femmes pendant la grossesse.

Un autre constat a été la légère augmentation de la prévalence des infections submicroscopiques vers la fin du troisième trimestre de grossesse. Cette légère augmentation des infections submicroscopiques pourrait s'expliquer par le faible nombre de doses de TPIg reçues au cours de la grossesse par les femmes enceintes. En effet, l'OMS a recommandé, depuis 2012, l'administration d'un minimum de trois doses de TPIg pendant la grossesse à partir du second trimestre de grossesse. Dans l'étude, la majorité des femmes (63%) ont reçu

deux doses avec 50% de ces femmes ayant une première dose après 22 SA. La durée médiane entre deux prises de TPIg était d'environ 6 semaines et celle entre la dernière prise de TPIg et l'accouchement était d'environ 9 semaines réduisant ainsi la fenêtre de couverture du TPIg pendant la grossesse. Les femmes ayant reçu trois doses de TPIg (14%) étaient également mal protégées vers la fin du troisième trimestre de grossesse parce que 25% d'entre elles avaient eu leur troisième dose au minimum huit semaines avant l'accouchement. Ceci pourrait expliquer la mauvaise protection à la fin du troisième trimestre de grossesse se traduisant par la légère hausse des infections submicroscopiques durant cette période.

D'autres facteurs en dehors des stratégies de lutte sont à prendre en considération pour expliquer la dynamique des infections submicroscopiques au cours de la grossesse.

Nous avons mis en évidence que le jeune âge est un facteur de risque de survenue des infections submicroscopiques et microscopiques au cours de la grossesse et même avant la grossesse avec un risque d'infection, en pré-grossesse, respectif de 37,2% contre 27,1% ( $p=0,02$  avec un test de  $\chi^2$ ). Ainsi, le jeune âge et l'existence d'une infection avant grossesse [178, 181] sont des facteurs de risque de survenue d'infection palustre pendant la grossesse avec un risque plus élevé d'infection palustre au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse.

L'implication du jeune âge dans le risque élevé d'infection avant et pendant la grossesse s'explique vraisemblablement par une réponse immunitaire, vis-à-vis du paludisme, moins efficace chez les sujets jeunes que chez les sujets âgés. L'association du jeune âge au risque de survenue des infections pendant la grossesse peut être également lié à la gestité. En effet, dans le groupe des jeunes femmes, la primigestité voire la secondigestité sont surreprésentés [178]. Les études ont déjà montré le lien entre la gestité et le risque de survenue des infections par *P. falciparum* pendant la grossesse [103, 191, 192] démontrant que les primigestes étaient plus à risque de contracter le paludisme que les multigestes. Par ailleurs, les primigestes ont une immunité plus faible voire inexistante contre les antigènes du parasite VAR2CSA

comparativement aux multigestes [81, 82, 193, 194], l'immunité protectrice contre les VAR2CSA étant acquise au cours des différentes grossesses et conférant ainsi une certaine protection aux multigestes par rapport aux primigestes.

Une hypothèse probable à étudier pourrait être l'utilisation faible des moyens de prévention contre le paludisme (MIILDA et TPIg) par les jeunes femmes qui sont majoritairement primigestes comparativement aux multigestes qui ont déjà une connaissance du risque encouru pendant la grossesse et donc des différentes méthodes de protection. Le principal système de distribution des MIILDA aux femmes enceintes se fait à la première CPN dans un contexte où la majorité des femmes ne consultent qu'à partir du deuxième trimestre de grossesse [123–126]. Les primigestes n'ont donc pas un accès rapide aux MIILDA. Les femmes multigestes ont par contre déjà eu accès aux MIILDA lors de leurs grossesses antérieures et pourraient continuer d'utiliser ces MIILDA en attendant leurs premières CPN pour les nouvelles grossesses. Des études réalisées dans d'autres pays africains ont déjà suggéré une utilisation faible des MIILDA par les primigestes comparées aux multigestes [180, 184, 195] qui pourrait expliquer l'existence d'un risque d'infection plus élevé chez les primigestes. Cette hypothèse mérite d'être confirmée pour permettre un ajustement des politiques de prévention contre le paludisme.

L'ethnie est également associée au risque de survenue des infections au cours de la grossesse. L'ethnie « Toffin » pourrait être un marqueur d'exposition et non un facteur de risque. En effet, les femmes Toffin sont en majorité situées dans la zone lacustre, zone favorable au développement des vecteurs et à la transmission du parasite. L'ethnie « Toffin » pourrait donc refléter la surexposition de ces femmes aux vecteurs (anophèles) via l'environnement (lac) favorable à leur multiplication. Une étude plus approfondie de leurs habitudes comportementales, alimentaires voire de la caractérisation de l'ethnie chez les femmes de l'étude pourrait permettre une meilleure compréhension de ce facteur de risque/d'exposition

des infections submicroscopiques. Nous n'avons malheureusement pas pu explorer ces pistes au cours de notre thèse.

Un antécédent d'infection submicroscopique à un trimestre donné (1<sup>er</sup> ou 2<sup>ème</sup>) augmente également le risque d'infection le trimestre suivant. Des analyses de génotypage, réalisées sur un sous-échantillon de prélèvements, ont montré qu'une proportion des infections détectées par PCR était similaire lors de deux visites consécutives, montrant une persistance de l'infection chez certaines femmes pendant la grossesse, en plus de l'existence de nouvelles infections intercurrentes (Jafari-Guemouri, communication personnelle).

En résumé, la dynamique des infections par *P. falciparum* aux différents trimestres de la grossesse est fortement influencée par l'existence préalable ou non d'une infection avant grossesse, aussi bien submicroscopique que microscopique. La compréhension de cette dynamique n'est pas simple et passe par les interactions de l'âge voire de la gestité, de la période de l'infection (pré-grossesse, trimestre de grossesse), de l'utilisation correcte des moyens de prévention déjà existants mais aussi probablement par des phénomènes génétiques, physiologiques et biologiques non explorés dans cette thèse.

### **6.3. Utilisation des stratégies de lutte actuelles dans l'étude RECIPAL**

Les moyens de prévention étant les outils qui ont permis jusqu'en 2015 de grandes avancées dans la lutte contre le paludisme, nous avons jugé important d'évaluer leur implémentation actuelle afin de comprendre la stagnation observée dans la lutte contre la maladie. Une bonne utilisation de ces moyens de prévention devrait normalement permettre de mieux protéger la femme enceinte contre les infections submicroscopiques et microscopiques au cours de la grossesse.

Le TPIg à la SP reste le seul moyen de prévention médicamenteux existant à ce jour pendant la grossesse. Les facteurs comportementaux comme le moment de la prise du TPIg

mais également des facteurs biologiques comme la résistance au médicament utilisé peuvent influencer l'efficacité du TPIg. Des études réalisées en Afrique ont démontré que le moment et la fréquence des infections palustres augmentaient le risque de conséquences néfastes, maternel et fœtales, liés au MiP [86, 196, 197]. De plus, la distribution des infections au cours de la grossesse est influencée par le moment d'administration du TPIg et plus précisément de la première dose. En effet, une administration précoce de la première dose de TPIg avec un nombre de doses conséquent (au moins 3 doses) a un effet bénéfique sur le risque d'infection pendant la grossesse et sur leurs conséquences à l'accouchement [196]. Cependant, au cours de l'étude, nous avons détecté un retard dans la prise de la première dose de TPIg, la moitié des femmes de l'étude l'ayant reçu au minimum à 22,6SA quel que soit le nombre de doses reçu pendant la grossesse. Par ailleurs, on note l'existence de 14% d'infections (microscopiques et submicroscopiques) dans le groupe de femmes ayant reçu deux ou trois doses de TPIg au cours de la grossesse en accord avec les directives nationales de 2 puis de 3 doses de TPIg recommandées au moment de l'étude. Une résistance à la SP pourrait, en partie, expliquer un manque d'efficacité de la SP et donc la persistance des infections malgré l'administration des doses recommandées de TPIg. Très peu d'études ont été réalisées au Bénin pour évaluer la résistance des parasites à la SP. Des études ont montré que la résistance à la SP est associée à des mutations dans le gène codant pour la dihydrofolate réductase (*pfdhfr*) et la dihydropteroate synthase (*pfdhps*) [198–201]. Différents types de mutations correspondent à différents niveaux de résistance à la SP. C'est ainsi qu'une mutation simple présente un faible niveau de résistance, une double mutation présente un niveau de résistance plus élevé que le simple et ainsi de suite [201]. N J White a montré dans une de ces études que l'efficacité de la SP en Afrique résulte de la propagation rapide des mutations quintuple [190]. Une étude réalisée au Bénin par Bertin *et al* a montré que la majorité des mutations impliquées dans la résistance à la SP retrouvés chez les femmes enceintes sont des mutations

triples ou quadruples. Toutefois, ces mutations retrouvées ne semblent pas être impliquées dans la réduction de l'efficacité de la SP en tant que TPIg [201] parce qu'elles n'étaient pas corrélées à l'efficacité clinique de la SP évaluée, dans l'étude, par le taux d'infection et la survenue d'issue défavorable de grossesse après une comparaison de deux groupes de femmes ayant soit des parasites mutants soit des parasites sauvages. La résistance à la SP ne pourrait donc pas être à priori mise en cause dans ce contexte.

Le moment de la première prise de TPIg se révélant être crucial pour protéger les femmes contre les infections palustres, les raisons du retard de la première prise constaté dans une étude avec un suivi régulier nous a donc interpellé. L'étude RECIPAL n'ayant pas été spécialement conçue pour étudier l'implémentation du TPIg, nous n'avons pas pu explorer toutes les hypothèses pouvant expliquer ce retard. En nous basant sur la littérature, nous avons pu mettre en avant quelques raisons, détaillées ci-dessous, pouvant expliquer le retard dans l'administration du TPIg au cours de l'étude [148, 149, 202, 203].

➤ **Raisons politiques**

Une mauvaise communication des directives sur l'utilisation du TPIg pourrait expliquer les différences observées dans la mise en œuvre des stratégies de prévention. En effet, les recommandations sur le TPIg ont été mises à jour par l'OMS entre 2004 et 2012 [189]. Ces révisions de recommandations n'ont pas permis aux différents pays de s'adapter et ont sûrement entraîné un retard dans la mise en œuvre des recommandations nationales et ensuite locales.

Une fois les recommandations nationales décrites, un retard de la diffusion du niveau central vers les différents niveaux périphériques du système sanitaire peut empêcher une mise en application efficace des stratégies de prévention sur le territoire.

Toutefois, un manque de motivation ainsi qu'un manque de formations continues du personnel de santé sur les différentes directives et révision des directives pourraient également être en cause.

