



UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



\*\*\*\*\*

ANNEE UNIVERSITAIRE 2022-2023

N°: 007

## FACULTE DE PHARMACIE THESE

Evaluation de la sensibilité *ex-vivo* de *Plasmodium falciparum* et  
*Plasmodium malariae* de M5717 et sa combinaison avec la Pyronaridine  
sur le *Plasmodium falciparum* au Mali.

Présentée et soutenue publiquement le 09 / 01 /2024 devant le jury  
de la Faculté de Pharmacie

**Par : M. SAMAKE Abdoul Karim**

**Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie**

**(Diplôme d'État)**

### JURY

- Président :** M. Abdoulaye A. DJIMDE (Professeur Titulaire)  
**Membres :** M. Souleymane DAMA (Maître de Conférences)  
M. Seidina A. S. DIAKITE (Maître de Conférences)  
M. Karim TRAORE (Maître-Assistant)  
**Directeur :** M. Laurent DEMBELE (Maître de Conférences)

# DEDICACES ET REMERCIEMENT

## DEDICACES

Je rends grâce à DIEU le Tout Puissant, le Clément et le Miséricordieux. Tout commence par Lui et tout finit par Lui. Je Lui rend grâce de m'avoir donné la vie, le courage et la santé sans quoi ce travail n'aurait pas eu lieu.

Au prophète Mohamed (PSL).

A mon papa Drissa et à ma mère Mariam Sangaré

Vous m'avez donné la vie, vous êtes mes modèles de vie pour toujours.

Ça n'a pas été toujours facile, mais la graine a germé.

Je prie le bon Dieu qu'il vous accorde une bonne santé et une longue vie.

A mes cher(e) s oncles et tantes merci pour vos conseils et affection à mon égard. Trouvé dans cette œuvre l'expression de ma profonde gratitude et de toute ma reconnaissance.

A mes frères et sœurs Aïchatou, Zeïnabou, Fatoumata, N'pinda et Habibatou, Aboudrahane, AbdoulAziz, AbdoulWahab, Aboubacar, Nouhoum, et Ibrahim : nous sommes unis par le sang et sommes appelés à œuvrer ensemble pour la réussite de la tâche commune. Je vous "adore" au-delà des liens du sang et à jamais, rien ne peut nous séparer, pas même les frontières du temps. Que DIEU renforce nos liens de fraternité.

A mes grands-parents Salimata Mariko et Ousmane Samaké merci pour vos encouragements et vos prières. Que le tout puissant vous accorde une bonne santé et une longue vie.

## REMERCIEMENT

A la famille SAMAKE,

A mes amis d'enfance, du quartier et de la faculté

A mes grandes sœurs du quartier

A mon amis et cher maître Ibrahim Keïta

Tu es un modèle pour moi à suivre, aux grands courages et rigueurs que DIEU t'accorde une longue vie en bonne santé pour que nous puissions continuer de jouir de tes exemples.

A toute la population de Faladjé, grand merci

Au Doyen de la Faculté de Pharmacie Professeur Boubacar Traoré

Au corps professoral de la Faculté de Pharmacie, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu.

Au personnel du MRTC/DEAP, pour votre disponibilité et votre franche collaboration.

A nos maîtres du MRTC/DEAP, pour votre engagement et votre souci constant de formation de qualité.

A l'équipe de l'unité de chimiorésistance du MRTC/DEAP: particulièrement au Professeur Abdoulaye DJIMDE, aux Docteurs, Mamadou TEKETE, Dinkorma OUOLOGUEM, Aminatou KONE, Souleymane DAMA, Laurent DEMBELE, Nouhoum DIALLO, Hamidou NIANGALY, Bakary FOFANA, Nianwalou DARA, Amadou BAMADIO, Aliou TRAORE, Bakary SIDIBE, Cheick Papa Oumar SANGARE, Aboubecrin HAIDARA, Fatoumata O Maïga, Fatoumata I Ballo, Diagassan DOUMBIA, Sékou Sissoko, Fanta Sogoré, Bilal Traoré, Bintou Diarra, Diakité Ousmaela, Mohamed Maïga , Nany Yacouba Barré, Diakité Bassirou , Djéneba Diallo, Souleymane Koné, Boï Koné, Fatoumata Diallo, aux internes Dramane Coulibaly et Aboudramane Kamaté.

Aux personnels de MRTC/DEAP/MEDRU : Mme SISSOKO Daoulé DIALLO, Mme BATHILY Yaye dite Nah SISSOKO, Mlle Adama Guindo, Mme OUEDRAOGO Mariam Kouyaté, Mr Ibrahim Kamaté, Mr Youssouf Fané.

Merci pour le soutien dont vous avez fait preuve tout le long des travaux de cette thèse. Elle est la vôtre.

## **Hommage à feu Professeur Ogobara K Doumbo**

Cher Professeur vous avez laissé un grand vide et malheureusement nous n'avons pas pu bénéficier directement de votre formation mais nul ne peut contre la volonté du bon Dieu et je sais que de là ou vous êtes, vous veillerez sur l'équipe.

Dors en paix Cher Maître

Amine

**HOMMAGE AUX  
MEMBRES DU JURY**

## **A notre Maître et président du jury**

**Professeur Abdoulaye A. DJIMDE**

- **Professeur Titulaire de Parasitologie – Mycologie à la Faculté de Pharmacie**
- **Directeur du MRTC Parasitologie**
- **Chef de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance (MEDRU/MRTC)**
- **Directeur du Programme DELGEME**
- **Membre de l'Académie Africaine des Sciences**

Cher Maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury de thèse. Auprès de vous nous avons pu bénéficier d'un enseignement de qualité. Nous avons admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques.. Recevez ici Cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance.

## **A notre Maître et juge**

### **MC. Souleymane DAMA**

- **Maître de Conférences en Parasitologie-Mycologie à la FAPH**
- **Spécialiste en Pharmacologie préclinique et clinique**
- **Enseignant-Chercheur à la FAPH**

Cher Maître, c'est un grand honneur et un réel plaisir que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Nous ne pourrions soumettre ce travail sans reconnaître votre rigueur scientifique et toute l'attention que vous portez à ce travail. Nous vous assurons notre profond attachement.

## **A notre Maître et juge**

**MC. Seidina A S DIAKITE**

- **Maître de Conférences en Immunologie à la Faculté de Pharmacie/ USTTB**
- **Docteur en Pharmacie, PhD en Immunologie**
- **Enseignant-Chercheur à la FAPH**

Cher Maître

C'est un immense honneur que vous nous faites en acceptant de juger. Votre calme, votre simplicité, votre disponibilité font de vous un Maître aux qualités recherchées.

Veillez recevoir, chère Maître, l'expression de nos sincères remerciements.

## **A notre Maître et juge**

### **Dr. Karim TRAORE**

- **Maître-Assistant en Pharmacologie à la Faculté de Pharmacie/ USTTB**
- **Docteur en Pharmacie, PhD en Pharmacologie**
- **Enseignant-Chercheur à la FAPH**

Nous avons eu l'honneur de vous associer à ce travail. Votre simplicité, votre disponibilité font de vous un Maître aux qualités recherchées. Recevez ici Cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance.

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

### **MC. Laurent Dembélé**

- **Maitre de Conférences à l'Université des Sciences, des Techniques et de Technologies de Bamako (USTTB), Faculté de pharmacie**
- **Docteur en biotechnologie, génie microbiologie**
- **Chercheur au MRTC Parasitologie**

Cher Maître, de ce temps passé à vos côtés nous avons beaucoup appris de vos valeurs humaines et scientifiques. Votre courage et votre disponibilité nous ont été d'un grand atout pour la réalisation de ce travail. Nous ne saurions être assez reconnaissants pour tout l'intérêt et toute la considération que vous avez porté à ce travail.

Qu'ALLAH vous donne santé et longévité afin que plusieurs générations d'apprenants puissent bénéficier la qualité de votre enseignement. Amen !

## Liste des sigles et abréviations :

ACD : Acid-Citrate-Dextrose

ADN : Acide désoxyribo-nucléique

av.J.C : Avant Jésus Christ

BB : Bleu de Bromophénol

CPS : Chimio prévention du Paludisme Saisonnier

CTA : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine

DEAP : Département d'Épidémiologie des Affections Parasitaires

DHA : Dihydroartémisinine

DHFR : Dihydrofolate Réductase

DHPS : DihydroPtéroate Synthétase

DNTPs : Désoxy Nucléotide Triphosphate

FM : Frottis Mince

FAPH : Faculté de Pharmacie

FBS : Fœtal Bovine Serum

G6PD : Glucose-6 Phosphate –Déshydrogénase

GNF : Genomic Novartis Fondation

GE : Goutte Épaisse

GPDI : Interaction Pharmacodynamique Générale

GTS : Global technical strategy for malaria

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

IRBC : Infected Red Blood Cell

LAMP : Loop-mediated isothermal Amplification

LDH : Lactate Déshydrogénase

MEDRU : Molecular Epidemiology and Drug Resistance Unit

mmHg : Millimètre de mercure

MRTC : Malaria Research and Training Center

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pb : Paire de base

PCR : Polymérase Chain Reaction

*Pfmdr-1* : *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-1

PI4K : Phosphatidylinositol 4 phosphate

PKG : Protéine kinase G

*P. f* : *Plasmodium falciparum*

*P. o. curtisi* : *Plasmodium ovale curtisi*

*P. o. wallikeri* : *Plasmodium ovale wallikeri*

PM : Poids Moléculaire

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

QBC : Quantitative Buffy Coat

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RPM: Revolution per Minute

RBC: Red Blood Cell

RT : Room Temperature

SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe

Taq : *Thermus aquaticus*

USTT-B : Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako

UV : Ultra-Violet

µl : Microlitre

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<input type="checkbox"/>	<b>Problématique et hypothèse de recherche</b> .....	<b>3</b>
<input type="checkbox"/>	<b>Hypothèses :</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Objectifs</b> .....	<b>5</b>
2.1.	Objectif général : .....	5
2.2.	Objectifs spécifiques : .....	5
<b>3</b>	<b>GENERALITES</b> .....	<b>7</b>
3.1.	Historique : .....	7
3.2.	Différentes espèces de <i>Plasmodium</i> : .....	8
3.3.	Cycle biologique de <i>Plasmodium</i> : .....	11
3.4.	Physiopathologie : .....	12
3.4.1.	Accès palustre non compliqué : .....	12
3.4.2.	Neuropaludisme : .....	13
3.5.	Manifestations cliniques : .....	14
3.6.	Diagnostic biologique du paludisme : .....	16
3.6.1.	Diagnostic direct : .....	16
3.6.2.	Diagnostic indirect : .....	18
3.6.3.	Diagnostic différentiel de l'espèce <i>Plasmodium malariae</i> : .....	18
3.7.	Culture de <i>Plasmodium</i> : .....	19
3.9.	Les stratégies de lutte contre le paludisme : .....	22
3.9.1.	Traitement curatif : .....	22
3.9.2.	Les mesures préventives : .....	22
3.10.	Les antipaludiques : .....	25
3.10.1.	La molécule antipaludique candidate : .....	32
3.10.2.	Pyronaridine : .....	33
3.11.	La chimiorésistance : .....	34
3.11.1.	Définition de la chimiorésistance : .....	34
3.11.2.	La résistance aux antipaludiques et gènes moléculaires associés : .....	35
<b>4.</b>	<b>MATERIEL ET MÉTHODES :</b> .....	<b>38</b>
4.1.	Lieu d'étude : .....	38
4.1.1.	Climat et végétation : .....	38
4.1.2.	Population : .....	38
4.1.3.	Infrastructures socio-sanitaires : .....	38
4.2.	Le choix du lieu d'étude : .....	39

4.3.	Type d'étude :	39
4.4.	Période d'étude :	39
4.5.	Population d'étude :	40
4.6.	Considérations éthiques et déontologiques :	40
4.7.	Critères d'inclusion et de non-inclusion :	40
4.7.1.	Critères d'inclusion :	40
4.7.2.	Critères de non inclusion :	41
4.8.	Traitement antipaludique administré :	41
4.9.	Méthodes de collecte des données :	42
4.9.1.	Collecte des données cliniques :	42
4.9.2.	Collecte des prélèvements biologiques :	42
4.10.	Test <i>ex- vivo</i> de l'efficacité des médicaments antipaludiques courants et médicaments candidats sur les espèces de <i>Plasmodium</i> :	44
4.11.	L'adaptation à la culture <i>in vitro</i> des isolats cliniques et la sélection des parasites mutants :	49
4.12.	Analyse des isobogrammes :	51
5.	Résultats :	54
5.1.	Sensibilité des souches de terrain de <i>P. falciparum</i> au traitement du M5717 : .....Erreur ! Signet non défini.	
5.2.	Sensibilité des souches de terrain de <i>P. malariae</i> au traitement du M5717 :	54
5.3.	Comparaison de l'efficacité de M5717 à celle d'un panel de médicaments antipaludiques existants :	57
5.4.	Phénotype et Génotype des parasites de <i>P. falciparum</i> résistant au M5717 :	61
5.4.1.	Sélection des parasites mutants au M5717 (recrudescence phénotypique) :	61
5.4.2.	Concentrations inhibitrices à 50% (CI <sub>50</sub> ) des parasites recrudescents :	64
5.4.3.	Confirmation par séquençage de la sélection des parasites recrudescents au traitement de M5717 :	65
5.5.	Test d'isobogramme basé sur les données de pharmacodynamie :	66
5.5.1.	Le M5717 ne montre aucune interaction avec la Pyronaridine par la méthode de calcul de la somme fractionnelle des Concentration Inhibitrice à 50 ( $\Sigma$ FIC50) :	66
5.5.2.	L'interaction M5717 – Pyronaridine tend vers une additivité par la méthode de prédiction de Bliss (Modèle de référence) :	67
6.	Discussions :	71
7.	Conclusion :	75
8.	Recommandation :	76
9.	Référence :	77
10.	Annexes :	89

**Listes des tableaux**

<b>Tableau I :</b> Résumé des médicaments antipaludiques courants .....	26
<b>Tableau II :</b> Structure chimique des antipaludiques courants. ....	30
<b>Tableau III:</b> les concentrations inhibitrices à 50% (IC50) des antipaludiques courants comparées au médicament candidat M5717 sur les isolats cliniques de <i>P. falciparum</i> à 48 heures. ....	59
<b>Tableau IV:</b> les concentrations inhibitrices à 50% (IC50) des antipaludiques courants comparées au médicament candidat M5717 sur les isolats cliniques de <i>P. malariae</i> à 72 heures. ....	60
<b>Tableau V:</b> Les concentrations inhibitrices à 50% (IC50) des antipaludiques courants comparées au médicament candidat M5717 sur les isolats cliniques de <i>P. malariae</i> à 72 heures. ....	61
<b>Tableau VI :</b> Concentrations inhibitrices à 50% des parasites phénotypiquement.....	64
<b>Tableau VII :</b> Résumé du séquençage des parasites recrudescents au traitement de M5717.....	65

## Listes des figures

Figure 1 : Cycle de vie <i>Plasmodium falciparum</i> (35).....	12
Figure 2 : la structure chimique de M5717 (87). ....	32
Figure 3 : Présentation du site (Faladjé) (101).....	39
Figure 4 : Processus de la détermination de test <i>ex-vivo</i> sur <i>Plasmodium</i> au stade sanguin. ....	45
Figure 5 : L'illustration d'image des parasites en fonction des colorants .....	48
Figure 6 : Illustration de l'interprétation d'un résultat d'analyse de cytométrie en flux. ....	48
Figure 7 : Procédure de la sélection des parasites mutants .....	50
Figure 8 : Processus du test <i>ex-vivo</i> de la détermination médicamenteuse.....	51
Figure 9: Courbes dose-réponses de la sensibilité <i>ex-vivo</i> des isolats cliniques de <i>P. falciparum</i> au M5717. ....	54
Figure 10 : Courbes dose-réponses de la sensibilité <i>ex-vivo</i> des isolats cliniques de <i>P. falciparum</i> au contrôle DHA. ....	54
Figure 11: Courbes dose-réponses de la sensibilité <i>ex-vivo</i> des isolats cliniques de <i>P. malariae</i> au M5717. ....	56
Figure 12: Courbes dose-réponses de la sensibilité <i>ex-vivo</i> des isolats cliniques de <i>P. malariae</i> au contrôle DHA. ....	56
Figure 13: Comparaison de la sensibilité <i>ex-vivo</i> de M5717 a un panel de médicaments antipaludiques contre les isolats cliniques de <i>P. falciparum</i> . ....	58
Figure 14: Comparaison de la sensibilité <i>ex-vivo</i> de M5717 a un panel de médicaments antipaludiques contre les isolats cliniques de <i>P. malariae</i> . ....	58
Figure 15 : Graphisme de la recrudescence des parasites par pression médicamenteuse de M5717. ....	62
Figure 16 : Graphisme de la recrudescence des parasites par pression médicamenteuse de M5717 .....	64
Figure 17 : Heatmap plot montrant les interactions par la méthode de calcul des CI50 fractionnelle. ....	66
Figure 18: Diagramme thermique Prediction des interactions M5717-Pyronaridine par la méthode de Bliss après 24h. ....	68
Figure 19 : Diagramme thermique prédiction des interactions M5717-Pyronaridine par la méthode de Bliss après 48h. ....	68
Figure 20 : Diagramme thermique prédiction des interactions M5717-Pyronaridine par la méthode de Bliss après 72h. ....	69
Figure 21 : Diagramme thermique prédiction des interactions M5717-Pyronaridine par la méthode de Bliss après 96h. ....	69

# **INTRODUCTION**

## 1 Introduction

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile, hémolysante, due à des protozoaires du genre *Plasmodium* (1). Ces sporozoaires sont transmis essentiellement par la piqûre infestante d'un moustique femelle hématophage lors de leurs repas sanguins. Seul le genre *Anophèles* est capable de transmettre le paludisme (*Anophèles gambiae sl.*, *Anophèles funestus*, *Anophèles stephensis*, ...). Par ailleurs, il existe d'autres voies plus rares de transmission telles que la voie sanguine (transfusion sanguine) et fœto-maternelle (2).

