

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° 082 /

**Test d'efficacité de la Combinaison Thérapeutique Artémether plus Luméfantrine dans la Commune Rurale de Dioro : Prévalence des mutations sur les gènes *Pfmdr1* et *PfK13* chez les parasites isolés lors des échecs thérapeutiques**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le 25/07/2018 devant la faculté de pharmacie pour obtenir le

Grade de

**DOCTEUR EN PHARMACIE**

**(DIPLOME D'ETAT)**

Par

**Mr Abdoul Karim DIALLO**

**JURY**

**Président du jury :** Professeur Guimogo DOLO

**Membres :** Docteur Tinzana COULIBALY

Docteur Youssouf DIARRA

**Co-directeur de thèse :** Professeur Lansana SANGARE

**Directeur de thèse:** Professeur Ousmane KOITA

**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
M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Boukassoum	H Aidara	Législation
M. Moussa	Feu 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	Parasitologie-Mycologie
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**

M. 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
Mme. Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
M. Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
M. Seydina S.A.	DIAKITE	Immunologie
M. Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
M. Kassoum	KAYENTAO	Santé Publique Biostatistiques
Mme. Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
M. Birama Apho	LY	Santé Publique
M. Dinkorma	OUOLOGUEM	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	DIWARA	Epidémiologie
Mme. Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Epidémiologie
M. Falaye	KEÏTA	Santé Publique/Santé Environnement.
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**

**MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE**

M. Loseni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
M. Bakary Moussa	CISSE	Galénique
M. Yaya	COULIBALY	Législation
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M. Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
M. Hama Boubacar	MAÏGA	Galénique
M. Moussa	SANOGO	Gestion
Mme. Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

**ASSISTANTS/ATTACHE 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/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

M. Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
M. Bénéoit Yaranga	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
M. Hamadoune 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**

M. Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
M. Modibo	DIALLO	Génétique
M. Moussa	KONE	Chimie Organique
M. 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**

## DEDICACES

Je rends grâce à DIEU Tout Puissant et à son bien-aimé et prophète Muhammad (paix et salut de Dieu soit sur lui) qui nous a prêté la vie et la santé pour réaliser ce travail.

Je dédie ce travail à mon père Drissa DIALLO. Papa je ne saurai trouver les mots justes pour t'exprimer ma gratitude. Ta patience et ton soutien ne m'ont jamais fait défaut. Merci pour l'éducation que tu m'as inculqué, elle n'a pas été vaine. Ta rigueur dans le travail et les énormes sacrifices consentis à mon endroit ont donné ce modeste travail que je t'offre. Merci, je te serai infiniment reconnaissant et que le Seigneur puisse te prêter longue vie.

## REMERCIEMENT

Mes remerciements s'adressent :

### **Au TOUT PUISSANT, LE TOUT MISERICORDIEUX, LE TRES MISERICORDIEUX**

- A mes mères, Aissetou DIARRA et Djeneba SANGARE de m'avoir offert l'amour maternel. Chères mamans, vous m'avez assuré un climat maternel sublime qui m'a permis d'atteindre ce niveau. Vous m'avez fait un prêt en assumant irréfutablement votre rôle de mamans que je ne pourrai jamais vous rembourser. Puisse Dieu vous le payer, vous donner une bonne santé et une longue vie à nos côtés.

- A mes oncles et tantes.

Vous avez su activer en moi le goût des études. Si ce travail est une réussite, je le dois à vos conseils, votre soutien et vos encouragements. Permettez-moi chers tantes et oncles de vous exprimer tous mes remerciements pour vos grands appuis et toutes vos prières. Recevez toutes ma reconnaissance. Que Dieu bénisse vous et vos familles.

- A mon cousin Oumar SANGARE et à ma sœur aînée, Fatoumata DIALLO pour leur soutien social et moral.

Cher cousin et chère sœur, c'est à vous que je dois la réussite de mes études universitaires. Soyez rassurés de ma sincère reconnaissance, de ma soumission infinie et de mon entière disponibilité. Que Dieu vous accorde la bonne santé et la longue vie aux côtés de vos charmants enfants.

- A l'ensemble de mes frères et sœurs pour leurs conseils et soutiens.

C'est avec vous que je partage la réussite de ce travail. Veuillez croire à mon attachement fraternel très profond. Puisse Dieu nous accorder une bonne santé et une longue vie pour vivre ensemble dans l'entente et la cohésion.

- A mes camarades de promotion,

J'aimerais rappeler tant de joie et de tristesse partagées ensemble, mais aussi tant d'élan et de familiarité dans le soutien.

Puissions-nous pérenniser cette forte solidarité.

- A tout le personnel du LBMA, ce travail est le fruit de votre soutien technique et moral. Trouvez ici l'expression de toute ma profonde gratitude.

A tout le personnel du CSCOM de Dioro pour leur hospitalité profonde et sans pareil surtout pendant la période de cette étude.

A toute la population de Dioro pour leur franche coopération à la réalisation de cette étude.

Aux élus locaux, chefs des quartiers, Imams et membres de l'ASACO de nous avoir accompagné surtout pendant les moments distingués.

- A Docteur Lassina DOUMBIA et Mr.Ibrahim KEITA, Vos encouragements et vos soutiens au moment distingué n'ont pas été vains. Que DIEU vous bénisse.

- A Professeur Lansana SANGARE

Vous nous avez guidé dans la conception et l'élaboration du protocole de ce travail. Nous avons su apprécier votre disponibilité, votre humanisme, et surtout votre attachement profond au travail bien fait. Chers maîtres merci ; ce travail est aussi le vôtre et nous pensons qu'il répondra à vos attentes.

**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, Consultant du Programme Santé de "Eartch Institut" de l'Université de Columbia;**
- **Assistant technique des PNLP en Afrique de l'Ouest et du Centre et conseiller du ministère de la Santé du Mali;**
- **Expert du paludisme avec les PNLP et les villages du millénaire en Afrique de l'Ouest et du Centre.**

Permettez-nous de vous remercier pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de notre travail.

Nous avons admiré vos qualités scientifiques, pédagogiques et humaines tout le long de notre formation.

Votre modestie et votre caractère scientifique élevé font de vous un maître exemplaire.

Veillez accepter Cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance.

### A notre Maître et Juge

#### Docteur Tinzana COULIBALY

- **Docteur en médecine générale;**
- **Spécialiste en santé publique;**
- **Ancien expert en santé publique du projet des villages du millénaire dans les communes rurales de DIORO et de Farakoumassa dans le cercle de Ségou;**
- **Ancien expert en santé publique des programmes de santé de l'OMS au Rwanda et du HCR en RDC et du Congo;**
- **Ancien collaborateur du LBMA.**

Cher maître.

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Votre disponibilité, votre humanisme et votre modestie forcent le respect et incitent l'admiration.

Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde gratitude.

**A notre Maître et Juge**

**Docteur Youssouf DIARRA**

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

Nous sommes très honorés par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de participer à ce jury de thèse.

Votre simplicité, votre disponibilité pour nous les étudiants font de vous un homme aux qualités humaines exceptionnelles. Cher Maître, croyez à nos sincères remerciements.

**A notre Maître et Co-directeur de thèse.**

**Professeur Lansana SANGARE**

- **Maître de conférences de Parasitologie à la FST;**
- **Chargé des cours de biologie moléculaire au département de biologie à la FST;**
- **Chef de l'unité de Parasitologie au LBMA.**

Cher maître,

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de co-diriger ce travail malgré vos multiples occupations nous a réconfortés. Votre simplicité, votre disponibilité et votre courage ont forcé notre admiration. Vous avez conduit de main de maître ce travail. Puisse-t-il répondre à vos attentes ?

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

**Professeur Ousmane KOITA**

- **Pharmacien Biologiste;**
- **Professeur Titulaire de parasitologie moléculaire;**
- **Chargé de cours de biologie moléculaire 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 de la FST.**

Cher maître,

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez accordée en nous proposant ce travail. Nous avons vite apprécié vos qualités scientifiques, humaines et surtout votre amour pour le travail bien fait. Ces qualités couplées à votre simplicité et votre générosité font de

vous un maître exemplaire. Nous avons parfait notre sens de la patience et de l'esprit d'équipe qui sont indispensables dans la recherche.

Nous sommes très honorés d'être parmi vos élèves.

Recevez par ce travail l'expression de notre admiration et de notre profonde gratitude.

## LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

**ATP:** adenosine triphosphate

**ATM:** Artemether

**AS:** Artesunate

**AQ:** Amodiaquine

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**ARN:** acide ribonucléique

**CSCoM:** centre de santé communautaire

**CTA:** combinaison thérapeutique à base d'Artemisinine

**C:** cysteine

**CI50:** concentration inhibitrice 50

**CDC:** Centres de Contrôle des Maladies (**Centers for Disease Control** and Prevention

°C: degré celsius)

**CYP3A4:** Cytochrome 3A4

**CYP2C19:** Cytochrome 2C19

**CYP2D6:** Cytochrome 2D6

**CQ:** Chloroquine

**DER:** Département de l'Enseignement et de la Recherche

**D:** Acide aspartique

**DHA:** Dihydroartemisinine

**DHODH:** Dihydroorotate deshydrogenase

**DHFR:** Dihydrofolate reductase

**DHPS:** Dihydropteroase synthetase

**DEET:** Diethyl Toluamide

**dl:** decilitre

**dNTPs:** deoxynucleotide triphosphates

**DNW:** Deep n-Well (Structure profonde de n puits)

**ELISA:** dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

**ER:** réticulum endoplasmique

**EDTA:** Éthylènediaminetétraacétique

**ELISA:** dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

**Exo:** exonuclease

**F:** Phenylalanine



**FDC:** Formes Dispersibles Combinées

**FRET:** Fluorescence Resonance Energy Transfer

**G:** Glycine

**G6PD:** Glucose-6-Phosphate Déhydrogénase

**GLURP:** Glutamate Rich Protein

**Hb:** hémoglobine

**HCR:** Haut Commissariat des Nations unies pour les réfugiés

**HiDi:** highly deionized (hautement désionisé)

**HF:** Haute-Fidélité

**HbF:** hémoglobine fœtale

**HRP2:** histidin riche proteine 2

**ICEMR:** International Centers of Excellence for Malaria Research

**IP:** indice plasmodique

**IM:** intramusculaire

**IV:** intraveineuse

**IGM:** Institut Géographique du Mali

**IFI:** immunofluorescence indirecte

**INRSP:** Institut National de Recherche en Santé Publique

**JC:** Jésus Christ

**J:** jour

**Kg:** kilogramme

**kDA:** kilodalton

**KEAP1:** *Kelch-like ECH-associated protein 1*

**Km:** kilomètre

**LMF:** Lumefantrine

**LBMA:** laboratoire de biologie moléculaire appliquée

**MFQ:** Mefloquine

**MIILDA:** Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action

**MSP1:** Merozoite Surface Protein-1

**mM:** millimole

**Min:** minute

**NIAID:** Institut national des allergies et des maladies infectieuses

**N:** Asparagine

**Nrf2:** facteur nucléaire lié au facteur érythroïde-2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2)

**NIH:** National Institutes of Health

**OMS:** Organisation mondiale de la santé

***Pfmdr1*** : *Plasmodium falciparum* multidrogue résistant

***PfK13***: *Plasmodium falciparum* domaine propeller kelch 13

**P** : proline

**PVM** : projet des villages du millénaire

**PPQ:** Piperaquine

**PDR:** République démocratique populaire

**Pgh1:** P-glycoprotein homologue 1

**Pan-LDH:** *Plasmodium falciparum* lactate deshydrogenase

**PCR:** Polymerase chain reaction

***PfCRT***: *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter

***PfATPase6***: *Plasmodium falciparum* adenosine triphosphatase 6

***PfDHPS***: *Plasmodium falciparum* dihydropteroase synthetase

***PfDHFR***: *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase

***PfCytb***: *Plasmodium falciparum* cytochrome b

**PI3K:** Phosphatidylinositol-3-kinase

**Pb:** paire de base

**PABA:** Acide para-amino-benzoïque

**PNLP:** Politique nationale de lutte contre le paludisme

**QBC:** Quantitative buffy coat

**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism

**RAPD:** Random Amplified Polymorphic DNA

**Rpm:** Révolutions par minute

**RSA0-3h:** Essais de survie du stade en anneau (Ring-stage Survival Assays)

**SEREF0:** Centre de Recherche et de Formation sur le VIH/Sida et la Tuberculose

**S:** serine

**SAP:** phosphatase alcaline

**SP:** sulfadoxine pyriméthamine

**SNP:** single nucleotide polymorphism

**T1/2** : Temps de demi-vie

**TDR:** Test diagnostique rapide

**VNTR:** Nombre variable de répétitions en tandem

**UPR:** réponse protéique mal repliée (unfolded protein response)

**μl:** microlitre

**UV:** ultraviolet

**UK:** United kingdom (Royaume uni)

**Y:** tyrosine

## Liste des figures

Figure 1: Répartition du paludisme dans le monde .....	7
Figure 2: La protéine Pgh1 de <i>P. falciparum</i> . Acides aminés polymorphes sont indiqués .....	8
Figure 3: Répartition des mutations sur le gène <i>Pfk13</i> dans le monde en 2013.....	9
Figure 4: Répartition des mutations sur le gène <i>Pfmdr1</i> dans le monde en 2013.....	10
Figure 5: Répartition des mutations <i>PfK13</i> en Afrique de l'Ouest en 2013 .....	12
Figure 6: Répartition des mutations <i>Pfmdr1</i> en Afrique de l'Ouest en 2013.....	13
Figure 7: Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'homme et le moustique .....	21
Figure 8: Voies métaboliques ou cibles des antipaludiques.....	24
Figure 9: Structure chimique de la quinine .....	25
Figure 10: Structure chimique de la Mefloquine .....	26
Figure 11: Structure chimique de l'Amodiaquine.....	27
Figure 12: Structure chimique de l'Artémisinine .....	28
Figure 13: Structure chimique de l'Artéméther et l'Artésunate.....	28
Figure 14: Structure chimique de la Dihydroartémisinine.....	29
Figure 15: Structure chimique de la Luméfantrine .....	30
Figure 16: Structure chimique de la Primaquine .....	31
Figure 17: Modèle 3D de <i>Pfmdr1</i> développé.....	41
Figure 18: Représentation schématique de K13 et son orthologue humain KEAP1 .....	42
Figure 19: Cartographie de la zone irriguée de Dioro.....	44
Figure 20: Répartition des enfants enrôlés en fonction du genre. ....	63
Figure 21: Survie des parasites au cours des 72 heures de prise de médicaments par la méthode de Kaplan Meier.....	65
Figure 22: Répartition de la moyenne géométrique du taux d'hémoglobine avant traitement et le 28 <sup>ème</sup> Jour du suivi.....	66
Figure 23: Profil <i>Pfmdr1</i> des souches isolées lors de cette étude .....	73
Figure 24: fréquence des mutations majeurs des souches isolées avant traitement et au jour d'échec thérapeutique.....	73

## LISTE DES TABLEAUX ET EQUATIONS

Tableau I: Les différents faciès de transmission du paludisme au Mali (22).....	14
Tableau II: Taxonomie du vecteur du paludisme.....	16
Tableau III: Les classes d'antipaludiques, leurs cibles et gènes de résistance (5).....	40
Tableau IV: Plan de suivi des patients durant les 42 jours .....	50
Tableau V: Séquence des amorces utilisées pour le genotypage des quatre marqueurs microsatellites .....	52
Tableau VI : Composition du mélange réactionnel de la 1 <sup>ère</sup> réaction.....	54
Tableau VII: Composition du mélange réactionnel de 2 <sup>ème</sup> réaction .....	54
Tableau VIII: Master Mix du ExoSAP (exonuclease +phosphatase alcaline).....	55
Tableau IX: Composition du mélange réactionnel du séquençage .....	56
Tableau X: Liste des amorces utilisées lors de la PCR nichée .....	57
Tableau XI: Composition du mélange réactionnel de la première réaction.....	58
Tableau XII: Composition du mélange réactionnel de la deuxième réaction .....	58
Tableau XIII: Master Mix du ExoSAP .....	59
Tableau XIV: Liste des amorces utilisées pour le séquençage proprement dit du gène <i>Pfmdr159</i>	
Tableau XV: Composition du mélange réactionnel du séquençage.....	60
Tableau XVI: Répartition des patients en fonction de la tranche d'âge .....	64
Tableau XVII: Répartition des patients en fonction du temps de clairance parasitaire .....	64
Tableau XVIII: L'évolution du temps de clairance parasitaire en fonction de l'âge.....	65
Tableau XIX: L'évolution du temps de clairance de la fièvre en fonction de l'âge .....	66
Tableau XX: Répartition des parasitémies en fonction des tranches d'âge .....	67
Tableau XXI: Répartition des patients en fonction de l'échec thérapeutique.....	67
Tableau XXII: Répartition des cas d'échecs thérapeutiques en fonction de l'analyse des microsatellites .....	68
Tableau XXIII: Répartition des patients en fonction de la recrudescence.....	69
Tableau XXIV: Répartition des cas d'échecs thérapeutiques en fonction de l'analyse des mutations du gène <i>Pfmdr1</i> région 1 et région 2 .....	70
Tableau XXV: Répartition des profils trouvés sur le gène <i>Pfmdr1</i> en fonction des deux régions étudiées.....	71
Tableau XXVI: Répartition des mutations trouvées sur le gène <i>Pfmdr1</i> en fonction des cas d'échec thérapeutique avant traitement et après traitement .....	71

Tableau XXVII: Répartition des haplotypes rencontrés au niveau des positions 86 et 184 de la région 1 de <i>Pfmdr1</i> .....	72
Tableau XXVIII: Répartition des haplotypes rencontrés au niveau des positions 86, 184 et 1246 de <i>Pfmdr1</i> .....	72
Tableau XXIX: Répartition des mutations trouvées sur le gène <i>Pfmdr1</i> en fonction du temps de clairance parasitaire.....	74
Tableau XXX: Répartition des mutations trouvées sur le gène <i>Pfmdr1</i> en fonction de la tranche d'âge.....	74
Tableau XXXI: Répartition des cas d'échecs thérapeutiques en fonction de l'analyse des mutations sur le domaine propeller du gène <i>K13</i> .....	75
Tableau XXXII: Répartition des mutations trouvées sur le gène <i>PfK13</i> .....	76
<b>Équation 1:</b> Formule de calcul de la parasitémie.....	49
<b>Équation 2:</b> Formule pour le calcul du nombre d'hématies parasitées.....	49

## TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION .....	1
1.1	Objectif principal.....	4
1.2	Objectifs spécifiques .....	4
2	GENERALITES .....	5
2.1	Définitions :.....	5
2.2	Historique .....	6
2.3	Répartition géographique .....	7
2.4	Biologie .....	15
2.4.1	Vecteur .....	15
2.4.2	Agent pathogène .....	17
2.5	Manifestations du paludisme.....	21
2.6	Traitement du paludisme .....	22
2.6.1	Classification des antipaludiques .....	22
2.6.2	Modes d'action des antipaludiques .....	23
2.6.3	Politique de traitement .....	33
2.7	Diagnostic Biologique .....	35
2.7.1	Diagnostic de présomption .....	35
2.7.2	Diagnostic parasitologique .....	36
2.7.3	Diagnostic immunologique .....	37
2.8	Polymorphisme du <i>P. falciparum</i> .....	38
2.9	Le séquençage par la méthode de SANGER.....	39
2.10	La résistance aux antipaludiques .....	39
3	METHODOLOGIE .....	44
3.1	Lieu de l'étude.....	44
3.2	Type et période de l'étude .....	45
3.3	Enrollement des patients .....	45

3.3.1	Criteres d'inclusion et de non inclusion.....	45
3.3.2	Enrollement proprement dit dans l'étude.....	46
3.4	Suivi des patients.....	50
3.4.1	Plan de suivi.....	50
3.4.2	Collecte des échantillons.....	50
3.5	Méthodes moléculaires.....	51
3.5.1	Analyse des microsatellites neutres.....	51
3.5.2	Séquençage du gène <i>PfK13</i> .....	54
3.5.3	Séquençage du gène <i>Pfmdr1</i> aux régions 1 et 2.....	57
3.5.4	Analyses des séquences après séquençage.....	61
3.6	Considérations éthiques et déontologiques.....	62
3.7	Gestion et l'analyse des données.....	62
4	RESULTATS.....	63
4.1	Données sociodémographiques.....	63
4.2	Taux d'échec thérapeutique sur la base de la goutte épaisse.....	67
4.3	Genotypage des isolats avec les 4 microsatellites neutres.....	67
4.4	Prévalence des mutations sur le gène <i>Pfmdr1</i> .....	70
4.5	Prévalence des Mutations sur le gène <i>PfK13</i> .....	75
5	COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	77
6	CONCLUSION.....	83
7	RECOMMANDATIONS.....	84
8	REFERENCES.....	85



# **INTRODUCTION**

## 1 INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile potentiellement mortelle due à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques *Anopheles* infectés. Ces moustiques qui sont les vecteurs du paludisme, piquent principalement entre le crépuscule et le petit matin (1). Bien qu'il existe 5 espèces de *Plasmodium* responsable de l'infection palustre chez l'Homme (*P. falciparum* ; *Plasmodium vivax* ; *Plasmodium ovale*; *Plasmodium malariae*; *Plasmodium knowlesi*), *P. falciparum* est l'espèce la plus répandue en Afrique. Elle est responsable de la plupart des cas mortels dans le monde (1).

Dans son rapport de 2017, l'OMS estime qu'il a été rapporté en 2016, 216 millions de cas de paludisme qui ont causé 45 000 décès (2). Malgré les progrès réalisés dans la lutte contre le paludisme, l'incidence de cette maladie a augmenté de façon significative entre 2014 et 2016 dans la région Amérique de l'OMS, et de manière plus marginale, dans les régions Afrique, Asie du Sud-Est et Pacifique occidental de l'OMS. L'Afrique représente 90% des cas de paludisme qui surviennent dans le monde loin devant l'Asie du Sud-Est (7%) et la méditerranée orientale (2%) (2). La plupart des décès dus au paludisme en Afrique surviennent chez les jeunes enfants (1).

Au Mali, le paludisme représente également 45,74 % de l'ensemble des consultations pour les enfants de moins de cinq ans. Il est la première cause de décès des enfants de moins de cinq ans et d'anémie chez les femmes enceintes (3).

La prise en charge du paludisme nécessite un diagnostic précoce et le traitement sans retard de la maladie au moyen d'antipaludéens efficaces.

L'augmentation de la résistance du *P. falciparum* aux antipaludiques usuels (chloroquine, Sulfadoxine–pyriméthamine) a amené l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 2001, à recommander une substitution rapide de la monothérapie par des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTAs) dans la prise en charge du paludisme simple (4).

Dans les années qui suivirent, la plupart des pays d'endémie palustre ont adopté les CTAs, le nombre de traitements CTA délivrés passant de 11 millions en 2005 à plus de 300 millions en 2015 (5).

La structure génétique des populations de *P. falciparum* varie en fonction des régions d'endémicité, mais ceci n'a pas été systématiquement étudié à travers les populations de *P. falciparum* en Afrique où la plus part des infections surviennent (6).

La résistance d'un pathogène en général du *Plasmodium* en particulier à une molécule s'acquiert par suite d'une pression médicamenteuse forte et conduit à la sélection des mutants. Elle peut aussi s'obtenir lorsqu'il y a une observance insuffisante durant le traitement. Cette résistance, qui se manifeste relativement par les faibles taux de clairance parasitaire après traitement aux CTAs, est

maintenant répandue dans la sous-région du Grand Mékong (6).

Récemment, des études de génétiques moléculaire et épidémiologique ont montré que la résistance de *P. falciparum* à l'Artémisinine est médiée par des mutations sur le gène qui code pour le domaine Propeller de la protéine *Kelch* K13 de *P. falciparum* (*PfK13*). La réduction de l'efficacité de l'Artémisinine à son tour entraîne une pression sélective accrue sur les médicaments partenaires l' Artémisinine et ses dérivés, les exposants à un plus grand risque d'échec thérapeutique (6).

Délimiter le rôle du gène de la résistance multidrogue chez le *P. falciparum* *Pfmdr1* est d'une importance particulière en raison de sa suspicion dans la résistance des parasites à chacun des médicaments partenaires à l'Artémisinine dans les CTAs (6).

Le gène *Pfmdr1* situé sur le chromosome 5 code pour un transporteur de type ABC (ATP binding cassette). La protéine *Pfmdr1* est impliquée dans la modulation de la sensibilité à de multiples antipaludiques et plus particulièrement, dans l'efflux des antipaludiques hydrophobes (7). Les mécanismes de résistance sont liés :

- Soit à des phénomènes de duplication, entraînant une augmentation de l'expression de la protéine (8) ce qui cause la résistance aux aryl-amino-alcool (comme la méfloquine ou la luméfantine) et une diminution de sensibilité aux dérivés de l'Artémisinine (mais sans lien statistiquement établi avec l'efficacité clinique des CTAs (9,10).
- Soit à l'apparition de mutations au niveau des codons 86 (N→Y), 184 (Y→F), 1034 (S→C), 1042 (N→D) et 1246 (D→Y), entraînant une altération de sensibilité des parasites à certains antipaludiques comme les amino-4-quinoléines (7). Il existe un effet antagoniste entre la sensibilité à la chloroquine et à la méfloquine : la mutation 86Y diminue la sensibilité des parasites à la chloroquine, mais augmente celle de la méfloquine. De même, l'augmentation du nombre de copies du gène *Pfmdr1* augmente la résistance à la méfloquine et à l'inverse accroît la sensibilité à la chloroquine (11).

Récemment, des mutations dans le domaine Propeller du gène *PfK13* ont été identifiées en tant que marqueurs moléculaires candidats de la résistance à l'Artémether. Ce gène se trouve sur le chromosome 13 du génome de *P. falciparum*. Il appartient à la superfamille des protéines du kelch, dont le domaine des hélices abrite de multiples sites d'interaction protéine-protéine et intervient dans diverses fonctions cellulaires, y compris la dégradation des protéines régulée par l'ubiquitine et les réponses au stress oxydatif (12).

La surveillance des loci potentiels de pharmacorésistance au sein d'une population qui pourrait émerger sous la pression croissante des drogues est une activité de santé publique importante (13). Les protéines de surface des mérozoïtes *msh1* et *msh2* qui sont sous pression sélective des anticorps, ont servi pour étudier la diversité génétique, la multiplicité de l'infection et le portage parasitaire. Cependant les marqueurs les microsatellites neutres ou polymorphisme mononucléaire sont des marqueurs hautement polymorphes utilisés pour étudier la génétique de la population de *P. falciparum* à travers la répétition de tandem qui sont de petites séquences d'acides aminés (14).

Actuellement l'OMS conseille aux pays d'endémie palustre de procéder à un suivi régulier de l'efficacité des médicaments antipaludiques tous les 24 mois au niveau des sites sentinelles, afin de détecter des modifications de leur efficacité thérapeutique (15). Ainsi, l'évaluation de la prévalence des marqueurs de résistance est nécessaire et devrait être conduite d'une manière régulière pour détecter les menaces sur la réponse du *Plasmodium* (dans le cas du paludisme) aux antipaludiques. Il y a plusieurs types d'évaluation de résistance, elle peut se faire *in vivo* par suite d'administration d'antipaludiques et le suivi du patient jusqu'à la clairance parasitaire, elle peut être conduite *ex vivo* (*in vitro*) où le parasite est exposé à une concentration de médicament et indiquant la concentration inhibitrice 50 (CI50). Enfin, avec des techniques moléculaires, utilisant des mutations ponctuelles de bases nucléotidiques associées à une molécule antipaludique, il est possible de détecter les souches résistantes ou sensibles.

La commune de Dioro a bénéficié depuis 2006 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 Artémether + Luméfantrine et le traitement présomptif intermittent avec la Sulfadoxine + Pyriméthamine. Simultanément, l'adoption de la CTA (Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine) 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 la prévalence des marqueurs moléculaire de résistance de l' Artémether plus la Luméfantrine utilisant à la fois les techniques *in vivo* et *ex vivo* de détection de la résistance des Plasmodies.

Ce travail se base sur l'hypothèse qu'après avoir mis des CTAs gratuitement à la disposition de la communauté de Dioro par le projet des villages du millénaire (PVM), il y a la possibilité de sélection des souches résistantes de *P. falciparum* à la combinaison Artémether plus Luméfantrine.

C'est ainsi que nous avons conduit cette étude dans la commune rurale de Dioro qui visait à étudier l'efficacité *in vivo* de la combinaison (Artémether + luméfantrine) dans le traitement du paludisme simple à *P.falciparum* et évaluer la prévalence des marqueurs de résistance sur les gènes *Pfmdr1* et *Pfk13*.

## OBJECTIFS

### 1.1 Objectif principal

Estimer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance à l'Artémether plus la Luméfantrine à Dioro.