➤ **Raisons logistiques**

D'une part, une mauvaise gestion des stocks avec des ruptures fréquentes peut occasionner des retards voire des absences d'administration du TPIg aux femmes enceintes qui arrivent en CPN. Une meilleure organisation des systèmes de santé et de la chaîne de distribution des moyens de prévention est donc nécessaire. Au cours de notre étude, nous avons constaté des épisodes de rupture de stock du TPIg. Malgré ces ruptures, les sages-femmes prescrivaient le TPIg aux femmes enceintes qui venaient en CPN et l'étude RECIPAL se chargeait de l'achat des médicaments. Les femmes prenaient donc le TPI malgré les ruptures de stocks. Cela montre que cette raison évoquée le plus souvent dans la littérature ne peut pas expliquer en totalité les retards constatés dans l'administration du TPIg au cours de l'étude. Il est donc mis en exergue dans cette étude un retard dans la prescription du TPIg aux femmes enceintes, en l'absence de rupture de stock, qui reste donc à élucider. Néanmoins, dans la vie réelle, ce retard de prescription serait couplé à un manque d'approvisionnement des centres de santé et des pharmacies qui entraînerait un retard plus marqué voire une absence d'utilisation du TPI par les femmes enceintes. En effet, ces femmes enceintes, faute de moyens financiers, pourraient retarder voire négliger l'achat du TPIg en cas de prescription par les agents de santé.

D'autre part, le manque d'accessibilité géographique aux différents centres de santé surtout dans les zones rurales empêche les femmes de se rendre souvent en CPN et peut causer des retards dans l'administration du TPIg aux femmes enceintes. Au cours du suivi, une logistique a été mise en place par l'étude pour pallier cet obstacle. Cela a donc permis aux femmes de pouvoir consulter aussitôt que nécessaire. L'efficacité de cette logistique est démontrée par le

nombre de CPN réalisées au cours du suivi. Les femmes de l'étude avaient en moyenne 8 CPN réalisées. La distance n'explique donc pas non plus le retard dans l'administration de la première dose de TPIg au cours de l'étude.

➤ **Raisons économiques**

Le paludisme sévit en majorité en ASS où le niveau socio-économique des populations est faible. Les plus pauvres sont les plus touchés. Ceci constitue un cercle vicieux. Le manque de moyens financiers entraîne un faible taux de réalisation de CPN par les femmes, induisant ainsi un faible accès au TPI qui augmente implicitement le risque d'infections palustres (persistantes ou nouvelles) au cours de la grossesse. Par conséquent, on assiste à une augmentation du risque de survenue des conséquences néfastes du paludisme pendant la grossesse induisant ainsi un fort taux de mortalité maternel et infantile. Pour pallier cela, les moyens de prévention sont censés être donnés gratuitement à la population (les MIILDA à la première CPN et le TPIg à partir du deuxième trimestre de grossesse) limitant ainsi les dépenses des foyers pour la protection des femmes enceintes et des nouveau-nés contre le paludisme et supprimant donc le facteur économique des raisons pouvant expliquer le retard d'administration du TIg. Malheureusement, dans la vie réelle, les ruptures de stock fréquents ne permettent pas toujours de garantir cette gratuité des outils de prévention constituant ainsi un frein dans la protection des femmes enceintes contre le paludisme.

Notons qu'au cours de l'étude, les soins étaient gratuits supprimant ainsi les raisons économiques comme possible raison du retard d'administration du TPIg constaté.

➤ **Raisons humaines et sociales**

Ces raisons peuvent être liées soit à la femme enceinte elle-même, soit au personnel soignant.

✓ **Femmes enceintes**

L'une des raisons incombant aux femmes enceintes est le faible recours aux CPN entraînant un faible taux de couverture et un retard dans l'administration du TPIg constatés. Le faible

recours aux CPN pouvant être due à une mauvaise volonté, à une occupation jugée plus importante par la femme que la CPN, à une maladie etc. Du fait de l'achat du TPIg par l'étude en cas de rupture de stock, montrant donc l'existence du TPIg au moment adéquat pour la femme enceinte, nous avons voulu comprendre si ce retard était dû à l'absence des femmes à une CPN précédente qui aurait permis de recevoir le TPIg plus tôt ou au personnel soignant. Nous avons ainsi constaté que parmi les femmes n'ayant reçu qu'une dose de TPIg pendant toute la grossesse, 75% d'entre elles étaient présentes à une CPN précédant la CPN de leur première dose effective. Ces femmes étaient éligibles au TPIg au cours de cette CPN (Age gestationnel de la CPN précédente >16SA). La présence de la majorité des femmes à des CPN où elles étaient éligibles au TPIg mais ne l'ont pas reçu ainsi que le nombre élevé de CPN réalisées (8 en moyenne) prouvant leur assiduité au cours de l'étude éliminent dans notre étude l'hypothèse du retard d'administration incombant aux femmes enceintes.

#### ✓ **Personnel de santé**

Au cours de notre étude, 50% des femmes ont reçu leur première dose de TPIg à 22SA. Du fait de la présence de la majorité des femmes (75%) à une CPN où elles étaient éligibles au TPIg (Age gestationnel de la CPN précédente >16SA) et ne l'ont pas reçu lors de cette CPN, nous nous questionnons entre autre sur l'adhésion du personnel soignant aux stratégies de prévention du paludisme pendant la grossesse. Des données de la littérature corroborent le constat d'une absence de don de TPIg à des femmes venant consulter alors qu'elles sont éligibles à la distribution de la première dose de TPIg [204, 205].

Une hypothèse pourrait être que du fait de la possibilité de survenue d'effets tératogènes en cas d'administration du TPIg au premier trimestre de grossesse, les sages-femmes préfèrent retarder le moment de la première administration du TPIg chez les femmes enceintes pensant protéger ainsi le fœtus. Une autre raison pourrait être une confusion chez les agents de santé en ce qui concerne l'administration effective du TPIg (moment d'administration et nombre de

doses à administrer) [204, 206]. Ces raisons possibles sont sûrement dues au manque d'informations et/ou de formations. En effet, une formation continue de tout le personnel soignant permettrait de renouveler leurs connaissances et de leur expliquer les différentes études ayant permis de pouvoir situer le seuil de la première prise de TPIg à 13 SA. Ceci pourrait modérer voire apaiser les craintes du personnel soignant et ainsi limiter les retards de la première prise de TPIg.

Grâce aux résultats de l'étude EVALMOUS, nous avons observé une bonne acceptation de l'implémentation des MIILDA par la population se traduisant par un fort taux de possession à 99% et par une bonne utilisation à 83% de cet outil de prévention. Environ 60% des MIILDA inspectées avaient une bonne intégrité physique, malheureusement juste 6% étaient bio efficaces. Ces résultats montrent la nécessité de sensibiliser la population sur l'utilisation de MIILDA efficaces du point de vue de leur intégrité physique mais également de leur efficacité biochimique. Une explication possible à ce faible taux de bio efficacité pourrait être un lavage répété des MIILDA par les femmes vivant à proximité de zones lacustres. Nous n'avons malheureusement pas pu mettre en évidence les causes liées à la faible efficacité des MIILDA au cours de l'étude. Une validation de ces résultats au niveau national par une approche multidisciplinaire incluant les sciences sociales est nécessaire. Ceci permettrait de confirmer ou infirmer nos observations mais surtout de comprendre les raisons expliquant le faible taux d'efficacité des MIILDA en cas de confirmation. Les résultats de cette étude aboutiraient à l'élaboration de nouvelles recommandations ciblées pour une meilleure protection des femmes enceintes. L'évaluation de la bio efficacité des MIILDA nécessite la disponibilité de laboratoires adéquats, l'expertise de techniciens formés mais également un coût financier important pour une évaluation périodique des MIILDA en population. Il nous semble donc nécessaire à court et moyen termes d'associer l'utilisation

optimale des MIILDA à un TPIg médicamenteux dès le début de la grossesse pour une protection efficace des femmes enceintes contre le paludisme.

Les résultats obtenus au cours de notre travail de thèse révèlent quelques points importants à souligner:

- ✓ La nécessité d'accentuer les actions préventives pour arriver à une implémentation optimale des outils de prévention (MIILDA et TPI) qui permettra une protection efficace des femmes enceintes dès le début de la grossesse ;
- ✓ L'existence d'un groupe à haut risque d'infections palustres pendant la grossesse que sont les jeunes femmes en âge de procréer infectées avant grossesse ;
- ✓ L'utilité d'évaluer une nouvelle molécule de TPIg en remplacement de la SP pour une utilisation à moyen et long termes dans la prévention contre le paludisme gestationnel.

#### 6.4. Limites

Au cours de notre travail, nous avons été confronté à quelques difficultés. Ces limites apportent des informations utiles pour la mise en place de nouvelles études et ne remettent pas en question la validité de nos résultats.

Des difficultés méthodologiques :

- ✓ La dynamique des infections par *Plasmodium falciparum* au cours de la grossesse est biaisée par l'utilisation des outils de prévention que sont la MIILDA et le TPIg. Néanmoins, nous avons tenu compte de cet aspect dans notre analyse multivariée en ajustant notre variable d'intérêt sur ces facteurs.
- ✓ L'étude RECIPAL étant une étude observationnelle, le niveau de preuve de nos résultats est intermédiaire comparé à celui qu'on aurait obtenu grâce à un essai randomisé. Cela n'invalide pas pour autant la pertinence des résultats obtenus. Des études à plus large échelle sont cependant nécessaires pour valider nos résultats.

Des difficultés statistiques :

- ✓ L'interprétation clinique difficile du modèle logistique mixte ordinaire que nous avons mis en œuvre. Néanmoins, nous avons trouvé une alternative par la présentation du risque d'infection palustre aux différents trimestres de grossesse dans le groupe à risque des jeunes femmes infectées avant grossesse illustrant ainsi l'interaction de second ordre retrouvé dans nos analyses.

L'étude RECIPAL a présenté quelques limites à prendre en considération.

- ✓ Le recrutement des femmes s'est fait en population générale, limitant ainsi le biais de sélection. L'inclusion des femmes dans l'étude s'est faite par participation volontaire. On peut donc supposer que (i) les femmes incluses dans la cohorte primaire sont celles qui ont été le plus informées de l'existence de l'étude (malgré les nombreuses séances de sensibilisations ayant eu lieu avant et au cours de l'étude) ou que (ii) les femmes pensant être les plus exposées ou les moins susceptibles de se protéger contre le paludisme aient décidé de ne pas participer. Une limite propre aux études de cohorte est liée à la durée du suivi dans l'étude : premièrement, au cours du suivi pré-conceptionnel, les retraits de consentement (36%) étaient souvent liés à la déception des femmes de ne pas tomber enceintes et à leur lassitude résultant du long suivi pré-conceptionnel (jusqu'à 24 mois). Deuxièmement, le nombre de CPN élevé réalisé au cours de l'étude (en moyenne 8 CPN) avec tous les examens réalisés épuisaient les femmes. D'autres retraits de consentement ont été effectués à cause de l'indisponibilité des femmes à réaliser un nombre aussi élevé de CPN pendant la grossesse entraînant une attrition d'environ 34%. Pour évaluer le biais de sélection qui aurait pu se créer par cette forte proportion de perdus de vue, nous avons comparé les caractéristiques générales des 273 femmes aux 138 femmes enceintes non incluses dans nos analyses (Annexe 2 : fichier supplémentaire de l'article 1). Les

caractéristiques ne différaient pas dans les deux groupes de femmes laissant donc supposer une absence de biais de sélection majeur au cours de l'étude.

