

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple-Un But-Une Foi



UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2022-2023

N° _____/

**Etude d'efficacité thérapeutique des combinaisons
thérapeutiques à base d'artémisinine dans la localité de
Sélingué entre 2016 et 2020 au Mali.**

Présentée et soutenue publiquement le __/__/__ devant la Faculté de Pharmacie pour
obtenir le grade de

**DOCTEUR EN PHARMACIE
(DIPLOME D'ETAT)**

Par

M. Ibrahim BAGAYOKO

JURY

Président du jury : Professeur Mouctar DIALLO

Membres : Docteur Oumar KONE

Monsieur Ibrahim KEITA

Co-directeur de thèse : Docteur Youssouf DIARRA

Directeur de thèse : Professeur Ousmane KOITA

Cette thèse a reçu le financement du projet PMI: 4442MALI-USTTB

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2022-2023

➤ ADMINISTRATION

Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur

Vice-doyen : Sékou BAH, Maître de Conférences

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable : Ismaël CISSE, Contrôleur des Finances.

➤ PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
4	Abdoulaye	DABO	Malacologie -Biologie animale
5	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
6	Mouctar	DIALLO	Parasitologie-mvcologie
7	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
8	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie humaine
9	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
10	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
11	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
12	Alou A.	KEÏTA	Galénique
13	Mamadou	KONE	Physiologie
14	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
15	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
16	Saïbou	MAÏCA	Législation
17	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
18	Mahamadou	TRAORE	Génétique
19	Sékou Fantamadv	TRAORE	Zoologie
20	Yaya	COULIBALY	Législation

➤ **PROFESSFURS DECEDES**

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mahamadou	CISSE	Biologie
2	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
3	Moussa	HARAMA	Chimie analytique
4	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
5	Moussa	SANOGO	Gestion pharmaceutique

➤ **DER: SCIENCES BIOLOGIQUES ET MÉDICALES**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Professeur	Hématologie
2	Mahamadou	DIAKITE	Professeur	Immunologie-Génétique
3	Alassane	DICKO	Professeur	Santé Publique
4	Abdoulaye	DJIMDE	Professeur	Parasitologie-Mycologie
5	Amagana	DOLO	Professeur	Parasitologie-Mycologie
6	Aldjouma	GUINDO	Professeur	Hématologie. Chef de DER
7	Akory Ag	IKNANE	Professeur	Santé Publique/Nutrition
8	Kassoum	KAYENTAO	Directeur de recherche	Santé publ./ Bio-statistique
9	Ousmane	KOITA	Professeur	Biologie-Moléculaire
10	Issaka	SAGARA	Directeur de recherche	Bio-statistique
11	Boubacar	TRAORE	Professeur	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Bourèma	KOURIBA	Maître de conférences	Immunologie
2	Almoustapha Issiaka	MAÏGA	Maître de recherche	Bactériologie-Virologie
3	Mahamadou S.	SISSOKO	Maître de recherche	Bio-statistique

4	Ousmane	TOURE	Maître de recherche	Santé Publiq/Santé environ.
5	Djibril Mamadou	COULIBALY	Maître de conférences	Biochimie clinique
6	Djénéba Koumba	DABITAO	Maître de conférences	Biologie-moléculaire
7	Antoine	DARA	Maître de conférences	Biologie-moléculaire
8	Souleymane	DAMA	Maître de conférences	Parasitologie - Mycologie
9	Laurent	DEMBELE	Maître de conférences	Biotechnologie-Microbienne
10	Seydina S. A.	DIAKITE	Maître de conférences	Immunologie
11	Fatou	DIAWARA	Maître de conférences	Epidémiologie
12	Ibrahima	GUINDO	Maître de conférences	Bactériologie Virologie
13	Amadou Birama	NIANGALY	Maître de conférences	Parasitologie – Mycologie
14	Fanta	SANGO	Maître de conférences	Santé publ/Santé commun.
15	Yéya dit Dadio	SARRO	Maître de conférences	Epidémiologie

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Maître-Assistant	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Maître-Assistant	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Maître-Assistant	Biologie clinique
4	Seydou Sassou	COULIBALY	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
5	Klétigui Casimir	DEMBELE	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
6	Yaya	GOITA	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
7	Aminatou	KONE	Maître-Assistant	Biologie moléculaire
8	Birama Apho	LY	Maître-Assistant	Santé publique
9	Dinkorma	OUOLOGUEM	Maître-Assistant	Biologie Cellulaire

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Assistant	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Assistant	Immunologie
3	Merepen dit Agnès	GUINDO	Assistant	Immunologie
4	Falaye	KEITA	Attaché de Recherche	Santé Publique/Santé Environn.
5	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Assistant	Nutrition
6	Djakaridia	TRAORE	Assitant	Hématologie

➤ **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Rokia	SANOGO	Professeur	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Maitre de Conférences	Pharmacie hospitalière
2	Mahamane	HAIDARA	Maitre de Conférences	Pharmacognosie

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Bakary Moussa	CISSE	Maitre-Assistant	Galénique
2	Issa	COULIBALY	Maitre-Assistant	Gestion
3	Balla Fatogoma	COULIBALY	Maitre-Assistant	Pharmacie hospitalière
4	Adama	DENOU	Maitre-Assistant	Pharmacognosie
5	Hamma Boubacar	MAÏGA	Maitre-Assistant	Galénique
6	Adiaratou	TOGOLA	Maitre-Assistant	pharmacognosie

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Assistant	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Assistant	Pharmacognosie
3	Sékou	DOUMBIA	Assistant	Pharmacognosie
4	Assitan	KALOGA	Assistant	Législation
5	Ahmed	MAÏGA	Assistant	Législation
6	Aichata Ben Adam	MARIKO	Assistant	Galénique
7	Aboubacar	SANGHO	Assistant	Législation
8	Bourama	TRAORE	Assistant	Législation
9	Sylvestre	TRAORÉ	Assistant	Gestion pharmaceutique
10	Aminata Tiéba	TRAORE	Assistant	Pharmacie hospitalière
11	Mohamed dit Sarmove	TRAORE	Assistant	Pharmacie hospitalière

➤ **DER : SCIENCES DU MEDICAMENT**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Professeur	Pharmacologie
2	Benoit Yaranga	KOUMARE	Professeur	Chimie Analytique
3	Ababacar I.	MAÏGA	Professeur	Toxicologie

1. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Tidiane	DIALLO	Maitre de Conférences	Toxicologie
2	Hamadoun Abba	TOURE	Maitre de Conférences	Bromatologie Chef de DER

2. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Maitre-Assistant	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Maitre-Assistant	Chimie thérapeutique

3	Ousmane	DEMBELE	Maitre-Assistant	Chimie thérapeutique
4	Madani	MARIKO	Maitre-Assistant	Chimie Analytique
5	Karim	TRAORE	Maître-Assistant	Pharmacologie

3. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Assistant	Pharmacologie
2	Dalave Bernadette	COULIBALY	Assistant	Chimie analytique
3	Blaise	DACKOOU	Assistant	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Assistant	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Assistant	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Assistant	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Assistant	Chimie analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Assistant	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Assistant	Chimie analytique

➤ DER : SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
-	-	-	-	-

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIAUTE
1	Lassana	DOUMBIA	Maitre de Conférences	Chimie appliquée
2	Abdoulaye	KANTE	Maitre de Conférences	Anatomie
3	Boubacar	YALCOUYE	Maitre de Conférences	Chimie organique

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Maitre-Assistant	Botanique-Biol. Végét Chef de DER
2	Boureima	KELLY	Maître-Assistant	Physiologie médicale

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Assistant	Chimie organique
2	Modibo	DIALLO	Assistant	Génétique
3	Moussa	KONE	Assistant	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Assistant	Biologie Entomologie

➤ CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba M	COULIBALY	Droit commercial
5	Moussa I	DIARRA	Biophysique
6	Satigui	SIDIBÉ	Pharmacie vétérinaire
7	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
8	Fana	TANGARA	Mathématiques
9	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
10	Mahamadou	TRAORE	Génétique
11	Boubacar	ZIBÉÏROU	Physique

DEDICACES ET REMERCIEMENTS

DEDICACES

Je dédie cette thèse :

A ALLAH

Le Tout Puissant et le Très Miséricordieux, à qui je rends grâce de m'avoir donné la santé, la force et le courage de réaliser ce document.

A mes parents

Qui n'ont ménagé aucun effort et sacrifice pour que je puisse réaliser mon rêve de Pharmacien un jour. Merci pour vos encouragements et soutiens !!!

REMERCIEMENTS

Tous mes remerciements :

A mon Papa, Wombo BAGAYOKO, de m'avoir soutenu et prodigué des conseils tout au long de mon cursus universitaire ainsi que lors de la réalisation de ce document. Que le Tout Puissant t'accorde encore une longue vie pieuse avec une santé de fer !!!

A ma Maman, Aminata SAMAKE, pour tes prières et bénédictions pour l'atteinte de mes objectifs. Merci de m'avoir gratifié de cet amour inconditionnel qu'une mère a pour son enfant, qu'ALLAH te donne encore une très longue vie à nos côtés !!!

A toute ma famille : Issa, Doussouba, Koura et Mamadou BAGAYOKO, pour vos soutien et présence dans ma vie. Puisse Dieu consolider davantage les liens qui nous unissent et nous donne une longue vie pieuse !!!

A mes MAITRES de la Faculté de Pharmacie pour leur enseignement édifiant et instructif.

A tout le personnel du LBMA, pour leur soutien et accompagnement à la réalisation de ce document.

A tout le personnel du CSRéf de Sélingué, pour leur hospitalité et leur engagement dans la bonne réalisation de cette étude. Mention spéciale au chef de laboratoire, Bassi COULIBALY

A mes aînés **Dr Youssouf DIARRA, Dr Modibo TELLY, Dr Hamadou BOUARE, Dr Tahirou TRAORE, Dr Bakary COULIBALY, Dr Modibo Salia DRAME, Dr Mamadou WAGUE**, pour leur encadrement et soutien moral dans la rédaction de ce document.

A tous mes camarades de la Promotion Feu Moussa Harama, la onzième promotion du *numerus clausus* de la Faculté de Pharmacie (USTTB) ; pour votre franche collaboration durant notre cursus universitaire. Puisse cela se perdurer dans notre vie professionnelle !!!

A mes amis de la faculté, Dr Mohamed A NANTOUME, Dr Souleymane KABA, Dr Mamadou SIDIBE, Dr Abdoulaye CAMARA, Dr Mohamed NIAMASSOUMOU, Dr Mahamadou TOGOLA, Dr Lamine DOUMBIA, Dr Moussa KOITA, Dr Aima DIAKITE, Dr Lassine DIALLO... Merci pour votre humanité et accompagnement tout au long de notre cursus universitaire !!!

A tout le personnel des officines du 2^{ème} PONT et LAYA, Merci pour votre soutien !!!

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maitre et Président du Jury

Professeur Mouctar DIALLO

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

Cher Maitre,

Nous vous exprimons toute notre gratitude pour vos enseignements et en acceptant de présider ce Jury de thèse. Puisse Dieu vous accorder encore une très longue vie !!!

A notre Maitre et membre du Jury

Docteur Oumar KONE

- ✓ **Diplômé d'études spécialisées de Maladies Infectieuses et Tropicales ;**
- ✓ **Membre de la Société Malienne de Pathologie Infectieuse et Tropicale (SOMAPIT) ;**
- ✓ **Membre de la Société Malienne d'Épidémiologie (SOMEPI) ;**
- ✓ **Infectiologue-chercheur ;**
- ✓ **Chargé de Prise en charge des cas au Programme National de Lutte contre le Paludisme.**

Cher Maitre,

Nous sommes très heureux de votre présence dans ce jury. Vous nous avez honorés par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail. Votre désir profond de valoriser la profession fait de vous un homme respectable. Recevez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maitre et membre du Jury

M. Ibrahim KEITA

- ✓ **Assistant en biologie moléculaire à la FMOS,**
- ✓ **Attaché de recherche au LBMA.**

Cher Maitre,

C'est un réel plaisir pour nous d'avoir accepté de juger ce travail. Votre rigueur scientifique et votre modestie nous ont beaucoup séduits durant la réalisation de ce document. Recevez nos sincères remerciements !!!

A notre Maitre et co-directeur de Thèse

Docteur Youssouf DIARRA

- ✓ **Pharmacien ;**
- ✓ **Titulaire d'un master en Épidémiologie ;**
- ✓ **DES en Biologie Clinique ;**
- ✓ **Chef d'unité de parasitologie au LBMA.**

Cher Maitre,

Ce fut un réel plaisir pour nous d'avoir été parmi vos thésards. Votre sens élevé de responsabilité et votre rigueur scientifique nous ont beaucoup animés lors de la réalisation de ce document. Merci pour votre disponibilité pendant ce travail. Puisse Dieu vous le rende au centuple !!!

A notre Maitre et directeur de Thèse

Professeur Ousmane KOITA

✓ Pharmacien Biologiste (PharmD, PhD) ;

✓ Professeur Titulaire en Biologie moléculaire ;

✓ Responsable de l'enseignement de Biologie cellulaire et moléculaire à la FAPH ;

✓ Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée.

Cher Maitre,

Vous nous avez beaucoup marqués par votre passion pour la recherche, du travail bien fait, votre disponibilité constante et la qualité de votre enseignement. Nous vous remercions d'avoir accepté de diriger ce travail malgré vos multiples occupations. Que le Tout Puissant vous le rende au centuple !!!

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

Abréviations	Significations
ACPR	Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate
AL	Artéméther plus Luméfantrine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ASACO	Association de Santé Communautaire
ASAQ	Artésunate + Amodiaquine
CI50	Concentration Inhibitrice 50
CIVD	Coagulation Intra Vasculaire Disséminée
CPS	Chimio prévention du Paludisme Saisonnier
CSCoM	Centre de Santé Communautaire
CS Réf	Centre de Santé de Référence
CTA	Combinaison thérapeutique à base d'Artémisinine
DP	Dihydroartémisinine plus Pipéraquline
ECAAM	Evaluation Externe des Compétences en Microscopie
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ETF	Early Treatment Failure (Échec Thérapeutique Précoce)
FRC	Formulaire de Report des Cas
FM	Frottis Sanguin Mince
GE	Goutte épaisse
GLURP	Glutamate Rich Protein
Hb	Hémoglobine
HRP2	Histidine Rich Protein 2
INPS	Institut National de Prévoyance Sociale
J-C	Jésus-Christ
Kg	Kilogramme
LBMA	Laboratoire de Biologie moléculaire Appliquée
LCF	Late Clinical Failure (Échec Clinique Tardif)
LPF	Late Parasitological Failure (Échec Parasitologique Tardif)
MILD	Moustiquaire Imprégnée d'insecticides à Longue Durée d'action
Mm	Milli-mole
MSP1	Merozoite Surface Protein 1
MSP2	Merozoite Surface Protein 2
NFS	Numération Formule Sanguine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
<i>P.falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P.knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P.malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P.ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>

<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PID	Pulvérisation Intra Domiciliaire
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
QBC	Quantity Buffy-Coat
SP	Sulfadoxine-Pyriméthamine
TDR	Test de Diagnostic Rapide
Tf	Trophozoïtes
TPI	Traitement Préventif Intermittent
TPIg	Traitement Préventif Intermittent pendant la grossesse

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Protocole d'administration de AL en fonction du poids.....	25
Tableau II : Protocole d'administration de ASAQ en fonction du poids.....	26
Tableau III : Protocole d'administration de DP en fonction du poids	26
Tableau IV : Liste des examens par visite	27
Tableau V : Taux d'inclusion des patients par année	33
Tableau VI : Répartition des patients selon leur genre	33
Tableau VII : Répartition des patients en fonction de la tranche d'âge.....	33
Tableau VIII : Répartition des cas selon le bras	34
Tableau IX : Répartition des différents paramètres à l'inclusion	34
Tableau X : Répartition des cas d'échecs thérapeutiques précoce (ETF).....	35
Tableau XI : Répartition des cas d'échecs cliniques tardifs (LCF)	36
Tableau XII : Répartition des cas d'échecs parasitologiques tardifs (LPF).....	36
Tableau XIII : Répartition des cas de réponse clinique et parasitologique adéquate (ACPR)	37
Tableau XIV : Répartition des cas d'échecs thérapeutiques en recrudescences.....	37
Tableau XV : Répartition des réinfections (RI).....	38
Tableau XVI : Répartition de la réponse clinique et parasitologique adéquate (ACPR) après correction moléculaire	38
Tableau XVII : Répartition des cas de réinfections en fonction de leur période de survenue.....	39

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition des cas de résistance à l'artémisinine dans le monde ...	Erreur ! Signet non défini.
Figure 2 : Répartition des cas de résistance à l'artémisinine en Afrique	9
Figure 3 : Répartition des cas de résistance à l'artémisinine au Mali	10
Figure 4 : Cycle de développement de P.falciparum	14
Figure 5 : Localisation géographique du site de Sélingué	22
Figure 6 : Algorithme de discrimination des cas de recrudescence des cas de nouvelles infections	29
Figure 7 : Kaplan-Meier 2016 à Sélingué avant et après correction moléculaire.....	40
Figure 8 : Kaplan-Meier 2017 à Sélingué avant et après correction moléculaire.....	41
Figure 9 : Kaplan-Meier 2020 à Sélingué avant et après correction moléculaire.....	42

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION.....	1
2	OBJECTIFS.....	4
2.1	Objectif général.....	4
2.2	Objectifs spécifiques.....	4
3	GENERALITES.....	6
3.1	Historique.....	6
3.2	Répartition géographique.....	6
3.3	BIOLOGIE.....	11
3.3.1	Vecteur.....	11
3.3.2	Agent pathogène.....	11
3.4	Cycle de vie des plasmodies.....	12
3.4.1	Chez l'Homme : Reproduction asexuée.....	12
3.4.2	Chez l'Anophèle : Reproduction sexuée.....	13
3.5	Diagnostic biologique.....	15
3.5.1	Diagnostic d'orientation.....	15
3.5.2	Diagnostic parasitologique.....	15
3.6	Traitement.....	16
3.6.1	Schizonticides.....	16
3.6.2	Gamétocytocides.....	17
3.6.3	Quelques Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA).....	17
3.7	Chimiorésistance.....	18
4	METHODOLOGIE.....	21
4.1	Lieu d'étude.....	21
4.2	Période d'étude.....	23
4.3	Echantillonnage.....	Erreur ! Signet non défini. 20
4.4	Critères d'inclusion.....	23
4.5	Critères de non inclusion.....	24
4.6	Intervention.....	24
4.6.1	Diagnostic du paludisme simple à <i>Plasmodium falciparum</i>	24
4.7	Schéma thérapeutique.....	25

4.7.1	Protocoles d'administration des molécules AL, ASAQ et DHA-PPQ.....	25
	Suivi des patients.....	26
4.8	Transport et conservation des échantillons.....	27
4.9	Analyse moléculaire.....	27
4.9.1	Extraction de l'ADN	27
4.9.2	Génotypage	28
4.10	Définitions des terminologies et analyses des données	30
4.11	Considérations éthiques et déontologiques.....	30
4.12	Confidentialité.....	31
5	RESULTATS.....	33
5.1	Les caractéristiques socio-démographiques des patients	33
5.2	Echecs thérapeutiques	35
5.2.1	Réponses aux traitements avant correction PCR	35
5.2.2	Réponses aux traitements après correction PCR	37
6	COMMENTAIRES ET DISCUSSION	44
7	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	49
9	ANNEXES	57

INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante, due à la présence et à la multiplication dans l'organisme humain d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis par la piqûre infestante de la femelle d'un moustique du genre *Anopheles* [1].