### 1.2 Objectifs spécifiques

- Estimer le taux d'échec thérapeutique par la goutte épaisse à Dioro;
- Estimer le taux d'échec thérapeutique corrigé par les 4 marqueurs neutre (2490; PfPK2; Polya et TA1) de microsatellites à Dioro;
- Estimer la prévalence des marqueurs de résistance de *Pfmdr1* et *PfK13* à *P. falciparum* à Dioro.

# GENERALITES

## 2 GENERALITES

### 2.1 Définitions :

Le paludisme connu aussi sous le nom de « malaria » (un mot italien qui veut dire mauvais air) est une érythrocytopathie causée par le développement dans les hématies, un parasite hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'Homme par la piqûre infectante d'un moustique (l'anophèle femelle) (16). Au Mali, ces vecteurs sont les espèces du complexe *Anopheles gambiae s.l* et *Anopheles funestus s.l* qui sont responsables de la transmission du paludisme. La phase sanguine du cycle biologique du parasite rend possible d'autres modes de transmission qui sont exceptionnels : il s'agit des transmissions congénitale, transfusionnelle, par greffe et par transplantation d'organes (17).

Les marqueurs de résistance moléculaires sont des positions ponctuelles sur des gènes du parasite dont leurs transformations peuvent être accompagnées à la résistance aux antipaludiques. La détermination de ces marqueurs par les techniques moléculaires constitue un des moyens pour étudier les résistances aux antipaludiques. Les modifications aux positions concernées sur ces gènes incriminées sont généralement des substitutions d'acides aminés suite à un changement de codon et des changements en termes du nombre de copies du gène *Pfmdr1* (17).

Actuellement la résistance à l'Artémisinine est un concept qui change relativement certains paramètres. Cette résistance, qui se manifeste par des taux relativement faibles de clairance parasitaire après traitement, est maintenant largement répandue dans la sous-région du Grand Mékong, ce qui suscite des inquiétudes quant à sa propagation possible sur le continent Africain où le paludisme est plus répandu. Des études génétiques épidémiologiques et moléculaires ont montré que la résistance à l'Artémether est principalement due à des mutations dans le domaine propeller de la protéine *Kelch* de *P. falciparum* K13 (6). Ce gène est localisé sur le chromosome 13 du génome de *P. falciparum*. K13 appartient à la superfamille des protéines du Kelch, dont le domaine des hélices abrite de multiples sites d'interaction protéine-protéine et intervient dans diverses fonctions cellulaires, y compris la dégradation des protéines régulée par l'ubiquitine et les réponses au stress oxydatif (12).

La définition du rôle du gène de résistance multiple à *P.falciparum-1* (*Pfmdr1*) est particulièrement pertinente en raison de son implication suspecte dans la sensibilité du parasite à chacun des médicaments partenaires des CTAs tels que la Luméfantrine (LMF), qui est associée à l'Artémether (ATM) pour constituer la CTA la plus utilisée), la Méfloquine (MFQ, associée à l'Artésunate (AS), l'Amodiaquine (ADQ, également associée à l'Artésunate) et la Pipéraquline (PPQ, combiné avec le métabolite actif de l'Artemether, la Dihydroartémisinine (DHA) (6).

Situé sur le chromosome 5, le gène *Pfmdr1* code pour un transporteur de type ABC (ATP binding Cassette). La protéine PfMDR-1 est impliquée dans la modulation de la sensibilité à de multiples antipaludiques et plus particulièrement dans l'efflux des antipaludiques hydrophobes.

## 2.2 Historique

Le paludisme est l'une des plus anciennes maladies que l'humanité ait connues. Son historique peut se présenter en plusieurs étapes:

- en 400 ans avant JC, Hippocrate décrivait le paludisme du kyste hydatique en Grèce **(15)** ;
- en 1630 Don Francisco Lopez apprenait des Indiens du Pérou les vertus de l'écorce du quinquina **(18)** ;
- Pelletier et Caventou isolent en 1820, l'alcaloïde actif de l'écorce du quinquina, la quinine **(18)**;
- Dix ans après Pelletier et Caventou ; Maillot utilise la quinine dans la campagne d'Algérie **(18)** ;
- C'est ainsi qu'en 1880 l'agent pathogène a été découvert par le médecin militaire, Alphonse Laveran à Constantine **(18)** ;
- en 1880 Marchiafava et Golgi décrivaient trois espèces de plasmodium parasite de l'homme : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* **(15)** ;
- De 1895 à 1897, Ross suspecta la transmission de la maladie par le moustique du genre *Anophèles* avant que la confirmation ne soit faite par Grassi en 1898 **(15)** ;
- en 1943 la chloroquine, premier antipaludique de synthèse fut obtenue **(15)** ;
- en 1957 la chloroquinorésistance est constatée en Asie et en Amérique du sud **(15)**;
- en 1970 le Professeur Zhenxing Wei (Chine) réalisait un extrait de l'Artémisinine **(15)**;
- en 1977 un chercheur de l'entreprise pharmaceutique Guilin synthétisa l'Artésunate **(15)**;
- en 1978 le Professeur Li Yin produisait pour la première fois l'Artéméther **(15)** ;
- 1979 en Afrique, la résistance à la chloroquine a été observée pour la première fois en Tanzanie **(15)** ;
- en 1992 la firme Rhône-poulenc aujourd'hui Aventis en accord avec l'OMS et l'usine pharmaceutique de Kunming produisirent de l'Artéméther injectable **(15)** ;
- c'est en 2001, en Asie du Sud-est, la résistance du *Plasmodium* à l'Artémisinine est suspectée **(15)** ;
- En 2006 au Cambodge, la résistance du *Plasmodium* à l'Artémisinine a été identifiée pour la première fois **(15)**.

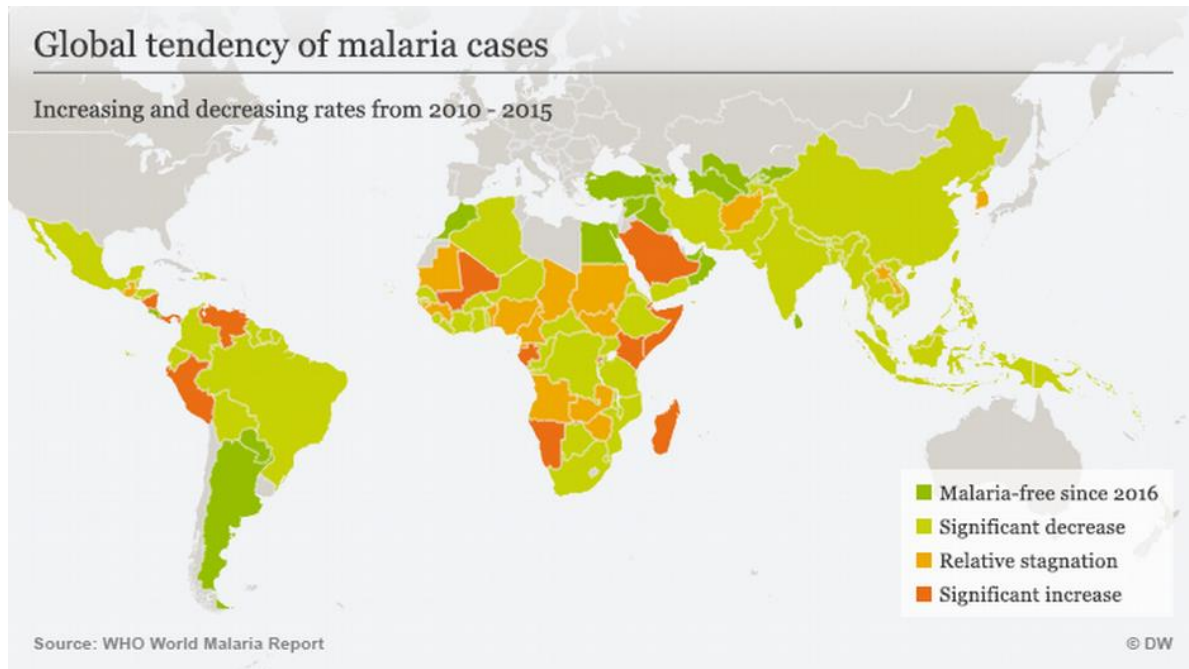
Actuellement, la recherche demeure orientée vers la lutte anti vectorielle, le traitement curatif et prophylactique, la vaccination. La lutte anti vectorielle est opposée à un problème technique



(résistance aux insecticides) et un problème économique (de cout et de mise en valeur des insecticides). Le traitement antipaludique requiert actuellement de nouveaux produits efficaces contre les souches de *P.falciparum* résistantes aux amino-4-quinoléines (16).

### 2.3 Répartition géographique

- Dans le Monde



**Figure 1:** Répartition du paludisme dans le monde

Source : <https://www.dw.com/fr/des-progr%C3%A8s-dans-la-lutte-contre-le-paludisme/av-36845786>

Le paludisme est l'infection parasitaire la plus répandue dans le monde. Il est au premier rang des priorités de l'OMS pour ses ravages directs et pour ses conséquences socio- économiques. Selon l'OMS près de la moitié de la population mondiale est exposée au paludisme (19).

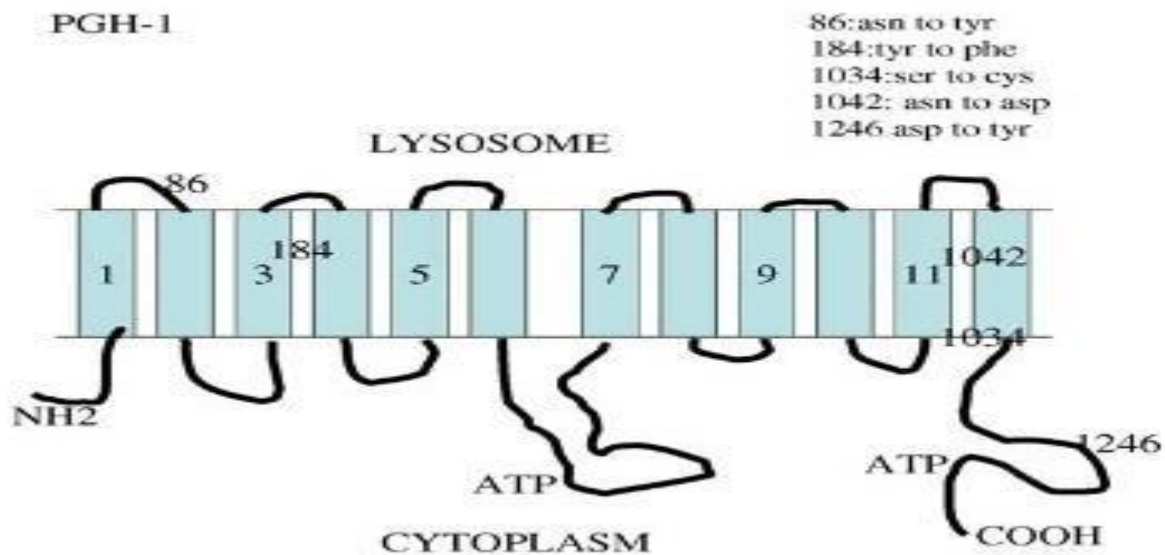
Entre 1957 et 1960, les premiers cas de résistance à la chloroquine ont touché plusieurs points du monde (Colombie et Venezuela, Cambodge et Thaïlande, Papouasie Nouvelle Guinée, Philippines) (11). La résistance s'est émergée dans les zones d'endémie palustre.

Les mutations sur le gène *Pfmdr1* aux positions 86, 184, 1034, 1226 et 1246 sont de plus en plus détectées en Asie du Sud-Est et en Afrique. Les positions 86 et 184 qui sont aussi associées à la résistance aux médicaments partenaires de l'Artemisinine dans les CTAs sont très fréquentes en Afrique (6).

En Amérique du Sud, des cas de parasitémie ont été relevés au troisième jour du traitement aux CTAs. La résistance à l'Artemisinine sévit actuellement en Asie du sud-est, notamment au Cambodge depuis

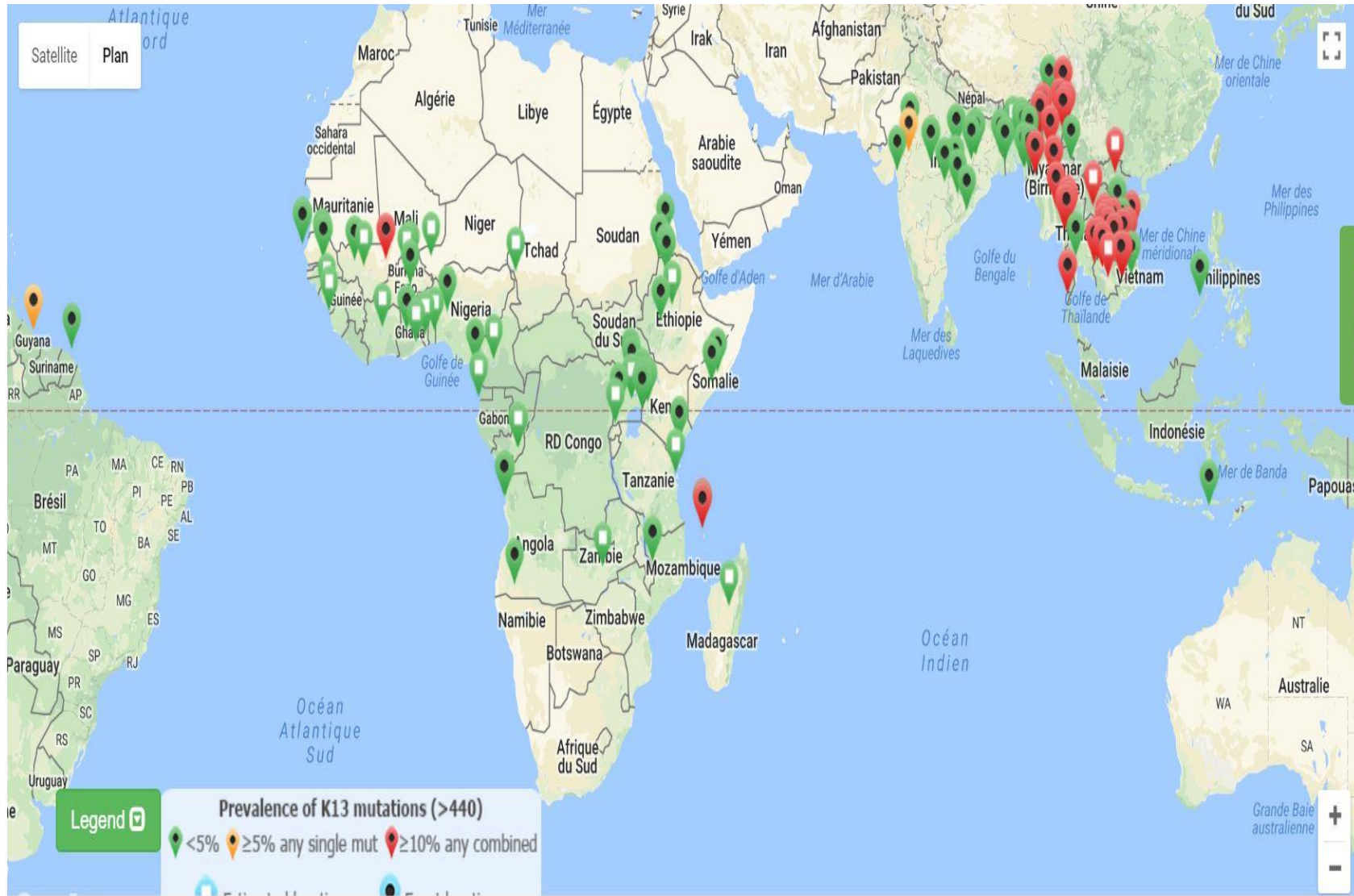
2006, à Lao PDR depuis 2013, à Myanmar depuis 2008, en Thaïlande depuis 2008 et au Viêt Nam depuis 2009 (20). Les mutations observées sur les positions 493, 539 et 580 sur le gène *PfK13* sont connues pour leur association à la résistance aux CTAs ainsi que le retard de clairance parasitaire en Asie du Sud-Est (21).

Des études sur le gène *Pfmdr1* ont identifié cinq mutations d'acides aminés prévalentes à l'échelle mondiale. Les mutations amino-terminales (86Y et 184F) sont plus courantes chez les parasites asiatiques et africains, alors que les trois mutations carboxy-terminales (1034C, 1042D et 1246Y) sont plus fréquentes chez les isolats sud-Américains. La capacité des variantes de *Pfmdr1* à influencer la puissance du médicament antipaludique est soutenue par des systèmes d'expression hétérologues qui fournissent des preuves du transport de médicaments par certaines isoformes de *Pfmdr1* (6).



**Figure 2:** La protéine Pgh1 de *P. falciparum*. Acides aminés polymorphes sont indiqués (7)

Prévalence des mutations sur les gènes *Pfmdr1* et *PfK13* chez les parasites isolés lors des échecs thérapeutiques



**Figure 3:** Répartition des mutations sur le gène *Pfk13* dans le monde en 2013

Source : <http://www.warn.org/molecular/surveyor/k13/index.html#0>

Prévalence des mutations sur les gènes *Pfmdr1* et *PfK13* chez les parasites isolés lors des échecs thérapeutiques

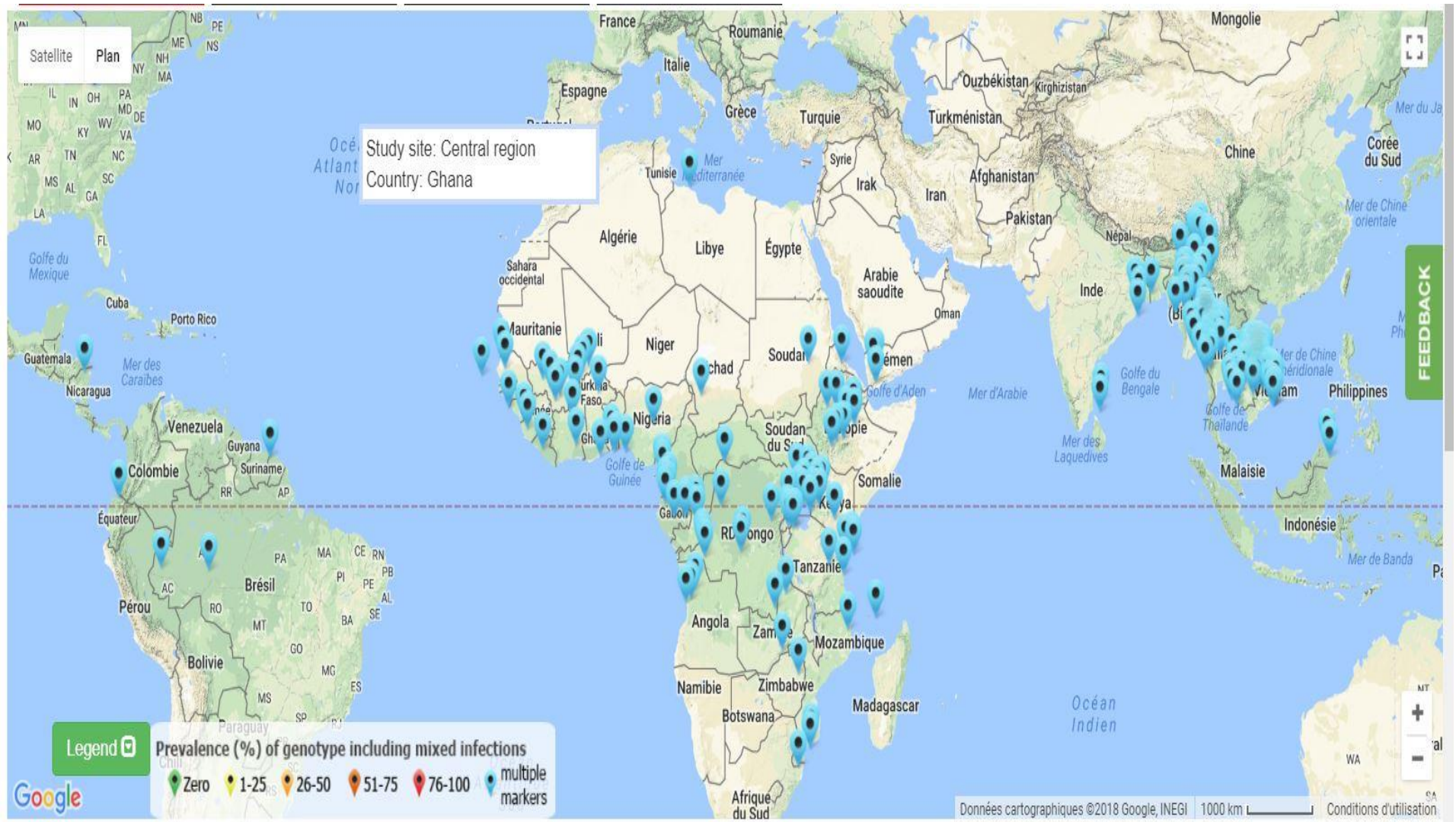


Figure 4: Répartition des mutations sur le gène *Pfmdr1* dans le monde en 2013

Source : <http://www.warn.org/molecular/surveyor/#0>

- **En Afrique**

En Afrique subsaharienne, le paludisme constitue un problème majeur de santé publique (22). Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituent les groupes à risque.

Actuellement, aucun cas de résistance à l'Artémisinine et ses dérivés n'a été confirmé en Afrique (23).

Cependant, une réduction de la sensibilité à l'Artémisinine est présente dans certaines zones endémiques en Afrique (24). Une augmentation du nombre de copies du gène *pfmdr1* a été observée au Ghana et cette découverte a des implications sur l'utilisation des CTAs dans le pays, bien qu'aucune résistance n'ait été rapportée (25).

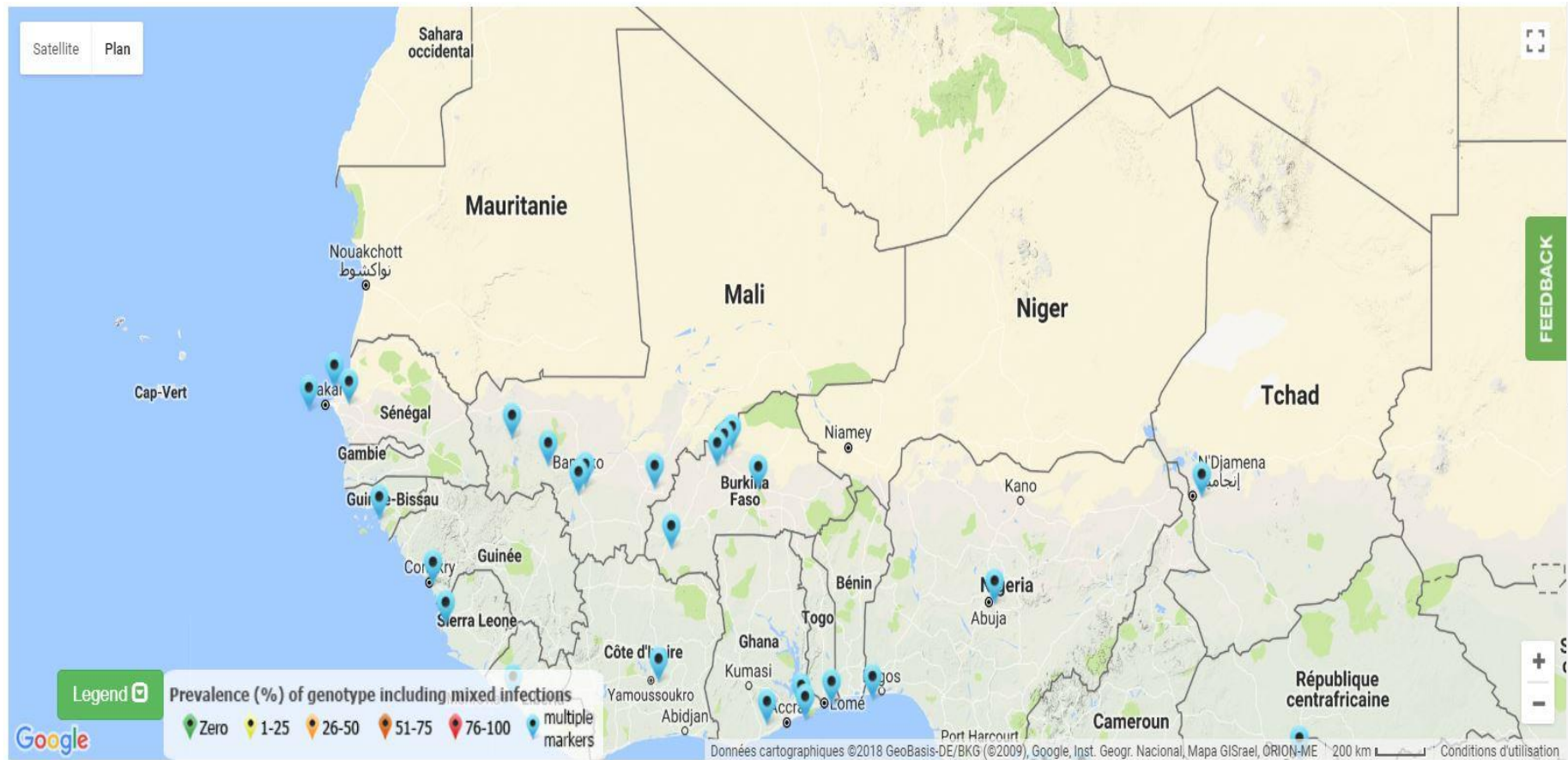
Beaucoup d'études sur l'efficacité des CTAs sont en cours dans la plupart des zones endémiques. De nos jours, aucun cas de mutation sur le gène *PfK13* n'a été confirmé et retrouvée associée à une clairance parasitaire retardée. Les résultats des différentes études menées montrent que les CTAs sont encore efficaces en Afrique avec des mutations au niveau des positions 469, 493, 503, 553, 556, 578 et 592 (13,21,26). Les mutations observées sur les positions 493, 539 et 580 restent absentes ou transitoires dans la région subsaharienne de l'Afrique (13,26,21).



**Figure 5:** Répartition des mutations *PfK13* en Afrique de l'Ouest en 2013

Source : <http://www.warn.org/molecular/surveyor/k13/index.html#0>

Prévalence des mutations sur les gènes *Pfmdr1* et *PfK13* chez les parasites isolés lors des échecs thérapeutiques



**Figure 6:** Répartition des mutations *Pfmdr1* en Afrique de l'Ouest en 2013

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

- **Au Mali**

Le paludisme est de type saisonnier au Mali, c'est-à-dire que la transmission est endémique avec un pic saisonnier pendant la saison des pluies.

**Tableau I:** Les différents faciès de transmission du paludisme au Mali (22)

Faciès épidémiologiques	Transmission Paludisme	Endémicité IP	Région géographique	Caractéristiques
Faciès soudanoguinéen	Intense (-6 mois/an)	Holoendémique IP > 75 %	Sikasso	Prémunition acquise 5 ans.
Faciès nordsoudanien et Sahel	Intense (3-4 mois/an)	Hyperendémique IP : 5 – 75 %	Ségou, Koulikoro, Mopti	Prémunition 9 ans. Neuropaludisme, fréquent à 1-9 ans.
Faciès saharien	Sporadique voire Epidémique	Epidémique IP < 10 %	Gao, Kidal, Tombouctou	Adultes aussi exposés risque paludisme grave et compliqué.
Faciès des Barrages	Bimodale (Plurimodale)	Mésoendémique IP : 26 – 50 %	Sélingué, Manantali, Markala	Anémie palustre élevée chez moins 9 ans.
Faciès urbain		Hypoendémique IP < 10 %	Bamako, Mopti ville	Adultes bamakois risque paludisme grave.



La chloroquinorésistance a été rapportée depuis les années 1990, ce qui a conduit en 2006 au retrait de la chloroquine dans le traitement du paludisme à *P.falciparum*

## 2.4 Biologie

Le paludisme est causé par des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques *Anopheles* infectés, appelés «vecteurs du paludisme», qui piquent principalement entre le crépuscule et le petit matin (20).

### 2.4.1 Vecteur

Un vecteur est 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 signifie, 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 (15).

Le paludisme est transmis exclusivement par les piqûres de moustiques *Anopheles*. Parmi plus de 500 espèces d'*Anopheles* reconnues à ce jour, 41 sont des vecteurs majeurs du paludisme, dont le plus grand nombre (39%) se trouve en Asie du Sud-est, alors que les vecteurs les plus compétents, *An. gambiae* et *An. arabiensis*, sont en Afrique (15). Chaque espèce vectrice présente ses caractéristiques comportementales, géographiques et écologiques qui lui sont spécifiques et qui déterminent l'épidémiologie locale du paludisme (27). Toutes les espèces importantes de vecteurs piquent la nuit. Les *Anopheles* se multiplient dans l'eau et chaque espèce a ses attirances ; certaines par exemple préfèrent l'eau douce de faible profondeur comme les flaques, les rizières et les empreintes laissées par les sabots d'animaux.

