

REPUBLIQUE DU MALI

*Un Peuple-Un But-Une Foi*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES

ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018

N° \_\_\_\_\_/

**Prévalence des marqueurs de résistance sur les gènes  
*Pfmdr1* et *PfK13* dans la localité de Sélingué en 2016**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le \_\_/07/2018 devant la faculté de  
Pharmacie pour obtenir le Grade de

**DOCTEUR EN PHARMACIE**

**(DIPLOME D'ETAT)**

Par

**M. Zakaria HAIDARA**

**JURY**

Président du jury :           Professeur Guimogo DOLO  
Membres :                    Professeur Mouctar DIALLO  
                                  Docteur Dade Ben Sidi HAIDARA  
Co-directeur de thèse :    Docteur Youssouf DIARRA  
Directeur de thèse :        Professeur Ousmane KOITA

Cette thèse a reçu le financement du Projet President's Malaria Initiative (PMI-USPQ ; FAA-16-002 USTTB)

**LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE****ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2017-2018****ADMINISTRATION****Doyen** : Boubacar TRAORE, Professeur**Vice-doyen** : Ababacar I. MAIGA, Professeur**Secrétaire principal** : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil**Agent comptable** : Famalé DIONSAN, Contrôleur des Finances.**LES PROFESSEURS HONORAIRES**

M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Boulkassoum	H Aidara	Législation
M. Moussa	HARAMA	Chimie Organique (décédé)
M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
M. Alou A.	KEÏTA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Bréhima	KOUMARE	Bactériologie et Virologie
M. Abdrahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

**DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES****PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE**

M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie /Parasitologie

M. Alassane	DICKO	Santé Publique
M. Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
M. Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

### **MAITRES DE CONFERENCE/MAITRES DE RECHERCHE**

M. Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
M. Abdoulaye	DJIMDE	Bactériologie-Virologie
M. Akory Ag	IKNANE	Santé Publique-Nutrition
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie <b>chef de DER</b>
M. Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé Environnement

### **MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-Virologie
M. Charles	ARAMA	Immunologie
M. Boubacar Tiétié	BISSAN	Biologie Clinique
M. Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie Clinique
M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
M. Souleymane	DAMA	Parasitologie Entomologie méd.
M. Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
M. Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
M. Seydina S.A.	DIAKITE	Immunologie
M. Yaya	GOITA	Biochimie Clinique
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
M. Kassoum	KAYENTAO	Santé Publique Biostatistiques

M.Aminatou	KONE	Biologie moléculaire
M.Birama Apho	LY	Santé publique
M.Dinkorma	OULOLOGUEM	Biologie Cellulaire
M. Issiaka	SAGARA	Santé Publique Biostatistiques
M.Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
Mme. Fanta	SANGHO	Santé Publique
M. Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique Biostatistiques

### **ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE**

Mme. Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
M. Issa	DIARRA	Immunologie
M. Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
Mme. Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
Mme. Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Epidémiologie
M. Falaye	KEÏTA	Santé Publique/Santé Environ.
M. N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
M. Yacouba	MAÏGA	Biostatistiques
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
M. Oumar	SANGHO	Epidémiologie
M. Djakaridia	TRAORE	Hématologie

### **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

#### **PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. SAÏBOU	MAÏGA	Législation
Mme. ROKIA	SANOGO	Pharmacognosie <b>Chef de DER</b>

**MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE**

N°	PRENOM	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

**MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

M. LOSENI	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
M. Bakary Moussa	CISSE	Galénique
M. Yaya	COULIBALY	Législation
M. Issa	COULIBALY	Gestion
Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
Moussa	SANOGO	Gestion
Mme. ADIARATOU	TOGOLA	Pharmacognosie

**ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE**

M. Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
M. Antoine	DARA	Sciences Pharmaceutiques
M. Daouda LASSINE	DEMBELE	Pharmacognosie
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
M. Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
M. Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
Mme. Assitan	KALOGA	Législation
M. Ahmed	MAÏGA	Législation
Mme AICHATA Ben Adam	MARIKO	Galénique
M. Aboubacar	SANGHO	Législation

M. BOURAMA	TRAORE	Législation
M. Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
M. Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
Mme. Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

**DER : SCIENCES DU MEDICAMENT****PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

M. Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
M. Benoît	KOUMARE	Chimie Analytique
M. Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

**MAITRES DE CONFERENCE/MAITRES DE RECHERCHE**

M. Sékou	BAH	Pharmacologie
----------	-----	---------------

**MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

M. Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
M. Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie
Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

**ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE**

M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
M. Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
M. Blaise	DACKOOU	Chimie Analytique

Mme. Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
M. Abdrahamane	DIARA	Toxicologie
M. Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique
M. Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

**DER : SCIENCES FONDAMENTALES****PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

M. Mouctar	DIALLO	Biologie/ <b>Chef de DER</b>
M. Cheick F.	TRAORE	Biologie/Entomologie
M. Mahamadou	TRAORE	Génétique

**MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE**

M. Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée
------------	---------	------------------

**MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

M. Abdoulaye	KANTE	Anatomie
M. Boureïma	KELLY	Physiologie Médicale

**ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE**

Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
Modibo	DIALLO	Génétique
Moussa	KONE	Chimie Organique
Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

**CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

M. Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
M. Babou	BAH	Anatomie
M. Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
M. Souleymane	COULIBALY	Psychologie
M. Bouba	DIARRA	Bactériologie
M. Modibo	DIARRA	Nutrition
M. Moussa I.	DIARRA	Biophysique
M. Babacar	DIOP	Chimie
M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie
M. Yaya	KANE	Galénique
M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Aboubakary	MAÏGA	Chimie Organique
M. Massambou	SACKO	SCMP/SIM
M. Modibo	SANGARE	Anglais
M. Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
Mme. Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
M. Fana	TANGARA	Maths
M. Abdel Kader	TRAORE	Pathologies Médicales
M. Boubacar	ZIBEÏROU	Physique



## **DEDICACES ET REMERCIEMENTS**

**Je dédie cette thèse :**

**AU TOUT PUISSANT, LE TOUT MISERICORDIEUX, LE TRES MISERICORDIEUX**

Pour la santé, le courage et la force que vous m'avez donnés et qui m'ont permis de surmonter les difficultés rencontrées lors de ma formation et l'élaboration de cette thèse.

### **A mon père Mohamed Ather HAIDARA**

Cher père vous avez toujours été une miséricorde de Dieu sur nous, vous nous conseillez toujours l'amour du prophète Mohamed (Paix et salut sur lui) et la soumission à ALLAH. Vos conseils continuent de nous éclairer la route de la vie et votre soutien permanent nous donne l'espoir. Qu'ALLAH vous donne une longue vie, qu'IL vous pardonne dans ce monde ici-bas et à l'au-delà, Qu'IL soit satisfait de vous le jour des comptes ! Amen.

### **A ma mère, AISSATA HAIDARA**

Mère attentive et affective. Ton dévouement, tes sacrifices, ton amour pour tes enfants font de toi une mère exemplaire. Puisse Dieu te prêter longue vie et santé afin que tu puisses goûter au fruit de ce travail, qu'IL te pardonne dans ce monde ici-bas et à l'au-delà, Qu'IL soit satisfait de toi le jour des comptes ! Amen.

**A mes oncles et tantes : Badourou Douja HAIDARA, Mariam HAIDARA, Oumou HAIDARA, Abou Mahamane HAIDARA, Nouhoum El moctar HAIDARA.**

Votre sympathie, votre soutien moral et matériel m'ont été d'un appui inestimable pour ce travail. Trouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance.

**A mes frères et sœurs : Sarata HAIDARA, Sadou HAIDARA, Aboubacrine HAIDARA, Youssouf HAIDARA, Abdoul Karim HAIDARA, Zoubeyda HAIDARA.**

Unis par un lien de sang nous sommes appelés à œuvrer ensemble pour la réussite de la tâche commune. Je vous réaffirme mon affection fraternelle et mon profond attachement.

**A MON GRAND PERE Mohamed Salia HAIDARA (In Mémoriam)** Je n'oublierai jamais tes conseils et merci pour toutes tes bénédictions, tu vis dans ma mémoire avec de beaux souvenirs. Qu'ALLAH t'accorde le repos éternel.

**A mes amis : Abdoulaye DIARRA, Modibo TELLY, Mamoutou Barry, Fatoumata Y Traoré, Souleymane Kanadji, Mamoutou Koureissy, Fatoumata Mariam Daffé, Abdoul wahab HAIDARA, Moussa Touré(Missira).** Pour votre soutien moral, votre courage, soyez rassurés de mon profond amour. Je vous dédie ce travail en guise de reconnaissance.

**A mes jeunes frères académiques : Hamady SISSOKO, Souleymane Kamissoko, Aboubacar DIALLO, Modibo kane Samassekou, Mohamed HAIDARA(Kati), Mohamed Cheick HAIDARA, CHEICK Oumar DIARRA** en espérant que ce travail vous serve d'exemple et vous incite à faire mieux que moi. Je ne vous oublierai jamais et vous avez toujours été des frères exemplaires, respectueux, courageux. Ce travail est aussi le fruit de votre sacrifice que DIEU vous donne longue vie et beaucoup de réussite.

### **Mention spécial**

**A mes oncles et tantes : Badi HAIDARA, Dr Alhassane HAIDARA, Aminata HAIDARA et Mariam MAIGA**

Vraiment les mots me manquent aujourd'hui pour exprimer toutes vos reconnaissances à ma modeste personne. Vous m'avez entretenu et éduqué, car vous avez su développer en moi les valeurs sociales et culturelles. Depuis mes 6 ans jusqu'aujourd'hui, il ne m'a rien manqué pour vite progresser dans mes études. Vous m'avez prouvé qu'on peut vivre mieux loin de son père et de sa mère, vous m'avez prouvé l'humilité et vous m'avez prouvé qu'est-ce que la bonne fraternité, le goût de la joie de vivre. Tout ce que j'aurai à dire aujourd'hui ne sera pas assez. En m'inclinant devant vous en signe de reconnaissance, dévouement, et entière soumission, je vous présente mes excuses pour tout le mal lié à mon âge et mon orgueil que vous avez dû subir et demande vos bénédictions qui ne m'ont pas d'ailleurs fait défaut. Puisse ce modeste travail fruit de votre engagement me rend digne de vous. Merci pour tous ! Que Dieu le tout puissant nous reste unit, vous accorde sa grâce, sa prospérité, longévité, santé. Qu'IL soit satisfait de vous le jour des comptes. Amen !

**A Dr MAIGA Aboubacarine (Ségou) et Ishak HAIDARA**

Merci pour le soutien moral, matériel et financier, les suggestions, et pour votre aide. Je vous suis très reconnaissant. Que Dieu vous prête succès et longue vie. Amen

## **Remerciements**

### **J'adresse mes sincères remerciements**

**Au corps professoral et à tout le personnel de la Faculté de Pharmacie(FAPH) de la Faculté de médecine et d'Odonto-Stomatologie (F.M.O.S) ;** Pour votre enseignement et éducation scientifique. En plus du savoir, vous nous avez appris le savoir-faire et le savoir être. Nous sommes très fiers d'avoir été l'un de vos apprenants. Trouvez ici l'expression de toute ma gratitude.

**A mes cousins et cousines : Mohamed El Moctar CISSE, Nouhoum MAIGA, Samba HAIADARA, Abdourahamane AN CISSE, Alkassoum HAIADARA, Ibrahim Abou HAIADARA, Fatoumata HAIADARA, Hadizatou HAIADARA, Aicha HAIADARA Kadidia MAIGA, Asma HAIADARA Ibrahim ALhousseyni HAIADARA, Aminata HAIADARA, Mohamed Cheick HAIADARA, Mohamed El Moctar HAIADARA(Moribabougou) Youssouf CISSE, Aboubacrine HAIADARA (Sévaré), Mohamed HAIADARA (Sévaré), Aboubacrine AN CISSE,**

Je me rappelle des bons moments passés ensemble, je vous remercie pour vos gentillesse, vos disponibilités et vos encouragements. Recevez ici l'expression de ma profonde affection et mon sincère attachement.

### **A tous les personnels de la pharmacie Nelson Mandela :**

Aucun mot ne saurait exprimer la joie qui m'anime depuis que je vous ai rencontré. Plus que des collègues, vous êtes pour moi des frères et sœurs. Je prie Dieu qu'il nous accorde longue vie pour réaliser nos rêves, tout en nous épargnant les méchancetés de la vie. Amen !

### **A l'association des Etudiants Ressortissant de la Région de Mopti et Sympathisants (AERMOS) :**

Votre simplicité, votre sensibilité aux problèmes des autres font de vous une famille admirable. Je vous dis tout simplement merci pour tout et puisse Dieu vous récompenser pour vos bienfaits.

**A l'association des Scolaires et Universitaires de Bourem (ASUB) :**

Vous m'avez donné l'opportunité d'exprimer mon leadership tout en me permettant d'apprendre et de renforcer aussi bien mes capacités que mon réseau d'amis. J'ose espérer coupler désormais mes autres occupations à celles de l'ASUB pour continuer à servir mon cercle. A tous les membres de cette belle association, merci d'avoir accepté mon adhésion et de croire en moi.

**Aux personnels des CSCOM de Sélingué et tout le Staff de Missira :**

Je vous présente mes sincères remerciements pour votre coopération pour l'élaboration de ce travail. Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

**A Dr Modibo Coulibaly, Touré,** et tout le personnel du laboratoire de l'Hôpital Sominé Dolo de Mopti pour vos mots d'encouragements. Recevez ici mes remerciements les plus sincères.

**A tous mes camarades ;**

De la promotion Mamadou N'Golo DIARRA (9<sup>ème</sup> promotion du numerus clausus), pour votre courtoisie, votre sens de l'humour et du savoir vivre.

Je m'abstiens de vous citer au risque d'omettre involontairement un nom quelconque. Je garderai le souvenir des bons amis avec qui j'ai passé le moment le plus marquant de ma vie. Courage et bonne chance dans la vie professionnelle.

**A tout le personnel du LBMA,** grand MERCI pour tout ce que j'ai appris et ce que je continue d'apprendre avec vous.

**A mes aînés de la faculté de pharmacie et de la faculté de médecine et d'odontostomatologie : Dr Youssouf DIARRA, Dr Moussa Koné, Dr Kardigué Kamissoko, Dr Anta O MAIGA, Dr Saharou Doucouré.**

Vous m'avez aidé à surmonter des moments difficiles au cours de mes études ; Puissiez-vous trouver le gage de mes sincères considérations.

**A la population de Sélingué,** merci pour votre collaboration.

**A tous les leaders de la commune de Sélingué,** merci pour votre accompagnement.

**A tous les leaders de la commune de Sélingué, merci beaucoup**

**A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail et dont les noms ne sont pas cités, trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.**

**HOMMAGES**  
**AUX MEMBRES**  
**DU JURY**

## **HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY**

### **A notre Maître et Président du Jury**

#### **Professeur Guimogo DOLO**

- ✓ **PhD en entomologie-parasitologie médicale**
- ✓ **Responsable de l'enseignement de la génétique à la FMOS**
- ✓ **Chef de l'unité biologie moléculaire du MRTC**
- ✓ **Membre du Comité Sahélien des Pesticides**
- ✓ **Membre du Comité "Vector Control Working Group" (VCWG) de Roll Back Malaria**
- ✓ **Expert du paludisme travaillant avec les programmes nationaux de lutte contre le paludisme et les villages du millénaire en Afrique de l'Ouest et du Centre**
- ✓ **Assistant technique et conseiller respectivement pour les PNL<sup>P</sup> et le ministère de la Santé**

Nous sommes honorés par votre présence en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations. Votre discrétion, votre profond respect d'autrui font de vous un maître particulièrement aimé et respecté.

Soyez assurés de notre profonde gratitude.

## **A notre Maitre et Jury**

### **Professeur Mouctar DIALLO**

- ✓ **PhD en Parasitologie Entomologie médicale ;**
- ✓ **Professeur de parasitologie/mycologie à la FAPH ;**
- ✓ **Responsable de l'Unité de Diagnostic Parasitaire au MRTC/FMPOS ;**
- ✓ **Chef de D.E.R des Sciences Fondamentales de la FAPH ;**
- ✓ **Président de l'association des biologistes techniciens de laboratoire du Mali.**

Votre rigueur scientifique, votre disponibilité, Votre humanité, votre simplicité, la clarté de vos enseignements, votre amour pour le travail bien fait imposent respect et admiration.

Merci pour votre soutien et les conseils que vous nous avez prodigués. Permettez-moi cher maître de vous adresser l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.



**A notre Maître et juge**

**Docteur Dade Ben Sidi HAIDARA :**

- ✓ **Médecin épidémiologiste à la Direction régionale de la santé de Sikasso**
- ✓ **Ancien Directeur du Centre de santé de référence de Sélingué**

Cher maître vous nous faites l'honneur en acceptant de juger cette thèse.

C'est le lieu de vous remercier pour votre modestie, votre disponibilité constante, vos qualités scientifiques et pédagogiques, votre esprit d'équipe et votre rigueur pour le travail bien fait qui font de vous un maître apprécié.

Permettez-nous cher maître de vous adresser l'expression de notre plus profonde reconnaissance.

**A Notre Maître et Co-directeur de thèse**

**Docteur Youssouf DIARRA :**

- ✓ **Docteur en Pharmacie**
- ✓ **Assistant de Recherche au Laboratoire Biologie Moléculaire Appliquée à la FST**

Cher Maître,

Permettez-nous de vous remercier cher maître de la confiance que vous nous avez faite en acceptant de codiriger cette thèse.

Nous avons beaucoup admiré vos immenses qualités humaines, sociales et scientifiques tout au long de ce travail. Vous avez cultivé en nous, le sens du travail bien fait.

Votre simplicité, votre disponibilité, votre rigueur, votre dynamisme font de vous un maître apprécié de tous.

Trouvez ici, cher maître l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible disponibilité.

## **A notre Maître et Directeur de thèse**

### **Professeur Ousmane KOITA**

- ✓ **Pharmacien Biologiste ;**
- ✓ **Professeur en parasitologie moléculaire ;**
- ✓ **Chargé de cours de biologie moléculaire appliquée à la FST et de biologie animale à la faculté de Pharmacie ;**
- ✓ **Ancien Directeur-Adjoint du SEREFO ;**
- ✓ **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Appliquée à la FST.**

Cher Maître, nous ne cesserons jamais de vous remercier pour la confiance que vous avez placée en nous pour effectuer ce travail.

Les mots me manquent pour vous exprimer combien cela fut un plaisir d'être un de élèves.

Vous nous avez inspiré, suivi et guidé pas à pas dans l'élaboration de ce travail. Votre simplicité, votre compétence et surtout votre rigueur scientifique sont des atouts qui nous ont fascinés et dont nous avons bénéficié tout au long de notre formation.

Cher Maître, trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude et de notre sincère reconnaissance

**LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS**

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ALAT	ALanine Amino Transférase
AM	Artéméther
<i>An arabiensis</i>	<i>Anopheles arabiensis</i>
<i>An funestus</i>	<i>Anopheles funestus</i>
<i>An gambiae s.s</i>	<i>Anopheles gambiae s.s</i>
AQ	Amodiaquine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
AS+AQ	Artesunate+Amodiaquine
ASACO	Association de santé communautaire
BHE	Barrière Hemato-Encephalique
CD	Chloroquine-Dapsone
CDC	Centre Americain de contrôle et de prevention des maladies
CI <sub>50</sub>	Concentration Inhibitrice 50
CPS	Chimiothérapie du Paludisme Saisonnier
CSCom	Centre de Santé Communautaire
CT	Cycle Thershold( seuil du cycle)
CTA	Combinaison thérapeutique à base d'artemisinine
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	Désoxycytidine triphosphate
ddNTP	Didésoxyribonucléotide
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
DHPS	Dihydropteroate synthase
dNTPs	Désoxyribonucléotides
dTTP	désoxythymidine triphosphate
FRC	Formulaire de Report des Cas
G=(G1 G2 et S)	interphase
G6PD	Glucose-6-Phosphate Deshydrogenase

HERG	<i>human Ether-à-go-go-Related Gene</i>
HRP2	Histidin Rich Protein 2 (Proteine Riche en Histidine 2)
IFI	Immunofluorescence indirecte
INR	Rapport international normalisé
INRSP	Institut National de recherche en Santé Publique
<i>k13</i>	Kelch 13
LBMA	Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
M	Mitose
<i>mdr1</i>	Multi-drug resistance protein 1
NIH	National Institutes of Health
ODRS	Office de développement rurale de Sélingué
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PABA	acide P-aminobenzoïque
Pan-LDH	Malaria pan Lactate Dehydrogenase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Photo-induced electron transfer
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pfk13</i>	<i>Plasmodium falciparum kelch 13</i>
<i>Pfmdr1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug drug resistance gene 1
pLDH	<i>Plasmodium</i> lactate dehydrogenase
PQ	Primaquine
PT	Taux de prothrombine
PTT	Temps de thromboplastine
<i>Pv</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>QBC</i>	<i>Quantitative Buffy Coat</i>
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
SP	Sulfadoxine Pyriméthamine
TCP	Temps de Clairance Parasitaire
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TPI	Traitement Préventif Intermittent
TPIe	Traitement préventif intermittent de l'enfant
TPIp	Traitement préventif intermittent pendant la grossesse
TQ	Tafénoquine

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1: Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'homme et le moustique .....	9
Figure 2: Position des moustiques au repos.....	10
Figure 3: Structure Chimique de l'Artémisinine de l'artéméther et de l'artesunate .....	17
Figure 4: Structure Chimique de deux antifoliques.....	19
Figure 5: Structures chimiques de trois antifoliniques .....	20
Figure 6: Structure chimique de l'Atovaquone.....	21
Figure 7: Structure Chimique de la quinine .....	23
Figure 8: Structure chimique de la Méfloquine .....	24
Figure 9: Structure chimique à noyau phénantrénique de l'Halofantrine .....	25
Figure 10: Structure chimique de la Luméfantrine .....	26
Figure 11: Structure moléculaire de la Primaquine, de la Tafénoquine et de la Pamaquine ....	28
Figure 12: Structure chimique de la Chloroquine .....	29
Figure 13: Répartition des pays en fonction de leur degré de sensibilité aux traitements .....	30
Figure 14: Structure chimique de l'Amodiaquine.....	31
Figure 15: Structure chimique de la Pyronaridine .....	32
Figure 16: Structure chimique de la Pipéraquline .....	33
Figure 17: Structure moléculaires des différents antibiotiques utilisés contre la malaria .....	35
Figure 18: Répartition des mutations sur le gène <i>PfK13</i> dans le monde.....	40
Figure 19: Répartition des mutations sur le gène .....	41
Figure 20: Répartition des mutations <i>PfK13</i> en Afrique de l'Ouest .....	42
Figure 21: Répartition des mutations <i>Pfmdr1</i> en Afrique de l'Ouest en 2013 .....	43
Figure 26: Localisation de Sélingué sur la carte du Mali .....	45
Figure 27: Répartition des patients en fonction du genre (n=309).....	64
Figure 28: Répartition des patients par tranche d'âge (n=309).....	65
Figure 29: Répartition des patients en fonction de la parasitémie initiale (n=309) .....	65
Figure 30: Mutations sur le domaine <i>Propeller</i> du gène <i>PfK13</i> .....	68
Figure 31: Répartition des mutations par tranche d'âge.....	69
Figure 32: Répartition des mutations non-silencieuse en fonction du temps de clairance parasitaire .....	72
Figure 33: Répartition des cas d'échecs thérapeutiques selon le profil du parasite avant et au cours du suivi .....	75
Figure 34: Répartition des mutations selon la période de survenue de l'échec thérapeutique .	76
Figure 35: Les haplotypes de <i>K13</i> , <i>mdr1</i> en fonction de la parasitémie .....	76

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1: Protocole d'administration des molécules AL en fonction du poids .....	50
Tableau 2: Protocole d'administration des molécules ASAQ en fonction du poids .....	51
Tableau 3: Listing des examens faits par rendez-vous .....	51
Tableau 4 : Composition du master mix pour la PET-PCR.....	55
Tableau 5: Composition du Master Mix de la 1 <sup>ère</sup> réaction de <i>PfK13</i> .....	56
Tableau 6: Composition du Master Mix de la 2 <sup>ème</sup> réaction de <i>PfK13</i> .....	57
Tableau 8: Master Mix du ExoSAP .....	57
Tableau 9: Cycle sequencing .....	58
Tableau 11: Séquences des amorces de la Région 1 et 2 de <i>Pfmdr1</i> .....	60
Tableau 12 : Composition du Master Mix de la 1 <sup>ère</sup> réaction de <i>Pfmdr1</i> .....	60
Tableau 13: Composition du Master Mix de la 2 <sup>ème</sup> réaction de <i>Pfmdr1</i> .....	60
Tableau 15: Cycle sequencing Master Mix .....	61
Tableau 17: Répartition des patients selon leur positivité au genre <i>Plasmodium</i> (n=309) .....	66
Tableau 18: Répartition des patients selon leur positivité à l'espèce <i>falciparum</i> (n=304).....	66
Tableau 19: Répartition des patients selon le temps de clairance parasitaire (n=292).....	67
Tableau 20: Evolution du temps de clairance parasitaire en fonction de la parasitémie initiale .....	67
Tableau 21: Evolution du temps de clairance parasitaire en fonction de l'âge .....	68
Tableau 22: Répartition des mutations en fonction de la parasitémie n=304 .....	70
Tableau 23: Répartition des mutations en fonction du temps de clairance parasitaire .....	70
Tableau 24: Répartition des mutations <i>Pfmdr1</i> région 1 obtenues des souches isolées avant le traitement (n=268).....	70
Tableau 25: Répartition des mutations selon les tranches de parasitémie .....	71
Tableau 26: Répartition des mutations selon les tranches d'âge.....	72
Tableau 27: Répartition des mutations <i>Pfmdr1</i> région 2 obtenues des souches isolées (n=309) .....	73
Tableau 28: Répartition des mutations de la région 2 en fonction des tranches de parasitémies .....	73
Tableau 29: Répartition des mutations de la region2 en fonction du TCP .....	74
Tableau 30: Répartition des mutations de la région 2 en fonction des tranches d'âge (n=268) .....	74

**TABLE DES MATIERES**

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>2</b>	<b>OBJECTIFS</b> .....	4
2.1	Objectif principal.....	4
2.2	Objectifs spécifiques .....	4
<b>3</b>	<b>GENERALITES</b> .....	5
3.1	Paludisme, généralités sur la maladie.....	5
3.1.1	Historique .....	5
3.1.2	Epidémiologie du paludisme .....	6
3.1.3	Agents pathogènes.....	7
3.1.4	Vecteur du paludisme .....	10
3.2	Diagnostic du paludisme.....	10
3.2.1	Diagnostic parasitologique .....	11
3.2.2	Diagnostic immunologique : ELISA et IFI .....	11
3.2.3	Les tests de diagnostic rapides : TDR .....	12
3.2.4	La Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	13
3.3	Stratégie de lutte contre le paludisme.....	15
3.3.1	Arsenal médicamenteux .....	15
3.3.2	Lutte antivectorielle.....	35
3.3.3	Chimioprophylaxie.....	36
3.4	Généralités sur la résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> aux antipaludiques de l'étude.....	38
3.4.1	Définition de la chimiorésistance.....	38
3.4.2	Répartition mondiale de la résistance aux Artémisinines et leurs partenaires....	39
3.4.3	: Répartition des mutations de <i>PfK13</i> et <i>Pfmdr1</i> en Afrique de l'Ouest .....	42
3.5	Détection des mutations par la méthode de FREDERICH SANGER.....	44
<b>4</b>	<b>METHODOLOGIE</b> .....	45



4.1	Lieu d'étude .....	45
4.2	Période d'étude.....	46
4.3	Echantillonnage.....	46
4.4	Critères d'inclusion .....	46
4.5	Critères de non inclusion .....	46
4.6	Diagnostic des cas du paludisme simple à <i>Plasmodium falciparum</i> .....	47
4.7	Prise de médicaments .....	50
4.8	Suivi des patients.....	51
4.9	Traitement des échantillons .....	52
4.10	Extraction de l'ADN de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	52
4.11	La PET-PCR .....	54
4.12	Le séquençage des échantillons .....	56
4.12.1	Séquençage du Domain <i>Propeller</i> de <i>Pfk13</i> .....	56
4.12.2	Séquençage des régions 1 et 2 de <i>Pfmdr1</i> .....	59
4.12.3	Analyses des séquences après séquençage .....	61
4.13	Considérations éthiques et déontologiques.....	62
4.14	Gestion des données .....	63
<b>5</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>64</b>
5.1	Facteurs démographiques .....	64
5.2	Diagnostic .....	65
5.3	Efficacité des CTAs.....	67
5.4	Mutations sur le domaine <i>Propeller</i> du gène <i>Pfk13</i> .....	68
5.5	Mutations sur le gène <i>Pfmdr1</i> .....	70
5.6	Mutations associées aux cas d'échecs thérapeutiques.....	75
<b>6</b>	<b>COMMENTAIRES ET DISCUSSION</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>RECOMMANDATIONS</b> .....	<b>82</b>

<b>9</b>	<b>RÉFÉRENCES</b> .....	83
<b>10</b>	<b>ANNEXES</b> .....	95

# **INTRODUCTION**

## 1 INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie provoquée par des hématozoaires appartenant au genre *Plasmodium*. Deux espèces parmi les cinq qui infectent l'homme, *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*, ont un impact majeur en santé publique. *Plasmodium falciparum* provoque une infection aiguë, potentiellement mortelle chez les sujets peu ou non immuns et est le parasite le plus répandu sur le continent Africain [1]. La chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* constitue l'un des obstacles majeurs qui entravent l'activité des programmes nationaux de lutte contre le paludisme depuis des décennies [2].

Selon le dernier rapport sur le paludisme dans le monde, publié en novembre 2017 par l'OMS, il y a eu 216 millions de cas de paludisme en 2016, contre 211 millions en 2015. On estime à 445 000 le nombre de décès dus au paludisme en 2016, un chiffre similaire à celui de l'année précédente (446 000) [3]. La Région OMS de l'Afrique supporte une part disproportionnée de la charge mondiale du paludisme. En 2016, 90% des cas de paludisme et 91% des décès dus à cette maladie sont survenus dans cette région. 80% de la charge de morbidité due au paludisme pesaient sur une quinzaine de pays – tous situés en Afrique subsaharienne, sauf l'Inde [3]. Dans les régions où la transmission du paludisme est intense, les enfants de moins de 5 ans risquent tout particulièrement de contracter l'infection, de tomber malades et de mourir; plus des deux tiers (70%) des décès dus au paludisme surviennent dans cette tranche d'âge [3]. Le nombre de décès enregistrés chez les enfants de moins de 5 ans est passé de 440 000 en 2010 à 285 000 en 2016. Toutefois, le paludisme demeure toujours un facteur majeur de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans et un enfant en meurt toutes les deux minutes [3].

La lutte anti vectorielle est historiquement la première méthode de prévention du paludisme. Elle repose sur l'abaissement des taux de transmission en s'appuyant sur trois approches fondamentales (la lutte mécanique et écologique ; la lutte biologique et génétique ; l'utilisation des insecticides chimiques) [4].

Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTAs) sont recommandées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme traitement de première intention du paludisme simple à *P. falciparum* [5].

L'émergence de la résistance de *Plasmodium falciparum* à l'artémisinine en Asie du Sud-Est menace les activités de contrôle et d'élimination du paludisme dans le monde entier [6].

Des études génétiques épidémiologiques et moléculaires ont récemment montré que la résistance aux artémisinines est principalement due à des mutations dans le domaine Propeller de la protéine Kelch13 de *P.falciparum* [6,7]. En Afrique, très peu de mutations sur le gène *PfK13* ont été reportées à Dakar [8], au Mali Ouattara et al.2015 [9], en Ouganda et al., 2015 [10] et 12 autres pays de l'Afrique sub-Sahararienne Kamau et al., 2015 [11]. Ces dernières études ont aussi montré que les mutations rencontrées dans les pays Africains sont différentes de celles retrouvées en Asie du Sud-Est Kamau et al., 2015 [11].

Au Mali, une étude menée sur la baisse de la sensibilité du *Plasmodium* à l'artésunate a prouvé l'efficacité de cette dernière sans clairance parasitaire retardée [12].

La réduction de l'efficacité du traitement aux artémisinines entraîne à son tour une augmentation de la pression sélective sur les médicaments partenaires (Luméfantine, Amodiaquine) des CTAs, ce qui augmente leur risque d'échec [13]. La résistance de *P. falciparum* à ces derniers a été reconnue pour son association aux mutations sur le *Pfmdr1* notamment aux positions 86, 184 et 1246 [14–17] Les mutations amino-terminales (N86Y et Y184F) sont plus communs aux parasites asiatiques et africains, alors que les trois mutations carboxy-terminales (S1034C, N1042D et D1246Y) se retrouvent plus souvent dans les isolats sud-américains (D1246Y est néanmoins présent dans environ 3% des 1502 génomes des parasites Africains récemment séquencés par le consortium MalariaGEN) [13].

Face à ces menaces de résistance aux antipaludiques, l'OMS recommande de procéder à un suivi régulier des antipaludiques dans les zones d'endémie palustre tous les 24 mois [18].