Il existe 465 espèces d'*Anopheles* officiellement reconnues, dont 41 sont considérés comme vecteur dominant dans la transmission du paludisme [2]. Au Mali, les vecteurs majeurs du paludisme sont les membres du complexe *Anopheles gambiae* et le groupe *Anopheles funestus* [3].

Environ 250 espèces de *Plasmodium* sont actuellement considérées comme des parasites de mammifères, oiseaux et reptiles. Parmi ces espèces, seules cinq (05) sont connues dans le paludisme humain : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, et *Plasmodium knowlesi* [2]. Il faut cependant noter que *Plasmodium falciparum* est la plus rencontrée et la plus virulente, donc la plus associée à la morbi-mortalité du paludisme dans la population générale où les enfants de moins de cinq (05) ans et les femmes enceintes constituent les couches les plus vulnérables [4].

Le Paludisme est une endémie parasitaire à laquelle 3.3 milliards de personnes sont exposées dans le monde. Malgré les efforts consentis pour l'éradication du paludisme dans le monde, il demeure toujours une priorité de santé publique, notamment en Afrique [5]. En 2019, on estimait à 229 millions de cas avec 409 000 décès dans le monde dont 90 % était enregistrés en Afrique et est considérée comme le continent qui paye le plus lourd tribut de la pathologie [6].

Le paludisme constitue un véritable problème de santé publique au Mali avec 32% des motifs de consultation [7]. En 2017, les centres de santé au Mali ont enregistré 2 097 797 cas de paludisme dont 673 574 cas graves. Les chiffres du PNLP indiquent 1 050 décès, soit un taux de létalité de 0,50 ‰ [7].

La distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILD), la pulvérisation intra domiciliaire (PID), le traitement préventif intermittent chez les femmes enceintes (TPIg), la chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) chez l'enfant de 3-59 mois constituent les méthodes préventives du PNLP pour mieux contrôler la maladie [7].

Les combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) sont en première ligne dans le traitement du paludisme simple au Mali sur la base de recommandation de l'OMS [4].

Actuellement, l'OMS recommande aux pays d'endémie du paludisme 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 [8].

En règle générale, la résistance d'un pathogène, du *Plasmodium* en particulier, à une molécule s'acquiert par suite d'une pression thérapeutique forte et conduit à la sélection des mutants. Elle peut aussi s'acquérir lorsqu'il y a une mauvaise observance durant le traitement [9].

Au Mali, une étude a été menée sur la baisse de la sensibilité du *Plasmodium* à l'artésunate, dérivé semi-synthétique de l'artémisinine administré par voie parentérale en monothérapie, a prouvé l'efficacité de cette dernière sur le parasite sans apparition de clairance parasitaire retardée [10].

Cependant, on enregistre peu de données récentes sur la réponse du parasite aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine.

Ainsi, l'évaluation de l'efficacité thérapeutique est nécessaire et devrait être conduite d'une manière régulière pour détecter une menace sur la réponse du *Plasmodium* aux antipaludiques (cas du paludisme). Il y a plusieurs types d'évaluation, 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) [11].

Comme hypothèse retenue à cette étude : la recommandation par l'OMS dans les zones d'endémie palustre d'utiliser les CTA comme traitement de 1^{ère} intention du Paludisme simple pourrait compromettre l'efficacité de ces dernières suites à l'usage abusif et ou la non-observance du traitement par les populations.

OBJECTIFS

2 OBJECTIFS

2.1 Objectif général

Evaluer l'efficacité thérapeutique de Arthéméther-Luméfantrine, Artésunate-Amodiaquine et Dihydroartémisinine-Pipéraquline dans la zone de Sélingué en 2016, 2017 et 2020 au Mali.

2.2 Objectifs spécifiques

- Estimer l'efficacité des différentes CTAs sur 3 et 7 jours de suivi ;
- Différencier les cas de recrudescence des cas de nouvelles infections ;
- Déterminer l'efficacité des différentes CTAs pendant les 42 jours de suivi.

GENERALITÉS

3 GENERALITES

3.1 Historique

Le paludisme est une pathologie qui a toujours accompagné l'homme au cours de son évolution. Les premiers grands scientifiques ont apporté leur pierre à l'édifice quant aux circonstances de découverte du paludisme, notamment l'implication du vent dans la survenue de la pathologie, d'où le nom malaria qui signifie -mauvais air- ainsi que la corrélation des cas de splénomégalie à des fièvres brutales selon le célèbre document chinois de l'empereur Huang Ti, le NeiChing [12]. Dans le "Canon de la médecine chinoise" au troisième siècle avant J-C, le paludisme serait apparenté à un dragon à 3 têtes représentant une triade (Maux de tête-Frissons-Fièvre), mais aussi potentiellement la survenue de l'accès palustre [12]. Le rôle du moustique et l'implication des eaux stagnantes dans l'environnement ont été mis en évidence en Egypte ancienne dans les papyrus d'Ebers [13].

Le monde de la recherche a toujours été passionné par la découverte de l'inconnu, c'est ainsi qu'en 1880, Alphonse Laveran découvrit qu'un agent pathogène est responsable du paludisme suite à des travaux menés sur les corps protoplasmiques présents sur les érythrocytes des patients infectés par cet agent. Ses travaux furent couronnés par le prix Nobel de médecine en 1902 [14]. Camillo Golgi révéla en 1886 que deux espèces sont responsables de la survenue des fièvres tierces et quartes remarquées lors de l'accès palustre, appuyé par des études approfondies par d'autres chercheurs pour identifier le genre et l'espèce des deux agents plus tard, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae* [11]. Les recherches continuèrent jusqu'en 1894 où Welche identifia une troisième espèce qu'il nomma *Plasmodium falciparum*, et en 1922 par Stephen la quatrième espèce, *Plasmodium ovale*. Enfin Knowles découvrit en 1932, une cinquième espèce, *Plasmodium knowlesi*, qu'on rencontre fréquemment chez les animaux (singes) à l'époque dont les premières apparitions humaines sont survenues en 1956, et la plus récente en 2004 à Bornéo en Malaisie [11].

3.2 Répartition géographique

Les espèces *P.falciparum* et *P.vivax* sont les répandues au monde. Sur le continent africain, le paludisme est très largement répandu dans toute l'Afrique subsaharienne où coexistent les espèces *P.falciparum*, *P.ovale*, et de manière plus sporadique *P.malariae* [15].

Le combat vers l'élimination du paludisme a toujours été une priorité de l'OMS compte tenu de son impact socio-économique et sanitaire. C'est pourquoi, des initiatives ont été prises par l'OMS en coordination avec les états concernés dans l'optique de vaincre le paludisme dans les pays les plus touchés, notamment par la mise en place dans les pays endémiques de paludisme, des programmes nationaux de lutte contre le paludisme pour la récolte des données et renseignements sur la pathologie au niveau local afin d'apporter des solutions idoines pour la riposte ; l'initiative Roll Back Malaria (faire reculer le paludisme) ; le projet Burden to High Impact High (une charge élevée à un fort impact) ; l'objectif zéro cas de paludisme d'ici 2030... [16].

Cependant, la lutte contre le paludisme dans le monde offre des opportunités et réalise des progrès importants malgré qu'il reste encore de nombreux défis d'éradication du paludisme à relever [6].

Plusieurs pays ont rapporté zéro cas de paludisme indigène pendant au moins 3 années consécutives, la Chine et le Salvador ont même demandé à l'OMS leur certification officielle pour l'élimination du paludisme [6].

Au Mali, on remarque une élévation du taux d'incidence de paludisme pendant une période précise de l'année appelée saison hivernale ou de haute transmission du paludisme. C'est pourquoi les efforts du PNLN sont centrés sur la lutte anti vectorielle avec le TPI à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) chez la femme enceinte et le nourrisson ainsi que la chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) afin de réduire la contraction de la maladie. Par ailleurs, la CPS a été adoptée au Mali par le PNLN après 2017. Grâce aux nombreux efforts déployés, le pays a connu quelques succès, notamment la baisse du nombre de cas de paludisme de 800 000 durant les deux dernières années selon le rapport de l'impact de l'approche HBHI de l'OMS [6].

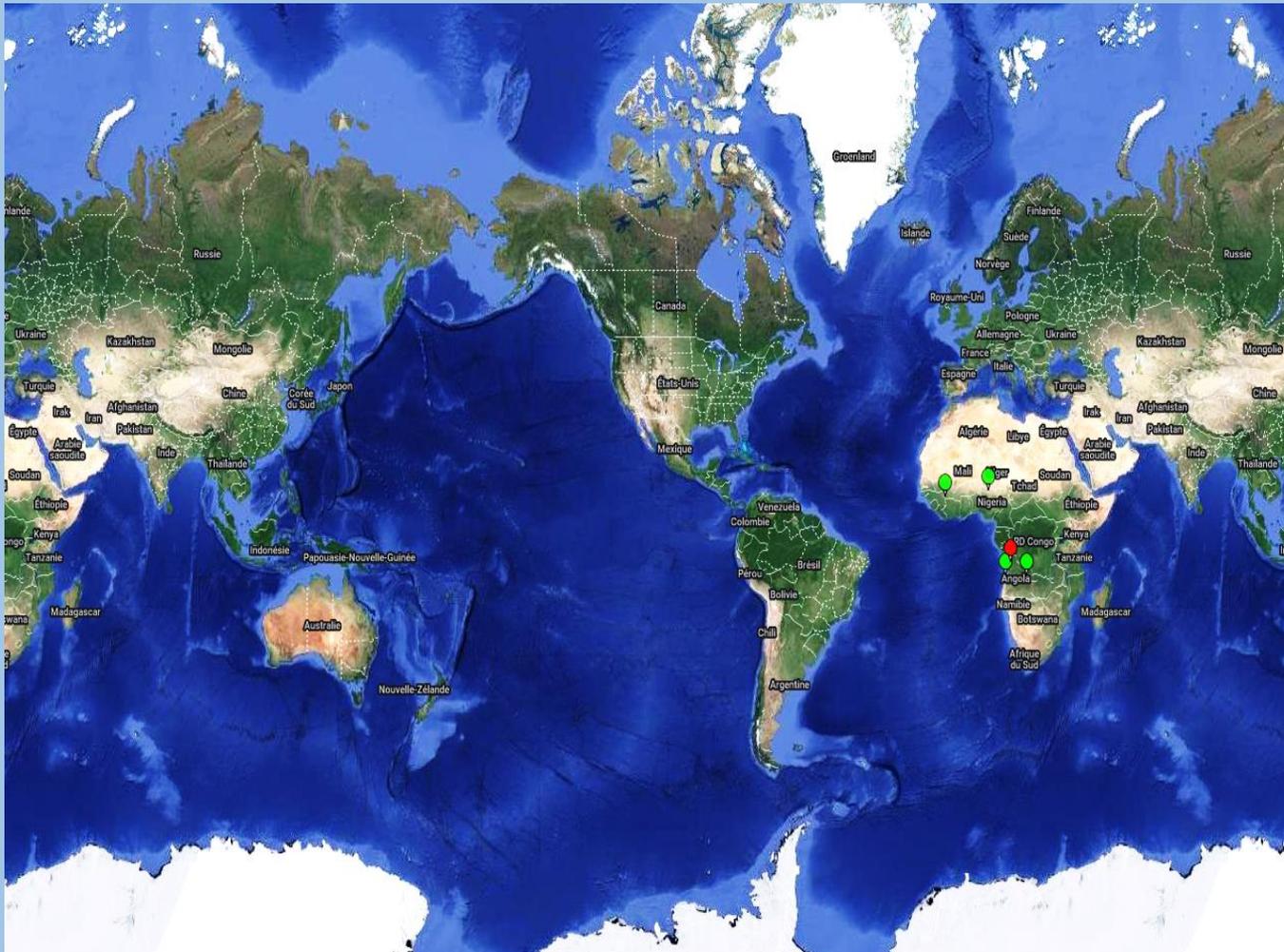


Figure 1 : Répartition des cas de résistance à l'artémisinine dans le monde

Source : <http://www.warn.org/explorer/app/#filter=1&Date=2015-2017&Drug=AM--AS--DHA&ModuleShow=Clinical&TreatmentType=all;mapset=1&zoom=2> ;

Clinical

Clinical data based on average day-28 efficacy data for a study location.

D28 success rate indicators:

<90



90-95



≥95%



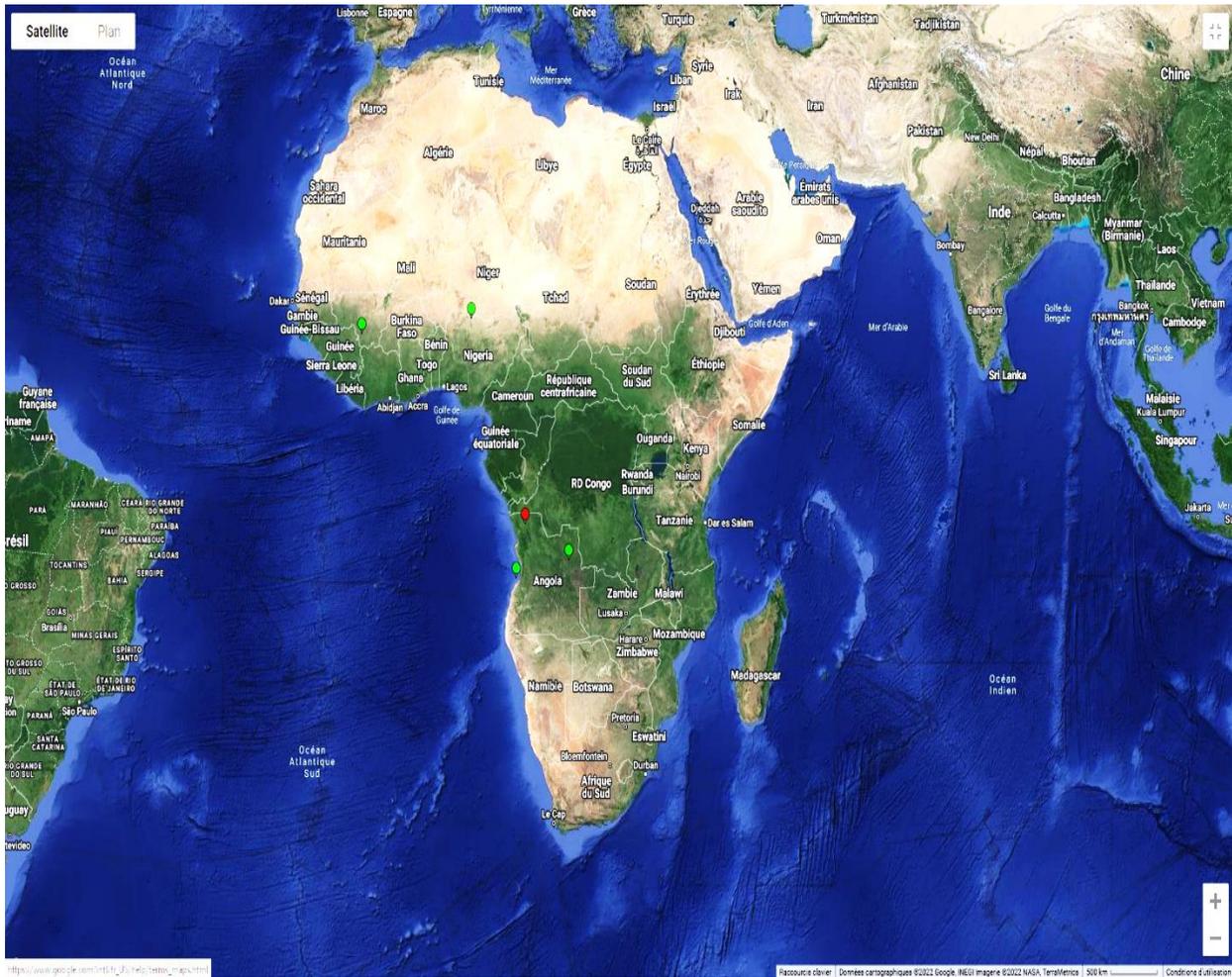


Figure 2 : Répartition des cas de résistance à l'artémisinine

Source : <http://www.warn.org/explorer/app/#filter=1&Date=2015-2017&Drug=AM--AS--DHA&ModuleShow=Clinical&TreatmentType=all;mapset=1&zoom=4;>

Figure 2 : Répartition des cas de résistance à l'artém

Clinical

Clinical data based on average day-28 efficacy data for a study location.