La transmission est plus importante aux endroits où les espèces de vecteurs ont une durée de vie relativement longue (ce qui permet au parasite de compléter son cycle de développement à l'intérieur du moustique) et piquent plutôt les êtres humains que les animaux. Par exemple, la longue durée de vie et la forte préférence pour l'homme des espèces africaines de vecteurs justifient que près de 90% des décès par paludisme enregistrés dans le monde surviennent en Afrique (15).

**Au Mali**, des études cytogénétiques ont montré que l'espèce *An. gambiae s.l* est composé de 3 formes chromosomiques désignées Bamako, Savane et Mopti (28). La forme Mopti se rencontre fréquemment dans les zones d'inondation du fleuve Niger, elle coexiste avec la forme Bamako dans les régions humides du sud, avec des fréquences faibles. La forme Savane se rencontre dans les zones du sud et du centre (28).

La transmission du paludisme est assurée en saison sèche froide (Novembre –Février) par *An. arabiensis* et la forme Mopti de *An. gambiae s.s* lui substitue en saison sèche chaude (Mars-Juin) (15). Les formes Savane et Bamako de *An. gambiae s.s* deviennent les principaux vecteurs pendant la saison des pluies (Juillet-Octobre). Ainsi, le long de l’année les vecteurs s’alternent dans la transmission du plasmodium (15).

- **Systematique (20)**

- La famille des Culicidae rassemble à ce jour plus de 3 500 espèces, qui regroupent l’ensemble des insectes connus sous le nom vernaculaire de moustiques (tableau II). Classés dans l’ordre des Diptères (2 ailes) et le sous-ordre des Nématocères (antennes filiformes). Ces insectes sont caractérisés par des antennes longues et fines à multiples articles, des ailes munis d’écailles et la présence, chez les femelles au moins, de pièces buccales en forme de trompe rigide appelée proboscis. Les *Culicidae* sont répartis en deux sous-familles : *Anophelinae* et *Culicinae*.

**Tableau II:** Taxonomie du vecteur du paludisme

<b>Règne</b>	<b>Animalia</b>	(= <b>Animaux</b> )
<b>Sous-Règne</b>	Metazoa	(= Composé de plusieurs cellules)
<b>Embranchement</b>	<b>Arthropoda</b>	(= <b>Pattes articulées</b> )
<b>Sous-embranchement</b>	Hexapoda	(= 3 paires de pattes)
<b>Super-classe</b>	Protostomia	(= bouche en premier lors du développement)
<b>Classe</b>	<b>Insecta</b>	(= <b>corps segmenté en 3 parties</b> )
<b>Sous-classe</b>	Pterygota	(= avec des ailes)
<b>Intra-Classe</b>	Neoptera	(= ailes qui se replient en arrière au repos)
<b>Super-ordre</b>	Endopterygota	(= larve dépourvue d’ailes)
<b>Ordre</b>	<b>Diptera</b>	(= <b>avec 2 ailes</b> )
<b>Sous-ordre</b>	<b>Nematocera</b>	(avec <b>antennes longues et fines</b> )
<b>Famille</b>	<b>Culicidae</b>	(= <b>moustiques</b> )
<b>Sous-famille</b>	<b>Anophelinae</b>	(= <b>anophèles</b> )
<b>Genre</b>	<b>Anopheles</b>	
<b>Sous-genre</b>	<b>Anopheles, Cellia, Nyssorhynchus, Kerteszia</b>	

## 2.4.2 Agent pathogène (15)

Le *Plasmodium* est le parasite responsable du paludisme. C'est un parasite intracellulaire obligatoire, amiboïde, colonisant les hématies et produisant un pigment.

- Les *Plasmodiums* sont des protozoaires appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa*. Cet embranchement est caractérisé par la présence d'un complexe apical généralement constitué d'un conoïde facilitant à la pénétration dans la cellule hôte, d'un anneau polaire et de rhoptries. Ces derniers sécrètent probablement une enzyme protéolytique ainsi que des microtubules sous membranaires conférant la mobilité à la cellule. Sa taxonomie est la suivante :

Embranchement : Apicomplexa,

Classe : Sporozoea,

Sous-classe : Coccidia,

Ordre: Eucoccida,

Sous-ordre : Haemosporina,

Famille: Plasmodidae,

Genre: *Plasmodium*

### 2.4.2.1 Les différentes espèces plasmodiales

Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (Plus de 140), touchant de nombreuses espèces animales, dont cinq espèces sont habituellement retrouvées en pathologie humaine : *P.falciparum*, *P.malariae* ; *P.vivax* ; *P. ovale* et *p.knowlesi*. Une cinquième espèce ; *P.knowlesi*, parasite habituel des singes d'Asie, s'est révélée être responsable d'une zoonose.

- ***P. falciparum***

C'est l'espèce la plus répandue dans le monde et est responsable des formes cliniques mortelles. Sa transmission est annuelle dans les régions équatoriales, elle est transmise toute l'année avec des recrudescences saisonnières. En dessous de 18°C, sa transmission s'interrompt. Sa période d'incubation s'étend de 7 à 12 jours (18).

Sur un frottis sanguin à *P. falciparum*, l'image se reconnaît par sa monotonie. Concernant l'hématie hôte, c'est tous les globules rouges à tout stade de maturité qui sont parasités, leur taille reste inchangée et peut être parsemée de petites mouchetures caractéristiques, les tâches de Maurer,

colorées en rouge-brun au Giemsa, le pluriparasitisme est courant au sein d'une hématie. L'aspect à la goutte épaisse est différent, les hématozoaires paraissent plus petits et sont en plus grand nombre.

○ ***P. malariae***

Il sévit sur les trois continents tropicaux avec une répartition beaucoup plus sporadique. Cette espèce de *Plasmodium* se différencie des autres espèces par une période d'incubation plus longue allant de 15 à 21 jours, par la périodicité de la fièvre (fièvre quarte), et surtout par sa capacité à entraîner des reviviscences très tardives (jusqu'à 20 ans après le retour de la zone d'endémie). L'infection à *P. malariae* est bénigne mais peut parfois entraîner des complications rénales (18).

Son frottis sanguin se caractérise par un parasitisme pauvre, mais toutes les formes évolutives peuvent être vues. L'hématie hôte, généralement âgée avec une légère diminution de diamètre et une teinte plus cuivrée, est caractérisée par le pointillé de Ziemann, qui n'est pas mis en évidence par les colorations usuelles.

En goutte épaisse, le champ microscopique est enrichi, les trophozoïtes jeunes peuvent prendre l'aspect de ceux de *P. falciparum*, avec la présence constante de pigment malarique, les autres éléments restent inchangés (15).

○ ***P. ovale***

Il sévit en Afrique intertropicale du centre et de l'ouest (et dans certaines régions du pacifique) et provoque une fièvre tierce bénigne. Son incubation est de 15 jours au minimum mais peut être beaucoup plus longue jusqu'à 4 ans. L'infection à *P. ovale* est bénigne mais on peut observer des rechutes tardives (dans 5 ans) (18).

Le frottis sanguin montre un mélange de toutes les formes évolutives. L'hématie hôte est jeune, le pluriparasitisme est fréquemment observé (2 à 3 parasites par hématie), il est toujours hypertrophié, décoloré avec tendance à s'ovaliser et à se franger ses bordures, la schüffnérisation est intense et très précoce (15).

Les aspects de la goutte épaisse sont comparables à ceux de *P. vivax*, et le diagnostic différentiel est très difficile, voire impossible si le parasitisme est très faible.

○ ***P. vivax***

Très largement répandu en Amérique du sud et en Asie, il est beaucoup plus rarement observé en Afrique. Sa transmission s'arrête en dessous de 15°C. Sa période d'incubation est de 11 à 15 jours, mais on peut observer des rechutes dues au réveil des hypnozoïtes pendant 3 à 4 ans. L'infection à *P. vivax* est classiquement considérée comme bénigne (18).

Au frottis sanguin, on a un panache intense dans lequel on peut trouver toutes les variétés évolutives. *P. vivax*, attaque les jeunes hématies (réticulocytes), le pluriparasitisme est rare,

l'hématie parasitée subit précocement un important remaniement, s'hypertrophie et tend à devenir polygonale avec apparition précoce de grains de Schüffner.

La goutte épaisse est aussi panachée et très enrichie, les trophozoïtes jeunes ont le même aspect que celui décrit précédemment, les autres éléments sont aisément reconnaissables.

### ***P. knowlesi* (29)**

- Du début des années trente jusqu'en 1955, *P. knowlesi* est utilisé comme agent pyrétique pour traiter les patients atteints de neurosyphilis. Mais ce n'est qu'en 1965 que le premier cas d'infection naturelle humaine par ce *Plasmodium* est décrit, chez un soldat américain affecté en Malaisie. De nos jours, ce parasite est présent en Malaisie, en Thaïlande et dans d'autres pays d'Asie du Sud-Est. Il est transmis principalement dans les forêts et en lisière des forêts. L'examen microscopique ne permet pas de le distinguer de *P. malariae*. Il peut provoquer un paludisme grave et entraîner la mort chez certains individus.

#### **2.4.2.2 Cycle de vie des plasmodies**

Le cycle de développement du *plasmodium* exige 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 (18).

- **Chez l'homme (22) :** Il se déroule en deux phases : une phase hépatique (ou exo-érythrocytaire) et une phase sanguine (ou érythrocytaire).

- **La phase hépatique**

L'anophèle femelle infesté inocule dans le sang, le parasite sous forme de sporozoïtes en piquant l'homme. 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 *P. ovale* et *P. vivax* ou par multiplication nucléaire, ils deviennent des schizontes intra hépatocytaires (corps bleus). Ce stade 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**

L'éclatement des corps bleus libère des mérozoïtes qui s'incorporent dans les érythrocytes par endocytose, et se transforment en trophozoïte. Le trophozoïte se développe 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. Les mérozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine par éclatement de l'hématie. Chaque mérozoïte envahit une nouvelle hématie, poursuivant ainsi le cycle intraérythrocytaire. Pendant la multiplication dans les hématies, le parasite produit au dépend de

l'hémoglobine un pigment appelé l'hémozoïne. 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 la rupture simultanée des corps en rosace d'une même génération qui cause 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 (22)**

Cette phase commence dès l'infection de l'anophèle femelle ayant piqué un impaludé porteur de gamétocytes. Elle est encore appelée cycle sporogonique,

Les gamétocytes passent dans son estomac, le gamétocyte femelle (ou macrogamétocyte) se différencie et devient immobile. Le gamétocyte mâle (microgamétocyte) va subir une exflagellation qui l'allongera et le rendra mobile. Après fécondation des gamètes mâle et femelle, il se forme un œuf mobile dans le tube digestif de l'*Anophèle* appelé ookinète.

Celui-ci traverse et part s'enkyster sur sa face externe de l'estomac formant un oocyste. Une fois mûr l'oocyste s'éclate et libère des sporozoïtes qui gagneront 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.

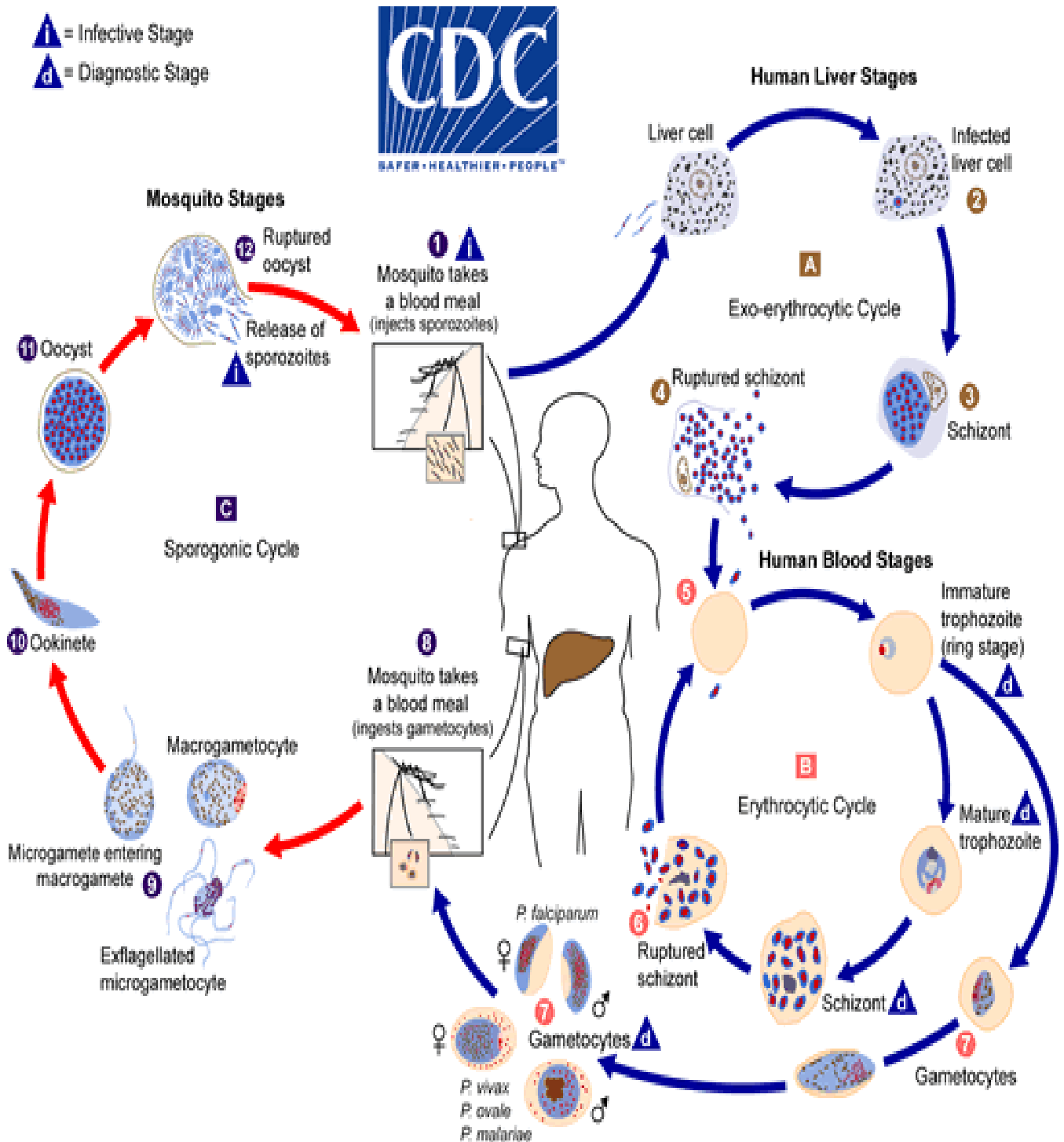


Figure 7: Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'homme et le moustique (30)

## 2.5 Manifestations du paludisme (18)

Les conséquences du Paludisme varient selon les malades, tout dépend de l'espèce de *Plasmodium* responsable de l'infection, de l'état immunitaire du porteur, de son âge. L'espèce *P. falciparum* est la plus dangereuse des cinq connues (car ayant le taux de mortalité le plus élevé) et représente une très grande partie des infections malariques humaines. De ce fait, l'éventualité du diagnostic de la maladie Paludique est importante et sa prise en charge doit être rapide.

- **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 ôter la vie au 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.

## 2.6 Traitement du paludisme

Les antipaludiques ou antimalariques sont des médicaments de synthèse chimique ou extraits de plantes destinées à traiter ou prévenir le paludisme.

*P. falciparum* est devenu résistant à de nombreux antipaludéens (ex. chloroquine, et à d'autres antipaludéens selon son origine géographique : méfloquine, sulfadoxine, pyriméthamine).

### 2.6.1 Classification des antipaludiques (31)

La connaissance du mécanisme d'action exacte des dérivés de l'Artémisinine serait très importante dans la compréhension et la mise en évidence de leur mécanisme de résistance. Ceci permettrait également d'établir la base moléculaire de cette résistance afin d'identifier des marqueurs moléculaires spécifiques.

- **Schizonticides érythrocytaires :**

- **Amino-4-quinoléines** : Chloroquine (Nivaquine®), Amodiaquine (Flavoquine®), Pipéraquline.
- **Amino-alcools** : Quinine (Quinimax®, Surquina®, Quinine Lafranc®), Méfloquine (Lariam®), halofantrine (Halfan®), Luméfantine.
- **Sesquiterpènes** : Artémisinine et ses dérivés : Dihydroartémisinine, Artéméther, Artésunate.
- **Antimétabolites** :

**Antifoliques** : Sulfadoxine, Dapsone,

**Antifoliniques** : Proguanil (Paludrine®), pyriméthamine (Malocideâ),



- **Antibiotiques** : cyclines (Doxypalu®, Granudoxy®Gé, Vibraveineuse®), clindamycine (Dalacine®, Zindacine®),
- **Analogues de l'ubiquinone** : Atovaquone.
- **Schizonticides intrahépatiques** :
  - Amino 8 quinoléines : Primaquine (Primaquine®), Tafénoquine.
  - Antimétabolites : Proguanil, cyclines.
- **Gamétocytocides** :
  - Amino-8-quinoléines : Primaquine (Primaquine®), Tafénoquine.
- **Associations d'antipaludiques à effet synergique schizonticide** :

L'effet synergique schizonticide de plusieurs molécules permet d'accentuer l'efficacité des médicaments antimalariques et d'obtenir une protection mutuelle des produits contre l'acquisition de résistance des plasmodies, essentiellement de *P. falciparum*.

Certaines de ces associations sont déjà anciennes :

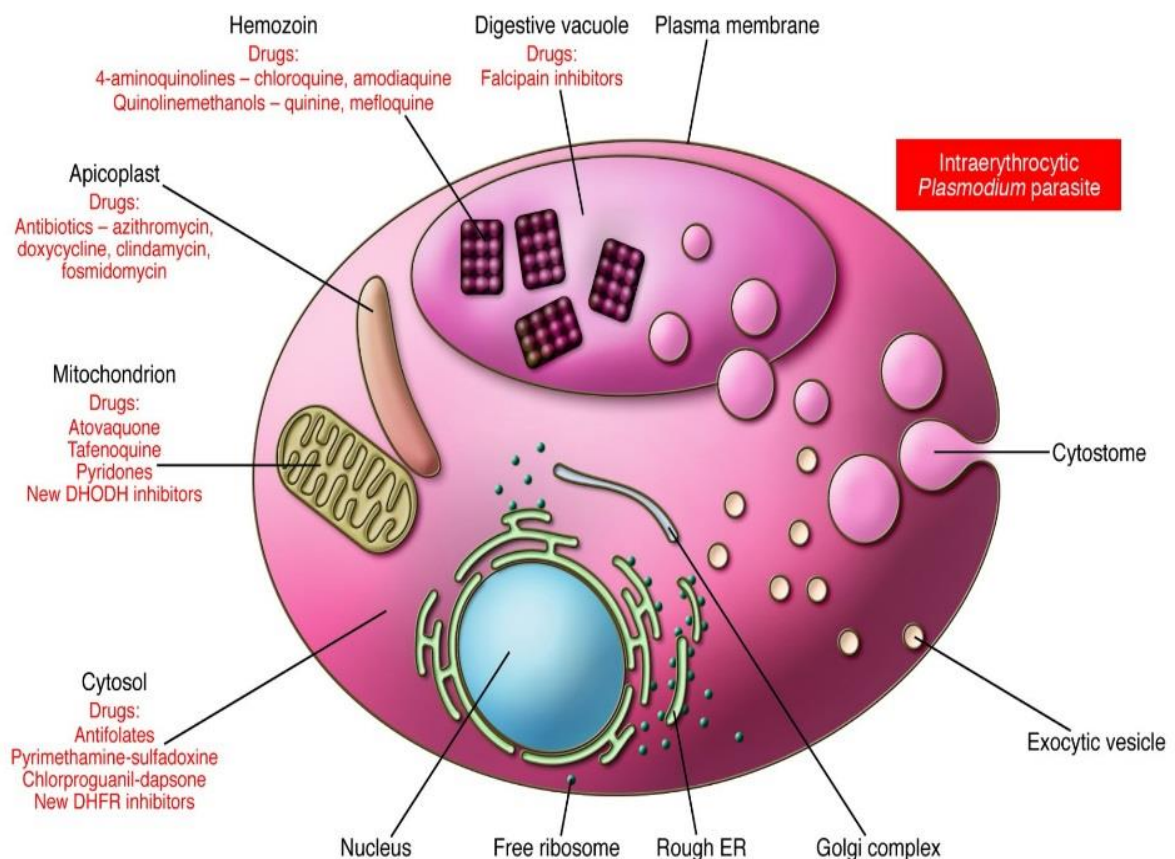
- Quinine + tétracyclines en zones de quininorésistance (forêts d'Asie du sud-est et Amazonie) ;
- Sulfadoxine + Pyriméthamine (Fansidar®)
- Méfloquine + Sulfadoxine + Pyriméthamine (Fansimef®, utilisé en Asie du sud-est),
- Chloroquine + Proguanil (Savarine®, utilisée en chimioprophylaxie seulement),
- Les « nouveaux » antimalariques sont tous associés, au moins en bithérapie :
- soit en associations libres (2 sortes de comprimés) : Artésunate + Sulfadoxine/pyriméthamine (Arsudar®), Artésunate + Amodiaquine (Arsucam®), Artésunate + Méfloquine (Artequin®) ;
- soit en associations fixes (FDC : fixed dose combination) : Atovaquone + Proguanil (Malarone®), Chlorproguanil + Dapsone (Lapdap®), Artéméther + Luméfantrine (Coartem®/Riametâ), Artésunate + Amodiaquine (AS/AQ®, Coarsucam®), Artésunate + Méfloquine (AS/MQ®).

### 2.6.2 Modes d'action des antipaludiques (5)

Les organites ou les compartiments qui organisent le *Plasmodium* constituent autant de cibles potentielles pour les molécules antipaludiques. On distingue :

- La vacuole digestive du parasite qui est le siège de la digestion de l'hémoglobine, de la cristallisation de l'hème et où l'on retrouve des moyens de défense contre le stress oxydant,
- Un cytoplasme comportant le cytosol et deux organites essentiels, les mitochondries et l'apicoplaste, qui sont nécessaires à la biosynthèse des acides nucléiques,

- Une membrane plasmique constituée de phospholipides et de canaux calciques, qui est le siège du trafic nutritionnel. Les antipaludiques sont classés en fonction de leur mode d'action ou la structure chimique.



**Figure 8:** Voies métaboliques ou cibles des antipaludiques (32)

- **Inhibition de la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive du *plasmodium* :**
  - Chloroquine, amodiaquine, pipéraquline
  - Quinine, méfloquine, halofantrine, luméfantrine
- **Alkylation des métabolites de l'hémoglobine, production de radicaux libres : Artémisinines**
- **Blocage de la fabrication des acides nucléiques :**

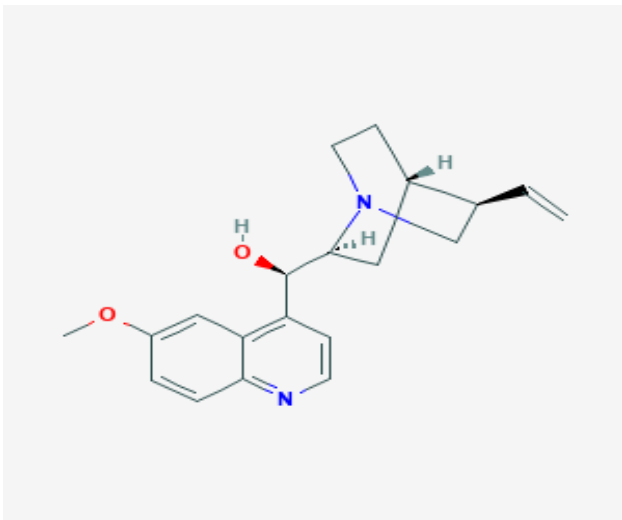
Cytochrome bc qui conduit à la baisse de l' adénosine triphosphate (ATP) : atovaquone.

Inhibition de la dihydropteroase synthetase (DHPS) : sulfadoxine, dapsone (antifoliques)

Inhibition de la dihydrofolate reductase (DHFR) : pyriméthamine, cycloguanil (antifoliques) (33).

### Pharmacocinetique des antipaludiques couramment utilisés en association (20)

#### • La Quinine : c'est un schizonticide endo-érythrocytaire



**Figure 9:** Structure chimique de la quinine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3034034>

Alcaloïde extrait de l'écorce de Quinquina (*Cinchona Officinalis*) aux propriétés antipaludiques schizonticides dont les premières utilisations remontent au XVII<sup>ème</sup> siècle.

L'activité se limite aux formes intra-érythrocytaires du parasite (toutes espèces confondues) et son mode d'action résultent de son accumulation dans la vacuole digestive parasitaire, ce qui va entraîner la perturbation du bon déroulement de la biosynthèse de l'ADN ainsi que de l'ARN, et diminuerait aussi la fixation de l'oxygène par le *Plasmodium*.

Elle reste en pratique le traitement de référence des formes graves du paludisme à *P. falciparum*. Elle se présente en ampoules, comprimés, suppositoires, suivant la gravité du tableau clinique, la voie d'administration et la posologie sont différents :

- En cas d'accès simple : posologie classique de 24 mg/kg/j. (en pratique 8 mg/kg de quinine toutes les 8 heures, pendant 7 jours, injectable ou per os),
- En cas de critères de gravité, la dose de charge : 17 mg/kg de quinine en 4 heures. Puis une dose d'entretien de 8 mg/kg en 4 heures. Toutes les 8 heures, en perfusion intraveineuse obligatoire, pendant 7 jours,

Si le paludisme est contracté en zone de quininorésistance (Asie du sud-est, Amazonie) : adjoindre la doxycycline, 200 mg/j ou la clindamycine, 10 mg/kg toutes les 8 heures

Elle peut s'administrer par voie intra-rectale biquotidienne : 15 à 20 mg/kg de quinine diluée (Quinimax® solution injectable), à renouveler éventuellement 12 heures après.

**Absorption:** rapide par voie orale ou par voie intramusculaire, biodisponibilité: 80%,  $T_{1/2} \approx 11$ h.

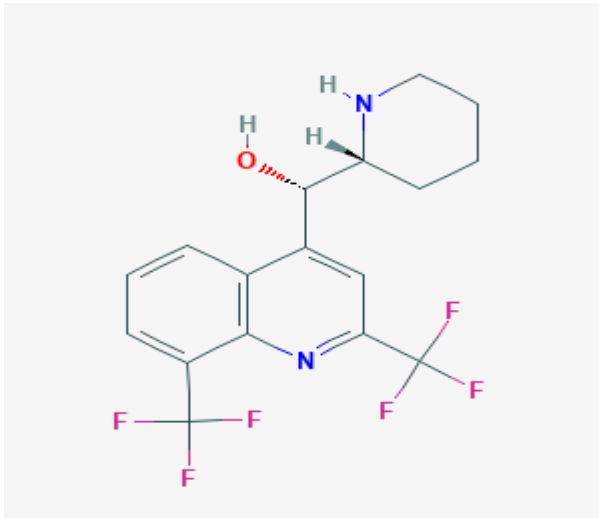
**Métabolisme:** le métabolisme se fait par l'intermédiaire du CYP3A4.

**Élimination:** Elle est rénale 20% sont éliminés sous forme inchangée, 80% sous forme de métabolites dont un actif, d'où adaptation de posologie chez les insuffisants rénaux (15).

- Effets indésirables (15)

La toxicité relative de cette substance peut engendrer un cinchonisme, voire une cécité définitive, une amaurose, une surdité, des troubles cardiaques et des convulsions en cas de surdosage massif.

- **Méfloquine :**



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

**Source :** <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40692>

L'administration se fait seulement par voie orale.

**Absorption orale:** On observe une bonne biodisponibilité (85%) augmentée par prise d'aliments et une très forte fixation aux protéines plasmatiques (98%).

**Métabolisme :** Il se fait par le CYP3A4 en métabolites inactifs.

**Élimination:** Lente inférieur à 10% sous forme inchangée dans les urines, 90% dans les fèces,  $T_{1/2} \approx 15-22$  jours (15).

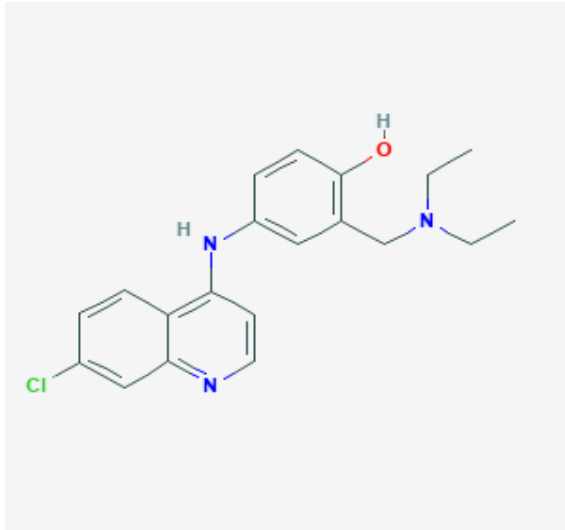
- **Effets indésirables (15)**

Les effets indésirables sont relativement fréquents mais bénins, ce sont des troubles neuropsychiatriques telleque: confusion, agitation, insomnie, vertiges, convulsions, diplopie, troubles de la conscience.