- ✓ L'évaluation complète de l'utilisation et de l'efficacité des MIILDA n'a pas pu être réalisée sur toute la cohorte RECIPAL, diminuant ainsi la puissance des tests statistiques mais n'invalide pas les résultats obtenus et les conclusions retenues. Les résultats obtenus dans le cadre de notre étude contrôlée et réalisée dans des conditions plus optimales que la réalité (nombre de CPN élevé, meilleur suivi des femmes, traitements rapides des affections...) a malgré tout mis en évidence des défauts dans l'implémentation des MIILDA. On peut donc supposer que nos résultats ont été surestimés ou sous-estimés par rapport à la réalité témoignant ainsi d'une utilisation et d'une efficacité sous-optimale des MIILDA dans des conditions réelles de suivi de grossesse.
- ✓ L'absence de données documentant les pratiques des sages-femmes lors des CPN surtout concernant le don des outils de protection (MIILDA, TPIg) aux femmes enceintes. Si l'évaluation de l'utilisation des moyens de lutte donne quelques indications sur la réalité du terrain, nous ne disposons pas d'assez d'éléments pour une compréhension totale de ces résultats, l'objectif principal de l'étude n'étant pas l'évaluation des outils de lutte.
- ✓ L'absence actuelle de génotypage des souches parasitaires le long de la grossesse ne permet pas de pousser plus loin nos réflexions sur la dynamique des infections submicroscopiques. Le génotypage permettrait d'étudier les différentes souches parasitaires des infections survenues au cours de la grossesse montrant ainsi la part des nouvelles infections et des infections persistantes au cours des différents trimestres de grossesse. Ces informations constitueraient une avancée majeure dans la compréhension de la dynamique des infections submicroscopiques et guiderait les

politiques de prévention. Le suivi régulier des femmes au cours de l'étude avec des traitements immédiats et une meilleure administration des doses de TPIg a probablement entraîné une meilleure santé des femmes de l'étude, sous-estimant ainsi la prévalence réelle des infections détectées au cours de la grossesse.

Ces limites ne remettent pas en cause la validité de nos résultats mais aideront pour la future mise en place d'études pré-conceptionnelles en Afrique.

### **6.5. Intérêts et forces de l'étude**

Le design de l'étude RECIPAL reposait sur un suivi mensuel d'une cohorte de femmes depuis la période pré-conceptionnelle jusqu'à l'accouchement. C'est une étude unique dans le domaine du paludisme gestationnel en ASS qui allie différentes disciplines avec un recueil standardisé rigoureux prospectif de données en clinique (médecine générale, gynécologie), nutrition, biologie, radiographie (échographies). Cette étude a donc permis un suivi de femmes avec des données dès le début de la grossesse (condition rare en Afrique où les femmes consultent en majorité à partir du deuxième trimestre de grossesse) donnant ainsi accès à des informations précieuses, en particulier sur les infections palustres, au premier trimestre de la grossesse. La conception de cette étude ayant permis le recueil de différentes informations sur différents facteurs impliqués dans la grossesse permet de répondre à de multiples objectifs sous-jacents, constituant ainsi une bonne plateforme scientifique sur le paludisme gestationnel en ASS.

L'infection palustre a été définie de la même manière chez toutes les femmes de l'étude. La mesure biologique était également standardisée et contrôlée. La catégorisation de la variable d'intérêt était assez précise empêchant la duplication des données dans différentes catégories évitant ainsi un biais de classement.

La datation précise de l'âge de la grossesse avec la première échographie ayant lieu avant la 14<sup>ème</sup> SA a permis d'avoir une estimation correcte de l'AG, très utile pour évaluer l'impact de

la prise précoce ou tardive du TPIg sur les infections palustres au cours de la grossesse. Ce suivi échographique est quasi inexistant en Afrique, l'estimation de l'AG se faisant souvent par la mesure de la hauteur utérine, conduisant à une estimation très imprécise de l'âge gestationnel, en complément d'une estimation via la date des dernières règles (connue ou approximative).

L'absence d'implication ou d'influence sur les pratiques des sages-femmes lors des CPN a permis d'observer en temps réel les pratiques des agents de santé dans la zone d'étude.

Le suivi régulier au cours de l'étude a permis une amélioration des conditions réelles de CPN et donc un meilleur traitement des affections survenues au cours de la grossesse permettant ainsi une amélioration de la morbidité des femmes incluses dans l'étude.

Le design de l'étude a probablement permis la mise en évidence d'un indicateur potentiel à utiliser lors des études d'évaluation du TPIg sur les infections submicroscopiques à savoir le moment de la première dose de TPIg en plus du nombre de doses pendant la grossesse.

Du point de vue des démarches statistiques utilisées au cours de notre travail, nous avons su trouver une alternative pour mieux interpréter les résultats obtenus par le modèle logistique mixte ordinal.

## ***6.6. Enjeux de santé publique et recommandations***

Nos résultats montrent (i) la complexité de la dynamique des infections submicroscopiques pendant la grossesse et (ii) la nécessité de la prise en compte de différents indicateurs des outils de prévention dans l'évaluation de leur efficacité sur le risque palustre.

### **➤ Dynamique et déterminants des infections submicroscopiques pendant la grossesse**

Il existe un large réservoir des infections submicroscopiques pendant la grossesse avec la plus grande proportion de ces infections survenant au premier trimestre de grossesse, qui est une période de vulnérabilité de la femme enceinte, puis une diminution au fil des trimestres. Les

jeunes femmes (<26 ans) infectées en pré-grossesse constituent un groupe à risque de développer des infections palustres au cours de la grossesse.

- Indicateurs des moyens de prévention
- ✓ MIILDA : Il faut tenir compte de la possession, utilisation vérifiée mais également de l'intégrité physique et de l'efficacité biochimique des MIILDAs utilisées par les femmes enceintes.
- ✓ TPIg à la SP : Il faut tenir compte du nombre de doses mais également du moment d'administration de la première dose chez la femme enceinte. La précocité de prise de la première dose est primordiale pour l'action préventive du TPIg sur les infections submicroscopiques. La non appréciation de tous ces indicateurs rend inexact l'impact réel de ces outils sur la protection des femmes enceintes.

A l'issue de notre travail, nos recommandations visent l'amélioration des mesures préventives contre le paludisme pouvant participer à l'élimination mondiale de la maladie.

Ainsi, nous formulons les recommandations suivantes en fonction des différents moments de la grossesse et des différents moyens de prévention actuellement disponibles:

- Période pré-conceptionnelle
- ✓ Distribution de MIILDA

Nous avons montré dans notre étude que les jeunes femmes avec une infection submicroscopique étaient plus à risque de développer des infections palustres au cours de la grossesse avec une plus forte prévalence au premier trimestre de grossesse que les femmes âgées infectées et les femmes non infectées. De plus, les MIILDA bio-efficaces et ayant une bonne intégrité physique protègent mieux les femmes avec un allongement du délai de survenue de la première infection palustre pendant le premier trimestre de grossesse.

Au vu de ces résultats, une stratégie visant la protection des femmes depuis la période pré-conceptionnelle avec un accent chez les femmes nulligestes et primigestes est nécessaire. Une

distribution précoce des MIILDA aux femmes en âge de procréer ciblées au niveau communautaire serait un bon point de départ et permettrait une diminution de l'incidence des infections palustres au premier trimestre de grossesse. Cette stratégie ciblant les nulligestes viendra en appui des recommandations déjà existantes à savoir la distribution des MIILDA aux femmes enceintes à leur première CPN associées à des séances d'information et de sensibilisation sur l'importance d'utiliser des MIILDA efficaces dès les toutes premières semaines de la grossesse.

✓ Vaccin contre le paludisme

L'élaboration d'un vaccin efficace pour toutes les femmes constitue la meilleure stratégie qui permettrait de lutter contre le paludisme placentaire. En effet, un vaccin administré en pré-grossesse protégerait la femme contre les infections dès la période pré-conceptionnelle en induisant chez les nulligestes un niveau d'immunité comparable à celle des multigestes.

Il pourrait se poser le problème d'acceptabilité de la vaccination par la population. Des études vaccinales sont déjà en cours d'évaluation et semblent prometteuses [70, 151, 207].

➤ Période gestationnelle

En plus de la distribution des MIILDA aux femmes enceintes à leur première CPN, le TPIg à la SP représente un autre moyen de prévention pendant la grossesse. Nous avons montré que le TPIg tel qu'utilisé actuellement ne protège pas avec une efficacité optimale les femmes enceintes contre les infections microscopiques et submicroscopiques à partir du deuxième trimestre de la grossesse. La prise précoce du TPIg à la SP permet de réduire le nombre d'infections submicroscopiques et microscopiques à partir du deuxième trimestre de grossesse. De plus, nous avons remarqué que les femmes enceintes n'étaient pas optimalement protégées au premier trimestre de grossesse par les MIILDA, seul outil actuellement disponible contre le paludisme, le TPIg à la SP étant contre-indiqué en cette période pour possibilité de risque de survenue d'effets tératogènes. Par ailleurs, un

phénomène de résistance à la SP est observé depuis plusieurs années ASS [201]. Nos résultats ont prouvé que l'utilisation des outils de lutte actuels ne permet pas une protection optimale de la femmes enceinte. L'adoption d'une molécule alternative à la SP non contre-indiquée au premier trimestre de grossesse et permettant une prévention précoce du paludisme est indispensable. Actuellement, les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA), apparemment sans danger pour le fœtus en début de grossesse [173, 208, 209] pourraient constituer une alternative à la SP. Leur utilisation en tant que TPIg pourrait pallier le problème de contre-indication de la SP au premier trimestre, permettant ainsi une protection médicamenteuse de la femme enceinte dès le début de sa grossesse. Parmi ces CTA, la dihydroartémisinine-pipéraquline (DHA-PQ) pourrait être une molécule prometteuse parce qu'elle est bien tolérée et pourrait ainsi être administrée dès le 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse [173–175]. Son utilisation comme moyen curatif des accès palustres aux deuxième et troisième trimestre est déjà validée ; la discussion actuelle à l'OMS concernant son adoption au premier trimestre de grossesse. Face aux phénomènes de résistance à la SP qui commencent à se répandre sur le continent africain [4], la DHA-PQ pourrait également être une probable molécule de remplacement à la SP à partir du deuxième trimestre de grossesse [70, 210]. Une évaluation de la possibilité de l'utiliser dès le premier trimestre comme TPIg doit être encouragée. Néanmoins, lors de son adoption en tant que molécule de TPIg dès le premier trimestre de grossesse avec probable remplacement de la SP à partir du deuxième trimestre (au moment où les phénomènes de résistances se développeront complètement en Afrique), il faudra également penser à la possibilité d'un problème de résistance qui pourrait survenir à long terme comme cela a déjà été le cas pour d'autres molécules comme la chloroquine.

Nos différentes recommandations nécessitent d'avoir accès aux femmes en désir de grossesse ou au tout début de la grossesse pour une meilleure implémentation de ces stratégies

combinées qui constituent un défi majeur. En effet, le problème majeur à la mise en place d'une telle stratégie intégrée nécessitant une mise en œuvre très précoce au cours de la grossesse en ASS est de pouvoir atteindre les femmes dès les premiers mois de grossesse.