D28 success rate indicators:



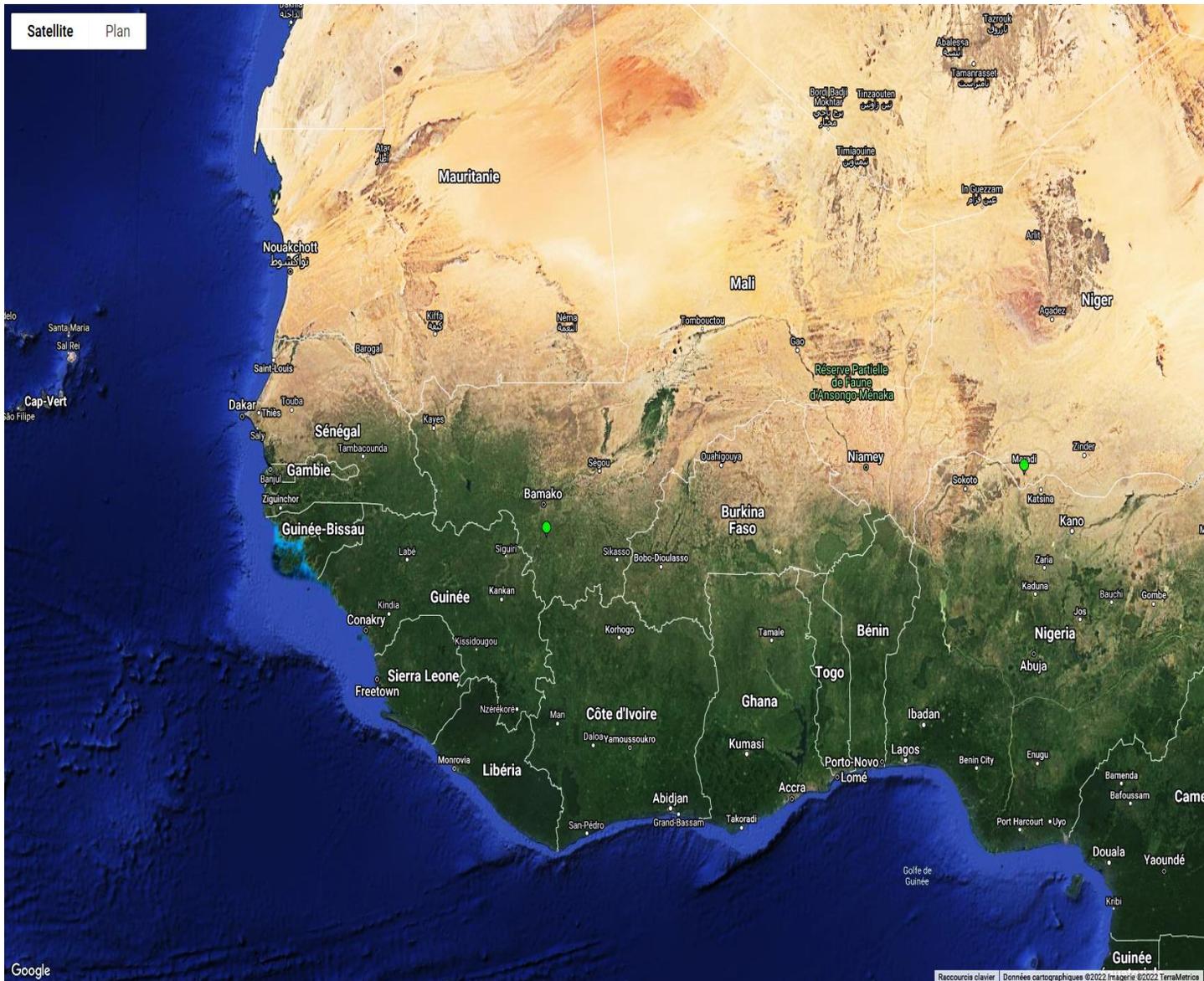


Figure 3 : Répartition des cas de résistance à l'artémisinine au Mali

Source : <http://www.wwarn.org/explorer/app/#filter=1&Date=2015-2017&Drug=AM--AS--DHA&ModuleShow=Clinical&TreatmentType=all;mapset=1&zoom=6;>

Clinical

Clinical data based on average day-28 efficacy data for a study location.

D28 success rate indicators

<90



90-95



>95%



3.3 BIOLOGIE

3.3.1 Vecteur

La transmission du paludisme est essentiellement due à un moustique du genre *Anopheles*. Seule la femelle est hématophage et constitue la principale voie de contraction du paludisme chez l'homme. Elle pique préférentiellement entre le crépuscule et l'aube. Parmi la panoplie d'espèces vectrices du genre *Anopheles* dans le monde, on en trouve principalement deux en Afrique avec des capacités vectrices jamais égalées dans le monde, *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*. On les trouve dans de l'eau propre, claire, limpide... (On ne les trouve pas dans les égouts, l'eau sale...) [17].

Le paludisme peut également être contracté par d'autres voies : les greffes d'organes, la transmission congénitale... [15].

3.3.2 Agent pathogène

Le genre *Plasmodium* est un protozoaire responsable de la transmission du paludisme à l'homme [15].

De nos jours, les recherches ont révélé que seules cinq (05) espèces plasmodiales interviennent dans la pathogénie du paludisme chez l'homme [15].

- *Plasmodium falciparum*
- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium knowlesi*

Parmi elles, *P. falciparum* est l'espèce la plus fréquente et la plus virulente (la seule espèce mortelle). Elle est responsable de 90% des décès en Afrique au Sud du Sahara, 10% des hospitalisations, et particulièrement moins est particulièrement dangereuse pour les femmes enceintes et les enfants de moins de cinq ans qui constituent les principales victimes de ses ravages. Elle a une période d'incubation de 7 à 12 jours [4].

Les autres espèces plasmodiales sont réparties de part et d'autre dans les différents continents selon leur tropisme pour ceux-ci [15].

Toutes les espèces plasmodiales sont facilement identifiables au microscope par leur taille, couleur, forme et type d'hématies parasitées à l'aide d'un frottis sanguin mince (FSM) réalisé [18].

Cependant, la mesure la plus fiable pour évaluer l'intensité de l'endémie palustre est l'indice plasmodiale qui consiste à déterminer le pourcentage de sujets examinés présentant des hématozoaires dans le sang [15].

3.4 Cycle de vie des plasmodies

Le cycle comporte deux phases : la phase asexuée ou schizogonie qui s'effectue chez l'Homme, et la phase sexuée ou sporogonie qui s'effectue chez le moustique [15].

3.4.1 Chez l'Homme : Reproduction asexuée

Phase pré érythrocytaire ou hépatique (Foie, hépatocytes)

Le sporozoïte (forme du parasite dans l'intestin du moustique) injecté au cours du repas sanguin du moustique se dirige vers le Foie où il se divise (schizogonie) pour donner des schizontes (parasites à plusieurs noyaux) appelés schizontes hépatiques ou corps bleu [15].

On peut rencontrer aussi des formes quiescentes du parasite une fois au niveau du Foie chez certaines espèces (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*), appelées hypnozoïtes (formes dormantes du parasite). Ces formes peuvent rester à l'état dormant pendant plusieurs années pour après s'activer et rendre le sujet malade [15].

Phase érythrocytaire (globules rouges)

Les mérozoïtes libérés après éclatement des schizontes hépatiques vont pénétrer dans les globules rouges et amorcer ainsi la phase érythrocytaire. Il y aura encore une schizogonie qui va aboutir à la formation des schizontes érythrocytaires ou corps en rosace. Ce corps en rosace va ensuite éclater et libérer d'autres mérozoïtes [15].

Après plusieurs cycles de schizogonie, certains mérozoïtes se différencient en gamètes mâle et femelle. Ces différenciations permettent d'amorcer le cycle sporogonique chez le moustique [15].

3.4.2 Chez l'Anophèle : Reproduction sexuée

Le moustique femelle au cours de son repas sanguin va aspirer ces formes sexuées. Les gamètes mâle et femelle vont ensuite féconder pour donner un œuf appelé Ookinète (mobile) qui se transforme en Oocyste ou Ookyste pour ensuite éclater pour libérer les sporozoïtes [15].

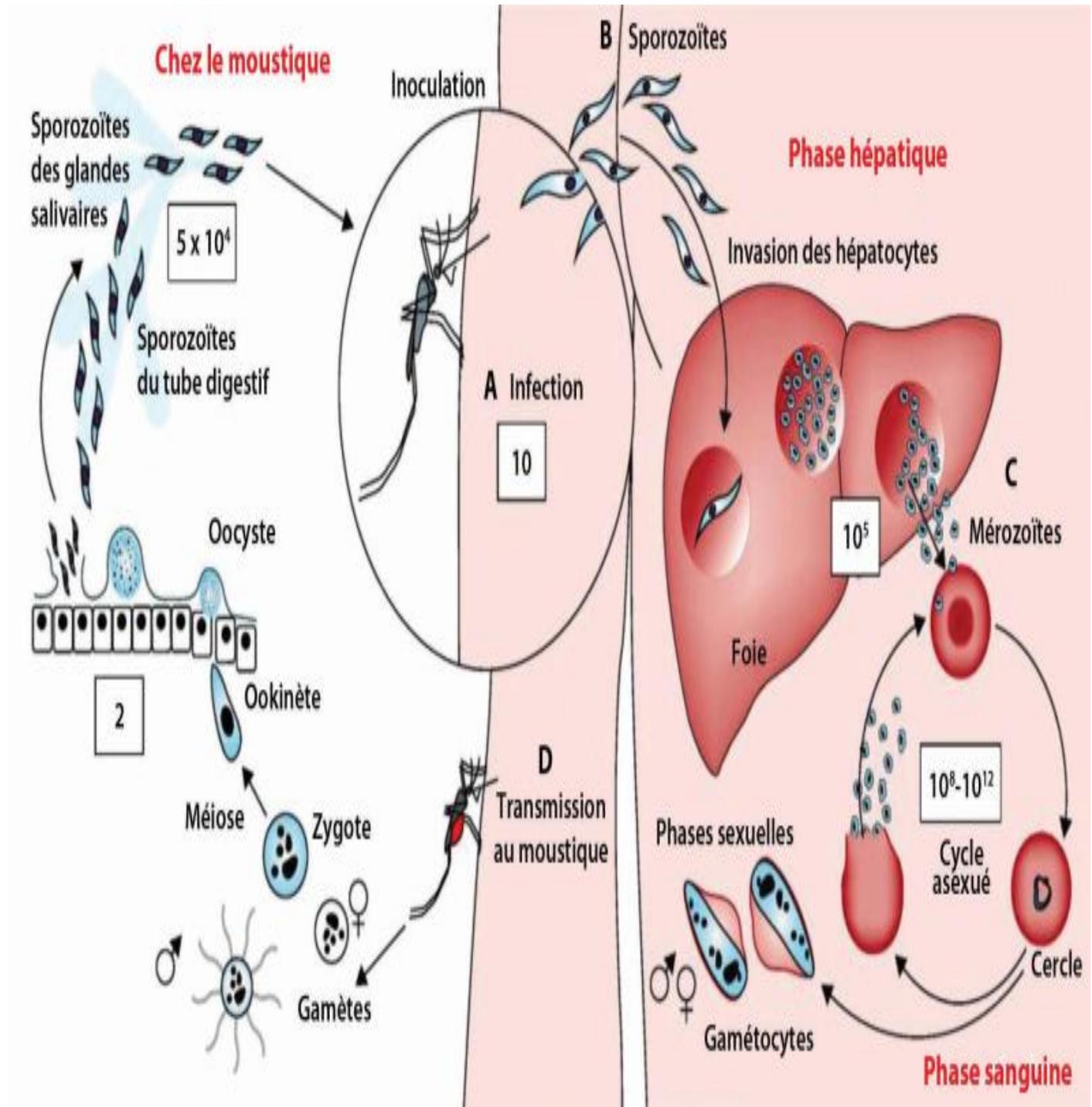


Figure 4 : Cycle de développement du *Plasmodium* [19]

3.5 Diagnostic biologique

3.5.1 Diagnostic d'orientation

Lorsque la numération formule sanguine (NFS) révèle une anémie avec un taux d'hémoglobine bas et une diminution du nombre de plaquettes, on peut alors penser au paludisme qui est considéré comme la première cause d'anémie chez l'enfant [18]. Dans l'hémogramme, on peut également constater une hyperleucocytose. On observe une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie dans le bilan lipidique. Dans les accès pernicioeux, on peut aussi remarquer une hypoglycémie et des perturbations des fonctions hépatiques [20].

3.5.2 Diagnostic parasitologique

Il constitue le diagnostic de certitude et repose sur la mise en évidence du parasite. On retrouve entre autres : la goutte épaisse (GE), le frottis sanguin mince (FM), Quantitative Buffy-Coat (QBC malaria test), Test de diagnostic rapide (TDR), les méthodes immunoenzymatiques (ELISA, IFI), Chaîne de réaction en Polymérase (PCR) [15].

La GE et le FM sont les techniques les plus couramment utilisées pour détecter l'infection au *Plasmodium*. Au microscope, la GE permet la quantification de la parasitémie tandis que le FM permet de faire rapidement et plus facilement la reconnaissance des espèces grâce à l'observation. Les deux techniques peuvent être réalisées sur une même lame [18].

Le TDR est une technique beaucoup plus sollicitée, notamment lors du dépistage de masse, à cause de sa simplicité d'utilisation et sa rapidité. Parasight-F ou Paracheck permet de déterminer dans le sang, Histidine Riche protéique de type 2 (HRP2) spécifique du *Plasmodium falciparum* [15].

▪ Formes cliniques

L'accès palustre à primo-invasion et l'accès palustre à fièvre périodique sont les formes les plus manifestées par les patients, et sont pour la majorité bénignes. Ils sont caractérisés par :

*une incubation (phase pré patente) de 7 à 21 jours (moins de 2 mois dans 90% des cas de paludisme à *Plasmodium falciparum*)

*une invasion : fièvre 39 à 40 degrés, gastroentérite fébrile (céphalées)

*fièvres intermittentes par l'apparition de successions de 3 stades caractérisés par la triade frissons-chaleurs-sueurs. La fièvre tierce est causée par les infections à l'espèce *P.falciparum*, *P.vivax* et *P.ovale* tandis que la fièvre quarte par *P.malariae*.

Il existe aussi d'autres formes de la maladie moins fréquentes : le neuropaludisme ou autres formes graves et compliquées, le paludisme viscéral évolutif, la fièvre bilieuse hémoglobinique, les formes atypiques... [15]

3.6 Traitement

Les médicaments sont aussi utilisés dans la lutte contre le paludisme afin d'éliminer les parasites en cause de la maladie ou de prévenir les complications.

On distingue deux classes d'antipaludiques selon leur mode d'action : les schizonticides et les gamétocytocides [21].

3.6.1 Schizonticides

Ils possèdent une activité sur les schizontes, donc une action curative mais ne préviennent pas la survenue de la maladie.

Parmi eux on peut citer des schizonticides d'action rapide tels que les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine), les amino-alcools (méfloquine, halofantrine, alcaloïdes de la quinine), les sesquiterpènes (artéméther, artésunate, artémolinol) ; d'action lente ou antimétabolite tels que les anti foliques (sulfadoxine), les anti foliniques (pyriméthamine, cycloguanil), la naphthoquinone (atovaquone) ; et certains antibiotiques comme la tétracycline (doxycycline) [21].

▪ Sulfadoxine Pyriméthamine

C'est une association d'anti-folates qui grâce à leur synergie d'action possède une activité schizonticides érythrocytaires d'action bonne mais lente avec une demi-vie de 7-8 jours pour la sulfadoxine et 4-5 jours pour la pyriméthamine. Elle est active sur les souches avec une disparition de la fièvre et de la parasitémie en 2-3 jours. On observe avec la sulfadoxine quelques rares cas d'affections cutanées sévères, voire létales (syndromes de Stevens-Johnson, syndrome de Lyell) ; et de l'anémie chez les enfants malnutris en administration prolongée avec la pyriméthamine. Elle présente également des risques de tératogénicité en début de grossesse (à éviter au 1^{er} trimestre de la grossesse).

Le PNLP recommande son utilisation pour le TPIg avec au moins 3 cures de 3 comprimés en prises supervisées et espacées d'au moins un mois à partir du 4^{ième} mois de la grossesse jusqu'à l'accouchement.

Elle est aussi utilisée par le PNLP dans la chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) en association avec l'amodiaquine chez les enfants de 3 à 59 mois pendant la période de haute transmission du paludisme.

3.6.2 Gamétocytocides

Ils préviennent la survenue de la maladie en inhibant la transmission des gamètes. On retrouve les amino-8-quinoléines (primaquine).

3.6.3 Quelques Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA)

- Artésunate + Amodiaquine
- Artéméther + Luméfantrine
- Artésunate + Sulfadoxine-Pyriméthamine
- Artésunate + Sulfaméthoxypyrazine-Pyriméthamine
- Artésunate + Méfloquine
- Dihydroartémisinine + Pipéraquline

Elles sont indiquées en première ligne dans le cas de paludisme non compliqué (fièvre, présence de signes ou symptômes de paludisme tels que les courbatures, frissons, embarras gastriques) ou en relais à la monothérapie administrée par voie parentérale dans le cas de paludisme grave et après le 1^{er} trimestre dans le paludisme pendant la grossesse [15].

En effet, le paludisme grave se manifeste avec au moins un des critères de gravité de l'OMS suivant :

- Crises convulsives répétées,
- Altération de la conscience, détresse respiratoire,
- Œdème pulmonaire (radiologique),
- Anémie grave inférieure 5g/dl
- Insuffisance rénale, Hypoglycémie, Collapsus circulatoire, Hémorragies diffuses ou Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), Hémoglobinurie massive, Acidose sanguine, Prostration, Hyper lactacidémie, Ictère,
- Hyper parasitémie supérieure à 500 000 TF/mm³ de sang [15].

3.7 Chimiorésistance

Selon l'OMS, la résistance est l'aptitude d'une souche de parasite du paludisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption des médicaments employés à des doses égales ou supérieures aux doses recommandées ordinairement mais comprises dans la limite de la tolérance du sujet. La résistance à un antipaludique est le fait qu'il devienne inefficace à des doses utilisables chez l'homme et ne peut plus être prescrit car les doses données deviendraient toxiques pour le patient. Elle s'est d'abord développée en Asie du sud-est, puis en Amérique du sud et en Afrique. Au fil du temps, l'utilisation de certains antipaludiques ont dû être abandonnés. Ce fut le cas pour la chloroquine, plus connu sous le nom de Nivaquine utilisée pendant plusieurs années dans la prophylaxie du paludisme chez les voyageurs et dans le traitement du paludisme non grave. La chloroquine a été synthétisée pendant la deuxième guerre mondiale et fut utilisée dans le traitement de masse pour éradiquer le paludisme dans les années 1950-1960. La résistance à la chloroquine a émergé en 1957 en Asie du Sud-Est plus particulièrement à la frontière de la Thaïlande et du Cambodge puis en 1959 en Amérique du sud [22]. Elle a ensuite gagné l'Afrique en 1978 suite à la venue des travailleurs asiatiques qui étaient impaludés au Kenya. Elle s'est alors propagée pour gagner toutes les zones d'endémie palustre en 1990. En 2002, l'OMS recommande

l'utilisation de Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine CTAs dans le traitement du paludisme. De 2002 à 2010, les pays endémiques du paludisme ont adopté l'utilisation des CTAs dans le traitement de paludisme simple et grave. Dès 2006, les premiers cas d'échecs cliniques à l'artémisinine et aux CTAs ont été décrits. L'émergence de la résistance s'est fait à la frontière de la Thaïlande et du Cambodge pour se propager vers le Laos, le Myanmar, le Vietnam et la Chine [23]. Les derniers rapports font état d'une diminution en dessous de 70% d'efficacité pour l'association dihydroartémisinine-pipéraquine, dernière combinaison thérapeutique à base d'artémisinine commercialisée depuis 2012. Il est donc impératif de surveiller l'émergence et la diffusion de la résistance aux antipaludiques.