De nos jours cinq (5) espèces du genre *Plasmodium* sont responsables du paludisme chez l'homme qui sont : *Plasmodium falciparum* considéré comme l'espèce la plus redoutable des parasitoses ; responsable de la fièvre tierce causant plus de 90% de la mortalité due au paludisme en Afrique Sub-saharienne. *Plasmodium malariae* cause la fièvre quarte. *Plasmodium ovale* aussi à l'origine d'une fièvre tierce maligne, est très souvent à l'origine des rechutes à long terme (2 à 4 ans), également divisé en deux sous-espèces : *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* (3). *Plasmodium vivax* est responsable de la fièvre tierce bénigne avec des rechutes à court ou long terme (quelques semaines à plusieurs mois). *P. vivax* est également l'espèce la plus répandue à travers le monde(4). *Plasmodium knowlesi* est considéré comme un parasite zoonotique, qui peut provoquer à la fois un paludisme simple et grave chez l'homme avec une fièvre quotidienne et des frissons(5).

Bien qu'il soit évitable et traitable, le paludisme continue d'entraîner des conséquences dévastatrices sur la santé et les moyens de subsistance des populations à travers le monde. En 2021, il a été dénombré 247 millions nouveaux cas de paludisme et 619 000 décès liés au paludisme. Plus des deux tiers des décès ont été enregistrés chez des enfants de moins de 5 ans vivant dans la région africaine selon l'OMS(6). Au Mali, le Système Local d'Information Sanitaire (SLIS) de 2021 a rapporté un nombre de 3 204 275 cas de paludisme, dont 1 045 945 cas graves et 1 480 décès(7).

Le déclin de plusieurs molécules antipaludiques de première intention dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* est dû à des mutations ponctuelles sur certains gènes de résistance des parasites contre les antipaludiques notamment la chloroquine, le proguanil, la méfloquine, la sulfadoxine-pyriméthamine(8)(9). Suite aux multiples résistances à la monothérapie les l'Organisation Mondiale de la Santé(10). Malgré ces mesures mise en œuvre, la résistance de *P. falciparum* gagne de l'espace. Le besoin urgent de nouveaux médicaments antipaludiques ayant

un nouveau mode d'action, d'activité thérapeutique à spectre large est nécessaire. Les nouveaux médicaments antipaludiques devraient être capables d'inhiber toutes les espèces plasmodiales et les parasites résistants aux antipaludiques existants. C'est dans cette logique que des candidats antipaludiques sont en cours de développement, parmi lesquels :

le candidat M5717 en cours d'essais de phase I entrant prochainement en phase II(11). C'est le fruit d'une collaboration entre l'unité de découverte de médicament, de l'Université de Dundee en Ecosse et le laboratoire Merck(12). Le mécanisme d'action du M5717 est particulier, il cible le facteur 2 d'élongation du gène eucaryotique chez *P. falciparum* (*P. falciparum* eukaryotic elongation factor 2 (*PfeEF2*)) essentiel pour la fabrication des protéines du parasite responsable du paludisme(13). Pour minimiser la probabilité de développer une résistance au M5717 dans les pays endémiques et conformément aux directives de l'OMS, il est recommandé d'associer le M5717 à un médicament partenaire afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique et de retarder le développement d'une résistance à chacun des médicaments composant de l'association. Ainsi, une précédente étude *in vivo* utilisant un modèle de souris humanisée infectée par *P. falciparum* 3D7 a permis d'identifier la Pyronaridine (PYR) comme molécule partenaire potentiel pour le M5717(14). Le M5717 est identifié à partir du criblage phénotypique avec une excellente efficacité sur l'espèce *P. falciparum* de laboratoire (3D7, DD2, NF54 ...).

### ❑ **Problématique et hypothèse de recherche**

L'efficacité du M5717 sur des isolats cliniques de *Plasmodium falciparum* et les espèces non *falciparum* reste encore à déterminer. Au laboratoire, des parasites souches de laboratoire résistants au M5717 *in vitro*, ont pu être générés. A cet égard, ce nouveau médicament candidat est ainsi planifié pour être développé en combinaison avec la Pyronaridine, d'où la nécessité d'évaluer l'activité *ex-vivo* et de sa combinaison avec la Pyronaridine.

### ❑ **Hypothèses :**

- 1) Le M5717 est efficace sur des isolats cliniques de *P. falciparum* et de *P. malariae*.
- 2) Les isolats cliniques de *P. falciparum* survivent à l'exposition *ex-vivo* de M5717.
- 3) La combinaison du M5717- Pyronaridine est une solution pour anticiper le problème de résistance au M5717 et accroître son efficacité sur le terrain.

# OBJECTIFS

## **2 Objectifs**

### **2.1. Objectif général :**

Évaluer l'efficacité de M5717 seul et sa combinaison avec la Pyronaridine sur des isolats cliniques *P. falciparum* collectés à Kati Faladjé.

### **2.2. Objectifs spécifiques :**

1 Déterminer l'efficacité de M5717 sur des isolats cliniques de *P. falciparum* et de *P. malariae* provenant de Kati Faladjé.

2 Mesurer le niveau de sélection des isolats mutants par le M5717.

3 Déterminer la sensibilité *ex-vivo* de la combinaison M5717 plus Pyronaridine sur *P. falciparum* provenant de Kati Faladjé.

# GENERALITES

### 3 GENERALITES

#### 3.1. Historique :

Le paludisme fait partie des plus vieilles affections de l'homme pour lesquelles les grandes civilisations de la préhistoire auraient des notions de diagnostique ou des techniques de différenciation des manifestations cliniques telles que : les premiers manuscrits du paludisme dans les anciens dossiers médicaux chinois datant de 2700 ans avant J.C, dans le papyrus d'Ebers 1200 ans avant J.C. Les médecins de l'Inde védique et brahmanique distinguaient déjà, 1000 ans avant JC, des fièvres intermittentes caractéristiques. Ainsi Hippocrate décrivait longuement des fièvres tierce et quarte(15). Le chef militaire Alexandre le Grand serait mort du paludisme (13 juin 323 av. J.C)(16). Malgré l'avancé de la science et de la recherche scientifique le paludisme continue à ôter la vie des milliers de personnes dans le monde en particulier l'Afrique. Les dégâts causés par le paludisme pendant la première guerre mondiale ont suscité la recherche et la mise à disposition des nouvelles molécules antipaludiques telles que les dérivés des amino-8-quinoleines, des amino-9-acridines et des amino-4-quinoleines dont la plus représentative est la chloroquine(17).

La chloroquine sera ensuite largement utilisée aussi bien en traitement curatif qu'en prophylaxie jusqu'à ce que l'OMS ait lancé en 1950 un programme d'éradication du paludisme à l'échelle mondiale : "le monde unit contre le paludisme". C'est ainsi qu'il y a eu le développement de nombreux antipaludiques de synthèses dont les plus connus sont l'amodiaquine, la pyriméthamine, le cycloguanil et le proguanil. Dans les années 2000, *Plasmodium* a développé des résistances à ces monothérapies(18)(19). Face aux résistances multiples de *Plasmodium* aux monothérapies, l'OMS a recommandé les CTA pour la prise en charge des cas de paludisme. Quelques années après la mise en œuvre de ces CTA, il a été observé dans la région du Pacifique occidental et dans la région de l'Asie du Sud-Est de l'OMS, une résistance partielle à l'artémisinine. Une résistance à un certain nombre de médicaments associés aux CTA a été confirmée au Cambodge, en République démocratique populaire du Lao, au Myanmar, en Thaïlande et au Viet Nam grâce à des études menées entre 2001 et 2019 (20).

### 3.2. Différentes espèces de *Plasmodium* :

Le genre *Plasmodium* a plus de 140 espèces qui causent le paludisme dont seulement six de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine. Il s'agit de :

- *Plasmodium falciparum*
- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium ovale curtisi* et
- *Plasmodium ovale wallikeri*
- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium knowlesi*

Les six plasmodies appartiennent à l'embranchement des Apicomplexa, classe des sporozoaires ou sporozoasida, ordre des Eucoccidies, sous-ordre des Haemosporina, famille des Plasmodiidae(21). Ils se différencient par des critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques.

#### ❑ *Plasmodium falciparum* :

*Plasmodium falciparum* est l'espèce prédominante en Afrique Subsaharienne où elle est à l'origine du taux élevé de mortalité (21). *P. falciparum* est l'espèce la plus dangereuse et la plus mortelle qui développe plus de résistance aux antipaludiques. *P. falciparum* est responsable des formes cliniques graves, notamment le neuropaludisme. Il est également présent dans les zones tropicales d'Afrique, d'Amérique Latine et d'Asie. En 2019, sur les 239 millions de cas de paludisme dans le monde, 65 millions étaient dus à *P. falciparum*(22). Dans les régions équatoriales, le paludisme à *P. falciparum* est transmis toute l'année avec cependant des pics saisonniers. Dans les régions sub-tropicales, sa transmission ne survient qu'en période chaude et humide. Sa transmission s'interrompt lorsque la température tombe en dessous de 18°C. L'évolution se fait d'un seul tenant après une incubation de 7 à 12 jours. Aucun cas de rechute tardive n'a été documenté de nos jours à la suite du paludisme à *P. falciparum*.

#### ❑ *Plasmodium vivax* :

*Plasmodium vivax* est l'espèce la plus répandue dans le monde, particulièrement en Amérique du Sud et en Asie et beaucoup plus rare en Afrique. En 2019, 51,7 % des cas de paludisme était dus à *P. vivax* en Asie du Sud-Est et seulement 0,3% en Afrique Subsaharienne (22). Cette espèce fut longtemps considérée comme absente en Afrique de l'Ouest et du Centre compte tenu de la forte prédominance des populations du groupe sanguin Duffy négatif ne possédant pas le récepteur membranaire (Duffy) à la surface des érythrocytes nécessaires à l'infection par *P. vivax*. Cependant, des infections à *P. vivax* chez des sujets du groupe sanguin Duffy-négatif ont été décrites récemment (23). La période d'incubation est de 11 à 13 jours avec des rechutes (accès de reviviscence) qui peuvent survenir jusqu'à 3 à 4 ans plus tard. Ces rechutes sont causées par l'activation des formes dormantes (hypnozoïtes) de ce parasite dans le foie. L'infection par *P. vivax* était traditionnellement considérée comme bénigne (fièvre tierce bénigne : cycle érythrocytaire de 48 heures). En revanche, en zone d'endémie il peut avoir des répercussions graves sur l'état de santé des populations, notamment l'anémie chez les enfants et les formes cliniques graves. De plus, des cas de résistances médicamenteuses de *P. vivax* à la chloroquine ont été rapportés (21).

#### ❑ *Plasmodium ovale* :

*Plasmodium ovale* est beaucoup plus rencontrée en Afrique intertropicale du Centre et de l'Ouest, et dans certaines régions du Pacifique. Tout comme *P. vivax*, elle provoque une fièvre tierce bénigne. Son incubation est de 15 jours au minimum, mais peut aller à plusieurs semaines. *P. ovale* peut causer des rechutes tardives 4 à 5 ans après comme celles observées avec *P. vivax* par la réactivation des hypnozoïtes. *P. ovale* serait géographiquement distribuée dans des zones où *P. vivax* est absente(21).

Des études ont révélé que l'espèce *Plasmodium ovale* était représentée par deux sous espèces. La sous espèce nommée *Plasmodium ovale curtisi* et la sous espèce variant appelée *Plasmodium ovale wallikeri*. Ces deux sous espèces ont été caractérisées grâce aux séquences des gènes suivants ; la cystéine protéase, la protéine de surface de l'ookinète et le cytochrome b(24,25). Une étude plus récente a montré que ces deux sous espèces constituent deux nouvelles espèces plasmodiales non recombinantes et sympatriques. Elles seraient responsables de plus de 15 millions de cas annuels de paludisme en Afrique au Sud du Sahara (26).

#### ❑ *Plasmodium malariae* :

*Plasmodium malariae*, espèce décrite pour la première fois comme une maladie infectieuse de l'homme par Golgi en 1886. Il a une distribution mondiale, mais de manière beaucoup plus sporadique. Il se différencie des autres espèces par une incubation plus longue (15 à 21 jours), une périodicité différente de la fièvre (cycle érythrocytaire de 72 heures responsable d'une fièvre quarte) et surtout par sa capacité à entraîner des reviviscences très tardives, jusqu'à 20 ans après la primo infection (21). Les mécanismes physiopathologiques responsables de ces reviviscences tardives ne sont pas totalement élucidés bien que certains évoquent la présence de mérozoïtes latents dans les voies lymphatiques. L'infection est considérée comme bénigne en général. Cependant, *P. malariae* peut parfois entraîner des complications rénales. En général, la répartition de *P. malariae* coïncide avec celle de *P. falciparum*. Dans les zones d'endémie en Afrique, *P. malariae* est dans la grande majorité retrouvé en co-infection avec *P. falciparum*(27). Les infections causées par *P. malariae* sont plus fréquentes en Afrique subsaharienne et dans le sud-ouest du Pacifique et moins fréquentes en Asie, au Moyen-Orient, en Amérique centrale et du Sud(28) . La prévalence de *P. malariae* varie de moins de 1% à 30-40% dans les zones focales de l'Afrique de l'Ouest et de l'Indonésie sur la base de la détection à la microscopie. Dans les communautés endémiques, *P. malariae* est une cause fréquente de morbidité avec l'incidence la plus élevée d'épisodes fébriles chez les enfants de moins de 10 ans(29).

#### ❑ *Plasmodium knowlesi* :

*Plasmodium knowlesi* a été isolée et étudiée en détail pour la première fois à la Kolkata School of Tropical Medicine en Inde au début des années 1930, après avoir été remarqué par Campbell dans un film sanguin provenant d'un macaque à longue queue qui avait été importé de Singapour (5). Décrite par Knowles en 1932, sa distribution s'étend en zone forestière d'Asie du Sud-Est (particulièrement en Malaisie, à Bornéo). C'est un parasite habituel des singes (macaques), genres *Presbytis* et *Macaca* (*M. mulata*, *M. fascicularis*, *M. nemestrina*) vivant dans la canopée. Des études récentes ont décrit des cas de paludisme à *P. knowlesi* chez l'Homme et son expansion de plus en plus en Asie du Sud-Est(30). Il est transmis par un moustique *Anophèles* de forêt : *A. leucosphyrus*. Ce vecteur pique surtout le singe, mais peut aussi prendre son repas sanguin chez l'homme. *Plasmodium knowlesi* est morphologiquement proche de *P. malariae*. Il se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24 heures responsable d'une fièvre quotidienne.

Il existe de rares formes graves, voire mortelles, avec de fortes parasitémies. A ce jour aucune chimiorésistance n'a été observée pour cette espèce (21).

### **3.3. Cycle biologique de Plasmodium :**

#### **Schizogonie hépatique ou extra-érythrocytaire**

Le cycle de vie des parasites du paludisme chez l'homme et les autres primates commence lorsqu'un moustique anophèle femelle injecte des sporozoïtes dans l'hôte lors d'un repas sanguin(31). Ces parasites sont transportés par la circulation sanguine vers le foie, où ils envahissent les hépatocytes, subissent une multiplication asexuée et se transforment en schizontes.

#### **Schizogonie érythrocytaire**

Les schizontes hépatiques qui se rompent libèrent des milliers de mérozoïtes qui envahissent les érythrocytes pour poursuivre leur développement. À l'intérieur de l'érythrocyte, le mérozoïte se développe en une forme d'anneau ou de trophozoïte précoce, qui se développe à son tour en un trophozoïte mature qui subit une multiplication asexuée pour former un schizonte contenant de nombreux mérozoïtes. Le schizonte érythrocytaire se rompt, libérant des mérozoïtes qui envahissent les érythrocytes, complétant ainsi le cycle érythrocytaire. Certains mérozoïtes se développent également à l'intérieur des érythrocytes en gamétocytes mâles et femelles, qui sont absorbés lors d'un repas sanguin par les moustiques anophèles femelles, dans lesquels ils continuent leur développement.

Il n'y a pas de signes et de symptômes cliniques lorsque les parasites du paludisme se développent dans le foie. Ils sont liés au cycle des parasites dans les érythrocytes. La durée du cycle érythrocytaire dépend de l'espèce de *Plasmodium* : *P. knowlesi* a le cycle le plus court, environ 24 heures, tandis que pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, il est d'environ 48 heures, et pour *P. malariae*, il est de 72 heures(31). Par conséquent, en l'absence de traitement, le nombre de parasites ou la parasitémie continuera à augmenter environ toutes les 24, 48 ou 72 heures, selon l'espèce de *Plasmodium*. Dans les infections synchrones de clones uniques, en particulier pour *P. knowlesi*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*, il y a un pic de fièvre qui se produit après la libération des mérozoïtes par la rupture des schizontes, ce qui donne lieu à des schémas de fièvre quotidiens, terriens ou quarantennaux. Cependant, les schémas de fièvre peuvent être quotidiens et ne pas être à ces intervalles réguliers pour toutes les espèces de *Plasmodium* au début de l'infection et également dans les cas où des espèces mixtes ou plus d'une couvée de parasites est présente(32,33).

### Sporogonie ou multiplication sexuée (Chez le moustique) :

Lors de son repas sanguin chez un sujet infecté, le moustique ingère les gamétocytes mâles et femelles du *Plasmodium* qui sont non infectieux pour lui. Une fois dans l'intestin du moustique, les gamétocytes se différencient rapidement en gamètes mâles microgamètes flagellés mobiles et femelles (macro-gamètes immobiles). La fertilisation du macro-gamète par un microgamète pour donner un zygote est réalisée dans les quinze minutes suivant l'exflagellation. Ce zygote évolue en ookinète mobile qui traverse la paroi de l'estomac du moustique et forme sur sa face externe un oocyste. Ce dernier se développe en quelques jours et donne des nombreux sporozoïtes. Ces sporozoïtes migrent alors jusqu'à la cavité sécrétoire et finalement arrive au conduit salivaire(34). Ils sont alors prêts à être injectés à l'homme au prochain repas sanguin.