Autres effets indésirables : effets digestifs 7-20% (nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées).

La méfloquine peut entraîner des troubles du rythme cardiaque.

- **Amodiaquine :**



**Figure 11:** Structure chimique de l'Amodiaquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2165>

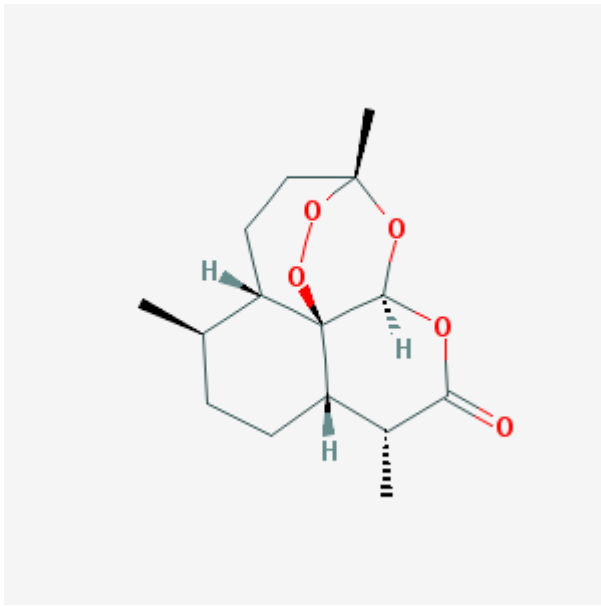
Les amino-4 quinoléines, à des doses assez élevées ont des propriétés anti-inflammatoires utilisées en rhumatologie dans le lupus érythémateux et la polyarthrite rhumatoïde.

Après prise orale, l'absorption est totale et rapide. Le pic sérique est atteint entre la 2<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> heure. Les amino-4 quinoléines se fixent aux protéines sériques et dans certains tissus (foie, reins, rate cœur). L'élimination rénale est très lente, d'où la nécessité de prises espacées.

- **Effets indésirables (15)**

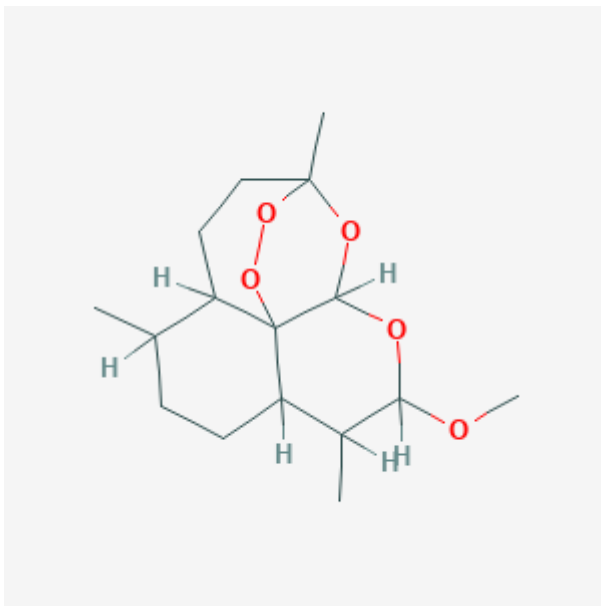
Rares aux doses utilisées en paludologie, des effets indésirables peuvent survenir dans le traitement de maladies du collagène qui nécessitent des doses trois fois plus élevées. Dans ce cas, peuvent apparaître : des troubles nerveux (vertiges, céphalées) et des troubles oculaires (rétinopathie non réversible)

- **Dérivés de l'Artémisinine :** Artéméther, Artésunate, Dihydroartémisinine

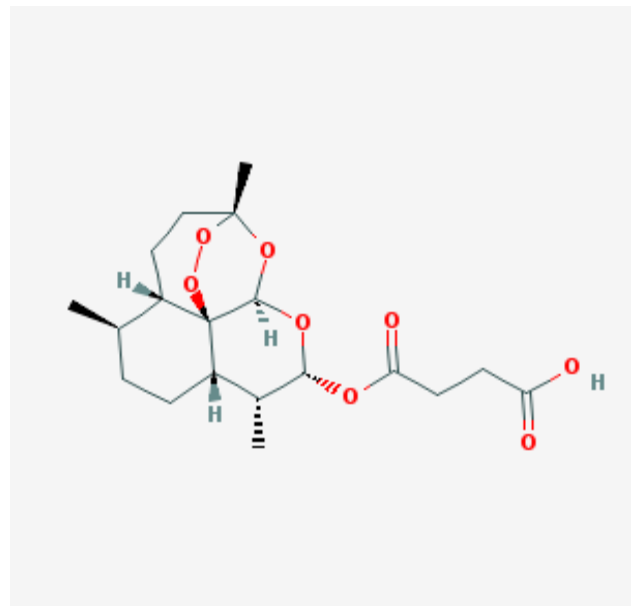


**Figure 12:** Structure chimique de l'Artémisinine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68827>



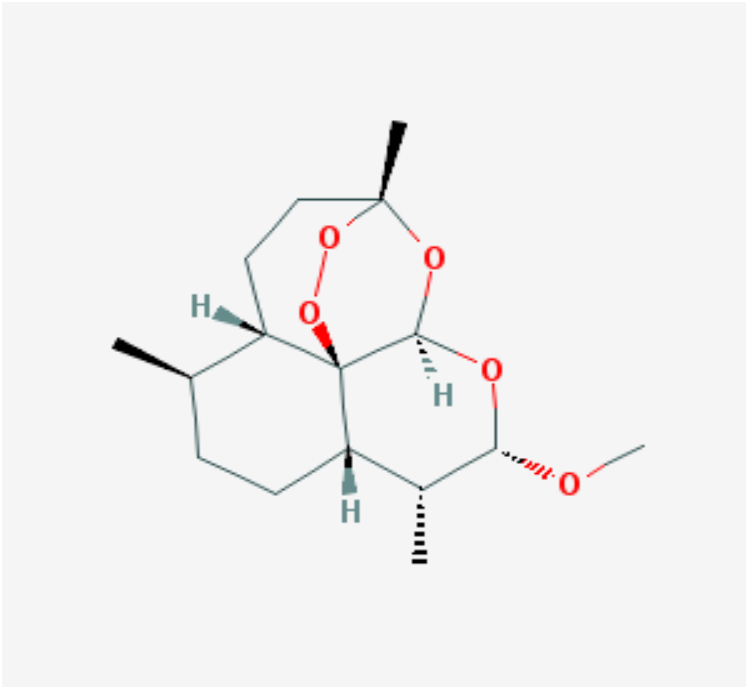
**Artemether**



**Artesunate**

**Figure 13:** Structure chimique de l'Artéméther et l'Artésunate.

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68827>



**Figure 14:** Structure chimique de la Dihydroartémisinine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/45357888>

Les deux autres dérivés ont pour métabolite actif la Dihydroartémisinine.

**Absorption orale :** l'absorption est rapide, le pic de concentration est atteint en 2 heures, la fixation aux protéines plasmatiques est de 95%.

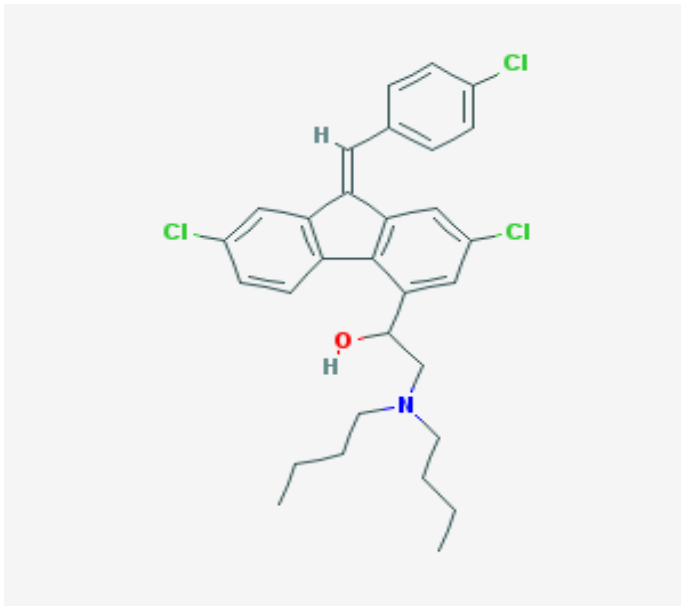
**Métabolisme :** ils sont métabolisés par le CYP3A4 et CYP2C19 en Dihydroartémisinine, métabolite actif, puis en métabolites inactifs, l'Artéméther induit son propre métabolisme.

**Élimination :** Ils sont éliminés sous formes de métabolites dans les urines et les fèces. Le temps de demi-vie  $T_{1/2}$  de l'artéméther et la Dihydroartémisinine est d'environ 2 heures (15).

○ **Effets indésirables (15) :**

Ils sont bien tolérés : Allergie dans 1 cas sur 3000. Dans de rares cas, des Palpitations, céphalées, étourdissement, toux, douleurs abdominales, arthralgie, myalgie en cas de surdosage.

• **La Luméfantrine :**



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

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6437380>

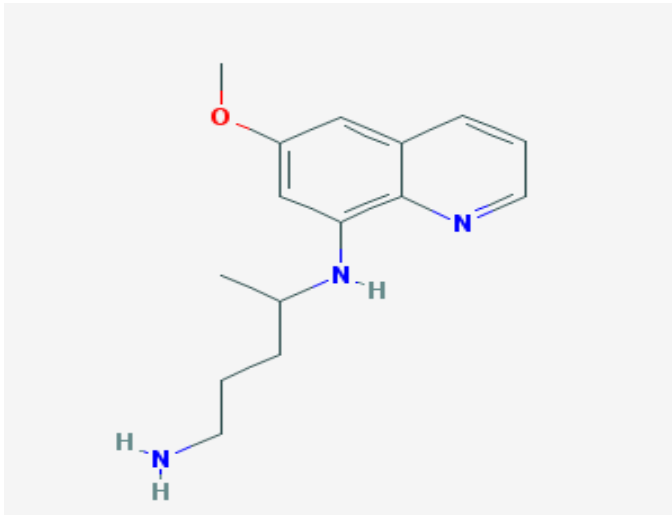
- **Absorption :** la luméfantine est un composé très lipophile. Son absorption débute 2 heures après son administration. Le pic de concentration est atteint 6-8 heures après son administration. Un repas riche en graisse augmente d'un facteur de l'absorption de la Luméfantine chez un impaludé. A jeun, le taux d'absorption est inférieur à 10% donc toujours prendre avec un repas ou avec une boisson lactée.
- **Métabolisme:** elle est métabolisée en desbutyl-luméfantine par le CYP3A4, métabolite 5-6 fois plus antipaludéen que la Luméfantine *in vitro*, ce métabolite ne représente que 1% de l'exposition systémique à la Luméfantine,
- **Élimination:** elle est fécale, principalement sous forme inchangée. La Luméfantine inhibe le CYP2D6. Son temps de demi-vie  $T_{1/2} = 2-3$  jours.

- **Effets indésirables (15)**

Essentiellement, des troubles digestifs, une élévation modérée des transaminases et souvent des troubles du rythme ventriculaire.



- **La Primaquine (Primaquine®)**



**Figure 16:** Structure chimique de la Primaquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4908>

La primaquine est le seul gamétocytocide disponible qui est élimine les gamétocytes de *P. falciparum* matures chez l'homme, empêchant ainsi la transmission de l'hématozoaire aux moustiques.

- **Effets indésirables**

Les troubles digestifs, méthémoglobinémie, agranulocytose, hémolyse chez les sujets ayant un déficit en G6PD.

L'hémolyse due à la primaquine est dose-dépendante chez les déficitaires en G6PD (15).

- **Dérivés de l'Artémisinine en monothérapie (20)**

- **Artéméther**(Paluther®) : c'est un dérivé de l'artémisinine utilisé seul par voie injectable. Il se présente en ampoules pour intramusculaire profonde (ampoules de 40 mg/0,5 ml et 80 mg/1 ml). Il est prescrit dans les formes graves à *P. falciparum* à la posologie de 1,6 mg/kg toutes les 12 heures à J1 (3,2 mg/kg/24h), puis 1,6 mg/kg/24h de J2 à J5. Il peut être utilisé dans des régions peu médicalisées, compte tenu de son mode d'administration par voie IM. Il est bien toléré.

- **Artésunate** : L'OMS recommande l'utilisation de l'artésunate IV en première intention dans le paludisme grave à *P. falciparum* chez l'enfant et l'adulte. L'artésunate existe sous forme de poudre pour injection et des gélules rectales. Son administration se fait selon la posologie de 2,4 mg/kg à heure 0, heure 12, heure 24 et toutes les 24 heures pendant 3 jours. Le relais est pris par un antipaludique oral après 3 jours.

• **La Sulfadoxine-Pyriméthamine (Fansidar®) (20)**

Il se présente en comprimés à 500 mg de sulfadoxine et 25 mg de pyriméthamine ; posologie : 3 comprimés en une prise (adulte), enfant : 1 cp/10 kg. Cette combinaison a une toxicité hématologique et cutanée.

• **Association Atovaquone + Proguanil (Malarone®) (20)**

Elle est prescrite dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* et en chimioprophylaxie du paludisme à *P. falciparum*. La posologie dans le traitement de l'accès simple est de 8 mg/kg/j pendant 3 jours en prise unique quotidienne, soit 4 comprimés chez l'adulte par jour s'il a plus de 40 kg de poids, 3 comprimés chez l'adulte de 31 à < 40 kg, 2 comprimés chez l'adultes de 21 à < 30 kg, 1 comprimé chez l'adulte de 11 à < 20 kg. Chez l'enfant de moins de 11 kg : 2 comprimés par jour chez l'enfant de 5 à < 9 kg, 3 comprimés par jour chez l'enfant de 9 à < 11 kg de poids. Cette association a une action sur les souches hépatocytaires de *P. falciparum*. Elle est bien tolérée, quelques troubles digestifs sont signalés. Les différents dosages sont :

- Dosage adultes et enfants > 40 kg : comprimés à 250 mg d'atovaquone et à 100 mg de proguanil;
- Dosage enfants de 11 à 40 kg : comprimés à 62,5 mg d'atovaquone et à 25 mg de proguanil.

• **Association Artéméther + Luméfantrine (Coartem®/Riamet®) (20)**

Cette association se présente en comprimés à 20 mg d'artéméther et à 120 mg de luméfantrine et est prescrit pour le traitement de l'accès palustre simple à *P. falciparum* : 4 comprimés en 2 prises par jour pendant 3 jours (dose adulte). Il n'est pas utilisé en chimioprophylaxie. Les effets secondaires sont des troubles du sommeil, des céphalées, des étourdissements, des troubles digestifs, un prurit. Il n'y a pas de cardiotoxicité. Il y a une présentation pédiatrique : Coartem® dispersible formulation pédiatrique.

• **Association Artésunate + Amodiaquine (20)**

Cette association se trouve sous forme **libre** (Arsucam®) et sous forme fixe (AS/AQ®, Coarsucam®). Elle est prescrite dans le traitement de l'accès palustre simple à *P. falciparum* en Afrique. La posologie est d'une prise par jour pendant 3 jours. Il y a quatre dosages selon l'âge : 3-

11 mois, 1 comprimé AS/AQ 25 mg/67,5 mg ; 1 à 6 ans, 1 comprimé 50 mg/135 mg ; 7 à 13 ans, 1 comprimé 100 mg/270 mg; 14 ans et au-dessus, 2 comprimés (100 mg/270 mg).

• **Association Artésunate + Méfloquine (20)**

L'association existe également en forme libre (Artequin®) ou en association fixe (AS/MQ®), qui est recommandées par l'OMS pour le traitement du paludisme à *P. falciparum* non compliqué. La posologie est d'une prise par jour pendant 3 jours. Il se présente en comprimés AS/MQ 25 mg/50 mg et 100mg/200 mg.

**2.6.3 Politique de traitement**

Depuis 2006, la plupart des pays où *P. falciparum* est endémique ont actualisé leur politique de traitement, passant de la Chloroquine (CQ) et de la Sulfadoxine-pyriméthamine (SP) qui sont en situation d'échec, aux associations thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) actuellement recommandées.

Ces dernières constituent désormais le meilleur traitement contre le paludisme simple à *falciparum* (20).

• **Traitement du paludisme simple à *P. falciparum* (20)**

Dans les cas de paludisme non compliqué à *P. falciparum*, l'OMS recommande de traiter avec une des associations à base d'Artémisinine suivante :

- Artéméther + Luméfantrine
- Artésunate + Amodiaquine
- Artésunate + Méfloquine
- Dihydroartémisinine + Pipéraquline
- Artésunate + Sulfadoxine–pyriméthamine (SP)

Le traitement à base d'Artémisinine doit durer au moins trois jours.

Chez les enfants de moins de 25Kg traités avec la Dihydroartémisinine + Pipéraquline, ils doivent recevoir au minimum de 2,5mg/kg de poids corporel de ihydroartémisinine par jour et 20mg/kg de poids corporel de pipéraquline par pendant trois (03) jours.

Au cours du premier trimestre de la grossesse, le traitement s'étend sur 7 jours et s'effectue avec la Quinine + Clindamycine.

Chez les nourrissons de moins de cinq (05) kilogrammes, le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* se fait avec les CTAs avec les mêmes dosages que chez les enfants.

Chez les patients co-infectés au VIH/SIDA, l'OMS recommande d'éviter les associations :

- Artesunate + SP si le patient est traité avec du Cotrimoxazole (triméthoprime plus sulfaméthoxazole) ;
- Artesunate + amodiaquine si le patient est traité avec Efavirenz ou Zidovudine

Chez les voyageurs non immunisés, le paludisme simple à *P. falciparum* sera traité avec les CTAs avant leur retour en zone non endémique.

• **Traitement du paludisme simple aux autres espèces plasmodiales (20)**

Lorsque l'espèce plasmodiale n'est pas connue avec certitude, le traitement peut se faire avec le protocole de traitement du paludisme simple à *P. falciparum*.

Dans les zones où le Plasmodium a déjà été déclaré résistant la chloroquine, le traitement se fera avec les CTAs.

• **Traitement du paludisme grave (20)**

L'adulte, l'enfant qui ont le paludisme grave (y compris les nourrissons, les femmes enceintes à tous les stades et les femmes allaitantes) doivent être traités avec de l'artésunate en injection intraveineuse ou intramusculaire pendant au moins 24 heures jusqu'à ce que le patient tolère l'administration du médicament par la voie orale puis compléter le traitement avec trois (03) jours de traitement avec les CTAs.

L'administration de l'artésunate se fait à raison de 3mg/kg de poids corporel chez les enfants de moins de 20kg et 2,4mg/kg de poids corporel chez le grand enfant et l'adulte.

Dans les milieux où l'artésunate n'est pas disponible en injectable, il faut préférer l'Artéméther injectable que la quinine dans les cas de paludisme grave chez l'enfant et l'adulte.

• **Prophylaxie (31)**

○ **Lutte antivectorielle**

La lutte antivectorielle est essentiellement basée sur :

- ✓ L'aménagement de l'environnement destiné à diminuer le nombre de gîtes d'anopheles,
- ✓ 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 (MIILDA) [OLYSET®, PERMANET®] avec une efficacité de 5 ans.

✓ Les ports de vêtements imprégnés d'insecticides (utilisés par les armées)

Les répulsifs (insecticides ou répulsifs). Beaucoup de répulsifs sont disponibles sur le marché. Deux produits sont recommandables en pratique : le Diethyl Toluamide ou DEET et Icaridine (1-méthylpropylester ou KBR 3023)

- **Chimioprophylaxie (34)**

**Les pays du groupe A** : le risque de transmission du paludisme est limité dans ses pays.

La prophylaxie est de se protéger contre les piqûres des moustiques.

**Les pays du groupe B** : seul le *P. vivax* est une menace dans ses zones.

La prévention des piqûres des moustiques ainsi que la chimioprophylaxie par la Chloroquine sont les schémas prophylactique que propose l'OMS.

**Les pays du groupe C** : ils sont exposés au risque de transmission de *P. falciparum* et à la chloroquinorésistance ainsi qu'à la SP.

La prévention des piqûres des moustiques ainsi que la chimioprophylaxie par l'Atovaquone Proguanil ou la Doxycilline ou la Mefloquine sont les directives de l'OMS

**Les pays du groupe D** : le risque de transmission du paludisme à *P. falciparum*, conjugué à une polypharmacorésistance est signalée dans ses pays.

Toutefois, l'OMS recommande la prévention des piqûres des moustiques afin d'associer des traitements chimioprophylactiques comme l'Atovaquone Proguanil ; la Doxycilline ou la Mefloquine. Toutefois le choix des médicaments est fonction du type de pharmacorésistance signalée, des effets secondaires et des contre-indications.

Les personnes qui voyagent dans des zones rurales où le risque d'infection palustre est faible peuvent associer un traitement de réserve d'urgence à la prévention des piqûres de moustiques.

Dans certaines zones où sévit un paludisme polypharmacorésistant, la chimioprophylaxie par la Mefloquine n'est plus recommandée par l'OMS. Il s'agit du Cambodge, du sud-est du Myanmar et de la Thaïlande.

## 2.7 Diagnostic Biologique

### 2.7.1 Diagnostic de présomption (35)

L'hémogramme révèle une anémie de type hémolytique, normochrome ou hypochrome, avec ou sans réticulocytose. Au cours des accès aigus et dans les accès pernicioseux, on retrouve parfois une

hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, remplaçant la leuconéutropénie habituelle, une thrombopénie est en rapport avec la séquestration splénique des plaquettes, tandis que dans les accès de reviviscence et le paludisme viscéral évolutif, une leucopénie est de règle, de même qu'une thrombopénie et une hypergammaglobulinémie.

### 2.7.2 Diagnostic parasitologique (31)

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.

- **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** : il 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, bien que celui-ci soit plus sensible et plus rapide que le frottis mince (10 à 20 parasites par  $\mu\text{l}$  de sang), il ne permet pas l'identification facile de l'espèce de *Plasmodium* responsable de l'infection. L'analyse consiste en l'examen microscopique d'une goutte de sang (ponction digitale sur EDTA ou citrate) et qui a séché directement sur une lame après étalement, l'épaisseur étant un critère de qualité dans la recherche est largement utilisée pour le diagnostic de routine.

- **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.

Il va sans dire que ces examens nécessitent de la rigueur et de la précision, leur qualité étant conditionnée en grande partie par le temps qui leur sera accordé par l'analyste. Or, plus on diagnostique vite, meilleur est le pronostic pour le malade. Il faut donc trouver un juste équilibre entre la rapidité de la prise en charge et l'exactitude des résultats. Ils demeurent, malgré les aléatoires qui les entourent (matériel, personnel, compétences), des tests très efficaces.

### 2.7.3 Diagnostic immunologique

- **ELISA et IFI**

Ces méthodes constituent le diagnostic indirect du paludisme.

Le principe d'IFI (immunofluorescence indirecte) 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 substituer le diagnostic parasitologique direct, du fait que les anticorps apparaissent avec un retard de plusieurs jours sur la parasitémie et disparaissent plutard. Ne peuvent être utilisés pour un diagnostic de routine, mais surtout plus à des fin de recherches (15).

- **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 fabricants 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.

## 2.8 Polymorphisme du *P. falciparum* (36)

L'ADN de *P. falciparum* comporte 25 à 30x 10<sup>6</sup> paires de bases réparties sur 14 chromosomes de tailles différentes. Les événements génétiques et les pressions immunitaires sont à l'origine de l'émergence de polymorphisme au niveau des antigènes du *Plasmodium* chez lequel les gènes de polymorphisme les plus utilisés pour la différenciation des clones infectants sont :

- **MSP1**: localisé sur le chromosome 9, ce gène comporte 17 blocs et code pour une glycoprotéine de surface du mérozoïte de 190 kDA (Merozoïte Surface Protein 1). La variabilité du bloc 2 (KI, MAD20, R033) sert à la différenciation des clones de *P. falciparum*
- **MSP2**: ce gène situé sur le chromosome 2 et est divisé en 5 blocs et code pour une glycoprotéine de surface de 28 kDA (Merozoïte surface Protein 2). La variabilité du bloc 3 (IC/3D7 ou FC27) est utilisée pour différencier les clones de *P. falciparum*.
- **GLURP** : Glutamate Rich Protein.
- **Microsatellites**: PFPK2, TA1, Poly $\alpha$ , 2490, TA81, TA60 et TA40

Ces gènes codent pour des glycoprotéines de surface impliquées soit dans la virulence du parasite soit dans la réponse immunitaire ou dans l'émergence de souches plasmodiales résistantes.

## Les marqueurs microsatellites (37)

Les microsatellites sont des séquences d'ADN constituées de répétition en tandem d'un motif de 1 à 6 paires de bases. Grâce à leurs caractéristiques, aussi bien biologiques que techniques, ces loci sont des marqueurs de choix pour l'analyse de la diversité entre races.

Le polymorphisme de ces séquences est un polymorphisme de longueur qui est dû à la variation du nombre de répétitions du motif de base. Les microsatellites présentent une répartition homogène sur le génome, ils sont codominants, multialléliques et à priori neutres vis-à-vis du processus de sélection. En plus de ces caractéristiques, ces marqueurs sont très polymorphes du fait d'un taux de mutation très



élevé car en moyenne, on peut considérer que ce taux est d'environ  $10^{-4}$  mutations par locus, par gamète et par génération.

En effet, le génotypage des microsatellites est basé sur l'utilisation de la technique PCR, procédure relativement simple et rapide, suivie d'une migration des fragments amplifiés sur gel d'acrylamide. Plusieurs locus peuvent être étudiés simultanément quand les amorces utilisées sont marquées par des fluorophores de couleurs différentes (PCR multiplex). Ces caractéristiques techniques favorisent ainsi la réalisation d'études de populations à grande échelle à l'aide des microsatellites.

Ces marqueurs sont largement utilisés dans les études de caractérisation des espèces.

Par ailleurs, l'une des applications les plus développées, à l'heure actuelle, des microsatellites, chez le *Plasmodium*, est la signalisation des vrai cas de recrudescences.

En effet, les erreurs d'appariement sont fréquentes dans les régions de répétitions en tandem, compte tenu de la forte homologie de séquences entre les répétitions.

## 2.9 Le séquençage par la méthode de SANGER

Le séquençage est l'opération qui consiste à déterminer la séquence des bases d'un fragment d'ADN donné. La technique a été mise au point par Sanger en 1977. Il a mis au point des nucléotides dit terminateur ; lorsque l'un d'entre eux est ajouté au brin néosynthétique, l'ADN polymérase arrête la synthèse, elle ne peut plus ajouter de nucléotide. Il s'agit de didésoxynucléotide ne possédant pas de groupement hydroxyle en 3'. L'absence de ce groupement ne permet plus la formation d'une liaison phosphodiester et la synthèse d'ADN est stoppée (38).

En plus de la technique de séquençage développée par Sanger, il existe d'autres techniques de telle que : séquençage de Gilbert Maxam, la pyroséquençage, séquençage Illumina.

## 2.10 La résistance aux antipaludiques

Malgré les travaux de développement et la mise en place de nouvelles politiques thérapeutiques antiplasmodiales, *P. falciparum* s'est continuellement adapté et a développé des résistances, y compris contre les dernières combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (39–41).

Les mutations apparaissent fortuites dans le génome de *Plasmodium*, avec des taux variables mais indépendamment de la pression médicamenteuse. Le grand nombre de divisions cellulaires réalisé par *Plasmodium* au cours de la méiose dans le vecteur anophèle et de la mitose chez l'hôte Humain favorise la multiplication de ces mutations (5).

Des études d'investigations d'isolats de terrain, de croisements génétiques et de gènes candidats ont permis d'identifier les gènes auteurs de la résistance à la plupart des antipaludiques. Ces gènes ou

marqueurs moléculaires permettent ainsi, de mettre en évidence l'émergence d'une résistance sur le terrain et d'évaluer sa diffusion afin d'adapter au mieux les politiques de traitement (5).