La commune de Sélingué, une zone d'endémie palustre, a bénéficié depuis 2015 de la stratégie intégrée de lutte contre le paludisme par la couverture universelle de l'usage des moustiquaires imprégnées d'insecticides, du traitement gratuit du paludisme simple par la combinaison Artéméther + Luméfantine et le traitement présomptif intermittent avec la sulfadoxine + Pyriméthamine. Simultanément, l'adoption de la CTA (Artéméther + Luméfantine) s'est accompagnée par le retrait de la chloroquine de la liste des médicaments antipaludiques. Ainsi, ce site apparaît comme un lieu propice pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques utilisant à la fois les techniques *in vivo* and *ex vivo* de détection de la résistance des parasites.

C'est ainsi que nous avons conduit une étude dans la commune rurale de Sélingué visant à tester l'efficacité des CTAs (artéméther + luméfantrine pour Coartem®) et (artesunate+amodiaquine pour ASAQ-DENK fixed dose) dans le traitement du paludisme simple à *P.falciparum* et évaluer la dynamique de la population de *P.falciparum* selon le portage des mutations sur les gènes *PfK13* au niveau du domaine Propeller et *Pfmdr1* au niveau des régions 1 et 2.

# **OBJECTIFS**

## 2 OBJECTIFS

### 2.1 Objectif principal

Estimer la prévalence des mutations sur les gènes *Pfm<sub>dr1</sub>* aux régions 1 et 2 par séquençage ainsi que sur le domaine Propeller de *Pfk<sub>13</sub>*

### 2.2 Objectifs spécifiques

- Identifier les mutations circulantes sur les régions 1 et 2 du gène *Pfm<sub>dr1</sub>* ;
- Identifier les mutations sur le domaine Propeller du gène *Pfk<sub>13</sub>* ;
- Evaluer s'il existe un lien entre les facteurs intervenant dans l'échec thérapeutique et les mutations obtenues.



# **GENERALITES**

### 3 GENERALITES

#### 3.1 Paludisme, généralités sur la maladie

##### 3.1.1 Historique

Le parasite responsable du paludisme est le *Plasmodium*. Sa découverte est en grande partie l'œuvre d'Alphonse Laveran, médecin et parasitologue Français né à Paris le 18 juin 1845. Ses recherches sur la maladie paludique débutent en 1878 à Bône en Algérie. Dans son traité sur le Paludisme il dira avoir été orienté par des granulations de pigments noirs observées pendant les autopsies des malades, dont il pista l'origine dans leur corps et les retrouva dans les leucocytes [19]. A côté de ceux-ci se trouvaient des « *corps sphériques, de volume variable, pigmentés, doués de mouvements amiboïdes, et des corps en croissant pigmentés* ». L'hypothèse d'un parasite est posée. Deux ans plus tard, à Constantine, ses doutes se confirment : il distingue sur le bord des corps sphériques pigmentés « *des éléments filiformes ressemblant à des flagelles qui s'agitaient avec une grande vivacité* ». Alphonse Laveran a trouvé des exflagellations de gamétocyte de *P.falciparum*, une espèce de *Plasmodium* [20].

Ce jour-là, le 8 novembre 1880, il venait de découvrir le parasite responsable du Paludisme. Cette découverte fut mal reçue, elle était contraire aux idées de cette période qui consistaient à expliquer l'origine de toutes les maladies par des bactéries (concept pastorien des pathologies). Suite à neuf ans de travaux, il a été considéré que « le parasite de Laveran » était bien le responsable de la maladie paludique. Il fut le premier Français à qui fut attribué en 1907 le prix Nobel de physiologie et de médecine, non seulement pour sa découverte du parasite responsable du Paludisme, l'hématozoaire *Plasmodium*, mais pour l'ensemble de ses travaux dans le domaine de la parasitologie. Une hypothèse des plus crédibles (mais sujette à beaucoup de discussions) est que *P. falciparum* dérive d'un proche parent qu'est le parasite du Paludisme du chimpanzé *P. reichenowi*. Cette hypothèse est corroborée par le constat que ces deux espèces de parasite ont divergé il y a 5 à 7 millions d'années, ce qui coïncide avec la date relative de divergence entre les hommes et les chimpanzés. Il est clair que l'histoire du parasite et de l'homme résulte de longues années de coévolution. Selon les récents modèles d'évolution génétique de *P. falciparum* (une des espèces de *Plasmodium*) était soit bien présent chez nos ancêtres il y a plus de 100 000 ans avec une forte population stable, soit il y a environ 6000 ans lors d'une expansion significative de la population parasitaire [21].

Des fièvres mortelles ayant des ressemblances avec le paludisme ont été relatées notamment en Egypte ancienne et dans l'Antiquité en Inde. Le terme de Malaria (de l'Italien *mal'aria*, ou mauvais air), désigne anciennement la maladie paludique (du Latin *paludis*, c'est à dire marais). Il fut trouvé par le médecin Italien Giovanni Lancisi qui fit la corrélation entre la présence de moustiques et la prédominance de la maladie au niveau des marais. Ronald Ross, médecin britannique, démontra en 1897 que la transmission de la maladie s'effectuait via un moustique. Il s'appuyait sur des travaux réalisés sur le Paludisme aviaire ainsi que la découverte du parasite dans les tubes digestifs de moustiques. Lui aussi fut récompensé par un prix Nobel pour ses travaux sur la maladie. Giovanni Battista Grassi, scientifique italien, prolongea ces travaux pour découvrir les quatre espèces de parasites responsables de la maladie chez l'homme et décrivit le cycle complet du parasite [22].

### 3.1.2 Epidémiologie du paludisme

Le paludisme sévit actuellement dans la ceinture de pauvreté du monde, mais l'impact de la maladie en termes de santé publique (mortalité, morbidité et impact socio-économique) varie considérablement d'une région à l'autre. La grande majorité des cas graves et mortels de paludisme est due essentiellement à *P. falciparum* et survient chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes [23]. En clinique, on estime à environ 2 épisodes de paludisme en moyenne par enfant (0-5 ans) et par saison de transmission (hivernage) [24]. Cette hétérogénéité du paludisme a très tôt imposé la nécessité d'une classification des zones où sévit la maladie en fonction du climat et de la végétation (Indices de Macdonald 1957) :

- ✓ Les zones de paludisme stable où la forte transmission entraîne une prémunition ;
- ✓ Les zones de paludisme instable où le caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition ;
- ✓ Entre ces deux zones, il existe une strate de situations intermédiaires.

Au Mali il existe 5 faciès épidémiologiques de transmission du paludisme [25].

- la zone de transmission saisonnière longue de 4 à 6 mois (zone soudano-guinéenne) ;
- la zone de transmission saisonnière courte de 3 à 4 mois (zone sahélo-soudanienne) ;
- la zone de transmission sporadique voir épidémique (zone saharienne) correspondant aux régions du nord (Gao, Tombouctou et Kidal), certains districts des régions de Koulikoro (Nara) et de Kayes (Nioro, Yélimané, Diéma et Kayes) ;
- la zone de transmission bi ou plurimodale saisonnière du Delta Intérieur et des barrages (Sélingué, Manantali et Markala) ;

- la zone peu propice à l'impaludation particulièrement le milieu urbain comme Bamako. La transmission se fait essentiellement en saison des pluies. Cette transmission continue même en saison sèche pour les zones irriguées [26].

### 3.1.3 Agents pathogènes

Le parasite responsable du paludisme est un protozoaire intracellulaire appartenant à l'embranchement des sporozoaires, de la classe des *Haemosporidae*, de l'ordre des *Haemosporida* et de la famille des *Plasmodidae*. Les espèces parasites de l'homme sont :

- *Plasmodium falciparum* : L'espèce la plus répandue, la plus redoutable car entraîne le paludisme grave ;
- *Plasmodium malariae* : Distribution clairsemée, entraîne la fièvre quarte ;
- *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* : Ces deux espèces entraînent la fièvre tierce bénigne avec des rechutes tardives ;
- *Plasmodium knowlesi* : Il est proche génétiquement de *Plasmodium vivax*, et microscopiquement de *Plasmodium malariae*. Il a été découvert récemment chez l'Homme en Malaisie (mais était connu antérieurement chez le singe) [27].

#### Cycle biologique du *Plasmodium* :

Le cycle de développement du plasmodium nécessite deux hôtes obligatoires : l'homme et le moustique. Chez l'homme s'effectue la multiplication asexuée ou schizogonie. Chez l'anophèle femelle s'effectue le cycle sexué ou sporogonie [16].

#### Chez l'homme : [25,28].

Il se déroule en deux phases : une phase hépatique (ou exo-érythrocytaire) et une phase sanguine (ou érythrocytaire)

- **La phase hépatique :**

L'anophèle femelle infestée en piquant l'homme lui inocule dans le sang, le parasite sous forme de sporozoïtes. Ceux-ci restent dans la circulation sanguine pendant une demi-heure avant de pénétrer dans les cellules du foie. Une fois dans l'hépatocyte, les sporozoïtes restent quiescents (hypnozoïtes) pour *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax* ou par multiplication nucléaire, ils deviennent des schizontes intra hépatocytaires (corps bleus). Cette phase dure 7 à 21 jours en fonction de l'espèce plasmodiale, elle est cliniquement muette et correspond à la phase d'incubation de la maladie.

- **La phase sanguine :**

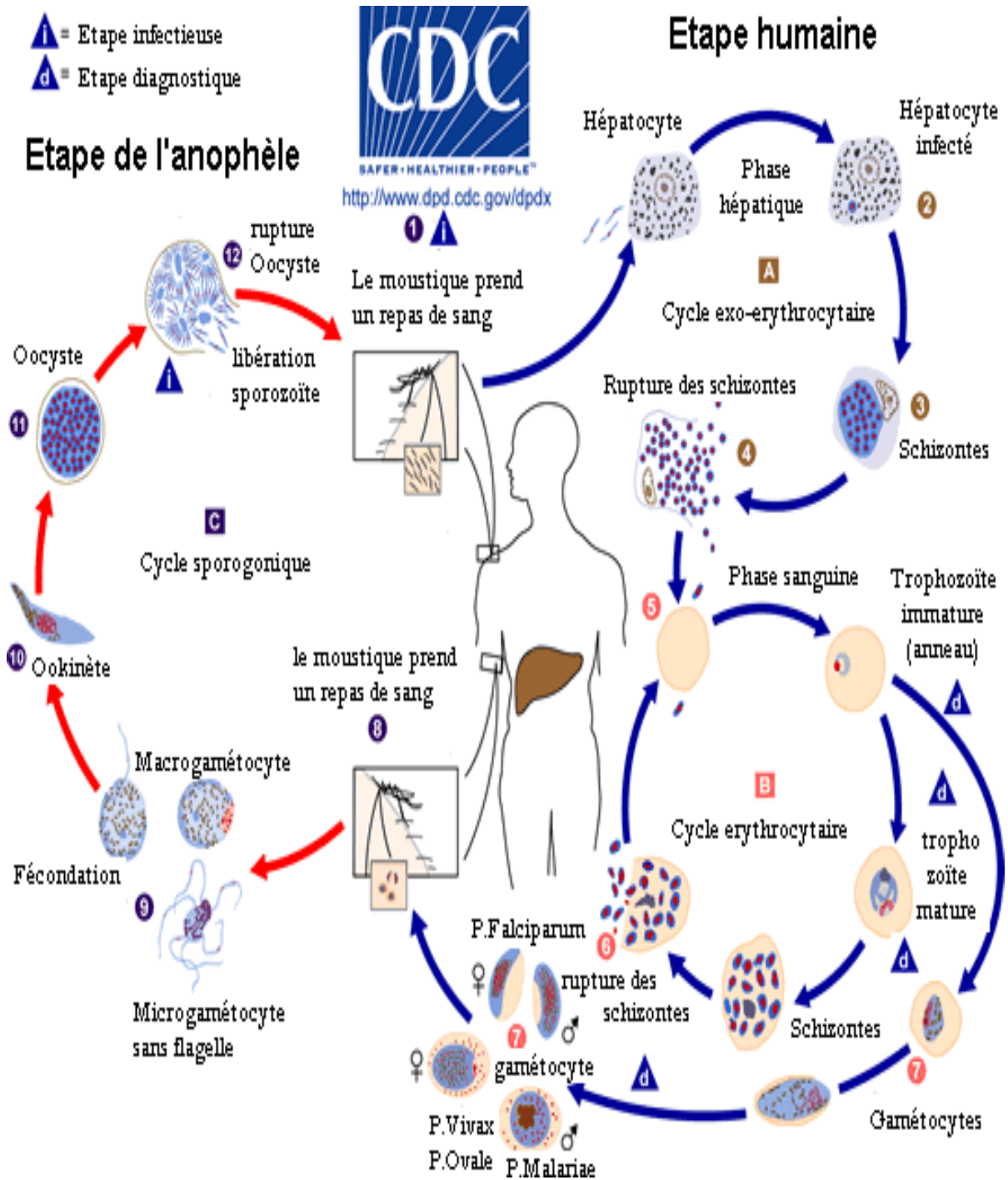
La rupture des corps bleus libère des mérozoïtes qui pénètrent les globules rouges par endocytose, et se transforment en trophozoïte. Le trophozoïte grossit et se transforme en schizonte sanguin qui est appelé corps en rosace à maturité et qui contient de nombreux mérozoïtes dont le nombre varie selon l'espèce plasmodiale. L'éclatement de l'hématie libère les mérozoïtes dans la circulation sanguine. Chaque mérozoïte envahit une nouvelle hématie, poursuivant ainsi le cycle intraérythrocytaire. Au cours de la multiplication dans les hématies, le parasite va produire au dépend de l'hémoglobine un pigment appelé l'hémozoiné. Parallèlement apparaissent dans l'hématie des taches de Maurer (*P.falciparum*), des granulations de Schüffner (*P.vivax* et *P.ovale*) ou des ponctuations de Ziemann (*P.malariae*).

Le cycle sanguin dure 48 heures chez le *P.falciparum*, *P.vivax* et *P.ovale*, 72 heures chez le *P.malariae*. C'est l'éclatement simultané des corps en rosace d'une même génération qui provoque l'accès fébrile typique du paludisme.

Après plusieurs cycles schizogoniques sanguins, certains mérozoïtes se différencient en élément à potentiel sexué : les gamétocytes. Ceux-ci ne poursuivront leur développement que s'ils sont absorbés par un anophèle femelle.

- ✓ **Chez l'anophèle : [25]**

Encore appelé cycle sporogonique, il débute dès l'infection de l'anophèle femelle ayant piqué un impaludé porteur de gamétocytes. Les gamétocytes passent dans son estomac, le gamétocyte femelle (ou macrogamétocyte) se transforme et devient immobile. Le gamétocyte mâle (microgamétocyte) va subir une exflagellation qui l'allongera et le rendra mobile. La fécondation de la macro gamétocyte par le micro gamétocyte aboutit à la formation d'un œuf mobile dans la lumière du tube digestif appelé ookinète. Celui-ci va traverser et aller s'enkyster sur sa face externe formant un oocyste. Une fois mûr l'oocyste éclate et libère des sporozoïtes qui vont gagner les glandes salivaires de l'anophèle d'où ils seront inoculés à l'homme lors d'une nouvelle piqûre. La durée du cycle chez l'anophèle est de 10 à 40 jours selon la température extérieure et les espèces.



**Figure 1:** Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'homme et le moustique

**Source :** <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> [29]

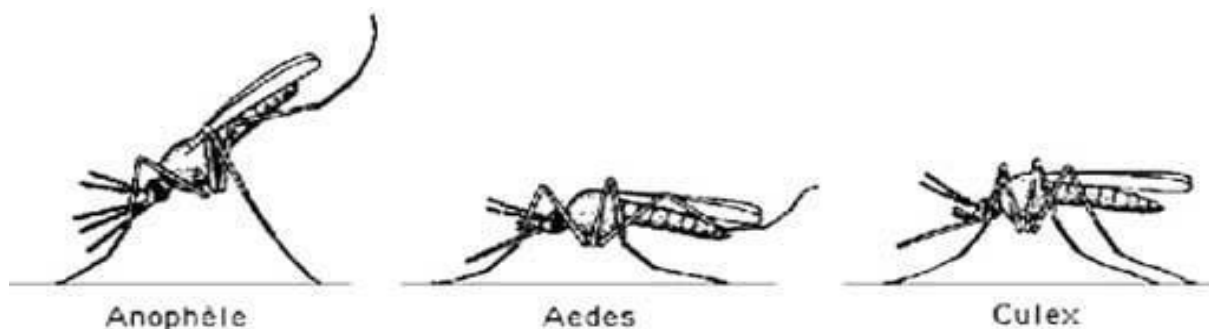
### 3.1.4 Vecteur du paludisme [30]

#### 3.1.4.1 Définition

On appelle vecteur un être vivant capable de transmettre un agent pathogène (bactérie, parasite, virus) d'un vertébré à l'autre tout en étant lui-même infecté. En parasitologie plus spécifiquement, il désigne un hôte intermédiaire qui va transmettre à l'hôte définitif le résultat de la transformation du pathogène présent. Chez l'hôte final, le parasite accomplira la fin de son cycle de vie.

#### 3.1.4.2 Anophèle femelle

Le terme d'Anophèle vient du grec *Opheles* qui signifie utile, et est associé au *a* privatif pour donner insecte dénué d'utilité. Ce genre de moustique est l'unique vecteur du Paludisme, il s'agit d'un Culicidae de l'ordre des Diptera (les diptères forment un des ordres dominant des insectes). On peut différencier les trois principaux genres de moustiques par leur posture au repos



**Figure 2: Position des moustiques au repos.**

Source [30].

Plus de 50 espèces d'anophèles assurent la transmission des plasmodies de manière plus ou moins efficace suivant leur anthropophilie et leur longévité. Chaque espèce a une aire de distribution bien délimitée dans l'ensemble biogéographique mondial [31].

Au Mali, sont présentes : *An. gambiae s.s.*, *An. aranbiensis* et *An. funestus*. L'espèce *An. Gambiae s.s.* est composée de trois formes chromosomiques (Bamako, Mopti, savane) qui contribuent toutes à la transmission du paludisme [32].

### 3.2 Diagnostic du paludisme

Etablir le diagnostic uniquement grâce aux signes cliniques est délicat. Il va falloir s'appuyer sur des tests biologiques pour orienter ou non vers un Paludisme. Il est bien

évidemment recommandé de diagnostiquer sans retard la maladie pour améliorer la prise en charge et sa surveillance.

### 3.2.1 Diagnostic parasitologique [12].

C'est un diagnostic d'urgence, consistant à mettre en évidence le parasite présent dans le sang, permettant de faire le diagnostic de certitude de l'infestation palustre. Toutes ces techniques sont des méthodes de diagnostic direct.

#### 3.2.1.1 Le frottis mince et la goutte épaisse

Elles demeurent la référence, elles nécessitent une méthodologie simple, mais précise et rigoureuse et un long apprentissage. La sensibilité est corrélée au temps d'observation (pour un frottis : lecture d'au moins 100 champs, en pratique 20 minutes).

**Le frottis mince** permet :

- L'étude morphologique des hématozoaires,
- Le diagnostic différentiel entre les espèces plasmodiales (il reste toujours un défi même pour un lecteur averti).

**La goutte épaisse**, examen de référence de l'OMS, est largement utilisée pour le diagnostic de routine. Sa sensibilité (seuil de détection d'hématies parasitées/ $\mu\text{L}$ ) est de 20 hématies parasitées/ $\mu\text{L}$ , 10 fois plus élevée que celle du frottis mince (100 à 200). Le problème du diagnostic d'espèce se pose rarement et l'incertitude est le plus souvent sans conséquence sur la conduite thérapeutique.

#### 3.2.1.2 Quantitative Buffy-Coat:

La coloration fluorescente des acides nucléiques par l'acridine orange : le malaria-test QBC (*quantitative buffy-coat*). Cette technique nécessite un équipement particulier. Sa sensibilité est de 5 hématies parasitées/ $\mu\text{L}$ .

Toutefois, le fait qu'il nécessite un microscope à fluorescence, qu'il manque de spécificité, ne sont pas à son avantage.

### 3.2.2 Diagnostic immunologique : ELISA et IFI

Ces méthodes constituent le diagnostic indirect du paludisme.

Le principe d'IFI consiste à mettre en contact, un antigène figuré de parasite sur goutte épaisse et/ou sur frottis sanguin, et un sérum animal ou humain. Si ce sérum contient des



anticorps spécifiques contre cet antigène le complexe immun persistera après le lavage, et sera fluorescent en lumière ultra-violet grâce au fluorochrome associé aux anticorps. Quant au principe d'ELISA, il consiste à fixer sur un support solide des éléments contenus dans le liquide biologique. Ensuite, les antigènes solubles sont détectés à l'aide d'un complexe immun marqué par l'enzyme, et sera révélé par addition d'un substrat spécifique de l'enzyme. Ces techniques apportent des informations précieuses qui permettent de confirmer le paludisme, lorsque la parasitémie a été réduite par exemple par un traitement anti palustre. Elles permettent également de suivre la guérison par la décroissance du taux des anticorps, et ont aussi un intérêt en zone d'endémie.

Le diagnostic immunologique ne peut remplacer le diagnostic parasitologique direct, du fait que les anticorps apparaissent avec un retard de plusieurs jours sur la parasitémie et disparaissent plus tard. Ne peuvent être utilisés pour un diagnostic de routine, mais surtout plus à des fins de recherches.

### 3.2.3 Les tests de diagnostic rapides : TDR

Les tests diagnostiques rapides du paludisme, parfois appelés " bandelettes réactives " ou " systèmes de diagnostic rapide " détectent les antigènes spécifiques (protéines) présents dans le sang des personnes infectées, et produits par les parasites.

Plusieurs tests de diagnostic rapide (TDR) par immunochromatographie sont disponibles. Ils sont classés en fonction du nombre d'antigènes détectés. La plupart, à l'exception de la série OptiMalt, permettent la mise en évidence de l'HRP2 (*Histidin Rich Protein 2*), spécifique de *P. falciparum* ; certains permettent la mise en évidence de la pLDH (Plasmodium lactate déshydrogénase) : Pf pour *P. falciparum*, Pv pour *P. vivax* ; Pan-LDH commune aux quatre espèces plasmodiales. La sensibilité et la spécificité revendiquées par les constructeurs de ces tests sont comparables.

La forme la plus simple est celle d'une bandelette qui est placée dans des puits contenant du sang et/ou une solution tampon. La bandelette de nitrocellulose peut être placée dans une cassette en plastique ou sur une carte. Les tests rapides antigéniques sont simples d'utilisation, rapides et d'un apport précieux en poste isolé. Cependant, les tests rapides ont des limites :

- ✓ les faux négatifs sont dus à une faible parasitémie de l'ordre de 100 parasites par  $\mu\text{L}$ ,
- ✓ soit 0,002% d'hématies infectées. Or, il est fréquent de mettre en évidence en pathologie d'importation ou chez le voyageur non immun en zone d'endémie sous chimioprophylaxie

non ou mal adaptée des parasitémies très faibles. Le résultat des TDR peut donc être faussement négatif.

- ✓ les faux positifs, moins bien connus, sont dus à une lecture trop tardive après le dépôt des réactifs, à la présence d'auto anticorps ou de facteur rhumatoïde à des taux élevés. De plus, la persistance de la circulation de l'HRP2 après disparition des parasites du sang circulant est trouvée jusqu'à 15 jours après négativité des tests microscopiques.

Ces tests ne doivent pas être employés seuls.

### 3.2.4 La Polymerase Chain Reaction (PCR)

C'est une technique de biologie moléculaire, basée sur la sélection puis l'amplification d'un gène spécifique du parasite à partir d'amorces spécifiques de ce gène. Elle a l'avantage de pouvoir détecter une souche spécifique du parasite par des gènes spécifiques ou après digestion du produit de PCR avec des enzymes de restriction spécifiques. Elle permet la détection des parasitémies très faibles.

Elle est utilisée pour le diagnostic du paludisme et en enquête de masse. Cependant, si son utilisation ne nécessite pas une ponction veineuse, elle n'est réalisable que dans des laboratoires spécialisés et son coût est très élevé.

#### 3.2.4.1 Photo-induced Electron Transfer PCR (PET-PCR) [33,34].

La PET-PCR est une méthode moléculaire de détection du matériel génétique dans un échantillon biologique et utilisée pour la détection des parasites du paludisme. C'est un test de détection très rapide du parasite et qui a une sensibilité supérieure et une spécificité par rapport à la microscopie et aux TDRs [34]. La PCR multiplex PET-PCR, est un test moléculaire qui utilise plusieurs fluorophores en fonction de l'objectif du diagnostic [34]. Les agents fluorophores couramment utilisés sont FAM et HEX [34,35].

Les amorces fluorogéniques à transfert d'électrons photo-induites (PET) auto-désactivantes utilisées dans le test PET-PCR fournissent un test de PCR en temps réel plus pratique et moins coûteux que les PCR en temps réel basés sur des sondes classiques dans la mesure où il n'y a pas de sondes internes (par ex. sondes TaqMan) ou de colorants intercalants [6,35].

Il a été montré comme étant aussi robuste et rentable par rapport à la PCR nichée [35]. Il est capable de détecter des parasites de faibles densités d'infections, même 1 parasite/ $\mu$ L.

Dans les dosages PCR en temps réel, la valeur CT est inversement proportionnelle à la quantité d'ADN dans un échantillon. Donc, les échantillons présentant des densités parasitaires élevées atteignent le seuil plus tôt et ont de faibles valeurs CT, alors que les échantillons avec faibles densités de parasites nécessitent plus de cycles pour atteindre le seuil. Classiquement, une valeur CT de 40 est considérée comme le seuil pour confirmer qu'une réaction est positive, et un échantillon avec une valeur CT supérieure à 40 est considéré comme négatif.

### 3.2.4.2 Génotypage

Plusieurs gènes de *Plasmodium falciparum* présentent un polymorphisme génétique important. Ce phénomène est exploité pour l'empreinte génétique et pour l'évaluation de la dynamique des populations de parasites [36,37].

Le génotypage des souches de *Plasmodium falciparum* passe donc le plus souvent par l'étude des gènes *msp1*, *msp2* et *glurp* [36,38,39]. Le génotypage moléculaire des régions hautement polymorphiques des locus *msp1*, *msp2* et *glurp* de *Plasmodium falciparum* est habituellement effectué pour distinguer les cas de recrudescence (véritables échecs) des nouvelles infections. Cet outil a maintenant été adopté en tant que partie intégrante des études d'efficacité des antipaludiques et des essais cliniques. Cependant, son utilité et sa fiabilité suscitent des inquiétudes car les conclusions tirées du typage moléculaire dépendent du profil génétique des populations de parasites respectives, mais ce profil n'est pas systématiquement documenté dans la plupart des régions endémiques [36,39,40].

#### ✓ La forme "classique" :

C'est l'accès palustre, fièvre intermittente à fréquence variable plus ou moins caractéristique du *plasmodium* infestant. La fièvre survient lors de l'éclatement des hématies et de la libération des mérozoïtes.

#### ✓ Accès pernicieux :

C'est la forme suraiguë du paludisme à *P. falciparum*, susceptible de tuer rapidement le malade en absence de traitement. C'est une urgence médicale. Le début est brutal (crise convulsive, coma) avec fièvres, troubles de la conscience, du comportement, hémoglobinurie.

✓ **Fièvre bilieuse hémoglobinurique :**

Survenant parfois après prise de quinine motivée par un accès fébrile, cette fièvre s'accompagne d'hémoglobinurie et d'ictère. Il y a hémolyse brutale et massive. Cette forme est devenue rare.

✓ **Rechute :**

Elles peuvent se produire plusieurs années ou dizaines d'années après un accès palustre, sauf pour *P. falciparum* dont les hépatozoïtes ne peuvent rester dans le foie.

### 3.3 Stratégie de lutte contre le paludisme

#### 3.3.1 Arsenal médicamenteux

➤ **Les sesquiterpènes**

Cette classe de traitement antipaludéen regroupe l'artémisinine ainsi que ses dérivés, l'artésunate et l'artéméther. Depuis 2007, l'OMS préconise l'arrêt de la production et de la commercialisation des monothérapies par voie orale à base d'artémisinine dans les pays d'endémie palustre au vu de leur contribution à l'émergence des résistances vis-à-vis de cette molécule. De ce fait, nous n'utilisons plus aujourd'hui que ces dérivés en association avec d'autres molécules [41].

Les dérivés de l'artémisinine ont été associés à un faible taux d'élévation des aminotransférases sériques (1-4%) qui sont généralement asymptomatiques, d'intensité légère à modérée et spontanément résolutive, souvent en cas de poursuite du traitement. Dans la plupart des études, le taux d'élévation sérique des ALAT au cours du traitement par l'artémisinine était similaire à celui observé chez les patients recevant des agents de comparaison. Fait important, il y a eu un nombre croissant de cas de lésions hépatiques aiguës idiosyncratiques chez des patients prenant des dérivés de l'artémisinine. Cependant, les cas les plus graves de lésion hépatique sont survenus chez des patients recevant également d'autres antipaludiques, dont certains sont hépatotoxiques (amodiaquine, sulfaméthoxazole, sulfadiazine / pyriméthamine) [41].

✓ **Artéméther [42]**

L'artéméther (AM) est un médicament antipaludéen dérivé de l'artémisinine (Qinghaosu), un extrait de l'herbe *Artemisia annua L.* C'est un agent antipaludéen utilisé pour traiter le paludisme aigu non compliqué. Il est administré en association avec la luméfantine pour une

efficacité améliorée. L'association artéméther et luméfantine est indiquée pour le traitement du paludisme aigu non compliqué causé par *Plasmodium falciparum*, y compris le paludisme acquis dans les zones résistantes à la chloroquine.

Dans le corps, l'artéméther est métabolisé en métabolite actif, la dihydroartémisinine. Le médicament agit contre les stades érythrocytaires de *P. falciparum* en inhibant la synthèse des acides nucléiques et des protéines. L'artéméther a un début d'action rapide et est rapidement éliminé de l'organisme. La luméfantine a une demi-vie beaucoup plus longue et semble éliminer les parasites résiduels. La nourriture augmente l'absorption de l'artéméther.

La dihydroartémisinine est rapidement absorbée après administration orale, atteignant des niveaux maximaux après environ 2,5 heures. L'absorption par la voie rectale est un peu plus lente, avec des niveaux de pic se produisant environ 4 heures après l'administration. La liaison aux protéines plasmatiques est d'environ 55%. La demi-vie d'élimination est d'environ 45 min via la glucuronidation intestinale et hépatique.

#### ✓ **Artesunate [43]**

L'artésunate est un dérivé semi-synthétique hydrosoluble de l'artémisinine avec des activités antipaludique, anti-shistosomiasique, antivirale et potentiellement antinéoplasique.

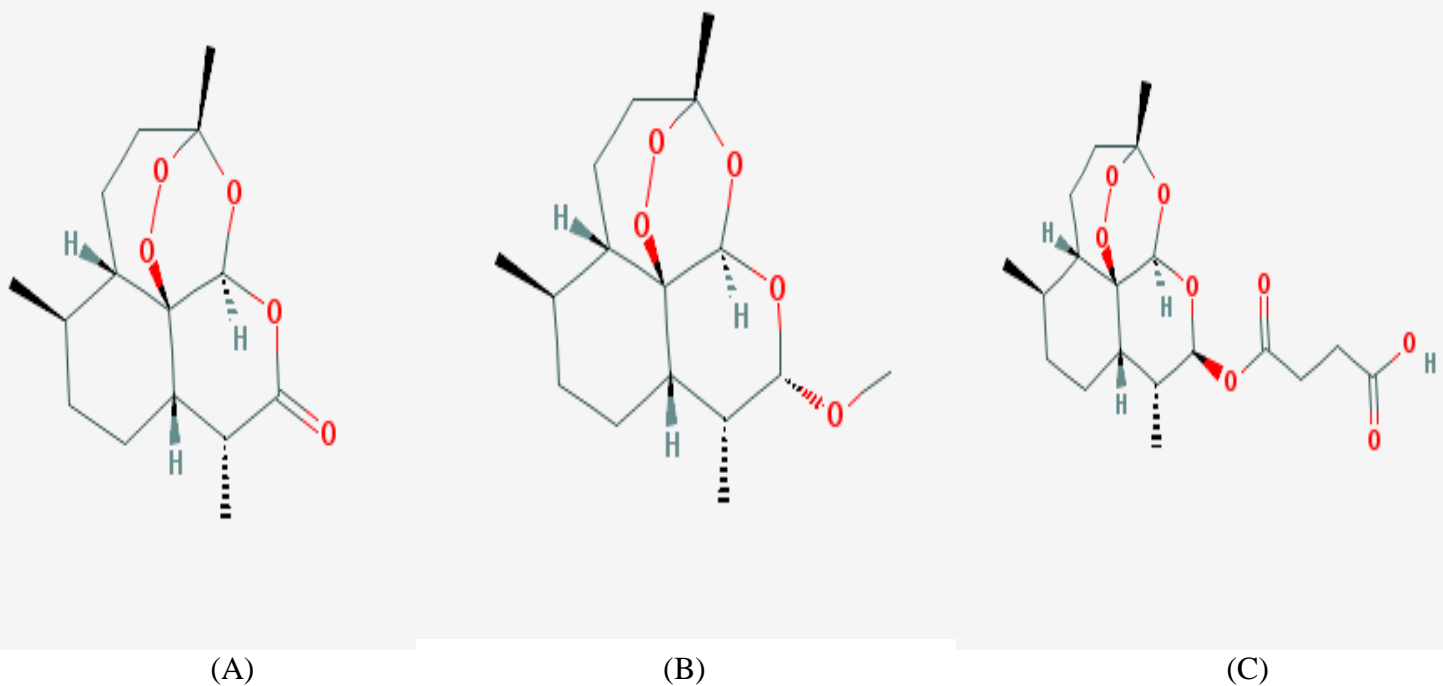
Il est utilisé pour le traitement du paludisme grave causé par *Plasmodium falciparum* chez les adultes et les enfants.