METHODOLOGIE

4 METHODOLOGIE

4.1 Lieu d'étude

Notre étude s'est déroulée dans la commune rurale de Sélingué dans le cercle de Yanfolila et région de Sikasso. La commune rurale de Sélingué représente l'un des faciès épidémiologiques du paludisme au Mali. Elle est composée d'un district sanitaire qui comptait en son sein 111 469 habitants en 2018, et qui de par sa situation géographique a un caractère de transmission bimodale du paludisme suite à la présence d'un barrage hydraulique. Pendant la saison des pluies, les habitants sont exposés à un risque très élevé de contraction du paludisme, en particulier les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituant les couches les plus vulnérables parmi les populations exposées.

En effet, le district sanitaire de Sélingué possède un Centre de Santé de Référence (CS Réf) et sept (07) aires de santé organisées en Centre de Santé Communautaire (CS Com) dont leur gestion est assurée par des Associations de Santé Communautaire (ASACO). En plus des CS Com adhérant au système de référence/contre référence, le district sanitaire de Sélingué abrite des dispensaires, des maternités (Mafléni, Bambala, etc..) et une infirmerie de l'Institut National de Prévoyance Sociale (INPS). Dans le cadre de la collaboration entre le LBMA et le CS Réf de Sélingué, ce dernier a bénéficié d'un appui en équipements et en formation du personnel de son laboratoire afin de renforcer les capacités opérationnelles de celui-ci permettant ainsi de rehausser le plateau technique du centre.

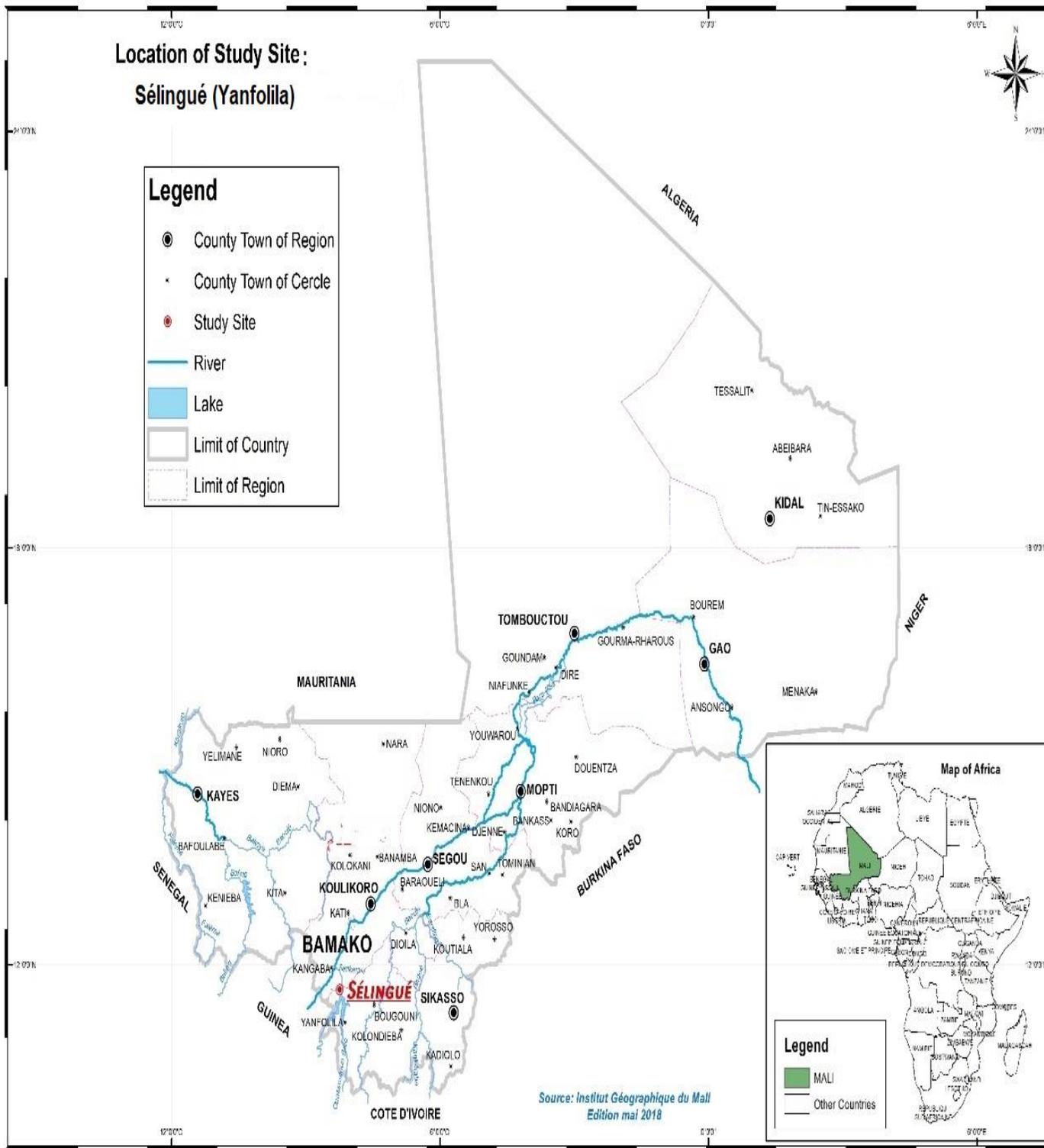


Figure 5 : Localisation géographique du site de Sélingué

4.2 Période d'étude

Notre étude s'est déroulée entre 2016 et 2020.

4.3 Échantillonnage

Cette étude a porté sur les enfants de 06 à 59 mois pour les périodes de 2016 et 2017 puis les enfants de 6 mois à 16 ans pour la période de 2020. Cependant, il n'y a pas eu d'étude en 2018 et 2019.

Nos patients étaient recrutés suite à un dépistage réalisé lors de leur consultation au centre. Le dépistage concernait tous les patients de nos tranches d'âge qui étaient venus se faire consulter. Il consistait à réaliser un test de diagnostic rapide chez les patients pour détecter la présence ou non de *P. falciparum* dans le sang et une goutte épaisse pour la quantification des parasites. Les patients étaient recrutés dans l'étude après avoir obtenu leur consentement ou l'assentiment des parents lorsqu'ils répondaient favorablement à tous les critères d'inclusions du protocole de l'étude.

Pour toutes les périodes de cette étude, l'objectif de la taille d'échantillon était de 480 enfants. Toutefois, notre analyse comparative a porté sur le nombre de patients pouvant être inclus dans l'étude durant chaque année. Ainsi 449 enfants ont été inclus en 2016, 176 en 2017 et 100 en 2020. L'allocation des enfants par bras de traitement était selon le schéma de randomisation qui utilisait une approche de non-infériorité entre les deux bras qui sont testés chaque année.

4.4 Critères d'inclusion

- Goutte épaisse positive à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 1.000 et 199.999 Tf/ μ L ;
- Patients vivant dans un rayon de 5 km ;
- Patients âgés de 6 à 59 mois (en 2016 et 2017) ;
- Patients âgés de 6 mois à 16 ans (en 2020) ;
- Présence de signes cliniques d'accès palustre simple ;
- Patients susceptibles de poursuivre l'étude jusqu'à terme ;
- Patients ayant la capacité à prendre les médicaments par voie orale ;
- Assentiment des parents ou tuteurs ;
- Consentement du malade.

4.5 Critères de non-inclusion

- Prise antérieure d'antipaludiques dans les 4 jours précédents ;
- Patients vivant dans un rayon supérieur à 5 km ;
- Présence de signes cliniques du paludisme grave (glycémie $\leq 2,2$ mM, Hb < 5 g/dl, densité parasitaire ≥ 200.000 Tf par μ l de sang, perte de mémoire au cours des dernières 24 heures) ;
- Patients ayant d'autres pathologies sous-jacentes ;
- Incapacité à prendre les médicaments par voie orale.

4.6 Intervention

4.6.1 Diagnostic du paludisme simple à *Plasmodium falciparum*

▪ Clinique

La clinique reposait sur les renseignements cliniques portés sur le bulletin d'analyse par le médecin lors de la consultation du potentiel patient de notre étude au CSCoM. Ces renseignements portaient sur l'état clinique et certains paramètres comme le poids, l'âge, la taille du patient. Le patient était alors pris en charge par notre équipe pour la réalisation du diagnostic biologique.

▪ Biologique

Le diagnostic biologique réalisé au cours de l'étude était le test de diagnostic rapide (TDR) et la goutte épaisse.

▪ Test de diagnostic rapide

C'est le test utilisé pour réaliser le diagnostic immunologique. Le TDR utilisé au cours de notre étude était le kit SD BIOLINE. Il est basé sur la détection par des bandelettes réactives de la protéine riche en Histidine II (HRP-II) spécifique de *P. falciparum*. C'est un test largement utilisé en raison de sa spécificité estimée à 99,5% et la sensibilité à 99,7% [24]. Ces TDR étaient utilisés selon le protocole recommandé par le fabricant (Annexe 1).

▪ La goutte épaisse

En plus du diagnostic clinique, la confirmation de l'infection palustre se faisait par la goutte épaisse dont le protocole est décrit en Annexe 2. Les lames des gouttes épaisses étaient lues par deux lecteurs différents et un troisième lorsque l'écart entre la parasitémie trouvée par les deux premiers

lecteurs valait 20%. Après la lecture, les lames sont arrangées dans des boîtes afin de faciliter le transport de celles-ci au laboratoire de biologie moléculaire appliquée (LBMA) pour une relecture et leur conservation. Au bout de chaque lame se trouvaient les informations de chaque patient (l'identifiant, le jour de suivi et la date) écrites avec un marqueur indélébile.

4.7 Schéma thérapeutique

Notre étude était basée sur l'administration des CTA dans les 3 premiers jours aux patients qui présentaient un accès de paludisme simple à *P. falciparum* et qui répondaient aux critères d'éligibilité de l'étude. Nous avions à notre disposition une liste de randomisation préétablie dans le protocole d'étude permettant d'attribuer une CTA de l'étude à chaque patient enrôlé. Le poids du patient était le paramètre utilisé pour connaître la dose de CTA à administrer chez le patient. Deux bras étaient concernés par la liste de randomisation chaque année au cours de l'étude.

4.7.1 Protocoles d'administration des molécules AL, ASAQ et DHA-PPQ

▪ Pour AL (Arthéméther-Luméfantine)

Coartem® de la firme Novartis dosé à 20/120mg par comprimé était utilisé en deux prises journalières avec huit heures d'intervalle le premier jour et douze heures d'intervalle les deux derniers jours pour chaque patient sur ce bras. Le tableau suivant résume le nombre de comprimé par prise en fonction du poids corporel du patient :

Tableau I : Protocole d'administration de AL en fonction du poids

Tranche de poids corporel en Kg	Nombre de comprimé par prise/jour
De 05 à 14,99	1 comprimé
De 15 à 24,99	2 comprimés
De 25 à 34,99	3 comprimés
Supérieur ou égal à 35	4 comprimés

▪ Pour ASAQ (Artésunate-Amodiaquine)

ASAQ-DENK® du laboratoire pharmaceutique DENK était la marque déposée utilisée pour le deuxième bras de l'étude. Il est dosé à 100mg d'artésunate et 270mg d'Amodiaquine. Le tableau suivant résume la dose journalière en prise unique pendant 3 jours consécutifs en fonction du poids corporel du patient.

Tableau II : Protocole d'administration de ASAQ en fonction du poids

Tranche de poids corporel en Kg	Nombre de comprimé par prise/jour
De 09 à 17	Demi-comprimé ½
De 18 à 36	1 comprimé

▪ **Pour DP (Dihydroartémisinine-Pipéraquline)**

Deux présentations de MALACUR® du laboratoire SALVAT étaient utilisées pour l'administration de ce bras, l'une dosée à 20/160mg et l'autre à 40/320mg. Les comprimés étaient avalés en prise unique pendant 3 jours consécutifs. Le tableau suivant résume le nombre de comprimé par prise unique chez un patient par rapport au poids corporel.

Tableau III : Protocole d'administration de DP en fonction du poids

Tranche de poids corporel en Kg	Nombre de comprimé par prise/jour
De 05 à 7,99	1 comprimé de 20/160mg
De 08 à 10,99	1 + ½ comprimé de 20/160mg
De 11 à 16,99	1 comprimé de 40/320mg
De 17 à 24,99	1 + ½ comprimé de 40/320mg
De 25 à 35,99	2 comprimés de 40/320mg
A partir de 36	3 comprimés de 40/320mg

Suivi des patients

Les patients recrutés dans l'étude étaient suivis selon un calendrier de visites sur 42 jours pour effectuer les examens clinique et biologique recommandés dans le protocole d'étude. Le tableau ci-dessous résume les examens réalisés aux différents jours de suivi

Tableau IV : Liste des examens par visite

Examens réalisés	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
GE et FSM	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Traitement par CTA	x	x	x							
Confettis	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Taux d'hémoglobine	x									x

x : La croix indique que l'examen a été réalisé au jour du suivi.

Comme le tableau l'indique, les visites étaient programmées toutes les semaines à partir du lendemain de la dernière prise de CTA jusqu'au 42^{ème} jour à compter à partir du premier jour de recrutement J0 du patient.

4.8 Transport et conservation des échantillons

Les lames des gouttes épaisses et les confettis collectionnés lors de la réalisation de l'étude étaient transportés au LBMA pour leur conservation. Les lames étaient soigneusement arrangées dans des boîtes à lames après lecture de celles-ci.

En effet, les confettis étaient réalisés au même moment que la goutte épaisse par suite de dépôt d'une grosse goutte de sang sur le cercle de spot du confetti, et on les laissait se sécher à l'air libre pendant 24 heures. Après leur séchage, les confettis étaient conservés dans des enveloppes avec des desséchants afin de faciliter leur transport. Chaque confetti comportait cinq cercles de spots, et au moins trois spots étaient réalisés à chaque confection lors des jours de visite du patient.

4.9 Analyse moléculaire

4.9.1 Extraction de l'ADN

Le matériel génétique des souches de *P. falciparum* a été extrait à partir des papiers confettis (Wattman® 901) avec le kit commercial Qiagen (QIAGEN GmbH, QIAGEN Strosse 1, 40724 Hilden, GERMANY). Ce kit reconnu pour sa sensibilité et la pureté de l'ADN obtenu, a été utilisé pour l'extraction de nos échantillons conformément aux instructions du fabricant (Annexe 3).

4.9.2 Génotypage

Le génotypage a été réalisé chez tous les patients ayant fait des échecs thérapeutiques en utilisant la PCR classique. Le génotypage a porté sur les gènes *msh1*, *msh2* et *glurp* (voir Annexe 4) recommandés par l'OMS pour la discrimination des recrudescences des cas de réinfections. Les parasites collectés à J0 et le jour de l'échec du traitement ont été traités dans le but de déterminer les profils ainsi que le nombre d'allotypes pour les 3 gènes. Les allotypes de J0 sont ainsi comparés à ceux de Jx selon l'algorithme ci-dessous (Figure 6).

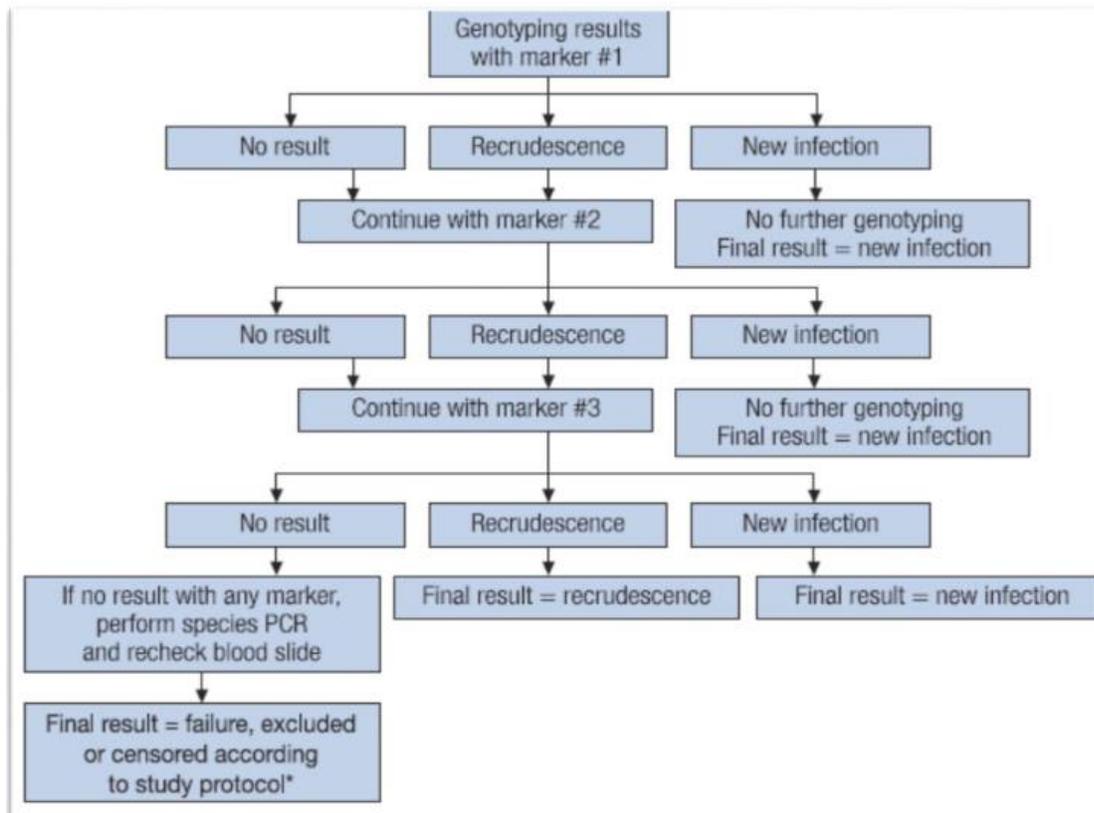


Figure 6 : Algorithme de discrimination des cas de recrudescence des cas de nouvelles infections

L'algorithme nous permettrait de savoir si les cas d'échecs thérapeutiques sont dus à une multiplication de la souche initiale ou l'infestation par une nouvelle souche de parasite.