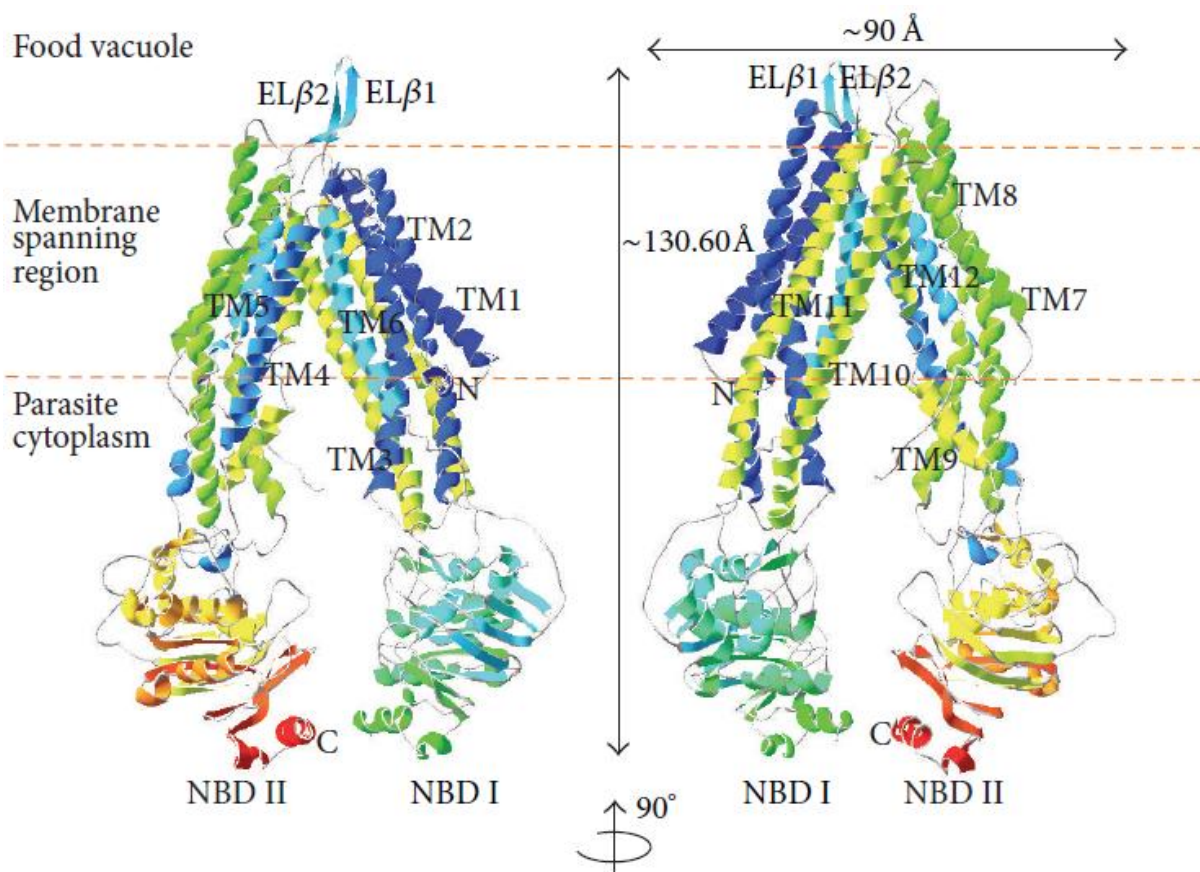
**Tableau III:** Les classes d'antipaludiques, leurs cibles et gènes de résistance (5)

Classe d'antipaludiques	Molécule	Cible	Gène de Résistance
<b>Agents lysosomotropes</b>			
Quinoléines	Chloroquine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>Pfcr1</i> <i>Pfmdr1</i>
	Quinine		<i>Pfmdr1</i> autre
	Méfloquine		<i>Pfmdr1</i> autre
	Amodiaquine		<i>Pfmdr1</i> <i>pfcr1</i>
	Halofantrine		<i>Pfmdr1</i> autre
	Luméfantrine		<i>Pfmdr1</i>
	Endopéroxydes naturels et dérivés semi-synthétiques		Artémisinine
Artésunate		<i>Pfmdr1</i> autre	
Artémether		<i>Pfatpase6</i>	
<b>Agents non lysosomotropes</b>			
Sulfamides	Sulfadoxine	DHPS (dihydropteroase synthetase)	<i>Pfdhps</i>
Diaminopyridines	Pyriméthamine	DHFR (dihydrofolate réductase)	<i>Pfdhfr</i>
Hydroxy naphtoquinone	Proguanil		
	Atovaquone	Cytochrome b	<i>Pfcytb</i>

Le gène *Pfmdr1* (*P. falciparum* multi-drug resistance), initialement évoqué comme gène candidat de la résistance à la chloroquine, a été identifié en recherchant des homologues de la famille des transporteurs MDR (multidrug resistance) impliqués dans la résistance des cellules cancéreuses de mammifères (42). Ce gène *Pfmdr1*, situé sur le chromosome 5, code pour un second transporteur, *P. falciparum* P-glycoprotein homologue 1 (*Pgh1*) localisé dans la membrane de la vacuole digestive

avec son domaine de liaison à l'ATP dirigé vers le cytoplasme (43). Chez le *Plasmodium*, ce transporteur induirait un mécanisme auxiliaire permettant aux molécules d'entrer dans la vacuole digestive. Cinq mutations ponctuelles (Polymorphisme mononucléotidique SNP), N86Y, Y184F, S1034C, N1042D et D1246Y, ont été détectés et altèreraient les propriétés physicochimiques de Pgh1 du fait de substitutions par des acides aminés plus polaires. Ces modifications affecteraient ainsi la capacité de liaison et le transfert de molécules (44) et influenceraient la sensibilité à la Lumefantrine, l'Artemether, la Quinine, la Mefloquine, l'Halofantrine et la Chloroquine (45,46).

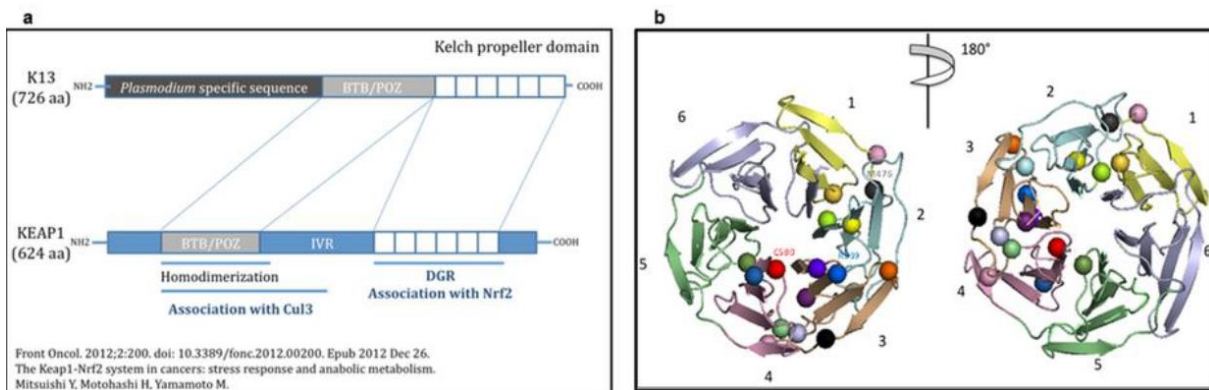
Bien que des mutations clés du gène *Pfmdr1* affectent la sensibilité à différents antipaludiques ciblant la vacuole digestive, la résistance de *P. falciparum* à la Mefloquine, à l'Halofantrine, à la Lumefantrine et à la Quinine, mais non à la Chloroquine (5) est également associée à la duplication/amplification du gène *Pfmdr1* (5). Cette duplication a pour conséquence de réduire la concentration intracellulaire en antipaludiques. Les mécanismes à l'origine de ce phénomène (réduction de l'entrée ou augmentation de l'efflux de molécules) restent pour l'instant inconnus.



**Figure 17: Modèle 3D de *Pfmdr1* développé (47)**

La résistance aux dérivés d'Artémether est très surveillée car ces molécules jouent un rôle crucial dans la politique actuelle de traitement du paludisme. La résistance à l'Artémether se caractérise par une augmentation des échecs aux traitements et une diminution des clairances parasitaires. Des tentatives

de sélection *in vitro* de la résistance à l'Artémether avaient initialement identifié une amplification de *Pfmdr1* chez les parasites sélectionnés. Des études génomiques d'isolats avaient ensuite associé des régions sur le chromosome 13 avec une clairance parasitaire retardée (48). Enfin, une approche combinant sélection *in vitro* de la résistance et analyse génomique a permis de mettre en évidence un polymorphisme sur le gène *Pf3D7\_1343700* du chromosome 13, *Pfkelch13*, qui corrélait avec une diminution des clairances parasitaires en Asie du Sud-Est (49).



**Figure 18:** Représentation schématique de K13 et son orthologue humain KEAP1 (49)

(a) Modélisation 3D de la structure de K13 (b) Les cercles représentent les différentes mutations.

Aujourd'hui, 186 mutations différentes dont 108 non synonymes, ont été rapportées en Asie du Sud-Est (50). La mutation dominante au Cambodge, Vietnam et Laos est C580Y (prévalence ~ 50%) alors qu'en Thaïlande, au Myanmar et en Chine, elle est peu représentée, la principale mutation étant F446I (avec 20% de prévalence) (50). Des études de génération de souches mutantes K13 ont permis de révéler des niveaux de résistance différents en fonction de la mutation introduite : les mutations R539T et I543T confèrent un niveau de résistance plus important que les mutations M476I, C580Y et Y493H (12). De plus, les niveaux de résistance induits par une mutation sont influencés par le fond génétique des souches dans lesquelles elles sont présentes. En Afrique, les mutations de *PfK13* restent rares, variées (50,51), différentes de celles observées en Asie et n'ont jamais été associées à des valeurs de demi-vies parasitaires ou de taux de survie au RSA0-3h (test de survie du stade « ring » synchronisé entre 0 et 3 heures) augmentées, ou à des échecs cliniques (4).

Ainsi, différentes mutations de *PfK13* confèrent une résistance à l'Artémisinine mais les mécanismes intervenant ne sont pas encore élucidés. *PfK13* est décrit comme l'orthologue du gène *keap 1* chez l'Homme, qui code pour une protéine séquestrant de façon constitutive, le facteur de transcription Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) sur la membrane cellulaire. Soumis à un stress oxydatif, le complexe Nrf2/KEAP1 (kelch-like ECH-associated protein 1) est clivé et Nrf2 transloque vers le noyau où il induit la transcription des gènes impliqués dans la protection cellulaire au stress. On suppose que la protéine codée par le gène K13 pourrait avoir des fonctions similaires à KEAP1

chez *P. falciparum* en délivrant un potentiel facteur de transcription à une ubiquitine ligase pour qu'il devienne la cible de la dégradation. Lors d'un stress oxydatif, K13 libérerait le facteur de transcription qui, ainsi, ne serait plus dégradé par le protéasome mais s'accumulerait dans le noyau pour réguler positivement environ 200 gènes impliqués dans les réponses au stress oxydatif, tel que celui induit par un traitement à l'Artémisinine (49). Dans les parasites résistants à l'Artémisinine, les mutations sur le gène K13 empêcheraient, de façon constitutive, l'interaction de K13 avec son partenaire et provoqueraient la dérégulation de la réponse anti-oxydante.

Une étude transcriptomique d'isolats de *P. falciparum* en Asie du Sud Est a permis d'étayer cette hypothèse (52). L'équipe de **Mok et coll.** a, en effet, été capable d'associer la résistance à l'Artémisinine à une surexpression de la voie « unfolded protein response » (UPR) et à un retard de progression du cycle intra-érythrocytaire, permettant aux parasites de réparer les protéines endommagées avant de progresser dans le cycle cellulaire (53). Récemment, un autre modèle de mode d'action des Artémisinines a été proposé, qui cibleraient un partenaire de K13, la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) de *P. falciparum* (53). Dans les parasites sensibles à l'Artémisinine, *PfK13* serait fixé à PI3K pour que cette dernière devienne la cible de la dégradation par le protéasome, limitant les réserves en PI3-phosphate (PI3P). Ainsi les parasites soumis à l'inhibition de la PI3K lié à la présence de l'Artémisinine ne peuvent plus générer des taux de PI3P suffisants et nécessaires à leur croissance. L'étude a montré qu'une mutation de *Pfkelch13* en empêchant l'ubiquitinylation de *PfPI3K*, provoquait son accumulation ainsi que celle du PI3P, conférant ainsi aux parasites, la résistance à l'Artémether. Il est à noter qu'une augmentation du produit PI3P seul est suffisante pour attribuer la résistance à l'Artémether des parasites porteurs d'un gène *Pfkelch13* sauvage. Enfin il a été mis en évidence par des études *in vitro* que les parasites survivant à une exposition courte d'Artémether, à une concentration sub-létale, présentaient un retard de progression de leur cycle érythrocytaire (54).

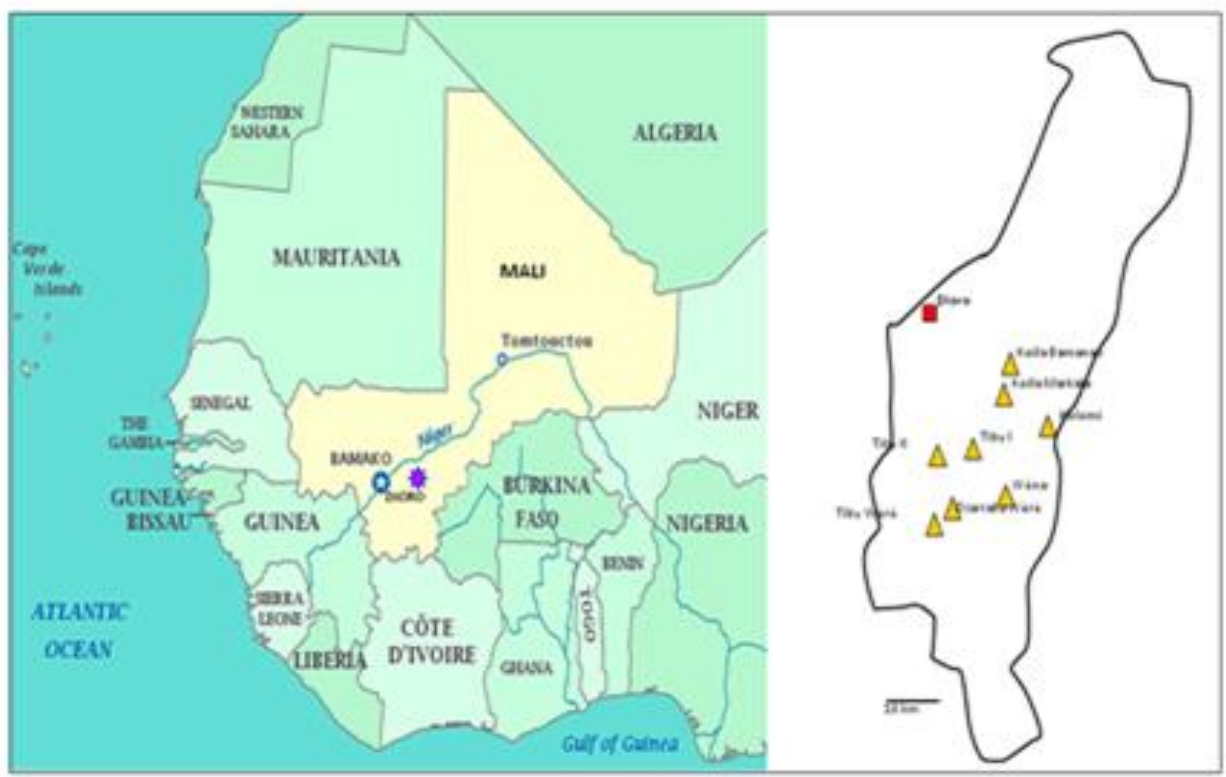
# **METHODOLOGIE**

### 3 METHODOLOGIE

#### 3.1 Lieu de l'étude

L'étude s'est déroulée dans la commune rurale de Dioro qui relève du district sanitaire de Markala dans la région de Ségou. La commune de Dioro est située à 60 km du côté-Est du cercle de Ségou, elle est limitée :

- Au Nord, par le fleuve Niger ;
- Au sud, par les communes de Diouna et Cinzana ;
- A l'Est, par les communes de Diédougou et de Kamiandougou;
- A l'Ouest, par la Commune de Farakou-Massa.



**Figure 19:** Cartographie de la zone irriguée de Dioro

Source : IGM (Institut Géographique du Mali).

Dioro est une commune rurale qui de par sa situation géographique héberge le paludisme par milliers de cas surtout pendant la saison pluvieuse. Pendant cette saison, le paludisme touche pratiquement toutes les couches de la société, mais les enfants sont les plus touchés pour de multiples raisons.

La commune rurale de Dioro dispose d'un CSCom bien établi (en ressources matérielles et humaines) accessible pour tous les villages environnants.

Le CSCom dispose d'un laboratoire équipé dont les capacités ont été renforcées par le LBMA dans le cadre de l'exécution du programme ICEMR en Afrique de l'Ouest.

Ces caractéristiques ont fait de Dioro un des sites qui répondait le mieux à nos attentes pour cette étude.

### 3.2 Type et période de l'étude

Il s'agissait d'une étude prospective qui s'est déroulée de Mai 2012 à Mai 2017. Lors de cette étude, les activités étaient beaucoup plus concentrées sur la période de transmission intense du paludisme, c'est-à-dire entre Mai et Novembre.

### 3.3 Enrollement des patients

#### 3.3.1 Critères d'inclusion et de non inclusion

- **Critères d'inclusion**

- Lame positive à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 2000 et 199999 p/ $\mu$ l ;
- Patients vivant dans un rayon de 5 km ;
- Patients âgés de 2 à 15 ans ;
- 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 donné.

- **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 8 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) ;
- Prostration (incapacité à marcher, à s'asseoir) ;
- Participation antérieure à la même étude ;
- Infection au VIH détectée par interrogatoire ;
- Antécédents d'hypersensibilité à l'Artéméter, à la Luméfantrine ;
- Incapable d'avaler oralement des médicaments, vomissement de la première dose et de la dose administrée à 30 minutes d'intervalle ;
- Autres maladies telle que la pneumonie, ou une malnutrition sévère, l'insuffisances cardiaques ou rénales chroniques, cancer, diabète, maladie chronique compromettant la vie.



### 3.3.2 Enrollement proprement dit dans l'étude

Les patients étaient tous des enfants âgés de 2 à 15 ans. A leur arrivée au centre de santé, les enfants étaient soumis à un examen clinique puis à un test de diagnostic rapide (TDR) et en fin une goutte épaisse / frottis mince pour confirmer l'accès palustre simple à *P. falciparum*. Après l'obtention du consentement ou de l'assentiment de l'accompagnant du malade ou des parents du malade, un prélèvement de sang veineux était fait. Ce sang servait à réaliser les différents tests *in vitro*. Après le prélèvement sanguin, le patient prenait sa dose de Coartem® qui était relative à son poids.

- **Diagnostic du paludisme**

- **Diagnostic Clinique**

Les patients étaient soumis à un examen clinique au CSCoM, à la recherche d'éventuels symptômes du paludisme. Le patient était 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 patient revenait 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 matériels comme :

- ✓ Un nouveau sachet de test non ouvert ;
- ✓ Un nouveau tampon imbibé d'alcool à 70 degré 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 et 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 :

**Etape 1 : Prélèvement du patient**

**Matériel nécessaire:**

- ✓ Lames d'examen de microscope ;
- ✓ Lancette stériles à usage unique ;
- ✓ Méthanol ou éthanol ;
- ✓ Coton hydrophile ;
- ✓ Crayon gras ou stylo graveur.

• **Procédure de prélèvement**

Chez les enfants le prélèvement se faisait au niveau 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> doigt et se faisait sur le côté qui est moins sensible.

- ✓ Nettoyer l'endroit choisi avec un tampon de coton imbibé d'alcool et avec un tampon sec pour enlever toute trace d'alcool ;
- ✓ Puis piquer d'un coup sec et rapide avec une Lancette stérile ;
- ✓ Jeter la lancette dans la boîte de sécurité ;
- ✓ Nettoyer les premières de sang avec du coton sec ;
- ✓ Tenir d'une main la lame étiquetée par les bords et de l'autre main le doigt piquer pour faire sortir une goutte de sang ;
- ✓ déposer délicatement la 2<sup>ème</sup> goutte de sang au centre de la lame étiquetée pour la goutte épaisse et vers le haut pour le frottis mince ;

- ✓ 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
  - ✓ 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.

**Etape 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 parasités.

Un paludisme à *P. falciparum* est considéré comme sévère quand le nombre d'hématies parasitées est supérieur à 100000 par  $\mu\text{L}$ , l'accès pernicieux est probable au-delà de 150000 par  $\mu\text{L}$  et une parasitémie supérieure à 400000 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:

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

Le pourcentage d'hématies parasitées était aussi déterminé pour la culture *in vitro* des parasites.

$$\text{Nombres d'hématies parasitées} = \frac{\text{Nombres de parasites par } \mu\text{L}}{45\,000}$$

**Équation 2:** Formule pour le calcul du nombre d'hématies parasitées

- **Assentiment des parents ou consentement des patients**

Le consentement libre et éclairé (assentiment) de la prise du sang et de la participation volontaire au suivi des 42 jours (jours 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35 et 42) fut obtenu des patients répondant aux critères d'enrôlement. Nous, investigateurs, avons eu à :

- ✓ Expliquer le protocole à chaque patient ou au parent ;
- ✓ Répondre aux questions des patients ou des parents ;
- ✓ Obtenir un consentement/assentiment libre, éclairé et signé ;
- ✓ Prélever le sang ;
- ✓ Remettre une copie originale du consentement/assentiment signé au sujet lui-même ou au parent.

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

### 3.4 Suivi des patients

Les patients enrôlés dans l'étude étaient suivis pendant 42 jours (J).

Pendant les 42 jours ils venaient au CSCCom les J0 ; J1 ; J2 ; J3 ; J7 ; J14 ; J21 ; J28 ; J35 et J42 soit dix (10) rendez-vous au total. Pendant J0 ; J1 et J2 les patients prenaient leurs doses de Coartem® puis subissaient des examens cliniques.

#### 3.4.1 Plan de suivi

Le tableau ci-dessous illustre les examens effectués lors du suivi des sujets par rendez-vous.

**Tableau IV:** Plan de suivi des patients durant les 42 jours

Visites	J0	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42
Examen Clinique	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Prise de température	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Goutte épaisse	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Frottis mince + TDR	X									
Traitement avec ART+LUM	X	X	X							
Prélèvement sang veineux	X				*	*	*	*	*	*
Confettis	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Glycérolyte/Cryoconservation	X				*	*	*	*	*	*
Taux d'hémoglobine	X							X		
Glycémie	X									

\* en cas de parasitémie, un prélèvement veineux est effectué.

#### 3.4.2 Collecte des échantillons

Les lames des gouttes épaisses et des frottis minces 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 trouve: l'identifiant, le numéro de suivi, la date, le numéro de la lame.

Comme l'illustre le tableau ci-dessus, un confetti se faisait à chaque visite. Sur le confetti du patient se trouvaient également ses informations. Après le dépôt des gouttes de sang dans les cercles de spots, les confettis étaient séchés à l'abri de poussière et des mouches avant de les introduire dans des enveloppes

afin de les protéger de la poussière. Nous faisons au minimum trois (03) spots par confetti et par patient.

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

### 3.5 Méthodes moléculaires

Les travaux moléculaires ont été réalisés au LBMA et au CDC (Atlanta, Georgia, USA)

L'extraction de l'ADN a été réalisée avec le kit Qiagen. Elle a été faite conformément aux instructions du fabricant.

#### 3.5.1 Analyse des microsatellites neutres

- **Principe**

Les microsatellites sont des répétitions en tandem d'un à six nucléotides dans une séquence d'ADN. Les loci des microsatellites ont généralement une longueur comprise entre cinq et quarante répétitions, les plus courantes des répétitions sont les dinucléotidiques, trinucleotidiques et tétranucleotidiques. Le génotypage des microsatellites est basé sur l'utilisation de la technique PCR, procédure relativement simple et rapide, suivie d'une migration des fragments amplifiés sur gel d'acrylamide. Plusieurs locus peuvent être étudiés simultanément quand les amorces utilisées sont marquées par des fluorophores de couleurs différentes (PCR multiplex) (37).

- **Matériels**

- ✓ Poste de travail PCR / UV ;
- ✓ Centrifugeuse ;
- ✓ Réfrigérateur ;
- ✓ Congélateur ;
- ✓ Analyseur génétique Applied Biosystems 3130 xl;
- ✓ Ordinateur avec programme GeneMapper® ;
- ✓ Mélangeur Vortex-Genie;
- ✓ Pipettes 1-20 µL, 10-200 µL et 100-1000 µL;
- ✓ Une pipette multichannel 1-20 µL si disponible;
- ✓ Embouts stériles de micropipettes ;
- ✓ Plaque PCR Optical de 96 puits;
- ✓ Tubes en strip;
- ✓ Support pour tube en strip;
- ✓ Tenue de sécurité (gants, blouses de laboratoire) ;

- ✓ Microtubes de 1,5 mL.

- **Réactifs**

- ✓ Master Mix 2X (Promega, Madison WI) ;
- ✓ HiDi formamide. (Applied Biosystems, Warrington UK) ;
- ✓ Eau distillée.
- ✓ Standard GeneScan ROX-350 (Applied Biosystems, Warrington UK) ;
- ✓ 10 µM de Solution de travail de chaque amorce microsatellite neutre

**Tableau V:** Séquence des amorces utilisées pour le genotypage des quatre marqueurs microsatellites

Locus	Chromosome	Positions sur le chromosome	Amorces	Séquence	Séquences répétées	Fluorophores	Taille du produit chez 3D7
TA1	6	900.037-900.054	Neu1-TA1-F	CTACATGCCTAATGAGCA	TA	HEX	185 bp
		899.846-899.863	Neu1-TA1-R	TTTTATCTTCATCCCCAC			
		900.014-900.031	Neu1-TA1-F-HEX	CCGTCATAAGTGCAGAGC			
Poly α	4	532.315-532.332	Neu3-Poly α-F	AAAATATAGACGAACAGA	ATT	FAM	150 bp
		532.133-532.150	Neu3-Poly α-R	ATCAGATAATTGTTGGTA			
		532.182-532.199	Neu3-Poly α-R-FAM	GAAATTATACTCTACCA			
PFPK2	12	1.611.373-1.611.390	Neu7-PFPK2-F	CTTTCATCGATACTACGA	TAA	HEX	170 bp
		1.611.149-1.611.166	Neu7-PFPK2-R	CCTCAGACTGAAATCCAT			
		1.611.220-1.611.237	Neu7-PFPK2-R-HEX	AAAGAAGGAACAAGCAGA			
2490	10	458.210-458.227	Neu12-2490-F	TTCTAAATAGATCCAAAG	TAAA, GAAA/T	FAM	82 bp
		458.332-458.349	Neu12-2490-R	ATGATGTGCAGATGACGA			
		458.276-458.292	Neu12-2490-R-FAM	AGAATTATTGAATGCAC			

- **Préparation du MASTER MIX**

Un mélange réactionnel contenant les réactifs suivants : *Taq* polymérase, du tampon, dNTPs et de MgCl<sub>2</sub> a été préparé.

- **Mode opératoire**



Quatre loci microsatellites à répétition trinuécléotidique situés sur des chromosomes distincts ont été choisis dans le génotypage des échantillons de sang sur papier filtre. Les amorces ont été conçues pour une PCR multiplex (tableau V). Les amorces ont été marquées à l'extrémité 5' avec un fluorophore HEX ou 6-FAM et une "queue" GTGTCTT 5' a été ajoutée aux amorces inverses pour favoriser l'addition d'une base d'adénosine supplémentaire pour une taille de produit de PCR plus uniforme.

Les loci *TA1*, *Poly-a*, *PfPK2*, et *2490* ont été utilisés

La PCR nichée : elle a été réalisée en deux étapes :

Un volume total de 15µl a été utilisé pour chaque réaction avec 1µl de la suspension d'ADN, 1X MASTER MIX et 0,5 µM de dilution de chaque amorce.

### Les conditions des cycles de la PCR NICHEE

#### 1<sup>ère</sup> Réaction

94°C	2:00min	} 25X
94°C	0:30min	
42°C	0:30min	
40°C	0:30min	
65°C	0:40min	
65°C	2:00min	
4°C	∞	

#### 2<sup>ème</sup> réaction

94°C	2:00min	} 25X
94°C	0:30min	
45°C	0:30min	
65°C	0:40min	
65°C	2:00min	
4°C	∞	

- **Séparation et détection des fragments sur gel.**

La séparation et la détection des microsatellites amplifiés ont été faite par électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique (**ABI 3130 xl Genetic Analyzer**).

Un volume de 1,5 µl du produit de PCR a été injecté dans les puits capillaires remplis de HiDi formamide (10,5 µl), qui sous l'influence d'un champ électrique a séparé les fragments d'ADN. La taille de ces fragments était déterminée par leur vitesse de migration dans les capillaires. Les résultats bruts ont été interprétés à l'aide du **logiciel GeneMapper®**, qui identifiait la taille des allèles de chaque locus.