Quelques pistes de solution pourraient permettre cette mise en place :

- Avoir une politique communautaire et décentralisée : la participation des agents de la planification familiale et des agents de santé communautaires (ASC) surtout dans les zones reculées pourrait permettre d'atteindre les femmes avant ou dès le début de la grossesse. Des séances de sensibilisation dans toutes les zones sanitaires sur le risque palustre encouru par les femmes (nulligestes surtout) et la nécessité de toute femme en désir de grossesse de se protéger bien avant la grossesse sont cruciaux. Pour atteindre une majorité de femmes, des distributions massives régulières de MIILDA ciblant les jeunes filles voire femmes en âge de procréer (15-49ans), en dehors des distributions en population générale, pourraient permettre de réduire l'incidence palustre au premier trimestre de grossesse;
- Faire participer les ASC à la distribution des MIILDA et du TPIg au cours de la grossesse: Une évaluation de ce processus a commencé à être mis en place au Bénin grâce à un financement du Fonds mondial ;
- Rendre les CPNs accessibles à toutes les femmes d'un point de vue financier voire logistique : la gratuité des CPNs et une plus grande décentralisation des services de soins prénataux pourraient permettre une meilleure accessibilité des populations aux CPNs ;
- Sensibiliser, informer et former continuellement et en temps réel tous les agents de santé du territoire sur les différentes recommandations. Des formations en ligne ou des cours préenregistrés à diffuser dans toutes les zones sanitaires accompagnés

des flyers ou affiches en appui pourraient permettre d'atteindre tous les personnels impliqués dans les CPN.

### 6.7. *Perspectives*

Plusieurs perspectives sont envisageables :

Nos résultats montrent un sur-risque d'infections par *P. falciparum* pendant la grossesse chez les femmes ayant un antécédent d'infection submicroscopique. L'absence de génotypage des souches parasitaires à chaque consultation n'a pas permis de voir si les infections du début de la grossesse ont perduré au cours de la grossesse et sont les mêmes ou si ce sont de nouvelles infections qui ont été contractées aux différents trimestres. Des analyses génotypiques sont actuellement en cours afin de répondre à cette question. Ces nouvelles connaissances sur le sujet permettront d'avoir une idée précise de l'efficacité des moyens de lutte actuels sur les infections submicroscopiques et permettront ainsi de faire des recommandations pour adapter la stratégie de lutte contre le paludisme.

Des études ont montré que les infections submicroscopiques par *P. falciparum* joueraient un rôle dans la survenue de certains indicateurs de santé maternels et fœtaux que sont l'anémie maternelle et le faible poids de naissance du nouveau-né. L'analyse de l'impact des infections submicroscopiques de la grossesse, surtout du premier trimestre de la grossesse, sur les différents indicateurs de santé au cours de l'étude RECIPAL est en cours. Ces résultats nous permettront d'avoir (i) des éléments de confirmation ou de modération de l'impact négatif des infections submicroscopiques survenues dès le début de la grossesse sur la santé de la mère et du nouveau-né et (ii) de mieux comprendre l'influence du moment de survenue des infections submicroscopiques sur la survenue des conséquences néfastes maternel et fœtales.

D'autres analyses sont également en cours pour évaluer l'impact des infections palustres au cours de la grossesse sur la croissance fœtale in utéro.

## *VII. CONCLUSION*

Nos travaux ont montré que les infections palustres submicroscopiques sont plus fréquentes que les infections microscopiques au cours de la grossesse. Leur prévalence est plus élevée au premier trimestre de grossesse comparativement aux deuxième et troisième trimestres de grossesse et ces infections précoces surviennent chez près du tiers des femmes au premier trimestre de grossesse. Les femmes infectées en période pré-conceptionnelle sont plus à risque de développer une infection au cours de la grossesse avec une plus forte prévalence au premier trimestre de grossesse. De plus, les femmes ayant une infection au premier trimestre de grossesse sont plus à risque de développer des infections aux second et troisième trimestres de grossesse indépendamment de l'administration du TPIg. Ces résultats sont en faveur d'une stratégie combinée permettant l'administration précoce des moyens de prévention contre le paludisme en pré-grossesse ou déjà dès le tout début de la grossesse.

## *VIII. REFERENCES*

1. WHO. Paludisme. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. Accessed 29 Oct 2019.
2. Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique INSAE. Enquête Démographique et de Santé du Bénin, 2017-2018. <https://www.insae-bj.org/actualites/69-cinquieme-enquete-demographique-et-de-sante-2017-2018>. Accessed 14 Aug 2019.
3. WHO. World malaria report 2019. <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>. Accessed 4 Dec 2019.
4. WHO. A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the African region. WHO. [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/afr\\_mal\\_04\\_01/en/](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/afr_mal_04_01/en/). Accessed 10 Sep 2019.
5. OMS. Document d'orientation en matière de politiques de l'OMS: Traitement préventif intermittent pour le paludisme lors de la grossesse à la sulfadoxine-pyriméthamine – TPIp-SP. WHO. [https://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy\\_brief\\_iptp\\_sp\\_policy\\_recommendation/fr/](https://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy_brief_iptp_sp_policy_recommendation/fr/). Accessed 7 Aug 2019.
6. Lengeler C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;:CD000363.
7. Gamble C, Ekwaru PJ, Garner P, ter Kuile FO. Insecticide-Treated Nets for the Prevention of Malaria in Pregnancy: A Systematic Review of Randomised Controlled Trials. *PLoS Med*. 2007;4. doi:10.1371/journal.pmed.0040107.
8. Briand V, Cottrell G, Massougbojji A, Cot M. Intermittent preventive treatment for the prevention of malaria during pregnancy in high transmission areas. *Malar J*. 2007;6:160.
9. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11:623–39.
10. Menéndez C, D'Alessandro U, ter Kuile FO. Reducing the burden of malaria in pregnancy by preventive strategies. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:126–35.
11. World Health Organization. World Malaria Report 2018. <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>. Accessed 2 Sep 2019.
12. Rantala A-M, Taylor SM, Trottman PA, Luntamo M, Mbewe B, Maleta K, et al. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malar J*. 2010;9:269.
13. Mayor A, Moro L, Aguilar R, Bardají A, Cisteró P, Serra-Casas E, et al. How hidden can malaria be in pregnant women? Diagnosis by microscopy, placental histology, polymerase chain reaction and detection of histidine-rich protein 2 in plasma. *Clin Infect Dis*. 2012;54:1561–8.
14. Lin JT, Saunders DL, Meshnick SR. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends Parasitol*. 2014;30:183–90.

15. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2009;200:1509–17.
16. Young MD, Hardman NF. The infectivity of native malarial parasites in South Carolina to *Anopheles quadrimaculatus*. *Am J Trop Med Hyg.* 1948;28:303–11.
17. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Davies DH, Jain A, et al. Submicroscopic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections are common in western Thailand - molecular and serological evidence. *Malar J.* 2015;14. doi:10.1186/s12936-015-0611-9.
18. Cottrell G, Moussiliou A, Luty AJF, Cot M, Fievet N, Massougbodji A, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infections Are Associated With Maternal Anemia, Premature Births, and Low Birth Weight. *Clin Infect Dis.* 2015;60:1481–8.
19. World Health Organization. World Malaria Report 2015. WHO. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>. Accessed 28 Nov 2020.
20. Schantz-Dunn J, Nour NM. Malaria and Pregnancy: A Global Health Perspective. *Rev Obstet Gynecol.* 2009;2:186–92.
21. Brabin BJ. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ.* 1983;61:1005–16.
22. McGregor IA. Epidemiology, Malaria and Pregnancy\*. *Am J Trop Med Hyg.* 1984;33:517–25.
23. Cottrell G, Mary J-Y, Barro D, Cot M. The importance of the period of malarial infection during pregnancy on birth weight in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76:849–54.
24. Ayoola OO, Whatmore A, Balogun WO, Jarrett OO, Cruickshank JK, Clayton PE. Maternal malaria status and metabolic profiles in pregnancy and in cord blood: relationships with birth size in Nigerian infants. *Malar J.* 2012;11:75.
25. Huynh B-T, Cottrell G, Cot M, Briand V. Burden of malaria in early pregnancy: a neglected problem? *Clin Infect Dis.* 2015;60:598–604.
26. Guyatt HL, Snow RW. The epidemiology and burden of *Plasmodium falciparum*-related anemia among pregnant women in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64:36–44.
27. Le Hesran JY, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B, Beyemé M, et al. Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol.* 1997;146:826–31.
28. Mutabingwa TK, Bolla MC, Li J-L, Domingo GJ, Li X, Fried M, et al. Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. *PLoS Med.* 2005;2:e407.
29. d’Almeida TC, Sadissou I, Cottrell G, Tahar R, Moreau P, Favier B, et al. Evolution of the levels of human leukocyte antigen G (HLA-G) in Beninese infant during the first year of life in a malaria endemic area: using latent class analysis. *Malar J.* 2016;15:78.

30. Bouaziz O, Courtin D, Cottrell G, Milet J, Nuel G, Garcia A. Is Placental Malaria a Long-term Risk Factor for Mild Malaria Attack in Infancy? Revisiting a Paradigm. *Clin Infect Dis*. 2018;66:930–5.
31. d’Almeida TC, Sadissou I, Sagbohan M, Milet J, Avokpaho E, Gineau L, et al. High level of soluble human leukocyte antigen (HLA)-G at beginning of pregnancy as predictor of risk of malaria during infancy. *Sci Rep*. 2019;9:9160.
32. Adegnika AA, Verweij JJ, Agnandji ST, Chai SK, Breitling LP, Ramharter M, et al. Microscopic and sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:798–803.
33. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Muchiri E, King CL. Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3630–5.
34. Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4:e2012026.
35. White Nicholas J. NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet Lond Engl*. 2014;383:723–35.
36. Campus de Parasitologie-Mycologie - Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Paludisme. <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/1.html>. Accessed 27 Nov 2019.
37. Carne B. B. Facteurs de gravité du paludisme en Afrique sub-Saharienne. Aspects épidémiologiques. *Médecine Mal Infect*. 1995;25:815–22.
38. Hill AVS, Allsopp CEM, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, et al. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*. 1991;352:595–600.
39. Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012;12:457–68.
40. Goheen MM, Campino S, Cerami C. The role of the red blood cell in host defence against *falciparum* malaria: an expanding repertoire of evolutionary alterations. *Br J Haematol*. 2017;179:543–56.
41. Dolo A, Maiga B, Tolo Y, Tapily A, Arama C, Daou M, et al. [Relationship between malaria and anemia in two ethnic groups living in sympatry in Mali]. *Bull Soc Pathol Exot* 1990. 2012;105:370–6.
42. Nacher M. Helminth-infected patients with malaria: a low profile transmission hub? *Malar J*. 2012;11:376.