Bien qu'il existe quelques différences mineures dans l'absorption orale et la biodisponibilité entre les différents dérivés de l'artémisinine, il n'y a aucune preuve que ces différences sont cliniquement significatives dans les formulations actuelles. Ce sont les propriétés du médicament partenaire qui déterminent l'efficacité et le choix de la combinaison. Les associations médicamenteuses antipaludiques avec l'artésunate ont toutes été évaluées dans les régions touchées par le paludisme, et parmi ces associations nous pouvons citer artésunate+amodiaquine qui est actuellement disponible sous forme de comprimés sécables séparés.

Lors de l'hydrolyse du fragment actif du pont endoperoxyde de l'artésunate par l'hème libéré dans les globules rouges infectés par le parasite, il se forme des espèces réactives de l'oxygène et des radicaux carbonés qui endommagent et détruisent les organismes parasitaires. De plus, des études in vitro démontrent que cet agent induit une rupture de l'ADN d'une manière dépendante de la dose. L'artésunate a également été montré pour stimuler la différenciation cellulaire, arrêter le cycle cellulaire dans les phases G1 et G2 / M, inhiber la prolifération cellulaire, et induire l'apoptose par les voies de signalisation mitochondriale et caspase.

Après administration à l'homme, l'artésunate est rapidement hydrolysé en son principal métabolite actif, la dihydroartémisinine.

La pharmacocinétique de l'artésunate et de la dihydroartémisinine est caractérisée par une variabilité interindividuelle marquée. Les paramètres pharmacocinétiques de l'artésunate et de la dihydroartémisinine diffèrent significativement entre les volontaires sains et les patients infectés, ainsi que parmi les patients présentant une gravité de la maladie différente.



**Figure 3:** Structure Chimique de l'Artémisinine de l'artéméthère et de l'artésunate

Sources : (A) [41] ; (B) [42] et (C) [43]

#### ➤ Les antimétabolites

Plusieurs substances sont regroupées dans cette catégorie d'antipaludéens et sont divisées en deux sous-catégories :

- ✓ **Les antifoliques : il s'agit de la Dapsone et de la Sulfadoxine (sulfamides).**
- **La Dapsone [44]**

La dapsone est un sulfone active contre un large éventail de bactéries mais principalement employée pour ses actions contre *Mycobacterium leprea*. Il est également utilisé avec la pyriméthamine dans le traitement du paludisme.

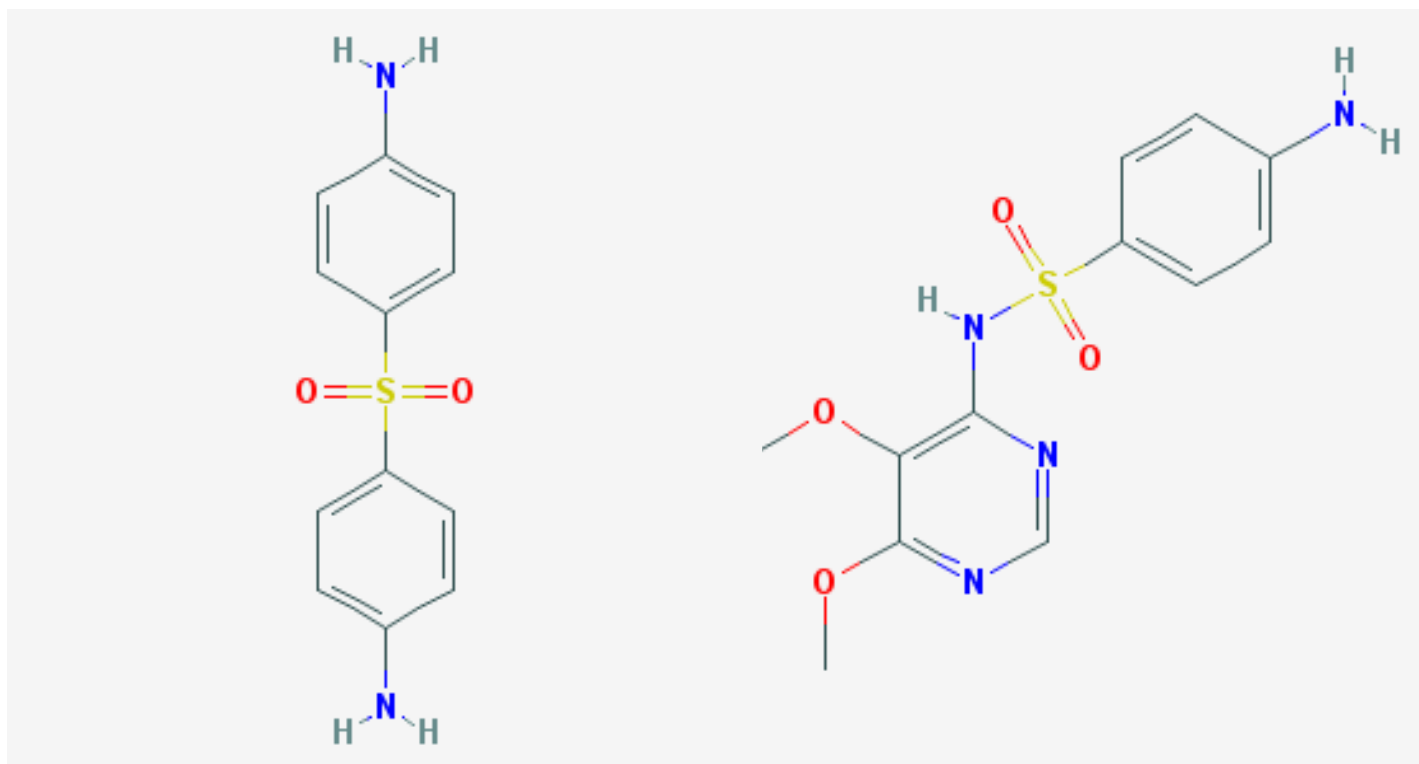
La Dapsone est administré comme un agent oral. Elle est associée au chlorproguanil pour le traitement du paludisme. La dapsonne est également utilisée pour l'infection et la prophylaxie à *Pneumocystis. jiroveci*, et pour la prophylaxie contre *Toxoplasma. gondii*. C'est un sulfone avec des propriétés immunosuppressives, anti-inflammatoires ainsi que des propriétés antibactériennes et antibiotiques. La dapsonne est le médicament principal dans un régime multidrogue recommandé par l'Organisation mondiale de la santé pour le traitement de la lèpre. En tant qu'agent anti-infectieux, il est également utilisé pour le traitement du paludisme et, récemment, pour la pneumonie à *Pneumocystis carinii* chez les patients atteints du SIDA. Son mécanisme d'action est probablement similaire à celui des sulfonamides qui implique l'inhibition de la synthèse de l'acide folique chez les organismes sensibles.

La dapsonne est absorbée rapidement et presque complètement du tractus gastro-intestinal et est distribuée dans l'ensemble de l'eau corporelle et est présente dans tous les tissus. Cependant, il a tendance à être retenu dans la peau et les muscles et en particulier dans le foie et les reins : des traces du médicament sont présentes dans ces organes jusqu'à 3 semaines après l'arrêt du traitement. En tant qu'analogue structurel de l'acide p-aminobenzoïque (PABA), la dapsonne inhibe la dihydroptéroate synthase (DHPS), une enzyme importante dans la synthèse du folate, entraînant une déplétion du pool de folates et une réduction de la quantité de thymidylate disponible pour la synthèse de l'ADN.

#### ○ **La Sulfadoxine [45]**

La sulfadoxine est un sulfamide à action prolongée qui est utilisé, habituellement en association avec d'autres médicaments, pour traiter les infections respiratoires, urinaires et paludéennes. La sulfadoxine est utilisée en association avec la pyriméthamine pour le traitement ou la prévention du paludisme. Elles sont indiquées pour le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* chez les patients chez lesquels une résistance à la chloroquine est suspectée.

La sulfadoxine entre en compétition avec le PABA pour l'enzyme bactérienne dihydroptéroate synthase, empêchant ainsi l'incorporation du PABA dans l'acide dihydrofolique, le précurseur immédiat de l'acide folique. Ceci conduit à une inhibition de la synthèse parasitaire de l'acide folique et à la synthèse de novo des purines et des pyrimidines, aboutissant finalement à l'arrêt de la croissance cellulaire et à la mort cellulaire.

**Dapsone (A)****Sulfadoxine (B)****Figure 4:** Structure Chimique de deux antifoliques

Source : (A) [44] ; (B) [45]

- ✓ **Les antifoliques** : on retrouve dans cette sous-catégorie le Proguanil et le Chlorproguanil (biguanides), la Pyriméthamine (diaminopyridines).
  - **Le Proguanil** [46]

Le proguanil est un composé de biguanide qui se métabolise dans le corps pour former du cycloguanil, un agent anti-malaria.

C'est un dérivé de biguanide qui est actif contre plusieurs espèces de protozoaires et est utilisé en association avec l'atovaquone et la chloroquine pour la prévention et la thérapie du paludisme. Le proguanil est un dérivé de biguanide qui est transformé en un métabolite actif appelé cycloguanil. Il exerce son action antipaludique en inhibant l'enzyme dihydrofolate reductase parasitaire. Variablement métabolisé dans le foie par les isoenzymes du cytochrome P450 en métabolite actif de la triazine, le cycloguanil. Ce métabolisme variable du proguanil peut avoir une importance clinique profonde chez les métaboliseurs lents tels que les populations asiatiques et africaines à risque d'infection palustre. La prophylaxie par le proguanil peut ne pas être efficace chez ces personnes car elles peuvent ne pas atteindre des niveaux thérapeutiques adéquats du composé actif, le cycloguanil, même après plusieurs doses.



- **Chlorproguanil (biguanides) :**

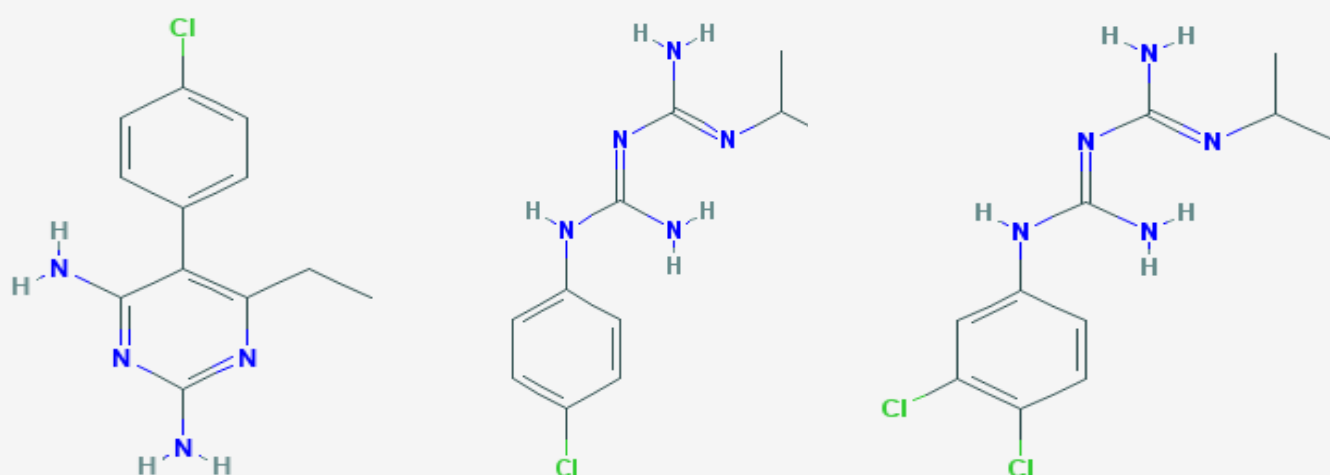
Agents utilisés dans le traitement du paludisme. Ils sont généralement classés sur la base de leur action contre les plasmodes à différents stades de leur cycle de vie chez l'homme [47].

À la fin des années 1990, le chlorproguanil-dapsone (CD) a été développé par un partenariat public-privé en tant que traitement peu coûteux du paludisme à *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) non compliqué en réponse à la résistance croissante à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) en Afrique. Le CD a été retiré du marché en 2008 suite à la démonstration d'une anémie hémolytique post-traitement chez des patients atteints de G6PD dans deux essais de phase III [48].

- **la Pyriméthamine (diaminopyridines) [49]**

La pyriméthamine est un inhibiteur de la dihydrofolate-réductase.

Bien que la pyriméthamine ait été utilisée seule pour la suppression ou la chimioprophylaxie du paludisme chez les voyageurs, le médicament n'est plus recommandé par les centres Américains de contrôle et de prévention des maladies (CDC) ou d'autres experts pour la prévention du paludisme. Le fabricant déclare que le médicament n'est pas systématiquement recommandé pour la prévention du paludisme et ne devrait être envisagé que dans les régions où le paludisme à *P. falciparum* résistant à la chloroquine est endémique et sensible aux médicaments à association fixe et lorsque des alternatives sont indisponibles ou contre-indiquées.



**Pyrimethamine (A)**

**Proguanil (B)**

**Chlorproguanil (C)**

**Figure 5:** Structures chimiques de trois antifoliques

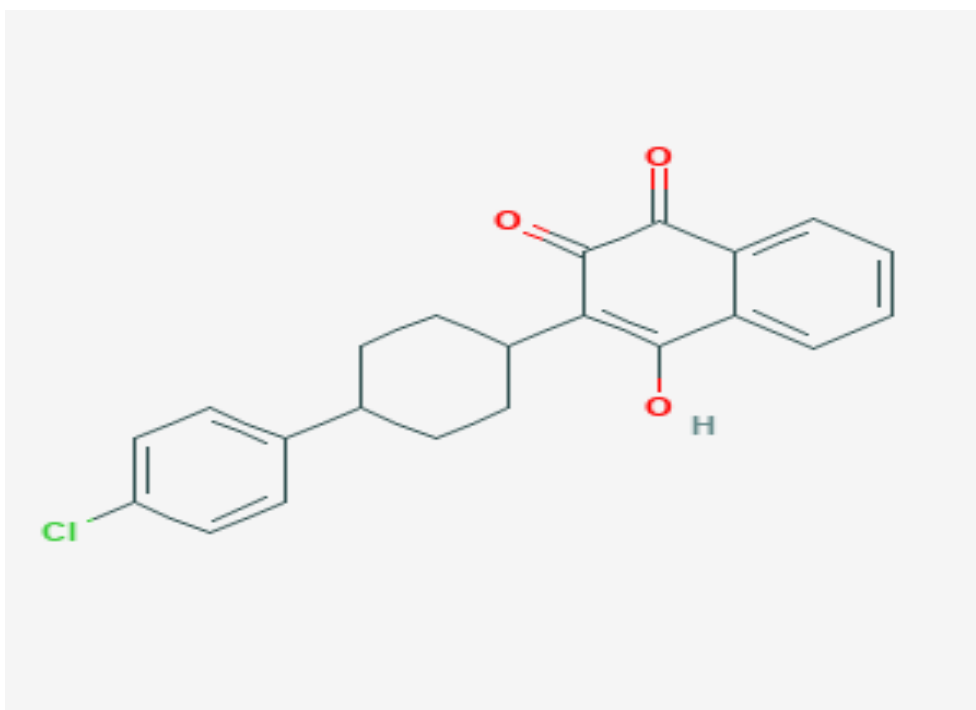
Source : A [49] ; B [46] et C [47]

### ✓ **Analogue de l'ubiquinone [50]**

L'atovaquone est une naphthoquinone utilisée pour la prévention et le traitement de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* (anciennement *carinii*) et, en association avec le proguanil, la prévention et le traitement du paludisme à *P. falciparum*.

Son effet inhibiteur étant comparable à l'ubiquinone, chez les parasites sensibles, l'atovaquone peut agir en affectant sélectivement le transport mitochondrial des électrons et des processus parallèles tels que l'ATP et la biosynthèse de la pyrimidine. Par exemple, le complexe cytochrome bc1 (complexe III) semble servir de cible moléculaire hautement discriminante pour l'atovaquone dans les plasmodies.

Étant donné que l'atovaquone est très fortement liée aux protéines plasmatiques, elle pourrait potentiellement déplacer d'autres médicaments qui sont également très fortement liés aux protéines plasmatiques ; cela pourrait augmenter le risque de toxicité des médicaments qui ont des index thérapeutiques étroits ;



**Figure 6:** Structure chimique de l'Atovaquone

Source : [50]

#### ➤ **Les amino-alcools**

Les amino-alcools regroupent de nombreuses grandes molécules historiques de la lutte contre le Paludisme et sont encore beaucoup utilisées : la Quinine, la Méfloquine, l'Halofantrine et la Luméfantrine.

### ✓ La Quinine [51]

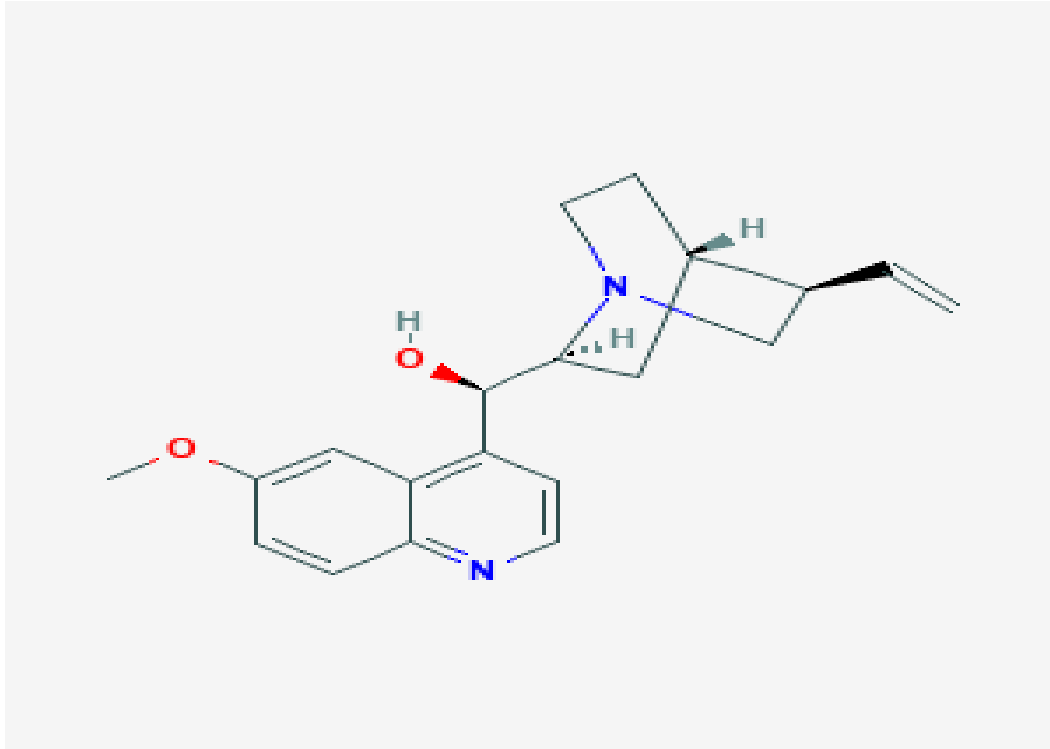
La quinine est un alcaloïde dérivé de l'écorce de l'arbre du quinquina. Elle est utilisée comme un médicament antipaludique, et est l'ingrédient actif dans les extraits de quinquina qui ont été utilisés à cet effet depuis avant 1633. La quinine est également un antipyrétique doux et analgésique et a été utilisé dans les préparations de rhume à cette fin. Il a été utilisé couramment et comme un agent amer et aromatisant, et est toujours utile pour le traitement de la babésiose. La quinine est également utile dans certains troubles musculaires, en particulier les crampes nocturnes des jambes et la myotonie congénitale, en raison de ses effets directs sur la membrane musculaire et les canaux sodiques. Les mécanismes de ses effets antipaludiques ne sont pas bien compris.

La quinine agit comme un schizonticide sanguin bien qu'elle ait également une activité gamétocytocide contre *P. vivax* et *P. malariae*. Parce que c'est une base faible, elle est concentrée dans les vacuoles alimentaires de *P. falciparum*. Il est admis qu'il agit en inhibant l'hème polymérase, permettant ainsi l'accumulation de son substrat cytotoxique, l'hème. En tant que médicament schizonticide, il est moins efficace et plus toxique que la chloroquine. Cependant, il occupe une place particulière dans la prise en charge du paludisme grave à *P. falciparum* dans les régions où la résistance à la chloroquine est connue.

La quinine a de nombreux mécanismes d'action, y compris la réduction de l'apport en oxygène et du métabolisme des glucides ; perturbation de la réplication de l'ADN et de la transcription par intercalation de l'ADN ; et la réduction de l'excitabilité des fibres musculaires via l'altération de la distribution du calcium.

Les alcaloïdes de quinquina, y compris la quinine, peuvent réduire la synthèse hépatique de facteurs de coagulation dépendants de la vitamine K, et l'effet hypoprothrombinémique qui en résulte peut renforcer l'action de la warfarine et d'autres anticoagulants oraux.

Chez les patients recevant ces anticoagulants et un traitement concomitant par la quinine, le temps de prothrombine (PT), le temps de thromboplastine partielle (PTT) ou le rapport international normalisé (INR) doivent être étroitement surveillés comme indiqué.



**Figure 7:** Structure Chimique de la quinine

Source : [51]

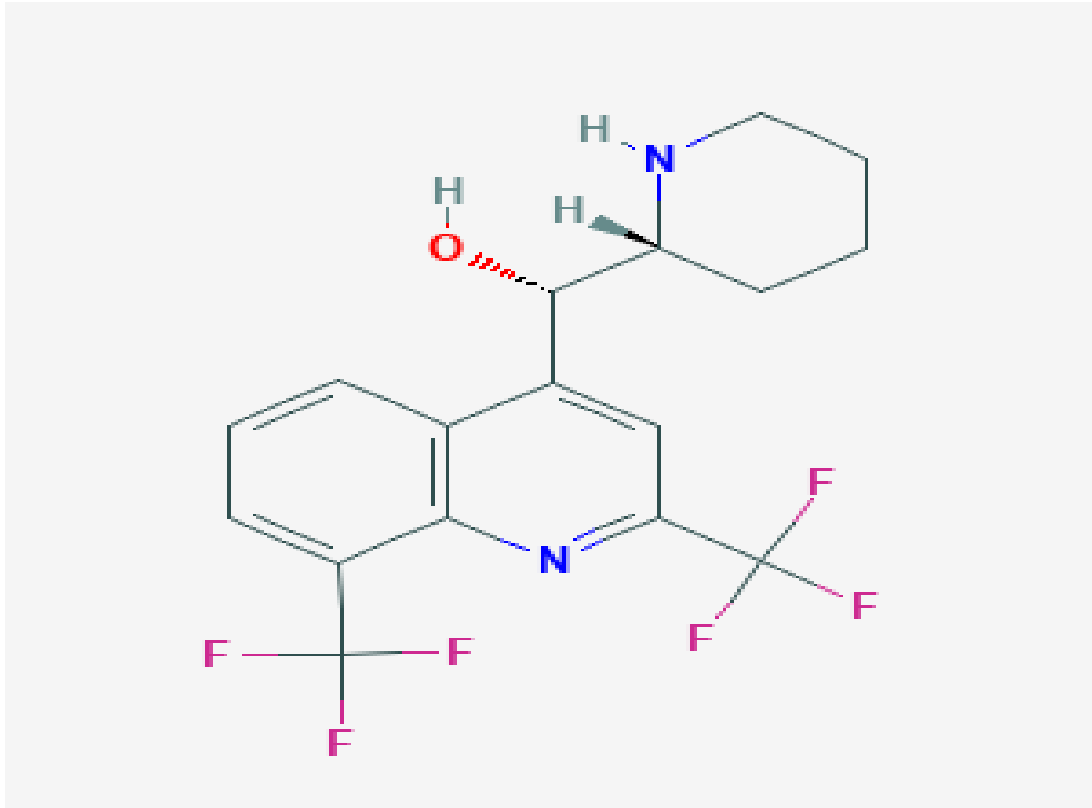
#### ✓ La Méfloquine [52]

La méfloquine est un antipaludéen interagissant avec les phospholipides.

Elle est très efficace contre *Plasmodium falciparum* avec très peu d'effets secondaires.

Bien que le mécanisme exact reste à élucider, la méfloquine, une base faible, s'accumule préférentiellement dans les lysosomes et perturbe la fonction et l'intégrité des lysosomes, conduisant ainsi à la mort des cellules hôtes. Similaire à la chloroquine, les activités chimiosensibilisantes et radiosensibilisantes de cet agent peuvent être liées à son inhibition de l'autophagocytose, un mécanisme cellulaire impliquant une dégradation lysosomale qui minimise la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) liées à la réoxygénation tumorale et l'exposition aux agents chimiothérapeutiques et aux rayonnements.

Comparée à la chloroquine, la méfloquine présente une meilleure pénétration dans la barrière hémato-encéphalique (BHE).



**Figure 8:** Structure chimique de la Méfloquine

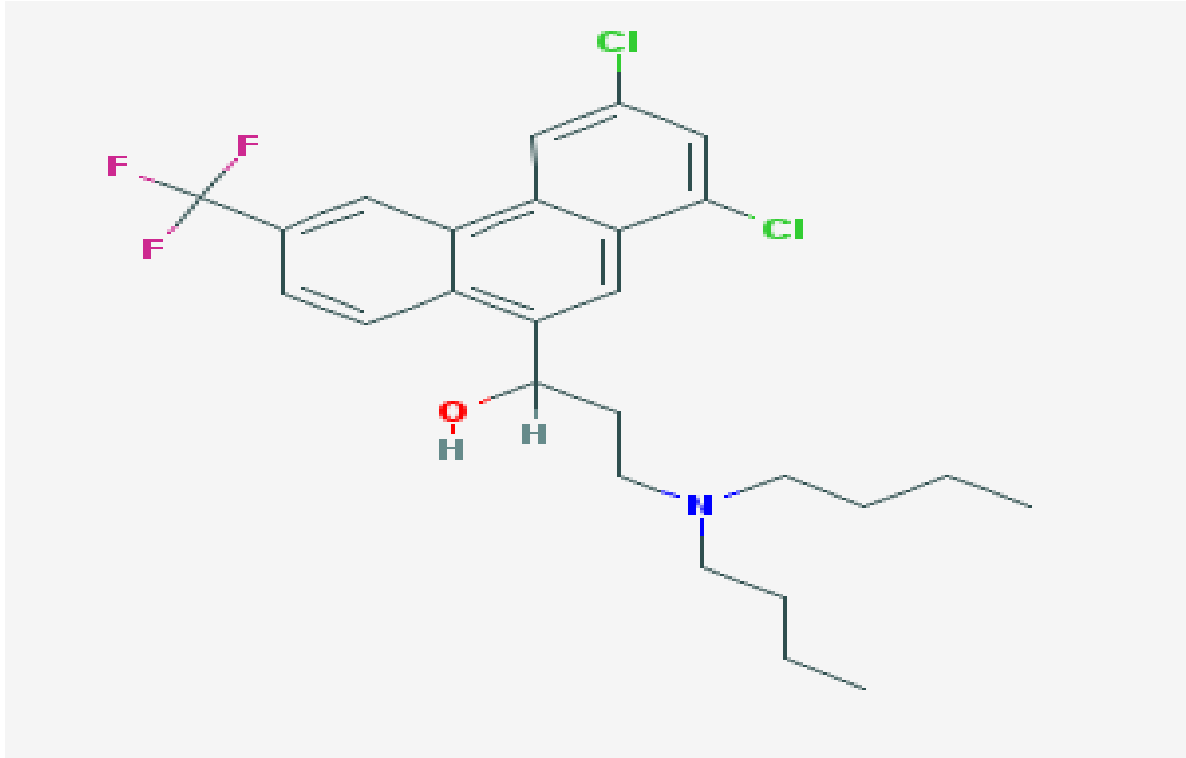
Source : [52]

✓ **L'Halofantrine [53]**

Halofantrine est un médicament utilisé pour traiter le paludisme. Il appartient à la classe des composés phénanthrènes qui comprennent la quinine et la luméfantrine.

Il semble inhiber la polymérisation des molécules de l'hème (par l'enzyme parasite 'hème polymérase'), ce qui entraîne l'empoisonnement du parasite par ses propres déchets. Il a été démontré que l'halofantrine bloquait préférentiellement les canaux HERG ouverts et inactivés, entraînant un certain degré de cardiotoxicité.

Le mécanisme d'action de Halofantrine peut être semblable à celui de la chloroquine, de la quinine et de la méfloquine ; en formant des complexes toxiques avec la ferritoporphyrine IX qui endommagent la membrane du parasite.



**Figure 9:** Structure chimique à noyau phénanthrénique de l'Halofantrine

Source : [53]

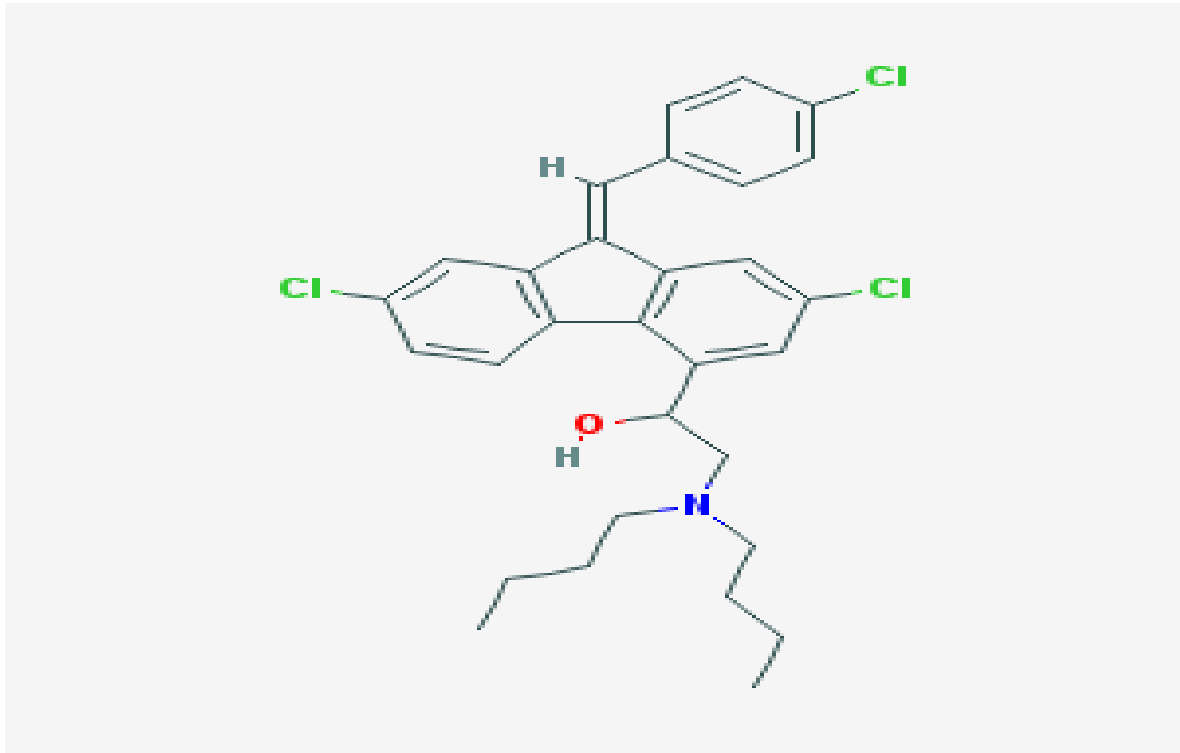
#### ✓ La Luméfantrine [54]

La luméfantrine est un agent antipaludéen utilisé pour traiter le paludisme aigu non compliqué. Il est administré en combinaison avec l'artéméther pour une efficacité améliorée. Cette association thérapeutique exerce ses effets contre les stades érythrocytaires de *Plasmodium spp*, et peut être utilisé pour traiter les infections causées par *P. falciparum* et les espèces non identifiées de *Plasmodium*, y compris les infections acquises dans les zones résistantes à la chloroquine.