4.10 Définitions des terminologies et analyses des données

▪ **ETF : Échec thérapeutique précoce**

- Signes de danger ou paludisme grave au jour 1, 2 ou 3 en présence de parasitémie ;
- Parasitémie au jour 2 plus élevée qu'au jour 0, quelle que soit la température axillaire ;
- Parasitémie au jour 3 avec la température axillaire supérieure ou égale 37,5 ;
- Parasitémie au jour 3 supérieur ou égale à 25% du nombre au jour 0.

▪ **LCF : Échec clinique tardif**

- Signes de danger ou paludisme grave en présence de parasitémie à n'importe quel jour entre les jours 4 et 42 du suivi chez les patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'ETF ;
- Présence de parasitémie à n'importe quel jour du suivi entre les jours 4 et 42 avec une température axillaire supérieure ou égale à 37,5 chez les patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'ETF.

▪ **LPF : Échec parasitologique tardif**

- Présence de parasitémie à n'importe quel jour du suivi entre les jours 7 et 42 avec une température axillaire inférieure à 37,5 chez les patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'ETF ou LCF.

▪ **ACPR : Réponse clinique et parasitologique adéquate**

- Absence de parasitémie au jour 42, quelle que soit la température axillaire, chez les patients qui ne répondaient à aucun des critères d'ETF, LCF ou LPF ;
- Les données cliniques et parasitologiques des patients ont été reportées sur des formulaires de report des cas (FRC). La saisie de ces données a été réalisée sur Microsoft® Office Excel, et le logiciel STATA version 16 a permis l'analyse des données.

4.11 Considérations éthiques et déontologiques

Les différents protocoles d'étude ont été soumis sous l'expertise et l'approbation du comité d'éthique de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP, actuel INSP) du ministère de la Santé. Par ailleurs, toutes modifications futures réalisées au cours de l'étude ont été aussi soumises à l'approbation de ce comité. Toutes les études ont été conduites conformément aux protocoles approuvés. Il s'agissait de tester le niveau d'efficacité des CTAs sur le marché

conformément au protocole standard de l’OMS. Les combinaisons Arthéméther plus Luméfantrine et Artésunate plus Amodiaquine ont été utilisées en 2016 et 2017 tandis que Arthéméther plus Luméfantrine et Dihydroartémisinine plus Pipéraquine étaient les CTAs utilisés en 2020. L’étude consistait à suivre le comportement du parasite *Plasmodium falciparum* sur une période de 42 jours, allant de son premier jour de recrutement au 42^{ème} jour du suivi. Le suivi était personnalisé pour chaque patient recruté et consistait à l’administration de la CTA et la réalisation de confettis aux 3 premiers jours ainsi que juste la réalisation de confettis à partir du 4^{ème}, 7^{ème}, 14^{ème}, 21^{ème}, 28^{ème}, 35^{ème}, 42^{ème} jours. Le taux d’hémoglobine était aussi réalisé au premier et dernier jour du suivi. Les patients étaient recrutés suite à l’obtention de l’assentiment libre et éclairé des parents ou du tuteur après explication du protocole à ces derniers par notre équipe. L’équipe prenait bien le soin d’expliquer le protocole tout entier aux parents ou tuteurs, surtout les désagréments liés au prélèvement du sang chez le patient ; d’écouter et rassurer les parents ou tuteurs sur les inquiétudes ou incompréhensions qu’ils peuvent avoir l’étude. Chaque parent ou tuteur est informé de l’anonymat total de son enfant à l’étude et la possibilité de retrait à tout moment sans aucune sanction ou conséquence pour l’enfant. Chaque parent ou tuteur signait le formulaire de consentement après avoir accepté de faire participer l’enfant à l’étude, et un exemplaire de ce formulaire signé par notre équipe leur était aussi donné. Une indemnité compensatrice du transport était remise au patient à chaque jour de son suivi. Le coût de cette indemnité s’élevait à 1000 FCFA et était remis pour compenser les frais de déplacement du patient au centre de santé.

4.12 Confidentialité

Les protocoles étaient de type mono-aveugle.

Chaque année où l’étude était implémentée, nous disposions d’un dispensateur qui administrait les doses de CTA aux patients selon une liste de randomisation à sa disposition.

Chaque patient était mis sur l’un des bras de la CTA en fonction de son numéro d’ordre sur la liste de randomisation, d’où le dispensateur était le seul à connaître le bras de CTA du patient en fonction de son numéro d’identification.

RESULTATS

5 RESULTATS

5.1 Les caractéristiques sociodémographiques des patients

Tableau V : Taux d'inclusion des patients par année

Année	2016	2017	2020
Total dépistés	3732	4330	787
Total inclus	449	176	100
Taux inclusion	12,03%	4,06%	12,7%

Le taux d'inclusion était plus élevé en 2020 (12,7%) comparativement aux années 2017 (4,06%) et 2016 (12,03%).

Tableau VI : Répartition des patients selon leur genre

Sexe	Année		
	2016 n (%)	2017 n (%)	2020 n (%)
Masculin	237 (52,78)	94 (53,4)	51 (51)
Féminin	212 (47,22)	82 (46,6)	49 (49)
Total	449	176	100

Au cours des 3 années d'étude, le sexe masculin était le plus représenté. Par ailleurs, le sexe ratio était plus ou moins équilibré en 2020.

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

Tranches d'âge (ans)	Année		
	2016 n (%)	2017 n (%)	2020 n (%)
Moins de 5	449 (100)	176 (100)	17 (17)
5-14	NA	NA	71 (71)
15-16	NA	NA	12 (12)
Total	449	176	100

Les tranches d'âge adultes et 5-14 ans n'ont été incluses qu'en 2020 suite à une modification du protocole. Cependant, pour les années 2016 et 2017, les enfants de moins de cinq ans (minimum 6 mois) ont été le centre d'intérêt de l'étude. La tranche d'âge 5-14 ans a été la plus représentée en 2020 avec 71% (n=71).

Tableau VIII : Répartition des cas selon le bras

Bras de traitement	Année		
	2016 n	2017 n	2020 n
AL	225	87	51
ASAQ	224	89	NA
DP	NA	NA	49
Total	449	176	100

En 2016 et 2017, les patients étaient repartis entre le bras de traitement AL et ASAQ tandis qu'en 2020, ils étaient repartis entre AL et DP.

Tableau IX : Répartition des différents paramètres à l'inclusion

Paramètres à l'inclusion		2016	2017	2020
Poids (Kg)	Moyenne (ET)	13,4 (2,8)	13,9 (3,1)	27,43 (14,2)
	Étendue (min-max)	(9-21)	(7,2-22)	(7-70)
Température (°C) à J0	Moyenne (ET)	37,8 (1,2)	37,6 (1,1)	37,8 (1)
	Étendue (min-max)	(34,9-41)	(36,1-41)	(36-40)
Age (ans)	Moyenne (ET)	3,1 (1,1)	3,5 (1,2)	9 (4,2)
	Étendue (min-max)	(0,5-4,9)	(0,5-4,9)	(0,8-16)
Parasitémie (µL) à J0	Moyenne	26957,91	12695	17192,5447
	Étendue (min-max)	(2000-199800)	(2000-188250)	(2000-165575)

Le poids moyen des participants au jour de leur recrutement était de $13,4 \pm 2,8$ Kg en 2016 contre $13,9 \pm 3,1$ Kg en 2017 et $27,43 \pm 14,2$ Kg en 2020.

La température corporelle moyenne des participants au jour de leur recrutement était de $37,8^\circ\text{C} \pm 1,2$ en 2016 et $37,8 \pm 1$ 2020 contre $37,6^\circ\text{C} \pm 1,1$ en 2017.

La moyenne d'âge exprimée en année était de 3,1 en 2016 contre 3,5 en 2017 et 9 en 2020.

La parasitémie moyenne au jour du recrutement estimé par μl de sang était de 26958 en 2016 contre 12695 en 2017 et 17193 en 2020. Le seuil de parasitémie minimal et maximal pour être inclus dans l'étude était respectivement de 2000 et 200 000 trophozoïtes par μl de sang pour les trois années, et l'année 2016 a enregistré la plus grande parasitémie avec 199800 trophozoïtes par μL de sang.

5.2 Echecs thérapeutiques

5.2.1 Réponses aux traitements avant correction PCR

Ces tableaux ci-dessous résument les réponses observées aux traitements administrés chez les patients lors de leur suivi sans correction par analyse moléculaire. Ils concernent les patients ayant terminé l'intégralité de leur calendrier de visite, soit 426 patients en 2016 avec 212 patients sur le bras AL et 214 patients sur le bras ASAQ ; 136 patients en 2017 avec 71 patients sur le bras AL et 65 patients sur le bras ASAQ ; 53 patients en 2020 avec 25 patients sur le bras AL et 28 patients sur le bras DP.

Tableau X : Répartition des cas d'échecs thérapeutiques précoces (ETF)

ETF	Année		
	2016 n (%)	2017 n (%)	2020 n (%)
AL	14 (6,6)	1 (1,4)	4 (1,6)
ASAQ	3 (1,4)	1 (1,5)	NA
DP	NA	NA	-
Total	17 (3,9)	2 (1,5)	4 (7,5)

En 2020, aucun patient n'a fait un échec thérapeutique précoce sur le bras DP contrairement à 2016 où on a enregistré sur un total de 449 patients enrôlés, 17 cas d'ETF soit 3,9% des sujets enrôlés et 2 patients (1,5%) en 2017 sur 176 patients enrôlés. Cependant, le taux de cas d'ETF était plus élevé en 2020 avec le bras AL mis en cause.

Tableau XI : Répartition des cas d'échecs cliniques tardifs (LCF)

LCF	Année		
	2016	2017	2020
	n (%)	n (%)	n (%)
AL	15 (7,1)	9 (12,7)	1 (4)
ASAQ	9 (4,2)	4 (6,2)	NA
DP	NA	NA	-
Total	24 (5,6)	13 (7,39)	1 (1,45)

Le taux d'échec clinique tardif était plus élevé en 2017 avec 7,39% (n=13) contre 5,6% (n=24) en 2016 et 1,45% (n=1) en 2020.

Tableau XII : Répartition des cas d'échecs parasitologiques tardifs (LPF)

LPF	Année		
	2016	2017	2020
	n (%)	n (%)	n (%)
AL	29 (13,7)	5 (7)	4 (8.5)
ASAQ	22 (10,3)	2 (3,1)	NA
DP	NA	NA	-
Total	51 (11,9)	7 (3,98)	4 (4)

Les cas d'échecs parasitologiques tardifs étaient plus nombreux en 2016 avec 51 patients (11,9%) qu'en 2017 et 2020 qui avaient respectivement 7 (3,98%) et 4 (4%) cas.

Tableau XIII : Répartition des cas de réponse clinique et parasitologique adéquate non-corrigée (ACPR)

ACPR	Année		
	2016 n (%)	2017 n (%)	2020 n (%)
AL	154 (72,6)	56 (78,9)	35 (89,7)
ASAQ	180 (84,1)	58 (89,2)	NA
DP	NA	NA	41 (100)
Total	334 (78,4)	114 (83,8)	76 (95)

Parmi le nombre de sujets enrôlés dans les différentes années, l'année 2016 a enregistré le plus faible taux de réponse clinique et parasitologique adéquate (ACPR) avec (78,4% ; n=334) comparativement à 2017 et 2020 qui ont respectivement enregistré (83,8% ; n=114) et (95% ; n=76).

5.2.2 Réponses aux traitements après correction PCR

Les mêmes échantillons utilisés dans l'analyse sans correction PCR ont été soumis à l'analyse de la correction par analyse moléculaire.

Tableau XIV : Répartition des cas d'échecs thérapeutiques en recrudescences

Recrudescence	Année		
	2016 n (%)	2017 n (%)	2020 n (%)
AL	5 (2,4)	3 (4,2)	1 (4)
ASAQ	4 (1,9)	1 (1,5)	NA
DP	NA	NA	-
Total	9 (2,1)	4 (2,9)	1 (1)

On observe neuf (09) cas de recrudescence en 2016 contre quatre (04) cas en 2017 et un seul (01) cas en 2020. Sur les trois années, l'AL enregistre à lui seul neuf (09) cas de recrudescence contre cinq (05) cas d'ASAQ et zéro cas de DP.

Tableau XV : Répartition des réinfections (RI)

Réinfection	Année		
	2016 n (%)	2017 n (%)	2020 n (%)
AL	39 (18,4)	11 (15,5)	3 (6,4)
ASAQ	27 (12,6)	5 (7,7)	NA
DP	NA	NA	-
Total	66 (15,4)	16 (11,7)	3 (2)

La majorité des cas de réinfections ont été enregistrés en 2016 avec 66 cas soit 15,4%. On note en 2020, qu'aucun cas n'a été détecté chez les patients mis sur le bras DP pendant l'étude. Par ailleurs, on constate que le bras AL était le plus mis en cause dans ces cas de réinfections.

Tableau XVI : Répartition de la réponse clinique et parasitologique adéquate (ACPR) après correction moléculaire

ACPR	Année		
	2016 n (%)	2017 n (%)	2020 n (%)
AL	154 (89)	57 (93,4)	35 (97,2)
ASAQ	180 (96,3)	58 (96,7)	NA
DP	NA	NA	41 (100)
Total	334 (78,4)	115 (84,5)	76 (98,6)

Tous les patients sur DP ont fait une réponse clinique et parasitologique adéquate en 2020. Par contre, 96,3% et 96,7% des patients sur le bras ASAQ ont fait leur ACPR respectivement en 2016 et 2017. Concernant le bras AL, 89% et 93,4% des patients ont réalisé leur ACPR respectivement en 2016 et 2017. L'année 2020 a enregistré le taux le plus élevé d'ACPR avec 50 cas soit 94,3%.

Tableau XVII : Répartition des cas de réinfections en fonction de leur période de survenue

Période de survenue	AL			ASAQ		DP
	2016	2017	2020	2016	2017	2020
J7 à J14	1	0	0	2	0	0
J15 à J21	10	3	1	1	0	0
J22 à J28	7	2	1	6	2	0
J29 à J35	16	4	0	12	2	0
J36 à J42	5	2	0	6	1	0
Total	39	11	2	27	5	0

La majorité des cas sont survenus à l'intervalle J29 à J42. La plus faible apparition des cas est survenue à l'intervalle J7 à J14 sauf en 2016 pour le bras AL.

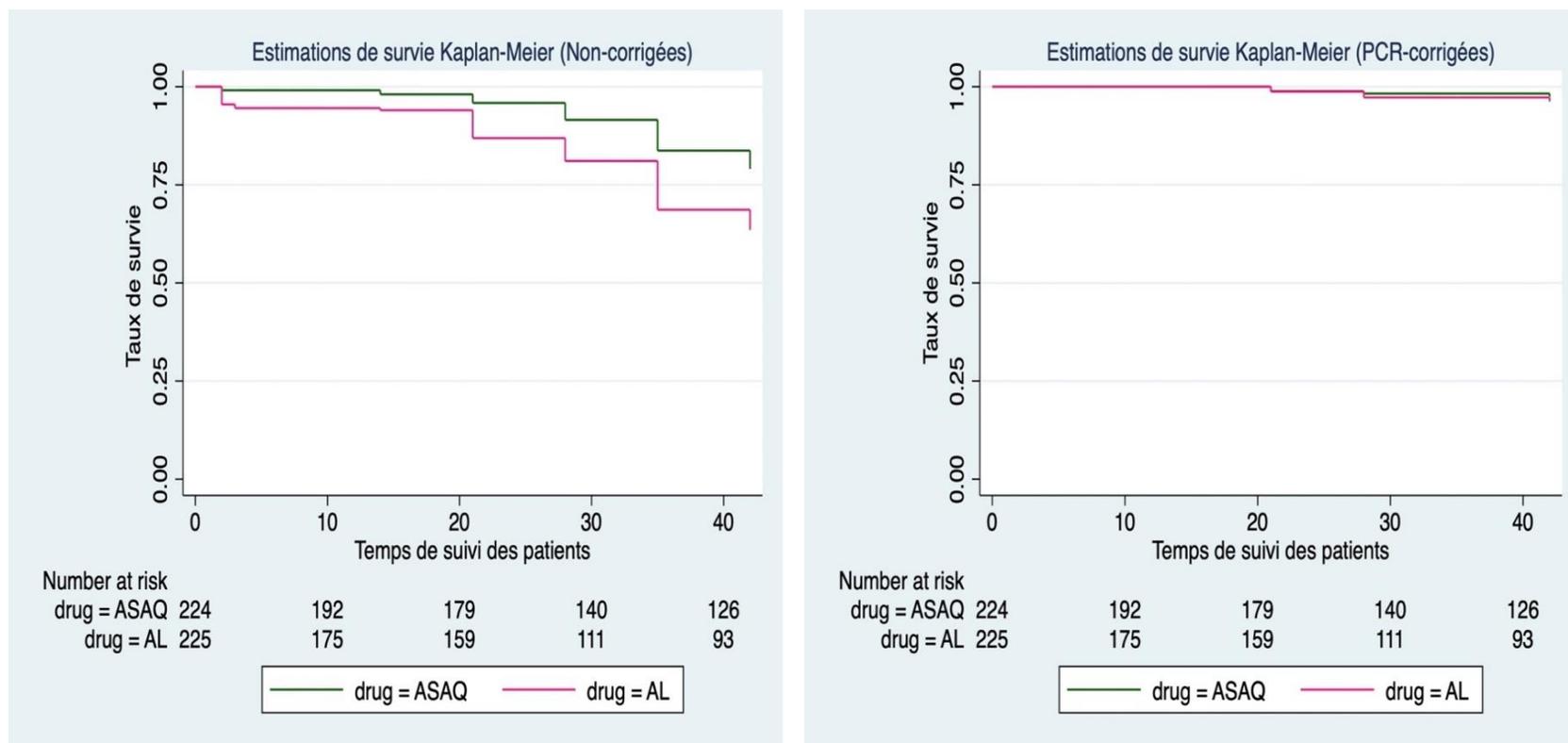


Figure 7 : Kaplan-Meier 2016 à Sélingué avant et après correction moléculaire

En 2016, la courbe de Kaplan Meier non-corrigée montre une efficacité du bras ASAQ comparativement au bras AL dont l'efficacité était inférieure à 75% au 42eme jour du suivi. Par contre, l'efficacité des deux combinaisons était similaire et avoisinait les 100% après correction moléculaire par PCR.