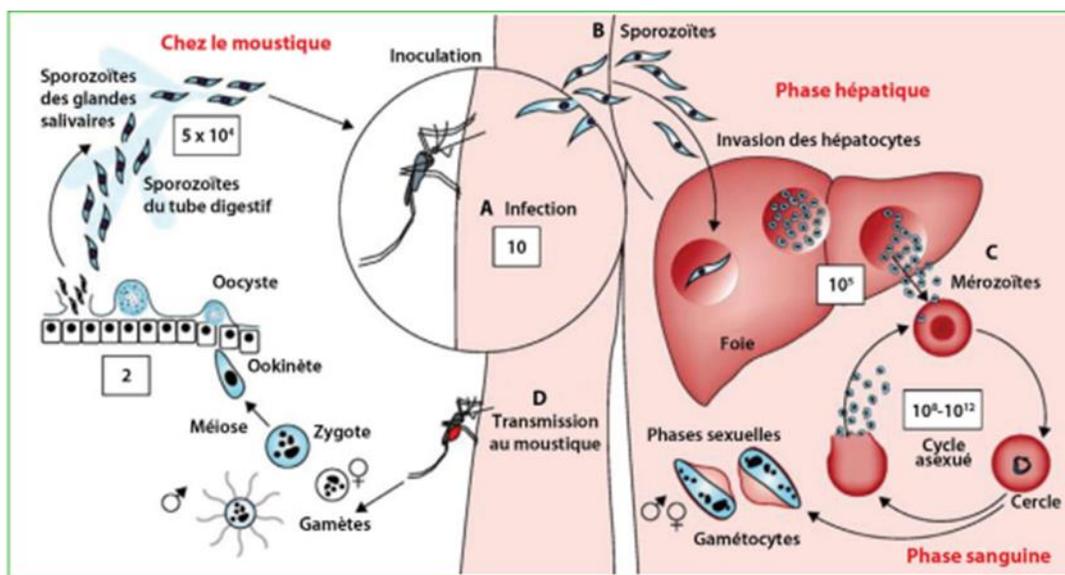


Figure 1 : Cycle de vie *Plasmodium falciparum* (35).

### 3.4. Physiopathologie :

Malgré le nombre de cas de paludisme et en dépit des modèles expérimentaux améliorés (culture *in vitro*, biologie moléculaire) la physiopathologie du paludisme demeure toujours mal élucidée bien que son impact dans certains organes ait été clairement défini. Elle peut être divisée en accès palustre non compliqué et en neuropaludisme.

#### 3.4.1. Accès palustre non compliqué :

Au niveau du sang, les hématies sont détruites par les trophozoïtes, libérant ainsi les pigments malariques appelés hémozoïnes. Quand la densité parasitaire atteint un certain seuil, l'hémozoïne

libérée agit sur le centre bulbaire de la thermorégulation provoquant ainsi la fièvre. Lorsque chez le malade le cycle endoérythrocytaire de *P. falciparum* se synchronise progressivement, la libération des pigments malariques est régulièrement répétée, ce phénomène confère ainsi à l'accès palustre sa périodicité. L'hépatomégalie et la splénomégalie surviennent suite à une hyperactivité du système des phagocytes mononuclés chargés de débarrasser l'organisme des pigments malariques et des débris érythrocytaires (36).

### **3.4.2. Neuropaludisme :**

La séquestration des formes matures de *P. falciparum* au niveau du cerveau et d'autres organes tels que le cœur, les poumons, les reins, la rate et le placenta (37), explique en partie la gravité du paludisme. Cette séquestration se fait après interaction entre la protéine 1 de la membrane érythrocytaire appelée PfEMP1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein1) et les différents récepteurs présents à la surface de l'endothélium vasculaire. Ce phénomène est appelé cytoadhérence des globules rouges parasités. Cependant d'autres hypothèses ont été évoquées pour expliquer la physiopathologie du paludisme grave.

- Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$
- Augmentation de la perméabilité de la barrière méningée entraînant une fuite du liquide céphalorachidien et un œdème cérébral.
- Coagulation intra-vasculaire disséminée.
- Phénomène immuno-pathologique avec dépôt de complexes immuns.

Quel que soit le mécanisme, le ralentissement du flux capillaire intracérébral provoque l'anoxie, voire tardivement une ischémie responsable d'une hémorragie péri-vasculaire et de lésion de la substance blanche qui ne sont pas sans séquelles.

### **3.5. Manifestations cliniques :**

Les manifestations cliniques du paludisme sont exclusivement liées à la schizogonie endo-érythrocytaire. Les principaux signes comprennent la fièvre, l'anémie et le sub-ictère sont dus à l'éclatement des hématies et des rosaces avec libération du pigment malarique. L'expression et la gravité de la maladie varient selon l'espèce et l'état de prémunition de l'individu. Les différentes formes cliniques sont notamment, le paludisme simple y compris la primo-invasion et l'accès de reviviscence, le paludisme grave (l'accès pernicieux ou neuropaludisme, l'anémie sévère...), le paludisme viscéral évolutif et la fièvre bilieuse hémoglobinurique (38).

#### **3.5.1. Paludisme simple :**

- **L'accès de primo-invasion :**

Il est caractérisé par une fièvre allant de 39°C à 40°C, des frissons et sueurs qui s'accompagnent de myalgie et de céphalée brutale. Cette fièvre diminue d'intensité après quelque temps. Ces signes sont souvent associés à des troubles digestifs de type « embarras gastrique » (nausées, vomissements et/ou diarrhées). Les signes traduisant l'hémolyse apparaissent souvent de façon différée : pâleur, sub-ictère, hépato-splénomégalie (39).

- **Accès de reviviscence :**

Les rechutes sont dues à la réactivation des formes dormantes hépatique appelées hypnozoïtes. Ce phénomène est observé avec *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*.

#### **3.5.2. Paludisme viscéral évolutif :**

Il survient chez les sujets jeunes vivant en zone endémique, peu ou non prémunis. La splénomégalie en est le signe majeur associée à une hépatomégalie. Les signes généraux (fébricule intermittente, asthénie, amaigrissement) et d'anémie (pâleur, ictère) sont très variables, allant d'une forme pauci symptomatique à une forme qui pourrait se confondre avec une leucémie.

### 3.5.3. La fièvre bilieuse hémoglobinurique :

La fièvre bilieuse hémoglobinurique est une réaction immuno-allergique grave qui survient chez les sujets qui se soumettent irrégulièrement à des traitements ou probablement une prophylaxie aux sels de quinine(40,41). En outre, la fièvre bilieuse hémoglobinurique a été rapportée après l'administration de l'halofantrine (42,43). Le début est brutal avec une hémolyse massive intra vasculaire chez le patient après un traitement aux sels de quinine. La symptomatologie est essentiellement rénale et allergique. La douleur est très intense en barre autour de la ceinture pelvienne. Les rares urines émises sont particulièrement rouges et foncées. Cette forme nécessite une réanimation avec un pronostic vitale engagé.

### 3.5.4. Le neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées :

C'est le paludisme des sujets non immun (nourrisson, femme enceinte, jeune enfant, les migrants venant d'une zone non impaludée et les sujets neufs). Ces formes sont majoritairement causées par *P. falciparum*, toutefois, les formes sévères du paludisme à *P. vivax* ont été rapportées. A l'absence d'un traitement adéquat, ces formes graves peuvent conduire à la mort au bout de 72 heures.

L'OMS a établi des critères qui, isolés ou associés, font poser le diagnostic du paludisme grave(44).

Il s'agit de la présence des formes asexuées de *Plasmodium sp* dans le sang associé à l'un des signes suivants :

- ❖ Neuropaludisme : Score de Blantyre  $\leq 2$  ou score de Glasgow  $\leq 9$ .
- ❖ Troubles de la conscience : Score de Blantyre  $< 5$  et  $> 2$  ou score de Glasgow  $< 15$  ou  $> 9$ .
- ❖ Convulsions répétées  $>1 /24$  heures.
- ❖ Prostration : extrême faiblesse (incapacité de se tenir droit).
- ❖ Vomissements itératifs.
- ❖ Syndrome de détresse respiratoire.
- ❖ Ictère clinique.
- ❖ Acidose métabolique : bicarbonates plasmatiques  $<15$  mmol/L.
- ❖ Lactatémie  $\geq 5$  mmol/L.
- ❖ Anémie grave (Hb  $< 5$ g/dl, Ht  $<15\%$ ).
- ❖ Hyperparasitémie  $\geq 4\%$  chez le sujet non immun, ou  $\geq 20\%$  chez le sujet immun.

- ❖ Hypoglycémie (glycémie < 2,2 mmol/L).
- ❖ Hémoglobinurie macroscopique.
- ❖ Insuffisance rénale : diurèse < 400 ml/ 24h ou créatinémie > 265µM chez l'adulte ; diurèse < 12 ml/ kg/ 24h ou créatinémie élevée pour l'âge chez l'enfant.
- ❖ Collapsus circulatoire : Tension Artérielle Systolique < 50 mmHg avant 5 ans, TAS < 80 mmHg après 5 ans.
- ❖ Hémorragie anormale.
- ❖ Œdème pulmonaire (radiologique).

### 3.6. Diagnostic biologique du paludisme :

Le diagnostic biologique du paludisme passe par la mise en évidence **direct** du parasite et **indirect** des éléments du parasite dans le sang. La confirmation du diagnostic clinique par un examen biologique permet de réduire l'utilisation des antipaludiques dans le traitement non justifié pour des fièvres non palustres(45). En effet la mise en œuvre des programmes de lutte contre le paludisme intègre la recherche d'un diagnostic précoce et d'un traitement efficace. Le diagnostic du paludisme comprend les techniques **de diagnostic indirect et direct** :

#### 3.6.1. Diagnostic direct :

Le diagnostic direct repose sur l'identification du *Plasmodium* dans le prélèvement sanguin par la microscopie, notamment par les techniques de la goutte épaisse (GE) et du frottis mince (FM) (46).

- **La goutte épaisse** : est la technique de référence (47) pour le diagnostic biologique du paludisme. Elle est une technique de concentration qui consiste à étaler environ 10ul de sang dans un diamètre d'environ 1 cm au milieu d'une lame porte objet. Après séchage, la lame est colorée avec une solution du GIEMSA à 3% ou 10% pendant 45 minutes ou 20 minutes respectivement. La lecture est faite au microscope optique à l'objectif 100 en immersion. Ainsi le noyau du *Plasmodium* est coloré au rouge vif et le cytoplasme en bleu. Elle a une sensibilité de 10 à 20 parasites / ul de sang.
- **Le frottis mince** : consiste à faire un étalement fin d'une goutte d'environ 5ul de sang sur une lame porte objet. Le frottis est ensuite fixé au méthanol, séché et coloré avec une solution de May-Grünwald-Giemsa ou de Giemsa. Après la coloration, la lame est séchée et la lecture se fait à l'objectif 100 en immersion. La technique du FM permet d'observer les parasites à l'intérieur des globules rouges infectés. Le FM a une sensibilité de 100 à 200 parasites /ul de sang

([campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/...](http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/)). Il permet d'établir le diagnostic d'espèce du Plasmodium.

- **Le Quantitative Buffy Coat (QBC) (32)** : le QBC est une technique qui utilise un fluorochrome (acridine orange) dans un tube capillaire (comme le tube hématocrite) dans lequel 55-110ul d'échantillon de sang à tester est ajouté. L'acridine orange s'attache aux acides nucléiques du parasite et colore le noyau en vert (ADN) et le cytoplasme en orange (ARN). Après centrifugation pendant cinq minutes, la lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les différents stades du parasite sont visibles dans la couche plaquettaire (gamétocytes) et la partie supérieure du culot globulaire (Schizontes, trophozoïtes et mérozoïtes). Le QBC est 5,5 fois plus sensible que la goutte épaisse et est à mesure de détecter précocement une infection à un seuil de 1 parasite/ ul de sang. Toutefois, compte tenu de sa lourdeur, cette technique est plus en plus abandonnée pour le diagnostic de routine. Elle ne permet pas de faire le diagnostic d'espèce de *Plasmodium*.

- **Autres techniques de diagnostic :**

- Les tests de diagnostic rapide (TDR) :**

Les TDRs sont des techniques immunochromatographiques qui ont comme principe la détection des protéines spécifiques des parasites (antigènes tel que HRP2, HRP3, ou enzymes telle que l'aldolase, la pLDH...) par chromatographie sur support solide. Certains tests permettent d'affirmer l'espèce de *Plasmodium*. Leur conservation et leur utilisation est facile. Ils sont très utiles dans les zones où le diagnostic microscopique n'est pas disponible. Ils ont une sensibilité de 200 parasites/ul de sang.

- Les méthodes moléculaires :**

Le diagnostic du paludisme est de plus en plus révolutionné par diverses techniques moléculaires. Il s'agit notamment de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui permet de détecter une infection a *Plasmodium sp* avec une sensibilité et une spécificité d'environ 100%. En plus de la PCR conventionnelle et la PCR quantitative à temps réel (qPCR), la technique LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) permet d'établir le diagnostic du paludisme de façon précise.

### **3.6.2. Diagnostic indirect :**

Les techniques de diagnostic indirect consistent à rechercher les anticorps dirigés contre les antigènes du *Plasmodium* dans le sérum de l'hôte. Elles sont indicatives d'une infection antérieure (persistance des anticorps même après l'infection) et sont par conséquent sans valeur diagnostique réelle dans les zones d'endémie palustre. Parmi ces techniques on peut citer : l'immunofluorescence indirecte, l'hémagglutination passive et le test Elisa (48) (49).

### **3.6.3. Diagnostic différentiel de l'espèce *Plasmodium malariae* :**

Le diagnostic des espèces de *Plasmodium* peut s'établir avec certitude par la microscopie du frottis mince et la méthode moléculaire.

#### **- Diagnostic de *P. malariae* à la microscopie :**

A la microscopie du frottis mince les trophozoïtes de *P. malariae* remplissent le globule rouge qu'ils infectent sans le déformer. Les granulations sont absentes sauf en cas d'une coloration intense et se présentent parfois sous forme de bande équatoriale dans l'hématie (50). Les trophozoïtes apparaissent compacts avec un cytoplasme régulier dense contenant des pigments abondants de nuance jaune (pigments malariques) chez les formes âgées. Le schizonte mature avec un reflet jaune dû au pigment malarique contient 6 à 12 noyaux qui s'individualisent en mérozoïtes chacun. Il est souvent difficile de distinguer les gamétocytes matures des trophozoïtes âgés. Les gamétocytes matures ont une forme ronde avec des pigments dispersés en gros grains très souvent répartis à la périphérie.

#### **-Diagnostic moléculaire de *P. malariae* :**

Le diagnostic moléculaire de *P. malariae* peut s'établir de façon spécifique et très précise par la PCR conventionnelle ou la qPCR. Les méthodes moléculaires permettent d'identifier les espèces plasmodiales avec une sensibilité de 100% (51).

Elle est réalisée à l'aide des amorces décrites par Fuehrer et collaborateurs utilisant la méthode de double PCR pour le diagnostic du genre suivi d'une simple PCR spécifique à l'espèce *P. malariae*.

### 3.7. Culture de Plasmodium :

La culture continue de *P. falciparum* est souvent considérée comme un moyen de parvenir à une fin, cette fin étant de sonder la biologie du parasite en question, et finalement la découverte de médicaments contre le paludisme. La culture est une exigence fondamentale pour la recherche sur le paludisme lorsque les objectifs principaux utilisent des parasites à des stades viables du cycle de vie. *P. falciparum* est la seule espèce pour laquelle la culture de tous les stades du cycle de vie ont été établies(52) pour permettre tous les aspects de la recherche tels que le criblage des médicaments.

Les efforts de culture *in vitro* de *Plasmodium* sont compliqués car chaque espèce de *Plasmodium* a son propre cycle de vie et son propre ensemble de paramètres physiologiques, métaboliques et nutritionnels(53). Comme alternative à la culture *in vitro* continue, une culture *ex vivo* soutenant des recherches importantes telles que les tests de sensibilité aux médicaments, a également été développée. Les cultures *ex vivo* sont développées en utilisant des isolats de *Plasmodium* fraîchement récoltés sur le terrain ou cryopréservés, qui subissent des modifications dans certains cas une fois en culture et compliquent ainsi la poursuite de recherches précises sur cette espèce cultivée *ex vivo*. Ainsi, il devient difficile d'étudier un stade spécifique, si les parasites cultivés *ex vivo* ne se développent pas correctement. Des tentatives inlassables ont toutefois permis de mettre au point des méthodes de culture *ex vivo* améliorées pour la deuxième espèce la plus répandue, *P. vivax*(54). Elle était un grand problème car cette espèce n'infecte que les globules rouges jeunes. Cette culture *ex vivo* fournit actuellement des données utiles sur *P.vivax*, telles que sa sensibilité aux médicaments antipaludiques(54,55), sa pathobiologie et ses mécanismes d'invasion(56).

Alors que les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine ont permis de réduire de manière significative la transmission, la morbidité et la mortalité de *P. falciparum*, la prolifération et la transmission persistante de *P. malariae* sont largement signalées(57,58). *P. malariae* est très répandue dans les régions où le paludisme est endémique, comme l'Amazonie(57) et l'Afrique subsaharienne(58–60). *P. malariae* peut provoquer une infection chronique potentiellement mortelle, une anémie grave comme décrite chez *falciparum* qui est le plus mortel, avec un impact socio-économique négatif important(61,62). En 2021, Dembélé Laurent et collaborateurs ont mis au point une méthode de culture pour contribuer au dépistage de nouveaux médicaments antipaludiques contre *P. malariae* et permettre d'étudier et de comprendre sa biologie, comme son mécanisme d'invasion et ses marqueurs de résistance aux médicaments (63).

### **3.8. Analyse des isobogrammes :**

L'analyse des isobogrammes aussi connue sous le nom de méthode des contours est une méthode classique utilisée dans des essais de la détermination des interactions médicamenteuses. En 1953 Leowe propose l'analyse issue des isobogrammes, Gessner et al (1970) sur la combinaison d'éthanol et d'hydrate de choral à cette époque leurs résultats n'ont pas attiré l'attention avant l'année 1992. L'application du modèle d'additivité de Leowe en 1992 à l'ajustement de ED<sub>50</sub> et de leurs intervalles de confiance 95% et de leurs variances par les chercheurs (Fei et Jisheng 1998) et à la méthode d'analyse graphique des contours la plus utilisée aujourd'hui a montré que cette méthode est désormais largement utilisée dans les expériences pharmacologiques et les pratique clinique (64).

- **Principe d'analyse des isobogrammes :**

Le principe de cette méthode est de satisfaire la relation dose-effet, et la valeur ED<sub>50</sub> est généralement calculée à l'aide des méthodes de Dixon-Mood (Yingxiu et al., 2014 ; Wenkai et al., 2016) et de probit (Xuejun et al., 2016 ; Hongxin et al., 2017 ; Hongwei et al., 2018) (64).

- **Cytométrie en flux**

La cytométrie en flux est une technologie qui permet de mesurer simultanément puis d'analyser de multiples caractéristiques physiques de particules uniques, généralement des cellules, lorsqu'elles s'écoulent dans un flux de fluide à travers un faisceau de lumière(65).

➤ **Principe et Fonctionnement**

Les cytomètres en flux utilisent des lasers comme sources de lumière pour produire des signaux lumineux diffusés et fluorescents qui sont lus par des détecteurs tels que des photodiodes ou des tubes photomultiplicateurs(66).