La luméfantrine est un schizonticide sanguin actif contre les stades érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*. L'administration de luméfantrine avec de l'artéméther entraîne des effets de compensation antipaludique. L'artéméther a un début d'action rapide et est rapidement éliminé de l'organisme. Ainsi il procure un soulagement symptomatique rapide en

réduisant le nombre de parasites paludéens. La luméfanantrine a une demi-vie beaucoup plus longue et semble éliminer les parasites résiduels.

La combinaison de l'artéméther et de la luméfanantrine (benflumétol) est un nouveau médicament antipaludéen oral très bien toléré, efficace même contre le paludisme à *P. falciparum* multirésistant. Le composant luméfanantrine est absorbé de manière variable dans le paludisme et est éliminé plus lentement (demi-vie de 3 à 6 jours). L'absorption est très dépendante de la coadministration avec la graisse.



**Figure 10:** Structure chimique de la Luméfanantrine

Source : [54]

➤ Les amino-8-quinoléines

✓ **Primaquine** [36]

La primaquine est une aminoquinoléine qui est administrée par voie orale pour produire un remède radical et prévenir la récurrence de paludisme à *P. vivax* et *P. ovale* après traitement par un schizontocide sanguin. Il a également été utilisé pour prévenir la transmission du paludisme à *P. falciparum* par ceux qui retournent dans des zones où il existe un risque de réintroduction du paludisme.

La primaquine est un agent antipaludéen et est la co-drogue essentielle avec la chloroquine dans le traitement de tous les cas de paludisme. Dans le sang, les parasites du paludisme décomposent une partie des globules rouges appelée hémoglobine. Lorsque cela se produit,

l'hémoglobine est divisée en deux parties ; hème et globine. Hème est toxique pour le parasite du paludisme. Pour éviter qu'il ne soit endommagé, le parasite du paludisme produit un produit chimique qui transforme l'hème toxique en un produit non toxique.

La primaquine agit en interférant avec une partie du parasite (mitochondrie) responsable de son approvisionnement en énergie. Sans énergie, le parasite meurt. Cela empêche l'infection de se poursuivre et permet à la personne de se rétablir. La primaquine tue la forme intra-hépatique de *Plasmodium vivax* et de *Plasmodium ovale*, et empêche ainsi le développement des formes érythrocytaires responsables des rechutes (elle tue aussi les gamétocytes).

### ✓ **Tafénoquine**

Agents utilisés dans le traitement du paludisme. Ils sont généralement classés sur la base de leur action contre les plasmodies à différents stades de leur cycle de vie chez l'homme [55].

La tafénoquine (TQ) est une 8-aminoquinoléine (8AQ) qui a été testée dans plusieurs études cliniques de phase II et de phase III et est actuellement en phase avancée de développement en tant qu'agent prophylactique antipaludéen.

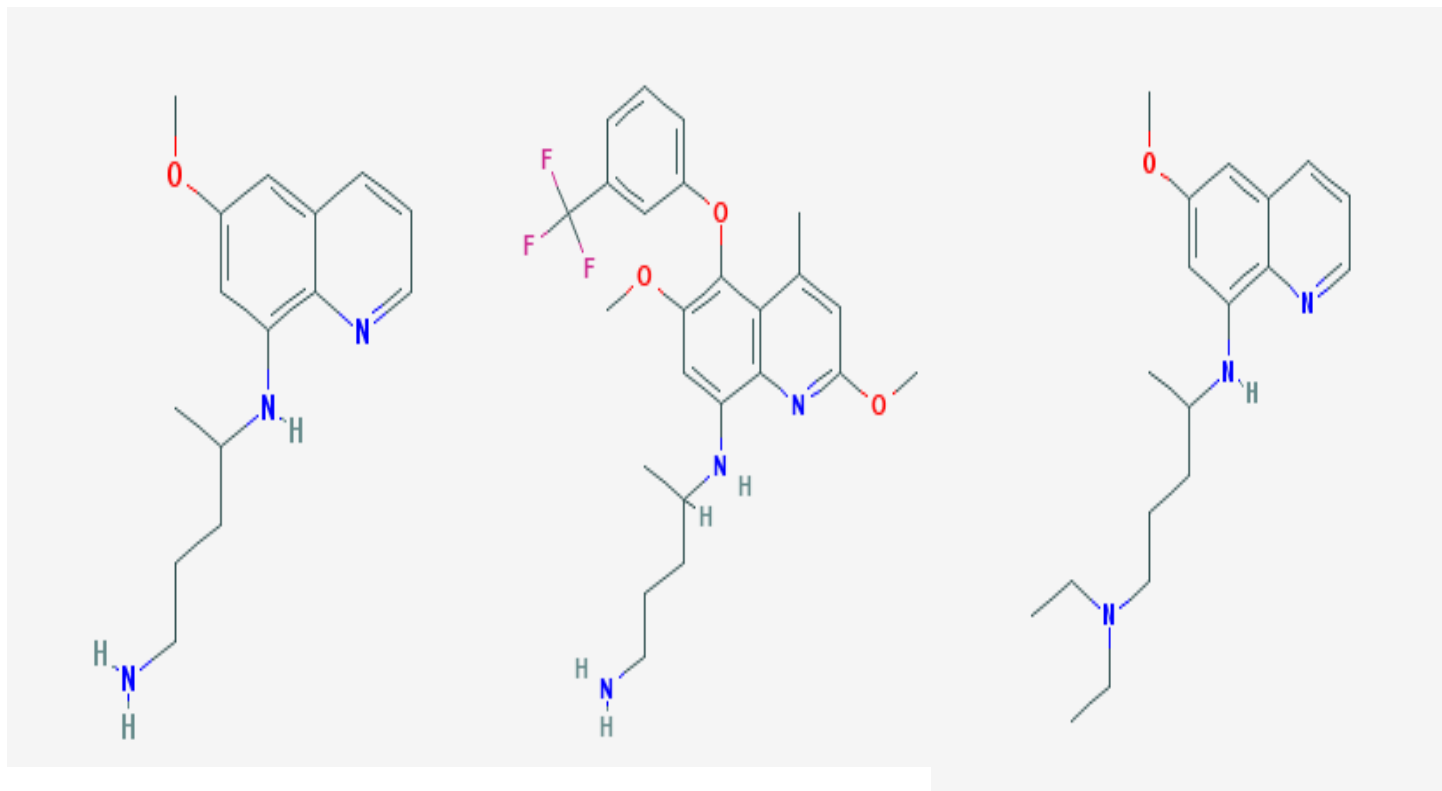
La classe des composés antipaludiques 8-aminoquinoléine (8AQ) est extrêmement importante dans la lutte contre le paludisme, car cette classe de molécules est unique en raison de son efficacité contre les formes récidivantes du paludisme. Cette activité est le résultat de l'activité anti-hypnozoïte de la classe 8AQ. Cet attribut ainsi que l'activité gamétocytocide de la primaquine (PQ) et d'autres 8AQ rendent la classe attrayante pour l'administration de masse dans les efforts d'éradication du paludisme [56].

#### – **Pamaquine [57]**

La Pamaquine, ou Plasmoquine, est l'un des premiers antipaludéens de synthèse (il date de 1926). Les recherches basées sur cette substance ont permis de trouver son analogue structurel (la Primaquine).



Toute comme celle-ci, la Pamaquine peut engendrer une anémie hémolytique en cas de déficience en G6PD, mais elle est cependant globalement moins efficace et plus toxique que son analogue, c'est pour ces raisons qu'elle n'est aujourd'hui plus utilisée.



Primaquine (A)

Tafénoquine (B)

Pamaquine (C)

**Figure 11:** Structure moléculaire de la Primaquine, de la Tafénoquine et de la Pamaquine

Sources : (A) [58]; (B) [55]; (C) [59]

➤ **Les amino-4-quinoléines**

✓ **Chloroquine [60]**

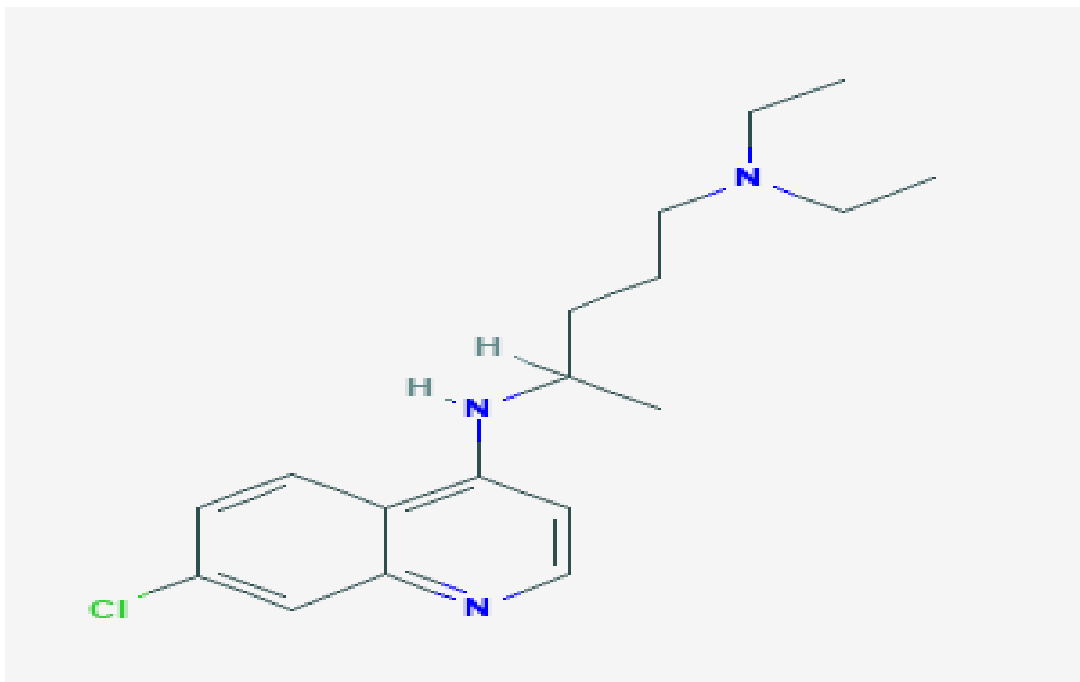
La chloroquine est l'agent antipaludéen prototypique avec un mécanisme qui n'est pas bien compris. Il a également été utilisé pour traiter la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé et la thérapie systémique des abcès hépatiques amibiens.

La chloroquine est le prototype du médicament antipaludéen, le plus largement utilisé pour traiter tous les types de paludisme, à l'exception de la maladie causée par *Plasmodium falciparum* résistant à la chloroquine. Il est très efficace contre les formes érythrocytaires de *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium malariae*, les souches sensibles de *Plasmodium falciparum* et les gamétocytes de *Plasmodium vivax*.

Étant alcalin, le médicament atteint une concentration élevée dans les vacuoles alimentaires du parasite et augmente son pH. Il se révèle induire une agglutination rapide du pigment.

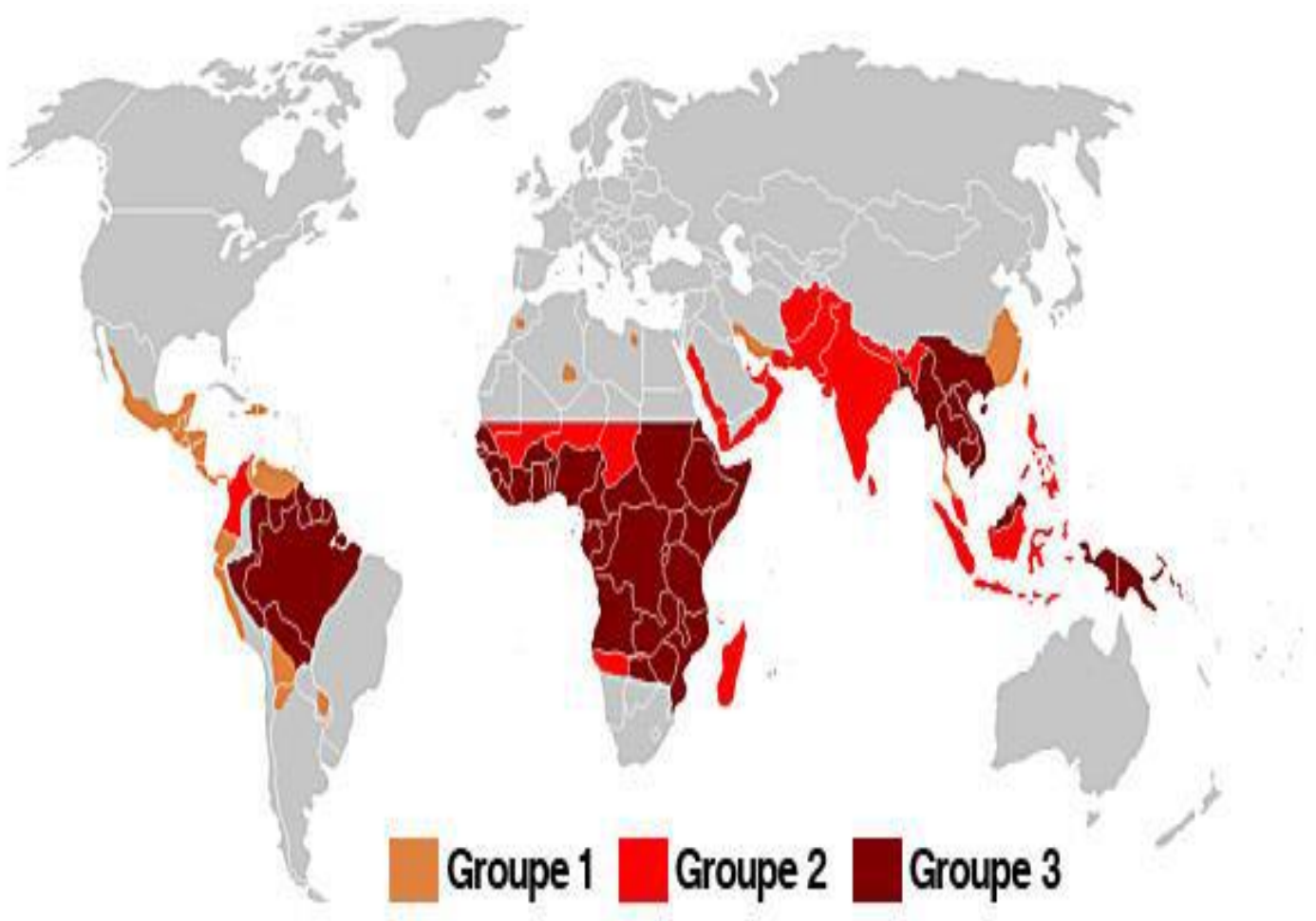
La chloroquine est Complètement absorbée par le tractus gastro-intestinal, son excrétion est assez lente, mais elle est augmentée par l'acidification de l'urine.

Les résultats d'une étude croisée chez des adultes en bonne santé indiquent que la biodisponibilité de la chloroquine est plus élevée lorsque le médicament est administré avec des aliments que lorsque le médicament est administré à jeun.



**Figure 12:** Structure chimique de la Chloroquine

Source : [60]



**Figure 13:** Répartition des pays en fonction de leur degré de sensibilité aux traitements antipaludéens pour *P.falciparum* [61].

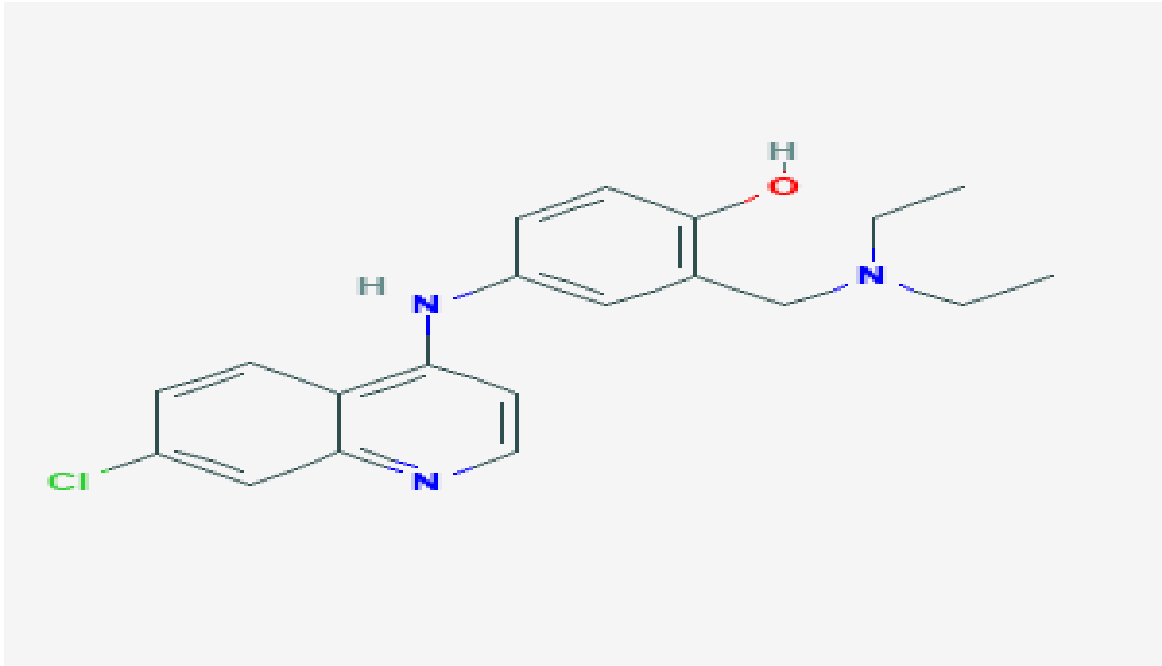
De ce fait, les pays touchés par le Paludisme sont regroupés en trois groupes vis-à-vis de la Chloroquine visible sur le Schéma 12 : pays du groupe I (aucune résistance), pays du groupe II (zone de Chloroquino-résistance), pays du groupe III (prévalence élevée et multi résistance).

#### ✓ **Amodiaquine** [62]

L'amodiaquine est un dérivé de 4-aminoquinoline actif par voie orale, doté de propriétés antipaludéennes et anti-inflammatoires. D'une structure et d'une activité similaires à la chloroquine, l'amodiaquine est efficace contre certaines souches résistantes à la chloroquine, en particulier *Plasmodium falciparum*, le parasite le plus meurtrier du paludisme.

Bien que le mécanisme de l'action plasmodicide n'ait pas été complètement élucidé, comme les autres dérivés de la quinoléine, l'amodiaquine est probablement capable d'inhiber l'activité

de l'hème polymérase dans le corps. Il en résulte une accumulation d'hème libre, toxique pour les parasites.



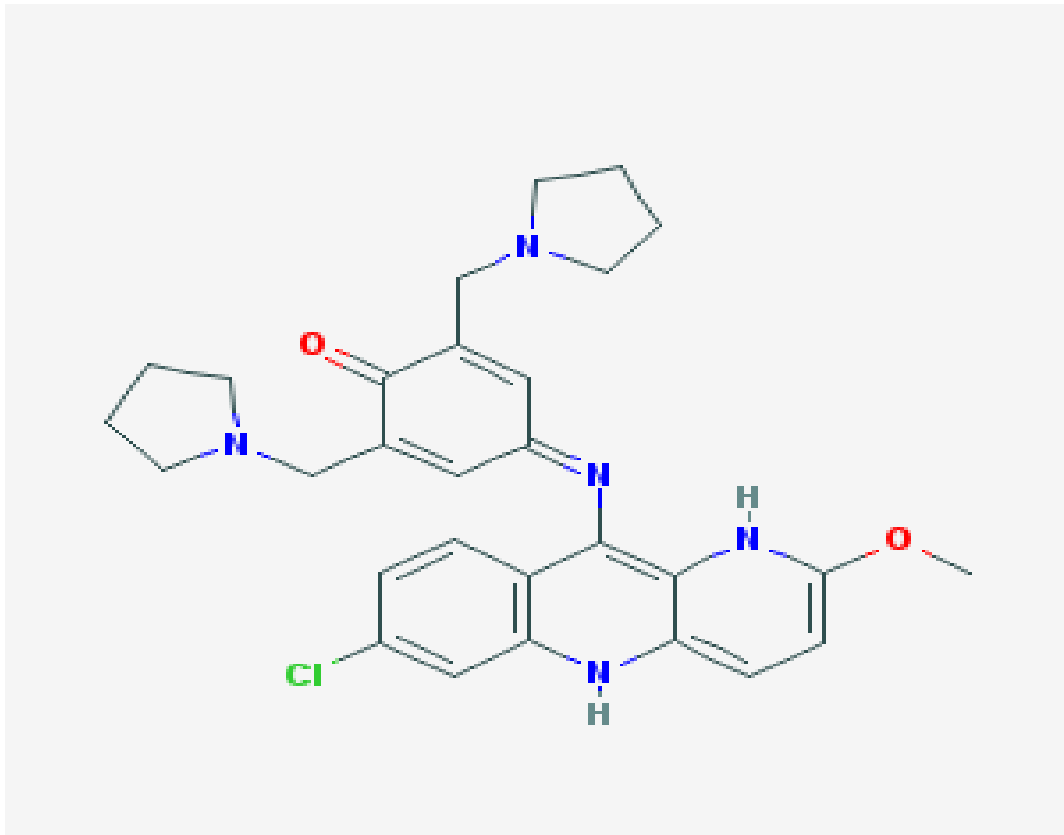
**Figure 14:** Structure chimique de l'Amodiaquine

Source : [62]

✓ **La Pyronaridine [63]**

La pyronaridine appartient à la famille des naphthyridines. Ce sont des composés contenant une molécule de naphthyridine, un naphthalène dans lequel un atome de carbone a été remplacé par un atome d'azote dans chacun des deux cycles. Le squelette naphthyridine peut également être décrit comme un assemblage de deux cycles pyridine condensés, qui ne partagent pas leur atome d'azote.

Agents utilisés dans le traitement du paludisme. Ils sont généralement classés sur la base de leur action contre les plasmodes à différents stades de leur cycle de vie chez l'homme.



**Figure 15:** Structure chimique de la Pyronaridine

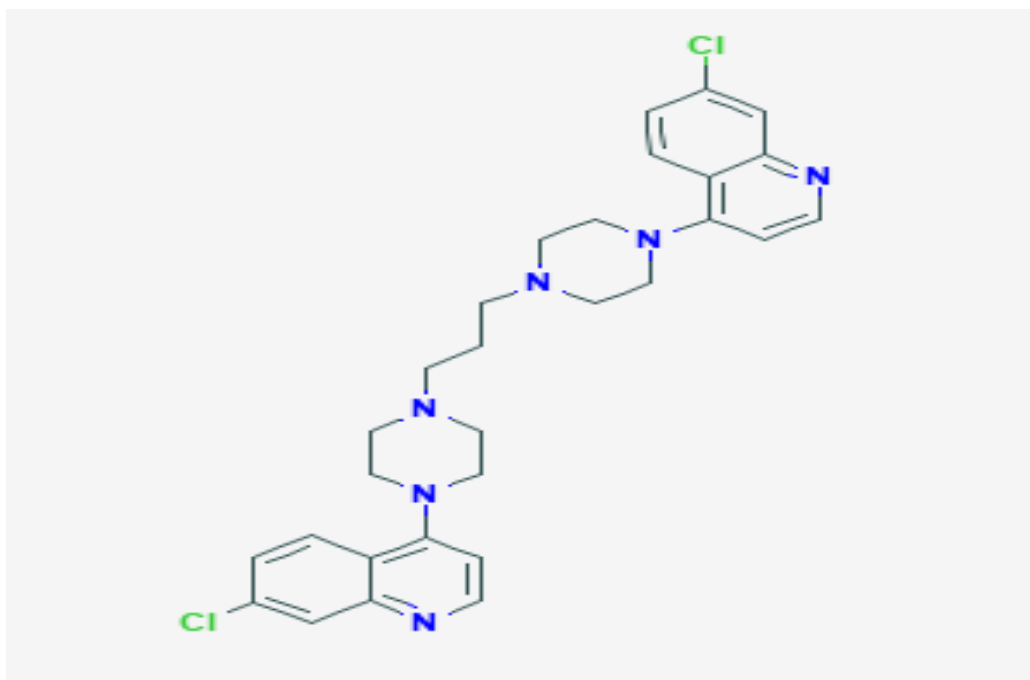
Source : [63]

✓ **Pipéraquine [64]**

La pipéraquine est un agent antipaludéen synthétisé dans les années 1960 et utilisé dans toute la Chine. Son utilisation a diminué dans les années 1980, lorsque des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la pipéraquine sont apparues et que des dérivés de l'artémisinine sont devenus disponibles. Il a été réutilisé en combinaison avec le dérivé de l'artémisinine dans le cadre du produit de combinaison Eurartesim.

La pipéraquine est lentement absorbée et présente de multiples pics dans sa courbe de concentration plasmatique suggérant un recyclage entérohépatique se produisant parallèlement au processus d'absorption.

On a observé que la pipéraquine s'accumulait plus chez les femelles à un degré de 30 à 50% plus élevé que chez les mâles. Il excrété dans les fèces avec une quantité négligeable dans l'urine.



**Figure 16:** Structure chimique de la Pipéraquine [64]

### ➤ Les antibiotiques

Ces antibiotiques sont actuellement utilisés pour traiter ou prévenir du Paludisme : l'Azithromycine (macrolide), la Clindamycine (lincosamide), et la Doxycycline (cycline)

#### ✓ Azithromycine [65]

L'azithromycine est un antibiotique macrolide semi-synthétique structurellement apparenté à l'érythromycine. Il a été utilisé dans le traitement des infections à *Mycobacterium avium* intracellulaire, la toxoplasmose et la cryptosporidiose.

Bien que d'autres études soient nécessaires, l'azithromycine a été utilisée conjointement avec un agent antipaludéen (par exemple la chloroquine, la quinine et l'artésunate) pour le traitement du paludisme non compliqué causé par *Plasmodium falciparum*, y compris les souches multirésistantes. L'azithromycine ne doit pas être utilisée seule en monothérapie pour le traitement du paludisme.

De structure similaire à l'érythromycine. L'azithromycine atteint des concentrations intracellulaires plus élevées que l'érythromycine, ce qui augmente son efficacité et sa durée d'action

### – Clindamycine [66]

La clindamycine est un antibiotique semi-synthétique à large spectre produit par modification chimique du composé parent, la lincomycine.

Elle est utilisée par voie orale, topique et parentérale pour les infections bactériennes dues à des organismes sensibles.

La clindamycine orale est utilisée conjointement avec le sulfate de quinine oral pour le traitement du paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum* résistant à la chloroquine ou lorsque l'espèce plasmodiale n'a pas été identifiée. La clindamycine n'est pas efficace lorsqu'elle est utilisée seule pour le traitement du paludisme.

La clindamycine dissocie le peptidyl-ARNt du ribosome bactérien, perturbant ainsi la synthèse des protéines bactériennes.

Les composés qui inhibent la synthèse des protéines sont généralement des agents antibactériens ou des toxines. Le mécanisme de l'action d'inhibition comprend l'interruption de l'allongement de la chaîne peptidique, le blocage du site des ribosomes, la mauvaise lecture du code génétique ou la prévention de la fixation des chaînes latérales oligosaccharidiques aux glycoprotéines

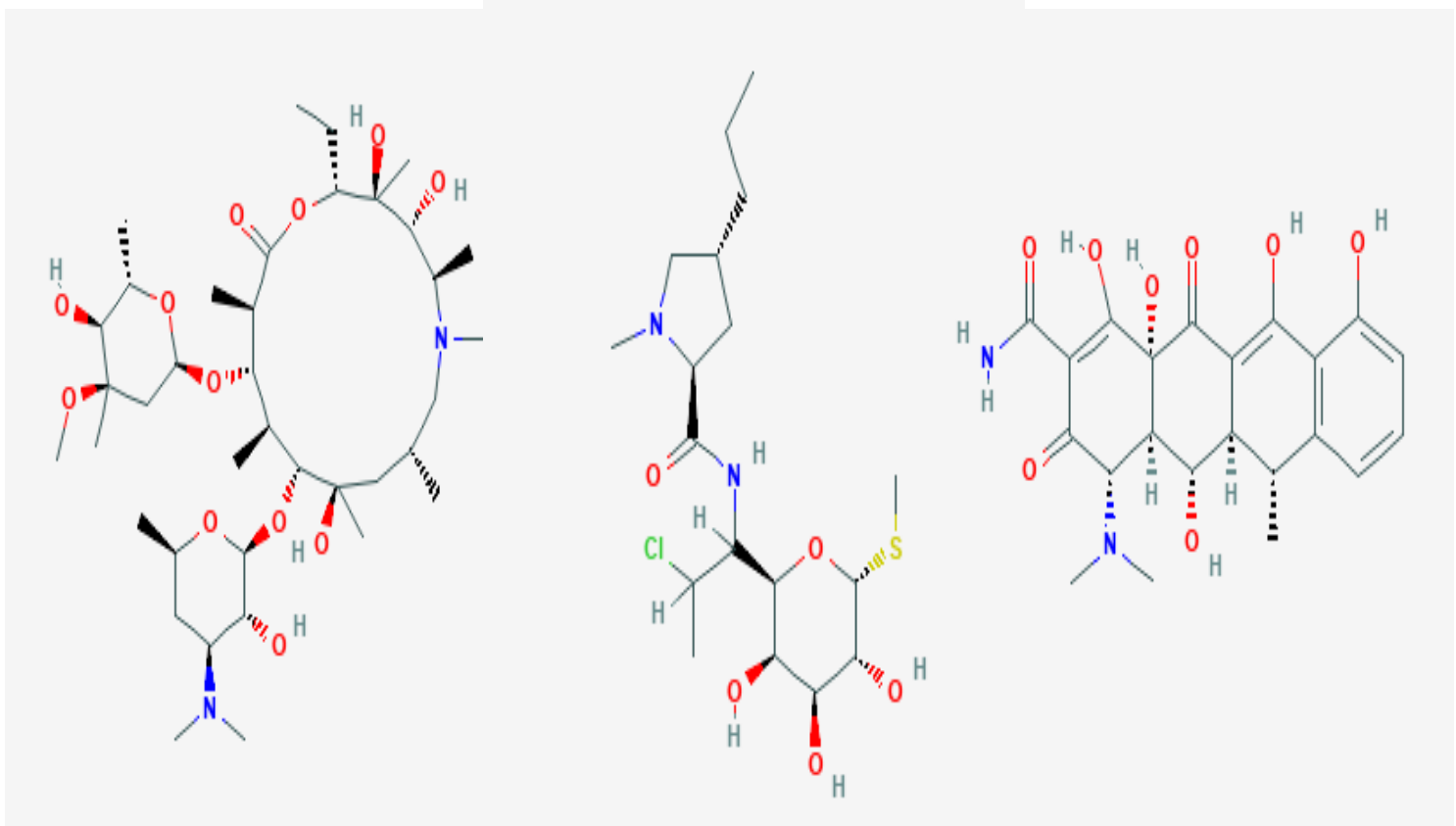
### – Doxycycline [67]

La doxycycline anhydre est un médicament de la classe des tétracyclines. La classification chimique de la doxycycline anhydre est la tétracycline.

La doxycycline est indiquée dans les infections des voies respiratoires causées par *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella spp.*, *ou Klebsiella spp.* Il est également utilisé pour la prophylaxie du paludisme. La doxycycline est indiquée pour diverses infections bactériennes, de *Mycobacterium fortuitum* et *M. marinum*, à *E. coli sensible* et *Brucella spp.* Il peut être utilisé comme alternative au traitement de la peste, du tétanos, du *Campylobacter fœtus*.

La doxycycline se lie à la sous-unité ribosomale 30S, éventuellement à la sous-unité ribosomique 50S, bloquant ainsi la liaison de l'aminoacyl-ARNt au complexe ARNm-ribosome. Cela conduit à une inhibition de la synthèse des protéines.

De plus, cet agent a présenté une inhibition de l'activité de la collagénase.



**Azithromycine (A)**

**Clindamycine (B)**

**Doxycycline (C)**

**Figure 17:** Structure moléculaires des différents antibiotiques utilisés contre la malaria

Sources : (A) [65]; (B) [66]; (C) [67]

### 3.3.2 Lutte antivectorielle [6]

La lutte antivectorielle est essentiellement basée sur :

- ✓ L'aménagement de l'environnement destiné à diminuer le nombre de gîtes anophéliens,
- ✓ La technique de l'insecte stérile : elle permet l'éradication ou la diminution d'une population d'insectes, les mâles irradiés par un rayonnement gamma (bombe au Cobalt 60) deviennent sexuellement stériles à cause de mutations dominantes au niveau du sperme.
- ✓ Les aspersion intra-domiciliaires d'insecticides à effet rémanent,
- ✓ Les moustiquaires imprégnées d'insecticides : outil majeur de prévention du paludisme au niveau communautaire, stratégie de lutte recommandée par l'OMS. Mais la résistance des vecteurs est préoccupante, et il est nécessaire de ré-imprégner régulièrement les moustiquaires pour maintenir leur efficacité. Actuellement, il y a un développement de



moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée d'action (MILDA) [OLYSET®, PERMANET®] avec une efficacité de 5 ans.

- ✓ Les ports de vêtements imprégnés d'insecticides (utilisés par les armées)
- ✓ Les répulsifs (insecticides ou repellents). Beaucoup de répulsifs sont disponibles sur le marché. Deux produits sont recommandables en pratique : le DEET et le KBR 3023.