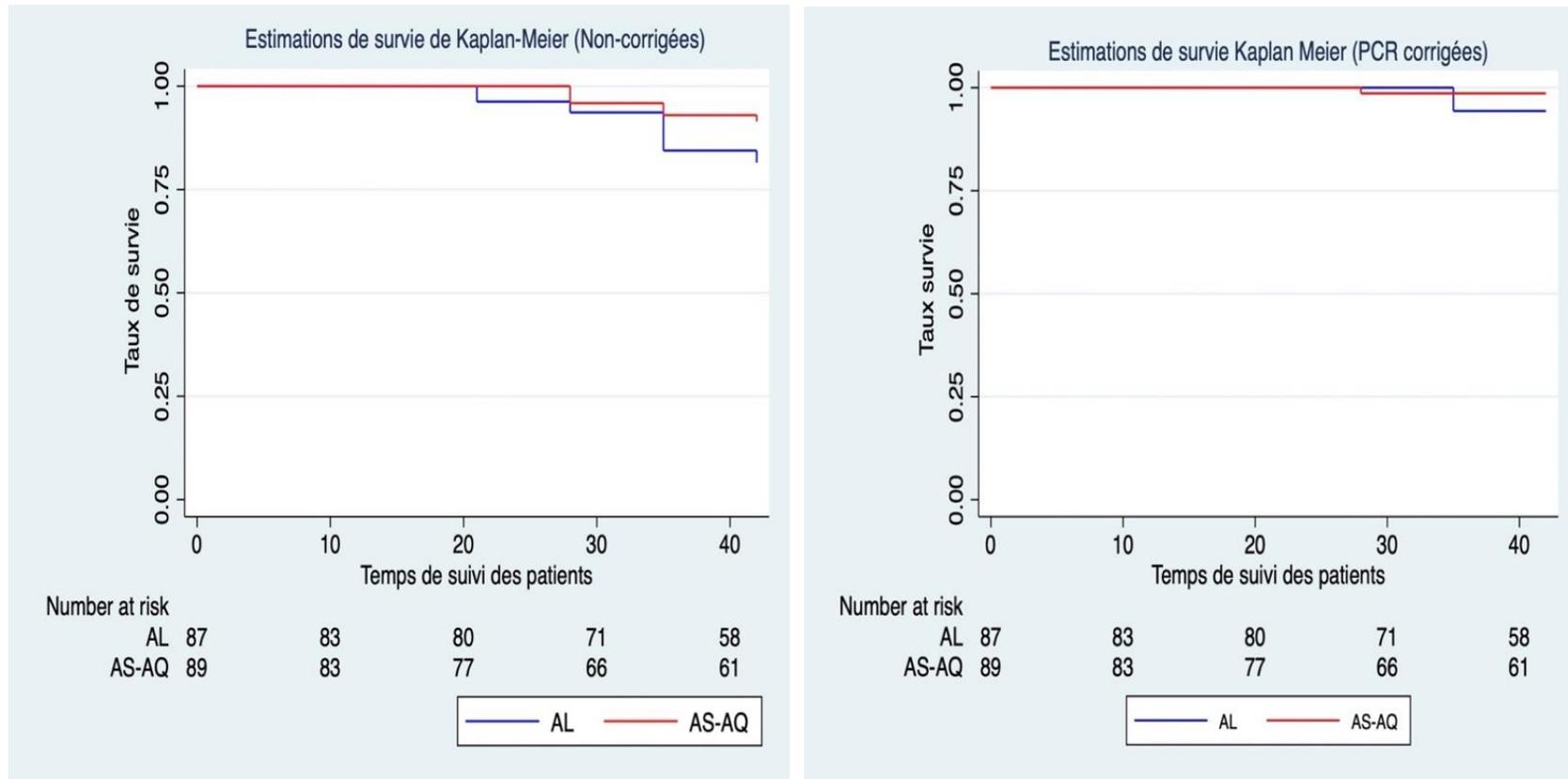


Figure 8 : Kaplan-Meier 2017 à Sélingué avant et après correction moléculaire

En 2017, la courbe de Kaplan-Meier non-corrigée a montré une efficacité de 100% du bras AS-AQ jusqu'au 28^{ème} du suivi des patients comparativement au bras AL où l'efficacité était en dessous de 100% dès le 21^{ème} jour de suivi. Cependant, la courbe de Kaplan-Meier corrigée du bras AS-AQ affiche quasiment une efficacité maximale de 100% tout au long du suivi tandis que celle du bras AL décline à 95% au 35^{ème} jour du suivi.

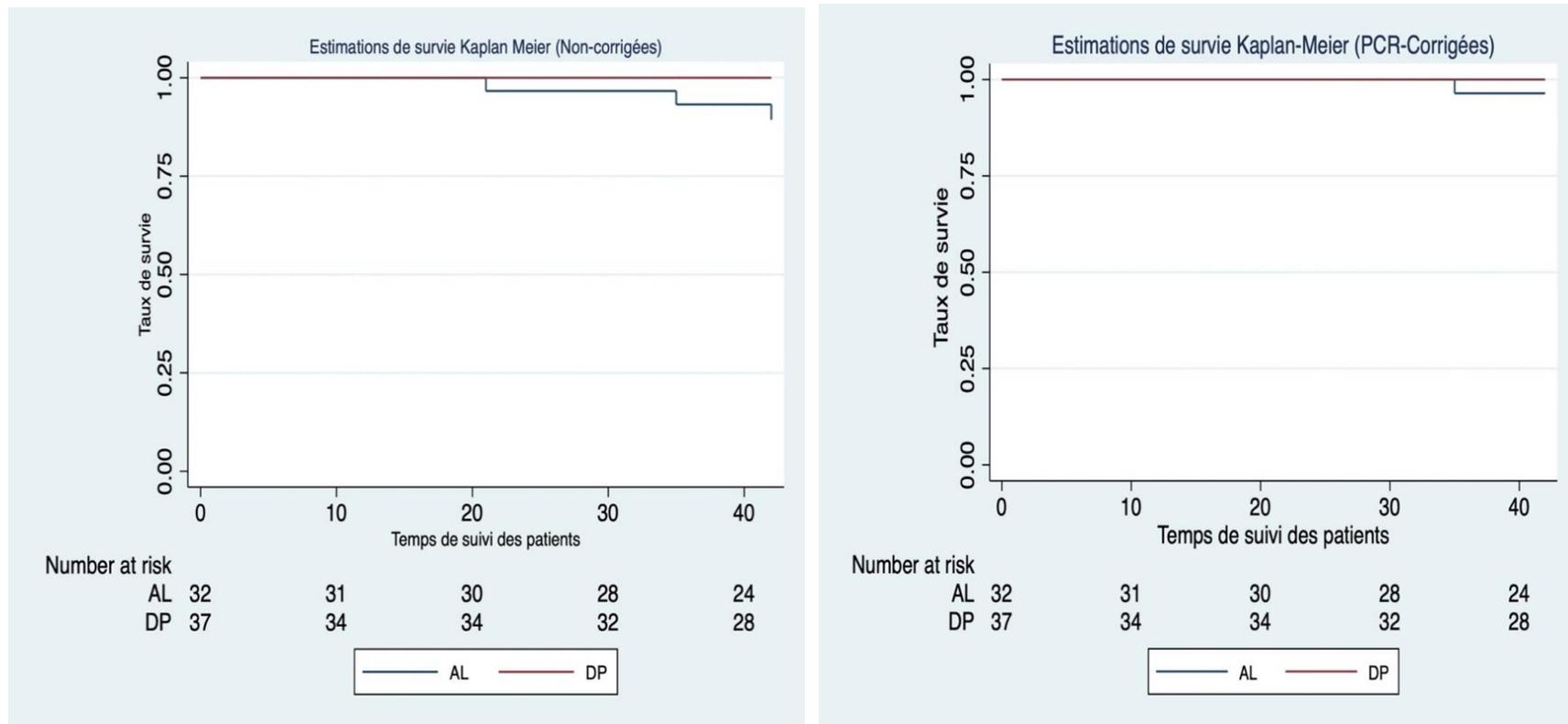


Figure 9 : Kaplan-Meier 2020 à Sélingué avant et après correction moléculaire

En 2020, la courbe de Kaplan-Meier non-corrigée montre une efficacité maximale de 100% du bras DP tout au long du suivi des patients comparativement au bras AL dont l'efficacité est inférieure à 95% au 42^{ème} jour du suivi des patients. On constate la même efficacité chez le bras DP après correction moléculaire par PCR comparativement au bras AL qui avoisine une efficacité de 98% à la fin du suivi des patients.

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Notre étude a été réalisée dans le cadre du programme TES (Therapeutic Efficacy Study) recommandé par l'OMS dans tous les pays endémiques de paludisme dans le but de tester l'efficacité des CTAs utilisées par le PNLP dans la prise en charge du paludisme simple [25]. L'OMS recommande de mener ces études d'efficacité des CTAs chaque 24 mois dans les pays endémiques au paludisme [26]. Ainsi notre étude porte sur des TES qui ont été faits sur trois années différentes, 2016, 2017 et 2020 avec une reconduction du même protocole chaque année excepté la combinaison DP qui a remplacé ASAQ en 2020.

Notre étude a été conduite dans la commune rurale de Sélingué qui compte parmi les sites sentinelles de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques par la présence différents faciès de transmission du paludisme [27]. Sélingué est une localité située dans la région de Sikasso et connaît aussi des quantités importantes de pluies [27,28]. Toutes ces conditions font que les habitants de Sélingué connaissent une forte transmission du paludisme, donc un lieu propice pour réaliser le test d'efficacité des différentes CTAs afin d'atteindre notre principal objectif qui consiste de tester l'efficacité des combinaisons AL, ASAQ et DP.

Notre étude était basée sur les évaluations prospectives des réponses cliniques et parasitologiques des patients pendant les 42 jours de suivi. Certaines études de TES sont conduites sur 28 jours de suivi avec comme argument au-delà de 28 jours, il n'y a plus de métabolites permettant de protéger le patient contre une nouvelle infection [29]. Bien que le choix de la période de suivi dépende aussi des molécules partenaires utilisées [30], certains auteurs préfèrent la période de suivi de 42 jours car du 29^{ème} jour au 42^{ème} jour de suivi, la biologie du parasite ne permet pas à un patient normalement protégé par les métabolites de développer un nouvel épisode de paludisme [29,30].

Au cours de l'étude, l'équipe du terrain reportait les données cliniques et parasitologiques des patients enrôlés et dépistés sur des Formulaires de Report de Cas (FRC), qui ont été ensuite envoyés au LBMA pour la saisie dans le formulaire Excel de l'OMS destiné à la saisie des données des essais cliniques sur les antipaludiques. L'utilisation de ce formulaire limite non seulement les erreurs de saisie car basée sur la double entrée des données mais elle permet aussi d'avoir les mêmes définitions des terminologies utilisées pour les résultats de traitement comme ETF, LPF....

La lecture au microscope de la goutte épaisse était réalisée par deux différents techniciens bien formés, un biologiste intervenait lorsque l'écart du nombre de trophozoïtes compté par les deux techniciens était supérieur à 25%. Un parasitologue reconfirmait les résultats des lames au microscope au LBMA avant les tests moléculaires. Cette stratégie recommandée par l'ECAAM a été mise en place pour minimiser les risques d'erreurs afin d'obtenir des données de qualité [31,32]. Les papiers confettis imbibés de sang étaient asséchés à l'air libre pendant 12 heures à l'abri de la poussière et des mouches, puis conservés individuellement dans des sachets plastiques (Minigrip RedLine®) contenant des desséchants. Ceci permet de prévenir la poussée des moisissures qui peut affecter les résultats moléculaires, sur ces confettis [33].

Nos échantillons ont été collectés à Sélingué et traités au LBMA. Tous les échantillons utilisés dans la présente étude étaient positifs à la goutte épaisse. Le génotypage a été utilisé pour les échantillons des cas d'échecs thérapeutiques pour discriminer les cas de recrudescence des cas de réinfections comme recommandé dans le manuel de l'OMS sur les méthodes de surveillance de l'efficacité des médicaments antipaludiques [30]. Pour cela, la PCR a été utilisée comme la méthode moléculaire afin de réaliser cette différenciation. Les gènes qui étaient ciblés lors de ce génotypage sont *msp1*, *msp2* et *glurp* qui sont connus pour leur polymorphisme permettant de différencier différentes souches de la même espèce de *Plasmodium* [30]. Cette différenciation était basée sur l'observation de la taille des bandes des échantillons du même patient de J0 et Jx (x = nouvel épisode de paludisme pendant les 42 jours de suivi après clairance parasitaire) suivant l'algorithme généralement utilisé pour la discrimination des réinfections des cas de recrudescence [29,34]. Cependant, la réalisation de la PCR a été précédée par l'extraction de l'ADN du parasite avec le kit Qiagen® qui permet d'obtenir de l'ADN purifié et sans impuretés [35], notamment l'hémoglobine qui peut inhiber la PCR.

Les tranches d'âges 6-59 mois, 5-14 ans et 15-16 ans ont constitué notre population d'étude où seule l'année 2020 a connu la représentation de toutes ces tranches d'âges contrairement aux années 2016 et 2017 qui ont connu exclusivement la représentation de la tranche d'âge 06-59 mois. Concernant la tranche d'âge 06-59 mois, elle comporte le plus grand pourcentage de la population malienne selon la Pyramide des âges [36]. Selon la cinquième enquête démographique et sanitaire du Mali (EDSV), elle représente 17% de la population malienne [36]. L'année 2016 a enregistré le taux d'inclusion le plus élevé avec 12%. Ceci peut s'expliquer par le fait que la localité de

Sélingué n'était pas concernée par la chimioprévention. Ceci entraîne donc une augmentation de nombre de cas dû au fait que les enfants n'ont pas de métabolites dans le sang [37].

Le génotypage des échantillons a montré que la majorité des cas d'échecs thérapeutiques sont des réinfections du parasite chez le patient. Parmi ces cas de réinfections, le bras AL, avec 39 (18,4%) en 2016 ; 11 (15,5%) en 2017 et 3 (6,4%) en 2020 ; comporte le plus grand nombre de cas entre les trois années, suivi du bras ASAQ et enfin DP. Le bras AL a enregistré en termes de recrudescence 2,4% ; 4,2% et 4% respectivement en 2016, 2017 et 2020. Ces taux, même relativement bas, sont probablement liés à la molécule partenaire qui est la luméfantrine. La demi-vie de cette molécule (2 à 3 jours) est plus courte que celles des autres molécules partenaires (8 jours pour l'Amodiaquine et 20 jours pour la Pipéraquline) [38,39]. Ainsi la luméfantrine qui est censée protéger le malade contre une nouvelle infection palustre car sa demi-vie est plus longue que celle de l'artémisinine peut s'avérer inefficace [39]. Par ailleurs, la présence des cas d'échecs thérapeutiques dans les groupes AL et ASAQ peuvent s'expliquer par la pression médicamenteuse exercée par ces combinaisons sur le parasite car utilisées depuis 2006 après le retrait de la chloroquine [40]. L'absence de l'apparition des cas d'échec thérapeutique pour le bras DP démontre l'efficacité curative et préventive de cette combinaison et peut non seulement s'expliquer par la demi-vie plus longue de la Pipéraquline [39] mais aussi par le fait que son introduction parmi les traitements de première ligne du paludisme simple est plus récente [41].

Les ETF qui se définissent comme les échecs thérapeutiques intervenant les premiers jours du traitement médicamenteux étaient plus fréquents dans l'étude conduite en 2016 comparativement aux autres années [42]. Cette tendance peut s'expliquer en grande partie par une multiplicité de l'infection plus forte en 2016 en raison de l'absence de prophylaxie dans la localité de Sélingué. Une augmentation de la multiplicité de l'infection suggère la présence de plusieurs souches en même temps et cela augmente la probabilité d'échec du traitement vu que chacune de ces souches peut avoir un comportement vis-à-vis du médicament administré [43]. D'autres études conduites dans la même période en Afrique Sub-saharienne ont enregistré des taux de ETF inférieurs aux nôtres en présence de prophylaxie médicamenteuse, soutenant notre hypothèse. En 2017, tout comme en 2020 où la chimioprévention a été faite, les proportions de ETF étaient plus faibles. Certains auteurs ont argumenté qu'en présence de prophylaxie, les parasitémies qui se développent

sont généralement faibles et causent rarement des cas de paludisme grave ou encore des échecs aux traitements administrés [37,44].

Le taux d'échec parasitologique tardif était plus élevé en 2016 (13%) qu'en 2017 (7,5%) et 2020 (8%). La survenue de ces échecs parasitologiques tardifs peut s'expliquer non seulement par la particularité de l'année 2016 par la non-administration de SP/AQ chez les enfants de moins de 5 ans. Le suivi au cours de toutes ces études qui s'étendait sur 42 jours peut s'avérer trop long pour permettre aux molécules partenaires de maintenir les enfants protégés contre des éventuelles piqûres infestantes. Beaucoup d'études conduites avec les mêmes molécules ont effectué le suivi sur 28 jours. Au-delà de ces 28 jours, les concentrations sanguines des métabolites des molécules utilisées sont trop faibles pour assurer la prophylaxie [29,44,45].

La clairance des signes cliniques dépend surtout du statut des patients qui est généralement fonction aussi des parasitémies rencontrées dans l'inclusion du patient [45]. Les parasitémies les plus élevées étaient rencontrées en 2016 avec une moyenne géométrique de 26958 contre 12695 en 2017 et 17193 en 2020.

Dans cette étude, le taux de réponse clinique et parasitologique adéquate (ACPR) non-corrigé était plus faible en 2016 (78,4%) comparativement à ceux de 2017 et 2020 qui ont respectivement enregistré 83,8% et 95%. Ce faible taux de l'ACPR non-corrigé peut s'expliquer par un cas élevé de recrudescence en 2016 par rapport aux autres années tendant à stimuler la production des gamétocytes, qui à leur tour facilite la transmission continue de parasites résistants [44]. La réponse clinique et parasitologique adéquate (ACPR) corrigée pour les patients sur DP était élevée par rapport à celle de l'ASAQ et l'AL, toutes années confondues. Cela peut s'expliquer, premièrement, par l'utilisation de la DP dans la plupart des pays de l'Afrique subsaharienne en deuxième ligne ou traitement alternatif. Deuxièmement, la demi-vie plus longue de la molécule partenaire, la Pipéraquline (2 à 3 semaine) que la luméfántrine (2-3 jours) et l'amodiaquine (~8 jours), peut justifier l'absence de cas de recrudescence et de réinfection observés avec le DP qu'avec l'ASAQ et l'AL [44].