Il est composé de trois systèmes principaux : fluide, optique et électronique.

- Le système fluide transporte les particules dans un flux vers le faisceau laser pour l'interrogation.
- Le système optique se compose de lasers pour éclairer les particules dans le flux d'échantillons et de filtres optiques pour diriger les signaux lumineux résultants vers le système d'analyse et de filtres optiques pour diriger les signaux lumineux résultants vers les détecteurs appropriés.

- Le système électronique convertit les signaux lumineux détectés en signaux électroniques qui peuvent être traités par l'ordinateur.

Pour certains instruments équipés d'une fonction triage, le système électronique est également capable d'initier des décisions de triage pour charger et dévier les particules.

Dans le cytométrie en flux, les particules sont transportées vers l'interception du laser dans un flux de fluide. Toute particule ou cellule en suspension d'une taille comprise entre 0,2 et 150 micromètres peut être analysée.

Les cellules provenant de tissus solides doivent être désagrégées avant l'analyse. La partie du flux de fluide où se trouvent les particules s'appelle le noyau de l'échantillon. Lorsque les particules passent à travers l'intercepteur laser, elles diffusent la lumière laser. Toute molécule fluorescente présente sur la particule deviennent fluorescents. La lumière diffusée et fluorescente est collectée par des lentilles positionnées de manière appropriée. Une combinaison de séparateurs de faisceaux et de filtres dirige la lumière diffusée et fluorescente vers les détecteurs appropriés.

Les détecteurs produisent des signaux électroniques proportionnels aux signaux optiques qui les frappent.

Des données en mode liste sont collectées pour chaque particule ou événement. Les caractéristiques ou paramètres de chaque événement sont basés sur ses propriétés de diffusion.

Les données sont collectées et stockées dans l'ordinateur(65).

➤ Application

La cytométrie en flux est un outil puissant qui a des applications dans de multiples disciplines telles que :

- Immunologie,
- Biologie moléculaire,
- Virologie,
- surveillance des maladies infectieuses,
- Biologie du cancer,
- Tri des cellules (67)...

➤ Interprétation d'un résultat de cytométrie en flux Analyse des cellules en fonction de deux paramètres :

Ces paramètres peuvent être soit la taille, granulosité, des couleurs.

FL1-H mesure la quantité d'ADN parasitaire permettant de voir que les globules rouges parasités. La granulosité de tous les globules rouges parasités et non parasité est visualisé par FSC-H. La viabilité du parasite est mesurée à la FL4-H en utilisant un marquage des mitochondries avec un Mitotracker rouge vif. Ainsi les deux fenêtres (F1, F2) contiennent des globules rouges parasités (GRP) et non parasités alors que les deux fenêtres (F3, F4) ne contiennent que globules rouges non parasités et peuvent représenter le control négatif de l'invasion, infection et développent parasitaire.

### **3.9. Les stratégies de lutte contre le paludisme :**

#### **3.9.1. Traitement curatif :**

Les nouvelles recommandations de l'OMS pour la prise en charge des cas du paludisme, notamment les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTAs) contre le paludisme non compliqué artemether-lumefantrine (AL), artesunate-amodiaquine (AS+AQ), artesunate-mefloquine (ASMQ), dihydroartémisinin-piperaquine (DHAP), artesunate + sulfadoxine-pyriméthamine (AS+SP), artesunate-pyronaridine (ASPY))(68) chaque fois que la voie orale reste possible. L'artésunate, l'arthéméter et la quinine tous utilisés par voie parentérale sont les molécules de choix pour le traitement des cas de paludisme grave. Également, les formes suppositoires de l'artésunate se sont avérées utiles pour le traitement pré-transfert des cas de paludisme grave et compliqué. Le gouvernement du Mali s'est engagé à assurer gratuitement le traitement de l'accès palustre chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. Pyronaridine-artesunate et dihydroartémisinin-piperaquine sont potentiellement utiles pour la diversification des CTA dans cette politique en Afrique, mais des données supplémentaires sur l'innocuité et l'efficacité sont nécessaires sur ces agents de traitement du paludisme. Aussi, la primaquine et la récente tafenoquine sont utilisées pour le traitement prophylactique et radical de *P. vivax* et *P. ovale* de même contre les formes sexuées du parasite pour bloquer la transmission (69) (70).

#### **3.9.2. Les mesures préventives :**

La prévention du paludisme pendant la grossesse, la chimio prévention du paludisme saisonnier et la lutte anti-vectorielle (LAV) constituent les axes principaux de la lutte préventive contre le

paludisme. Un vaccin efficace contre le paludisme serait également un outil majeur dans la lutte et l'éradication de cette maladie dans le monde.

### **La prévention du paludisme pendant la grossesse :**

Le traitement préventif intermittent (TPI) avec la Sulfadoxine + Pyriméthamine est recommandé pour prévenir le paludisme pendant la grossesse. Ce traitement est administré à raison d'une dose mensuelle entre le 4ème et le 8ème mois de la grossesse. Chaque dose est composée d'une prise unique de 3 comprimés de Sulfadoxine (500mg) +Pyriméthamine (25mg) chacun.

### **La chimio prévention du paludisme saisonnier :**

La chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) est une nouvelle stratégie de prévention du paludisme chez les enfants de 1-5ans basée sur l'administration d'une dose curative de Sulfadoxine-Pyriméthamine + amodiaquine (SPAQ) chaque mois pendant la saison de transmission. Elle est adoptée pour des zones où le paludisme est saisonnier avec une transmission pendant trois ou quatre mois de l'année. Cette CPS concerne les pays (en majorité sahélo-saharien de l'Afrique) qui répondent à ces critères et pour lesquels la SP et l'AQ conservent leur efficacité contre *P. falciparum*.

### **La lutte anti-vectorielle :**

Le Mali a adopté les méthodes de lutte anti-vectorielle pouvant être utilisées au niveau individuel et communautaire pour protéger contre les piqûres de moustiques. Il s'agit de :

La promotion des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée de rémanence par la distribution gratuite à travers :

- La consultation prénatale pour la protection des femmes enceintes (CPN+).
- Le programme élargi de vaccination pour la protection des enfants de moins de 1 an (PEV+).
- La promotion de moustiquaires imprégnées d'insecticide à travers le circuit commercial pour la population générale.
- Le traitement ciblé des gîtes larvaires.
- La pulvérisation intra-domiciliaire avec pour objectif de réduire la population de moustique.
- La promotion de l'hygiène et de l'assainissement.

## Vaccin :

Un vaccin efficace contre le paludisme serait le meilleur outil pour pallier aux phénomènes de résistance contre les médicaments et surtout d'éradiquer le paludisme.

De nombreux candidats vaccins sont en l'étude. Malgré la réalisation de plusieurs essais vaccinaux, aucun vaccin d'excellents résultats de protection n'a été mis sur le marché. Par contre, on compte un candidat vaccin en phase III des essais cliniques depuis 2012, il est actif sur les formes pré-érythrocytaires. Le développement d'un vaccin contre le paludisme est entravé par des difficultés telles que la complexité du parasite et de son cycle de vie, une très grande variation antigénique et une compréhension limitée des interactions entre *P. falciparum* et le système immunitaire de l'hôte humain.

Dans l'infection par *P. falciparum*, le développement d'un vaccin est possible parce que l'infection induit une immunité clinique. Dans les zones hyper-endémiques à *P. falciparum*, l'immunité contre le paludisme sévère est acquise dès la petite enfance, alors que l'immunité contre une maladie bénigne n'est pas acquise avant la fin de l'adolescence (71). Différents vaccins contre le paludisme sont testés chez l'homme. Ainsi, quatre catégories de vaccins sont en phase d'essai contre le paludisme : des vaccins anti- stade pré-érythrocytaire, des vaccins anti-stade, des vaccins bloquant la transmission, des vaccins bloquant la cytoadhérence des hématies parasitées (71).

Après des décennies de recherche, un vaccin contre le paludisme (**RTS, S/AS01**) a reçu un avis positif de l'agence européenne des médicaments en vertu de l'article 58 en 2015 ; cependant, il n'est que modérément efficace et son avenir est incertain. Son introduction ne devrait pas diminuer la demande en médicaments antipaludiques(72).

### 3.10. Les antipaludiques :

Bref résumé sur la classification des antipaludiques. On distingue :

❖ Les schizontocides : ils sont actifs sur les schizontes mais inactifs sur les gamétocytes. Ils sont curatifs des accès palustres, mais n'empêchent pas la transmission de la maladie. Ils comprennent : la quinine, les amino-4 quinoléines, les biguanides et dérivés, les diaminopyrimidines et les sulfamides.

En plus de l'activité schizontocide, l'artémisinine et dérivés sont actifs préférentiellement sur les formes anneaux jeunes 'Ring stages'(73).

❖ Les gamétocytocides : ils n'ont pas d'action forte sur les schizontes mais ont un intérêt sur le plan collectif car ils peuvent empêcher la transmission. Ils comprennent les amino-8 quinoléines

❖ D'autre part, certains antibiotiques appartenant à la famille des tétracyclines (Doxycycline) ou des macrolides (érythromycine) utilisés en association avec les schizontocides (en général la quinine) permettent de renforcer l'activité antipaludique.

**Tableau I : Résumé des médicaments antipaludiques courants**

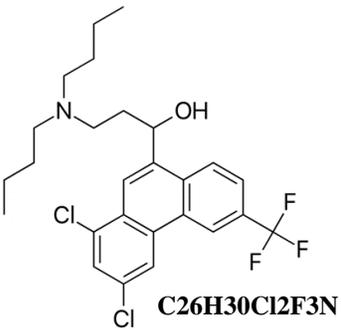
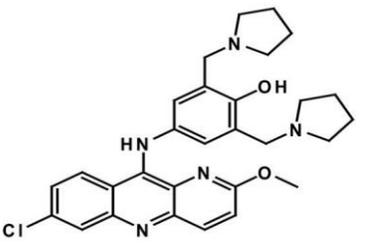
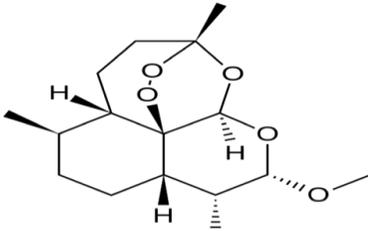
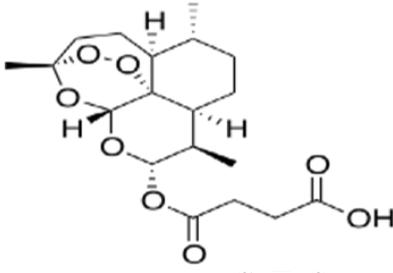
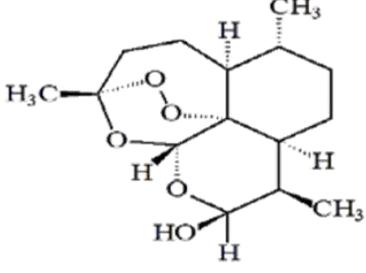
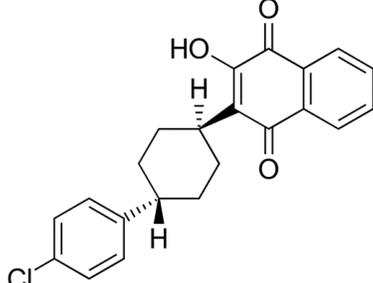
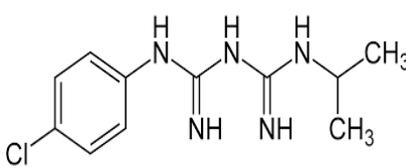
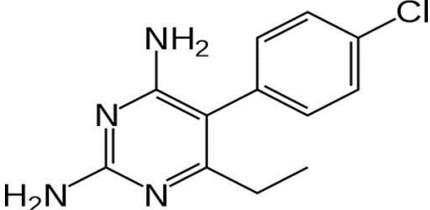
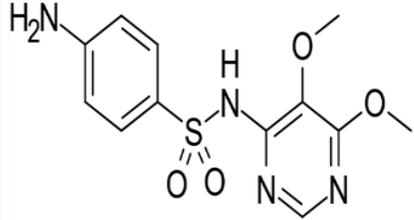
Classe	Catégorie	Médicament (année de développement)	Utilisation thérapeutique	Effets secondaire	Mécanisme d'action	Réf
Dérive de la quinoléine	Alcaloïde de quinquina	Quinine et Quinidine (1820)	Traitement de <i>P. falciparum</i> et du Paludisme grave	Hypoglycémie Cichonsime (acouphènes, surdité, troubles visuels, maux de tête, dysphorie, nausées, vomissements), hypotension	Le mécanisme d'action de ces antipaludiques en grande majorité n'est clairement élucidé. Mécanisme de détoxification de l'hème du parasite bloque et le cycle au niveau des mérozoïtes. Inhibition des transporteurs exocytose et la dégradation de l'hémoglobine à partir des vacuoles digestives du parasite.	(74)
	4-aminoquinoline	Chloroquine (1940)	Pour les cas de paludisme non <i>falciparum</i>	S'accablent dans la rétine et la mélanine		(75)
		Amodiaquine (1948)	Médicament partenaire d'CTA	Hépatite, myélotoxi-ville, agranulocytose		(76)
		Piperaquine (1960)	Médicament partenaire d'CTA avec Dihydroartemisinine + Piperaquine	Maux de tête légers, vertiges, nausées, douleurs abdominales, vomissements		(77)
	8-Aminoquinoline	Primaquine (1950)	Guérison radicale et prophylaxie De <i>P. vivax</i> et <i>P. ovale</i> ; gamétocytocide pour <i>P. falciparum</i>	Anémie hémolytique en cas de déficit en G6PD		(78)
		Tafenoquine (1978)	Guérison radicale et prophylaxie de <i>P. vivax</i> et <i>P. ovale</i> ; Gamétocytocide pour <i>P. falciparum</i>			
	Quinoline-methanol	Mefloquine (1970)	Prophylaxie et médicament partenaire des CTA pour traiter <i>P. falciparum</i>	Dépression, psychose, cauchemars		(79)
	Aryl amino alcool	Lumefantrine (1976)	Combinaison avec l'artéméther dans les CTA	Maux de tête, anorexie, vertiges et asthénie avec l'artéméther		(80)
		Halofantrine (1980)	TX du paludisme <i>P. falciparum</i>	Toxicité cardiaque		

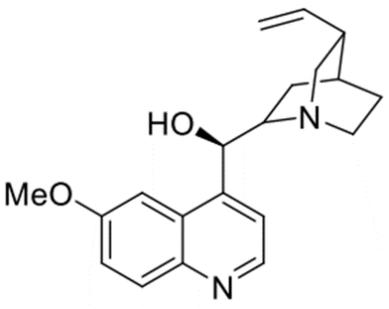
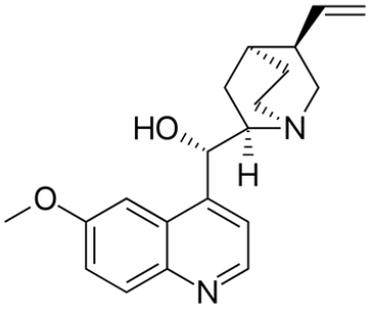
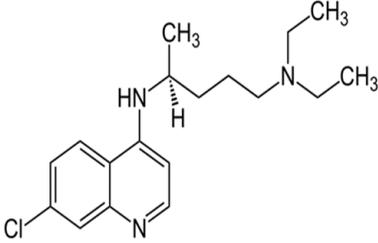
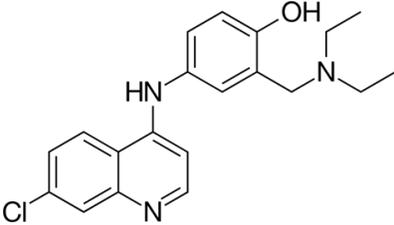
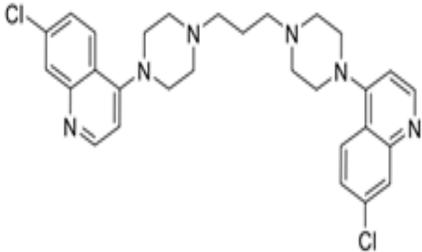
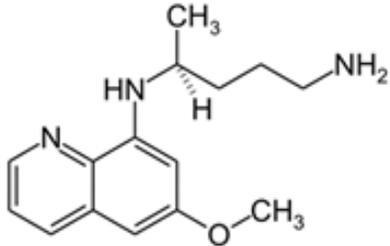
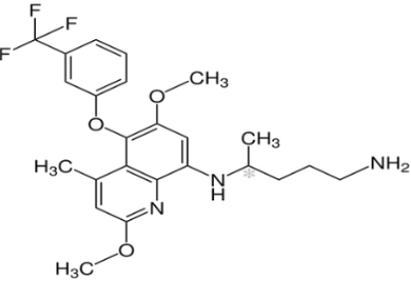
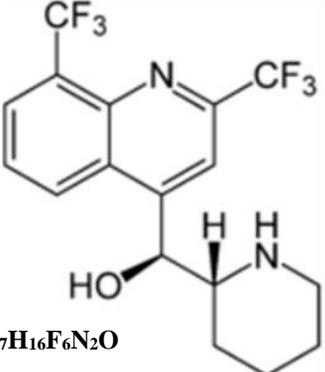
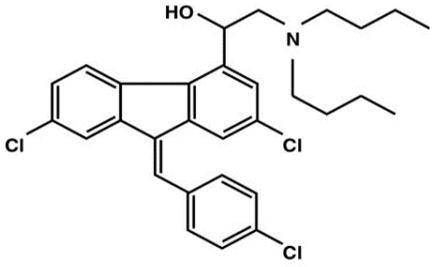
	Dérive Benzonaphthyridine	Pyronaridine (1970)	Combinaison avec l'artésunate comme CTA	Douleurs abdominales, vomissements, maux de tête, vertiges, perte d'appétit, palpitations et changements modifications transitoires de l'ECG, mais sans gravité.	Inhibiteur de la formation de l'hémozoïne : topoisomérase II de l'ADN niveau de la vacuole digestive en inhibant la bio cristallisation de l'hème.	(81)
--	---------------------------	---------------------	---	--	--	------