### 3.3.3 Chimio prophylaxie

#### 3.3.3.1 Chimio prophylaxie des expatriés et des voyageurs

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

- ✓ Schéma prophylactique pour l'adulte suivant les groupes 1, 2 ou 3 :
  - Pays du groupe 1 : chloroquine (Nivaquine®) 100 mg/j, séjour + 4 semaines après,
  - Pays du groupe 2 : association chloroquine (100 mg/j) + proguanil (200 mg/j) (Savarine®) 1 comprimé par jour, séjour + 4 semaines après ; ou association atovaquone + proguanil (Malarone®) : dose chez les sujets de plus de 40 kg : 1 comprimé adulte (250mg/100 mg) par jour, séjour + une semaine après.
  - Pays du groupe 3 : trois choix sont possibles :
    - choix n°1 : Lariam®, comprimés à 250 mg, 1 comprimé par semaine, 10 jours avant + séjour + 3 semaines après,
    - choix n°2 : Malarone® : même dose que pour les pays du groupe 2, séjour + une semaine après,
    - choix n°3 : doxycycline (Doxypalu®, Granulodoxyl®Gé), comprimés à 100 et 50 mg: 100 mg chez l'adulte et chez l'enfant de plus de 8 ans ou pesant plus de 40 kg, 50 mg chez l'enfant de plus de 8 ans pesant moins de 40 kg, séjour+ 4 semaines après.
- ✓ Schéma prophylactique chez la femme enceinte suivant les groupes 1, 2 ou 3 :
  - pays du groupe 1 : Nivaquine®
  - pays du groupe 2 : Savarine® ou Malarone®,
  - pays du groupe 3 : séjour déconseillé, si séjour indispensable : Lariam® ou Malarone®
- ✓ Schéma prophylactique Nivaquine chez l'enfant
  - pays du groupe 1 : Nivaquine®
  - pays du groupe 2 : association chloroquine (Nivaquine®) 1,5 mg/kg/j + proguanil (Paludrine®) 3 mg/kg/j (la Savarine® n'étant prescrite qu'à partir de 15 ans) ou

Malarone®, comprimé enfant (62,5 mg/25 mg) suivant poids : 1 cp/j de 11 à 20 kg, 2 cp/j de 21 à 30 kg, 3 cp/j de 31 à 40 kg à heure fixe et en prise unique.

- pays du groupe 3 : si poids > 15 kg ou âge > 3 ans : Lariam®; alternative : doxycycline si > 8 ans ou Malarone® si poids entre 11 kg et 40 kg : de 11 à 20 kg 1cp/j, de 21 à 30 kg : 2cp.j, de 31 à 40 kg : 3 cp/j. Si enfant < 11 kg, ½ cp/j de 5 < 7 kg (hors AMM), ¾ cp/j de 7 < 11kg (hors AMM).

La chimioprophylaxie doit être poursuivie pendant 4 semaines après le retour, sauf pour le Lariam® pendant 3 semaines et pour la Malarone® pendant une semaine seulement, ce court délai s'expliquant par l'activité schizonticide de la Malarone® dans les formes tissulaires de *P. falciparum* en développement transitoire dans le foie.

### 3.3.3.2 Traitement Préventif Intermittent (TPI) des femmes enceintes et des enfants des pays en développement

Le traitement préventif intermittent (TPIp) consiste dans l'administration intermittente et systématique d'antipaludiques : amodiaquine ou sulfadoxine-pyriméthamine (SP) chez les femmes enceintes à titre prophylactique. La chimioprophylaxie est recommandée par l'OMS pendant la grossesse, associée aux moustiquaires imprégnées, dans les zones de haute transmission d'endémie palustre. La SP est utilisé préférentiellement lors des visites prénatales (femmes enceintes ayant plus de 16 semaines d'aménorrhée). Il faut prescrire deux doses de TPIp séparées d'au moins un mois, 3ème dose si la femme enceinte est séropositive, trois comprimés de SP en prise unique.

Le traitement préventif intermittent chez les enfants (TPIe) réduit la prévalence de l'infection palustre. La chimiothérapie du paludisme saisonnier (CPS) est recommandée chez les nourrissons de 3-11 mois et les enfants de 12-69 mois. Elle associe amodiaquine et sulfadoxine-pyriméthamine. Chez les nourrissons : un demi-comprimé de 153 mg d'AQ une fois par jour pendant 3 jours et une dose unique d'un demi-comprimé de 500/25 mg de SP. Chez l'enfant, un comprimé entier de 153 mg d'AQ une fois par jour pendant 3 jours et une dose unique d'un comprimé entier de 500/25 mg de SP. La CPS est prescrite pendant la période durant laquelle le risque de contracter le paludisme est le plus élevé pour les enfants : par exemple au Mali en août, septembre et octobre, donc en trois occasions à un mois d'intervalle. La CPS doit être couplée à l'utilisation des moustiquaires imprégnées, ce qui permet de réduire de façon substantielle le paludisme maladie, le paludisme infection et l'anémie. La mise en œuvre du traitement préventif intermittent du paludisme chez les

enfants de moins de 5 ans (TPIe) est très lente : sur les 16 pays auxquels l'OMS a recommandé d'adopter le TPIe, 6 seulement l'ont fait.

### 3.3.3.3 Effets indésirables des médicaments antimalariques en chimioprophylaxie

Tous les médicaments antimalariques utilisés en chimioprophylaxie : chloroquine, méfloquine, doxycycline, chloroquine + proguanil, atovaquone + proguanil ont des effets indésirables, neuropsychiques, digestifs, cutanés, en règle non graves. La méfloquine a la plus haute proportion de manifestations neuropsychiques surtout chez les femmes (céphalées, vertiges, troubles psychiques : tendance dépressive, confusion, obnubilation, anxiété, hallucinations). L'association chloroquine + proguanil a la plus haute proportion de troubles cutanés (prurit, éruptions). Tous entraînent des troubles digestifs. La photosensibilité à la doxycycline est dose dépendante, non significative à 50 mg, peu significative à 100 mg, fréquente à 200 mg. Une des complications potentielles de la doxycycline est la diarrhée à *Clostridium difficile*, elle est très rare et ne doit pas faire éliminer ce médicament dans cette indication.

## 3.4 Généralités sur la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques de l'étude

### 3.4.1 Définition de la chimiorésistance

L'OMS a défini la chimiorésistance comme l'aptitude d'une souche de parasites du paludisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées mais comprises dans les limites de tolérance du sujet [68]. La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques est un phénomène réel sur tous les continents. Plusieurs études ont été menées pour expliquer le mécanisme de la résistance. Comme chez les bactéries, les principaux mécanismes de la résistance pourraient être dus :

Soit à l'inactivation enzymatique ou à la dégradation des médicaments [69] Soit à une altération du site de fixation du médicament. Soit à une inhibition de l'entrée du médicament [70]. Soit à un reflux actif du médicament au niveau de son site d'action.

✓ Résistance aux antipaludiques [71]

La résistance est apparue contre toutes les classes d'antipaludiques y compris l'artémisinine et ses dérivés. Cette résistance a augmenté la charge de morbidité mondiale due au paludisme et constitue une menace importante pour la lutte antipaludique. L'utilisation très répandue et

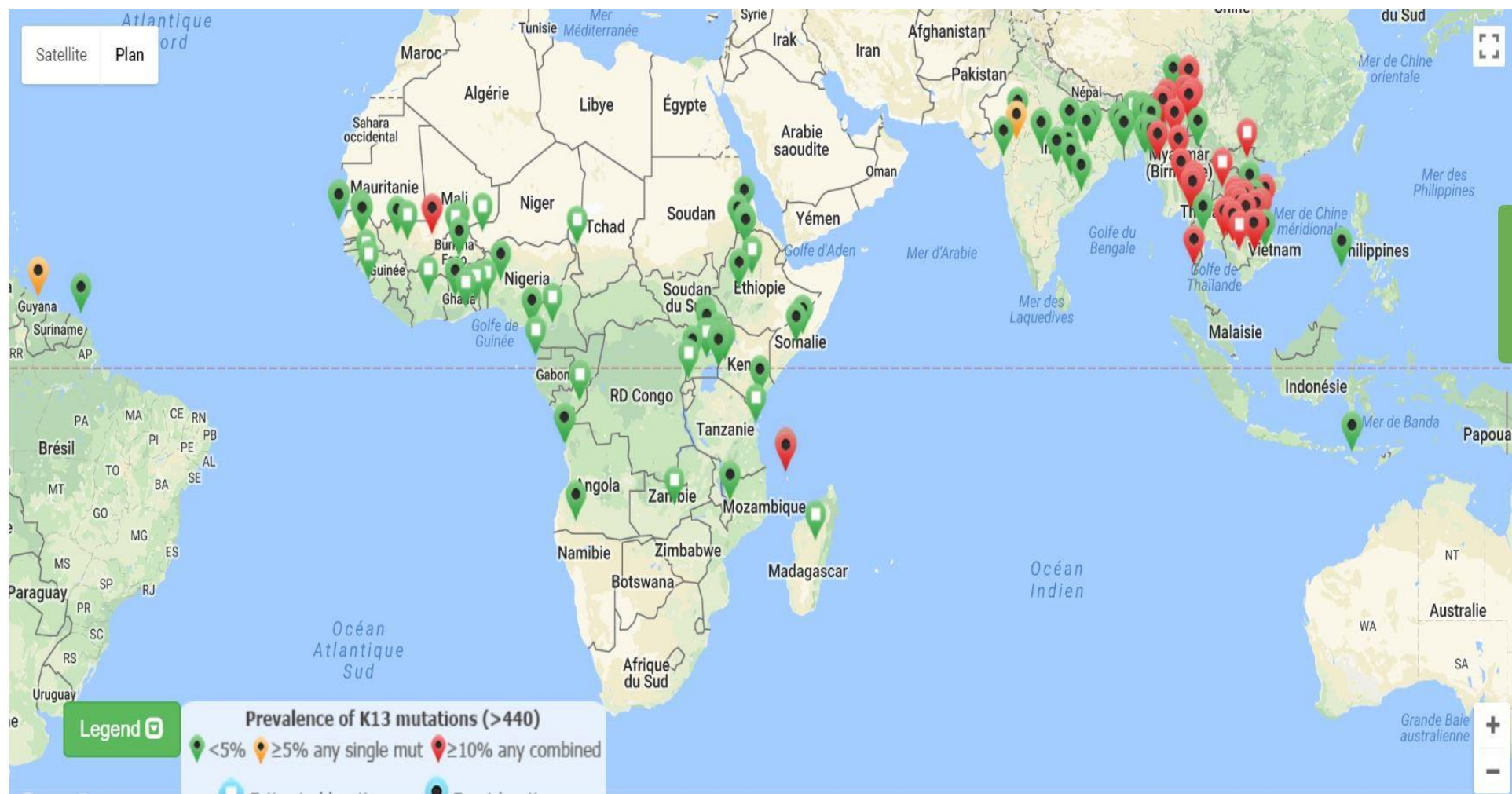
sans discernement des antipaludiques exerce une forte pression de sélection sur les plasmodies qui développent alors des taux de résistance élevés. La résistance peut être évitée ou son apparition différée considérablement en associant des antipaludiques ayant différents mécanismes d'action et en garantissant des taux de guérison très élevés grâce à une compliance totale aux bons schémas thérapeutiques.

PfMDR1, une glycoprotéine transmembranaire et un homologue de la P-glycoprotéine 1 (P-gp1), est classée sous la superfamille des protéines, ABC transporters, qui agissent comme des pompes à efflux qui aident à la translocation de substrat, y compris l'antipaludéen et ont été liés à la résistance multidrogue dans le domaine du paludisme [72].

Il est de plus en plus clair que la résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine et ses dérivés n'est pas due à la modulation de l'efflux ou des modifications de la cible comme décrit pour d'autres antipaludiques, mais est basée sur une capacité accrue de parasites mutant-PfK13 à gérer les dommages oxydatifs grâce à une plus grande mobilisation de l'UPR [73].

### **3.4.2 Répartition mondiale de la résistance aux Artémisinines et leurs partenaires**

Une résistance aux antipaludiques a été documentée pour *P. falciparum*, *P. vivax* et plus récemment *P. malariae*. Chez *P. falciparum*, la résistance a été observée contre pratiquement tous les antipaludiques actuellement utilisés (amodiaquine, chloroquine, méfloquine, quinine et sulfadoxine-pyriméthamine), y compris l'artémisinine et ses dérivés [74]. Sa répartition géographique et sa vitesse de propagation ont montré des variations considérables.



**Figure 18:** Répartition des mutations sur le gène *Pfk13* dans le monde

Source : [75] <http://www.wwarn.org/molecular/surveyor/k13/index.html#0>

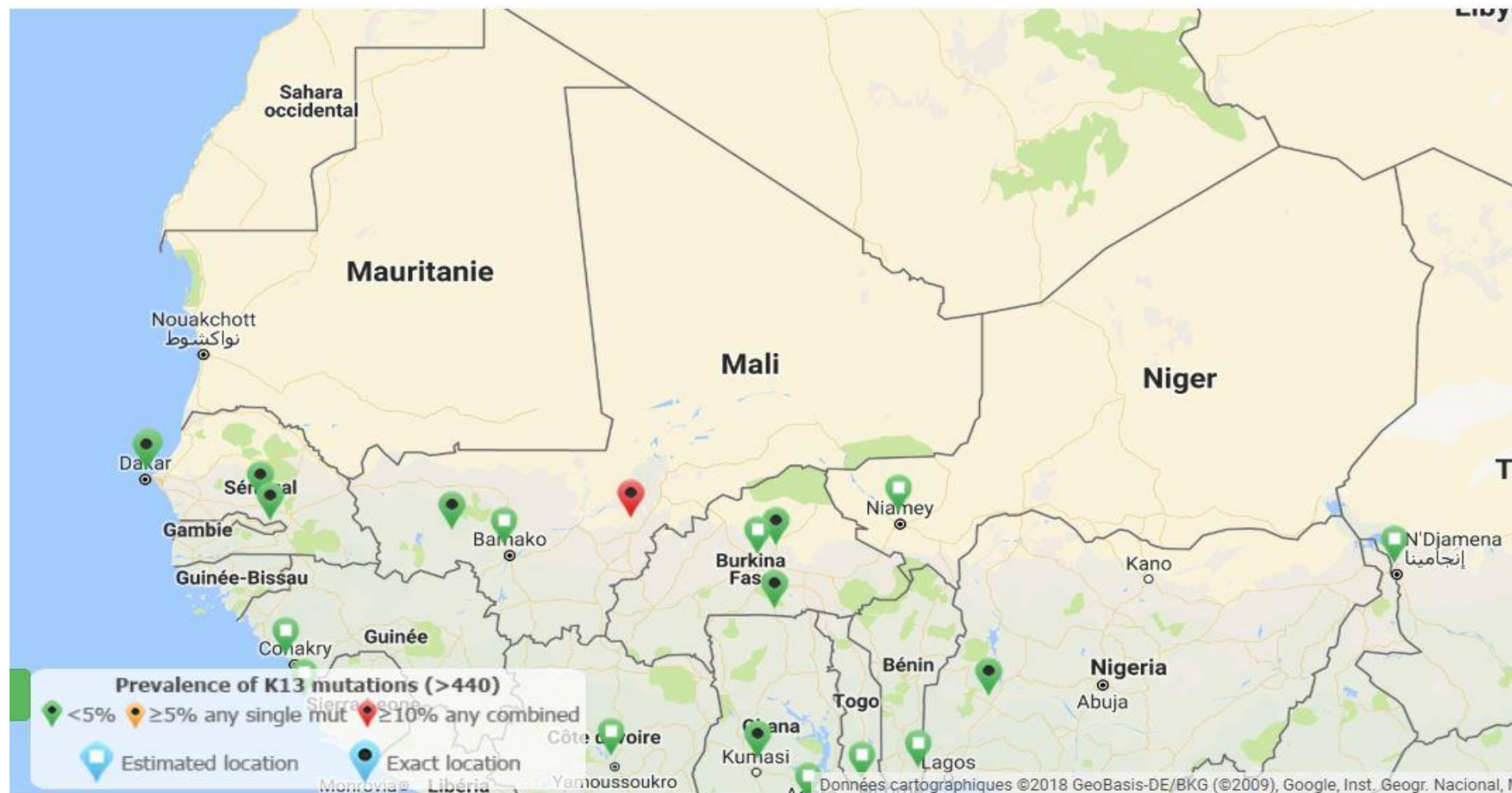




Source : [76] <http://www.wwarn.org/molecular/surveyor/#0>

**Figure 19:** Répartition des mutations sur le gène

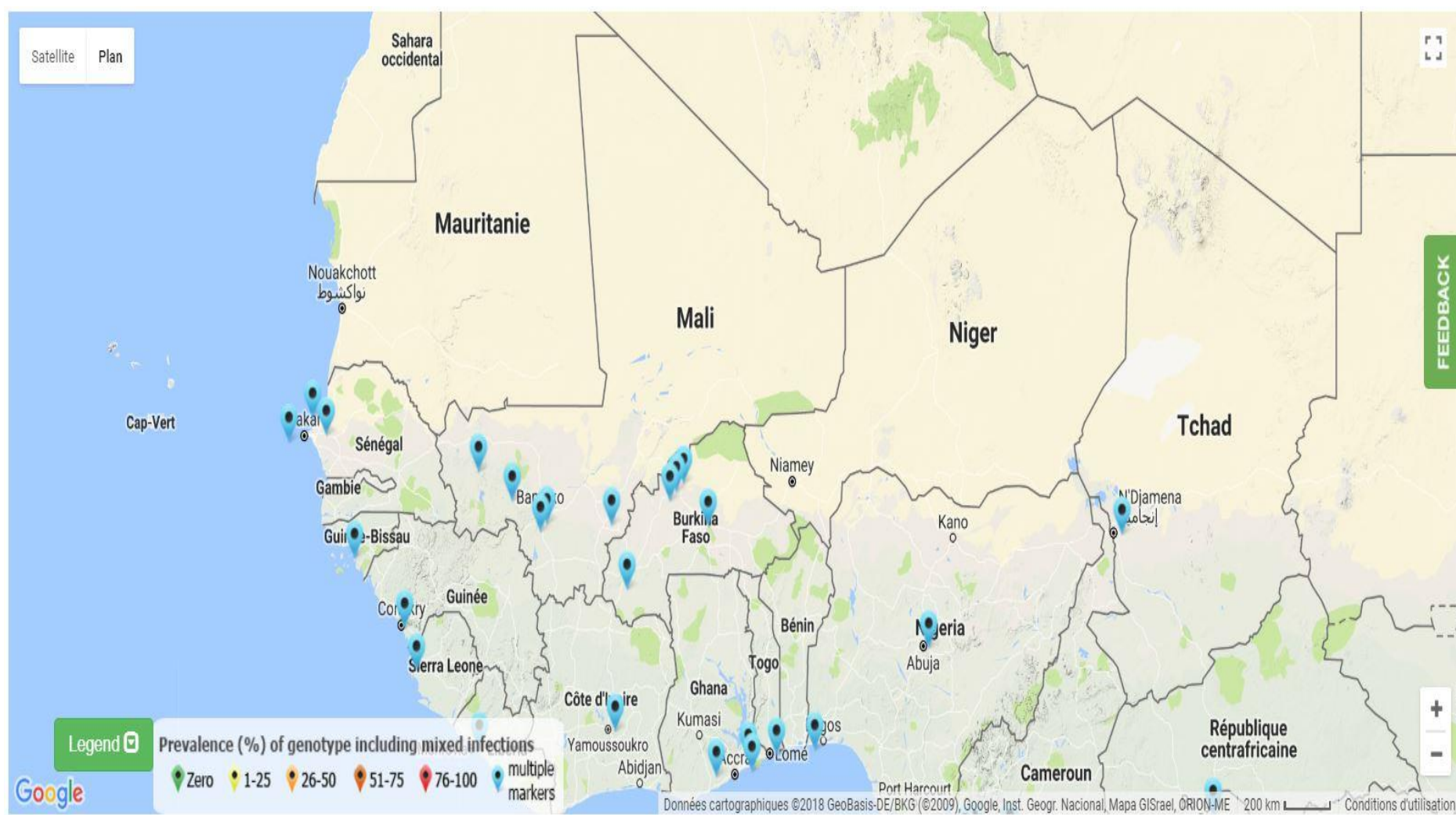
### 3.4.3 : Répartition des mutations de Pfk<sub>13</sub> et Pfm<sub>dr1</sub> en Afrique de l'Ouest



Source : [75] <http://www.wwarn.org/molecular/surveyor/k13/index.html#0>

**Figure 20:** Répartition des mutations Pfk<sub>13</sub> en Afrique de l'Ouest





Source : [76] <http://www.wwarn.org/molecular/surveyor/#0>

**Figure 21:** Répartition des mutations *Pfmdr1* en Afrique de l'Ouest en 2013



### 3.5 Détection des mutations par la méthode de FREDERICH SANGER [77]

Cette méthode repose sur l'allongement par l'ADN polymérase d'un brin à partir d'une amorce, en utilisant un autre brin d'ADN comme matrice. Cet allongement est réalisé en présence des quatre désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), monomères utilisés par la polymérase, et d'un analogue didésoxyribonucléotide (ddNTP) qui joue le rôle de terminateur de chaîne.

Du fait de l'incorporation spécifique de l'analogie par la polymérase, on obtient un mélange de fragments qui se terminent sélectivement aux positions correspondant au nucléotide choisi

Le principe de la méthode de séquençage est illustré comme suit :

On effectue ainsi quatre réactions en parallèle, chacune avec l'un des quatre ddNTP, et l'on sépare les fragments obtenus par électrophorèse. Afin de pouvoir identifier les fragments d'ADN synthétisés par la polymérase et en particulier pour pouvoir les distinguer de l'ADN matrice, on les marque avec un traceur fluorescent. Celui-ci est accroché à l'une de ses deux extrémités, soit en 5', sur l'amorce de séquençage, soit en 3' sur le didésoxyribonucléotide terminateur.

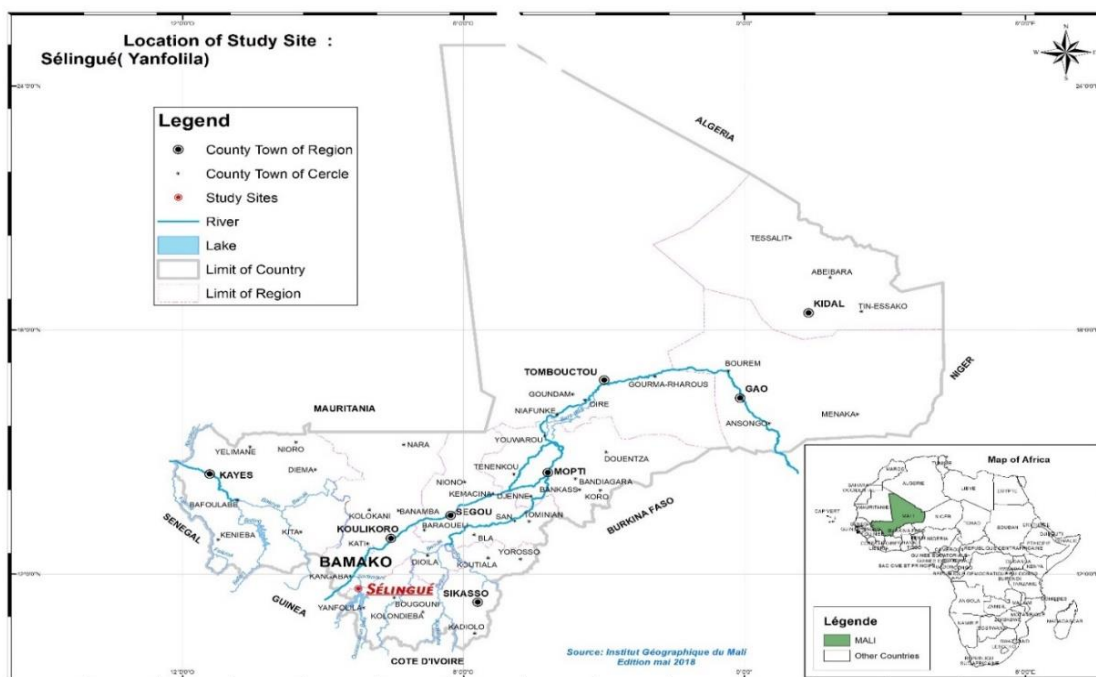
# **METHODOLOGIE**

## 4 METHODOLOGIE

### 4.1 Lieu d'étude

L'étude s'est déroulée à Sélingué, cercle de Yanfolila situé dans la région de Sikasso, Mali. Sa population est estimée à 111 469 habitants. Carrière ; Dalabala ; Sanankoroni ; Kangaré ; Bozola ; Dalaba ; Bougoudani et Kibarou constituent les principaux quartiers de la commune de Baya. Sélingué est une localité endémique où la transmission du paludisme est assurée par deux phénomènes : le barrage de Sélingué et la pluviométrie

Le district sanitaire de Sélingué regroupe un Centre de Santé de Référence et sept (7) aires de santé organisées en centres de santé communautaires (CSCoM) et gérées par des associations de santé communautaire (ASACO) : Kangaré, Binko, Tagan, Carrière, Faraba, Sièkorolé et Diarani plus trois (3) CSCoM du cercle de Kangaba (Manikoura, Séléfougou, Figuiratomo). Pour des raisons d'accessibilité géographique, la zone sanitaire de Sélingué abrite des dispensaires, des maternités (Mafléni, Bambala, Makandiana et Solinkoro) et une infirmerie de l'institut nationale de prévoyance sociale au niveau de l'office de développement rural de Sélingué (ODRS).



**Figure 22:** Localisation de Sélingué sur la carte du Mali

Source : Institut Géographique du Mali. Localisation de Sélingué sur la carte du Mali [Internet]. Mai 2018. Institut Géographique du Mali; Disponible sur: [78] [www.igm-mali.ml/](http://www.igm-mali.ml/)

## 4.2 Période d'étude

Cette étude s'est déroulée entre Octobre 2015 et Janvier 2017

## 4.3 Echantillonnage

Les patients étaient tous des enfants âgés de 6 à 59 mois.

A leur arrivée au centre de santé, les enfants sont soumis à un examen clinique puis à une goutte épaisse pour confirmer l'accès palustre simple à *Plasmodium falciparum*.

Après l'obtention de l'assentiment de l'accompagnant du malade ou des parents du malade, un prélèvement de sang veineux est fait. Ce sang servira à faire les différentes analyses moléculaires. Le sang veineux est prélevé sur du papier confetti et asséché dans le laboratoire à la température ambiante.

## 4.4 Critères d'inclusion

- Lame positive à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 2.000 et 199.999 p/  $\mu$ L ;
- Patients vivant dans un rayon de 5 km ;
- Patients âgés de 6 à 59 mois ;
- Diagnostic d'accès palustre simple (pas d'évidence de paludisme sévère ou de paludisme cérébral) ;
- Sujets pouvant potentiellement rester dans l'étude jusqu'à J42 ;
- Assentiment des parents ou tuteurs.

## 4.5 Critères de non inclusion

- Prise antérieure d'antipaludiques dans les 4 jours précédents ;
- Patients vivant dans un rayon supérieur à 5 km ;
- Patients ayant un poids corporel inférieur à 9 kg ;
- Co-infection avec d'autres espèces plasmodiales ;
- Evidence de paludisme sévère (glycémie  $\leq 2,2$  mM, Hb  $\leq 5$  g/dL, densité parasitaire  $\geq 200.000$  par  $\mu$ L, signes de perte de mémoire durant les dernières 24 heures) (**OMS, 2000**) ;
- Prostration (incapacité à marcher, à s'asseoir) ;
- Infection au VIH détectée par interrogatoire ;

- Antécédents d'hypersensibilité à l'artéméther, à la luméfantine, à l'artésunate ou à l'amodiaquine ;
- Incapable d'avaler oralement des médicaments, vomissement de la première dose et de la dose administrée à 30 minutes d'intervalle Autres infections telle la pneumonie, ou une malnutrition sévère ;
- Insuffisances cardiaques ou rénales chroniques, cancer, diabète, maladie chronique compromettant la vie.
- Les enfants âgés de moins de 6 mois et plus de 59 mois

#### 4.6 Diagnostic des cas du paludisme simple à *Plasmodium falciparum*

- **Clinique**

Les sujets sont soumis à un examen clinique au CSCoM, à la recherche d'éventuels symptômes du paludisme. Le sujet est ensuite soumis à un diagnostic immunologique (Test de Diagnostic Rapide) et parasitologique (Goutte épaisse et frottis mince) du paludisme au laboratoire. Après la confirmation de l'accès palustre simple à *P. falciparum* le sujet revient chez le médecin pour la mesure de certains paramètres comme la fréquence respiratoire, la fréquence cardiaque, le poids et la prise de médicament.

- **Diagnostic biologique :**

- **Le Test de Diagnostic Rapide (TDR) :**

Les tests de diagnostic rapide dont nous disposions étaient des cassettes et de la firme SD BIOLINE.

C'est un test de diagnostic rapide pour la détection qualitative et différentielle de la HRP-II (Protéine riche en Histidine II) spécifique de *P. falciparum*.

La sensibilité de ce test est estimée à 99,7% avec une spécificité de 99,5%.

L'utilisation de ces TDRs requiert à chaque fois certains matériaux comme :

- Un nouveau sachet de test non ouvert ;
- Un nouveau tampon imbibé d'alcool à 70° non ouvert ;
- Une nouvelle lancette stérile de la solution de tampon ;
- Une nouvelle paire de gants d'examen jetables ;
- Un chronomètre ;
- Un container pour évacuer les déchets tranchants et pointus ;
- Une poubelle pour les déchets non pointus et non tranchants.

Les TDRs s'utilisaient immédiatement après leur ouverture selon le schéma qui suit :

- D'abord la vérification de la date de péremption ;
- Enfiler la nouvelle paire de gant d'examen ;
- Puis ouvrir et sortir la cassette du sachet ;
- Ensuite écrire l'identifiant du patient sur la cassette ;
- Puis nettoyer le 4<sup>ème</sup> ou le 3<sup>ème</sup> doigt du patient avec le tampon imbibé d'alcool ;
- Laisser le doigt se sécher à l'air libre ;
- Piquer le doigt d'un coup sec avec la lancette et jeter cette dernière dans la boîte de sécurité ;
- Prélever une goutte de sang avec l'anse de prélèvement et placer la goutte de sang dans l'alvéole de la cassette destinée à recevoir la goutte de sang (carrée marquée de la lettre A) ;
- Ajouter 5 à 6 goutte de la solution tampon dans l'alvéole ronde marquée de la lettre B
- Observer 5 à 10 minutes puis lire ;
- Le test est dit **positif** si des **lignes apparaissent dans les deux fenêtres** (du test et du contrôle) ;
- Le test est dit **négatif** si une ligne apparaît dans la fenêtre de contrôle et **PAS** de ligne dans la fenêtre de test ;
- Le test est dit **invalide** s'il n'y a pas de ligne dans la fenêtre de contrôle **MAIS** il y a une ligne dans la fenêtre de test.

➤ **La goutte épaisse et le frottis mince :**

Cet examen microscopique se faisait en plusieurs étapes :

- **Etape1 : Prélèvement du malade**

**Matériel nécessaire :**

Lames d'examen de microscope

Lancettes stériles à usage unique

Méthanol ou éthanol

Coton hydrophile

Crayon gras ou stylo graveur

**Méthode :**

- Chez les enfants la piqûre se faisait au niveau 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> doigt et se faisait sur le côté qui est moins sensible ; elle se également sur le talon et le gros orteil.
- Nettoyer l'endroit choisi d'abord avec un tampon de coton imbibé d'alcool et avec un tampon sec pour enlever toute trace d'alcool ;
- Puis on pique d'un coup sec et rapide ;

- On déposait les premières gouttes de sang sur du papier filtre (confettis) ;
- De la main droite on tient une lame par les bords et de la main gauche le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang ;
- Ensuite on prenait une 2<sup>ème</sup> lame et on recueillait une seconde goutte de sang en la mettant délicatement avec une extrémité de la lame.

- **Etape 2 : Préparation et coloration de la goutte épaisse et du frottis mince**

☐ **La goutte épaisse se préparait comme suit :**

- On fait un étalement épais au centre de la lame ;
- On étale le sang avec le bout d'une lame propre jusqu'à épaissement uniforme ;
- Au bout de la lame on collait les étiquettes sur lesquelles se trouvent les identifiants des patients ;
- On laisse sécher les lames à l'air libre pendant 10 minutes à l'intérieur du laboratoire, donc à l'abri de la poussière et des mouches.

☐ **Préparation du frottis mince :**

- On tient la lame d'une main. De l'autre main, poser le bord de la lame rodée juste en avant de la goutte de sang ;
- Puis faire glisser la lame jusqu'à ce qu'elle touche la goutte de sang et laisser le sang se répartir tout le long du bord de la lame rodée ;
- Ensuite pousser la lame rodée jusqu'au bout de la lame d'étalement, d'un mouvement doux et régulier ;
- Au bout de la lame d'étalement, on collait l'étiquette identifiant le patient.