L'efficacité globale non ajustée tout au long du suivi pour le bras AL était inférieure à celle de l'ASAQ et de DP selon la courbe de Kaplan Meier, toutes les années confondues. Par contre, après correction moléculaire par PCR ; nous avons trouvé une efficacité similaire pour les deux combinaisons AL et ASAQ en 2016. Pour les autres années, l'efficacité pour le bras AL est restée

inférieure même après correction par PCR par rapport aux bras ASAQ et DP. Cette baisse de l'efficacité pour AL peut être due à l'utilisation élevée pendant longtemps de ce médicament par rapport aux deux autres combinaisons. Aussi, pour raison des effets secondaires liés à l'Amodiaquine, les patients ainsi que les cliniciens préfèrent la combinaison AL par rapport à ASAQ, pendant que la combinaison DP reste peu connue par rapport à AL faisant d'elle un traitement alternatif dans beaucoup de pays de l'Afrique subsaharienne [44].

7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1 CONCLUSION

Suite à l'apparition de résistances à certaines molécules antipaludiques conduisant parfois au retrait du marché de ces dernières, il était nécessaire d'évaluer l'efficacité thérapeutique de ces CTAs. Pour réaliser cette étude, nous avons recruté des patients auxquels on avait administré des CTAs pour faire leur suivi pendant 42 jours. Nous avons ensuite sélectionné les cas d'échecs aux traitements de CTAs de nos patients pour l'analyse moléculaire afin de discriminer les cas de recrudescences aux cas de nouvelles infections chez ces patients. Notre étude portait sur trois CTAs utilisées pendant trois années AL, ASAQ et DP ; seule la molécule DP n'a fait objet d'échec thérapeutique au traitement donnant ainsi une efficacité maximale de 100% lors des 42 jours de suivi des patients. Aussi, bien que les deux autres combinaisons aient enregistré des cas d'échecs thérapeutiques, après correction moléculaire leurs ACPR étaient supérieures à 90%. Cela permet de conclure qu'au regard des résultats de la présente étude, les combinaisons DP, ASAQ et AL sont efficaces dans la prise en charge du paludisme simple dans la zone de Sélingué.

7.2 RECOMMANDATIONS

✓ LBMA

Procéder au séquençage des cas de recrudescences afin de détecter les mutations associées aux dérivés de l'artémisinine et ses molécules partenaires.

✓ PNLP et partenaires

De continuer et aussi élargir des études similaires sur d'autres localités du pays dans le but de mieux surveiller l'émergence de la résistance aux CTAs.

En perspectives, nous demandons aux autorités du pays de s'impliquer encore davantage à la vulgarisation des ces études au près des populations cibles afin de faciliter le bon déroulement des activités des équipes sur le terrain.

REFERENCES

8 REFERENCES

1. Médecine Tropicale, Gentilini, 1993 - Google Scholar [Internet]. [cité 21 déc 2022]. Disponible sur: https://scholar.google.com/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&q=M%C3%A9decine+Tropicale%2C+Gentilini%2C+1993&btnG=
2. Caputo A, Garavelli PL. Climate, environment and transmission of malaria. *Infez Med.* 2016;2:93-104.
3. Diallo M, Sangare D, Diarra A, Camara D, Mariko R, Guidenhard M, et al. Dynamic study of *Anopheles gambiae* sl population and polymorphism of TRP1 gene during high malaria transmission season in Bancoumana commune, Mali. 2017;
4. mondiale de la Santé O. Lignes directrices de l'OMS sur le paludisme, 16 février 2021. Organisation mondiale de la Santé; 2021.
5. Lekana-Douki JB, Boundenga L. Genotyping for *Plasmodium* spp.: Diagnosis and Monitoring of Antimalarial Drug Resistance. In: Genotyping. IntechOpen; 2018.
6. Rapport 2021 sur le paludisme dans le monde - Recherche Google [Internet]. [cité 21 déc 2022]. Disponible sur: https://www.google.com/search?q=Rapport+2021+sur+le+paludisme+dans+le+monde&client=firefox-b-d&sxsrf=ALiCzsYZNXuUHf1WLvJMXbRz_4GJxxQQSw%3A1671629189677&ei=hQmjY_X9KKiDkdUPtceO-AE&ved=0ahUKEwi11K-A6Ir8AhWoQaQEHbWjAx8Q4dUDCA4&uact=5&oq=Rapport+2021+sur+le+paludisme+dans+le+monde&gs_lcp=Cgxnd3Mtd2l6LXNlcnAQAzIECCMQJzoHCCMQ6gIQJzoGCAAQFhAeSgQIQRgASgQIRhgAU00JWIMeYPEmaAFwAHgAgAGHAogBswWSAQMylTOYAQCgAQGgAQKwAQrAAQE&sclient=gws-wiz-serp
7. PNLP : Objectif, zéro paludisme au Mali à l'horizon 2030 - Recherche Google [Internet]. [cité 21 déc 2022]. Disponible sur: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=PNLP+%3A+Objectif%2C+z%2C%3A9ro+paludisme+au+Mali+%3A0+1%E2%80%99horizon+2030>
8. Traoré T. Polymorphisme génétique de la dihydroptéroate Synthétase de *Plasmodium falciparum* Pfdhps par la technique de séquençage des isolats collectés au cours de la chimio-prévention saisonnière du paludisme à Dioro, Missira et Sélingué [PhD Thesis]. USTTB; 2019.
9. Youssouf MD. Docteur en Pharmacie (Diplôme d'état). 2015;
10. Maiga AW, Fofana B, Sagara I, Dembele D, Dara A, Traore OB, et al. No evidence of delayed parasite clearance after oral artesunate treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Mali. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(1):23.

11. Bouaré H. Test d'efficacité des combinaisons Thérapeutiques Artémether plus Luméfantrine et Artésunate plus Amodiaquine dans le traitement du paludisme simple à P. falciparum à Sélingué et à Missira en 2016 [PhD Thesis]. Thèse de pharmacie Bamako; 2018.
12. Yaya S. Le paludisme: Repères historiques, climatiques et anthropiques. In 2013.
13. Sarrazin RB. Interactions culturelles et syncrétisme religieux dans les amulettes iatromagiques grecques d'Égypte.
14. Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine - Recherche Google [Internet]. [cité 21 déc 2022]. Disponible sur: https://www.google.com/search?q=Bulletin+de+L%27Acad%C3%A9mie+Nationale+de+M%C3%A9decine&client=firefox-b-d&sxsrf=ALiCzsb2EWC3EQNTrGD4XYKQ0ZdoLcIpeQ%3A1671626268666&ei=HP6iY4qmKN3KkdUPpPipgAI&ved=0ahUKEwiKpMOP3Yr8AhVdZaQEHSR8CiAQ4dUDCA4&uact=5&oq=Bulletin+de+L%27Acad%C3%A9mie+Nationale+de+M%C3%A9decine&gs_lcp=Cgxnd3Mtd2l6LXNlcnAQAzIFCAAQgAQ6BwgjEOoCECdKBAhBGABKBAhGGABQrgtYrgtg_RNoAXAAeACAAeMCiAHjApIBAzMtMZgBAKABAaABArABCsABAQ&scient=gws-wiz-serp
15. Paludisme ; ANOFEL - Recherche Google [Internet]. [cité 21 déc 2022]. Disponible sur: https://www.google.com/search?q=Paludisme+%3B+ANOFEL&client=firefox-b-d&sxsrf=ALiCzsbYcsTszokHrRHG64V3QK1s-qwUKw%3A1671628665243&ei=eQejY7y1DsuqkdUPzZ-uoAI&ved=0ahUKEwj81aaG5or8AhVLVaQEHC2PCyQQ4dUDCA4&oq=Paludisme+%3B+ANOFEL&gs_lcp=Cgxnd3Mtd2l6LXNlcnAQDDIFCAAQgAQyBQgAEIAEOgcIIXDqAhAnSgQIQRgASgQIRhgAUJoJWKHaAWCF_wFoA3ABeACAAe8BiAHvAZIBAzItMZgBAKABAaABArABCsABAQ&scient=gws-wiz-serp
16. Cadre pour l'élimination du paludisme - Recherche Google [Internet]. [cité 21 déc 2022]. Disponible sur: https://www.google.com/search?q=Cadre+pour+l%27E2%80%99%C3%A9limination+du+paludisme&client=firefox-b-d&sxsrf=ALiCzsYda1LGBmeYOupKrwWctDeqOxXgYw%3A1671629116549&ei=PAmjY9ONeCIkdUPteiNAE&ved=0ahUKEwjTm8Dd54r8AhVgRKQEHTV0Ax8Q4dUDCA4&uact=5&oq=Cadre+pour+l%27E2%80%99%C3%A9limination+du+paludisme&gs_lcp=Cgxnd3Mtd2l6LXNlcnAQAzIHC AAQgAQQDTokCAAQRxDWBBCwA0oECEYYAEoECEYYAFC5BVi5BWCwD2gBcAF4AIAB_wGIAf8BkgEDMi0xmAEAoAECOAEBYAEIWAEB&scient=gws-wiz-serp
17. Carnevale P, Robert V. Les anophèles: biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. IRD éditions; 2017.
18. Durieux MF. Diagnostic biologique du paludisme. Actual Pharm. 2018;57(574):25-9.
19. Diallo MLP. Etudiants subsahariens à Toulouse et prévention du paludisme d'importation [PhD Thesis]. Université Toulouse III-Paul Sabatier; 2018.

20. Khermach A, Khalki H, Louzi L, Zinebi A, Moudden K, Elbaaj M. Perturbations biologiques au cours du paludisme: à propos de trente cas. *Pan Afr Med J.* 2017;26.
21. Paludisme médecine tropicale - Recherche Google [Internet]. [cité 21 déc 2022]. Disponible sur: https://www.google.com/search?q=Paludisme+m%C3%A9decine+tropicale&client=firefox-b-d&sxsrf=ALiCzsZLkv2F-TLB2lh26jIvdjDt5t7agA%3A1671629805798&ei=7QujY5mdMLONkdUP1YKEgAI&ved=0ahUKEwjZx5Sm6or8AhWzRqQEHVUBASAQ4dUDCA4&uact=5&oq=Paludisme+m%C3%A9decine+tropicale&gs_lcp=Cgxnd3Mtd2l6LXNlcnAQAzIFCAAQgAQyCAgAEBYQHhAPOgcIIxDqAhAnSgQIQRgASgQIRhgAUMcUWMCUYKofaAFwAHgAgAHyAYgB8gGSAQMMyLTGYAQCgAQGgAQKwAQrAAQE&sclient=gws-wiz-serp
22. Global Partnership to Roll Back Malaria. L' utilisation des antipaludiques : rapport d'une consultation informelle de l' OMS, 13-17 novembre 2000 [Internet]. Organisation mondiale de la Santé; 2001 [cité 21 déc 2022]. Report No.: WHO/CDS/RBM/2001.33. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67811>
23. Organization WH. Update on artemisinin resistance. World Health Organization; 2012.
24. SD BIOLINE Malaria Ag P.f/Pan - Test rapide de paludisme by Standard Diagnostics | MedicalExpo [Internet]. [cité 21 déc 2022]. Disponible sur: <https://www.medicaexpo.fr/prod/standard-diagnostics/product-70168-713579.html>
25. Monitoring antimalarial drug efficacy and resistance [Internet]. [cité 3 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/case-management/drug-efficacy-and-resistance/monitoring-antimalarial-drug-efficacy>
26. Adegbite BR, Edoa JR, Honkpehedji YJ, Zinsou FJ, Dejon-Agobe JC, Mbong-Ngwese M, et al. Monitoring of efficacy, tolerability and safety of artemether–lumefantrine and artesunate–amodiaquine for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Lambaréné, Gabon: an open-label clinical trial. *Malar J.* 16 déc 2019;18(1):424.
27. Diahara DT, Danaya DK. Note d'information stratégique et politique sur la prévention du paludisme au Mali. 2010;
28. Pages F, Orlandipradines E, Corbel V. Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine Mal Infect.* mars 2007;37(3):153-61.
29. Global Partnership to Roll Back Malaria. Evaluation et surveillance de l' efficacité des antipaludiques pour le traitement du paludisme à plasmodium falciparum non compliqué [Internet]. Organisation mondiale de la Santé; 2004 [cité 4 févr 2023]. Report No.: WHO/HTM/RBM/2003.50. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68595>
30. World Health Organization. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. 2009;85.

31. Organisation mondiale de la Santé. Diagnostic microscopique du paludisme : manuel d'assurance qualité [Internet]. version 2. Genève: Organisation mondiale de la Santé; 2017 [cité 4 févr 2023]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258702>
32. World Health Organization, UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Microscopy for the detection, identification and quantification of malaria parasites on stained thick and thin blood films in research settings (version 1.0): procedure: methods manual [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [cité 4 févr 2023]. 33 p. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/163782>
33. University of Maryland, Mahidol University, Global Scientific Solutions for health, WWARN. Molecular Testing for Malaria Standard Operating Procedure (SOP) Collection of blood on filterpaper. :22.
34. Felger I, Snounou G, Hastings I, Moehrle JJ, Beck HP. PCR correction strategies for malaria drug trials: updates and clarifications. *Lancet Infect Dis*. janv 2020;20(1):e20-5.
35. Menu E, Mary C, Toga I, Raoult D, Ranque S, Bittar F. Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples. *BMC Res Notes* [Internet]. 27 mars 2018 [cité 31 mai 2021];11. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869780/>
36. CPS/SSDSPF, INSTAT, INFO-STAT. Enquête Démographique et de Santé (EDSM-V) [Internet]. 2014 [cité 6 févr 2023] p. 577. Disponible sur: <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/fr286/fr286.pdf>
37. OMS. Chimio-prévention du paludisme saisonnier par administration de sulfadoxine-pyriméthamine et d'amodiaquine aux enfants: guide de terrain [Internet]. [cité 4 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/publications-detail/9789241504737>
38. Jullien V. Pharmacocinétique des antipaludiques.
39. Somé AF, Séré YY, Dokomajilar C, Zongo I, Rouamba N, Greenhouse B, et al. Selection of Known Plasmodium falciparum Resistance-Mediating Polymorphisms by Artemether-Lumefantrine and Amodiaquine- Sulfadoxine-Pyrimethamine but Not Dihydroartemisinin-Piperaquine in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2010;54(5):1949-54.
40. Menard D, Dondorp A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. juill 2017 [cité 2 janv 2021];7(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5495053/>
41. Abuaku BK, Mensah BA, Ofori MF, Myers-Hansen J, Derkyi-Kwarteng AN, Essilfie F, et al. Efficacy of Artesunate/Amodiaquine in the Treatment of Uncomplicated Malaria among Children in Ghana. *Am J Trop Med Hyg*. 7 sept 2017;97(3):690-5.
42. Nambozi M, Van Geertruyden JP, Hachizovu S, Chaponda M, Mukwamataba D, Mulenga M, et al. Safety and efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Zambian children. *Malar J*. 28 févr 2011;10(1):50.

43. Zhong D, Koepfli C, Cui L, Yan G. Molecular approaches to determine the multiplicity of Plasmodium infections. *Malar J.* 23 avr 2018;17(1):172.
44. Marwa K, Kapesa A, Baraka V, Konje E, Kidenya B, Mukonzo J, et al. Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine and dihydroartemisinin-piperaquine in the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Sub-Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* [Internet]. 2022 [cité 5 févr 2023];17(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8912261/>
45. Menard S. Plasmodium falciparum et résistance aux antipaludiques: aperçu et conséquences des facteurs impliqués dans la sélection et la diffusion des parasites résistants [Internet] [phdthesis]. Université Toulouse 3 Paul Sabatier; 2017 [cité 16 juill 2021]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01919157/document>

ANNEXES

9 ANNEXES

ANNEXE 1: PROTOCOLE SD BIOLINE

MATERIEL

➤ **Kit SD BIOLINE**

- Des nouvelles cassettes ;
- Des anses de prélèvement ;
- Des tampons imbibés d'alcool à 70° non ouverts ;
- Des lancettes stériles à usage unique ;
- Solution de migration
- Une nouvelle paire de gants d'examen jetables ;
- Un container pour évacuer les déchets tranchants et pointus ;
- Une poubelle pour évacuer les déchets non tranchants et non pointus ;
- Un marqueur ou feutre.

MODE OPERATOIRE

- Enfiler une paire de gant puis procéder à l'ouverture du kit ;
- Identifier le patient sur la cassette à l'aide du marqueur ;
- Procéder à la désinfection du majeur ou de l'annulaire de la main avec le tampon imbibé d'alcool à 70° ;
- Piquer le doigt désinfecté d'un coup sec avec la lancette stérile après séchage du doigt à l'air libre ;
- Jeter cette lancette dans le container pour déchets tranchants et pointus ;
- Prélever une goutte de sang avec une anse de prélèvement du kit et déposer cette goutte dans l'alvéole de la cassette destinée à recevoir la goutte de sang (carrée marquée de la lettre A) ;
- Ajouter 2 à 3 gouttes de la solution de migration dans l'alvéole ronde marquée de la lettre B ;
- Attendre 2 à 3 minutes pour interpréter le résultat.

INTERPRETATION DU RESULTAT

La cassette comporte deux traits ou fenêtres (fenêtre contrôle et fenêtre test).

L'apparition de la fenêtre contrôle permet la validation du test et celle de la fenêtre test permet de confirmer la présence de *P. falciparum* dans le sang.

Le test est dit **positif** si le trait apparait au niveau de la fenêtre contrôle et de la fenêtre test de la cassette, donc deux traits.

Le test est dit **négatif** si un seul trait apparait dans la cassette, au niveau de la fenêtre contrôle.

Le test est dit **invalide** en l'absence de trait au niveau la fenêtre contrôle de la cassette, peu importe la présence d'un trait ou non au niveau de la fenêtre test.

ANNEXE 2 : GOUTTE EPAISSE

MATERIEL

- Une paire de gant d'examen ;
- Deux lames d'examen au microscope ;
- Lancette stérile ;
- Coton hydrophile ;
- Ethanol à 90° ;
- Crayon gras ou stylo graveur ;
- Compteur ;
- Huile à immersion.

Phase 1 : PRELEVEMENT

- Mettre l'identifiant du patient sur la lame à l'aide du crayon gras ou stylo graveur ;
- Le prélèvement est effectué préférentiellement au niveau de l'annulaire ;

- Désinfecter l'annulaire avec du coton imbibé d'alcool et ensuite le nettoyer avec du coton sec ;
- Piquer le doigt d'un coup sec avec la lancette stérile ;
- Déposer une goutte de sang au centre et une toute petite goutte légèrement en haut de la lame en pressant la zone piquée avec une main et en tenant la lame avec l'autre main pour recevoir la goutte de sang.