43. Organisation Mondiale de la Santé. Terminologie OMS du paludisme. WHO. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/malaria-terminology/fr/>. Accessed 18 Dec 2019.
44. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12:833–40.
45. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, et al. “Asymptomatic” Malaria: A Chronic and Debilitating Infection That Should Be Treated. *PLoS Med.* 2016;13:e1001942.
46. Drakeley C, Gonçalves BP, Okell LC, Slater HC. Understanding the Importance of Asymptomatic and Low- Density Infections for Malaria Elimination. 2018.
47. Nkumama IN, O’Meara WP, Osier FHA. Changes in Malaria Epidemiology in Africa and New Challenges for Elimination. *Trends Parasitol.* 2017;33:128–40.
48. Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4:e2012026.
49. Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52:81–8.
50. Nsoby SL, Parikh S, Kironde F, Lubega G, Kanya MR, Rosenthal PJ, et al. Molecular evaluation of the natural history of asymptomatic parasitemia in Ugandan children. *J Infect Dis.* 2004;189:2220–6.
51. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun.* 2012;3:1237.
52. Mosha JF, Sturrock HJW, Greenhouse B, Greenwood B, Sutherland CJ, Gadalla N, et al. Epidemiology of subpatent *Plasmodium falciparum* infection: implications for detection of hotspots with imperfect diagnostics. *Malar J.* 2013;12:221.
53. Roucher C, Rogier C, Dieye-Ba F, Sokhna C, Tall A, Trape J-F. Changing malaria epidemiology and diagnostic criteria for *Plasmodium falciparum* clinical malaria. *PloS One.* 2012;7:e46188.
54. Kimenyi KM, Wamae K, Ochola-Oyier LI. Understanding *P. falciparum* Asymptomatic Infections: A Proposition for a Transcriptomic Approach. *Front Immunol.* 2019;10:2398.
55. Moody A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:66–78.
56. Mirdha BR, Samantaray JC, Mishra B. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol.* 1997;50:356.
57. Warhurst DC DC, Williams JE JE. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol.* 1996;49:533–8.

58. Cunningham J, Jones S, Gatton ML, Barnwell JW, Cheng Q, Chiodini PL, et al. A review of the WHO malaria rapid diagnostic test product testing programme (2008-2018): performance, procurement and policy. *Malar J.* 2019;18:387.
59. CDC-Centers for Disease Control. Malaria - Diagnosis & Treatment (United States) - Diagnosis (U.S.). 2019. [https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis\\_treatment/diagnostic\\_tools.html](https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnostic_tools.html). Accessed 11 Feb 2020.
60. Gaye O., Mc Laughlin G., Diouf M., Diallo S. Etude comparative de cinq méthodes de diagnostic biologique du paludisme. *Médecine d’Afrique Noire.* 1998;45 (4).
61. Poon LLM, Wong BWY, Ma EHT, Chan KH, Chow LMC, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Chem.* 2006;52:303–6.
62. Han E-T, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2521–8.
63. Hopkins H, González IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C, et al. 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. *J Infect Dis.* 2013;208:645–52.
64. Polley SD, González IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J, et al. Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. *J Infect Dis.* 2013;208:637–44.
65. Owalla TJ, Okurut E, Apungia G, Ojakol B, Lema J, C Murphy S, et al. Using the Ultrasensitive Alere *Plasmodium falciparum* Malaria Ag HRP-2™ Rapid Diagnostic Test in the Field and Clinic in Northeastern Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 2020;103:778–84.
66. Girma S, Cheaveau J, Mohon AN, Marasinghe D, Legese R, Balasingam N, et al. Prevalence and Epidemiological Characteristics of Asymptomatic Malaria Based on Ultrasensitive Diagnostics: A Cross-sectional Study. *Clin Infect Dis.* 2019;69:1003–10.
67. Landier J, Haohankhunnatham W, Das S, Konghahong K, Christensen P, Raksuansak J, et al. Operational Performance of a *Plasmodium falciparum* Ultrasensitive Rapid Diagnostic Test for Detection of Asymptomatic Infections in Eastern Myanmar. *J Clin Microbiol.* 2018;56.
68. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoia K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:93–104.
69. Guyatt HL, Snow RW. Malaria in pregnancy as an indirect cause of infant mortality in sub-Saharan Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95:569–76.
70. Rogerson SJ, Desai M, Mayor A, Sicuri E, Taylor SM, van Eijk AM. Burden, pathology, and costs of malaria in pregnancy: new developments for an old problem. *Lancet Infect Dis.* 2018;18:e107–18.

71. Phillips Margaret A. MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. *Malaria. Nat Rev Dis Primer.* 2017;3:17050.
72. Cot M, Deloron P. *Malaria prevention strategies. Br Med Bull.* 2003;67:137–48.
73. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. *Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? Trends Parasitol.* 2004;20:425–32.
74. Bouyou-Akotet MK, Ionete-Collard DE, Mabika-Manfoumbi M, Kendjo E, Matsiegui P-B, Mavoungou E, et al. *Prevalence of Plasmodium falciparum infection in pregnant women in Gabon. Malar J.* 2003;2:18.
75. Tako EA, Zhou A, Lohoue J, Leke R, Taylor DW, Leke RFG. *Risk factors for placental malaria and its effect on pregnancy outcome in Yaounde, Cameroon. Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:236–42.
76. Duffy PE. *Plasmodium in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. Parasitology.* 2007;134:1877–81.
77. Shi YP, Sayed U, Qari SH, Roberts JM, Udhayakumar V, Oloo AJ, et al. *Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1. Infect Immun.* 1996;64:2716–23.
78. Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, Druilhe P. *Cytophilic immunoglobulin responses to Plasmodium falciparum glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. Infect Immun.* 2000;68:2617–20.
79. Rogerson SJ, Broek NR van den, Chaluluka E, Qongwane C, Mhango CG, Molyneux ME. *Malaria and anemia in antenatal women in Blantyre, Malawi: a twelve-month survey. Am J Trop Med Hyg.* 2000;62:335–40.
80. Saute F, Menendez C, Mayor A, Aponte J, Gomez-Olive X, Dgedge M, et al. *Malaria in pregnancy in rural Mozambique: the role of parity, submicroscopic and multiple Plasmodium falciparum infections. Trop Med Int Health TM IH.* 2002;7:19–28.
81. Espinoza E, Hidalgo L, Chedraui P. *The effect of malarial infection on maternal-fetal outcome in Ecuador. J Matern Fetal Neonatal Med.* 2005;18:101–5.
82. Walker-Abbey A, Djokam RRT, Eno A, Leke RFG, Titanji VPK, Fogako J, et al. *Malaria in pregnant Cameroonian women: the effect of age and gravidity on submicroscopic and mixed-species infections and multiple parasite genotypes. Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:229–35.
83. Huynh B-T, Fievet N, Gbaguidi G, Borgella S, Mévo BG, Massougbdji A, et al. *Malaria associated symptoms in pregnant women followed-up in Benin. Malar J.* 2011;10:72.
84. Fleming AF. *Tropical obstetrics and gynaecology. 1. Anaemia in pregnancy in tropical Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;83:441–8.

85. Shulman CE, Graham WJ, Jilo H, Lowe BS, New L, Obiero J, et al. Malaria is an important cause of anaemia in primigravidae: evidence from a district hospital in coastal Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90:535–9.
86. Kalilani L, Mofolo I, Chaponda M, Rogerson SJ, Meshnick SR. The effect of timing and frequency of *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy on the risk of low birth weight and maternal anemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104:416–22.
87. Ouédraogo S, Bodeau-Livinec F, Briand V, Huynh B-T, Koura GK, Accrombessi MM, et al. Malaria and gravidity interact to modify maternal haemoglobin concentrations during pregnancy. *Malar J.* 2012;11:348.
88. Steketee RW, Wirima JJ, Slutsker L, Heymann DL, Breman JG. The problem of malaria and malaria control in pregnancy in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55 1 Suppl:2–7.
89. Brabin BJ, Diseases UBSP for R and T in T. The risks and severity of malaria in pregnant women : including a summary of current field research with identification of research priorities related to appropriate methods of prevention of malaria in pregnancy. 1991. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/61511>. Accessed 19 Mar 2020.
90. Menendez C. Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. *Parasitol Today Pers Ed.* 1995;11:178–83.
91. Rogerson SJ, Beeson JG. The placenta in malaria: mechanisms of infection, disease and foetal morbidity. *Ann Trop Med Parasitol.* 1999;93 Suppl 1:S35-42.
92. McCormick MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med.* 1985;312:82–90.
93. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The Burden of Malaria in Pregnancy in Malaria-Endemic Areas. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2623/>. Accessed 20 Mar 2020.
94. Were FN, Bwibo NO. The contribution of very low birth weight deaths to infant mortality. *East Afr Med J.* 2009;86:374–7.
95. WHO. Malaria in pregnancy: guidelines for measuring key monitoring and evaluation indicators. Genève (Suisse): World Health Organization; 2007.
96. Mockenhaupt FP, Rong B, Till H, Eggelte TA, Beck S, Gyasi-Sarpong C, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections in pregnancy in Ghana. *Trop Med Int Health TM IH.* 2000;5:167–73.
97. Luxemburger C, Ricci F, Nosten F, Raimond D, Bathet S, White NJ. The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91:256–62.
98. Lekana Douki J-B, Traore B, Costa FTM, Fusai T, Pouvelle B, Sterkers Y, et al. Sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria: monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates. *Blood.* 2002;100:1478–83.

99. Staalsoe T, Shulman CE, Bulmer JN, Kawuondo K, Marsh K, Hviid L. Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Lond Engl*. 2004;363:283–9.
100. Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ. Malarial anemia: of mice and men. *Blood*. 2007;110:18–28.
101. Dimasuay KG, Aitken EH, Rosario F, Njie M, Glazier J, Rogerson SJ, et al. Inhibition of placental mTOR signaling provides a link between placental malaria and reduced birthweight. *BMC Med*. 2017;15:1.
102. Dimasuay KG, Gong L, Rosario F, McBryde E, Spelman T, Glazier J, et al. Impaired placental autophagy in placental malaria. *PloS One*. 2017;12:e0187291.
103. Muthusamy A, Achur RN, Bhavanandan VP, Fouda GG, Taylor DW, Gowda DC. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes adhere both in the intervillous space and on the villous surface of human placenta by binding to the low-sulfated chondroitin sulfate proteoglycan receptor. *Am J Pathol*. 2004;164:2013–25.
104. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menéndez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The sick placenta—the role of malaria. *Placenta*. 2004;25:359–78.
105. Hartman TK, Rogerson SJ, Fischer PR. The impact of maternal malaria on newborns. *Ann Trop Paediatr*. 2010;30:271–82.
106. Snounou G, Bourne T, Jarra W, Viriyakosol S, Brown KN. Identification and quantification of rodent malaria strains and species using gene probes. *Parasitology*. 1992;105:21–7.
107. Kassberger F, Birkenmaier A, Khattab A, Kremsner PG, Klinkert M-Q. PCR typing of *Plasmodium falciparum* in matched peripheral, placental and umbilical cord blood. *Parasitol Res*. 2002;88:1073–9.
108. Mayengue PI, Rieth H, Khattab A, Issifou S, Kremsner PG, Klinkert M-Q, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections and multiplicity of infection in matched peripheral, placental and umbilical cord blood samples from Gabonese women. *Trop Med Int Health TM IH*. 2004;9:949–58.
109. Singer LM, Newman RD, Diarra A, Moran AC, Huber CS, Stennies G, et al. Evaluation of a malaria rapid diagnostic test for assessing the burden of malaria during pregnancy. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70:481–5.
110. Ramharter M, Grobusch MP, Kiessling G, Adegnika AA, Möller U, Agnandji STM, et al. Clinical and parasitological characteristics of puerperal malaria. *J Infect Dis*. 2005;191:1005–9.
111. Walker-Abbey A, Djokam RRT, Eno A, Leke RFG, Titanji VPK, Fogako J, et al. Malaria in pregnant Cameroonian women: the effect of age and gravidity on submicroscopic and mixed-species infections and multiple parasite genotypes. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72:229–35.