Artémisinine	Sesquiterpène lactone endoperoxydes	Artéméther	Combinaison avec l'artéméther dans les CTA	Excellent profil de sécurité à long terme peut provoquer des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, des démangeaisons et des fièvre	Le pont peroxyde intra-moléculaire, en présence du fer (Fe) ferreux de l'hème de l'hémoglobine, donnant des radicaux libres qui détruisent le parasite.	(82)
		Artésunate	CTA ; traitement du paludisme grave			
		Dihydroarthemisine	Paludisme résistant à la chloroquine, <i>P. falciparum</i> compliqué Paludisme cérébral			
	Napthoquinone	Atovaquone (1991)	Combiné au Proguanil pour traiter <i>P.falciparum</i>	Diarrhée, vomissements, maux de tête, éruptions cutanées, fièvre	Inhibiteur d'électrons ubiquinones du cytochrome bc1. Cette inhibition provoque une perte du potentiel membranaire de la mitochondrie qui entraîne une inhibition de la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP).	(83)
Anti folate	Diaminopyrimidine	Pyriméthamine (1950)	Utilisé uniquement en combinaison avec un sulfamide ou la dapsone pour le traitement du <i>P. falciparum</i>	Nausées et éruptions cutanées anémie mégaloblastique et granulocytopenie	le blocage de la synthèse de l'acide dihydrofolique, indispensable à l'édification de l'ADN de l'hématozoaire mais leur action est lente.	(84)
	Sulfonamides	Sulfadoxine (1960)	L'utilisation est limitée au traitement ponctuel de <i>P. falciparum</i> non compliqué résistant aux	Dermatite exfoliatrice, syndrome de Stevens-Johnson		

			CQ <i>P. falciparum</i>			
	Biguanide	Proguanil (Chloroguanide) (1945)	Traitement des parasites résistants à la chloroquine ; associer avec de l'artésunate comme CTA	Alopécie, ulcération aphteuse, nausées et irritation gastrique	Inhibiteur d'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique en se liant à la dihydrofolate réductase (DHFR).	
Antibiotiques	Tétracycline	Doxycycline et Tétracycline	Combiné à la quinine pour traiter <i>P. falciparum</i> lorsque la résistance à la quinine	Toxicité cutanée et gastro-intestinale	Inhibiteur de la sous-unité ribosomale 30S.	(85)
	Lincisamide	Clindamycine	Associe à la quinine dans le traitement du paludisme non compliqué à <i>P. falciparum</i>		Inhibiteur de la sous-unité ribosomale 50S provoquant une inhibition de la synthèse de peptides.	(86)
	Macrolide	Azithromycine				

**Tableau II** : Structure chimique des antipaludiques courants.

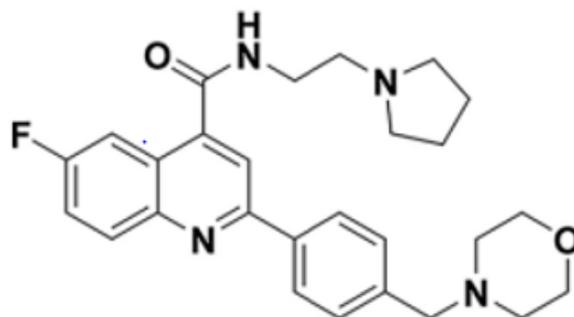
 <p><b>C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N</b></p>	 <p><b>C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub></b></p>	 <p><b>C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub></b></p>
<p>Halofantrine : 3-(dibutylamino)-1-[1,3-dichloro-6-(trifluorométhyl)-9-phenanthrenyl]-1-propanol.</p>	<p>Pyronaridyne : 4-[(7-chloro-2-méthoxybenzo[b][1,5]naphthyridin-10-yl)amino]-2,6-bis[(pyrrolidin-1-yl)méthyl]phénol</p>	<p>Artémether : décahydro-10-méthoxy-3,6,9-triméthyl-3,12-époxy-12H-pyrano(4,3-j)-1,2-benzodioxépine.</p>
 <p><b>C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub></b></p>	 <p><b>C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub></b></p>	 <p><b>C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>ClO<sub>3</sub></b></p>
<p>Artésunate : octahydro-3,6,9-triméthyl-3,12-époxy-12H-pyrano[4,3-j]-1,2-benzodioxépin-10(3H)-one</p>	<p>Dihydroartemisinin : décahydro-3,6,9-triméthyl-3,12-époxy-12H-pyrano[4,3-j]-1,2-benzodioxépin-10-ol</p>	<p>Atovaquone : trans-2-[4-(4-chlorophényl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthalenedione</p>
 <p><b>C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub></b></p>	 <p><b>C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub></b></p>	 <p><b>C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S</b></p>
<p>Proguanil : 1-[amino-(4-chloroanilino)méthylidène]-2-propan-2-ylguanidine;hydrochloride</p>	<p>Pyriméthamine : 5-(4-chlorophényl)-6-éthyl-2,4-pyrimidinediamine</p>	<p>Sulfadoxine : 4-amino-N-(5,6-diméthoxypyrimidin-4-yl) benzène sulfonamide.</p>

 <p style="text-align: center;"><b>C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>3</sub></b></p>
<p>Quinine : (R)-[(2S,4S,5R)-5-ethenyl-1-azabicyclo[2.2.2]octan-2-yl]-(6-methoxyquinolin-4-yl)methanol</p>	<p>Quinidine : (S)-[(2R,4S,5R)-5-ethenyl-1-azabicyclo[2.2.2]octan-2-yl]-(6-methoxyquinolin-4-yl)methanol</p>	<p>Chloroquine : N-(7-chloroquinolin-4-yl) - N, N-diéthyl-pentane-1,4-diamine</p>
 <p style="text-align: center;"><b>C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>3</sub>O</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O</b></p>
<p>Amodiaquine : 4-[(7-chloroquinolin-4-yl) amino] - 2- [(diéthylamino) méthyl] phénol.</p>	<p>Piperaquine : 4,4'-(Pentamethylenedi-4,1-piperazinediyl)bis-7-chloroquinoline</p>	<p>Primaquine : N4-(6-méthoxyquinolin-8-yl) pentane-1,4-diamine</p>
 <p style="text-align: center;"><b>C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>F<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O</b></p>
<p>Tafenoquine : N-[2,6-diméthoxy-4-méthyl-5-[3-(trifluorométhyl) phénoxy] quinolin-8-yl] pentane-1,4-diamine</p>	<p>Mefloquine : [2,8-bis(trifluorométhyl)quinolin-4-yl]-piperidin-2-ylmethanol</p>	<p>Lumefantrine : 2-(dibutylamino)-1-[(9Z)-2,7-dichloro-9-[(4-chlorophenyl)méthylidène]fluorène-4-yl]éthanol</p>

### 3.10.1. La molécule antipaludique candidate :

#### □ M5717

Structure :



**Figure 2** : la structure chimique de M5717 (87).

Formule brute :  $C_{27}H_{31}FN_4O_2$ .

Nom chimique : 6-fluoro-2-[4-(morpholinyl-4-méthyl) phényl] -N-(2-pyrrolidinyl-1-éthyl) quinoline-4-carboxamide

Nom vernaculaire : Cabamique (89).

La cabamique ciblant le facteur 2 d'élongation de la traduction (eEF2), qui est responsable de la translocation dépendante du GTP (guanosine triphosphate) du ribosome le long de l'ARN messager, et qui est essentiel à la synthèse des protéines plus précisément chez *P. falciparum* (6). M5717 est actif sur tous les stades du cycle parasitaire (sauf le stade hépatique quiescent ou hypnozoïte de *P. vivax*). Par conséquent, ce composé pourrait potentiellement traiter et protéger les populations à risque. Une étude de Phase I a été menée en 2018 chez des volontaires sains. Au cours de cette étude, les sujets ont reçu d'abord un petit nombre de parasites sensibles au médicament par injection intraveineuse, et 8 jours plus tard, une dose de 800 mg de M5717 pour évaluer son activité sur le stade sanguin (étude VIS). Les résultats montrent que le composé était bien toléré et que les parasites avaient été complètement éliminés du sang. La prochaine étape du développement de M5717 sera de réaliser une autre étude chez des volontaires sains pour évaluer son activité prophylactique chez l'homme. Parallèlement, des activités sont menées actuellement pour évaluer le potentiel de la pyronaridine comme partenaire de M5717 afin de commencer une étude avec cette association thérapeutique chez l'homme (7).

### **3.10.2. Pyronaridine :**

La pyronaridine est le premier dérivé benzonaphthyridine synthétisé en 1970 en Chine. Elle a été utilisée en Chine pour le traitement du paludisme en monothérapie pendant 30 ans. Plus récemment l'intérêt accordé à la pyronaridine a été renouvelée comme étant un partenaire possible des dérivés de l'artémisinine dans les CTAs. Elle existe sous la forme base et sel.

#### **Mécanisme d'action :**

Elle agit par inhibition de la topoisomérase II de l'ADN. L'action se fait au niveau de la vacuole digestive en inhibant la bio cristallisation de l'hème.

#### **Formulation :**

Capsules de 50mg et 100mg

En combinaison thérapeutique : Pyronaridine (180 mg) /Artésunate (60mg).

#### **Intérêt de la pyronaridine dans la combinaison :**

La pyronaridine est très efficace contre le *P. falciparum* et des souches résistantes à des antipaludiques notamment contre les souches résistantes à la chloroquine. Les données pharmacocinétiques cliniques concernant la pyronaridine indiquent une élimination T<sub>1/2</sub> de 13,2 et 9,6 jours, respectivement, chez les adultes et les enfants atteints de paludisme aigu non compliqué à *falciparum* et à *vivax*, dans des conditions d'exposition à l'artémisinine et à la chloroquine. La pyronaridine a une toxicité généralement faible comparée à la chloroquine. Des études ont montré que l'émergence à la pyronaridine est lente et encore si elle est utilisée dans une combinaison(88).

### 3.11. La chimiorésistance :

#### 3.11.1. Définition de la chimiorésistance :

L'OMS a défini la chimiorésistance comme l'aptitude d'un microorganisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées mais comprises dans les limites de tolérance du sujet(89).

La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques est un phénomène réel sur tous les continents. Plusieurs études ont été menées pour expliquer le mécanisme de la résistance. Comme chez les bactéries, les principaux mécanismes de la résistance pourraient être dus :

- Soit à l'inactivation enzymatique ou à la dégradation des médicaments(90).
- Soit à une altération du site de fixation du médicament.
- Soit à une inhibition de l'entrée du médicament(91).
- Soit à un reflux actif du médicament au niveau de son site d'action.

Les variants issus d'erreurs de réplication de l'ADN, sont d'autant plus fréquents que la multiplication asexuée est rapide et que les systèmes enzymatiques de réparation de l'ADN sont imparfaits. Il y a sélection de plasmodies mutantes lorsque la concentration de l'antipaludique est suffisante pour inhiber la multiplication des plasmodies sensibles mais insuffisante pour bloquer celle des mutants, phénomène désignée sous le nom de « sélection médicamenteuse» (92). On pense que ce processus sélectif est facilité par la présence de concentrations plasmatiques infra thérapeutiques d'antipaludiques et lorsque la courbe dose-réponse est plate. Un parasite résistant est celui qui présente une ou plusieurs mutation(s) génétique(s) au niveau de son ADN (selon les médicaments). Les mutations génétiques ne sont pas dues à l'action du médicament, mais sont des anomalies qui se produisent lors de la réplication de l'ADN chromosomique ou mitochondrial du parasite. Donc le médicament administré à un sujet porteur de parasites se trouve déjà présents dans l'organisme de celui-ci des parasites, soit préalablement mutés (résistants) soit non mutés (sensibles)(93). ~~La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques est un phénomène réel sur tous les continents. Plusieurs études ont été menées pour expliquer le mécanisme de la résistance.~~

### **3.11.2. La résistance aux antipaludiques et gènes moléculaires associés :**

La résistance aux antipaludiques se produirait dans les zones de faible ou de haute transmission de paludisme. En effet, la résistance s'est développée en premier dans les zones de faible transmission (Thaïlande et Brésil) et elle reste actuellement plus fréquente dans ces zones que dans celles de transmission plus élevée, s'appuyant sur l'hypothèse de la faible transmission.

Les résistances concernent des degrés variables de la plupart des antipaludiques actuels sur le marché compliquant le traitement du paludisme. Les médicaments sont moins efficaces en raison de modifications d'ordre génétique apparues chez le parasite. Cependant des marqueurs moléculaires y sont impliqués dans ces phénomènes de résistance.

#### **Le gène *Plasmodium falciparum multidrug resistance1 Pfmdr1* :**

Des homologues du gène *mdr*, responsables de la multirésistance des cellules cancéreuses aux médicaments anti-cancéreux ont été découverts chez *P. falciparum* et nommés *Pfmdr1* et *Pfmdr2*. Le *Pfmdr2* est localisé sur le chromosome 14 de *P. falciparum*. Les études ont montré qu'il n'était pas impliqué dans la résistance à la chloroquine. Ce gène ne présente pratiquement aucune variation entre les parasites sensibles et ceux résistants (94).

En revanche des variations dans le nombre de copies du gène *Pfmdr1* (le gène correspondant situé sur le chromosome 5 du parasite) associées ou non avec des mutations ponctuelles, ont été initialement considérées dans la chloroquino-résistance. Des mutations ponctuelles de *Pfmdr1* sont liées à la chloroquino-résistance dans certaines études de terrain, par contre certains auteurs ont trouvé le contraire (95).

Le gène *Pfmdr1* code pour une protéine de perméabilité d'un poids moléculaire de 170kD. Comme les homologues des cellules cancéreuses, cette protéine serait impliquée dans le transport transmembranaire de la chloroquine et d'autres molécules (96). Une mutation au niveau du *Pfmdr1* Asn-Tyr en position 86 pourrait contribuer à la chloroquino-résistance (97). Ce marqueur est impliqué dans la résistance des molécules suivantes : Méfloquine, chloroquine, quinine.

### **Le gène *Plasmodium falciparum* chloroquine résistance transporter (*Pfcr*) :**

L'équipe de Wellems a montré qu'une mutation de ce gène codant pour une protéine transmembranaire (*Pfcr*) de la vacuole digestive de *P. falciparum* est responsable de la résistance à la chloroquine. Le gène *Pfcr* est entièrement séquencé et comprend 13 exons. En Amérique du sud, cette résistance est associée à d'autres variants "*Pfcr*" porteurs de plusieurs mutations. Toutefois, les variants "*Pfcr*" de ces trois régions ont en commun, deux mutations spécifiques (*K76T* et *A220S*)(98).

Le gène *Pfcr* est situé sur le chromosome 7, et code pour *Pfcr*, une protéine membranaire de transport vacuolaire. De nombreux polymorphismes de *Pfcr* associés à la résistance à la chloroquine ont été identifiés. La mutation sur le codon 76 (Thr→Lys) de *Pfcr* est essentielle dans la résistance à la chloroquine. La mutation Thr76Lys est associée à une résistance absolue à la chloroquine *in vitro*. De nombreuses études cliniques réalisées dans diverses zones géographiques ont confirmé l'association entre la mutation *Thr76Lys* et la résistance à la chloroquine notamment en Afrique, au Mali, au Cameroun, au Soudan, et au Mozambique, en Asie, au Laos et en Thaïlande, ainsi qu'en Amérique du Sud, au Brésil(99).

Jusqu'à nos jours il n'y a pas de marqueur moléculaire pour l'amodiaquine. On pense que des variations alléliques sur le *Pfcr* et sur le *Pfmdr1* auraient une relation avec une élévation de résistance à l'amodiaquine (100).

### **Le gène *Plasmodium falciparum* dihydroPtéroate synthétase (*Pfdhps*) / le gène *Plasmodium falciparum* dihydrofolate réductase (*Pfdhfr*) :**

La résistance à la pyriméthamine-sulfadoxine est apparue à la frontière entre la Thaïlande et le Cambodge dans le milieu des années 60. En Afrique, la sensibilité de la pyriméthamine-sulfadoxine a commencée à baisser dans les années 1980. Cette résistance s'est répandue plus rapidement à l'Est qu'à l'Ouest du continent (74). La résistance *in vitro* à la pyriméthamine-sulfadoxine a été reportée dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne, variant de 13 à 30 %. De toutes les résistances aux antipaludiques, la base moléculaire de la résistance à la pyriméthamine-sulfadoxine est la mieux caractérisée. Les mutations spécifiques de *P. falciparum* qui conduisent à la résistance à la pyriméthamine et à la sulfadoxine ont été identifiées.

# METHODOLOGIE

## **4. MATERIEL ET MÉTHODES :**

### **4.1. Lieu d'étude :**

Notre étude a été réalisée à Faladjé et les villages environnants. Faladjé est un village de la commune de N'Tjiba et est situé à 80 Km au Nord-ouest de la ville de Bamako (Figure 17). Le paludisme y est hyper endémique avec une transmission d'intensité saisonnière entre les mois de Juillet et Janvier.

#### **4.1.1. Climat et végétation :**

Le climat est caractérisé par deux saisons : une saison sèche, et une saison pluvieuse. La saison des pluies dure 6 à 7 mois (Mai - Novembre) avec une pluviométrie maximale en août et la saison sèche de 5 à 6 mois (décembre-avril). La végétation est dense et on y rencontre des grands arbres : le caïlcédrat (*Khaya senegalensis*), le néré (*Parkia biglobosa*), le karité (*Vitellaria paradoxa*), etc. La végétation est de type savane (101).