☐ **Coloration de la goutte épaisse et du frottis mince :**

La solution de coloration était diluée à 10% et pour cela on prenait 45 mL d'eau distillée plus 5 mL de Solution concentrée de Giemsa que l'on mélange. Puis plonger les lames à colorer dans la cuve à coloration contenant la solution de Giemsa et laisser colorer pendant 15 minutes. Sortir les lames, rincer à l'eau de robinet et laisser sécher pendant quelques minutes.

- **Etape 3 : examen de la goutte épaisse à la recherche des parasites du paludisme**

On dépose une goutte d'huile à immersion sur la goutte épaisse, puis on amène l'objectif à 100 au-dessus de la goutte épaisse. On abaisse l'objectif jusqu'à ce qu'il entre en contact avec l'huile à immersion ensuite faire la mise au point et observer les parasites. A l'aide d'un compteur on comptait les parasites vus et aussi les leucocytes.

Le nombre de parasites se comptait sur 300 leucocytes.

- **Étape 4 : Estimation de la densité parasitaire sur la goutte épaisse :**

En cas de résultat positif à *P.falciparum*, la densité parasitaire est estimée afin de voir le niveau de gravité de l'infection palustre lié au taux d'hématies parasitées.

Un paludisme à *P. falciparum* est considéré comme sévère quand le nombre d'hématies parasitées est supérieur à 100.000 par  $\mu\text{L}$ , l'accès pernicieux est probable au-delà de 150.000 par  $\mu\text{L}$  et une parasitémie supérieure à 400.000 par  $\mu\text{L}$  est un élément de très mauvais pronostic.

Vu l'estimation que le nombre moyen de leucocyte par  $\mu\text{L}$  est 8.000 [79] :

Le calcul du nombre de parasite par  $\mu\text{L}$  se faisait selon la formule suivante :

$$\text{Nombres de parasites par } \mu\text{L} = \frac{7.500 \times \text{Nombres de parasites comptés}}{\text{Nombre de leucocytes comptés}}$$

**Équation 1** : Formule de calcul de la parasitémie

#### 4.7 Prise de médicaments

Les patients enrôlés reçoivent des doses d'Artéméther+Luméfántrine ou d'Artesunate+Amodiaquine. Les doses administrées étaient de la firme pharmaceutique NOVARTIS donc **COARTEM®** et de la firme pharmaceutique DENK donc **ASAQ-Denk**. L'administration se faisait en fonction du poids de l'enfant et selon le schéma de randomisation.

**Tableau 1:** Protocole d'administration des molécules AL en fonction du poids

Tranches de poids corporel	Posologie et durée de traitement
5 - 14 kg	1 comprimé x 2 fois par jour pendant 3 jours
15 - 24 kg	2 comprimés x 2 fois par jour pendant 3 jours
25 - 34 kg	3 comprimés x 3 fois par jour pendant 3 jours
$\geq 35$ kg	4 comprimés x 4 fois par jour pendant 3 jours



➤ **ASAQ 100/270 : Artésunate [AS] +Amodiaquine [AQ], pendant trois jours consécutifs**

Le schéma d'administration en fonction du poids corporel est le suivant :

**Tableau 2:** Protocole d'administration des molécules ASAQ en fonction du poids

Tranches de poids corporel	Dosages ASAQ Comprimés	Posologie et durée de traitement
Petit enfant 9 - 17 kg	100/270 mg	½ comprimé x 1 fois par jour pendant 3 jours (24 heures intervalles entre les prises).
18 – 36 kg	100/270 mg	1 comprimé x 1 fois par jour pendant 3 jours (24 heures intervalles entre les prises).

#### 4.8 Suivi des patients

Les patients enrôlés dans l'étude ont été suivis pendant au total 42 jours.

Pendant les 42 jours ils viennent au centre de sante les J1; J2; J3; J7; J14; J21; J28; J35 et J42 soit dix (10) rendez-vous au total. Pendant J1; J2 et J3 les patients prennent leurs doses de Coartem® ou d'ASAQ-Denk puis subissent des examens cliniques. Le tableau ci-dessous illustre les examens effectués lors du suivi des patients par rendez-vous.

**Tableau 3:** Listing des examens faits par rendez-vous

Visites	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42
Examen Clinique	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Prise de température	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Goutte épaisse	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Traitement pat ART+LUM	X	X	X						
Traitement par ARTS+AQ	X	X	X						
Confettis	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TDR	X								
Taux d'hémoglobine	X								X

#### 4.9 Traitement des échantillons

Les lames des gouttes épaisses étaient lues par deux lecteurs différents et un troisième dans les cas où la différence entre les parasitémies trouvées par des deux premiers lecteurs valait 20%. Après la lecture des lames, ces dernières sont arrangées dans des boîtes à lames pour leur conservation au laboratoire de biologie moléculaire appliquée (LBMA) à Bamako. Au bout de chaque lame se trouvait une étiquette portant les informations du patient (l'identifiant, le numéro de suivi et la date).

Comme l'illustre le tableau ci-dessus, un confetti se faisait à chaque visite. Sur le confetti du patient se trouvaient également ses informations suscitées. Après le dépôt des gouttes de sang dans les cercles de spots, on les laissait s'assécher avant de les introduire dans des plastics contenant des dessiccants afin de les protéger de la poussière et de l'humidité. Nous faisons 10 spots le 1<sup>er</sup> jour du patient ainsi que lorsqu'il y a un échec thérapeutique et 5 spots les autres jours du suivi.

Quant aux cassettes des TDRs, on écrivait les identifiants des patients les dessus puis on les conservait dans une boîte.

Le premier jour de visite du patient, c'est-à-dire le J0, un prélèvement de sang veineux est fait avant l'administration de la première dose de médicament.

#### 4.10 Extraction de l'ADN de *Plasmodium falciparum*

##### ➤ Découpage du papier confetti

Il faut disposer de : Puncheur, de plaque de découpage des confettis, de kimwipes, d'alcool 70 à 100%, portoir de tube 1,5mL, de tubes 1,5mL, de tubes 50mL.

1. Découper 3 spots de sang puis les placer dans les tubes 1,5mL.

NB : Veiller au bon nettoyage du puncheur lors du découpage des confettis.

Lors du découpage, pour passer d'un échantillon à un autre, le puncheur doit être trempé dans la solution d'alcool puis dans de l'eau distillée, ensuite nettoyé avec le kimwipe. Il faut s'assurer que le puncheur est débarrassé de toute trace d'alcool.

La plaque de découpage doit être nettoyée aussi à l'alcool. Il faut aussi s'assurer que la plaque n'est pas mouillée par l'alcool au moment de découper les confettis.

### ➤ **Extraction de l'ADN avec le Kit Qiagen**

Il faut disposer de : au moins 3 bains-Marie, portoir de tube 1,5mL, portoir de tube 1.5mL pour le bain-Marie, vortexeuses, Ethanol 96-100%, pipettes de [20, 200, 1000µL], centrifugeuse de tube 1,5mL.

Toutes les étapes de centrifugation doivent se faire à la température ambiante (15-20°C)

Avant de commencer, s'assurer que :

- Les bains-marie sont à 85°C pour l'étape 2, 56°C pour l'étape 3 et 70°C pour l'étape 4,
- Equilibrer le buffer AE ou l'eau distillée à la température ambiante pour l'élution, l'étape 10,
- S'assurer que les buffers AW1 et AW2 ont été préparés avec l'alcool comme indiqué dans le guide du kit d'extraction,
- S'assurer que les buffers AL et ATL ne contiennent pas de précipités, sinon les faire dissoudre en les incubant à 56°C.

### **Procédure :**

1. Dans les tubes de 1,5mL contenant les 3 spots de sang déjà découpés, ajouter 180µL de buffer ATL,
2. Incuber à 85°C pendant 10 minutes puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,
3. Ajouter 20µL de Protéinase K de la solution de stock. Vortexer, puis incuber à 56°C pendant 1 heure. Centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,

A noter que l'ajout de la protéinase K est essentiel.

4. Ajouter 200µL de buffer AL aux échantillons. Centrifuger bien, et incuber à 70°C pendant 10 minutes puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.

Pour assurer une bonne lyse, il est essentiel d'ajouter le buffer AL et Vortexer immédiatement.

Il ne faut pas ajouter la protéinase K directement au buffer AL.

Après l'ajout du buffer AL, il est possible que des précipités blancs se forment. Dans la plupart des cas, ces précipités disparaissent après l'incubation.

5. Ajouter 200 $\mu$ L d'éthanol (96-100%) aux échantillons, bien Vortexer puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,

Il est essentiel que l'éthanol et les échantillons soient bien Vortexer.

6. Soigneusement transférer la solution de l'étape 5 dans les colonnes. Fermer les colonnes puis centrifuger a 8000rpm pendant 1 minute. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat.

Bien fermer les colonnes pour éviter la formation des aérosols lors de la centrifugation.

7. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 $\mu$ L du buffer AW1. Fermer les colonnes puis centrifuger a 8000rpm pendant 1 minute.

Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat.

8. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 $\mu$ L du buffer AW2. Fermer les colonnes puis centrifuger a 14000rpm pendant 3 minutes.

9. Recommandé : Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat puis centrifuger à haute vitesse pendant 1 minute.

Cette étape aide à éliminer le restant de la solution du buffer AW2 restant après l'étape précédente.

10. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes 1.5mL stériles puis jeter les tubes de collection qui peuvent contenir encore du filtrat. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 150 $\mu$ L du buffer AE ou d'eau distillée. Incuber à la température ambiante (15-20°C) pendant 1 minute puis centrifuger a 8000rpm pendant 1 minute.

Le volume d'ADN dissout utilisé lors de la PCR ne doit pas excéder les 10%, par exemple pour une PCR de 50 $\mu$ L, il ne faut pas ajouter plus de 5 $\mu$ L d'ADN.

Après l'extraction de l'ADN, si le nombre d'échantillon est grand on peut aliquoter 60 $\mu$ L d'ADN comme solution de travail et conserver le reste a -20°C.

#### 4.11 La PET-PCR

Toutes les solutions de travail des amorces ont été préparées à la concentration de 10 $\mu$ M à l'exception de l'amorce *P.falciparum-HEX* qui était à la concentration de 5 $\mu$ M.

### Préparation du Master Mix

Pour un volume total de 20µL :

**Tableau 4 : Composition du master mix pour la PET-PCR**

Réactifs	Volumes pour 20,0 µL	Conc. Finale
ddH <sub>2</sub> O	3.0µL	-----
2X ABI TaqMan Buffer	10.0µL	1X
10µM Genus Amorces Aller	0.5µL	0,25µM
10µM FAM-genus Amorces Retour	0.5µL	0,25µM
10µM <i>P.falciparum</i> Amorces Aller	0.5µL	0,25µM
10µM HEX- <i>P.falciparum</i> Amorces Retour	0.25µL	0,125µM
Extrait d'ADN	5,0 µL	-----
<b>TOTAL</b>	<b>20,0 µL</b>	

### Conditions de cycling lors de la PCR

On s'assurait que les deux dyes à savoir FAM et HEX ont été correctement utilisés et sélectionner FAM pour le genre *Plasmodium* et HEX pour l'espèce *P.falciparum*.

### Conditions de cycling :

- |         |                    |               |
|---------|--------------------|---------------|
| 1) 95°C | 15 minutes         | } X 45 cycles |
| 2) 95°C | 20 secondes        |               |
| 3) 63°C | <b>40 secondes</b> |               |
| 4) 72°C | 30 secondes        |               |

### Analyse des données

- S'assurer que les contrôles ont marché comme il se doit :
  - Contrôle Négatif = Valeur de CT  $\geq$  40
  - Contrôle positif = Valeur de CT inférieur à 40
- Les échantillons avec une valeur de CT supérieure à 40 sont considérés comme négatifs à la PET-PCR
- Tous les autres sont considérés comme positifs

## 4.12 Le séquençage des échantillons

Nous avons fait le séquençage de ces échantillons dans le but de rechercher les mutations sur les gènes *Pfmdr1* et *PfK13* non seulement à J0 mais aussi au jour de l'échec thérapeutique lors du suivi puis éventuellement les comparer. Cette comparaison permettra d'apporter une réponse à la question :

Est-ce que le retour du patient avec le paludisme est dû à une réinfection ou une résistance des souches de J0 au Coartem® et à l'ASAQ ?

### 4.12.1 Séquençage du Domaine *Propeller* de *PfK13*

Le séquençage du Domaine *Propeller* de *PfK13* s'est déroulé en cinq (5) étapes successives.

#### Etape 1 : Nested-PCR

Une série de deux réactions de PCR a été utilisée pour amplifier le domaine *Propeller* de *PfK13* (Tableau 4, 5 et 6). Le produit de la première PCR a été dilué au 1 :10 et a servi de matrice pour la seconde PCR. Le produit de PCR de la deuxième réaction contient le Domaine *Propeller* de *K13* amplifié.

**NB** : En cas de besoin, le protocole peut être stoppé à ce niveau et garder l'amplicon entre 2-8°C pour une semaine.

**Tableau 5:** Composition du Master Mix de la 1<sup>ère</sup> réaction de *PfK13*

Réactifs	Pour 20.0µL de réaction	Conc finale
ddH2O	12, 4µL	-----
5X HF Buffer	4, 0µL	1X
10µM 1 <sup>o</sup> Forw Primer	1, 0µL	0,5µM
10µM 1 <sup>o</sup> Rev Primer	1, 0µL	0,5µM
10mM DNTPs	0, 4µL	0,2µM
HF Phusion Taq	0, 2µL	1U
ADN	1,0µL	-----
<b>TOTAL</b>	<b>20,0µL</b>	

**Tableau 6:** Composition du Master Mix de la 2<sup>ème</sup> réaction de *Pfk13*

Réactifs	Pour 20.0µL de réaction	Conc final
ddH <sub>2</sub> O	12,4µL	-----
5X HF Buffer	4,0µL	1X
10µM 2 <sup>o</sup> Forw Primer	1,0µL	0,5µM
10µM 2 <sup>o</sup> Rev Primer	1,0µL	0,5µM
10mM DNTPs	0,4µL	0,2µM
HF Phusion Taq	0,2µL	1U
Diluat (1:10) 1 <sup>o</sup> RxN	1,0µL	-----
<b>TOTAL</b>	<b>20,0µL</b>	

**Conditions de cycling**1<sup>ère</sup> Réaction

98°C 2:00min	
98°C 0:10min	} 30X
48°C 0:30min	
68°C 2:30min	
68°C 10:00min	
4°C ∞	

2<sup>ème</sup> Réaction

98°C 2:00min	
98°C 0:10min	} 30X
54°C 0:30min	
68°C 2:30min	
68°C 10:00min	
4°C ∞	

**Etape 2 : ExoSAP cleaning (Purification de l'amplicon)**

Cette étape a pour objectif de nettoyer l'amplicon en le débarrassant des autres produits de la PCR tels que le restant de MgCl<sub>2</sub>, de dNTPs, d'amorces, enzymes et autres produits de la réaction de PCR.

**Tableau 7: Master Mix du ExoSAP**

Exonuclease I	2, 5µL
TSAP	3, 0µL
ddH <sub>2</sub> O	494, 5µL
<b>TOTAL</b>	<b>500,0µL</b>

Le nettoyage de l'amplicon s'est déroulé étape par étape de la manière suivante :

- Préparer le master mix selon le tableau 7 ;
- Ajouter 5µL de ce Master Mix à chaque échantillon de 20µL de la deuxième réaction ;
- Placer les tubes dans le thermocycleurs puis lancer le cycling comme illustrés dans le tableau 8.

### Condition de cycling de l'ExoSAP cleaning

37°C	25 :00min	} 1X
80°C	20 :00min	
4°C	∞	

### Etape 3: Cycle sequencing

Après le nettoyage, les produits de la PCR sont de nouveaux amplifier dans un mélange contenant à la fois les dNTPs et ddNTPs (Tableau 9 et 10). Cette opération est réalisée sur une plaque de **96 puits**.

**NB :** En cas de besoin, le protocole peut être stoppé à ce niveau et garder l'amplicon entre 2-8°C pour une semaine.

**Tableau 8: Cycle sequencing**

Réactifs	Pour 10,0µL de réaction	Conc final
ddH <sub>2</sub> O	5, 5µL	-----
Big dye Buffer	2, 0µL	0, 5µM
Big Dye	1, 0µL	0, 5µM
10µM 2° For ou Rev	0, 5µL	0, 5µM
Diluat (1:5) 2°RxN	1,0µL	-----
<b>TOTAL</b>	<b>10,0µL</b>	

### Conditions de cycling

96°C	1:00min	} 25X
96°C	0:10min	
50°C	0:05min	
60°C	4:00min	
4°C	∞	



#### **Etape 4 : Précipitation**

La précipitation s'est déroulée selon la procédure suivante :

1. Ajouter 2,0 $\mu$ L d'EDTA 0,125M pH=8 dans chaque puits de la plaque contenant un échantillon ;
2. Ajouter 2,0 $\mu$ L de sodium acétate pH=5,2 dans chaque puits ;
3. Ajouter 30,0 $\mu$ L d'éthanol 100% froid dans chaque puits de la plaque contenant un échantillon puis mélanger avec la pipette ;
4. Couvrir la plaque de seal et l'incuber a la température ambiante pendant 15-20minutes ;
5. Centrifuger a 3200rpm pendant 30 minutes à la température de 20,0°C ;
6. Enlever le seal et couvrir la plaque de kimwipes puis l'inverser, ensuite centrifuger a 1000rpm pendant 5 minutes ;
7. Ajouter 30,0 $\mu$ L d'éthanol 70% froid dans chaque puits de la plaque contenant un échantillon puis mélanger avec la pipette ;
8. Couvrir la plaque de seal, puis centrifuger a 3200 rpm pendant 15minutes ;
9. Enlever le seal et couvrir la plaque de kimwipes puis l'inverser, ensuite centrifuger a 1000rpm pendant 5 minutes ;
10. Laisser sécher la plaque dans la température ambiante pendant 30 minutes à 1 heure ;
11. Ajouter 10,0 $\mu$ L de HiDi Formamide dans chaque puits de la plaque, couvrir la plaque et passer au séquençage. Pour les puits qui ne contiennent pas d'échantillon, on peut mettre de l'eau distillée.

#### **Etape 5 : Séquençage**

Dans cette dernière étape, la plaque est insérée dans un séquenceur. Le mélange est aspiré par les capillaires du séquenceur et les séquences des fragments sont fournies par le logiciel pour analyse.

##### **4.12.2 Séquençage des régions 1 et 2 de *Pfmdr1***

Pour séquencer les régions 1 et 2 de *Pfmdr1*, nous avons suivi la même procédure que pour le séquençage du Domaine Propeller de *PfK13*. Toutefois, les amorces utilisées, la composition des Masters mix et les conditions d'amplifications étaient spécifiques à la portion de l'ADN à séquencer (Tableau 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15)

**Remarque** : Pas besoin de faire une PCR nichée après l'amplification primaire. Juste aller pour le traitement ExoSap et séquencer avec l'amorce AL6878 (interne). Cependant, dans quelques échantillons (2-5%), il est possible de ne pas obtenir de séquence pour certains codons comme 86 et 144. Dans ce dernier cas, il faut envisager de séquencer ces échantillons avec l'amorce interne AL6877. En cas d'ADN de faible qualité (pour les faibles parasitémies), il faut opter pour une PCR nichée avec les amorces.

**Tableau 9:** Séquences des amorces de la Région 1 et 2 de *Pfmdr1*

Amorces Région 1	Amorces Région 2
AL6875(Forw):5'-CCGTTTAAATGTTTACCTGCAC-3'	AL6792(Forw):5'-GCATTTAGTTCAGATGATGAAATG-3'
AL6876(Rev):5'-TGGGGTATTGATTCGTTGCAC-3'	Al6793(Rev):5'-CCATATGGTCCAACATTTGTATC-3'

**Tableau 10 :** Composition du Master Mix de la 1<sup>ère</sup> réaction de *Pfmdr1*

Réactifs	Pour 15,0µL de réaction	Conc final
ddH2O	5,7µL	-----
2X TaqMan Buffer	7,5µL	1X
10µM 1 <sup>o</sup> Forw Primer	0,4µL	0,5µM
10µM 1 <sup>o</sup> Rev Primer	0,4µL	0,5µM
Template DNA	1,0µL	-----
<b>TOTAL</b>	<b>15,0µL</b>	

Diluer le produit de PCR de la 1<sup>ère</sup> réaction au 1:6 pour la région 2.

**Tableau 11:** Composition du Master Mix de la 2<sup>ème</sup> réaction de *Pfmdr1*

Réactifs	Pour 15,0µL de réaction	Conc final
ddH2O	4, 7µL	-----
2X TaqMan Buffer	7, 5µL	1X
10µM 2 <sup>o</sup> Forw Primer	0, 4µL	0, 5µM
10µM 2 <sup>o</sup> Rev Primer	0, 4µL	0, 5µM
Diluat 1 <sup>o</sup> RxN ADN	2, 0µL	-----
<b>TOTAL</b>	<b>15,0µL</b>	

**Conditions de Cycling****Région 1**

94°C	10:00min	
94°C	1:00min	} 35X
57°C	1:00min	
72°C	1:00min	
72°C	10:00min	
4°C	∞	

**Région 2**

94°C	5:00min	
94°C	0:30min	} 35X
56°C	0:30min	
68°C	1:00min	
68°C	10:00min	
4°C	∞	

**Tableau 12:** Cycle sequencing Master Mix

Réactifs	Pour 10,0µL de réaction	[Conc final]
ddH2O	4, 5µL	-----
Big dye Buffer	2, 0µL	0, 5µM
Big Dye	1, 0µL	0, 5µM
10µM 2° For ou Rev	0, 5µL	0, 5µM
Purified 2°RxN product	2, 0µL	-----
<b>TOTAL</b>	<b>10, 0µL</b>	

**Conditions de cycling Région 1 et Région 2**

96°C	1:00min	
96°C	0:10min	
50°C	0:05min	25X
60°C	4:00min	
4°C	∞	

**4.12.3 Analyses des séquences après séquençage**

Au cours de cette étude :

- La souche *P.falciparum* MRA1236 a été utilisée comme souche sauvage et la souche MRA 1239 comme souche mutée pour le gène *PfK13*

- La souche *P. falciparum* 3D7 a été utilisée comme souche sauvage puis Dd2 et Hb3 comme les souches mutées au niveau des régions 1 et 2 de *Pfmdr1*.

Après le séquençage des échantillons, les données brutes sont recueillies et analysées avec le logiciel Geneious R11. La séquence de la souche *Pf3D7* est utilisée comme séquence consensus pour rechercher les mutations sur les autres séquences.

Après importation des données brutes dans le logiciel, toutes les séquences dont la qualité des données est inférieure à 40% ont été exclues de l'analyse au même titre que les extrémités des séquences qui comportent très souvent des données de faible qualité. Les séquences sont ensuite alignées et analysées avec le logiciel Geneious pour voir les mutations.

#### **4.13 Considérations éthiques et déontologiques**

Le protocole de recherche de cette étude a été soumis et validé par le Comité d'éthique de l'INRSP, (Ministère de la Santé, Mali). Tout changement ultérieur du protocole était soumis à l'approbation de ce comité d'éthique. C'était une étude à risque minimal car il ne s'agit pas de tester un nouveau médicament ou un matériel à usage biomédical. Elle s'appuie sur des tests de diagnostic et du schéma thérapeutique qui sont utilisés en routine dans les centres de santé dans lesquels nous avons conduit cette étude. Nous précisons que le volume total prélevé par patient (< 4mL) se trouve dans l'intervalle des quantités admises par le NIH et autres agences, lesquelles sont  $\leq 3,0$  ml par kg dans un intervalle de temps  $\geq 8$  semaines. Pour un assentiment éclairé avant la prise du sang, nous, investigateurs, avons eu à :

- Expliquer le protocole à chaque parent ou tuteur ;
- Répondre aux questions des parents ou tuteurs ;
- Obtenir un assentiment libre, éclairé et signé ;
- Remettre une copie originale de l'assentiment signé aux parents ou accompagnants ;
- Prélever le sang.

La décision de participer ou de ne pas participer relevait exclusivement du parent ou tuteur de l'enfant. Ce dernier était informé de la possibilité de se retirer de l'étude à tout moment sans aucune conséquence ou préjudice.

Tous les documents de l'étude (y compris les codes de nos données) étaient gardés dans un lieu sécurisé, et les échantillons de sang étaient étiquetés avec un code unique sans le nom du patient pour assurer la confidentialité des informations.

#### 4.14 Gestion des données

La positivité des tests de diagnostic rapide (TDRs) a été estimée en fonction des données du fabricant, **SD Bioline**.

La positivité des gouttes épaisses, l'estimation de la parasitémie étaient faites en fonction des normes de l'OMS sur la goutte épaisse et le frottis mince.

La base des données, le calendrier du suivi et les autres fichiers électroniques étaient gérés avec Excel et Word.

L'analyse des données a été faite avec **GraphPad Prism3** et **Excel**.

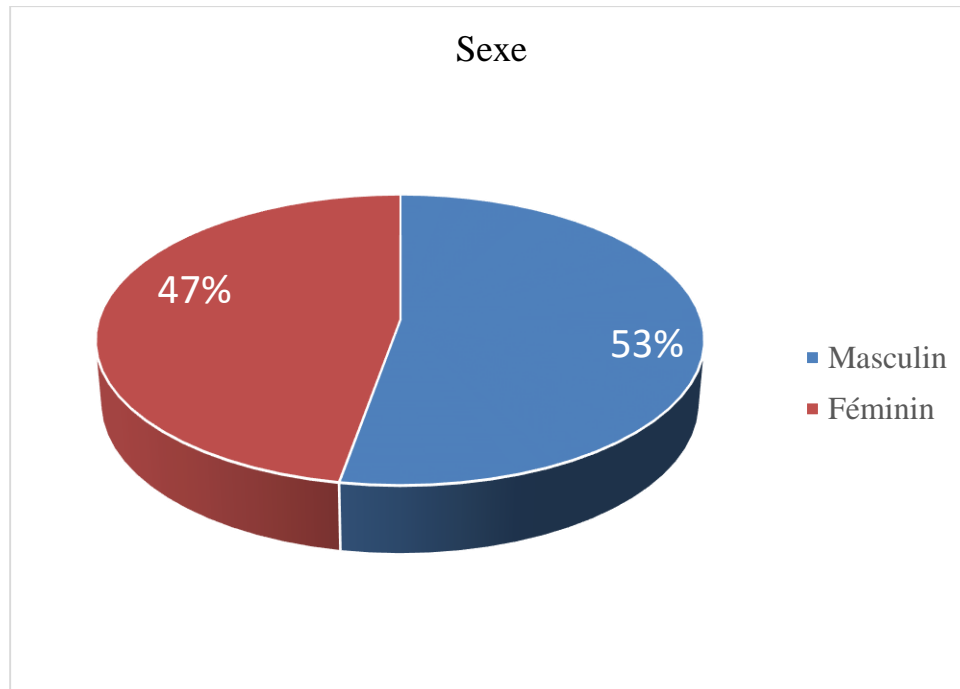
Les tests statistiques Khi-deux ont été fait pour observer les différences statistiques entre différents paramètres.

# **RESULTATS**

## 5 RESULTATS

### 5.1 Facteurs démographiques

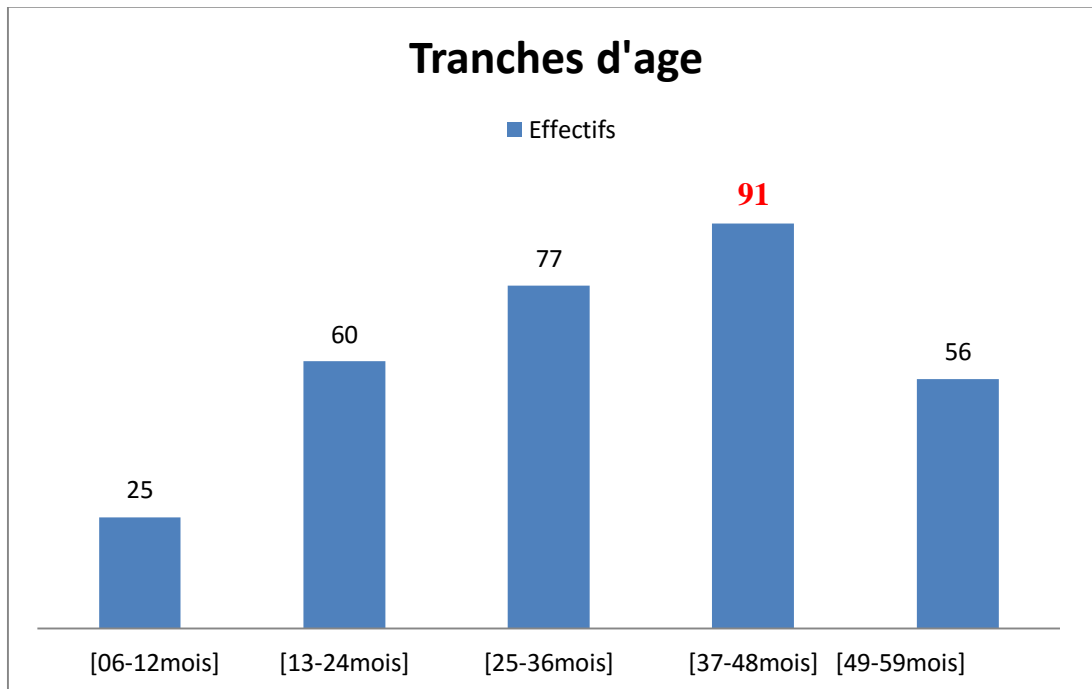
Notre étude a porté sur les enfants (filles et garçons) de 6 à 59 mois, tous de la localité de Sélingué.



**Figure 23:** Répartition des patients en fonction du genre (n=309)

Au total 309 patients ont participé à cette étude dont **53%** de ces patients étaient du sexe masculin, avec un sexe ratio de 1,11 en faveur du sexe Masculin.

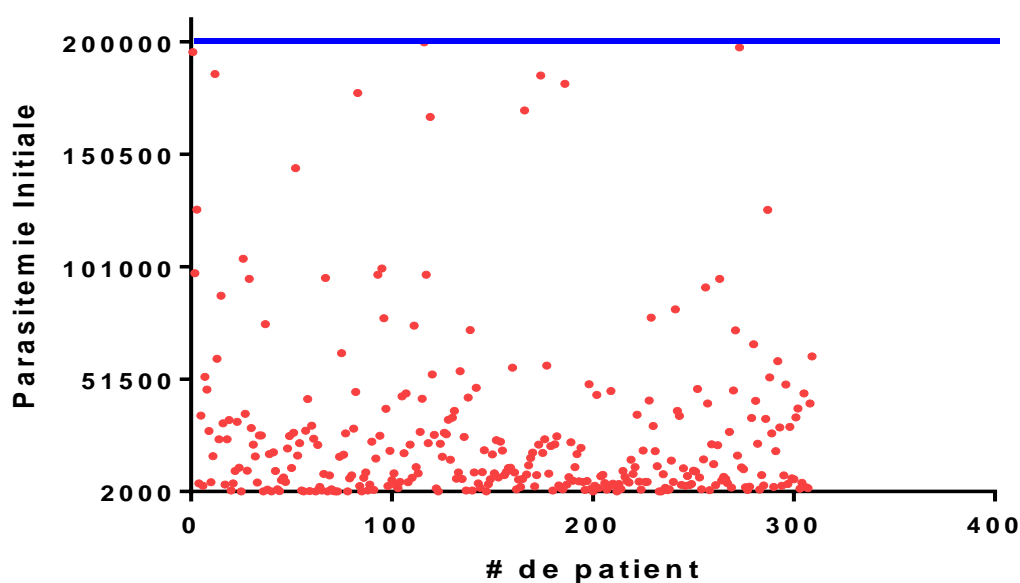
Nous avons reparti les patients ayant participé à cette étude par tranche d'âge afin qu'on puisse estimer l'efficacité clinique des CTAs utilisées en fonction de l'âge.



**Figure 24:** Répartition des patients par tranche d'âge (n=309)

L'âge Minimum était 6 mois et le maximum 59 mois. La moyenne de l'âge était  $37 \pm 14,47$ . La tranche d'âge des [37-48 mois] était la plus représentée avec 29,4% (n = 91).

## 5.2 Diagnostic



**Figure 25:** Répartition des patients en fonction de la parasitémie initiale (n=309)



La majorité de nos patients avait une parasitémie initiale comprise entre 2000-50000 Tf/ $\mu$ L. Tous les patients qui ont participé à cette étude avaient des parasitémies comprises entre 2000 et 199.999 parasites/ $\mu$ L de sang.

Au cours de cette étude, nous avons observé la réaction de chaque patient aux médicaments administrés.

La positivité des lames de goutte épaisse a été confirmée par PET-PCR. La confirmation a été faite pour le genre *Plasmodium* ainsi que l'espèce *falciparum*.