### 3.5.2 Séquençage du gène *PfK13*

Nous avons utilisé un protocole de PCR nichée modifié pour l'amplification du domaine propeller du gène *PfK13* et le séquençage de Sanger en utilisant des amorces précédemment rapportées.

- **Procédure de réalisation de la PCR nichée**

**Tableau VI :** Composition du mélange réactionnel de la 1<sup>ère</sup> réaction

Réactifs	Pour 20.0µL de réaction	Concentration final
ddH <sub>2</sub> O	12,4µL	-----
5X HF tampon	4,0µL	1X
10µM 1° Amorce allée	1,0µL	0,5µM
10µM 1° Amorce retour	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>	

Diluer le produit de PCR de la 1<sup>ère</sup> réaction au 1:10

**Tableau VII:** Composition du mélange réactionnel de la 2<sup>ème</sup> réaction

Réactifs	Pour 20.0µL de réaction	Concentration final
ddH <sub>2</sub> O	12,4µL	-----
5X HF tampon	4,0µL	1X
10µM 2° Amorce allée	1,0µL	0,5µM
10µM 2° Amorce retour	1,0µL	0,5µM
10mM DNTPs	0,4µL	0,2µM
HF Phusion Taq	0,2µL	1U
Diluât (1:10) 1°RxN	1,0µL	-----
<b>TOTAL</b>	<b>20,0µL</b>	

### Les conditions du cycle de la PCR nichée

1 <sup>ère</sup> Réaction		2 <sup>ème</sup> réaction	
98°C	2:00min	98°C	2:00min
98°C	0:10min	98°C	0:10min
48°C	0:30min	54°C	0:30min
68°C	2:30min	68°C	2:30min
68°C	10:00min	68°C	10:00min
4°C	∞	4°C	∞

30X

Le produit de PCR de la deuxième réaction contient le *Propeller Domain* 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.

#### Lavage avec ExoSAP (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 VIII:** Master Mix du ExoSAP (exonuclease +phosphatase alcaline)

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

#### Purification de l'amplicon étape par étape :

- Préparer le master mix selon le schema precedent ;
- Ajouter 5µL de ce Master Mix à chaque échantillon de 20µL de la deuxième réaction ;
- Placer les tubes dans le thermocycler puis lancer le cyclage comme illustrés ci-dessous.

Les conditions du cycle de purification par ExoSAP

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

### Cycle de séquençage

Cette étape doit être lancée dans une plaque

**Tableau IX:** Composition du mélange réactionnel du séquençage

Réactifs	Pour 10,0µL de réaction	concentration final
ddH <sub>2</sub> O	5,5µL	-----
Big dye tampon	2,0µL	0,5µM
Big Dye	1,0µL	0,5µM
10µM 2° amorce retour	0,5µL	0,5µM
Diluat (1:5) 2°RxN	1,0µL	-----
<b>TOTAL</b>	<b>10,0µL</b>	

### Conditions des cycles de séquençage

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

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

### Précipitation :

Il faut disposer de :

- EDTA 0,125M pH=8,0
- Sodium Acetate 3M pH=5,2
- Ethanol 70% et 100% tous froids
- HiDi Formamide congelé
- Kimwipes
- Seal pour fermer les plaques
- Centrifugeuses avec portoirs de plaques

### Procédure de precipitation

1. Ajouter 2,0µL d'EDTA 0,125M pH=8 dans chaque puits de la plaque contenant un échantillon ;
2. Ajouter 2,0µL de sodium acétate pH=5,2 dans chaque puits ;
3. Ajouter 30,0µL 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 3200 rpm 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 30,0µL 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 3200rpm 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 10,0µL de HiDi Formamide dans chaque puits de la plaque, couvrir la plaque et passer au séquençage propement dit. Pour les puits qui ne contiennent pas d'échantillon, on peut mettre de l'eau distillée.

### 3.5.3 Séquençage du gène *Pfmdr1* aux regions 1 et 2

- **Procédure de séquençage du gène *Pfmdr1***

Le séquençage des deux régions de *Pfmdr1* est identique en termes de méthodes et similaire au séquençage du gène *PfK13* en terme de procédures.

**Remarque** : il n'y a pas besoin de faire une PCR nichée après l'amplification primaire. Juste procéder au traitement avec ExoSap et séquençer 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 séquençer 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.

#### 1<sup>ère</sup> réaction pour la Région 1

**Tableau X:** Liste des amorces utilisées lors de la PCR nichée

Amorces Région 1	Amorces Région 2
------------------	------------------

<b>AL6875(Forw):</b> 5'-CCGTTTAAATGTTTACCTGCAC-3'	<b>AL6792(Forw):</b> 5'-GCATTTAGTTCAGATGATGAAATG-3'
<b>AL6876(Rev):</b> 5'-TGGGGTATTGATTTCGTTGCAC-3'	<b>AL6793(Rev):</b> 5'-CCATATGGTCCAACATTTGTATC-3'

**Tableau XI:** Composition du mélange réactionnel de la première réaction

Réactifs	Pour 15,0µL de réaction	Concentration final
ddH <sub>2</sub> O	5,7µL	-----
2X TaqMan tampon	7,5µL	1X
10µM 1° amorce allée	0,4µL	0,5µM
10µM 1° amorce retour	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.

### 2<sup>ème</sup> réaction

**Tableau XII:** Composition du mélange réactionnel de la deuxième réaction

Réactifs	Pour 15,0µL de réaction	Concentration final
ddH <sub>2</sub> O	4,7µL	-----
2X TaqMan tampon	7,5µL	1X
10µM 2° amorce allée	0,4µL	0,5µM
10µM 2° amorce retour	0,4µL	0,5µM
Diluat 1°RxN ADN	2,0µL	-----
<b>TOTAL</b>	<b>15,0µL</b>	

Le produit de PCR de la deuxième réaction contient la region1 ou 2 du *Pfmdr1*.

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

### Conditions des Cycles de la PCR

#### Région 1

#### Région 2

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

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

### Purification par le kit ExoSAP cleaning:

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 XIII:** Master Mix du ExoSAP

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

### Nettoyage étape par étape :

- Préparer le master mix selon ;
- Ajouter 5µL de ce Master Mix à chaque échantillon de 15µL de la deuxième réaction ;
- Placer les tubes dans le thermocycler puis lancer les conditions de cycling comme illustrés dans le tableau ci-dessous

### Condition du cycle de purification ExoSAP cleaning

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

Le produit de purification de la PCR nichée est par la suite utilisé pour réaliser le séquençage proprement dit.

### Cycle de séquençage

**Tableau XIV:** Liste des amorces utilisées pour le séquençage proprement dit du gène *Pfmdr1*

Amorces Région 1	Amorces Région 2
------------------	------------------

<b>AL6877(F):</b> 5'-GTATGTGCTGTATTATCAGGAG-3'	<b>AL6794(F):</b> 5'-TATGCATACTGTTATTAATTATGG-3'
<b>AL6878(R):</b> 5'-AGCCTCTTCTATAATGGACATG-3'	<b>AI6795(R):</b> 5'-TTCGATAAATTCATCTATAGCAG-3'

### Master Mix du Cycle de séquençage

Cette étape doit être lancée dans une plaque

**Tableau XV:** Composition du mélange réactionnel du séquençage

Réactifs	Pour 10,0µL de réaction	Concentration final
ddH <sub>2</sub> O	4,5µL	-----
Big dye tampon	2,0µL	0,5µM
Big Dye	1,0µL	0,5µM
10µM 2° amorce retour	0,5µL	0,5µM
2°RxN produit de Purification	2,0µL	-----
<b>TOTAL</b>	<b>10,0µL</b>	

### Conditions des cycles du séquençage de la Region1 et Region2 du gène *Pfmdr1*

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

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



### Précipitation :

Il faut disposer de :

- EDTA 0,125M pH=8,0
- Sodium Acetate 3M pH=5,2
- Ethanol 70% et 100% tous froids
- HiDi Formamide congelé
- Kimwipes
- Seal pour fermer les plaques
- Centrifugeuses avec portoirs de plaques

### Procédure de précipitation:

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 15-20 minutes ;
5. Centrifuger a 3200 rpm 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 3200rpm 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.

#### 3.5.4 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* tandis que les souches *P.falciparum* 3D7 ont été utilisées 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 par Geneious pour voir les mutations.

### 3.6 Considérations éthiques et déontologiques

Le protocole de recherche de cette étude a été soumis à l'accord du Comité d'éthique de l'INRSP, (Ministère de la Santé, Mali). Le protocole a été revu et approuvé par le comité institutionnel d'éthique de Tulane University (Nouvelle Orléans, Louisiane, États-Unis d'Amérique) et du NIAID/NIH (le sponsor de cette étude). Tout changement ultérieur du protocole était soumis à l'approbation de ces comités d'éthique. C'est 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.

Tous les documents de l'étude (y compris les codes de nos données) qui sont gardés dans un lieu sécurisé, et les échantillons de sang sont étiquetés avec un code unique sans le nom du patient. Seuls les membres du personnel de recherche avaient accès aux mots de passe.

Une compensation pour le temps perdu pour le travail journalier et les coûts liés au transport (aller-retour) vers le centre pour les visites de suivi a été assurée et le montant s'élevait à 2500 f CFA par visite.

### 3.7 Gestion et l'analyse des données

Les données ont été saisies et enregistrés dans le logiciel Excel. L'analyse des données a été faite avec le logiciel **SPSS IBM version 23** et **Microsoft office Excel**. Nous avons utilisé  $X^2$  avec  $\alpha = 5\%$  pour vérifier s'il y a une différence entre les proportions trouvées. Les séquences obtenues des réactions de séquençage de *Pfk13* et *Pfmdr1* ont été analysées avec le logiciel Geneious R10.

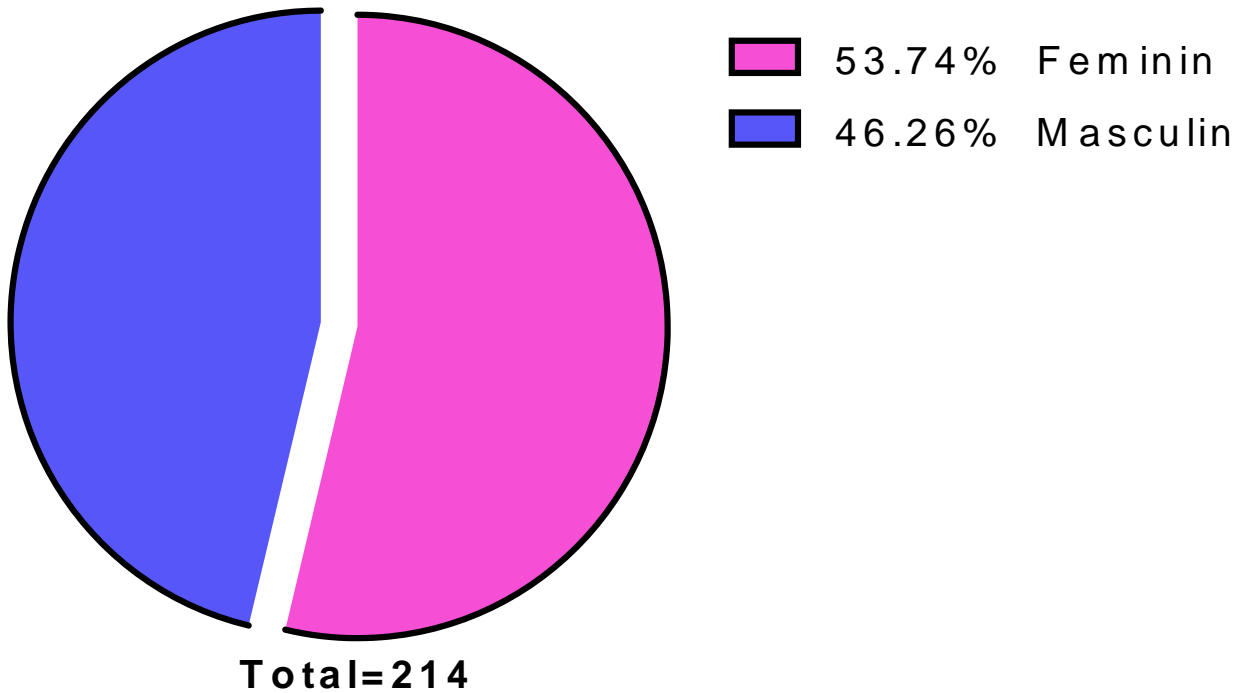
L'interprétation des résultats de microsatellites neutres était faite avec le **logiciel GeneMapper®**, de la manière suivante : Seuls les pics espacés à des intervalles correspondant aux répétitions trinuécléotidiques (présents dans les quatre microsatellites étudiés) ont été considérés comme des allèles possibles. Les seuils ont été fixés par rapport à la hauteur des autres pics présents dans l'échantillon.

# **RESULTATS**

## 4 RESULTATS

### 4.1 Données sociodémographiques

Au total 1249 enfants ont été reçus pour le dépistage du paludisme de mai 2012 à avril 2017 dont 214 ont été enrôlés conformément aux critères d'inclusion de notre étude.



**Figure 20:** Répartition des enfants enrôlés en fonction du genre.

Le sexe le plus représenté était le sexe féminin avec 53,74% (115/214). Le sexe ratio était de 1,16 en faveur du genre féminin. Le  $X^2 = 2,39$  ( $p=0,12$ ) il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les genres.

**Tableau XVI:** Répartition des patients en fonction de la tranche d'âge

Tranche	Effectif	%
[02-05ans]	51	23,83
[06-09ans]	89	41,59
[10-15ans]	74	34,58
<b>Total</b>	214	100

L'âge minimum était de 2 ans et le maximum de 15 ans. La tranche d'âge la plus représentée était [06-09 ans]. La moyenne d'âge était 8,2 ans. Le  $X^2 = 15,41$  ( $p < 0,001$ ), il y avait une différence statistiquement significative entre les tranches d'âges 2 à 5 ans et les autres groupes de tranche d'âge.

- **Clairance parasitaire et de la fièvre**

**Tableau XVII:** Répartition des patients en fonction du temps de clairance parasitaire

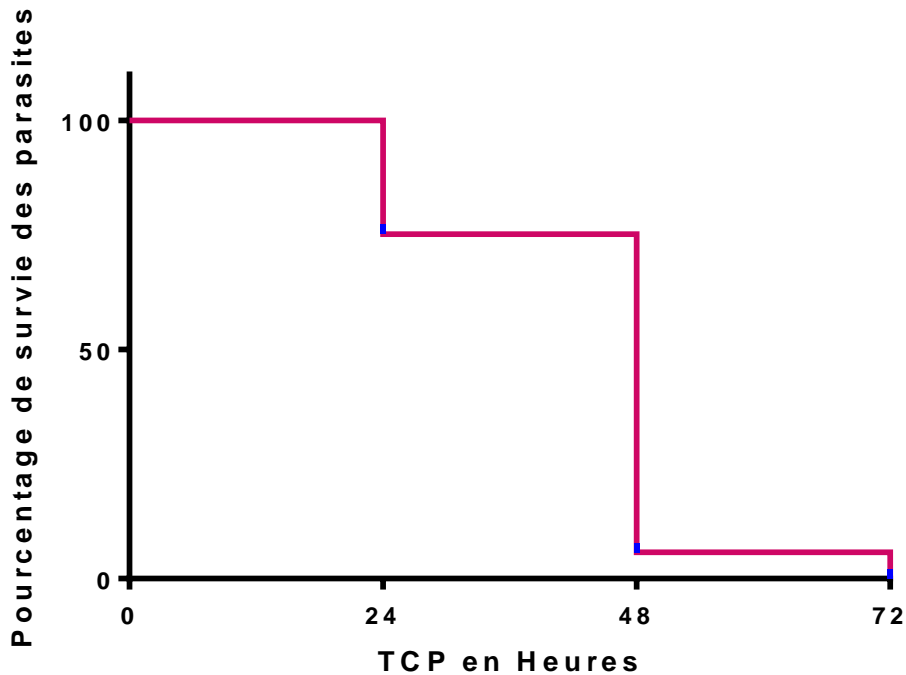
TCP	Effectif	%
<b>24H</b>	90	42,05
<b>48H</b>	108	50,47
<b>72H</b>	16	7,48
<b>Total</b>	214	100

La plupart (soit 50,47%) de nos patients ont fait leur clairance parasitaire 48 heures après le début du traitement. Certains patients (7,48%) ont tout de même présenté des clairances parasitaires retardées à 72 heures.

**Tableau XVIII:** L'évolution du temps de clairance parasitaire en fonction de l'âge

Tranche d'âges	TCP			TOTAL
	24H (%)	48H (%)	72H (%)	
[02-05 ans]	17 (18,89)	25 (23,14)	9 (56,25)	51
[06-09 ans]	<b>39 (43,33)</b>	45 (41,67)	5 (31,25)	89
[10-15 ans]	34 (37,78)	38 (35,18)	2 (12,5)	74
TOTAL	90	108	16	214

Les tranches d'âge [06-09 ans] et [10-15 ans] éliminaient plus rapidement les parasites à 24H et 48H respectivement 43,33% (39/90) et 37,78%(34/90).



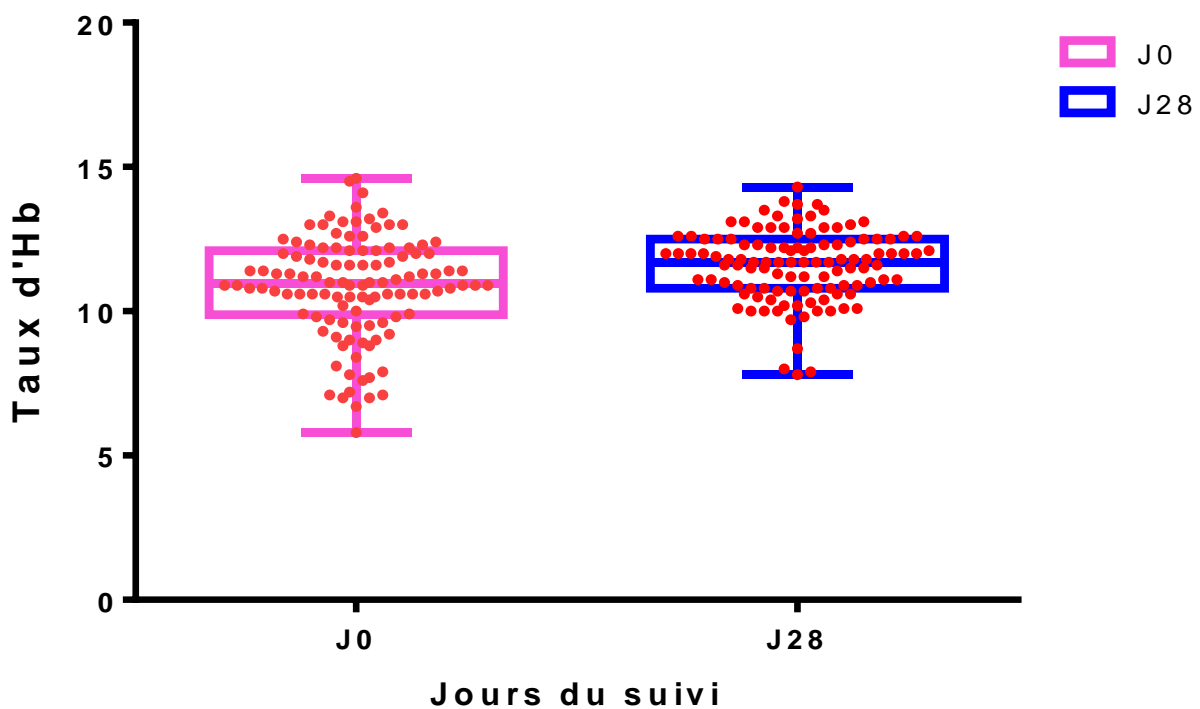
**Figure 21:** Survie des parasites au cours des 72 heures de prise de médicaments par la méthode de Kaplan Meier

Les fréquences cumulées des clairances parasitaires les plus élevées ont été obtenue respectivement à 48 heures et à 24 heures après l'administration des médicaments.

**Tableau XIX:** L'évolution du temps de clairance de la fièvre en fonction de l'âge

Tranche d'âge	Elimination de la fièvre				Total
	Pas de fièvre	24H	48H	72H	
[02 -05 ans]	11	14	3	1	29
[06 - 09 ans]	19	<b>38</b>	4	1	62
[10 -15 ans]	12	34	2	0	48
Total	42	86	9	2	139

Les tranches d'âge 6 à 9 ans éliminaient plus rapidement la fièvre à 24H soit 44,18% (38/86).



**Figure 22:** Répartition de la moyenne géométrique du taux d'hémoglobine avant traitement et le 28<sup>ème</sup> jour du suivi.

La moyenne géométrique du taux d'hémoglobine à J0 était 10,68 g/dL contre 11,54 g/dL au 28<sup>ème</sup> jour du traitement. Il y'avait une différence statistiquement significative entre les taux d'hémoglobines à l'enrôlement et ceux des jours d'échec thérapeutique ( $p < 0,0001$ ).

**Tableau XX:** Répartition des parasitémies en fonction des tranches d'âge

Tranches d'âge	Parasitémies				Total
	[2000 -5000]	[5001-10000]	[10001-99999]	[100000 - 199999]	
[02 - 05ans]	5	7	<b>35</b>	4	51
[06 - 09ans]	11	14	<b>60</b>	4	89
[10-15 ans]	10	7	<b>54</b>	3	74
Total	26	28	<b>149</b>	11	214
Pourcentage	12,1	13,1	69,6	5,1	100,0

Les parasitémies comprises entre 10001 à 99999 parasites par microlitre de sang étaient les plus représentées avec 149 cas respectivement 60 cas pour la tranche 6 à 9 ans ; 54 cas pour la tranche 10 à 15 ans et 35 cas pour la tranche 2 à 5 ans. Le  $X^2 = 8,93$  ( $p= 0,01$ ), il y avait une différence statistiquement significative entre les différentes tranches d'âges en termes de parasitémies initiales de 10001 à 99999 Tf/uL.

#### 4.2 Taux d'échec thérapeutique sur la base de la goutte épaisse

**Tableau XXI:** Répartition des patients en fonction de l'échec thérapeutique

Echec thérapeutique entre J8-J42	Effectifs	Pourcentage
Présence de la parasitémie	19	8,9
Absence de la parasitémie	<b>195</b>	<b>91,1</b>
Total	214	100

Le taux de guérison basé sur la technique de la goutte épaisse représentait 91,1 % et le taux échec thérapeutique était 8,9 %.

#### 4.3 Genotypage des isolats avec les 4 microsatellites neutres

Parmi les 214 enfants enrôlés, 19 personnes étaient revenues avec une parasitémie avant la fin de leurs suivis. Parmi ces 19 patients chez qui un échec thérapeutique a été constaté, les échantillons de 14 ont été soumis à l'analyse des microsatellites à leur inclusion dans l'étude et le jour d'échec thérapeutique faisant un total de 28 échantillons analysés.



• Taux d'échec thérapeutique sur la base de l'analyse des microsatellites

**Tableau XXII:** Répartition des cas d'échecs thérapeutiques en fonction de l'analyse des microsatellites

Cas d'échec thérapeutique	Microsatellites				Conclusion
	2490	<i>PfPk2</i>	<i>Poly-α</i>	<i>TAI</i>	
3MDR007 D2		38.86	NA	NA	Réinfection
3MDR007 D35	81	160	159/177	131/18/167	
3MDR012 D0	81	164	171	158	Réinfection
3MDR012 D35	NA	167	173/171	158	
3MDR026 D0	81	180	174	164	Réinfection
3MDR026 D35	82	158	174	164	
3KB050 D0	81	158/161	163	155	Réinfection
3KB050 D31	81	173	159	171	
3KB056 D0	NA	181	186	175	Réinfection
3KB056 D28	82	167	165	164	
3KB057 D0	81	158/173	165	180	Réinfection
3KB057 D35	NA	161	162	NA	
3KB139 D0	81	164	162	170	Réinfection
3KB139 D28	74	185	161	164	
3KB153 D0	78	157	165	144	Réinfection
3KB153 D35	NA	160	159	152	
3KB161 D0	81	163	166	170	Réinfection
3KB161 D42	81	167/158	168	166	
3KB176 D0	82	164	140	147	Réinfection
3KB176 D42	81	168/179	172	178	
3KB196 D0	83	157	160	131	Réinfection
3KB196 D35	81	167	166	147	
3KB198 D0	<b>82</b>	<b>176</b>	<b>174</b>	<b>158</b>	<b>Recrudescence</b>
3KB198 D23	<b>82</b>	<b>176</b>	<b>175</b>	<b>157</b>	
3KB203 D0	<b>78</b>	<b>170</b>	<b>171</b>	<b>148</b>	<b>Recrudescence</b>
3KB203 D42	<b>78</b>	<b>170</b>	<b>171</b>	<b>148</b>	
3KB213 D0	NA	NA	169	NA	Réinfection
3KB213 D42	81	184	162/177	148	

L'analyse des microsatellites nous a révélé 2 cas de recrudescence parmi les 19 cas d'échecs thérapeutiques.

**Tableau XXIII:** Répartition des patients en fonction de la recrudescence

Echecs thérapeutiques corrigé par la PCR	Effectifs	Pourcentage
Recrudescence	2	0,96
Nouvelle infection	12	5,74
Absence de la parasitémie entre Jour 8-42	195	93,30
Total	209	100

Le taux de guérison corrigé par l'analyse des microsatellites représentait 99,04% et le taux recrudescence représentait 0,96 %. Les taux sous ou sur estimer sont dus aux résultats de cinq patients non interprétables.

#### 4.4 Prévalence des mutations sur le gène *Pfmdr1*

**Tableau XXIV:** Répartition des cas d'échecs thérapeutiques en fonction de l'analyse des mutations du gène *Pfmdr1* région 1 et région 2

Cas d'échecs thérapeutiques	<i>Pfmdr1</i> region 1			<i>Pfmdr1</i> region 2				
	N86 <b>Y</b>	G102 <b>G</b>	Y184 <b>F</b>	N1042 <b>D</b>	G1161 <b>R</b>	G1218 <b>G</b>	T1226 <b>T</b>	D1246 <b>Y</b>
3MDR007 D2	N	G	<b>F</b>	-	G	G	T	-
3MDR007 D35	N	G	<b>Y/F</b>	N	G	G	T	D
3MDR012 D0	N	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D
3MDR012 D35	N	G	<b>Y/F</b>	N	G	G	T	D
3MDR026 D0	N	G	<b>Y</b>	N	G	G	T	D
3MDR026 D35	N	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D
3KB050 D0	<b>Y</b>	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D
3KB050 D31	N	G	<b>Y</b>	N	G	G	T	D
3KB056 D0	N	G	<b>F</b>	-	G	G	T	-
3KB056 D28	N	G	<b>Y</b>	N	G	G	T	D
3KB057 D0	N	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D
3KB057 D35	N	G	-	N	<b>R</b>	G	T	D
3KB139 D0	N	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D
3KB139 D28	N	G	<b>Y</b>	N	G	G	T	D
3KB153 D0	<b>Y</b>	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D
3KB153 D35	N	G	-	N	G	G	T	D
3KB161 D0	N	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D
3KB161 D42	N	G	<b>F</b>	N	G	G	<b>T</b>	<b>Y</b>
3KB176 D0	N	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D
3KB176 D42	N	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D
3KB196 D0	N	<b>G</b>	<b>Y</b>	N	G	G	T	D
3KB196 D35	N	G	-	N	G	<b>G</b>	T	D
3KB198 D0	N	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D
3KB198 D23	N	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D
3KB203 D0	N	G	<b>Y</b>	N	G	G	<b>T</b>	D
3KB203 D42	N	G	<b>Y</b>	N	G	G	<b>T</b>	D
3KB213 D0	<b>N/Y</b>	G	<b>Y/F</b>	-	G	G	T	-
3KB213 D42	N	G	<b>F</b>	N	G	G	T	D

Les mutations retrouvées étaient respectivement 92,85% (13/14) et 71,42% (10/14) aux jours d'enrôlement et aux jours d'échec thérapeutique.

**Tableau XXV:** Répartition des profils trouvés sur le gène *Pfmdr1* en fonction des deux régions étudiées

<i>Pfmdr1</i>	Profil des parasites	Effectif	%
Région 1	Sauvage	10	40
	Muté	<b>18</b>	<b>72</b>
Région 2	Sauvage	20	80
	Muté	5	20

La majorité des mutations a été retrouvées sur la région 1 du gène *Pfmdr1* soit **72%**.