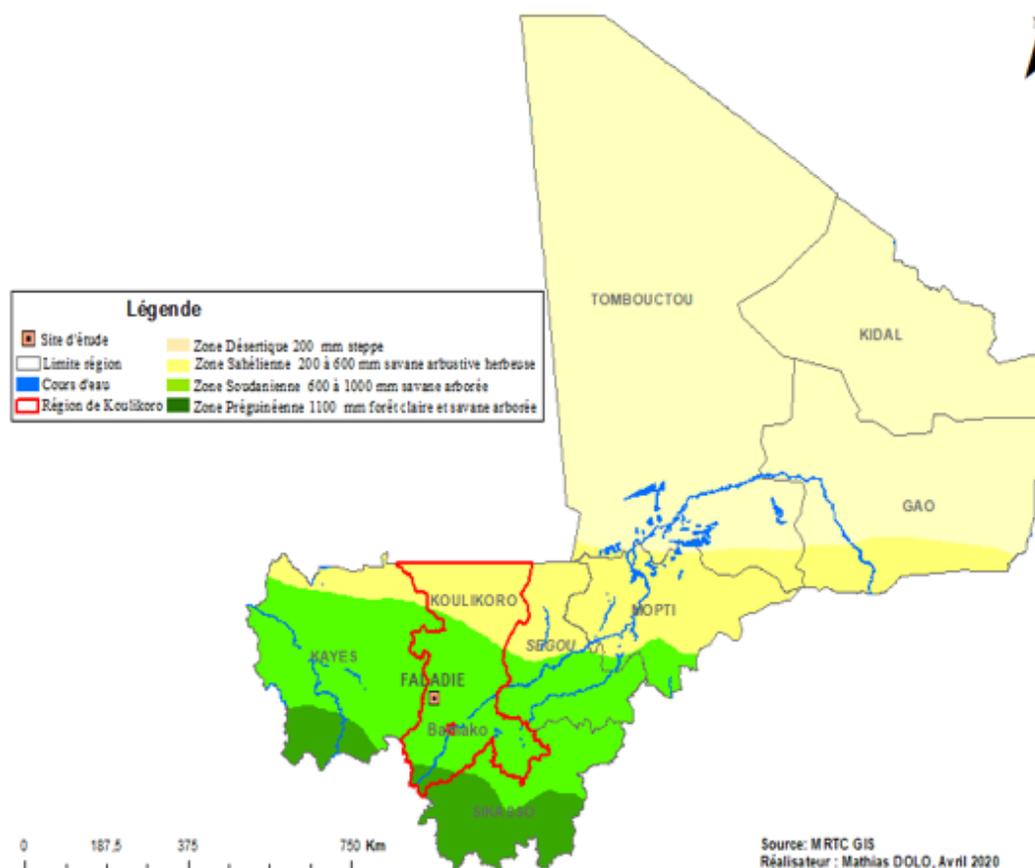
#### **4.1.2. Population :**

La population du village de Faladjé comprend les Bambara (l'ethnie majoritaire) qui cohabitent avec les peuhls, soninkés, maures, etc... La religion occupe une place importante dans la vie des habitants. L'islam est pratiqué par près de 70 % de la population, tandis que 20 % pratique le christianisme, et 10 % l'animisme. Le village de Faladjé comprend cinq quartiers : Bamanan-kin, Doura-kin, la Mission, Djélibabougou et le quartier des eaux et forêts.

#### **4.1.3. Infrastructures socio-sanitaires :**

L'aire de santé de Faladjé couvre toute la commune de N'Tjiba. Le système de santé est constitué d'un dispensaire qui est la seule structure de santé de la commune.

Le personnel dispense des soins en médecine générale et en pédiatrie. Le centre dispose d'une maternité bien équipée, les vaccinations de routine telles que planifiées par le programme élargi de vaccination (PEV) sont rigoureusement suivies. Le village de Faladjé dispose d'une école (premier et second cycle) dirigée par la mission catholique et une école communautaire.



**Figure 3 : Présentation du site (Faladjé) (101).**

#### **4.2. Le choix du lieu d'étude :**

Une étude antérieure réalisée sur le site de Faladjé a rapporté une double circulation de *P. malariae* et de *P. falciparum*, détectée par microscopie et confirmée par la PCR justifiant ainsi le choix de ce site pour la présente étude (63).

#### **4.3. Type d'étude :**

Nous avons mené une étude d'évaluation d'action expérimentale avec des passages hebdomadaires.

#### **4.4. Période d'étude :**

L'étude a été réalisée en 2021 et s'est déroulée en deux phases de janvier à mars et d'octobre à décembre couvrant ainsi la collecte des échantillons et les expériences de laboratoire.

#### **4.5. Population d'étude :**

L'étude a porté sur les volontaires résidant sur le site d'étude et villages environnants, présentant ou pas des symptômes de paludisme.

#### **4.6. Considérations éthiques et déontologiques :**

Le protocole de l'étude, ainsi que les formulaires de consentement et d'assentiment libres et éclairés ont été approuvés par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et de la Faculté de Pharmacie (FAPH).

Avant le début de l'étude, l'avis favorable communautaire a été obtenue auprès des notables et la population des sites d'étude. Sur le terrain, le consentement/assentiment éclairé des participants a été obtenu conformément aux principes éthiques.

Chaque participant signait ou apposait son empreinte digitale sur une fiche de consentement volontaire qui lui était présenté par l'équipe de recherche. Pour les enfants mineurs, les parents ou les tuteurs signaient à leur place. Des identifiants ont été attribués aux participants pour garantir l'anonymat.

#### **4.7. Critères d'inclusion et de non-inclusion :**

##### **4.7.1. Critères d'inclusion :**

Les volontaires ayant répondu aux critères ci-dessous ont été inclus dans cette étude :

- Volontaire de tout sexe confondu âgé de 1 an et plus, présentant un paludisme non compliqué,
- Résident à Faladjé et villages environnants,
- Volontaire présentant une infection à *P. malariae*, ou *P. falciparum*.
- Présence d'une fièvre définit comme une température axillaire non corrigée  $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$  ou antécédent de fièvre.
- Obtenir un consentement éclairé du participant ou le consentement des parents ou tuteurs légaux pour les enfants de moins de 14 ans et l'assentiment des enfants de 14 à 18 ans après qu'ils aient reçu une information détaillée du protocole.

#### **4.7.2. Critères de non inclusion :**

N'ont pas été inclus dans cette étude les volontaires qui répondaient aux critères de non-inclusion ci-dessous :

- Refus de donner le consentement,
- Patients non résident à Faladjé et de ses villages voisins,
- Patients ayant reçus un traitement antipaludique depuis moins de 14 jours,
- Paludisme grave,
- Femme enceinte,
- Anémie sévère,
- Pas disponible pour l'étude,
- Infection grave, tuberculose, VIH, COVID positive.

#### **4.8. Traitement antipaludique administré :**

Les volontaires ont été immédiatement pris en charge après le prélèvement de sang avec le traitement recommandé par l'OMS et le Ministère de la Santé du Mali. La combinaison thérapeutique Artéméther + Luméfántrine (chaque comprimé est dosé à 20mg d'artéméther et 120mg de la luméfántrine) a été administrée par voie orale pendant trois jours selon la posologie suivante en fonction du poids corporel :

- 5kg a < 15kg : 1 comprimé deux fois par jour,
- 15kg a < 25kg : 2 comprimés deux fois par jour,
- 25kg a < 35kg : 3 comprimés deux fois par jour,
- $\geq 35$ kg : 4 comprimés deux fois par jour.

La prise correcte du médicament a été observée par un investigateur de l'étude pendant toute la durée du traitement. Les volontaires sont gardés en observation pendant une heure afin de s'assurer qu'ils n'ont pas vomi le médicament. A la fin du traitement, l'investigateur clinique a examiné de nouveau le patient pour évaluer l'évolution clinique de la maladie. Une goutte épaisse et un frottis mince de contrôle ont été réalisés chez tous les volontaires au septième jour du traitement.

#### **4.9. Méthodes de collecte des données :**

##### **4.9.1. Collecte des données cliniques :**

Chaque participant a bénéficié d'un examen clinique complet à l'admission. Les données sont recueillies par un clinicien du site par l'interview directe ou par l'examen physique du volontaire. Les informations cliniques collectées portent sur le poids, la taille, la température corporelle, la recherche de la splénomégalie par palpation de la rate, les fréquences cardiaques et respiratoires, la recherche de signe de gravités. Le même examen était aussi fait en cas de visite (prévue ou imprévue).

##### **4.9.2. Collecte des prélèvements biologiques :**

Ils ont été collectés au poste de biologie, chaque participant ou son tuteur avait déjà donné son consentement écrit après avoir pris connaissance du protocole avant son enrôlement. Les prélèvements biologiques ont été collectés à partir des veines (3ml - 10ml sur tubes ACD) ou des capillaires au bout du doigt sur lames.

Nous avons effectué :

- le frottis mince à partir d'un prélèvement au bout du doigt,
- les confettis sanguins à partir du prélèvement veineux d'un volume variable de sang (3 à 5 ml) pour les enfants âgés de moins de 5 ans ; et 5 à 10 ml pour les participants de plus de 5 ans. Les prélèvements ont été faits par un personnel qualifié. Les prélèvements ont servi :
  - le diagnostic du paludisme par la goutte épaisse en déterminant la densité parasitaire (DP) et le frottis mince pour l'identification d'espèce de *Plasmodium*.

Les parasitémies ont été estimées en comptant 200 globules blancs (leucocytes) et le tout rapporté à 8000 leucocytes par millimètre cube de sang.

Nous avons :

- déterminé le taux d'hémoglobine,
- confectionné des papiers buvards ou confettis de sang pour les analyses moléculaires et génomiques du parasite,
- fait les analyses fonctionnelles du parasite (test d'invasion, tests *ex-vivo*, tests *in-vitro* et sélection de parasites résistants).

#### 4.9.2.1. Goutte épaisse :

- **Principe :**

Technique de concentration en vue de la recherche des hématozoaires dans le sang. Elle consiste à réaliser un étalement épais de sang circonscrit dans un cercle d'environ 1 cm de diamètre.

- **Matériel :**

Blouse, gants stériles, lames porte-objet, vaccinostyles stériles à usage unique, alcool à 70°C, coton hydrophile, poubelle, Giemsa à 10%, bacs de coloration, éprouvette graduée, râteliers, eau desionisée, crayon à papier, chronomètre, huile à immersion, compteur manuel, papier hygiénique, microscope optique binoculaire, une machine à calculer, une table de lecture et une chaise.

- **Mode opératoire :**

Les lames étaient marquées par un crayon indélébile. L'index ou le majeur de la main gauche était désinfectée par un tampon d'alcool, puis essuyé avec un morceau de coton sec afin d'enlever le reste d'alcool. Une ponction capillaire était faite au niveau de ce doigt et la première goutte était essuyée avec un morceau de coton sec. La seconde goutte a été récupérée sur une lame porte-objet. Avec l'extrémité d'une 2ème lame la goutte a été étalée par des mouvements spirales (défibrination) pendant une à 2 minutes sur 1 cm de diamètre environ.

Nous avons laissé sécher à plat sur un support à la température ambiante à l'abri de la poussière et des mouches pour ensuite colorer dans une solution de Giemsa à 10% pendant 15 minutes. Ensuite, nous avons rincé avec l'eau propre, en faisant couler le liquide très délicatement sur la lame et laisser sécher sur le râtelier.

- **Examen microscopique :**

La lecture des gouttes se faisait sur place par un biologiste à l'aide d'un microscope optique binoculaire à l'objectif X100 avec huile à immersion. La densité parasitaire était déterminée en comptant le nombre de parasites sur 200 leucocytes et le tout apporté à 8000 leucocytes par millimètre cube de sang.

Le frottis mince était utilisé pour l'identification des espèces de *Plasmodium*. Après la lecture, les lames étaient conservées dans des boîtes de l'OMS. Pour le contrôle de qualité, 10% des lames ont été relues par un microscopiste certifié qui n'a pas participé à l'étude.

#### **4.10. Test *ex- vivo* de l'efficacité des médicaments antipaludiques courants et médicaments candidats sur les espèces de *Plasmodium* :**

Les tests *ex-vivo* ont été faits sur des isolats de terrain pour déterminer leur sensibilité au médicament candidat (M5717) contre le paludisme et le contrôle antipaludique Dihydroarthemisine (DHA). L'efficacité *ex-vivo* de ces médicaments a été évaluée chaque 48 heure pour *P. falciparum* et 72 heures pour *P. malariae*. Le test *ex -vivo* a été fait dans des plaques de 96 puits pour chaque espèce avec des séries de dilutions des différents médicaments en suivant les étapes décrites ci-dessous :

Les étapes du test *ex-vivo* de l'efficacité des médicaments antipaludiques.

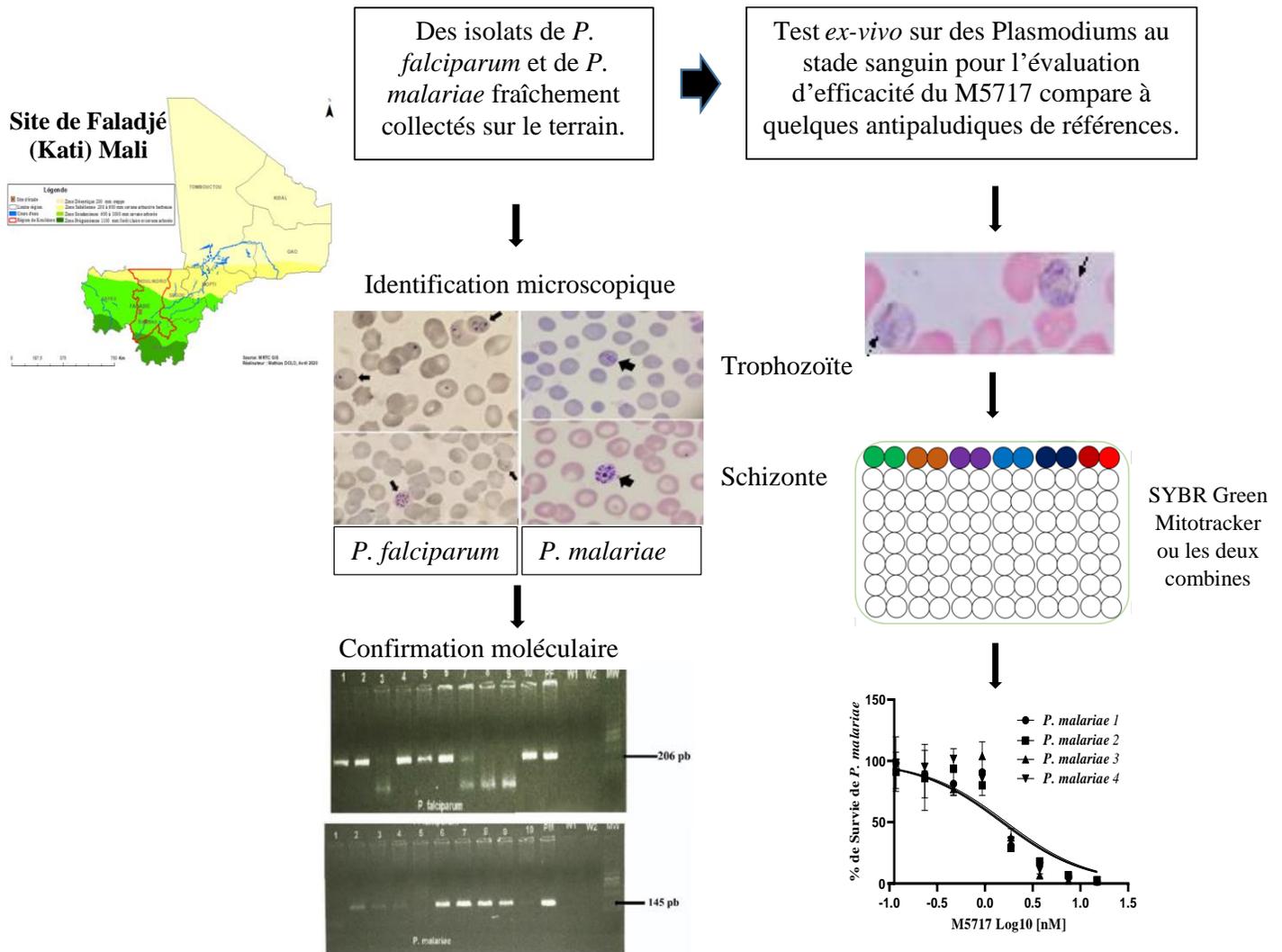


Figure 4 : Processus de la détermination de test *ex-vivo* sur *Plasmodium* au stade sanguin.

### ❑ **Lavage des échantillons sanguins de terrain**

Les prélèvements sanguins dans des tubes ACD provenant du site étaient centrifugés à 657 g pendant 5 minutes pour éliminer le plasma. Le culot globulaire est ensuite lavé trois (3) fois en ajoutant une solution dont la composition est la suivante :

- \_Quantité suffisante d'eau stérile pour 1 litre,
- \_10,43g de la poudre du RPMI + glutamine (INV-31800022),
- \_2,5g de NaHCO<sub>3</sub>,
- 5,96g d'Hepes : 5,96g,
- 2,5 ml de la Gentamicine (10mg/ml).

Pour chaque lavage, on ajoutait deux fois le volume équivalent au culot globulaire de la solution dont la composition est citée ci-dessus. Le mélange est ensuite agité délicatement par retournement à la main puis centrifugé à 657 g pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé par aspiration à l'aide d'une pipette sérologique.

### ❑ **Résuspension du culot de globules rouges infectés après lavage**

A la fin des lavages, la résuspension du culot était faite pour ramener la parasitémie à 1% et le taux d'hématocrite à 2% avec une solution appelée milieu de culture complet dont la composition est la suivante :

- \_Quantité suffisante d'eau stérile pour 1 litre,
- 10,43g de la poudre du RPMI + glutamine (INV-31800022),
- 2,5g de NaHCO<sub>3</sub>,
- 5,96g d'Hepes,
- 5g d'Albumax I (INV-11020021),
- 1ml d'Hypoxantine,
- 2,5 ml de la Gentamicine (10mg/ml),

### ❑ Dilution des médicaments dans des plaques de 96 puits

Le test *ex-vivo* de l'efficacité d'une série de dilution au 1/3 des médicaments de l'étude a été effectué dans des plaques de 96 puits. Pour chaque médicament, 60ul de la solution étaient ajoutés dans des puits successifs de la plaque pour obtenir des concentrations finales.

### ❑ Test *ex-vivo* d'efficacité proprement dit des médicaments

La susceptibilité *ex-vivo* de chaque espèce de *Plasmodium* à différentes concentrations des médicaments de l'étude a été évaluée en ajoutant 60ul de la suspension globulaire avec une parasitémie de 1% et un taux d'hématocrite de 2% dans chaque puit contenant 60ul d'une concentration donnée du médicament.

Ainsi le volume final de 120ul de préparation dans chaque puit est incubé à 37°C dans un incubateur avec 5% CO<sub>2</sub>. Deux plaques ont été utilisées pour les espèces *P. falciparum* et *P. malariae* dont l'une a été incubée pendant 48 heures et l'autre pendant 72 heures.

Après 48 heures pour *P. falciparum* et 72 heures pour le traitement de la culture par *P. malariae*, la plaque était retirée de l'incubateur.

### ❑ Mesure du taux de survie des parasites après le test *ex-vivo*

Le taux de survie des parasites a été déterminé après exposition *ex vivo* à différentes concentrations des différents médicaments de l'étude en utilisant la cryométrie en flux.