112. Malek A, Bersinger NA, Di Santo S, Mueller MD, Sager R, Schneider H, et al. C-reactive protein production in term human placental tissue. *Placenta*. 2006;27:619–25.
113. Andrews L, Andersen RF, Webster D, Dunachie S, Walther RM, Bejon P, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:191–8.
114. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Muchiri E, King CL. Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3630–5.
115. Swan H, Sloan L, Muyombwe A, Chavalitshe-winkoon-Petmitr P, Krudsood S, Leowattana W, et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:850–4.
116. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Davies DH, Jain A, et al. Submicroscopic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections are common in western Thailand - molecular and serological evidence. *Malar J*. 2015;14. doi:10.1186/s12936-015-0611-9.
117. Gonçalves BP, Walker PG, Cairns M, Tiono AB, Bousema T, Drakeley C. Pregnant Women: An Overlooked Asset to *Plasmodium falciparum* Malaria Elimination Campaigns? *Trends Parasitol*. 2017. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492217300661>.
118. Huynh B-T, Fievet N, Gbaguidi G, Dechavanne S, Borgella S, Guézo-Mévo B, et al. Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:214–20.
119. Valea I, Tinto H, Drabo MK, Huybregts L, Sorgho H, Ouedraogo J-B, et al. An analysis of timing and frequency of malaria infection during pregnancy in relation to the risk of low birth weight, anaemia and perinatal mortality in Burkina Faso. *Malar J*. 2012;11:71.
120. Briand V, Saal J, Ghafari C, Huynh B-T, Fievet N, Schmiegelow C, et al. Fetal Growth Restriction Is Associated With Malaria in Pregnancy: A Prospective Longitudinal Study in Benin. *J Infect Dis*. 2016;214:417–25.
121. Accrombessi M, Fievet N, Yovo E, Cottrell G, Agbota G, Massougbdji A, et al. Prevalence and Associated Risk Factors of Malaria in the First Trimester of Pregnancy: A Preconceptional Cohort Study in Benin. *J Infect Dis*. 2018;217:1309–17.
122. Hounkonnou C, Djèntonin A, Egbinola S, Houngbegnon P, Bouraima A, Soares C, et al. Impact of the use and efficacy of long lasting insecticidal net on malaria infection during the first trimester of pregnancy - a pre-conceptional cohort study in southern Benin. *BMC Public Health*. 2018;18:683.
123. Ouédraogo S, Koura GK, Accrombessi MMK, Bodeau-Livinec F, Massougbdji A, Cot M. Maternal anemia at first antenatal visit: prevalence and risk factors in a malaria-endemic area in Benin. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87:418–24.

124. Mkandawire P, Atari O, Kangmennaang J, Arku G, Luginaah I, Etowa J. Pregnancy intention and gestational age at first antenatal care (ANC) visit in Rwanda. *Midwifery*. 2019;68:30–8.
125. Magadi MA, Madise NJ, Rodrigues RN. Frequency and timing of antenatal care in Kenya: explaining the variations between women of different communities. *Soc Sci Med* 1982. 2000;51:551–61.
126. Crawley J, Hill J, Yartey J, Robalo M, Serufulira A, Ba-Nguz A, et al. From evidence to action? Challenges to policy change and programme delivery for malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:145–55.
127. WHO Malaria Policy Advisory Committee and Secretariat. Malaria Policy Advisory Committee to the WHO: conclusions and recommendations of eighth biannual meeting (September 2015). *Malar J*. 2016;15:117.
128. World Health Organization. Guidelines for the Treatment of Malaria. 3rd edition. Geneva: World Health Organization; 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294440/>. Accessed 18 Mar 2020.
129. Ferenchick EK, Roman E, Wolf K, Florey L, Youll S, Mangiaterra V, et al. A renewed focus on preventing malaria in pregnancy. *Reprod Health*. 2018;15:131.
130. Reyburn H. New WHO guidelines for the treatment of malaria. *BMJ*. 2010;340:c2637.
131. Kunte R, Kunwar R. WHO Guidelines for the treatment of malaria. *Med J Armed Forces India*. 2011;67:376.
132. D’Alessandro U, Olaleye B, Langerock P, Aikins MK, Thomson MC, Cham MK, et al. Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednet programme. *The Lancet*. 1995;345:479–83.
133. WHO. Integrated management of pregnancy and childbirth. Pregnancy, childbirth, postpartum and newborn care. WHO. [http://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/documents/imca-essential-practice-guide/en/](http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/imca-essential-practice-guide/en/). Accessed 18 Mar 2020.
134. Kabanywany AM, MacArthur JR, Stolk WA, Habbema JDF, Mshinda H, Bloland PB, et al. Malaria in pregnant women in an area with sustained high coverage of insecticide-treated bed nets. *Malar J*. 2008;7:133.
135. ter Kuile FO, Terlouw DJ, Phillips-Howard PA, Hawley WA, Friedman JF, Kariuki SK, et al. Reduction of malaria during pregnancy by permethrin-treated bed nets in an area of intense perennial malaria transmission in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68 4 Suppl:50–60.
136. Miller JM, Korenromp EL, Nahlen BL, W Steketee R. Estimating the number of insecticide-treated nets required by African households to reach continent-wide malaria coverage targets. *JAMA*. 2007;297:2241–50.
137. van Eijk AM, Hill J, Larsen DA, Webster J, Steketee RW, Eisele TP, et al. Coverage of intermittent preventive treatment and insecticide-treated nets for the control of malaria during

- pregnancy in sub-Saharan Africa: a synthesis and meta-analysis of national survey data, 2009-11. *Lancet Infect Dis.* 2013;13:1029–42.
138. WHO Expert Committee on Malaria (1998 : Geneva S, Organization WH. WHO Expert Committee on Malaria : twentieth report. World Health Organization; 2000. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42247>. Accessed 18 Mar 2020.
139. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med.* 2000;343:1608–14.
140. World Health Organization. WHO recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience. WHO. [http://www.who.int/reproductivehealth/publications/maternal\\_perinatal\\_health/anc-positive-pregnancy-experience/en/](http://www.who.int/reproductivehealth/publications/maternal_perinatal_health/anc-positive-pregnancy-experience/en/). Accessed 12 Aug 2019.
141. Schultz LJ, Steketee RW, Macheso A, Kazembe P, Chitsulo L, Wirima JJ. The efficacy of antimalarial regimens containing sulfadoxine-pyrimethamine and/or chloroquine in preventing peripheral and placental *Plasmodium falciparum* infection among pregnant women in Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51:515–22.
142. Verhoeff FH, Brabin BJ, Chimsuku L, Kazembe P, Russell WB, Broadhead RL. An evaluation of the effects of intermittent sulfadoxine-pyrimethamine treatment in pregnancy on parasite clearance and risk of low birthweight in rural Malawi. *Ann Trop Med Parasitol.* 1998;92:141–50.
143. Shulman CE, Dorman EK, Cutts F, Kawuondo K, Bulmer JN, Peshu N, et al. Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 1999;353:632–6.
144. Briand V, Cottrell G, Massougboji A, Cot M. Intermittent preventive treatment for the prevention of malaria during pregnancy in high transmission areas. *Malar J.* 2007;6:160.
145. Menéndez C, Bardají A, Sigauque B, Sanz S, Aponte JJ, Mabunda S, et al. Malaria prevention with IPTp during pregnancy reduces neonatal mortality. *PloS One.* 2010;5:e9438.
146. Eisele TP, Larsen DA, Anglewicz PA, Keating J, Yukich J, Bennett A, et al. Malaria prevention in pregnancy, birthweight, and neonatal mortality: a meta-analysis of 32 national cross-sectional datasets in Africa. *Lancet Infect Dis.* 2012;12:942–9.
147. Henry M, Florey L, Youll S, Gutman JR. An analysis of country adoption and implementation of the 2012 WHO recommendations for intermittent preventive treatment for pregnant women in sub-Saharan Africa. *Malar J.* 2018;17:364.
148. Hill J, Hoyt J, van Eijk AM, D’Mello-Guyett L, Ter Kuile FO, Steketee R, et al. Factors affecting the delivery, access, and use of interventions to prevent malaria in pregnancy in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2013;10:e1001488.
149. Webster J, Kayentao K, Bruce J, Diawara SI, Abathina A, Haiballa AA, et al. Prevention of malaria in pregnancy with intermittent preventive treatment and insecticide treated nets in Mali: a quantitative health systems effectiveness analysis. *PloS One.* 2013;8:e67520.

150. Salanti A, Dahlbäck M, Turner L, Nielsen MA, Barfod L, Magistrado P, et al. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Exp Med*. 2004;200:1197–203.
151. Tuikue-Ndam N, Deloron P. Developing vaccines to prevent malaria in pregnant women. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15:1173–82.
152. Tuikue Ndam NG, Salanti A, Le-Hesran J-Y, Cottrell G, Fievet N, Turner L, et al. Dynamics of anti-VAR2CSA immunoglobulin G response in a cohort of senegalese pregnant women. *J Infect Dis*. 2006;193:713–20.
153. Pehrson C, Heno KK, Adams Y, Resende M, Mathiesen L, Soegaard M, et al. Comparison of functional assays used in the clinical development of a placental malaria vaccine. *Vaccine*. 2017;35:610–8.
154. United Nations Development Program. | Human Development Reports. <http://hdr.undp.org/en/countries/profiles/BEN>. Accessed 6 Feb 2020.
155. Organisation Mondiale de la Santé. Profil sanitaire du Bénin. WHO. <http://www.who.int/countries/ben/fr/>. Accessed 6 Feb 2020.
156. Fabiana Piovesan Alves, Luiz Herman S. Gil, Paulo E. M. Ribolla, Luiz Hildebrando Pereira Da Silva, Erney P. Camargo, Mauro T. Marrelli. Asymptomatic Carriers of *Plasmodium* spp. as Infection Source for Malaria Vector Mosquitoes in the Brazilian Amazon | *Journal of Medical Entomology* | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/jme/article-abstract/42/5/777/862895>. Accessed 13 Feb 2019.
157. Petra Schneider, J. Teun Bousema, Louis C. Gouagna, Silas Otieno, ROBERT W. Sauerwein. Submicroscopic *Plasmodium Falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection | *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2007.76.470>. Accessed 13 Feb 2019.
158. Gonçalves BP, Walker PG, Cairns M, Tiono AB, Bousema T, Drakeley C. Pregnant Women: An Overlooked Asset to *Plasmodium falciparum* Malaria Elimination Campaigns? *Trends Parasitol*. 2017. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492217300661>.
159. Akogbeto M, Modiano D, Bosman A. Malaria transmission in the lagoon area of Cotonou, Benin. *Parassitologia*. 1992;34:147–54.
160. Djènontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry M-C, Bousari O, Chabi J, et al. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasit Vectors*. 2010;3:83.
161. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors*. 2010;3:117.
162. Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, Zaramella M, Caputo A, Garavelli PL. Climate, environment and transmission of malaria. *Infez Med*. 2016;24:93–104.