**Tableau XXVI:** Répartition des mutations trouvées sur le gène *Pfmdr1* en fonction des cas d'échec thérapeutique avant traitement et après traitement

<i>Pfmdr1</i>	Marqueurs de mutation	Fréquences (n)	Pourcentage
Région 1	N86 <b>Y</b>	3 (28)	<b>10,71</b>
	G102 <b>G</b>	1 (28)	3,57
	Y184 <b>F</b>	19 (26)	<b>73,07</b>
Région 2	N1042 <b>D</b>	0 (25)	0
	G1161 <b>R</b>	1 (28)	3,57
	G1218 <b>G</b>	1 (28)	3,57
	T1226 <b>T</b>	3 (28)	<b>10,71</b>
	D1246 <b>Y</b>	1 (26)	3,84

Les mutations les plus représentées étaient, Y184**F**, N86**Y** et T1226**T** avec respectivement 73,07%, 10,71% et 10,71%.

**Tableau XXVII:** Répartition des haplotypes rencontrés au niveau des positions 86 et 184 de la région 1 de *Pfmdr1*

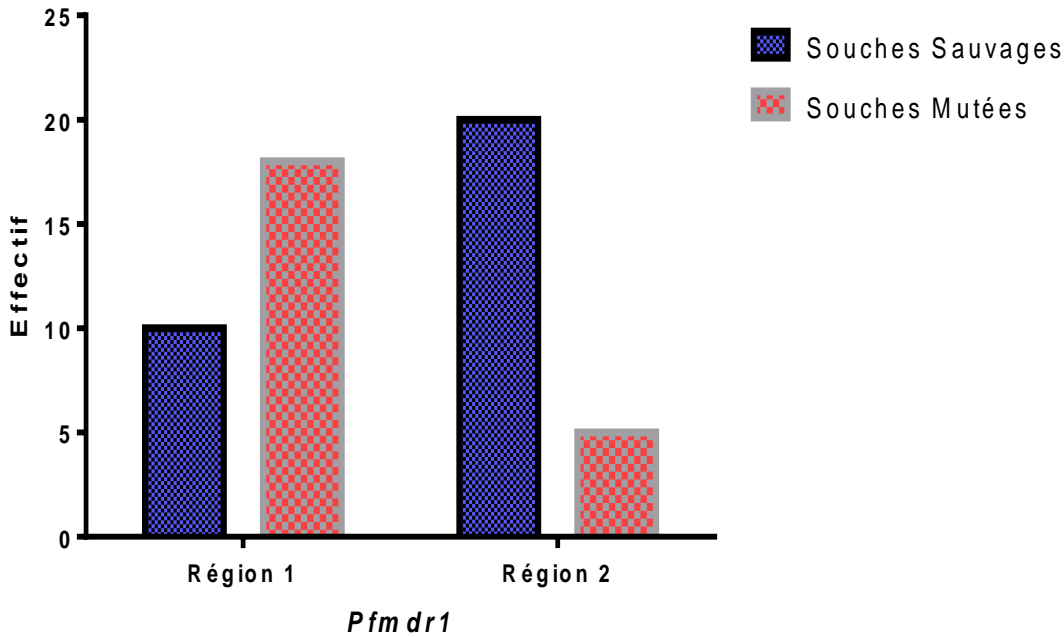
Haplotypes Région 1 aux positions 86 et 184	Effectifs	%
NY	10	40
N <b>F</b>	16	64
<b>Y</b> Y	1	4
<b>Y</b> F	3	12

Les mutations mixtes obtenues étaient, les double mutations (N86**Y** plus Y184**F**) et les triple mutations (Y184**F** plus T1226**T** plus D1246**Y**) dont la mutation double représentait 10% des mutations mixtes.

**Tableau XXVIII:** Répartition des haplotypes rencontrés au niveau des positions 86, 184 et 1246 de *Pfmdr1*

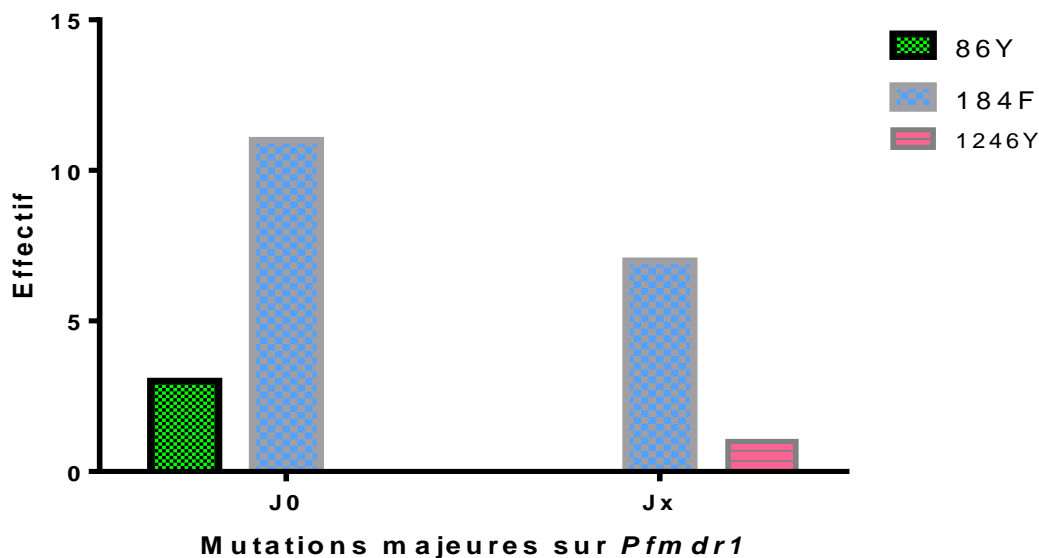
Haplotypes	Effectifs	%
NYD	9	40,90
<b>Y</b> F <b>Y</b>	0	0
N <b>F</b> D	12	54,54
<b>Y</b> F <b>D</b>	2	9,09
N <b>F</b> <b>Y</b>	1	4,5

L'haplotype N**F**D était le plus représenté soit **54,54 %** parmi les haplotypes des positions majeurs étudiées.



**Figure 23:** Profil *Pfmdr1* des souches isolées lors de cette étude

Les mutations sur le gène *Pfmdr1* étaient plus fréquentes au niveau de la région 1. La différence dans l'apparition des mutations entre les deux régions était statistiquement significative (Test exact de Fisher,  $P=0,002$ )



**Figure 24:** fréquence des mutations majeures des souches isolées avant traitement et au jour d'échec thérapeutique

Les mutations majeures obtenues sur le gène *Pfmdr1* étaient rencontrées à l'inclusion et au cours du suivi. La différence d'observation de ces mutations entre J0 et Jx n'était pas statistiquement significative (Test Khi-Deux,  $P=0,1726$ )

**Tableau XXIX:** Répartition des mutations trouvées sur le gène *Pfmdr1* en fonction du temps de clairance parasitaire

Mutations sur <i>Pfmdr1</i>	Temps de Clairance Parasitaire		
	24 Heures	48 Heures	72 Heures
N86Y	1	2	0
G102G	0	1	0
Y184F	4	<b>7</b>	0
N1042D	0	0	0
G1161R	0	0	0
G1218G	0	0	0
T1226T	1	0	0
D1246Y	0	0	0
N86Y + Y184F	1	2	0
Total	7	12	0

Les mutations impliquées dans les retards de clairance étaient respectivement, la mutation Y184F, N86Y et G102G.

**Tableau XXX:** Répartition des mutations trouvées sur le gène *Pfmdr1* en fonction de la tranche d'âge

Marqueurs de mutation <i>Pfmdr1</i>	Tranche d'âge		
	[02-05 ans]	[06-09 ans]	[10-15 ans]
N86Y	0	2	1
G102G	1	0	0
Y184F	4	4	3
N1042D	0	0	0
G1161R	0	0	0
G1218G	0	0	0
T1226T	0	1	0
D1246Y	0	0	0
N86Y plus Y184F	0	2	1
Total	5	<b>9</b>	5

La tranche 6 à 9 ans était la plus infectée avec une souche mutée parmi les cas d'échec thérapeutique avant le traitement.

#### 4.5 Prévalence des Mutations sur le gène *PfK13*

**Tableau XXXI:** Répartition des cas d'échecs thérapeutiques en fonction de l'analyse des mutations sur le domaine propeller du gène *K13*

Cas d'échec thérapeutique	Domaine Propeller du gène <i>PfK13</i>									
	P413P	C469C	F491F	Y493H	K503K	R539T	G548S	A578S	C580Y	P613P
3MDR007 D2	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3MDR007 D35	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3MDR012 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3MDR012 D35	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3MDR026 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3MDR026 D35	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB050 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB050 D31	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB056 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB056 D28	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB057 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB057 D35	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB139 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB139 D28	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB153 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB153 D35	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB161 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB161 D42	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB176 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB176 D42	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB196 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB196 D35	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB198 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB198 D23	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB203 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB203 D42	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB213 D0	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P
3KB213 D42	P	C	F	Y	K	R	G	A	C	P

La mutation trouvée était P413P. C'était une substitution nucleotidique où la guanine est remplacée par l'adenine (CCG en CCA). Elle était présente dans un échantillon avant le traitement.



**Tableau XXXII:** Répartition des mutations trouvées sur le gène *PfK13*

Mutation trouvée sur le gène <i>PfK13</i>	Effectifs (n=28)	Pourcentage
Sauvage	27	96,43
Mute	1	3,57
Total	28	100,00

La mutation trouvée était P413P. Elle représentait 3,57 % (1/28).

# **COMMENTAIRES ET DISCUSSION**

## 5 COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Le choix du site d'étude a été porté sur Dioro du fait qu'il est situé au bord du fleuve Niger et est entouré par le canal d'irrigation des champs de culture du riz faisant beaucoup de gîtes larvaires pendant la période hivernal et de riziculture. Dioro est une zone endémique du paludisme. Notre étude était de type prospectif qui avait pour but d'évaluer la fréquence de portage des mutations par les souches de *P. falciparum* après la prise en charge totale (gratuité) du traitement de la population par le projet des Villages du Millénaire (PVM) de 2008 à 2015.

Au total 1249 enfants ont été reçus pour le dépistage de mai 2012 à avril 2017 dont 214 enfants ont été enrôlés, tous âgés de 2 à 15 ans. Le choix de cette tranche d'âge pourrait s'expliquer en partie par l'hypothèse que le paludisme occupe la 1<sup>ère</sup> place dans l'étiologie des hospitalisations fébriles dans le groupe de 1 à 15 ans (55).

Le diagnostic des cas de paludisme se faisait par la goutte épaisse. Cette technique étant une des techniques de mise en évidence du parasite demeure recommandée par l'OMS pour les études du paludisme pour la détermination de la charge parasitaire. La méthode de génotypage recommandé dans les zones à forte endémicité (pour différencier une nouvelle infection d'une recrudescence) a été utilisée (56). C'est ainsi que nous avons utilisé quatre marqueurs de microsatellites neutres *Polya* (chromosome 4), *TAI* (chromosome 6), *PfPK2* (chromosome 12) et *2490* (chromosome 10). Contrairement aux protéines de la surface des mérozoïtes (*MSP1* et *MSP2*) ces microsatellites sont très stables du fait qu'elle ne sont généralement pas sous immuno-sélection; elles sont très polymorphes, le calcul de la taille des allèles facilite la comparaison entre plusieurs échantillons et laboratoires (56). certaines erreurs d'appariement sont fréquentes dans les régions de répétitions nucléotidiques, compte tenu de la forte homologie de séquences entre les répétitions (44). Aussi, le marqueur *PfPk2* donne souvent de faux positif et *Polya* ne permet pas souvent de détecter la multiplicité de l'infection (56).

Le séquençage par la méthode de Frederic Sanger a été utilisé pour la recherche des mutations sur les gènes *Pfmdr1* et *PfK13*. Sa sensibilité pour la détection des mutations est estimée à environ 98% (57). Le séquençage de façon globale reste la méthode moléculaire la plus sensible et efficace pour déterminer la séquence des nucléotides d'un matériel génétique à ce jour (57).

- **Facteurs démographiques**

- **Age**

La tranche d'âge de 06 à 09 ans était la plus représentée dans notre étude avec un taux de 41,58% suivie des enfants du groupe d'âge 10 à 15 ans 34,57% et 21,16% pour la tranche d'âge 02 à 05 ans. Le faible taux d'incidence observé chez les enfants de 02 à 05 ans pourrait être dû à la campagne de

distribution gratuite des moustiquaires et les campagnes de chimioprévention saisonnière (CPS) qui pourraient être un facteur préventif pour cette tranche d'âge.

Ce résultat est comparable à celui de **KOUROUNTE I. (58)** en 2014 chez lequel la tranche 5 à 9 ans était la plus représentée 44,8%. **KAMATÉ B. (59)** a trouvé le contraire en 1999 à Deneguebougou, la tranche 02 à 05 ans était la plus représentée chez lui avec 96,1%. Cette différence pourrait être due la taille faible de sa population d'étude (200) ainsi qu'à l'âge de participation à son étude (0 à 20 ans). La moyenne d'âge était 8,2 ans et la tranche d'âge 2 à 5 ans était significativement moins représentée comparée aux autres tranches d'âge ( $p < 0,001$ ).

- **Sexe**

Le sexe ratio était de 1,16 en faveur du genre féminin. Ce qui est du probablement à une préférence du vecteur pour le sexe féminin pendant son repas sanguin (**60,61**).

- **Temps de clairance parasitaire**

Parmi les 214 enfants enrôlés, 19 personnes étaient revenues avec une parasitémie avant la fin de leurs suivis.

Les tranches d'âge [06-09 ans] et [10-15 ans] éliminaient plus rapidement les parasites à 24H et 48H Il y'a une corrélation entre l'âge des patients et le temps de clairance parasitaires. Ce résultat est comparable à celui de **Ndour PA. et coll. (62)** en 2015 qui avait trouvé que les enfants plus âgés éliminaient plus vite les parasites que les moins âgés. Cela peut s'expliquer qu'après plusieurs années de contacts répétés avec le parasite, l'enfant construit ses propres défenses immunitaires, ce que les frères Sargent (**63**) ont appelé la prémunition. En zone d'endémie stable, cette immunité se met en place plus ou moins rapidement, entre six et dix ans selon le niveau de transmission (**63**). Cette immunité leur permet d'éliminer plus rapidement les parasites durant le traitement.

La figure (21) nous a montré le temps de clairance par la méthode de Kaplan Meier, 56% des parasites étaient éliminés après le premier jour du traitement avec  $p < 0,036$  ce qui nous a permis d'en déduire que le traitement était efficace. Il y'avait une différence significative entre les parasitémies après chaque jour de traitement. Ce résultat est proche aux résultats de plusieurs études, dont celui de **DiarraY. en 2015 au LBMA (15)** qui a conclu qu'il existait une corrélation positive entre la parasitémie initiale dans son étude et le temps de clairance parasitaire  $P < 0,0064$  et celui de **Maiga, A. W. et coll. (64)** en 2012 chez qui le temps de clairance moyen était de 32 Heures. En 2009, une étude d'efficacité des CTAs menée au Burkina par **Siribié M. et coll. (4)** avait signalé des résultats similaires.

Les fréquences cumulées des clairances parasitaires les plus élevées ont été obtenue respectivement au deuxième et au premier jour après l'administration des médicaments. Ce qui confirme l'efficacité de la combinaison Artémether plus Luméfantrine.

- **Charge parasitaire**

La plupart des patients de la tranche 6 à 9 ans et 10 à 15 ans se présentaient au centre avec des parasitémies élevées soit entre 10001 à 99999 parasites par microlitre de sang.

Le  $X^2 = 8,93$  ( $p = 0,01$ ), il y avait une différence statistiquement significative entre les différentes tranches d'âges en termes de parasitémies initiales. Cette absence de forte parasitémie dans la tranche d'âge 2 à 5 ans pourrait s'expliquer par quelques mécanismes tels que la présence d'un pourcentage d'hémoglobine fœtale (HbF) (63), l'allaitement exclusif durant les premiers mois de vie et le passage d'anticorps anti palustres de la circulation maternelle dans la circulation fœtale qui protège l'enfant des formes graves de paludisme (63). D'autres facteurs liés au mode de vie de l'enfant ont un rôle dans la survenue des infections palustres. En effet, l'absence d'acide para-amino-benzoïque (PABA) dans le lait maternel, limite le développement du parasite qui en a besoin pour la synthèse de son ADN (63). A ces dernières raisons s'ajoute le fait que la plupart de ces enfants dorment avec leur maman sous les moustiquaires.

- **Taux de guérison**

Le taux d'échec thérapeutique était 8,9 % obtenu par la méthode de goutte épaisse, et le taux de guérison était de 91,1%. Ce taux (échec thérapeutique) supérieur à 3 % est confirmé par la littérature dans la sous-région (65,66). Ce résultat est proche de celui de **Dorsey G. et coll. (67)** en 2007 qui avaient trouvé 6,7% pour l'association Artémether-Luméfantrine comme taux d'échec thérapeutique mais différent à celui de **Sow D. et coll. (2,3 %)** (68). Le taux de guérison élevé de notre étude a été confirmé par plusieurs études ; l'étude multicentrique, réalisée au Nigeria, au Kenya et en Tanzanie avait donné 97% de réponse adéquate clinique et parasitologique pour l'Artémether Luméfantrine (69).

Au Mali, **Sagara I. et coll. (70)** en 2006, ont trouvé 99% d'efficacité thérapeutique à l'Artémether Luméfantrine lors d'une étude menée sur Essai randomisé d'Artésunate-Sulfaméthoxypyrazine-Pyriméthamine versus Artémether-Luméfantrine pour le traitement du paludisme à *P. falciparum* non compliqué au Mali. L'équipe de **Mutabingwa T. (71)** ont trouvé 89% de réponse adéquate clinique et parasitologique à l'association Artésunate Amodiaquine en Tanzanie.

- **Génotypage par les microsatellites**

L'analyse des microsatellites avant traitement et le jour d'échec thérapeutique a permis de corriger le taux de guérison qui a passer de 91,1% à 99,73%. Ce taux sous ou sur estimé pourrait être dus aux résultats de cinq patients non interprétables. Ceci constitue une des limites de notre étude.

- **Mutations sur le gène *Pfmdr1***

La mutation la plus retrouvée sur le gène *Pfmdr1* était 184F et représentait 73,07% des mutations retrouvées, suivie de 86Y, 10,71% puis les mutations transitoires T1226T, 10,71%. Nos résultats sont proches de ceux d'une étude réalisée au Cambodge par **Vinayak S. et coll. (72)** en 2011, qui avaient trouvé les mutations Y184F, 1109I, N86Y, 130K respectivement 78,37% à l'ouest du Cambodge (Y184F) et 39,59% ; 4,02% ; 2,68% ; 1,34%. Cette fréquence élevée de la mutation Y184F a été signalée au Burkina en 2016 par **Somé A F. et coll** ainsi qu'au Sénégal et en Gambie par **Dieye B et coll** en 2012 respectivement 68,75%; 77,5% et 51,7%. Ces résultats sont différents de ceux trouvés (46% pour 86Y et 2% pour 184F) par **Pirahmadi S. et coll** en 2016 en Iran lors d'une étude menée sur l'analyse des mutations sur *Pfmdr1* 4 ans après l'introduction des CTAs dans le traitement du paludisme (73) et ceux trouvés par **Koukouikila-K F. et coll. (74)** en 2010, qui avaient trouvé la fréquence la plus élevée au niveau de la mutation N86Y soit 73%. Ces différences pourraient être dues aux profils épidémiologiques du paludisme qui varient d'une localité a une autre et par la même occasion les souches de *Plasmodium* de par leurs profils génétiques. Bien que la mutation Y184F ait été la plus détectée dans nos échantillons d'échec thérapeutique, elle n'a pas encore été décrite comme étant associée dans la résistance de la combinaison Artémether plus Luméfantrine au Mali même si elle est à une prévalence élevée à l'ouest du Cambodge et a été décrite comme étant associée à la résistance de la Mefloquine dans cette région (**Sumiti V. et coll.** en 2011). Lors de notre étude, cette dernière mutation n'a pas été retrouvée associée à la clairance parasitaire retardée. Le même constat a été fait dans une étude menée par **Lo E. et coll, 2016.** sur la clairance parasitaire au niveau de la frontière Chine-Myanmar sur des souches de *P. falciparum* et *P. vivax* (75).

La région 1 du gène *Pfmdr1* s'est révélée plus polymorphique que la région 2. L'haplotype muté NF aux positions 86 et 184 respectivement était le plus fréquent (64%) au niveau de la région 1, toutefois, l'haplotype YF a été retrouvé chez 3 patients (12%). Nos résultats sont différents de ceux de **Li J. et coll, 2015** qui ont obtenu respectivement 33,76% et 45,22% dans une étude menée en Guinée Equatoriale sur les profils moléculaires des mutations sur les gènes *Pfprt* et *Pfmdr1* chez les souches de *P. falciparum* isolées dans l'île de Bioko (76). Ce dernier haplotype a été retrouvé chez des souches

isolées avant le traitement antipaludique et avant le suivi donc. Aussi, les NF ont été retrouvés aussi bien chez les souches isolées avant le traitement que les souches d'après le traitement antipaludique. Ces derniers constats nous suggèrent que les mutations aux positions 86 et 184 de *Pfmdr1* sont fréquentes à Dioro et y sont bien établies. Lors de cette étude, nous avons obtenu une mutation transitoire à la position 102 de la région 1 avant le traitement. Bien que cette dernière position ne soit pas connue pour son association à la résistance aux antipaludiques, sa mutation suggère un changement de comportement du parasite à l'égard des molécules couramment utilisées. Ce changement de comportement pourrait être l'effet de la pression médicamenteuse engendrée par les molécules partenaires de l'Artémisinine dans les CTAs. Les mutations 86Y et 184F obtenues lors de cette étude n'ont pas été retrouvées associées à l'évolution de l'âge encore moins le temps de clairance parasitaire car ces mutations étaient également réparties entre les différentes tranches d'âge et étaient retrouvées chez des patients ayant fait leur clairance à 24 heures et 48 heures. Des polymorphismes à la fois sur les gènes *Pfmdr1* et *Pfcr1* agiraient également sur la sensibilité aux CTA, notamment la combinaison *Pfcr1* 76T et l'haplotype *pfmdr1* 86Y-184F-1246Y qui serait associé à une recrudescence et une réinfection après un traitement à Artésunate plus Amodiaquine (5). De même, les allèles sauvages *Pfcr1* K76 et *Pfmdr1* N86 et D1246 associée à la mutation *Pfmdr1* 184F seraient sélectionnés après un traitement à AL (5). Cependant, le rôle conjoint de ces mutations reste encore à justifier et le nombre de molécules associées pour traiter les patients rend difficile leur étude. En effet, les mutations *Pfmdr1* N86Y et D1246Y modifieraient le niveau de résistance à la chloroquine des parasites déjà porteurs de mutations sur le gène *Pfcr1* (5).

Dans une étude menée par **Ojorunbe O. et coll, 2007.** au Nigeria sur la détection rapide des mutations de *Pfcr1* et *Pfmdr1* par la méthode de FRET (Transfert d'énergie par résonance de fluorescence), aucune corrélation n'a été observée entre l'apparition des mutations en fonction de l'âge (77). L'haplotype sauvage NY a été retrouvé à une fréquence de 35,71%. Au niveau de la région 2 du gène *Pfmdr1*, nous avons obtenu très peu de mutations. Ces mutations pour la plupart étaient des mutations transitoires. Les mutations au niveau des positions 1218 et 1226 étaient des changements de codons avec les mêmes acides aminés. Au niveau de la position 1218 le changement consistait en une substitution du codon GGA par le codon GGG tous deux codant pour la Glycine tandis qu'au niveau de la position 1226 il s'agissait d'une substitution du codon TTT par TTC tous deux codant pour la thréonine. Les mutations au niveau des positions 1161 et 1246 étaient des mutations définitives et consistaient en des substitutions de la Glycine par l'Arginine et l'Acide aspartique par la Tyrosine respectivement. Bien que les positions 1161, 1218 ne soient pas connues pour leur association à la résistance aux Artémisines et leurs dérivés, ces mutations transitoires et définitives restent rarement retrouvées lors des études menées en Afrique de l'Ouest. La plupart des mutations observées au

niveau de cette région ont été retrouvées chez des parasites isolées lors de l'échec thérapeutique avec une de ces souches présentant l'haplotype NFTY pour respectivement les positions 86, 184, 1226 et 1246. L'haplotype NFD pour les positions majeures 86, 184 et 1246 qui est connu pour sa sélection par la combinaison Artémether + Luméfantrine dans certaines localités (25) a retrouvé certains (54,54%) de nos patients au moment de l'échec thérapeutique. Nos résultats étaient très proches de ceux obtenus par **Apinjoh T O. et coll, 2017** qui avaient trouvé une prévalence de 53,2% pour l'haplotype NFD lors d'une étude menée au Cameroun sur les marqueurs moléculaires de résistance à l'Artémisinine et ses molécules partenaires dans la population de *P. falciparum* suivant une augmentation de l'utilisation des moustiquaires imprégnés d'insecticides (78). Ce résultat était toutefois plus élevé que ceux trouvés (29,80% ; 32%) dans une étude menée en Guinée Equatoriale par **Li J et coll en 2014** sur la haute prévalence des mutations *Pfmdr1* N86Y et Y184F chez les souches de *P. falciparum* isolées à l'île de Bioko et une autre étude menée par **Ljolie et al, 2018**. sur la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de Artémether plus Luméfantrine dans 3 provinces d'Angola en 2015 (79,80).

- **Mutations sur le gène *Pfk13***

Nous avons trouvé une mutation sur le domaine Propeller du gène *PfK13* avant le traitement dans l'isolat d'un seul patient chez qui un échec thérapeutique a été observé. La mutation trouvée était P413P et serait associée à un retard de clairance de 48 heures. Au Togo en 2016, **Dorkenoo AM. et coll.** ont rapporté les mutations suivantes: S522M, A578S et C532S à Lomé; S522C, A578S à Sodoké; S522C et A578S à Niamtougou. Leurs patients avaient fait leurs clairances avant le troisième jour du traitement (81). Lors de notre étude, il s'agissait d'une mutation silencieuse car il n'y a pas eu changement d'acide aminé (changement de codon: CCG en CCA). Elle n'a pas été décrite comme étant associée à la résistance à l'Artémether. D'autres mutations étaient également présentes sur le gène *Pfmdr1* pour le même patient, il s'agit de la mutation multiple (86Y + 184F). Elle est différente des mutations habituellement décrite en Afrique et est différente de la mutation (M476I) qui a été sélectionnée par la pression médicamenteuse de l'Artémisinine *in vitro* des parasites Africaines (51).

Plusieurs études en Afrique font état des mutations habituellement trouvées respectivement: **Ouattara A. et coll. (82)** au Mali ont trouvé la mutation A578S à Faladje (Ouest du Mali). En Guinée Equatoriale, **Jian L. et coll. (83)** ont trouvé que la mutation A578S était à 2,04 %. Cette mutation a été également trouvée dans quatre autres pays de l'Afrique subsaharienne (Kenya; République Démocratique du Congo; Gabon, Ghana et aussi à l'Ouganda) (84). Une étude réalisée par **Isozumi R. et coll. (85)** au Kenya en 2015 a signalé les mutations suivantes : M442V, N554S, A569S, A578S, C439C, S477S, Y500Y, N531N, G538G. Ces mutations trouvées en Afrique diffèrent de ceux en Asie



selon plusieurs études ; selon **Wang Z. et coll.** (21) en Chine, les mutations du gène K13 trouvées étaient : I352**T** 1 (0,5%) ; I376**V** 2 (1,0%) ; P441**L** 1 (0,5%) ; P443**S** 1 (0,5%) ; F446**I** 52 (27,2%) ; N458**Y** 1 (0,5%) ; C469**Y** 2 (1,0%) ; L492**S** 1 (0,5%) ; F495**L** 2 (1,0%) ; P574**L** 12 (6,3%) ; C580**Y** 3 (1,6%). Les parasites isolés lors de cette dernière étude partageaient trois mutations (F446**I**, P574**L** et A676**D**) avec celles reportées par **Feng et coll.** (86), trois mutations (P441**L**, N458**Y** et C580**Y**) ; avec celles reportées par **Nyunt et coll.** (87) et quatre mutations (F446**I**, P574**L**, C580**Y** et A676**D**) avec celles reportées par **Tun et coll.** (88). Ces mutations n'ont pas été retrouvées au cours de notre étude.

# CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

## 6 CONCLUSION

Le paludisme continue d'être un véritable problème de santé publique. Son contrôle inclut le test d'efficacité des antipaludiques de façon fréquente dans les zones endémiques.

Au terme de cette étude, les microsatellites (*Ta1*, *PfPK2*, *Polya* et 2490) nous ont permis d'estimer le taux de guérison par la combinaison Artémether plus Luméfantrine, d'échec thérapeutique et de recrudescence à respectivement **99,73%** ; **5,74%** et **0,96 %**.