**Tableau 13:** Répartition des patients selon leur positivité au genre *Plasmodium* (n=309)

Nombre de cycles-CT value FAM	Effectifs	Pourcentage
Positif (16-39)	304	98,38
Négatif (>40)	0	0
*	5	1,62
<b>Total</b>	309	100

\*Echantillons ayant donné des résultats non-interprétables

Le genre *Plasmodium* a été détecté chez tous les patients (n=304) dont la PET-PCR a marché.

**Tableau 14:** Répartition des patients selon leur positivité à l'espèce *falciparum* (n=304)

Nombre de cycles-CT value HEX	Effectifs	Pourcentage
Positif (16-39)	304	98,38
Négatif (>40)	0	0
*	5	1,62
<b>Total</b>	309	100

\*Echantillons ayant donné des résultats non-interprétables

Tous les échantillons testés avec succès (n=304) avaient des souches de *Plasmodium falciparum*.

### 5.3 Efficacité des CTAs

**Tableau 15:** Répartition des patients selon le temps de clairance parasitaire (n=292)

Temps de Clairance en heures	#	%
24 Heures	120	41,09
48 Heures	<b>152</b>	<b>52,05</b>
72 Heures	20	6,85
<b>Total</b>	292	100

Nous avons remarqué que 152 (soit 52,05%) de nos patients ont fait leur clairance au bout de 48 heures après le début de leur traitement antipaludique. La médiane du temps de clairance parasitaire était de 48 heures pour une moyenne de 39,78 heures.

**Tableau 16:** Evolution du temps de clairance parasitaire en fonction de la parasitémie initiale

Parasitémie initiale	TCP			Total
	24 Heures	48 Heures	72 Heures	
2000-50000	<b>112</b>	<b>133</b>	<b>11</b>	<b>256</b>
50005-100000	5	14	4	23
100005-150000	2	1	2	5
150005-200000	1	4	3	8
<b>Total</b>	120	152	20	292

La majorité des patients qui avaient une parasitémie comprise entre 2000 et 50000 parasites/ $\mu$ L de sang ont réussi à faire leur clairance parasitaire entre 24 heures et 48 heures, cependant 20 patients ont fait leurs clairances à 72 heures. Nous remarquons également que parmi les 05 patients qui ont une parasitémie comprise entre 100005 et 150000 tous ont fait leur clairance parasitaire dans les 72 heures. Nous avons remarqué une différence statistiquement significative en termes de clairance parasitaire entre les patients ayant une forte parasitémie et une parasitémie inférieure à 50.000Tf/ $\mu$ L (**Test de Khi-deux, Valeur de**

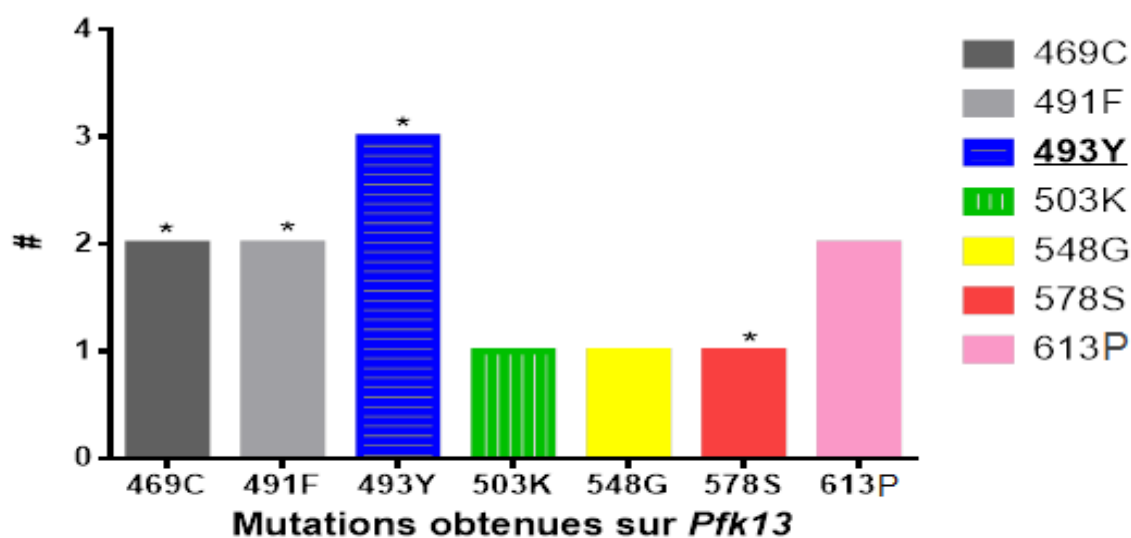
**P <0,0001**). Les patients ayant donc de petites parasitémies initiales ont tendance à faire leur clairance parasitaire plus rapidement que ceux ayant de fortes parasitémies.)

**Tableau 17:** Evolution du temps de clairance parasitaire en fonction de l'âge

Tranche d'âge	TCP			Total
	24 Heures	48 Heures	72 Heures	
06-12 mois	8	11	4	23
13-24 mois	23	31	3	57
25-36 mois	27	42	6	75
37-48 mois	37	42	6	85
49-59 mois	25	26	1	52
<b>Total</b>	120	152	20	292

Ce tableau montre une évolution plus ou moins similaire de la clairance parasitaire entre les différentes tranches d'âge. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans l'évolution du temps de clairance parasitaire entre les tranches d'âge (**Test de Khi-deux, Valeur de P=0,4436**)

#### 5.4 Mutations sur le domaine *Propeller* du gène *Pfk13*



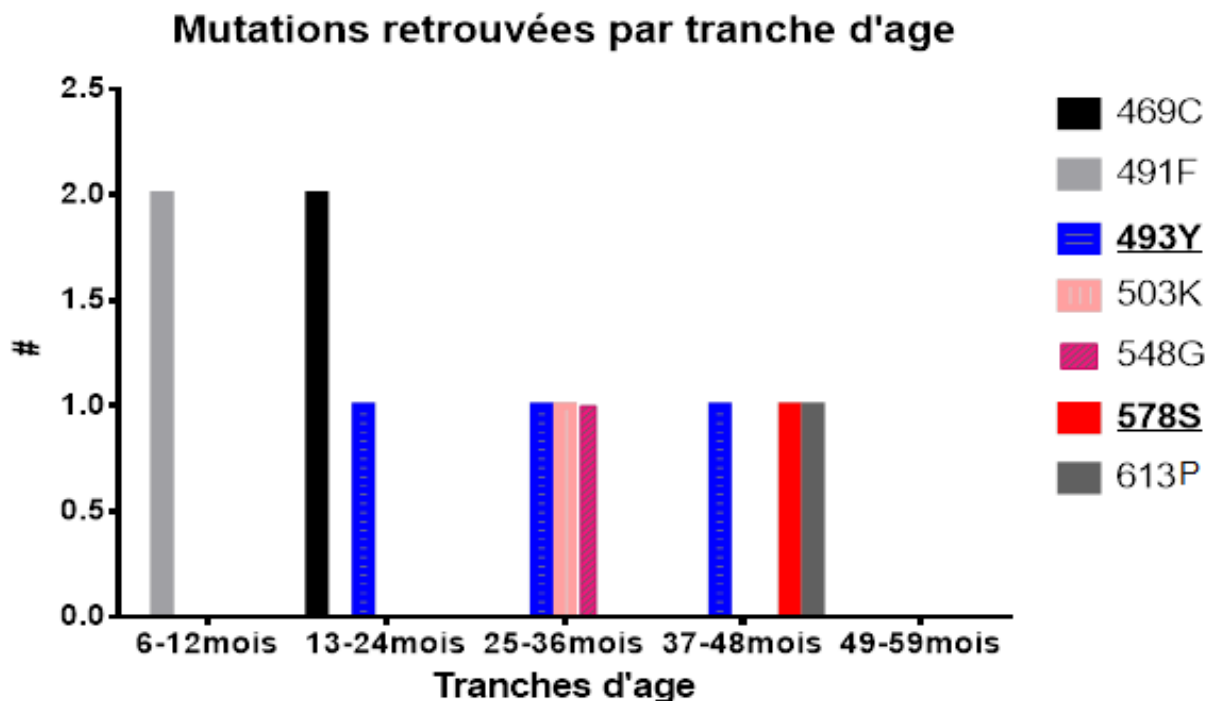
\* Mutations précédemment reportées

**Figure 26:** Mutations sur le domaine *Propeller* du gène *Pfk13*

La plupart des mutations obtenues après séquençage du gène *Pfk13* étaient des mutations transitoires. Il faut cependant noter le cas de la position 578 qui n'est pas une mutation silencieuse A578S, elle constitue en la substitution de l'Arginine (A) par la Serine (S).

La mutation à la position 493 qui est assez connue pour son association au retard de clairance parasitaire en Asie du Sud-Est a été retrouvée chez 3 patients. Toutefois, ces mutations sont actuellement transitoires.

\*Parmi les 2 mutations transitoires observées à la position 613, l'une d'entre elles provenait d'un parasite isolé lors du suivi (échec thérapeutique)



**Figure 27:** Répartition des mutations par tranche d'âge

Nous avons trouvé des mutations sur le domaine *Propeller* de *Pfk13* dans toutes les tranches d'âge sauf la tranche 49-59mois.

**Tableau 18:** Répartition des mutations en fonction de la parasitémie n=304

Parasitémie	469C	491F	493Y	503K	548G	578S	613P
<b>2000-50000</b>	2	2	2	1	1	0	1
<b>50005-100000</b>	0	0	0	0	0	1	0
<b>100005-150000</b>	0	0	1	0	0	0	0
<b>150005-200000</b>	0	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	2	2	3	1	1	1	2

Deux des mutations : l'une à la position 493 et l'autre à la position 613 étaient liées à des fortes parasitémies.

**Tableau 19:** Répartition des mutations en fonction du temps de clairance parasitaire

TCP	469C	491F	493Y	503K	548G	578S	613P
<b>24 Heures</b>	1	0	0	1	1	0	0
<b>48 Heures</b>	1	1	2	0	0	0	1
<b>72 Heures</b>	0	0	1	0	0	1	0
<b>Total</b>	2	2	3	1	1	1	1

La mutation non-silencieuse **578S** était liée à un temps de clairance retardé aussi bien que l'une des mutations transitoires de la position 493.

### 5.5 Mutations sur le gène *Pfmdr1*

**Tableau 20:** Répartition des mutations *Pfmdr1* région 1 obtenues des souches isolées avant le traitement (n=268)

Positions <i>Pfmdr1</i> region1	86Y	102G	184F	237G	238I	245P	247I	249V	276V
#	5	1	65	2	4	1	1	1	1
%	1,9	0,4	24,3	0,7	1,5	0,4	0,4	0,4	0,4

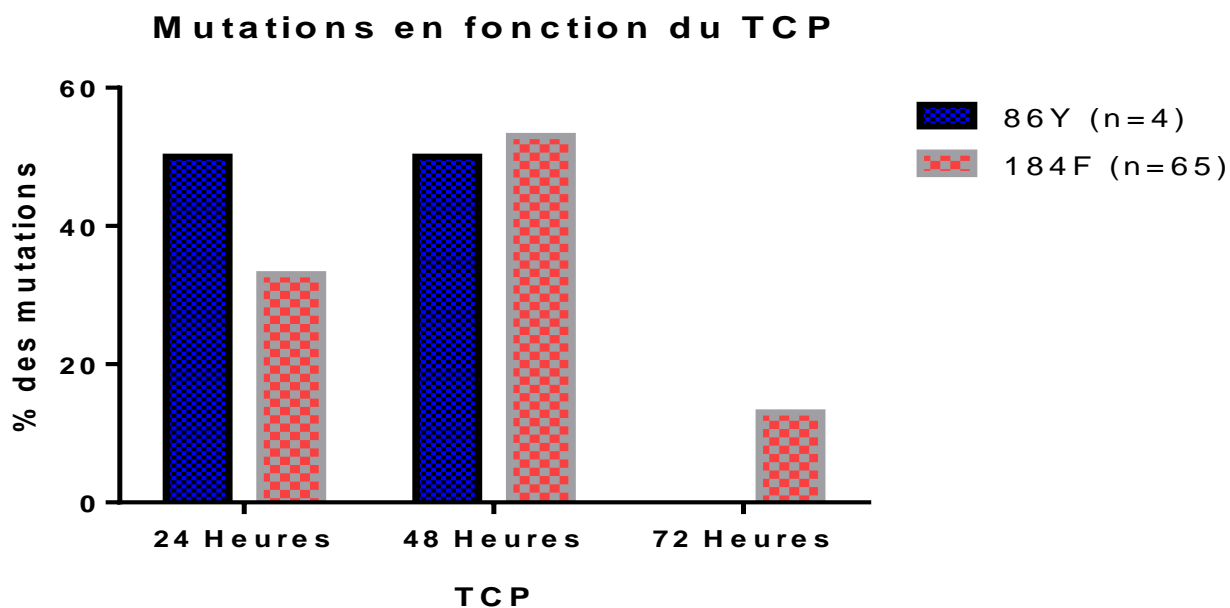
Nous avons séquencé les régions 1 et 2 du gène *Pfmdr1* de toutes les souches de *P.falciparum* obtenues avant administration et suivi des patients. Nous avons obtenu des mutations

silencieuses et transitoires. Parmi ces dernières on peut citer la position 102 sur laquelle le codon GGT est substitué au codon GGC. Toutefois, l'acide aminé G (Glycine) est resté le même chez ces parasites ayant présenté ces mutations. Nous avons aussi observé des mutations non-silencieuses à plusieurs positions de ce gène. La position 184 s'est révélée la plus mutée avec un pourcentage de 24,3% suivie de la position 86 (n=5). Les mutations à la position 184 étaient une substitution de l'acide aminé Y (Tyrosine) par F (Phénylalanine) et à la position 86 il s'agissait d'une substitution de l'acide aminé N (Asparagine) par Y (Tyrosine).

**Tableau 21:** Répartition des mutations selon les tranches de parasitémie

Tranche de parasitémie	Mutations sur la region1 de <i>Pfmdr1</i>								
	86Y	102G	184F	237G	238I	245P	247I	249V	276V
<b>2000-50000</b>	5	1	53	1	3	1	1	1	0
<b>50005-100000</b>	0	0	8	1	1	0	0	0	0
<b>100005-150000</b>	0	0	2	0	0	0	0	0	1
<b>150005-200000</b>	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	5	1	65	2	4	1	1	1	1

La majorité des mutations obtenues lors de cette étude étaient observées dans la tranche de parasitémie 2000-50000. Quatre (4) mutations au niveau de la position 184F étaient associées aux fortes parasitémies.



**Figure 28:** Répartition des mutations non-silencieuse en fonction du temps de clairance parasitaire

La mutation 184F a été retrouvée associée aux patients ayant fait leur clairance parasitaire à 72 heures aussi bien qu'à 48 et 24 Heures. Toutefois, la mutation 86Y a été associée à 48 et 24 heures comme temps de clairance parasitaire.

**Tableau 22:** Répartition des mutations selon les tranches d'âge

Tranche de parasitémie	Mutations sur la region1 de <i>Pfmdr1</i>								
	86Y	102G	184F	237G	238I	245P	247I	249V	276V
06-12 mois	0	0	5	0	1	0	0	0	0
13-24 mois	0	0	11	0	0	0	0	0	1
25-36 mois	2	0	18	1	1	1	1	1	0
37-48 mois	2	1	15	1	1	0	0	0	0
49-59 mois	1	0	16	0	1	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>65</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

Nous avons trouvé des mutations sur le gène *Pfmdr1* dans toutes les tranches d'âge. Il n'y avait aucune différence statistiquement significative entre les mutations et les tranches d'âge (Test de Khi-deux, Valeur de P =0,9108).

**Tableau 23:** Répartition des mutations *Pfm<sub>dr1</sub>* région 2 obtenues des souches isolées (n=309)

Positions <i>Pfm<sub>dr1</sub></i> region2	1069T	1082A	1246Y
#	7	1	1
%	2,3	0,3	0,3

La majorité des mutations obtenues au niveau de la région 2 étaient des mutations silencieuses. Ces dernières concernaient surtout la position 1069 avec la substitution du codon ACT en ACG tous deux codant pour l'acide aminé T (Thréonine). Nous avons observé aussi quelques mutations non-silencieuses à la position 1082 qui était la substitution d'un acide aminé S (Serine) en A (Alanine) et à la position 1246 dont il s'agissait d'une substitution de D (Acid Aspartique) en Y (Tyrosine).

**Tableau 24:** Répartition des mutations de la région 2 en fonction des tranches de parasitémies

Tranches de parasitémies	Mutations sur la région 2 de <i>Pfm<sub>dr1</sub></i>		
	1069T	1082A	1246Y
2000-50000	5	0	0
50005-100000	2	1	1
100005-150000	0	0	0
150005-200000	0	0	0
<b>Total</b>	7	1	1

Toutes les mutations obtenues lors de cette étude étaient observées dans la tranche de parasitémie 2000-50000 ; et 50005-100000.



**Tableau 25:** Répartition des mutations de la region2 en fonction du TCP

TCP en heures	Mutations sur la région 2 de <i>Pfmdr1</i>		
	1069T	1082A	1246Y
24 Heures	0	0	0
48 Heures	6	1	1
72 Heures	1	0	0
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

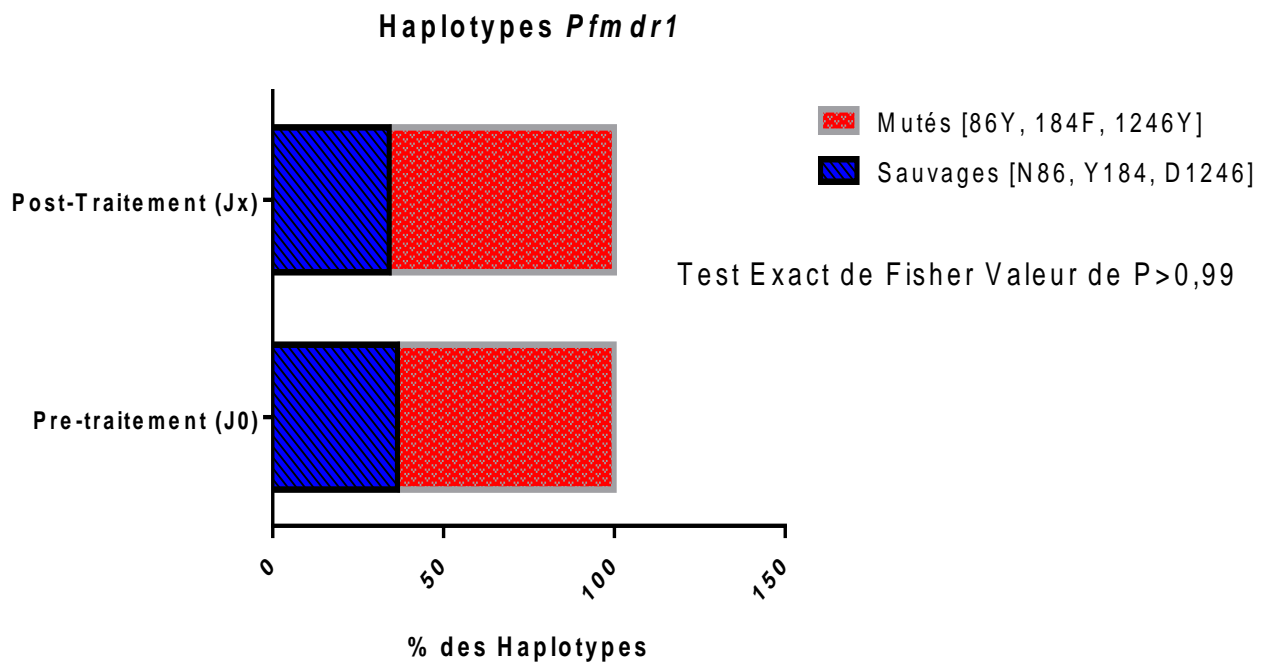
Des mutations observées sur la région 2 du gène *mdr1*, une seule d'entre elles était associée à une clairance parasitaire atteignant 72 heures.

**Tableau 26:** Répartition des mutations de la région 2 en fonction des tranches d'âge (n=268)

Tranches d'âge	Mutations sur la région 2 de <i>Pfmdr1</i>		
	1069T	1082A	1246Y
06-12 mois	2	0	0
13-24 mois	2	0	1
25-36 mois	2	1	0
37-48 mois	1	0	0
49-59 mois	0	0	0
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

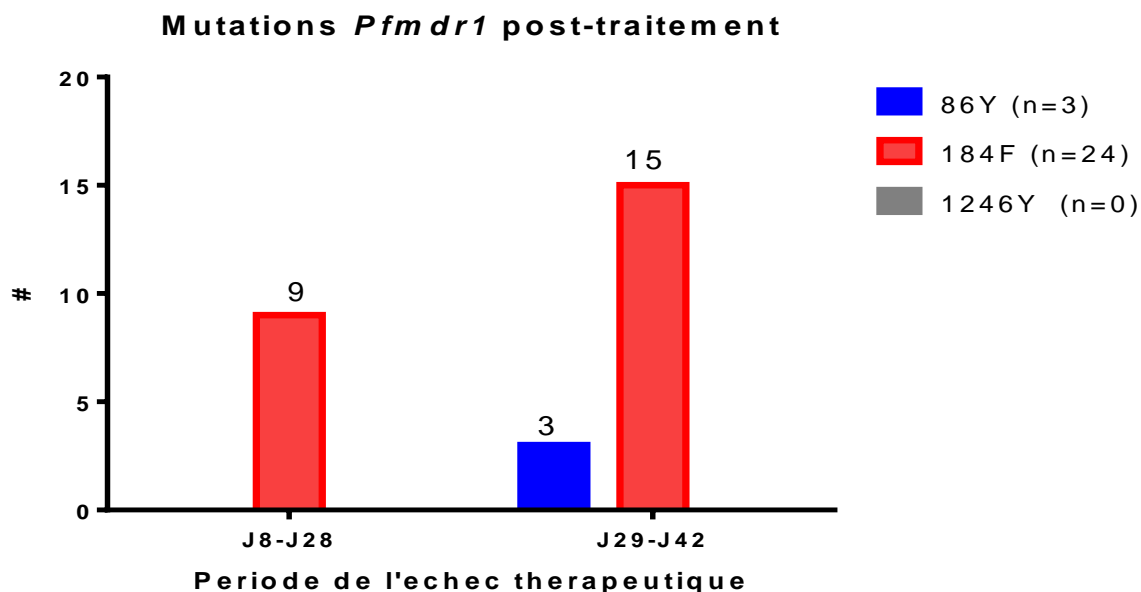
Les mutations obtenues sur la région 2 du *Pfmdr1* étaient repartis sur toutes les tranches d'âge sauf la tranche d'âge 49-59 mois.

## 5.6 Mutations associées aux cas d'échecs thérapeutiques

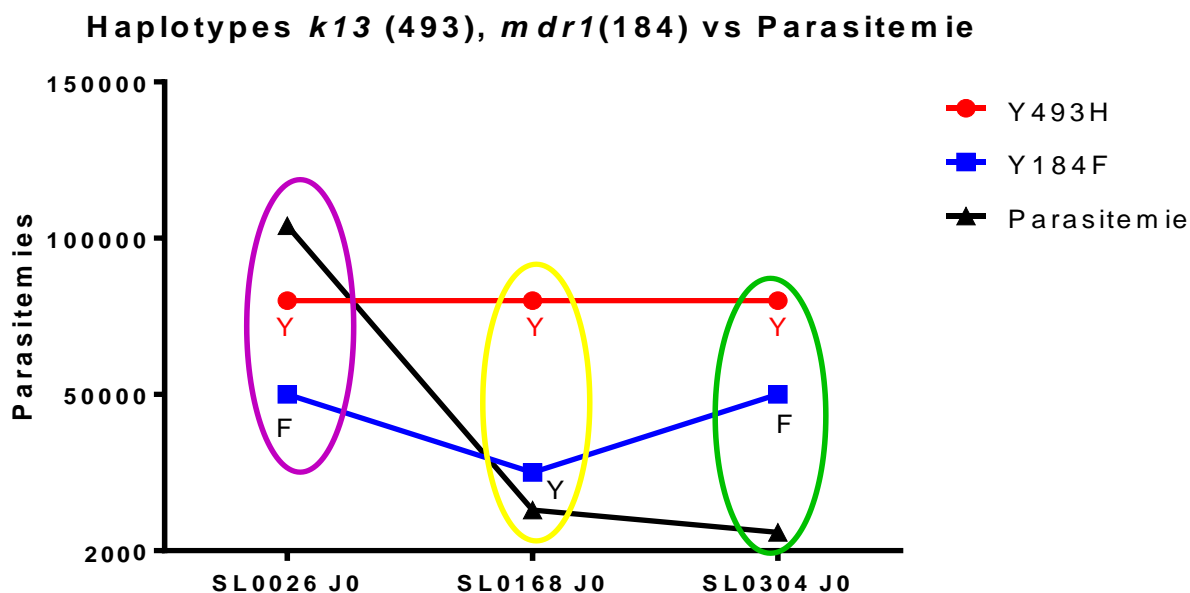


**Figure 29:** Répartition des cas d'échecs thérapeutiques selon le profil du parasite avant et au cours du suivi

Après séquençage des paires de parasites isolés chez les patients qui ont subi des échecs thérapeutiques, nous avons remarqué que les profils mutés étaient rencontrés aux mêmes fréquences parmi les souches isolées avant le traitement (J0 ; 63,41%) que les souches isolées lors du suivi (Jx ; 65,85%). Il n'y avait aucune différence statistiquement significative dans la distribution des mutations à J0 et Jx (Test exact de Fisher, valeur de  $P > 0,99$ )



**Figure 30:** Répartition des mutations selon la période de survenue de l'échec thérapeutique  
 Nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative dans la répartition des mutations dans les périodes J8-J28 et J29-J42 (Test de Khi-deux, Valeur de P=0,1939). Les mutations 184F se retrouvent de part et d'autre de J28.



**Figure 31:** Les haplotypes de *K13*, *mdr1* en fonction de la parasitémie

Deux des trois patients avaient des mutations à la position 493 associées aux mutations 184F avec une forte parasitémie.

**COMMENTAIRES  
ET DISCUSSION**

## 6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Comme tout travail humain notre étude comporte également quelques limites et parmi ces limites nous notons que : nous n'avons pas pu utiliser d'autres méthodes de séquençage qui sont connu comme étant plus efficace que le Sanger, par exemple la méthode de séquençage NGS (nouvelle génération de Sequencing), celle-ci est due au cout très élevés du Séquenceur

Nous avons fait une étude prospective de la prévalence des mutations associées à la résistance à l'artémisinine et ses dérivés ainsi que les molécules partenaires (Amodiaquine et Luméfantrine) utilisées dans les CTAs constituant les traitements de première ligne du paludisme simple a *P.falciparum* au Mali.

La localité de Sélingué a été choisie pour cette étude car elle fait partie des localités où la transmission est réellement forte. A Sélingué, le faciès de transmission du paludisme correspond au Faciès des Barrages (Sélingué, Manantali et Markala). Avec comme caractéristique, une anémie palustre élevée chez les moins de 9 ans. La transmission du paludisme y est Bimodale (plurimodale) [12]. La pluviométrie élevée et la présence du barrage hydroélectrique à Sélingué en font un site propice au développement des vecteurs (l'anophèle) à cause des retenus d'eau et donc de la transmission du parasite du paludisme (*Plasmodium*).

Les données de notre étude ont été collectées sur les formulaires de report de cas (FRC) et saisies dans le logiciel Microsoft Excel 2013 pour en faire une base de données. Cette méthode nous a permis de collecter des données fiables et exploitables. Les séquences obtenues après séquençage ont été alignées et analysées avec le logiciel Geneious version 10 [80].

Le dépistage se faisait par la clinique et la parasitologie. La lecture des lames des gouttes épaisses se faisait d'abord par un technicien de laboratoire, puis une deuxième fois par un pharmacien biologiste et en fin une dernière lecture par un parasitologue si besoin était de départager les deux premiers lecteurs. Ces lectures répétées des lames nous ont permis d'éviter les cas de faux positifs. Les papiers confettis ont été fait avec le sang total, séchés à la température ambiante à l'abri des mouches et du soleil suivant les recommandations de l'OMS [81,82] Ensuite les papiers confettis ont été rangés dans des sachets secs avec des dessiccants (desséchants) pour leurs bonnes conservations. Ces dessiccants ont été utilisés

dans le but de prévenir le développement des moisissures sur ces papiers filtres. Le respect de ces mesures lors de la confection des confettis augmente les chances d'avoir des confettis de bonne qualité et donc du matériel génétique adéquat pour les tests moléculaires [81,82]. Durant l'étude, un système de supervision était mis en place pour prévenir la survenue d'éventuelles erreurs.

Le kit Qiagen a été utilisé pour l'extraction de l'ADN. Ce kit permet d'avoir de l'ADN purifié, débarrassé de toutes impuretés comme l'hémoglobine pouvant entraîner des interférences lors de la PCR.

Le génotypage des échantillons a été fait par séquençage suivant la méthode de Sanger. Cette méthode est décrite comme l'une des plus utilisées et préférées en termes de séquençage du matériel génétique [83]. Cette méthode a également été décrite dans certaines études comme ayant une sensibilité de 98-100% [84].

Cette étude a porté sur 309 enfants dont 53% d'entre eux étaient du sexe masculin avec un sexe ratio de 1,11. Cette tendance semble être similaire à celle retrouvée dans les données de l'enquête de la banque mondiale à propos de la pyramide des âges. Selon l'enquête de la banque mondiale donnant la pyramide des âges, le sexe ratio (1,04) est en faveur du genre masculin chez cette tranche d'âge (0-5ans). Cette tendance est confirmée par d'autres études menées au Mali dont celle menée en 2003 dans la localité de Missira, Kolokani au Mali par DARAR.H.Y portant sur l'étude épidémiologique et moléculaire du Paludisme à *Plasmodium falciparum* par la *msp1* à Missira

La majorité des patients recrutés dans cette étude avaient des parasitemies inférieures à 50.000Tf/ $\mu$ L de sang. Ces parasitemies pas assez élevées peuvent s'expliquer d'une part par le système de dépistage actif (dépistage porte en porte) qui était mis en place lors de cette étude et d'autre part à la prévalence du paludisme dans la localité de Sélingué. Grâce donc au système de dépistage de porte en porte, nous étions à mesure de détecter les parasitemies chez les patients ne présentant aucun symptôme du paludisme. Dans la localité de Sélingué, les personnes sont très exposées aux piqûres de moustiques et donc exposées à développer des parasitemies. Les enfants de 6 à 59 mois n'ayant pas beaucoup d'épisodes (pas de prémunition) de paludisme sont plus aptes à développer des parasitemies après des piqûres infestantes.

Certains patients avaient toutefois de fortes parasitemies. Pour la plupart de ces dernières, elles proviennent des dépistages volontaires. Les patients qui viennent au centre pour

dépistage volontaire sont plus aptes à développer de fortes parasitémies car ces enfants ne sont amenés au centre que lorsqu'ils présentent des symptômes. Ce constat montre clairement que le dépistage actif contribue activement à détecter précocement les cas de paludisme et leur prise en charge.

Pour tous les patients (100%) qui ont été désignés « positifs » à la goutte épaisse, la confirmation a été faite par la PET-PCR. La PET-PCR est une technique qui a une sensibilité et une spécificité de 92,3% et 100% respectivement [34]. La lecture microscopique nécessite souvent un lecteur très expérimenté au risque de confondre certaines espèces de *Plasmodium*. Cette confirmation des souches de parasites confirmées à 100% du genre *Plasmodium* et de l'espèce *falciparum* prouve la qualité de la lecture microscopique lors de cette étude.

La plupart des patients ont fait leur clairance parasitaire à 48 heures lors de cette étude. La moyenne de ce temps de clairance parasitaire était de 39,78 heures. Ce temps de clairance avait une médiane (48 heures) supérieure à celle (32 heures) d'une étude menée par **Maiga et al** en 2012 à Sikasso sur l'efficacité des CTAs [85].

Nous avons aussi remarqué que le temps de clairance parasitaire était fonction de la parasitémie initiale (Khi-deux,  $p < 0,0001$ ). Cette tendance est confirmée par une étude menée par Nicholas J White [86]. La clairance parasitaire est en principe liée à la concentration du médicament et aussi les stades parasitaires. Pour les patients qui ont de très fortes parasitémies, il y a plus de chance d'avoir plusieurs stades parasitaires. Ceci pourrait donc contribuer à ralentir la clairance parasitaire car les médicaments sont spécifiques de certains stades parasitaires. Toutefois, le temps de clairance parasitaire n'avait aucun lien avec les tranches d'âge. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces tranches d'âges sont très proches les unes des autres et que ces enfants n'ont pas encore eu suffisamment de temps pour développer une certaine prémunition qui peut non seulement protéger contre le paludisme mais aussi accélérer le temps de clairance parasitaire en cas d'infection palustre.