163. Planche T T, Krishna S, Kombila M, Engel K, Faucher JF, Ngou-Milama E, et al. Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:599–602.
164. Swysen C, Vekemans J, Bruls M, Oyakhirome S, Drakeley C, Kremsner P, et al. Development of standardized laboratory methods and quality processes for a phase III study of the RTS, S/AS01 candidate malaria vaccine. *Malar J.* 2011;10:223.
165. Mischlinger J, Pitzinger P, Veletzky L, M G, R Z-M, Aa A, et al. Validity and Reliability of Methods to Microscopically Detect and Quantify Malaria Parasitaemia. *Tropical medicine & international health : TM & IH.* 2018. doi:10.1111/tmi.13124.
166. Diallo A, Ndam NT, Moussiliou A, Dos Santos S, Ndonky A, Borderon M, et al. Asymptomatic carriage of plasmodium in urban Dakar: the risk of malaria should not be underestimated. *PloS One.* 2012;7:e31100.
167. Taylor SM, Mayor A, Mombo-Ngoma G, Kenguele HM, Ouédraogo S, Ndam NT, et al. A quality control program within a clinical trial Consortium for PCR protocols to detect Plasmodium species. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2144–9.
168. Schmiegelow C, Matondo S, Minja DTR, Resende M, Pehrson C, Nielsen BB, et al. Plasmodium falciparum Infection Early in Pregnancy has Profound Consequences for Fetal Growth | *The Journal of Infectious Diseases* | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/jid/article/216/12/1601/4349817>. Accessed 5 Apr 2019.
169. World Health Organization. World malaria report 2019. WHO. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2019/en/>. Accessed 8 Jan 2020.
170. Williams R. Generalized Ordered Logit/Partial Proportional Odds Models for Ordinal Dependent Variables: *Stata J.* 2006. doi:10.1177/1536867X0600600104.
171. Williams R. Understanding and interpreting generalized ordered logit models. *J Math Sociol.* 2016;40:7–20.
172. Adjusted Predictions & Marginal Effects for Multiple Outcome Models &. *StuDocu.* <https://www.studocu.com/en-us/document/university-of-notre-dame/categorical-data-analysis/lecture-notes/adjusted-predictions-marginal-effects-for-multiple-outcome-models/1194070/view>. Accessed 16 Sep 2020.
173. Moore KA, Simpson JA, Paw MK, Pimanpanarak M, Wiladphaingern J, Rijken MJ, et al. Safety of artemisinins in first trimester of prospectively followed pregnancies: an observational study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:576–83.
174. Benjamin JM, Moore BR, Salman S, Page-Sharp M, Tawat S, Yadi G, et al. Population Pharmacokinetics, Tolerability, and Safety of Dihydroartemisinin-Piperaquine and Sulfadoxine-Pyrimethamine-Piperaquine in Pregnant and Nonpregnant Papua New Guinean Women. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:4260–71.
175. Gutman J, Kovacs S, Dorsey G, Stergachis A, ter Kuile FO. Safety, tolerability, and efficacy of repeated doses of dihydroartemisinin-piperaquine for prevention and treatment of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017;17:184–93.

176. TIPTOP - Advancing Prevention of Malaria in Pregnancy. TIPTOP. <https://www.tiptopmalaria.org/news/>. Accessed 30 Mar 2020.
177. Hounkonnou CPA, Briand V, Fievet N, Accrombessi M, Yovo E, Mama A, et al. Dynamics of Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infections Throughout Pregnancy: A Preconception Cohort Study in Benin. *Clin Infect Dis*. doi:10.1093/cid/ciz748.
178. Tuikue Ndam N, Tornyigah B, Dossou AY, Escriou G, Nielsen MA, Salanti A, et al. Persistent *Plasmodium falciparum* Infection in Women With an Intent to Become Pregnant as a Risk Factor for Pregnancy-associated Malaria. *Clin Infect Dis*. 2018;67:1890–6.
179. Cohee LM, Kalilani-Phiri L, Boudova S, Joshi S, Mukadam R, Seydel KB, et al. Submicroscopic malaria infection during pregnancy and the impact of intermittent preventive treatment. *Malar J*. 2014;13:274.
180. Berry I, Walker P, Tagbor H, Bojang K, Coulibaly SO, Kayentao K, et al. Seasonal Dynamics of Malaria in Pregnancy in West Africa: Evidence for Carriage of Infections Acquired Before Pregnancy Until First Contact with Antenatal Care. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98:534–42.
181. Jafari-Guemouri S, Courtois L, Mama A, Rouas B, Neto Braga G, Accrombessi M, et al. A Genotyping Study in Benin Comparing the Carriage of *Plasmodium falciparum* Infections Before Pregnancy and in Early Pregnancy: Story of a Persistent Infection. *Clin Infect Dis*. doi:10.1093/cid/ciaa841.
182. Accrombessi M, Yovo E, Fievet N, Cottrell G, Agbota G, Gartner A, et al. Effects of Malaria in the First Trimester of Pregnancy on Poor Maternal and Birth Outcomes in Benin. *Clin Infect Dis*. 2018.
183. Pullan RL, Bukirwa H, Staedke SG, Snow RW, Brooker S. *Plasmodium* infection and its risk factors in eastern Uganda. *Malar J*. 2010;9:2.
184. Singh M, Brown G, Rogerson SJ. Ownership and use of insecticide-treated nets during pregnancy in sub-Saharan Africa: a review. *Malar J*. 2013;12:268.
185. Peters PJ, Thigpen MC, Parise ME, Newman RD. Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. *Drug Saf*. 2007;30:481–501.
186. Oyibo WA, Agomo CO. Scaling Up of Intermittent Preventive Treatment of Malaria in Pregnancy Using Sulphadoxine–Pyrimethamine: Prospects and Challenges. *Matern Child Health J*. 2011;15:542–52.
187. Cohee LM, Kalilani-Phiri L, Mawindo P, Joshi S, Adams M, Kenefic L, et al. Parasite dynamics in the peripheral blood and the placenta during pregnancy-associated malaria infection. *Malar J*. 2016;15:483.
188. Huynh B-T, Fievet N, Briand V, Borgella S, Massougbdji A, Deloron P, et al. Consequences of gestational malaria on birth weight: finding the best timeframe for intermittent preventive treatment administration. *PloS One*. 2012;7:e35342.

189. Kayentao K, Garner P, van Eijk AM, Naidoo I, Roper C, Mulokozi A, et al. Intermittent preventive therapy for malaria during pregnancy using 2 vs 3 or more doses of sulfadoxine-pyrimethamine and risk of low birth weight in Africa: systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2013;309:594–604.
190. White NJ. Intermittent Presumptive Treatment for Malaria. *PLoS Med*. 2005;2. doi:10.1371/journal.pmed.0020003.
191. Lufele E, Umbers A, Ordi J, Ome-Kaius M, Wangnapi R, Unger H, et al. Risk factors and pregnancy outcomes associated with placental malaria in a prospective cohort of Papua New Guinean women. *Malar J*. 2017;16:427.
192. Tran EE, Cheeks ML, Kakuru A, Muhindo MK, Natureeba P, Nakalembe M, et al. The impact of gravidity, symptomatology and timing of infection on placental malaria. *Malar J*. 2020;19:227.
193. Guitard J, Andersen P, Ermont C, Gnidehou S, Fievet N, Lund O, et al. *Plasmodium falciparum* population dynamics in a cohort of pregnant women in Senegal. *Malar J*. 2010;9:165.
194. Doritchamou J, Sossou-tchatcha S, Cottrell G, Moussiliou A, Hounton Houngbeme C, Massougbdji A, et al. Dynamics in the cytoadherence phenotypes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes isolated during pregnancy. *PloS One*. 2014;9:e98577.
195. Gikandi PW, Noor AM, Gitonga CW, Ajanga AA, Snow RW. Access and barriers to measures targeted to prevent malaria in pregnancy in rural Kenya\*. *Trop Med Int Health*. 2008;13:208–17.
196. Huynh B-T, Fievet N, Gbaguidi G, Dechavanne S, Borgella S, Guézo-Mévo B, et al. Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:214–20.
197. Taha TET, Gray RH, Mohamedani AA. Malaria and Low Birth Weight in Central Sudan. *Am J Epidemiol*. 1993;138:318–25.
198. Basco LK, Eldin de Pécoulas P, Wilson CM, Le Bras J, Mazabraud A. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995;69:135–8.
199. Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem*. 1994;224:397–405.
200. Wang P, Read M, Sims PF, Hyde JE. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol*. 1997;23:979–86.
201. Bertin G, Briand V, Bonaventure D, Carrieu A, Massougbdji A, Cot M, et al. Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine during intermittent preventive treatment of pregnant women in Benin. *Malar J*. 2011;10:196.

202. Vodouhe MV V, Aaa O, Ir S, Fm H, K S, Bolinon SY D, et al. Determinants of Adherence to Intermittent Preventive Treatment for Malaria with Sulfadoxine Pyrimethamine (IPTp-SP) in Pregnant Women in Parakou (BENIN). *J Pregnancy Child Health*. 2016;3. doi:10.4172/2376-127X.1000282.
203. Adewole AO, Fawole O, Ajayi I, Yusuf B, Oladimeji A, Waziri E, et al. Determinants of intermittent preventive treatment of malaria among women attending antenatal clinics in primary health care centers in Ogbomoso, Oyo State, Nigeria. *Pan Afr Med J*. 2019;33:101.
204. Sangaré LR, Stergachis A, Brentlinger PE, Richardson BA, Staedke SG, Kiwuwa MS, et al. Determinants of use of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: Jinja, Uganda. *PLoS One*. 2010;5:e15066.
205. Hill J. et al., al. Effectiveness of antenatal clinics to deliver intermittent preventive treatment and insecticide treated nets for the control of malaria in pregnanc... - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24651078>. Accessed 25 Jun 2019.
206. Mubyazi GM, Bygbjerg IC, Magnussen P, Olsen O, Byskov J, Hansen KS, et al. Prospects, achievements, challenges and opportunities for scaling-up malaria chemoprevention in pregnancy in Tanzania: the perspective of national level officers. *Malar J*. 2008;7:135.
207. Pehrson C, Salanti A, Theander TG, Nielsen MA. Pre-clinical and clinical development of the first placental malaria vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16:613–24.
208. Dellicour S, Brasseur P, Thorn P, Gaye O, Olliaro P, Badiane M, et al. Probabilistic record linkage for monitoring the safety of artemisinin-based combination therapy in the first trimester of pregnancy in Senegal. *Drug Saf*. 2013;36:505–13.
209. Dellicour S, Sevene E, McGready R, Tinto H, Mosha D, Manyando C, et al. First-trimester artemisinin derivatives and quinine treatments and the risk of adverse pregnancy outcomes in Africa and Asia: A meta-analysis of observational studies. *PLoS Med*. 2017;14. doi:10.1371/journal.pmed.1002290.
210. Kakuru A, Jagannathan P, Muhindo MK, Natureeba P, Awori P, Nakalembe M, et al. Dihydroartemisinin-Piperaquine for the Prevention of Malaria in Pregnancy. *N Engl J Med*. 2016;374:928–39.