Phase 2 : PREPARATION

- Après avoir déposé une goutte de sang au centre des deux lames, on réalise un étalement épais avec la goutte au centre de chacune des lames à l'aide de l'extrémité d'une lame ;
- On dépose également sur la même lame une petite goutte légèrement en haut afin de réaliser le frottis à l'aide de la lamelle ou le bord d'une lame ;
- Quelques minutes après avoir réalisé le frottis, on trempe la partie de la lame où le frottis a été réalisé à de l'alcool à 90 pendant quelques secondes ;
- On laisse ensuite la lame se sécher à l'air libre sur la paillasse du laboratoire à l'abri des mouches et de la poussière.

Phase 3 : COLORATION

La coloration était réalisée à l'aide d'une solution mère concentrée de GIEMSA, qui sera diluée à 10% avec de l'eau distillée pour colorer les lames et permettant de mettre en évidence les parasites au microscope. La solution GIEMSA contient un mélange de deux colorants, le bleu de méthylène qui permet de colorer le cytoplasme du parasite en bleu et l'éosine qui colore le noyau en rouge.

Après avoir préparé la solution de dilution de GIEMSA à 10%, on plonge les lames à colorer dans cette solution diluée pendant 10 à 15 minutes, puis les faire sortir pour ensuite les rincer à de l'eau de robinet de façon très délicate pour ne pas perdre la goutte et le frottis sur la lame puis on la laisse se sécher pour l'examiner au microscope.

Phase 4 : EXAMEN AU MICROSCOPE

Pour la recherche des parasites du paludisme, nous travaillons seulement avec l'objectif *100 du microscope qui doit être en contact avec l'huile à immersion préalablement déposée sur la goutte

épaisse pour l'estimation de la densité parasitaire ou le frottis sanguin mince pour l'identification de l'espèce plasmodiale.

CALCUL DE LA DENSITE PARASITAIRE

La densité parasitaire est estimée suite au comptage simultané du nombre de parasites et de leucocytes dans chaque champ par le lecteur à l'aide d'un compteur classique manuel jusqu'à 300 leucocytes comptés, et le comptage s'arrête pour appliquer la formule standard suivante :

$$\text{Nombre de parasites par } \mu\text{L} = \frac{7500 \times \text{Nombre de parasites comptés}}{300}$$

La valeur obtenue est exprimée par μL de sang.

Dans les cas de très forte parasitémie, lors du comptage simultané, lorsqu'on atteint 100 parasites comptés avant d'arriver à 100 leucocytes comptés, le comptage peut s'arrêter à 200 leucocytes.

ANNEXE 3 : EXTRACTION D'ADN DE *P.falciparum* AVEC LE KIT Qiagen

Le kit Qiagen donne un meilleur rendement quant à la sensibilité et la pureté de l'ADN obtenu après l'exécution du protocole d'extraction ci-après indiqué par le fabricant

1^{ère} étape : DECOUPAGE DES PAPIERS CONFETTIS

MATERIEL

- Gants
- Puncheurs
- Plaques sur lesquelles seront découpés les papiers confettis
- Tubes eppendorf de 1,5ml, 50ml, de collections et leurs portoirs adaptés
- Colonnes
- Papiers Kimwipes
- Alcool 70 ou 90 degrés
- Eau distillée

PROCEDURES

On enfile les gants pour numéroté les tubes Eppendorf 1.5ml et colonnes par les identifiants des patients sur les papiers confettis. Le même identifiant de patient est numéroté sur un tube 1.5ml et une colonne.

Ensuite, on range les tubes Eppendorf 1.5ml dans le portoir pour la réception des spots (3 spots en général) de confettis qui seront découpés à l'aide du puncheur.

Pour le découpage, le papier confetti est déposé sur la plaque, ensuite on prend le puncheur préalablement nettoyé par l'alcool et l'eau distillée à l'aide du papier Kimwipes pour découper le spot de confetti en appuyant le bout du puncheur sur le papier confetti, ensuite effectuer des mouvements circulaires de sens opposé jusqu'à détacher le spot du papier confetti puis on le transfère dans le tube Eppendorf 1,5ml correspondant. On procède toujours au nettoyage de la plaque et du puncheur par de l'alcool et de l'eau distillée à la fin du découpage d'un spot de confetti avant de procéder au découpage du prochain confetti.

2^{ème} étape : EXTRACTION DE L'ADN DES SPOTS DE CONFETTIS AVEC LE KIT

Qiagen

MATERIEL

- Trois bains maries
- Portoirs flottants pour bains marie pouvant contenir les tubes Eppendorf 1,5ml
- Ethanol absolu
- Pipettes de 20 μ l, 200 μ l et 1000 μ l
- Vortexeuse et centrifugeuse

NB : Anticiper les étapes du protocole en mettant les bains maries à 85, 56, 70 degrés respectivement pour les étapes 2, 3 et 4 ; et vérifier que les réactifs du kit Qiagen respectent les règles édictées par le fabricant pour leur usage.

PROCEDURE

1. Dans les tubes de 1,5ml contenant les 3 spots de sang déjà découpés ajouter 180 μ L de buffer ATL.

2. Incuber à 85°C pendant 10mn puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.

3. Ajouter 20µl de protéinase K de la solution de stock. Vortexer, puis incuber à 56°C pendant une heure. Centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.

Après cette centrifugation, l'ADN était conservé à -20 degrés pour son utilisation lors techniques moléculaires.

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

5. Ajouter 200µL d'éthanol (96%) aux échantillons, bien vortexer puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.

6. Soigneusement transférer la solution de l'étape 5 dans les colonnes. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1mn. Transférer dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat, bien fermer les colonnes pour éviter la formation des aérosols lors de la centrifugation.

7. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 µL du buffer AW1. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000 rpm pendant 1mn. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat.

8. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 µL de buffer AW2. Fermer les colonnes puis centrifuger à 14000 rpm pendant 3mn.

9. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat puis centrifuger à haute vitesse pendant 1mn. Cette étape aide à éliminer le restant de la solution du buffer AW2 restant après l'étape précédente.

10. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes 1.5ml stériles puis jeter les tubes de collection qui peuvent contenir encore du filtrat. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 150µL du buffer AE ou d'eau distillée. Incuber à la température ambiante (15°C à 25°C) pendant 1mn puis centrifuger à 8000rpm pendant 1mn.

Après cette centrifugation de l'étape finale, l'ADN obtenu était bien conservé à -20°C pour la réalisation des techniques moléculaires.

ANNEXE 4 : AMPLIFICATION DES GENES *msp1*, *msp2* et *glurp* de *P.falciparum* :

➤ Amplification du gène *msp1*

• Première réaction d'amplification : PCR1

C'est une PCR classique qui consistait à amplifier les blocs 1 et 3 du gène *msp1* avec la paire d'amorce suivante :

Amorce sens M1-OF : 5'- CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG -3'

Amorce antisens M1-OR : 5'- CTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA -3'

Le tableau ci-après représente la composition des réactifs utilisés ainsi que leur volume correspondant pour une réaction de PCR

Réactifs	Conc initiale	Volume (µL)	Conc finale
Eau Biosedra		Qsp 25	
Buffer	10X	2.5	1X
dNTP	2mM	2.5	0.2mM
MgCl ₂	25mM	2	2mM
Amorce sens M1-OF	10µM	2.5	1µM
Amorces anti-sens M1-OR	10µM	2.5	1µM
Taq solis	5U/µL	0.4	2.5U
ADN		3	

• Deuxième réaction d'amplification : PCR2

Elle caractérise le gène *msp1*. Elle consistait à amplifier les allotypes K1, Mad20 et Ro33 du gène *msp1* avec une paire d'amorce spécifique utilisée pour chaque allotype. Chaque paire d'amorce est constituée d'une amorce aller ou amorce sens (F) et d'une amorce retour ou amorce anti-sens (R).

Les différentes paires d'amorces utilisées sont les suivantes :

-Allotype K1

Amorce sens M1-KF : 5'- AAATGAAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC -3'

Amorce anti-sens M1-KR : 5'- GCTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGA -3'

-Allotype Mad20

Amorce sens M1-MF : 5'- AAATGAAGGAACAAGTGGAACAGCTGTTAC -3'

Amorce anti-sens M1-MR : 5'- ATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATTACC-3'

-Allotype Ro33

Amorce sens M1-RF : 5'- TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG -3'

Amorce antisens M1-RR : 5'- CATCTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGATC 3'

Le tableau ci-après récapitule les réactifs utilisés et leurs différentes concentrations au cours de cette deuxième amplification génique :

Réactifs	Concentration initiale	Volume (µL)	Concentration finale
Eau Biosedra		Qsp 25	
Buffer	10X	2.5	1X
dNTP	2mM	2.5	0.2mM
MgCl ₂	25mM	2	2mM
Amorce sens M2-OF	10µM	2.5	1µM
Amorces anti-sens M2-OR	10µM	2.5	1µM
Taq solis	5U/µL	0.4	2.5U
ADN		3	

Le volume total du mélange réactionnel utilisé pour l'amplification était de 25µL. Chaque tube PCR contenait donc un volume de 20µL de mélange de réactifs et un volume de 5µL d'ADN à amplifier. L'ADN extrait par la méthode de Qiagen était utilisé à la première

réaction PCR, et l'amplicon obtenu au cours de la première réaction était utilisé comme ADN de la deuxième réaction PCR. L'amplification est réalisée dans le thermo cycler dont le principe est basé sur la variation de la température. Les programmes suivants étaient utilisés selon les réactions :

PROGRAMME

Première réaction d'amplification

1^{ère} étape : Elle se réalise une seule fois.

Dénaturation initiale à 95°C pendant cinq (5) minutes.

2^{ème} étape : Elle consiste à faire une

-Dénaturation à 95°C pendant une (1) minute

-Hybridation à 59°C pendant deux (2) minutes

-Élongation à 72°C pendant deux (2) minutes.

Ce cycle est répété 40 fois suivant l'ordre chronologique.

3^{ème} étape : Elle marque la fin du processus d'amplification

Élongation finale à 72°C pendant dix (10) minutes.

4^{ème} étape : Elle consistait juste à conserver les amplicons obtenus à 4°C.

Deuxième réaction d'amplification

1^{ère} étape : Elle se réalise une seule fois.

Dénaturation initiale à 95°C pendant cinq (5) minutes.

2^{ème} étape : Elle consiste à faire une

-Dénaturation à 95°C pendant une (1) minute

-Hybridation à 59°C pendant deux (2) minutes

-Élongation à 72°C pendant deux (2) minutes.

Ce cycle est répété 25 fois suivant l'ordre chronologique.

3^{ème} étape : Elle marque la fin du processus d'amplification.

Élongation finale à 72°C pendant dix (10) minutes.

4^{ème} étape : Elle consistait à conserver les amplicons obtenus à 4°C

NB : La différence entre les deux programmes est que l'étape 2 est réalisée 25 fois dans la deuxième réaction d'amplification au lieu de 40 fois dans la première réaction d'amplification.

➤ **Amplification du gène *msp2***

Les mêmes procédés d'application PCR et de programme PCR ont été utilisés comme pour le gène *msp1*, avec aussi l'utilisation de différentes paires d'amorces dans les deux réactions d'amplification. Les différentes paires d'amorces utilisées sont aussi spécifiques pour le gène *msp2* et constituent la seule différence entre les deux techniques.

Les séquences des paires d'amorces utilisées lors des deux réactions étaient les suivantes :

Première réaction d'amplification : PCR1

Amorces sens ou M2-OF : 5'- ATGAAGGTAATTAACATTGTCTATTATA -3'

Amorces anti-sens ou M2-OR : 5'- CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT -3'

Deuxième réaction d'amplification : PCR2

Les allèles 3D7 et FC27 du gène *msp2* étaient le centre d'intérêt de notre étude. Les séquences de paires d'amorces utilisées étaient les suivantes :

-Iso forme 3D7

Amorce sens M2-IcF : 5'- AGAAGTATGGCAGAAAGTAAKCCTYCTACT -3'

Amorce antisens M2-IcR : 5'- GATTGTAATTCGGGGGATTCAGTTTGTTCG -3'

-Iso forme FC27

Amorce sens M2-FcF : 5'- AATACTAAGAGTGTAGGTGCARATGCTCCA -3'

Amorce anti-sens M2-FcR: 5'- TTTTATTTGGTGCATTGCCAGAACTTGAAC -3'

➤ **Amplification du gène Glurp**

Le type de PCR et les séquences de paires d'amorces spécifiques pour le gène glurp étaient les différences notoires entre la technique commune réalisée dans msp1 et msp2. Cependant, le programme PCR appliqué était aussi différent du programme commun de msp1 et msp2

La semi-nested PCR était le type PCR utilisé, qui consistait à réaliser la même première réaction d'amplification du gène glurp utilisée pour msp1 et msp2, mais à la seconde réaction d'amplification, seule l'amorce aller ou amorce sens (F) était changée dans la séquence de paire d'amorce spécifique utilisée.

Les séquences de paires d'amorces étaient les suivantes :

Première réaction d'amplification : PCR1

Amorce sens G-OF : 5'- TGAATTTGAAGATGTTCCACTGAAC -3'

Amorce anti-sens G-OR : 5'- GTGGAATTGCTTTTTCTTCAACTAA -3'

Deuxième réaction d'amplification : PCR2

Amorce sens Glurp F : 5'- ATGAATTTGAAGATGTTCCACTGAAC -3'

Amorce anti-sens G-OR : 5'- GTGGAATTGCTTTTTCTTCAACTAA -3'

Après la réalisation des mélanges réactionnels PCR, les programmes PCR étaient les suivants :

Première réaction d'amplification

1^{ère} étape : Elle se réalise une seule fois.

Dénaturation initiale à 95°C pendant cinq (5) minutes.

2^{ème} étape : Elle consiste à faire une

-Dénaturation à 95°C pendant une (1) minute

-Hybridation à 59°C pendant deux (2) minutes

-Élongation à 72°C pendant deux (2) minutes.

Ce cycle est répété 40 fois suivant l'ordre chronologique.

3^{ème} étape : Elle marque la fin du processus d'amplification

Élongation finale à 72°C pendant dix (10) minutes.

4^{ème} étape : Elle consistait juste à conserver les amplicons obtenus à 4°C.

Deuxième réaction d'amplification

1^{ère} étape : Elle se réalise une seule fois.

Dénaturation initiale à 95°C pendant cinq (5) minutes.

2^{ème} étape : Elle consiste à faire une

-Dénaturation à 95°C pendant une (1) minute

-Hybridation à 59°C pendant deux (2) minutes

-Élongation à 72°C pendant deux (2) minutes.

Ce cycle est répété 25 fois suivant l'ordre chronologique.

3^{ème} étape : Elle marque la fin du processus d'amplification.

Élongation finale à 72°C pendant dix (10) minutes.

4^{ème} étape : Elle consistait à conserver les amplicons obtenus à 4°C.

ANNEXE 5 : ANALYSE DES PRODUITS DE LA PCR

La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose réalisée après les différentes réactions de PCR était l'outil d'analyse du génotypage des échantillons à travers l'observation des bandes apparues sous l'effet de la lampe UV.

MODE OPERATOIRE

MATERIEL

- Poudre d'agarose

- Tampon de Tris Borate EDTA 0.5x (TBE 0.5x)
- Bromure d'éthidium
- Balance
- Tube d'Erlenmeyer
- Pipettes de 200 et embout adapté
- Four à micro-ondes
- Cuve d'électrophorèse
- Bac de migration et peigne adapté

PROCEDURE

- 1- Le gel d'agarose était réalisé à l'aide d'une solution concentrée à 2%.
- 2- On verse la quantité de poudre d'agarose préalablement pesée à la balance dans le tube d'erenmeyer, et on ajoute le volume de TBE 0.5x correspondant pour atteindre 2% comme concentration finale de la solution. On place ensuite le tube d'erenmeyer contenant la solution d'agarose dans le four à micro-onde pendant 1 minute 30 secondes.
- 3- On laisse refroidir un peu et on ajoute 30 μ L de bromure d'éthidium à la solution, puis on remue la solution mixte jusqu'à obtenir un mélange homogène.
- 4- On fait ensuite couler notre solution dans le bac de migration avec peigne adapté bien équilibré, et on laisse ensuite la solution pendant quelques minutes jusqu'à polymérisation complète.
- 5- Après polymérisation, on enlève les peignes qui forment des petits trous sur le gel appelés puits. On loge ensuite dans les puits, les amplicons (ADN) de PCR, les contrôles (positif et négatif) ainsi que le marker de taille servant à mesurer la taille des bandes apparues après l'électrophorèse.
- 6- L'électrophorèse consiste à submerger le bac contenant le gel à migrer avec les différents échantillons dans la cuve à électrophorèse préalablement remplie par la solution de TBE 0,5x reliée à un générateur de courant sous une tension (voltage et ampérage) pendant quelques minutes afin de faire migrer l'ADN présent dans l'amplicon du pole négatif (-) vers le pole positif (+).

Visualisation des bandes sous U.V

Après migration de l'ADN, le gel était placé sous la lumière Ultra-Violette du Trans illuminateur, puis une capture était réalisée à l'aide de la caméra du système UVP (UV TRANSILLUMINATOR) sur l'ordinateur relié au Trans illuminateur. La capture était sauvegardée dans l'ordinateur pour l'interprétation des bandes visibles à l'œil nu sur la capture grâce à l'effet de la fluorescence émise par le bromure d'éthidium.

Interprétation des bandes aperçues

Les bandes étaient interprétées pour déterminer le polymorphisme des gènes à travers l'estimation de leur taille par rapport aux bandes du marqueur de taille spécifique par le programme UVP (UV TRANSILLUMINATOR). L'apparition, d'une bande spécifique au niveau d'un amplicon de PCR correspondait à la présence d'un allotype de *P.falciparum*, de deux bandes spécifiques à deux allotypes différents, ainsi de suite... Cependant, plus le gène est polymorphe, plus il représente de bandes au niveau d'un allèle.

Les résultats obtenus de la réponse au traitement à partir de *msp1*, *msp2* et *glurp* étaient classifiés suite à une comparaison du niveau de la position des clones (bandes) chez un même patient au jour de son recrutement (J0) et le jour où il s'est présenté avec du parasite de *P.falciparum* dans le sang avant la fin du calendrier de visites (jour de l'échec de traitement).

Le classement était fait par comparaison de la position des clones au jour du recrutement J0 et le jour de l'échec de traitement du patient suite à la réponse au traitement à partir des résultats de *msp1*, *msp2* et *glurp*

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 !