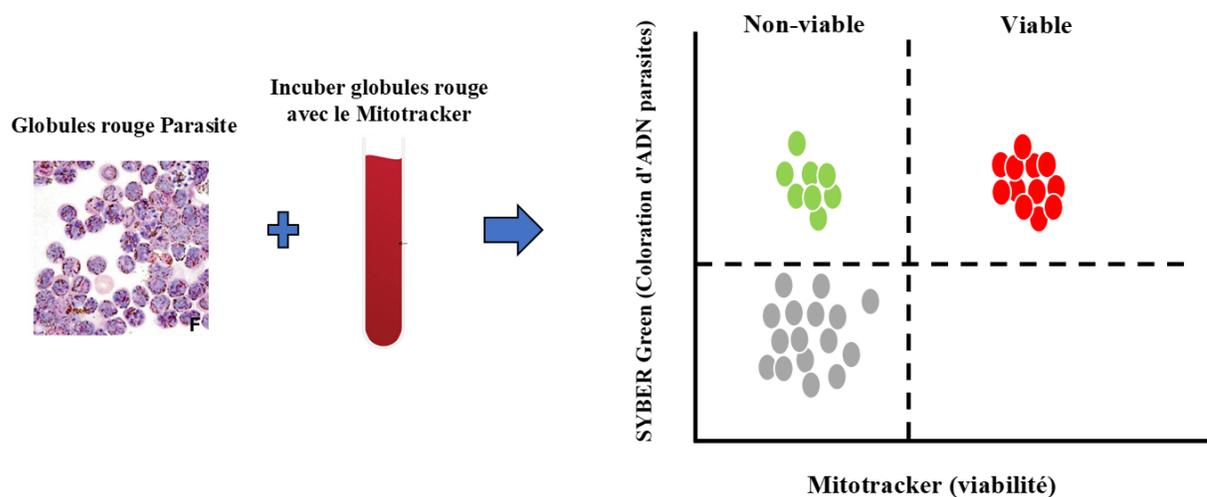
Au bout de chaque intervalle d'exposition, les parasites ont été marqués en utilisant le **SYBR Green** et le **Mitotracker** (annexe 2) selon les procédures décrites ci-dessous :

- Centrifuger les plaques à 657 g pendant 5 minutes au bout des 48 et 72 heures d'incubation selon les espèces de *Plasmodium*.
- Jeter le surnageant,
- Ajouter 120ul de la solution de SYBR green 5X + Mitotracker 1mM
- Incuber pendant une heure et à 37°C dans l'incubateur,
- Retirer les plaques de l'incubateur et centrifuger à 657 g pendant cinq (5) minutes et jeter le surnageant,
- Ajouter 120 ul d'une solution de lavage constituée du HBSS 1X et du FBS 2%
- Mélanger et centrifuger à 657 g pendant 5minutes
- Répéter le lavage trois (3) fois.
- Reconstituer 120ul du culot globulaire avec 6 ml du milieu de culture complet pour une plaque.
- Passer la plaque à la cryométrie en flux.

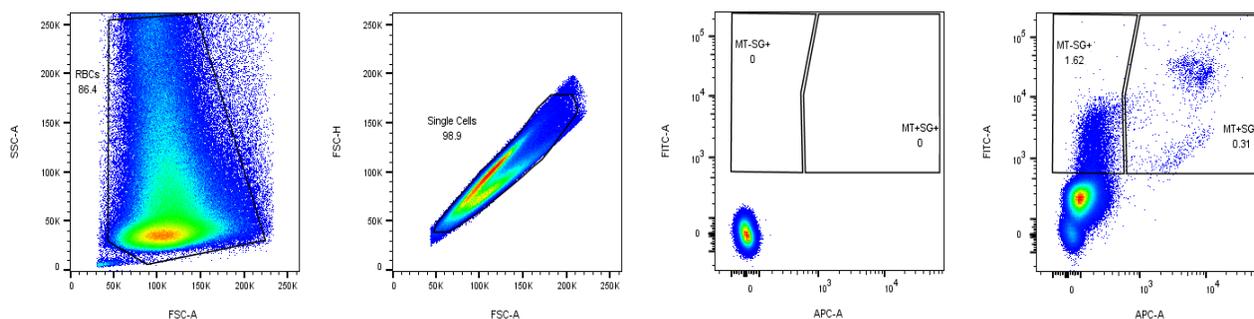
- **Détermination de la CI<sub>50</sub> des médicaments**

Le cytomètre en flux BD ACCURI C6 flow cytometer (numéro de série : 2901) a été utilisé pour déterminer le taux de survie des parasites à une série de dilution des différents médicaments comme indiqué dans le tableau. Le logiciel GraphPad Prism version 9 a été utilisé pour : 1) l'analyse des données, 2) la prédiction des concentrations inhibitrices à 50 % (CI<sub>50</sub>).

**Quelques d'images d'illustration de fonctionnement de la cytométrie en flux.**



**Figure 5 : L'illustration d'image des parasites en fonction des colorants**

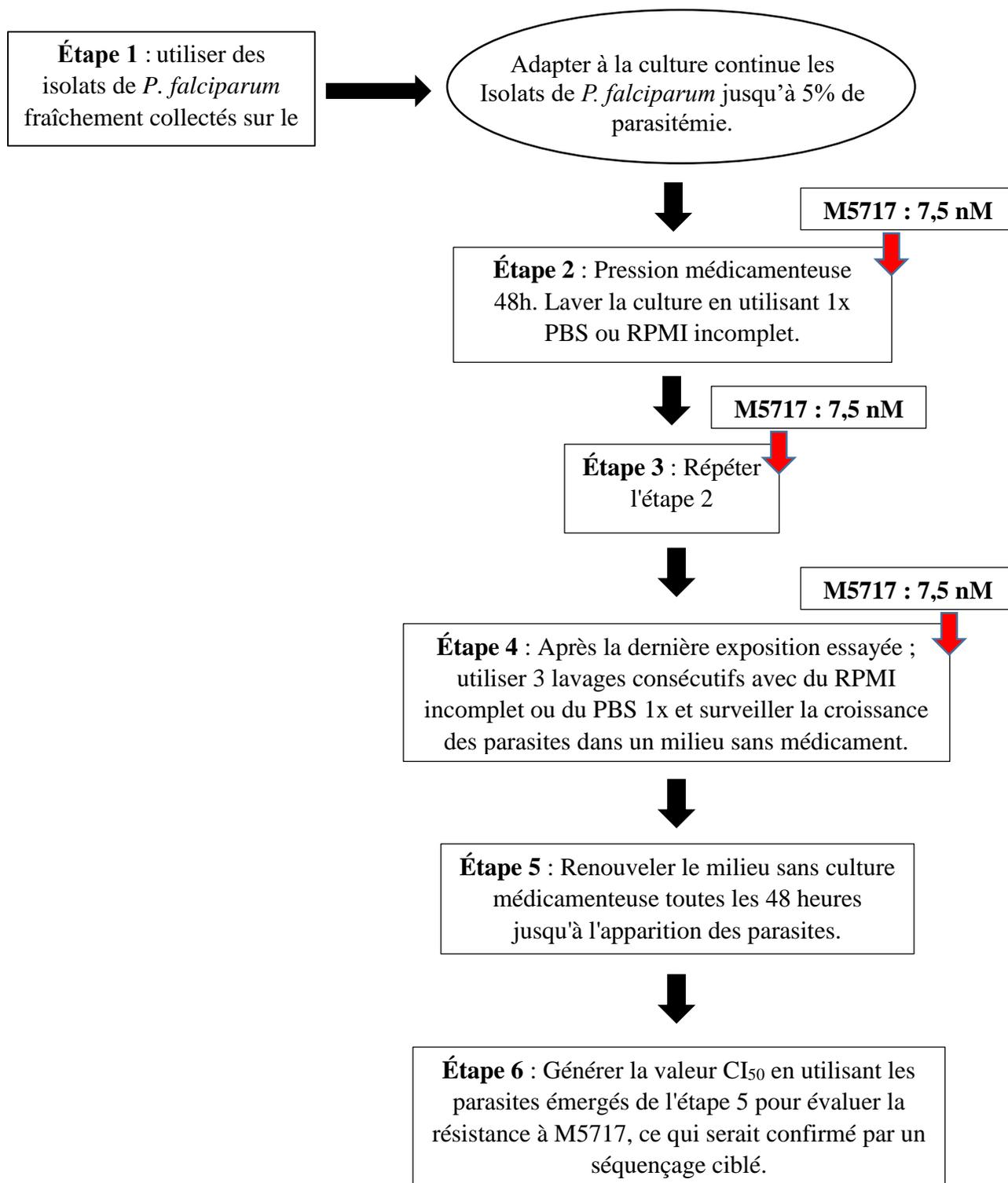


**Figure 6 : Illustration de l'interprétation d'un résultat d'analyse de cytométrie en flux.**

#### **4.11. L'adaptation à la culture *in vitro* des isolats cliniques et la sélection des parasites mutants :**

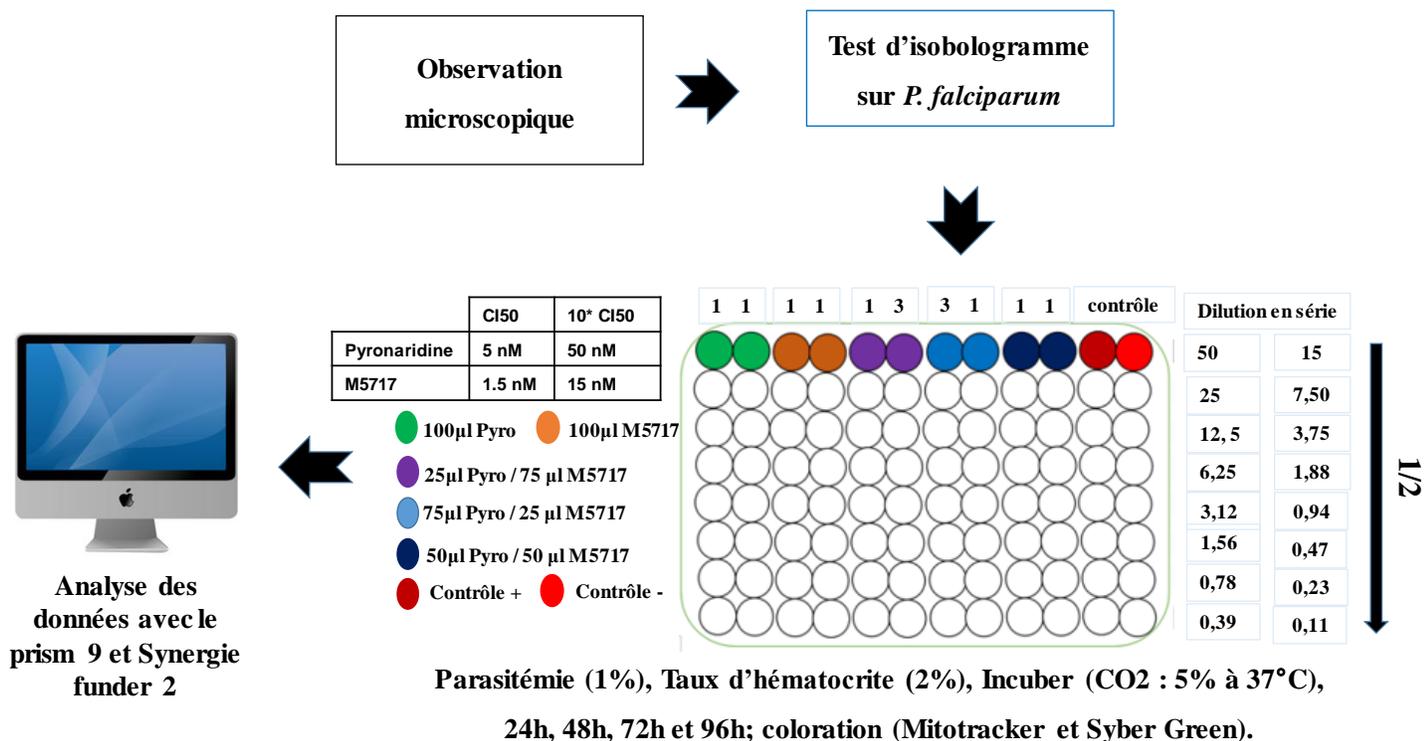
Nous avons utilisé les isolats cliniques de *P. falciparum* fraîchement collectés sur le terrain. Ensuite nous les avons adaptés à la culture continue dans un milieu complet RPMI-1640. Une partie de ces parasites adaptés à la culture (EEF192 et EEF209) ont été conservés dans de l'Azote et une partie a été utilisée pour la sélection des mutants résistants au M5717, les souches de laboratoire 3D7 (3D7\_FS et 3D7\_MM) ont été utilisées comme contrôle. Les deux groupes de parasites ont été soumis à une série de pressions médicamenteuses du M5717 à 15 fois la  $CI_{50}$  ( $CI_{50}$  [M5717] : 7.5 nM) pendant trois cycles de vies successives du parasite. Après les étapes de la pression médicamenteuse, les parasites sont maintenus en culture continue en changeant leur milieu de culture chaque 48h jusqu'à l'apparition des parasites recrudescents. L'ADN de ces parasites a été extrait avec un kit Qiagen et le séquençage ciblé du gène élancement facteur 2 fut effectué sur la plateforme SANGER. L'outil UGENE version 20 a été utilisé pour les analyses bio-informatiques des données de séquençage. L'ensemble de ces étapes de sélection de mutants sont résumées sur la figure 7.

## L'adaptation à la culture *in vitro* des isolats cliniques et la sélection des parasites mutants



**Figure 7 : Procédure de la sélection des parasites mutants**

## 4.12. Analyse des isobologrammes :



**Figure 8 : Processus du test *ex-vivo* de la détermination médicamenteuse**

Les isolats de terrain de *P. falciparum* sont cultivés dans un milieu de RPMI-1640 complet avec différents dosages des médicaments. L'hématocrite du culot de globules rouges dans le RPMI-1640 était de 2% et la parasitémie de 1 %. Des séries de concentrations de chaque composé Pyronaridine et M5717 ont été testés dans des puits conformément au plan expérimental sur la Figure 8. Les parasites seront exposés aux médicaments pendant 24, 48, 72 et 96 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. À la fin du traitement médicamenteux, la sensibilité des parasites serait évaluée à l'aide du test standard de SYBR Green combiné au Mitotracker après incubations (pendant 1h) suivit d'une série de lavages (3 fois de suite à 1200 RPM/5mn) au HBS (1x). Après le lavage, les plaques sont lues au Cytométrie de Flux pour quantifier la sensibilité des parasites aux médicaments combinés. Le tableur Excel 2019 a été utilisé pour extraire les données en suite analyser par le logiciel GraphPad Prism version 9 pour la prédiction des concentrations inhibitrices à 50 % (CI<sub>50</sub>) et pour prédire les interactions médicamenteuses, et SynergyFinder 2 a été utilisé pour l'analyse de la prédiction de Bliss.

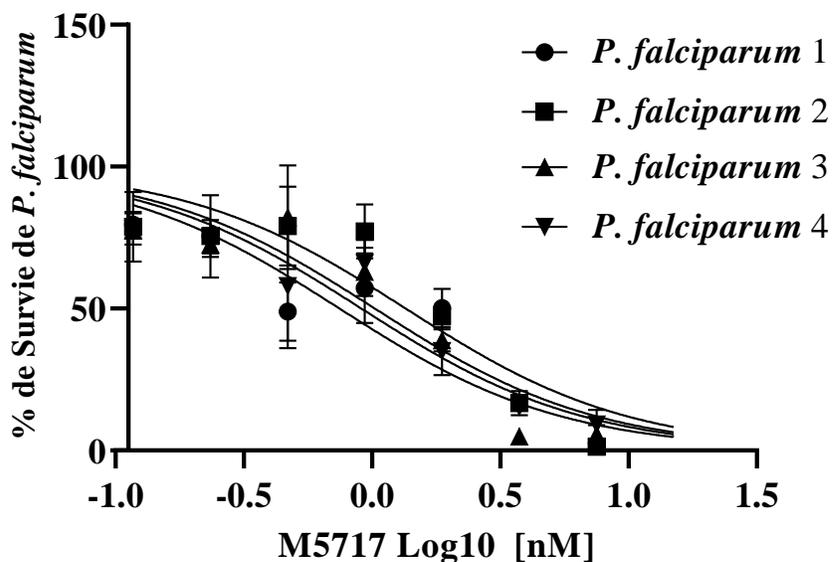
Après incubation suivant les différents temps, la moyenne des concentrations inhibitrices fractionnelles ( $\sum FCI_{50}$ ) furent calculées pour déterminer les interactions. Ainsi quand la  $\sum FCI_{50}$  est supérieure à 2 on parle d'antagonisme ; si elle est inférieure ou égale à 0,5 on parle de Synergisme et quand elle est comprise entre 0,5 et 2 ( $0,5 \leq \sum FCI_{50} < 2$ ) on parle d'interaction indéterminée.

Le modèle de Bliss suggère qu'il y a zéro interaction entre deux ou plusieurs médicaments combinés ayant des mécanismes d'action différentes. Les synergies scores sont exprimés avec une échelle de couleur où le rouge foncé score supérieur à 10 signifie le Synergisme, le vert foncé score inférieur à -10 signifie l'antagonisme, le rouge clair, le vert clair et le blanc représente l'intervalle -10 et 10 et signifie l'additivité.

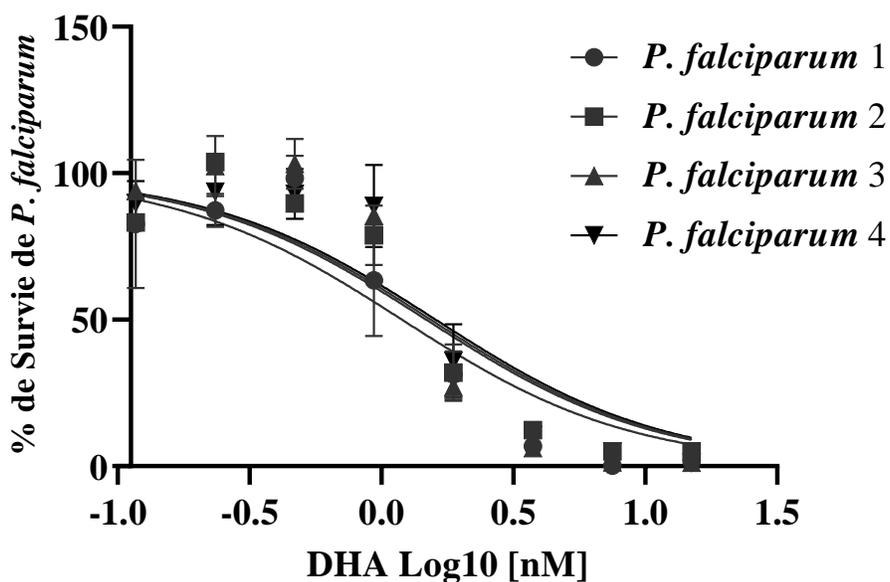
# RESULTATS

## 5. Résultats :

### 5.1. Sensibilité des souches de terrain de *P. falciparum* au traitement du M5717 :



**Figure 9:** Courbes dose-réponses de la sensibilité *ex-vivo* des isolats cliniques de *P. falciparum* au M5717.



**Figure 10 :** Courbes dose-réponses de la sensibilité *ex-vivo* des isolats cliniques de *P. falciparum* au contrôle DHA.