Certaines mutations comme *Pfmdr1* 184**F** ont été retrouvés à des fréquences très élevées (**73,07%**). Les mutations *Pfmdr1*, 86**Y**, 1246**Y** et *Pfk13* P413**P** sont présents à des taux respectifs de **10,71%**; **10,71%**; et **3,57%**. Aucune mutation n'a été mise en évidence sur la position 1042 du *Pfmdr1* et les autres positions du gène *Pfk13* étudiées. Notre travail révèle également une relation probable entre les mutations étudiées et le retard de clairance notamment les mutations Y184**F**, N86**Y**, G102**G** et l'haplotype 86**Y** + 184**F**.

Notre étude montre que l'association Artémether plus Luméfantrine est encore efficace dans la lutte contre le paludisme simple à *P. falciparum* et une nécessité de continuer le monitoring des mutations associées à la résistance à l'Artémisinine et ses dérivés.

## 7 RECOMMANDATIONS

Au terme de notre étude, nous recommandons :

### **Au programme national de lutte contre le paludisme PNL**

De continuer la surveillance des antipaludiques et de tester d'autres CTAs à Dioro en plus du Coartem®.

De renforcer les capacités des structures de recherche dans la prise en charge des maladies associées au paludisme et de mener une surveillance parallèle chez les personnes âgées au cours de leur étude.

### **Au personnel du CSCOM de Dioro**

De sensibiliser la population des conséquences de l'automédication et de veiller à la bonne dispensation des antipaludiques en particulier.

### **Au laboratoire de biologie moléculaire LBMA**

De renforcer les liens de collaboration avec le PNL et les élus locaux de ces différents sites d'étude.

De séquencer d'autres gènes incriminés dans la résistance des antipaludiques couramment utilisés.

De mener des études de lutte contre les gîtes larvaires.

### **A la population de Dioro**

De respecter les doses indiquées par les prescripteurs pendant la prise des médicaments et à la bonne utilisation des moustiquaires.

De continuer à aider les acteurs de la santé dans la bonne application des protocoles de surveillance des antipaludiques.

D'arrêter l'utilisation des médicaments de la rue.

# **REFERENCES**

## 8 REFERENCES

1. OMS. Paludisme, 2018. Consulté le 21 mai 2018, Disponible sur : <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.
2. Malaria RB. World malaria report. Geneva: World Health Organization. 2005.
3. Andualem M. Oumer, Seydou Doumbia, Constance Touré, Safoura Berthe, Aligui Yattara, Cheich Oumar Dembele, et al. Rapport de quantification des intrants antipaludiques : Période janvier 2014 à décembre 2018 [Internet]. 2018. Available from: [who.int/medicinedocs/documents/s22011fr/s22011fr.pdf](http://who.int/medicinedocs/documents/s22011fr/s22011fr.pdf)
4. Siribié, M., Diarra, A., Tiono, A. B., et al. Efficacité de l'Artéméther-luméfantrine dans le traitement du paludisme simple de l'enfant en milieu rural au Burkina Faso en 2009. Bulletin de la Société de pathologie exotique, 2012, 105, (3) : 202-207.
5. Menard S. *Plasmodium falciparum* et résistance aux antipaludiques: aperçu et conséquences des facteurs impliqués dans la sélection et la diffusion des parasites résistants [PhD Thesis]. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier; 2017.
6. 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. Nature communications, 2016, 7: 11553.
7. Duraisingh MT, Cowman AF. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. Acta Tropica. 2005 Jun; 94(3):181–90.
8. Nishiyama Y, Okuda Y, Kim H-S, Huruta T, Kimura M, Wataya Y. Genetic analysis of mefloquine-resistant mechanism of *Plasmodium falciparum*. Nucleic Acids Symp Ser (Oxf). 2004 Nov 1; 48(1):163–4.
9. Price RN, Uhlemann A-C, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. The Lancet. 2004; 364 (9432): 438–47.
10. Cowman AF, Galatis D, Thompson JK. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. PNAS. 1994 Feb 1; 91(3):1143–7.
11. Ménard D, Arieu F, Mercereau-Puijalon O. Étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (RIIP-Palu). médecine/sciences. 2013; 29 (6-7): 647–55.
12. Straimer J, Gnädig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP, et al. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. Science. 2015 Jan 23; 347 (6220): 428–31.

13. 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017; 61 (3): e02116–16.
14. Nabet C, Doumbo S, Jeddi F, Konaté S, Manciuilli T, Fofana B, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in human malaria cases in Mali. *Malaria Journal*. 2016 Dec; 15 (1): 353.
15. Diarra Y. Etude d'efficacité des antipaludiques : cas de l'artemether-lumefantrine et la chloroquine dans la commune rurale de Dioro. Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako USTTB. Thèse Pharmacie, 2016, N°05.
16. Traore A M. Etude des connaissances, attitudes et pratiques liées au paludisme chez les usagers du CSCom central de Kolokani (Bamako, Mali). Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako USTTB. Thèse Médecine, 2013, N° 107.
17. Niare K. Efficacité des combinaisons Artéméther-Luméfántrine et Artésunate/Sulfadoxine-Pyriméthamine et quiescence des isolats parasitaires de *P. falciparum* tolérants à l'Artémisinine au Mali. Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako USTTB. Thèse Pharmacie, 2013, N°08.
18. Marc GENTILINI. *Medecine Tropicale*. 6ème édition-2012, Librairie Lavoisier. 2018. Consulté le 09/06/2018, Disponible sur: <https://www.lavoisier.fr/livre/medecine/medecine-tropicale-6e-ed/gentilini/descriptif-9782257203960>
19. OMS | Rapport 2015 sur le paludisme dans le monde [Internet]. WHO. Consulté le 10 Jun 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/fr/>
20. Kunte R, Kunwar R. WHO Guidelines for the treatment of malaria. *Med J Armed Forces India*. 2011 Oct; 67(4):376.
21. Wang Z, Shrestha S, Li X, Miao J, Yuan L, Cabrera M, et al. Prevalence of K13-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* from China-Myanmar border in 2007–2012. *Malaria journal*, 2015, 14, (1): 168.
22. 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. Thèse de doctorat, Montpellier II, 1992, Consulté le 09/06/2018, Disponible sur : <http://www.theses.fr/1992MON20039>
23. Djimdé AA, Fofana B, Sagara I, Sidibe B, Toure S, Dembele D, et al. Efficacy, safety, and selection of molecular markers of drug resistance by two ACTs in Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008 Mar; 78(3):455–61.

24. Talisuna AO, Karema C, Ogutu B, Juma E, Logedi J, Nyandigisi A, et al. Mitigating the threat of artemisinin resistance in Africa: improvement of drug-resistance surveillance and response systems. *Lancet Infect Dis*. 2012 Nov;12(11):888–96.
25. Duah NO, Matrevi SA, De Souza DK, Binnah DD, Tamakloe MM, Opoku VS, et al. Increased *pfmdr1* gene copy number and the decline in *pfcr* and *pfmdr1* resistance alleles in Ghanaian *Plasmodium falciparum* isolates after the change of anti-malarial drug treatment policy. *Malaria journal*. 2013;12(1):377.
26. 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. *The Journal of infectious diseases*. 2014, 211, (8): 1352-1355.
27. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Fontenille D, Ravaonjanahary C, Richard A, et al. Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers d'études et de recherches francophones / Santé*. 1993 Jul 1;3(4):220–38.
28. Touré YT. Sensitivity of *Anopheles gambiae sl* to insecticides in the Selingue dam area. *Parassitologia*. 1984, 26, (3): 311-318.
29. Servonnet, A., Rapp, C., Delacour, H., et al. *Plasmodium knowlesi*: une espèce émergente chez l'homme?. *Médecine et Santé Tropicales*. 2012, 22, (4): 417-421.
30. Prevention C-C for DC and. CDC - Malaria - About Malaria - Biology. consulté le 10 Jun 2018. disponible sur: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
31. Aubry P, Gaüzère BA. Paludisme, actualités 2017. Centre René Labusquière, Institut de Médecine Tropicale, Université de Bordeaux, France. Consulté le 09/06/2018, Disponible sur : <http://medecinetroficale.free.fr/cours/paludisme.pdf>.
32. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of clinical investigation*, 2008, 118, (4): 1266-1276.
33. Gan LSH, Loh JP. Rapid identification of chloroquine and atovaquone drug resistance in *Plasmodium falciparum* using high-resolution melt polymerase chain reaction. *Malaria Journal*. 2010 May 21;9:134.
34. OMS. Liste des pays, territoires et zones<sup>1</sup>. *Voyages Internationaux et Santé* – 16 février 2017 Consulté le 11/06/2018, Disponible sur: <http://www.who.int/ith/ITH2017-CountryList-fr.pdf>.
35. Ann O'Fel. *Parasitologie Mycologie*. Nouv. éd. 96/97 (Collection références, ISSN 1635-8627).



36. Diallo S. Sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques : Relation entre marqueurs moléculaire et échec thérapeutique au traitement. Université Polytechnique de Bobo Dioulasso. Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques ; 2009, Mémoire N°363.
37. SOUHEIL, GAOUAR Samir Bachir. Etude de la biodiversité: Analyse de la variabilité génétique des races ovines algériennes & de leurs relations phylogénétiques par l'utilisation de microsatellites. 2009. Thèse de doctorat. Université Ahmed Ben Bella d'Oran I Es Senia.
38. Gaudriault S, Vincen R. Génomique. Mémento Sciences Biologie. De Boeck Supérieur, 2009.
39. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. N. Engl. J. Med. 2009 Jul 30; 361(5):455–67.
40. Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. N. Engl. J. Med. 2008 Dec 11; 359(24):2619–20.
41. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border. Emerging Infect. Dis. 2008 May; 14(5):716–9.
42. Cowman AF, Karcz S, Galatis D, Culvenor JG. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. J. Cell Biol. 1991 Jun; 113(5):1033–42.
43. Van Es HH, Karcz S, Chu F, Cowman AF, Vidal S, Gros P, et al. Expression of the plasmodial *pfmdr1* gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. Mol. Cell. Biol. 1994 Apr; 14(4):2419–28.
44. Bray PG, Hawley SR, Mungthin M, Ward SA. Physicochemical properties correlated with drug resistance and the reversal of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. Mol. Pharmacol. 1996 Dec; 50(6):1559–66.
45. Griffin CE, Hoke JM, Samarakoon U, Duan J, Mu J, Ferdig MT, et al. Mutation in the *Plasmodium falciparum* CRT protein determines the stereospecific activity of antimalarial cinchona alkaloids. Antimicrob. Agents Chemother. 2012 Oct; 56(10):5356–64.
46. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. Nature. 2000 Feb 24; 403(6772):906–9.
47. 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. ISRN Bioinform. 2013; 2013:437168.
48. Cheeseman IH, Miller BA, Nair S, Nkhoma S, Tan A, Tan JC, et al. A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria. Science. 2012 Apr 6; 336(6077):79–82.
49. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, et al. A molecular

marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014 Jan; 505 (7481):50.

50. 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.* 2016 23; 374 (25):2453–64.
51. 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. *Malaria Journal*. 2014 Dec 4; 13: 472.
52. Mok S, Ashley EA, Ferreira PE, Zhu L, Lin Z, Yeo T, et al. Drug resistance. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science*. 2015 Jan 23; 347(6220):431–5.
53. Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, Liu H, Estiu G, Stahelin RV, et al. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2015 Apr 30; 520 (7549):683–7.
54. Hott A, Tucker MS, Casandra D, Sparks K, Kyle DE. Fitness of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015 Oct; 70 (10):2787–96.
55. Haidaro, S. A., Doumbo, O., Traore, A. H., et al. La place du paludisme dans les syndrome fébriles en médecine interne. *Médecine d’Afrique Noire*, 1991, 38, (2).
56. Greenhouse B, Myrick A, Dokomajilar C, Woo JM, Carlson EJ, Rosenthal PJ, et al. Validation of microsatellite markers for use in genotyping polyclonal *Plasmodium falciparum* infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006 Nov; 75 (5):836–42.
57. 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*. 2014 Jan 10;14:13.
58. Kourounte I. Etude biologique de la relation entre l’anémie et le paludisme chez les enfants de 2 à 15 ans dans le CSCOM de Dioro. Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako USTTB. Thèse medecine, 2014, N°147.
59. Kamaté B. Effets du niveau de transmission et de l’âge sur l’incidence du paludisme simple a Sotuba et Doneguebougou (mali) en 1999 et 2000. Université de Bamako. Faculté de médecine, de Pharmacie et d’Odonto-stomatologie (FMPOS) Thèse medecine, 2002, N°143.
60. Klenerman P. Mosquitoes: how to be the perfect host. *Int. J. Dermatol.* 1989 Aug;28(6):370–2.
61. Maibach HI, Skinner WA, Strauss WG, Khan AA. Factors that attract and repel mosquitoes in human skin. *JAMA*. 1966 Apr 18;196(3):263–6.

62. Ndour PA, Lopera-Mesa TM, Diakité SAS, Chiang S, Mouri O, Roussel C, et al. *Plasmodium falciparum* Clearance Is Rapid and Pitting Independent in Immune Malian Children Treated With Artesunate for Malaria. *J Infect Dis.* 2015 Jan 15;211(2):290–7.
63. LE HESRAN, Jean-Yves. Les particularités du paludisme chez l'enfant. *Med Trop*, 2000, 60, (1): 92-98.
64. Maiga, A. W. MAIGA A W., FOFANA B., SAGARA I., et al. No evidence of delayed parasite clearance after oral artesunate treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Mali. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2012, 87, (1): 23-28.
65. Faye B, Ndiaye J-L, Ndiaye D, Dieng Y, Faye O, Gaye O. Efficacy and tolerability of four antimalarial combinations in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Senegal. *Malar. J.* 2007 Jun 14;6: 80.
66. Zwang J, Olliaro P, Barennes H, Bonnet M, Brasseur P, Bukirwa H, et al. Efficacy of artesunate-amodiaquine for treating uncomplicated *falciparum* malaria in sub-Saharan Africa: a multi-centre analysis. *Malar. J.* 2009 Aug 23; 8: 203.
67. Dorsey G, Staedke S, Clark TD, Njama-Meya D, Nzarubara B, Maiteki-Sebuguzi C, et al. Combination therapy for uncomplicated *falciparum* malaria in Ugandan children: a randomized trial. *JAMA.* 2007 May 23; 297 (20):2210–9.
68. Sow, D., Ndiaye, J.-L., Sylla, K., et al. Évaluation de l'efficacité et de la tolérance des combinaisons artésunate-amodiaquine, dihydroartémisinine-pipéraquline et Artéméthéruméfanztrine pour le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* non compliqué au Sénégal. *Médecine et Santé Tropicales*, 2016, 26, (1): 45-50.
69. Falade C, Makanga M, Premji Z, Ortmann C-E, Stockmeyer M, De Palacios PI. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine (Coartem) tablets (six-dose regimen) in African infants and children with acute, uncomplicated *falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2005 Jun; 99(6):459–67.
70. Sagara I, Dicko A, Djimde A, Guindo O, Kone M, Tolo Y, et al. A randomized trial of artesunate-sulfamethoxypyrazine-pyrimethamine versus artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006 Oct; 75 (4): 630–6.
71. Mutabingwa TK, Anthony D, Heller A, Hallett R, Ahmed J, Drakeley C, et al. Amodiaquine alone, amodiaquine+sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine+artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in Tanzanian children: a four-arm randomised effectiveness trial. *Lancet.* 2005 Apr 23; 365(9469):1474–80.
72. Vinayak S, Alam MT, Sem R, Shah NK, Susanti AI, Lim P, et al. Multiple genetic backgrounds

of the amplified *Plasmodium falciparum* multidrug resistance (*pfmdr1*) gene and selective sweep of 184F mutation in Cambodia. *J. Infect. Dis.* 2010 May 15; 201 (10):1551–60.

73. Pirahmadi S, Zakeri S, Afsharpad M, Djadid ND. Mutation analysis in *pfmdr1* and *pfmrp1* as potential candidate genes for artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates 4years after implementation of artemisinin combination therapy in Iran. *Infection, Genetics and Evolution.* 2013 Mar 1; 14: 327–34.
74. Koukouikila-Koussounda F, Jeyaraj S, Nguetse CN, Nkonganyi CN, Kokou KC, Etoke-Beka MK, et al. Molecular surveillance of *Plasmodium falciparum* drug resistance in the Republic of Congo: four and nine years after the introduction of artemisinin-based combination therapy. *Malar. J.* 2017 19; 16 (1):155.
75. Lo E, Nguyen J, Oo W, Hemming-Schroeder E, Zhou G, Yang Z, et al. Examining *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* clearance subsequent to antimalarial drug treatment in the Myanmar-China border area based on quantitative real-time polymerase chain reaction. *BMC Infectious Diseases.* 2016 Apr 16; 16: 154.
76. Li J, Chen J, Xie D, Eyi UM, Matesa RA, Obono MMO, et al. Molecular mutation profile of *Pfcr1* and *Pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* isolates from Bioko Island, Equatorial Guinea. *Infection, Genetics and Evolution.* 2015 Dec 1; 36: 552–6.
77. Ojurongbe O, Ogunbamigbe TO, Fagbenro-Beyioku AF, Fendel R, Kremsner PG, Kun JFJ. Rapid detection of *Pfcr1* and *Pfmdr1* mutations in *Plasmodium falciparum* isolates by FRET and in vivo response to chloroquine among children from Osogbo, Nigeria. *Malar. J.* 2007 Apr 11;6:41.
78. Apinjoh TO, Mugri RN, Miotto O, Chi HF, Tata RB, Anchang-Kimbi JK, et al. Molecular markers for artemisinin and partner drug resistance in natural *Plasmodium falciparum* populations following increased insecticide treated net coverage along the slope of mount Cameroon: cross-sectional study. *Infectious Diseases of Poverty.* 2017 Nov 6; 6: 136.
79. Li J, Chen J, Xie D, Monte-Nguba S, Eyi JUM, Matesa RA, et al. High prevalence of *pfmdr1* N86Y and Y184F mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from Bioko island, Equatorial Guinea. *Pathogens and Global Health.* 2014 Oct 1;108 (7): 339–43.
80. Ljolje D, Dimbu PR, Kelley J, Goldman I, Nace D, Macaia A, et al. Prevalence of molecular markers of artemisinin and lumefantrine resistance among patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in three provinces in Angola, 2015. *Malaria journal,* 2018, 17, (1): 84.
81. Dorkenoo AM, Yehadji D, Agbo YM, Layibo Y, Agbeko F, Adjeloh P, et al. Therapeutic efficacy trial of artemisinin-based combination therapy for the treatment of uncomplicated

malaria and investigation of mutations in k13 propeller domain in Togo, 2012–2013. *Malaria journal*. 2016, 15, (1): 331.

82. 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.* 2015 Jun; 92 (6): 1202–6.
83. Li J, Chen J, Xie D, Eyi UM, Matesa RA, Ondo Obono MM, et al. Limited artemisinin resistance-associated polymorphisms in *Plasmodium falciparum* K13-propeller and PfATPase6 gene isolated from Bioko Island, Equatorial Guinea. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2016 Apr; 6 (1): 54–9.
84. Conrad MD, Bigira V, Kapisi J, Muhindo M, Kanya MR, Havlir DV, et al. Polymorphisms in K13 and falcipain-2 associated with artemisinin resistance are not prevalent in *Plasmodium falciparum* isolated from Ugandan children. *PLoS ONE*. 2014;9 (8): e105690.
85. Isozumi R, Uemura H, Kimata I, Ichinose Y, Logedi J, Omar AH, et al. Novel Mutations in K13 Propeller Gene of Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Emerg Infect Dis*. 2015 Mar;21 (3):490–2.
86. Feng J, Zhou D, Lin Y, Xiao H, Yan H, Xia Z. Amplification of *pfmdr1*, *pfprt*, *pvmdr1*, and K13 Propeller Polymorphisms Associated with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Isolates from the China-Myanmar Border. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2015 May 1; 59 (5):2554–9.
87. Nyunt MH, Hlaing T, Oo HW, Tin-Oo L-LK, Phway HP, Wang B, et al. Molecular assessment of artemisinin resistance markers, polymorphisms in the k13 propeller, and a multidrug-resistance gene in the eastern and western border areas of Myanmar. *Clin. Infect. Dis*. 2015 Apr 15;60 (8): 1208–15.
88. Tun KM, Imwong M, Lwin KM, Win AA, Hlaing TM, Hlaing T, et al. Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *Lancet Infect Dis*. 2015 Apr; 15 (4): 415–21.



# **ANNEXES**

## ANNEXES

### FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom :** DIALLO

**Prénom :** Abdoul Karim

**Tel :** (00223)-71300341 **Email :** [abdoukarimdiallo360@gmail.com](mailto:abdoukarimdiallo360@gmail.com)

**Titre de la thèse :** Test d'efficacité de la combinaison thérapeutique Artémether plus Luméfantrine dans la commune rurale de Dioro : Prévalence des mutations sur les gènes *Pfmdr1* and *PfK13* chez les parasites isolés lors des échecs thérapeutiques

**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.

#### Résumé

L'émergence de la résistance aux dérivés de l'Artémisinine et ses molécules partenaires à l'ouest du Cambodge menace les progrès récents en matière de contrôle et de l'élimination du paludisme à l'échelle mondiale. Le polymorphisme des mutations du gène *PfK13* et *Pfmdr1* sont d'une importance capitale d'où l'objet de cette étude, qui était d'estimer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance à l'Artémether plus la Luméfantrine à Dioro.

Il s'agissait d'une étude prospective qui s'est déroulée d'avril 2012 à mai 2017 dans le centre de santé communautaire de Dioro. Un total de 1249 patients ont été dépistés parmi lesquels 214 ont été enrôlés, tous âgés de 2 à 15 ans. Des échantillons de sang prélevés sur du papier filtre ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN par le kit Qiagen (conformément aux instructions du fabricant). La différenciation des nouvelles infections des cas de recrudescence a été faite par l'utilisation de 4 microsatellites neutres (*2490* ; *PfPK2* ; *Polya* et *TA1*). La détection des mutations a été faite par le séquençage du Domaine Propeller gène *PfK13* et les régions 1 et 2 de *Pfmdr1* par la méthode de Frederick Sanger. Elle a été réalisée sur 14 patients parmi les 19 cas d'échecs thérapeutiques avant le traitement et le jour d'échec thérapeutique.

La tranche d'âge 6 à 9 ans était la plus représentée soit 41,58% (89/214) et éliminaient plus rapidement les parasites à 24H et 48H respectivement 43,33% et 41,67%. Le taux de guérison corrigé par l'analyse des quatre microsatellites neutres représentait 99,73% et le taux recrudescence était 0,93%. Les mutations trouvées sur le gène *Pfmdr1* étaient Y184F à 73,1%, 10,7% pour (N86Y et T1226T), 3,6% pour (G102G, G1161R et G1218G) et 3,8% pour D1246Y. Les doubles (N86Y +



Y184F) et les triples (Y184F + T1226T + D1246Y) mutations représentaient respectivement 10,7% et 3,6%. Une mutation transitoire a été trouvée sur le gène *PfK13*, il s'agit de P413P soit 3,57 %.

En conclusion, avec la fréquence élevée des mutations sur *Pfmdr1*, un contrôle régulier des marqueurs de mutations associées à la résistance des dérivés de l'Artémisinine et ses molécules partenaires s'avère nécessaire. Le traitement à base d'Artémisinine plus la Luméfantrine reste efficace dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* dans la localité de Dioro.

**Mots clés** : mutations, gène, séquençage, *Pfmdr1*, *PfK13* et Dioro

## IDENTIFICATION SHEET

**Last Name:** DIALLO

**First Name:** Abdoul Karim

**TEL:** (00223) 71300341      **Email :** [abdoukarimdiallo360@gmail.com](mailto:abdoukarimdiallo360@gmail.com)

**Title:** Efficacy test of the therapeutic combination Artemether plus Lumefantrine in the rural commune of Dioro: Prevalence of mutations on *Pfmdr1* and *PfK13* genes within parasites isolated during therapeutic failures

**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

The emergence of Artemisinin derivatives resistance and its partner molecules in western Cambodia threatens recent progress in controlling and eliminating malaria worldwide. The polymorphism of *PfK13* and *Pfmdr1* mutations is very important, hence the purpose of this study was to estimate the prevalence of molecular markers of resistance to Artemether plus Lumefantrine in Dioro.

This study was a prospective study that took place from April 2012 to May 2017 in the Dioro Community Health Center. A total of 1249 patients were screened, from which 214 were enrolled, all from 2 to 15 years old. Dried blood spots were used for DNA extraction by the Qiagen kit (according to the manufacturer's instructions). The differentiation of new infections from recrudescence cases was made by the use of 4 neutral microsatellites (2490, PfPK2, Poly $\alpha$  and TA1). Detection of mutations was done by sequencing the Propeller Domain of *PfK13* gene and regions 1 and 2 of *Pfmdr1* by the method of Frederick Sanger. It was performed on 14 patients among the 19 cases of treatment failure before treatment and the day of treatment failure.

The age group 6 to 9 years was the most represented, with 41.58% and eliminated the parasites at 24H and 48H respectively 43.33% and 41.67%. The cure rate corrected by the analysis of the four neutral microsatellites was 99.73% and the recrudescence rate was 0.93%. The mutations found on the *Pfmdr1* gene were 73.1% of **184F**, 10.7% for **86Y** and **1226T**), 3.6% for (**102G**, **1161R** and **1218G**) and 3.8% for **1246Y**. Double (**86Y** + **184F**) and triple (**184F** + **1226T** + **1246Y**) mutations accounted for 10.7% and 3.6%, respectively. A transient mutation was found on the *PfK13* gene, it is the **413P** for 3.57%.

In conclusion, with the high frequency of mutations on *Pfmdr1*, a regular monitoring of the mutations associated to the resistance of the Artemisinin derivatives and its partner molecules is necessary.

Artemisinin-based treatment plus Lumefantrine remains effective in the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria in the Dioro locality.

**Keywords:** mutations, gene, sequencing, *Pfmdr1*, *PfK13* and Dioro

## Notation de la taille des fragments à l'aide du logiciel GeneMapper®

Ouvrez le programme GeneMapper

"Fichier" → "Ajouter des échantillons au projet"

Recherchez le dossier, puis cliquez dessus. Cliquez sur "Ajouter à la liste", puis sélectionnez "Ajouter"

"Méthode d'analyse" → "Microsatellite default". Puis sélectionnez Tout et remplissez (Ctrl + D)

"Taille standard" → GS350. Puis sélectionnez tout et remplissez

Sélectionnez ensuite → tous les échantillons et appuyez sur le bouton vert "Play"

Donnez le nom approprié au fichier

Utilisez l'onglet Éditeur de correspondance de taille pour vous assurer que les marqueurs moléculaires sont corrects.

Vérifier les erreurs sur la colonne SQ (qualité du calibrage).

Puis éditez les exemples avec des erreurs dans leur taille en utilisant l'éditeur de correspondance de taille.

("Override →" Apply "fait passer le signal du rouge au vert).

Appuyez sur Lecture une fois les modifications terminées pour réexécuter les échantillons.

Pour voir les résultats, sélectionnez l'échantillon et "Afficher les graphiques".

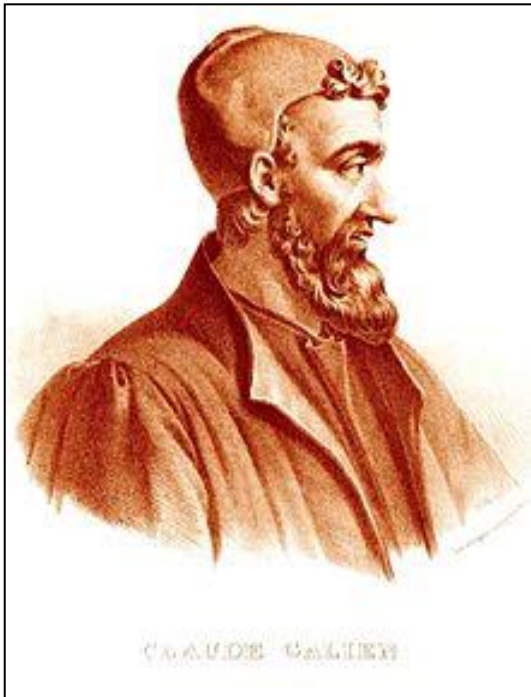
Assurez-vous que toutes les couleurs sont activées et que l'onglet "Combine Oyes" est sélectionné.

Aussi, vous voulez analyser à la hauteur maximale, donc "View" → Y Axis → Maximum Y

Les unités fluorescentes relatives minimales à considérer comme un pic positif sont de 100 rfu (unité de fluorescence relative). Vérifiez toujours votre contrôle sans gabarit pour vous assurer qu'il n'y a pas de contamination et que votre contrôle positif a fonctionné HEX- Bleu; FAM- Vert.

**NB:** Si l'amplification échoue au premier essai, l'amplification et l'analyse doivent être répétées une fois de plus. Ce n'est qu'après un second cycle d'amplification et d'analyse qu'un échantillon sera catégorisé comme ayant échoué à amplifier (DNW) à un locus particulier.

## 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!