## *IX. ANNEXES*

*Annexe 1 : Fichiers supplémentaires de l'article 1*

**Table 1: Comparison of some characteristics of pregnant women who delivered (273) and those who did not achieved their pregnancy (138) in the RECIPAL study, Southern Benin, 2014–2017**

Variables		Pregnant women who delivered (273)	Pregnant women who did not achieved the pregnancy(138)	p-value (273 vs 138) <sup>1</sup>
<b>Age (years)</b>		26.8	26.7	0.92
<b>Gestational rank</b>	Primigravidae	24	13	0.16
	Secundigravidae	40	28	
	Multigravidae	209	97	
<b><i>P. falciparum</i> infection before pregnancy</b>	Negative	188	99	0.76
	Submicroscopic	68	31	
	Microscopic	17	7	
<b>Ethnic group</b>	Toffin	203	98	0.44
	Others	70	47	

<sup>1</sup> Student's t-test and Chi2 test were respectively used to compare continuous and categorical variables

**Table 2: Factors associated with the number of malaria infections during the first trimester of pregnancy (multivariate Poisson regression model, N = 194 pregnant women); Sô-ava and Akassato, Benin 2015-2016**

Variables (terms)	Final multivariable model			
	N	IRRa	IC95 %	pvalue
<b>Use of LLIN by the woman the week before the visit</b>				0.003
<i>No</i>	35	1		
<i>Yes</i>	159	0.40	(0.20-0.78)	
<b>Physical integrity of the pregnant woman's LLIN</b>				0.004
<i>Bad</i>	82	1		
<i>Good</i>	112	0.44	(0.24-0.81)	
<b>Quantitative bio-efficacy <sup>1</sup>of the pregnant woman's LLIN</b>	194	0.98	(0.95-0.99)	0.02

N: Total; IRRa: Incidence Rate Ratio adjusted; CI 95 %: Confidence Interval at 95 %; LLIN: Long Lasting Impregnated bedNets; pvalue: one-sided pvalue

<sup>1</sup> Quantitative bio-efficacy is defined as the proportion of female anopheles who died 24 hours after exposure to the LLIN

## *Annexe 2 : Fichiers supplémentaires de l'article 2*

Supplementary file 1: Factors associated with the number of *P. falciparum* infections (microscopic+submicroscopic) after the 17th week of gestation for women receiving 2 IPTp doses during the pregnancy (Negative binomial model, N=173), RECIPAL 2014-2017, Benin

Variables		Number of <i>P. falciparum</i> infection(s)		
		aIRR	CI 95%	p-value
Microscopic <i>P. falciparum</i> at the first trimester of pregnancy		1.99	[1.28-3.11]	0.002
Submicroscopic <i>P. falciparum</i> infection at the first trimester of pregnancy		1.99	[1.32-2.99]	0.001
Ethnicity	Toffin	1.91	[1.20-3.04]	0.007
Timing of the first IPTp dose	≤ 21.2 wg	1		
	>21.2 wg	1.48	[0.95-2.32]	0.084

Abbreviations: N, number of pregnant women; RECIPAL, Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme; aIRR, adjusted incidence rate ratio; IPTP, intermittent preventive treatment in pregnancy; wg, weeks of gestation.

Supplementary file 2: Factors associated with the number of submicroscopic *P. falciparum* infections after the 17th week of gestation for women receiving 2 IPTp doses during the pregnancy (Negative binomial model, N=105). Sub-sample of pregnant women without microscopic *P. falciparum* infections from the 17<sup>th</sup> wg, RECIPAL 2014-2017, Benin

Variables	Number of <i>P. falciparum</i> infection(s)			
	aIRR	CI 95%	p-value	
Submicroscopic <i>P. falciparum</i> at the first trimester of pregnancy	2.06	[1.10-3.87]	0.024	
Ethnicity	Toffin	1.93	[0.90-4.13]	0.091
Timing of the first IPTp dose	≤21.2 wg	1		
	>21.2 wg	2.11	[0.90-4.94]	0.087

Abbreviations: N, number of pregnant women; RECIPAL, Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme; aIRR, adjusted incidence rate ratio; IPTP, intermittent preventive treatment in pregnancy; wg, weeks of gestation.

Supplementary file 3: Factors associated with the number of *P. falciparum* infections (microscopic+submicroscopic) after the 17th week of gestation (Univariate negative binomial model, N=273), RECIPAL 2014-2017, Benin

Variables		Number of <i>P. falciparum</i> infection(s)		
		IRR	CI 95%	p-value
Microscopic <i>P. falciparum</i> at the first trimester of pregnancy		1.57	[0.96-2.56]	0.07
Submicroscopic <i>P. falciparum</i> infection at the first trimester of pregnancy		1.64	[1.28-2.11]	<0.001
Number of total IPTp dose during the pregnancy	0&1	1		
	2&3	0.64	[0.49-0.83]	0.001
Ethnicity	Toffin	1.82	[1.37-2.43]	<0.001
Number of ANC after 17 wg		1.09	[0.99-1.20]	0.06
Use of ITN the night before	Yes	0.76	[0.43-1.33]	0.33
Timing (wg) of the first IPTp intake	<=21.2	1		
	>21.2	1.37	[1.04-1.82]	0.03

Abbreviations: N, number of pregnant women; RECIPAL, Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme; aIRR, adjusted incidence rate ratio; IPTP, intermittent preventive treatment in pregnancy; wg, weeks of gestation.

Supplementary file 4: Factors associated with the number of submicroscopic *P. falciparum* infections after the 17th week of gestation (Univariate negative binomial model, N=157), RECIPAL 2014-2017, Benin

Variables		Number of <i>P. falciparum</i> infection(s)		
		IRR	CI 95%	p-value
Submicroscopic <i>P. falciparum</i> infection at the first trimester of pregnancy		1.79	[1.04-3.06]	0.03
Number of total IPTp dose during the pregnancy	0&1	1		
	2&3	0.77	[0.40-1.48]	0.43
Ethnicity	Toffin	1.71	[0.95-3.07]	0.07
Number of ANC after 17 wg		1.24	[0.99-1.56]	0.06
Use of ITN the night before	Yes	1.19	[0.44-3.21]	0.72
Timing (wg) of the first IPTp intake	<=21.2	1		
	>21.2	1.57	[0.86-2.86]	0.14

Abbreviations: N, number of pregnant women; RECIPAL, Retard de Croissance Intra-utérin et Paludisme; IRR, incidence rate ratio; IPTP, intermittent preventive treatment in pregnancy; wg, weeks of gestation.

*Annexe 3: Distribution de la densité parasitaire en pré-grossesse et aux différents trimestres de la grossesse chez les femmes ayant une parasitémie positive*

Parasitémie (parasites/uL)				
	Pré-grossesse	Trimestre1	Trimestre2	Trimestre3
Moyenne (min-max)				
GE/DP	568,6 (12-2760)	2255,9 (18-60000)	4027,8 (46,6-30000)	13641 (18-138600)
PCR	460,7 (0,9-6357,6)	1136,9 (0,4-59889,7)	1665,8 (3,6-72044,1)	6775,6 (5,2-206392,1)

*Annexe 4: Quelques photos du terrain EVALMOUS*



## Résumé

Chaque année, environ 11 millions de femmes sont exposées au paludisme gestationnel (PG) en Afrique sub-Saharienne, avec pour principales conséquences l'anémie maternelle (AM) et le faible poids de naissance du nouveau-né (FPN). L'OMS recommande, en zone de forte transmission, l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide et un traitement préventif intermittent (TPI). Cette stratégie a permis de baisser la prévalence du PG au niveau mondial. Les infections détectées par Polymerase Chain Reaction (PCR) dites « submicroscopiques » constituent un grand réservoir d'infections et leur impact sur la santé des populations reste mal connue. Ces infections submicroscopiques (IS) revêtent une importance de santé publique majeure. L'objectif de cette thèse est de caractériser la dynamique des IS aux différents trimestres de la grossesse et d'évaluer l'efficacité du TPI sur ces infections. Pour cela, nous nous sommes basés sur les données d'une cohorte de 273 femmes enceintes suivies de la préconception jusqu'à l'accouchement au Bénin.

Nous avons montré que les IS constituent un large réservoir d'infections comparé aux infections microscopiques pendant la grossesse. Le jeune âge et l'existence d'une IS avant grossesse augmentent le risque d'infections palustres aux différents trimestres de la grossesse avec un risque plus élevé au 1<sup>er</sup> trimestre. Nous avons aussi noté une utilisation sous-optimale du TPI. L'administration précoce du TPI permettait de réduire le nombre d'IS à partir du 2<sup>ème</sup> trimestre de grossesse. Nous recommandons une stratégie de prévention combinée qui débiterait dès le début de la grossesse, le challenge étant d'avoir un accès précoce aux femmes enceintes.

**Mots-clés :** infections submicroscopiques, grossesse, *Plasmodium falciparum*, 1<sup>er</sup> trimestre, cohorte, Bénin

## Abstract

Each year, approximately 11 million women are exposed to malaria in pregnancy (MiP) in sub-Saharan Africa; the main consequences being maternal anemia (MA) and low birth weight (LBW) of the newborn. WHO recommends the use of insecticide-treated nets and intermittent preventive treatment (IPT) in areas of high transmission. The use of this strategy has led to a decrease in the prevalence of MiP. The infections detected by PCR called "submicroscopic" constitute a large reservoir of infections and their impact on the health of populations remains poorly known. These submicroscopic infections (SI) are of major public health importance. The objective of this thesis is to characterize the dynamics of SI in the three trimesters of pregnancy and to evaluate the efficacy of IPT on these infections. Thus, we used data from a cohort of 273 pregnant women followed from preconception to delivery in Benin. We showed that SI constitute a large reservoir of infections compared to microscopic infections during pregnancy. Young age and the occurrence of SI before pregnancy increase the risk of malaria infections in different trimesters of pregnancy with a higher risk in the first trimester. We also noted a sub-optimal use of IPT. Early administration of IPT reduced the number of SI from the 2nd trimester of pregnancy. We recommend a combined prevention strategy that would begin early in pregnancy, the challenge for optimal achievement of this recommendation being to have early access to pregnant women.

**Keywords:** Submicroscopic infections, pregnancy, *Plasmodium falciparum*, 1st trimester, cohort, Benin