Après séquençage du domaine *Propeller* du gène *Pfk13*, nous avons obtenu des mutations transitoires et non-silencieuses. Pour les positions 469, 613 et 503 les mutations obtenues étaient silencieuses et constituaient respectivement une substitution du codon TGT en TGC avec le même acide aminé (Cystéine-C), CAA en CAG avec la Phénylalanine (F) puis une substitution du codon AAG en AAA avec toujours le même acide aminé (Lysine-K). Ces mutations ont été précédemment reportées dans une étude menée en 2016 par **Talundzie Eldin et al** au Sénégal sur l'épidémiologie des mutations de *P.falciparum* [6]. Et dans une autre étude menée sur les mutations du gène *PfK13* au Ghana [87]. La mutation aux positions 469, 613 et 503 n'est actuellement pas connue comme associées au retard de clairance

parasitaire, à la résistance aux CTAs. La 469 a été précédemment retrouvée au Ghana tandis que la mutation 503 a été retrouvée au Mali à Faladje [87]. Les 2 mutations obtenues à la position 469 étaient associées à un temps de clairance de 24 heures. Ceci pourrait confirmer le fait que cette mutation ne soit pas associée au retard de clairance parasitaire [87]. Toutefois, l'une des mutations à la position 613 a été retrouvée chez un patient ayant fait un échec thérapeutique.

Cependant, la position 493 connue pour son association au retard de clairance parasitaire en Asie du Sud-Est a montré trois (3) mutations transitoires lors de notre étude [18]. La présence des mutations transitoires à cette position pourrait être une preuve de la pression médicamenteuse engendrée par les CTAs qui sont largement utilisées actuellement. La mutation transitoire à la position 493 de *K13* a été précédemment obtenue en RDC et en Tanzanie [87]. Parmi les 3 mutations de la position 493, deux d'entre elles ont été retrouvées associées à un temps de clairance parasitaire de 48 heures pendant que la 3ème était associée à un temps de clairance retardé (72 heures). Cette dernière était aussi associée à une forte parasitémie comprise entre 150.000 et 200.000 Tf/ $\mu$ L de sang. Ces mutations même transitoires, pourraient être la preuve d'une pression médicamenteuse réelle. Aussi, deux mutations transitoires ont été obtenues aux positions 491 et 548. Parmi les mutations obtenues lors de cette étude, celle de la position **491 et 548 sont nouvelles en Afrique**. Ces dernières étaient respectivement la substitution du codon TTC en TTT (Phénylalanine-F) et la substitution de GGC en GGT (Glycine-G). Ces positions nécessitent donc des investigations plus poussées dans le but de pouvoir étudier leur association à la résistance aux artémisinines. La mutation non-silencieuse obtenue se trouvait au niveau de la position 578. Elle constituait en la substitution de l'acide aminé A (Alanine) par S (Serine). Cette position qui se trouve au voisinage de la position 580, n'est présentement pas connue comme associée à la résistance aux artémisinines. Elle a cependant été déjà identifiée dans beaucoup de pays de la sous-région comme le Ghana, le Sénégal, le Mali et de l'Afrique centrale et de l'est comme le Kenya, le Gabon la RDC [87–90]. Cette position, malgré qu'elle ne soit pas connue associée à la résistance aux artémisinines était associée à une forte parasitémie (entre 150.005 et 200.000Tf/  $\mu$ L de sang) et un temps de clairance parasitaire de 72 heures.

Après séquençage du gène *Pfmdr1* à la région 1, nous avons obtenu beaucoup de mutations transitoires. Des mutations transitoires ont été obtenues à la position 102. Cette position n'est pas encore connue comme associée à la résistance aux aminoquinoléines. Ceci pourrait expliquer pourquoi cette mutation a été retrouvée chez un patient ayant une faible parasitémie et ayant fait sa clairance parasitaire à 24 heures.



Parmi les mutations non-silencieuses obtenues, certaines sont déjà connues pour leur association à la résistance à certaines molécules comme l'Amodiaquine et la Luméfantrine [91]. La mutation **184F** a été la plus observée avec une fréquence de 24,3%. Une augmentation de la prévalence de la mutation **184F** a été observée dans une étude menée au Ghana par **Nancy O Duah et al** entre 2003 et 2010 sur l'augmentation du nombre de copy de *Pfmdr1* ainsi que sa résistance après le changement des antipaludiques utilisés. Les positions 86 et 184 de *mdr1* sont connues pour leur implication dans la résistance à la Luméfantrine [91]. Les mutations 86Y et 184F ont été retrouvées aux mêmes fréquences avant le traitement qu'après le traitement (figure 29, valeur de  $P > 0,99$ ). Ceci suggère que ces mutations sont bien établies dans la communauté où s'est tenue cette étude. Toutefois, celles retrouvées après le traitement peuvent être le résultat d'une sélection après un traitement à base de AL comme suggéré dans certaines études [14]. Aussi, beaucoup de mutations 184F (n=9) ont été retrouvées chez les patients ayant fait leur échec thérapeutique avant J28. Ces cas sont probablement des cas où les molécules partenaires des CTAs n'ont pas pu empêcher le développement d'une nouvelle infection.

Nous avons obtenu une mutation non-silencieuse à la position 1246 de *mdr1*. La mutation au niveau de la position 1246 de la région 2 de *mdr1* est aussi connue pour son implication dans les échecs thérapeutiques à base d'Amodiaquine [92]. Lors de cette étude, nous n'avons pas trouvé d'association entre cette dernière mutation et le temps de clairance parasitaire retardée.

Nous avons obtenu plusieurs mutations transitoires à la position 1069. Cette mutation silencieuse a été précédemment reportée dans une étude menée par Sidsel Nag et al en 2017 en Guinée-Bissau [93]. Cette mutation n'a pas encore été reportée comme associée à la résistance aux aminoquinoléines.

**CONCLUSION**  
**ET**  
**RECOMMENDATIONS**

## 7 CONCLUSION

Lors de cette étude nous avons trouvé des mutations connues comme associées à la résistance à certains aminoquinoléine comme l'Amodiaquine et la Luméfantrine, une prévalence de 21% des mutations 184F et 1,6% pour 86Y pourrait être due à la pression médicamenteuse engendrée par les CTAs. La présence de mutation transitoire sur le gène *Pfk13* à la position 493 en plus de son association à un retard de clairance parasitaire ainsi que la mutation 184F de *Pfmdr1* est une autre preuve que les parasites subissent une pression médicamenteuse par ces CTAs. L'identification de la mutation 578S au voisinage de 580 sur le gène *Pfk13* lors de notre étude et aussi dans des études précédentes menées en Afrique suggère de mener des études d'efficacité beaucoup plus poussées sur cette position en particulier et le gène *Pfk13* en général.

## 8 RECOMMANDATIONS

Au terme de cette étude, nous formulons les recommandations suivantes :

✓ **Aux décideurs de la santé :**

Il y a un besoin accru de formation et de développement de capacité dans ces méthodes d'évaluation de la chimiorésistance pour une bonne surveillance de ces molécules.

✓ **Aux LBMA et aux scientifiques Ouest-Africains:**

De continuer les tests d'efficacité des CTAs tout en se focalisant sur les mutations qui sont actuellement inconnues et associées à la résistance à ces antipaludiques dans la Région Afrique.

✓ **A la population**, une meilleure participation dans de telles études afin de faciliter la mise au point de mesures de protection efficiente contre le paludisme en Afrique.

✓ **Aux leaders (Politiques ; Communaux ; Religieux ; Coutumiers) et tous les facilitateurs**, une collaboration plus étroite afin d'avoir une lutte plus efficace contre le paludisme.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## 9 RÉFÉRENCES

1. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol* [Internet]. mai 2009;25(5):220-7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349210>
2. Sangare I. STUDY ON THE IN VITRO RESISTANCE OF PLASMODIUM FALCIPARUM TO ANTIMALARIAL DRUGS COUPLED WITH PFMDR1 MUTATION IN BOBODIOULASSO, BURKINA FASO. *Dakar Med* [Internet]. 1 janv 2011;56:294-302. Disponible sur: <https://www.researchgate.net/publication/261705109>
3. Paludisme [Internet]. World Health Organization. [cité 10 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
4. La lutte antivectorielle est le principal moyen de prévenir et de réduire la transmission du paludisme( articles de journaux) - Recherche Google [Internet]. [cité 13 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.ijisr.issr-journals.org/>
5. Kaur H, Allan EL, Mamadu I, Hall Z, Ibe O, El Sherbiny M, et al. Quality of Artemisinin-Based Combination Formulations for Malaria Treatment: Prevalence and Risk Factors for Poor Quality Medicines in Public Facilities and Private Sector Drug Outlets in Enugu, Nigeria. *PLoS ONE* [Internet]. 27 mai 2015;10(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4446036/>
6. Talundzic E, Ndiaye YD, Deme AB, Olsen C, Patel DS, Biliya S, et al. Molecular Epidemiology of Plasmodium falciparum kelch13 Mutations in Senegal Determined by Using Targeted Amplicon Deep Sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017;61(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328579/>
7. Mok S, Ashley EA, Ferreira PE, Zhu L, Lin Z, Yeo T, et al. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science* [Internet]. 23 janv 2015 [cité 23 juill 2018];347(6220):431-5. Disponible sur: <http://science.sciencemag.org/content/347/6220/431>
8. Torrentino-Madamet M, Fall B, Benoit N, Camara C, Amalvict R, Fall M, et al. Limited polymorphisms in k13 gene in Plasmodium falciparum isolates from Dakar, Senegal in

- 2012–2013. Malar J [Internet]. 4 déc 2014;13:472. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-472>
9. Ouattara A, Kone A, Adams M, Fofana B, Maiga AW, Hampton S, et al. Polymorphisms in the K13-Propeller Gene in Artemisinin-Susceptible Plasmodium falciparum Parasites from Bougoula-Hameau and Bandiagara, Mali. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 3 juin 2015 [cité 23 juill 2018];92(6):1202-6. Disponible sur: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.14-0605>
  10. Cooper RA, Conrad MD, Watson QD, Huezo SJ, Ninsiima H, Tumwebaze P, et al. Lack of Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum in Uganda Based on Parasitological and Molecular Assays. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 1 août 2015 [cité 23 juill 2018];59(8):5061-4. Disponible sur: <http://aac.asm.org/content/59/8/5061>
  11. Scopus preview - Scopus - Welcome to Scopus [Internet]. [cité 23 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.scopus.com/home.uri>
  12. DIARRA Y. ETUDE D'EFFICACITE DES ANTIPALUDIQUES: CAS DE L'ARTEMETHER-LUMEFANTRINE ET LA CHLOROQUINE DANS LA COMMUNE RURALE DE DIORO [Internet] [Thèse de Pharmacie]. [Bamako]: USTTB; 2016 [cité 5 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.kenya.net/fmpos/theses/2016/pharma/pdf/16P05.pdf>
  13. Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnädig N, Uhlemann A-C, et al. Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate Plasmodium falciparum susceptibility to artemisinin-based combination therapies. Nat Commun [Internet]. 18 mai 2016 [cité 13 juill 2018];7:11553. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/ncomms11553>
  14. Baliraine FN, Rosenthal PJ. Prolonged Selection of pfmdr1 Polymorphisms After Treatment of Falciparum Malaria With Artemether-Lumefantrine in Uganda. J Infect Dis [Internet]. 1 oct 2011 [cité 11 juill 2018];204(7):1120-4. Disponible sur: <https://academic.oup.com/jid/article/204/7/1120/810569>
  15. Baraka V, Tinto H, Valea I, Fitzhenry R, Delgado-Ratto C, Mbonye MK, et al. In Vivo Selection of Plasmodium falciparum Pfert and Pfmdr1 Variants by Artemether-

- Lumefantrine and Dihydroartemisinin-Piperaquine in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1 janv 2015 [cité 23 juill 2018];59(1):734-7. Disponible sur: <http://aac.asm.org/content/59/1/734>
16. Eyase FL, Akala HM, Ingasia L, Cheruiyot A, Omondi A, Okudo C, et al. The Role of Pfmdr1 and Pfert in Changing Chloroquine, Amodiaquine, Mefloquine and Lumefantrine Susceptibility in Western-Kenya *P. falciparum* Samples during 2008–2011. *PLOS ONE* [Internet]. mai 2013 [cité 23 juill 2018];8(5):e64299. Disponible sur: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064299>
  17. Holmgren G, Hamrin J, Svärd J, Mårtensson A, Gil JP, Björkman A. Selection of pfmdr1 mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa. *Infect Genet Evol* [Internet]. 1 sept 2007;7(5):562-9. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156713480700041X>
  18. Chenet SM, Akinyi Okoth S, Huber CS, Chandrabose J, Lucchi NW, Talundzic E, et al. Independent Emergence of the Plasmodium falciparum Kelch Propeller Domain Mutant Allele C580Y in Guyana. *J Infect Dis* [Internet]. 1 mai 2016;213(9):1472-5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26690347>
  19. Laveran A. *Traité du paludisme* [Internet]. Masson; 1907. 646 p. Disponible sur: [https://books.google.ml/books/about/Trait%C3%A9\\_du\\_paludisme.html?id=r89wAAA-AIAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.ml/books/about/Trait%C3%A9_du_paludisme.html?id=r89wAAA-AIAAJ&redir_esc=y)
  20. Petithory J-C. A propos de la découverte de l'hématozoaire du paludisme par A. Laveran Bône 1878-Constantine 1880. *Hist Sci Méd* [Internet]. 1995;29:57–61. Disponible sur: <http://www.biusante.parisdescartes.fr/sfhm/hsm/HSMx1995x029x001/HSMx1995x029x001x0057.pdf>
  21. Webb JLA. Malaria and the Peopling of Early Tropical Africa. *J World Hist* [Internet]. 2005;16(3):269-91. Disponible sur: <http://www.jstor.org/stable/20079330>
  22. Fantini B. The concept of specificity and the Italian contribution to the discovery of the malaria transmission cycle. *Parassitologia* [Internet]. sept 1999 [cité 20 juin 2018];41(1-3):39-47. Disponible sur: <http://europepmc.org/abstract/MED/10697832>

23. SANOGO K. TOLERANCE ET EFFICACITE DE LA PRIMAQUINE A FAIBLE DOSE UNIQUE COMBINEE AVEC LA DIHYDROARTEMISININE-PIPERAQUINE SUR LA TRANSMISSION DU PALUDISME A *P. falciparum* CHEZ LES ENFANTS ET LES ADULTES DE SEXE MASCULIN NON DEFICITAIRES EN G6PD A OUELESSEBOUGOU, MALI. [Internet] [thèse de medecine]. [Bamako]: USTTB; 2015. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2015/med/pdf/15M334.pdf>
24. Dicko A, Sagara I, Diemert D, Sogoba M, Niambele MB, Dao A, et al. Year-to-year variation in the age-specific incidence of clinical malaria in two potential vaccine testing sites in Mali with different levels of malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2007;77(6):1028–1033. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18165516>
25. Doumbo O. Epidémiologie du paludisme au Mali : étude de la chloroquinorésistance, essai de stratégie de contrôle basée sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associée au traitement systématique des accès fébriles [Internet]. Montpellier 2; 1992 [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/1992MON20039>
26. Barry A. morbidité palustre dans deux localité du cercle de Kolokani: Nossombougou et Didiéni [Internet] [thèse de medecine]. [Bamako]: FMPOS; 2009 [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2009/med/pdf/09M431.pdf>
27. Mamady K. LA PRÉVALENCE DU PALUDISME SUR GROSSESSE DANS LE DISTRICT DE BAMAKO [Internet]. [Bamako]: USTTB; 2015 [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2015/med/pdf/15M57.pdf>
28. Guide Pratique de Lutte contre le Paludisme en Entreprise [Internet]. calameo.com. [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.calameo.com/read/000236343f640efb30a48>
29. Prevention C-C for DC and. CDC - Malaria - About Malaria - Biology [Internet]. 2018 [cité 28 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
30. Memoire Online - Activités larvicides des extraits de plantes sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaires - Meryem ALAOUI BOUKHRIS [Internet]. Memoire Online. [cité 21 juin 2018]. Disponible sur:



<https://www.memoireonline.com/04/12/5696/Activites-larvicides-des-extraits-de-plantes-sur-les-larves-de-moustiques-vecteurs-de-maladies-para.html>

31. Alhousseini M-L. Impact du traitement préventif intermittent sur le paludisme chez les enfants dormant sous des moustiquaires imprégnées d'Insecticide à Siby, Cercle de Kati, Mali. [Internet] [thèse de médecine]. [Bamako]: USTTB; 2011 [cité 14 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2011/med/pdf/11M05.pdf>
32. Koné CO. ETUDE DE LA TRANSMISSION ET POTENTIEL INFECTIEUX DES PORTEURS DE GAMETOCYTES AVANT ET APRES TRAITEMENT DU PALUSTRE SIMPLE AVEC LES CTAs A BOUGOULA HAMEAU (REGION DE SIKASSO) [Internet] [Thèse de Pharmacie]. [Bamako]: USTTB; 2007 [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2007/pharma/pdf/07P35.pdf>
33. Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, DaSilva AJ, et al. Molecular Diagnosis of Malaria by Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Primers: PET-PCR. PLOS ONE [Internet]. févr 2013 [cité 23 juill 2018];8(2):e56677. Disponible sur: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056677>
34. Lucchi NW, Karell MA, Journel I, Rogier E, Goldman I, Ljolje D, et al. PET-PCR method for the molecular detection of malaria parasites in a national malaria surveillance study in Haiti, 2011. Malar J [Internet]. 26 nov 2014;13:462. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-462>
35. Santos Souza S, L'Episcopia M, Severini C, Udhayakumar V, Lucchi NW. PET-PCR for Detection of *Plasmodium falciparum* *Plasmepsin 2* G ene copy number. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 4 juin 2018;AAC.00317-18. Disponible sur: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00317-18>
36. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck H-P, Snounou G, et al. Plasmodium falciparum msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. Malar J [Internet]. 6 avr 2011;10:79. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-79>

37. Felger I, Smith T, Edoh D, Kitua A, Alonso P, Tanner M, et al. Multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* févr 1999;93 Suppl 1:29-34.
38. Snounou G, Zhu X, Siripoon N, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, et al. Biased distribution of *m*sp1 and *m*sp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* août 1999;93(4):369-74.
39. Peyerl-Hoffmann G, Jelinek T, Kilian A, Kabagambe G, Metzger WG, Sonnenburg FV. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. *Trop Med Int Health* [Internet]. 6(8):607-13. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3156.2001.00761.x>
40. Magesa SM, Mdira KY, Farnert A, Simonsen PE, Bygbjerg IC, Jakobsen PH. Distinguishing *Plasmodium falciparum* treatment failures from re-infections by using polymerase chain reaction genotyping in a holoendemic area in northeastern Tanzania. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. nov 2001;65(5):477-83. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716101?dopt=Abstract>
41. Pubchem. Artemisinin [Internet]. [cité 8 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68827>
42. Pubchem. Artemether [Internet]. [cité 8 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68911>
43. Pubchem. Artesunate [Internet]. [cité 8 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6917864>
44. Pubchem. Dapsone [Internet]. [cité 3 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2955>
45. Pubchem. Sulfadoxine [Internet]. [cité 3 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17134>
46. Pubchem. Proguanil [Internet]. [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6178111>

47. Pubchem. Chlorproguanil [Internet]. [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9571037>
48. Poirot E, Vittinghoff E, Ishengoma D, Alifrangis M, Carneiro I, Hashim R, et al. Risks of Hemolysis in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficient Infants Exposed to Chlorproguanil-Dapsone, Mefloquine and Sulfadoxine-Pyrimethamine as Part of Intermittent Presumptive Treatment of Malaria in Infants. PLOS ONE [Internet]. 23 nov 2015 [cité 3 juill 2018];10(11):e0142414. Disponible sur: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0142414>
49. Pubchem. Pyrimethamine [Internet]. [cité 3 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4993>
50. USP Monographs: Atovaquone [Internet]. [cité 30 juin 2018]. Disponible sur: [http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_m6342.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m6342.html)
51. Pubchem. Quinine [Internet]. [cité 4 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3034034>
52. Pubchem. Mefloquine [Internet]. [cité 4 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40692>
53. Pubchem. Halofantrine [Internet]. [cité 4 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37393>
54. Pubchem. Lumefantrine [Internet]. [cité 4 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6437380>
55. Pubchem. Tafenoquine [Internet]. [cité 4 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/115358>
56. Marcisin SR, Sousa JC, Reichard GA, Caridha D, Zeng Q, Roncal N, et al. Tafenoquine and NPC-1161B require CYP 2D metabolism for anti-malarial activity: implications for the 8-aminoquinoline class of anti-malarial compounds. Malar J [Internet]. 3 janv 2014;13:2. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3893421/>
57. Richards WHG. Use of Avian Malarias (In Vivo). In: Peters W, Richards WHG, éditeurs. Antimalarial Drugs I [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg;

1984. p. 207-24. Disponible sur: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-69251-2\\_7](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-69251-2_7)
58. Pubchem. Primaquine [Internet]. [cité 14 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4908>
59. Pubchem. Pamaquine [Internet]. [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10290>
60. Pubchem. Chloroquine [Internet]. [cité 6 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2719>
61. Prophylaxie anti-paludéenne - Smartfiches [Internet]. Smartfiches médecine. [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <http://smartfiches.fr/infectiologie/item-166-paludisme/prophylaxie-paludisme>
62. Pubchem. Amodiaquine [Internet]. [cité 6 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2165>
63. Pubchem. Pyronaridine [Internet]. [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5485198>
64. Pubchem. Piperaquine [Internet]. [cité 6 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/122262>
65. Pubchem. Azithromycin [Internet]. [cité 7 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447043>
66. Pubchem. Clindamycin [Internet]. [cité 7 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/29029>
67. Pubchem. Doxycycline [Internet]. [cité 7 juill 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54671203>
68. OMS. WHO\_TRS\_529\_fre.pdf [Internet]. GENEVE; 128apr. J.-C. [cité 11 juill 2018]. Report No.: 529. Disponible sur: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38673/WHO\\_TRS\\_529\\_fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38673/WHO_TRS_529_fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

69. Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science [Internet]. 15 avr 1994;264(5157):388-93. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8153626>
70. Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pagès J-M. Detection and Prevalence of Active Drug Efflux Mechanism in Various Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Turkey. J Clin Microbiol [Internet]. juin 2004;42(6):2701-6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC427859/>
71. OMS. OMS | Nouvelles directives de traitement antipaludique et guide d'achat de médicaments [Internet]. WHO. [cité 7 juin 2018]. Disponible sur: [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/malaria\\_20100308/fr/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/malaria_20100308/fr/)
72. Patel SK, George L-B, Prasanth Kumar S, Highland HN, Jasrai YT, Pandya HA, et al. A Computational Approach towards the Understanding of Plasmodium falciparum Multidrug Resistance Protein 1 [Internet]. International Scholarly Research Notices. 2013 [cité 23 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/437168/>
73. Paloque L, Ramadani AP, Mercereau-Puijalon O, Augereau J-M, Benoit-Vical F. Plasmodium falciparum: multifaceted resistance to artemisinins. Malar J [Internet]. 9 mars 2016;15:149. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1206-9>
74. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. N Engl J Med [Internet]. 11 déc 2008;359(24):2619-20. Disponible sur: <https://doi.org/10.1056/NEJMc0805011>
75. Artemisinin Molecular Surveyor [Internet]. [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.wwarn.org/molecular/surveyor/k13/index.html?t=201505211240#0>
76. ACT Partner Drug Molecular Surveyor [Internet]. [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.wwarn.org/molecular/surveyor/#0>
77. AHAKOUD M. le séquençage d'acide desoxyribonucléique: Principe [Internet]. [MAROC]: SIDI MOHAMMED BEN ABDALLAH; 2015 [cité 7 juin 2018]. Disponible sur: [http://scolarite.fmp-usmba.ac.ma/cdim/mediatheque/e\\_theses/67-15.pdf](http://scolarite.fmp-usmba.ac.ma/cdim/mediatheque/e_theses/67-15.pdf)

78. IGM | Institut Géographique du Mali [Internet]. [cité 10 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.igm-mali.ml/>
79. Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ*. 1988;66(5):621.
80. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* [Internet]. 15 juin 2012;28(12):1647-9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3371832/>
81. Mei JV, Zobel SD, Hall EM, De Jesús VR, Adam BW, Hannon WH. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. *Bioanalysis* [Internet]. août 2010 [cité 14 juill 2018];2(8):1397-403. Disponible sur: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.10.73>
82. Worldwide Antimalarial Resistance Network. (2010). Filter paper preparation v1.0 (SOP ID: MOL03/CLIN06). Worldwide Antimalarial Resistance Network (WWARN) - Recherche Google [Internet]. [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: [www.wwarn.org/sites/.../ext02-dna-extraction-by-chelex-v1.1.doc](http://www.wwarn.org/sites/.../ext02-dna-extraction-by-chelex-v1.1.doc)
83. Pillai S, Gopalan V, Lam AK-Y. Review of sequencing platforms and their applications in pheochromocytoma and paragangliomas. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. août 2017 [cité 11 juill 2018];116:58-67. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842817300665>
84. Ihle MA, Fassunke J, König K, Grünwald I, Schlaak M, Kreuzberg N, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer* [Internet]. 10 janv 2014;14:13. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-13>
85. Maiga AW, Fofana B, Sagara I, Dembele D, Dara A, Traore OB, et al. No evidence of delayed parasite clearance after oral artesunate treatment of uncomplicated falciparum malaria in Mali. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. juill 2012;87(1):23-8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22764287>

86. White N. The parasite clearance curve. *Malar J* [Internet]. 22 sept 2011;10:278. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-278>
87. Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, et al. K13-Propeller Polymorphisms in Plasmodium falciparum Parasites From Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis* [Internet]. 15 avr 2015 [cité 8 juin 2018];211(8):1352-5. Disponible sur: <https://academic.oup.com/jid/article/211/8/1352/916350>
88. Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, et al. Absence of Putative Artemisinin Resistance Mutations Among Plasmodium falciparum in Sub-Saharan Africa: A Molecular Epidemiologic Study. *J Infect Dis* [Internet]. 1 mars 2015 [cité 8 juin 2018];211(5):680-8. Disponible sur: <https://academic.oup.com/jid/article/211/5/680/2918011>
89. Project MP falciparum C. Genomic epidemiology of artemisinin resistant malaria. *eLife* [Internet]. 4 mars 2016 [cité 8 juin 2018];5:e08714. Disponible sur: <https://elifesciences.org/articles/08714>
90. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, et al. A Worldwide Map of Plasmodium falciparum K13-Propeller Polymorphisms. *N Engl J Med* [Internet]. 23 juin 2016;374(25):2453-64. Disponible sur: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1513137>
91. Duah NO, Mtrevi SA, de Souza DK, Binnah DD, Tamakloe MM, Opoku VS, et al. Increased pfmdr1 gene copy number and the decline in pfprt and pfmdr1 resistance alleles in Ghanaian Plasmodium falciparum isolates after the change of anti-malarial drug treatment policy. *Malar J* [Internet]. 30 oct 2013;12:377. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-377>
92. Childs RA, Miao J, Gowda C, Cui L. An alternative protocol for Plasmodium falciparum culture synchronization and a new method for synchrony confirmation. *Malar J* [Internet]. 2013;12(1):386. Disponible sur: <http://www.malariajournal.com/content/12/1/386>
93. Nag S, Dalgaard MD, Kofoed P-E, Ursing J, Crespo M, Andersen LO, et al. High throughput resistance profiling of Plasmodium falciparum infections based on custom

dual indexing and Illumina next generation sequencing-technology. Sci Rep [Internet]. 25 mai 2017 [cité 11 juill 2018];7(1):2398. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-02724-x>



# **ANNEXES**

## 10 ANNEXES

### FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom :** HAIDARA

**Prénom :** Zakaria

**Tel :** (00223)-98005128      **E-mail :** [zaka99t@gmail.com](mailto:zaka99t@gmail.com)

**Titre de la thèse :** Prévalence des marqueurs de résistance sur les gènes *Pfmdr1* et *PfK13* dans la localité de Sélingué en 2016

**Nationalité :** Malienne

**Année Universitaire :** 2017-2018

**Ville de soutenance :** Bamako-Mali

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

**Secteur d'intérêt :** Parasitologie Moléculaire, Santé publique, Pharmacologie.

### RESUME

Malgré les efforts consentis par différents acteurs, le paludisme reste encore de nos jours un problème majeur de santé publique dans le monde. Le but de notre étude était d'évaluer la prévalence des marqueurs de résistance sur les gènes *Pfmdr1* et *Pfk13* chez les enfants de 06 à 59 mois dans la localité de Sélingué en 2016. Il s'agissait d'une étude prospective randomisée double aveugle, ouverte à deux bras (ASAQ de la firme pharmaceutique DENK et Coartem de NOVARTIS). Un groupe recevait l'ASAQ (artesunate+amodiaquine) et l'autre Coartem® (artéméther+luméfantrine) selon un code bien établi. Au total 309 enfants ont été inclus dans l'étude et tous avaient une parasitémie comprise entre 2000 et 199.999 parasites par microlitre de sang. La confirmation de l'accès palustre a été faite par la PET-PCR et la détection des mutations sur les gènes *Pfk13* et *Pfmdr1* a été effectuée sur des confettis et ceci par séquençage (Sanger sequencing). Après séquençage du domaine *Propeller* du gène *Pfk13*, nous avons obtenu des mutations transitoires et non-silencieuses. Pour les positions 469, 613 et 503 les mutations obtenues étaient silencieuses et ne sont actuellement pas connues comme

associées au retard de clairance parasitaire, à la résistance aux CTAs. Nous avons également trouvé trois (3) mutations transitoires lors de notre étude à la position **493 (493Y)**, qui pourrait être une preuve de la pression médicamenteuse engendrée par les CTAs qui sont largement utilisées actuellement. Nous avons aussi trouvé deux mutations qui sont nouvelles en Afrique, il s'agit des positions **491** et **548**. La mutation non-silencieuse obtenue se trouvait au niveau de la position 578 (578S). Après séquençage du gène *Pfmdr1* à la région 1, nous avons obtenu beaucoup de mutations transitoires parmi lesquelles, la position 1069, la position 184, la position 86 et la position 102. La mutation transitoire obtenue à la position 102 n'est pas encore connue comme associée à la résistance aux aminoquinoléines. Nous avons également trouvé une mutation non-silencieuse à la position **1246**. La mutation **184F** a été la plus observée avec une fréquence de **21%**. Les mutations **86Y** et **184F** ont été retrouvées aux mêmes fréquences avant le traitement qu'après le traitement antipaludique. Malgré l'efficacité des molécules antipaludiques l'augmentation de la fréquence des mutations interpelle le monde scientifique sur l'amélioration de ces molécules ou leurs conditions d'utilisation.

**Mots clés :** *Plasmodium falciparum*, *Pfmdr1*, *Pfk13*, mutation, CTAs, PET-PCR, séquençage et Sélingué

**IDENTIFICATION SHEET****Last Name:** HAIDARA**First Name:** Zakaria**Tel:** (00223)-98005128**E-mail:** [zaka99t@gmail.com](mailto:zaka99t@gmail.com)**Title:** Prevalence of resistance markers on the *Pfmdr1* and *Pfk13* genes in the locality of Sélingué in 2016.**Academic Year:** 2017-2018**City of defense:** Bamako-Mali**Place of deposit:** Library of Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology**Focus area:** Molecular Parasitology, Public Health, Pharmacology.**ABSTRACT**

Despite the efforts of different actors, malaria is still a major public health problem in the world. The aim of our study was to evaluate the prevalence of resistance markers on the *Pfmdr1* and *Pfk13* genes in children from 06 to 59 months in the locality of Sélingué in 2016. It was a prospective randomized double-blind study, open to two arms (ASAQ of the pharmaceutical firm DENK and Coartem of NOVARTIS). One group received ASAQ (artesunate + amodiaquine) and the other Coartem® (artéméther + luméfantrine) according to a well-established randomized code. A total of 309 children were included in the study and all had parasitemia ranging from 2000 to 199,999 parasites per microliter of blood. The confirmation of malaria access was made by PET-PCR and the detection of mutations on the *Pfk13* and *Pfmdr1* genes was performed using dried blood spot by sequencing (Sanger sequencing). After sequencing the Propeller domain of the *Pfk13* gene, we obtained transient and non-silent mutations. For positions 469, 613 and 503 the mutations obtained were silent and are not currently known to be associated with delayed parasite clearance, resistance to CTAs. We also found three (3) transient mutations in our study at position 493 (493Y), which could be the evidence of the drug pressure generated by ACTs that are widely used today. We also found two mutations that are new in Africa; these are positions 491 and 548. The non-silent mutation obtained was at position 578 (578S). After sequencing of the *Pfmdr1* gene at region 1, we obtained many transient mutations including positions 1069, 184, position 86 and position 102. The transient mutation obtained at position 102 is not yet known. as associated

with resistance to aminoquinolines. We also found a non-silent mutation at position 1246. The 184F mutation was the most observed with a frequency of 21%. Mutations 86Y and 184F were found at the same frequencies before treatment as after antimalarial treatment. Despite the effectiveness of antimalarial drugs, the increase in the frequency of mutations challenges the scientific world on the improvement of these molecules or their conditions of use.

**Keywords:** *Plasmodium falciparum*, *Pfmdr1*, *Pfk13*, mutation, ACTs, PET-PCR, sequencing and Sélingué

## SERMENT DE GALIEN



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens, et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement,

D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine,

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels,

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses,

Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque!

Je le jure!