L'activité du M5717 a été testée sur quatre (4) isolats de *P. falciparum* fraîchement venus du terrain, et le DHA a été utilisé comme le médicament contrôle. L'analyse des courbes dose-réponse montre que le M5717 inhibe la croissance de la population parasitaire de *P. falciparum* avec une  $CI_{50}$  moyenne de 1,49 nM (Figure 9) alors que le contrôle DHA a montré une  $CI_{50} = 0,60$  nM (Figure 10).

5.2.Sensibilité des souches de terrain de *P. malariae* au traitement du M5717 :

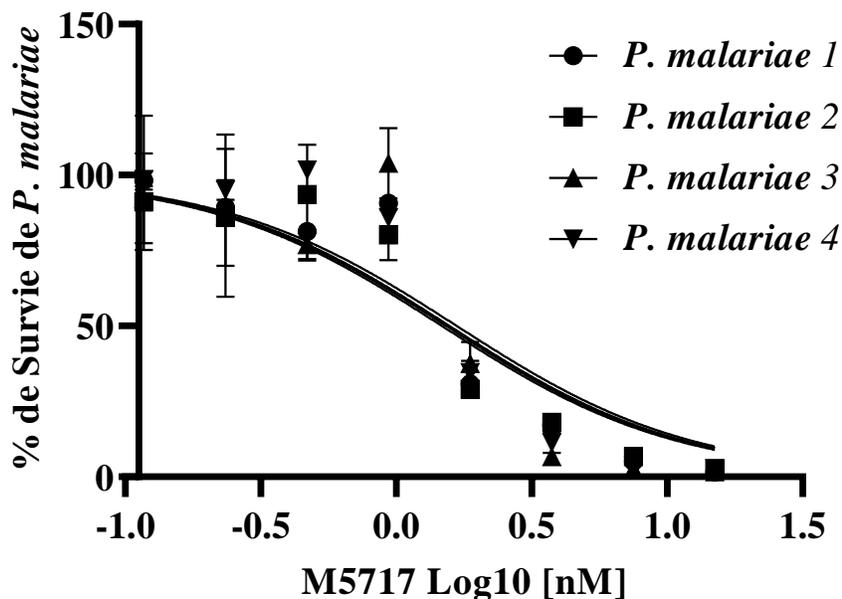


Figure 11: Courbes dose-réponses de la sensibilité *ex-vivo* des isolats cliniques de *P. malariae* au M5717.

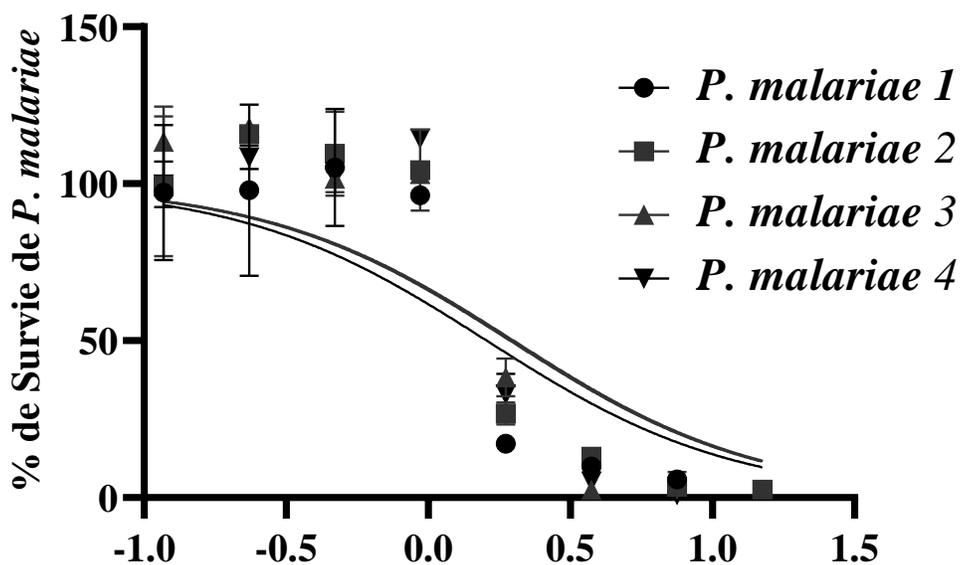


Figure 12: Courbes dose-réponses de la sensibilité *ex-vivo* des isolats cliniques de *P. malariae* au contrôle DHA.

L'activité du M5717 a été testée sur quatre (4) isolats de *P. malariae* fraîchement obtenus du terrain et le DHA a été utilisé comme le médicament contrôle. L'analyse des courbes dose-réponse montre que le M5717 inhibe la croissance de la population parasitaire de *P. malariae* avec une  $CI_{50}$  moyenne de 3,16 nM (Figure 11) nettement inférieure à celui du DHA à  $CI_{50} = 8,87$  nM (Figure 12).

5.3. Comparaison de l'efficacité de M5717 à celle d'un panel de médicaments antipaludiques existants :

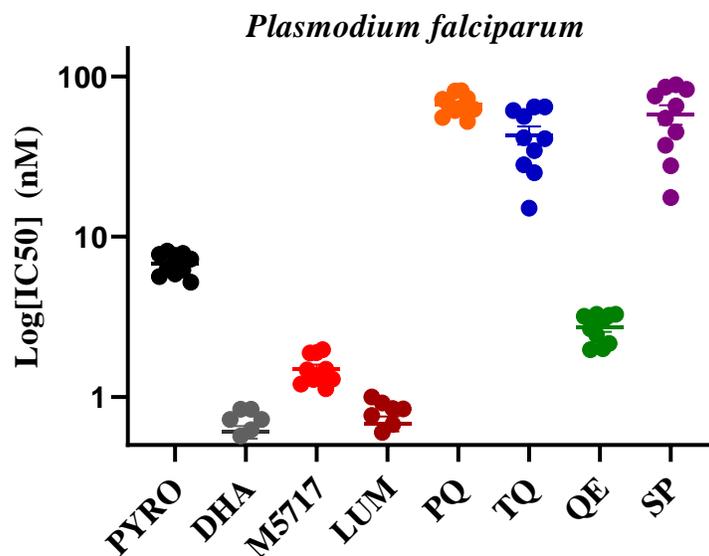


Figure 13: Comparaison de la sensibilité *ex-vivo* de M5717 a un panel de médicaments antipaludiques contre les isolats cliniques de *P. falciparum*.

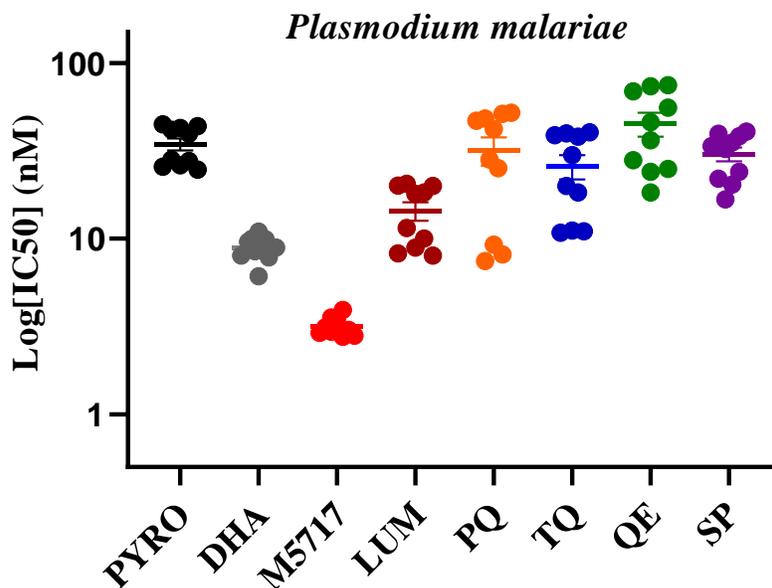


Figure 14: Comparaison de la sensibilité *ex-vivo* de M5717 a un panel de médicaments antipaludiques contre les isolats cliniques de *P. malariae*.

**Tableau III:** les concentrations inhibitrices à 50% (IC50) des antipaludiques courants comparées au médicament candidat M5717 sur les isolats cliniques de *P. falciparum* à 48 heures.

Isolats de terrain	CI <sub>50</sub> des isolats de <i>P. falciparum</i>							
	PYRO	DHA	M5717	LUM	PQ	TQ	QE	SP
1	7,62	0,84	1,284	0,999	52,37	40,8	2,16	65,6
2	5,86	0,44	1,974	0,845	55,39	56,2	3,23	45
3	5,19	0,72	1,203	0,431	81,51	64,5	3,18	17,6
4	6,28	0,47	1,883	0,764	61,21	15,1	1,97	88,8
5	5,62	0,84	1,485	0,599	62,27	41,4	2,66	75,5
6	7,86	0,44	1,474	0,915	65,93	61,2	2,43	55
7	6,19	0,72	1,293	0,4	73	34,5	3,28	37,3
8	8,12	0,57	1,891	0,674	63,5	25	2	82,8
9	7,23	0,62	1,303	0,342	80,91	64,5	3,28	27,7
10	7,76	0,37	1,123	0,843	72,12	28,1	2,99	85,6
Médiane	6,75	0,6	1,389	0,719	64,72	41,1	2,82	60,3
Moyenne	6,77	0,6	1,491	0,681	66,82	43,1	2,72	58,1

**Tableau IV:** les concentrations inhibitrices à 50% (IC50) des antipaludiques courants comparées au médicament candidat M5717 sur les isolats cliniques de *P. malariae* à 72 heures.

Isolats de terrain	CI <sub>50</sub> des isolats de <i>P. malariae</i>							
	PYRO	DHA	M5717	LUM	PQ	TQ	QE	SP
1	26,2	10,98	3,52	10,033	28,24	18,33	18,35	40,6
2	44,6	9,597	2,76	18,32	51,31	40,37	45,94	16,73
3	25,7	8,022	3,02	20,52	46,86	10,8	74,84	35,36
4	41,6	6,103	3,92	8,231	7,47	38,78	36,32	21,98
5	28,2	9,9003	2,952	11,502	25,21	19,98	24,95	39,54
6	42,6	8,497	3,56	17,999	52,012	29,9	55,655	20,31
7	24,7	9,012	3,12	20,022	42,1	11,02	69,119	24
8	39,6	7,803	2,803	7,999	8,12	38	27,996	38,2
9	27,7	9,966	3,12	19,989	48,21	11,1	73,555	33,6
10	43,6	8,903	2,91	8,91	9,22	39,78	23,991	32,32
Médiane	33,9	8,9575	3,07	14,751	35,17	24,94	41,13	32,96
Moyenne	34,4	8,8783	3,1684	14,353	31,853	25,81	45,072	30,26

Après avoir vérifié l'activité du M5717 sur *P. falciparum* et *P. malariae*, nous avons comparés l'activité du M5717 à celle des médicaments antipaludiques couramment utilisés dans les zones endémiques sur des isolats de *P. falciparum* et *P. malariae*. Ces résultats ont montré que le M5717 a une capacité inhibitrice nettement plus élevée que tous les antipaludiques utilisés excepté le DHA et la Lumefantrine contre *P. falciparum* (Figures 14) et (Tableau III). Cependant nous remarquons que le M5717 montre une capacité inhibitrice plus élevée que tous les antipaludiques utilisés contre *P. malariae* (Figures 15) et (Tableau IV).

#### 5.4. Phénotype et Génotype des parasites de *P. falciparum* résistant au M5717 :

##### 5.4.1. Sélection des parasites mutants au M5717 (recrudescence phénotypique) :

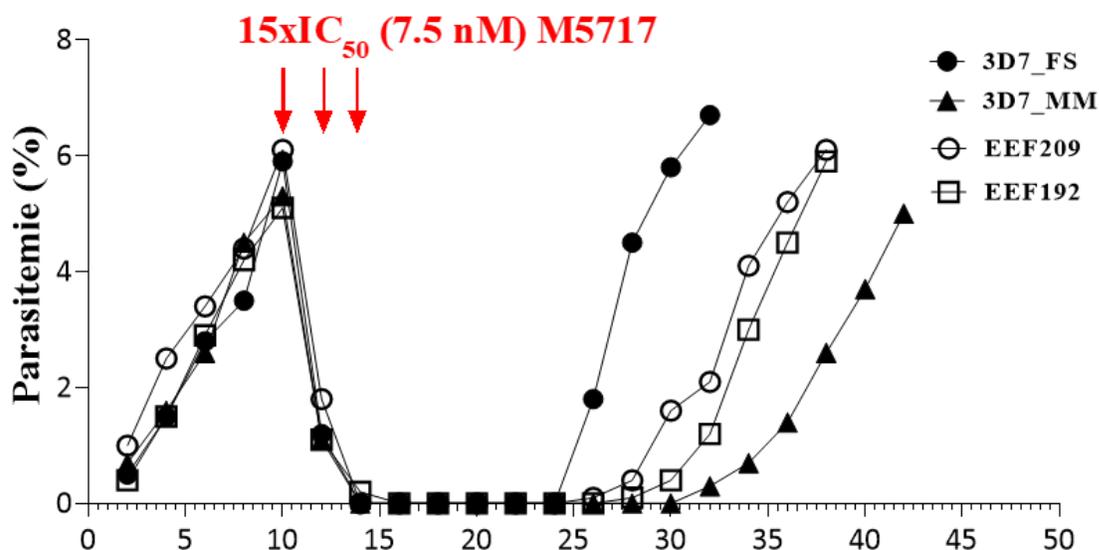


Figure 15 : Graphisme de la recrudescence des parasites par pression médicamenteuse de M5717.

Les parasites qui ont été soumis à la pression médicamenteuse de 15xCI<sub>50</sub> de M5717. Nous avons observé une recrudescence des parasitaires au cours du 25ème jour de culture chez le contrôle 3D7\_FS le plus tôt, chez sur deux isolats de terrain respectivement EE209 et EE192 et pour le cas souches de laboratoire 3D7\_MM le deuxième contrôle qu'après 31ème au jour.

Des isolats cliniques de *P. falciparum* provenant de terrain de plus 50 donneurs maliens ont été adaptés à la culture, parallèlement la lignée témoin 3D7 de laboratoire a été utilisée comme contrôle (Figure 12) pour l'étude de la sélection des parasites mutants.

Pour la sélection des mutants, des parasites ont été mis en culture continue jusqu'à l'obtention d'une parasitémie plus ou moins de six pour cent ( $\pm 6\%$ ) qui seront soumises à une pression médicamenteuse de  $15 \times CI_{50}$  de M5717. Pour évaluer le nombre de parasites qui ont survécu au traitement, la croissance quotidienne des parasites a été suivie. Pour plus de 50 isolats, seulement deux isolats ont été reçus à terme. Aucune recrudescence parasitaire n'a été observée avant le 25<sup>ème</sup> jour de culture. En revanche, une recrudescence parasitaire est apparue chez le contrôle 3D7\_FS plus tôt que chez les deux isolats de terrain en culture respectivement les isolats EEF209 et EEF192 et pour la souche de laboratoire 3D7\_MM le deuxième contrôle au jour 36 (Figure 12).

#### 5.4.2. Concentrations inhibitrices à 50% (CI<sub>50</sub>) des parasites recruescents :

La sensibilité des parasites types sauvages : WT et recruescents au M5717 a été évaluée en déterminant la CI<sub>50</sub> avec M5717 et Dihydroartémisinine (DHA) comme contrôle positif (Tableau V). En comparant les CI<sub>50</sub> du M5717 des parasites recruescents et WT des souches de laboratoire *P. falciparum* 3D7, on a observé un décalage de 170 fois de la IC<sub>50</sub> du 3D7\_FS recruescent par rapport au 3D7\_FS WT et 154 fois le IC<sub>50</sub> du 3D7\_MM recruescent par rapport au 3D7\_MM WT (Tableau V). Pour les isolats cliniques de terrain WT et recruescents, on a observé un décalage de 6302 et 302 fois les CI<sub>50</sub> de EEF209 et EEF192 recruescents respectivement par rapport à leur WT (tableau V). Ainsi, tous les parasites recruescents étaient moins sensibles au traitement du M5717 (tableau III). Cependant, aucune différence significative dans la sensibilité des parasites au traitement par le Dihydroartémisinine n'a été observée pour toutes les lignées de parasites recruescents par rapport à leur WT (Tableau V).

**Tableau VI** : Concentrations inhibitrices à 50% des parasites phénotypiquement

Médicaments	Parasites	CI <sub>50</sub> (nM)				Autres parasites de terrain
		3D7_FS	3D7_MM	EEF209	EEF192	
M5717	Sauvage	0.42	1.5	0.4	0.93	Pas de parasites mutants détectés.
		0.55	0.7	0.3	0.6	
		0.42	0.63	0.55	0.38	
	Mutant	89.74	102.1	2814	226.8	
		68.53	172.8	3030	173.7	
		77.86	159.8	2034	176.5	
DHA	Sauvage	0.43	1.3	0.43	0.83	
		0.44	1.24	0.27	0.47	
		0.46	0.93	0.4	0.18	
	Mutant	0.21	1.1	0.35	0.71	
		1.28	0.17	0.14	0.46	
		0.36	0.19	0.32	0.17	

### 5.4.3. Confirmation par séquençage de la sélection des parasites recrudescents au traitement de M5717 :

Sur la base de nos résultats, les parasites recrudescents ont été séquencés afin d'identifier les éventuels points de mutations dans l'eEF2 responsables de la diminution de la sensibilité au M5717 (Tableau VI). Le séquençage du parasite EEF209, isolat clinique de terrain, qui présente le plus grand décalage de la CI<sub>50</sub> entre les parasites WT et recrudescents, a permis d'identifier la mutation Y186C (Tableau VI) dans le site eEF2 de *P. falciparum* qui confère une résistance de haut niveau (décalage de plus de 6 000 fois de la concentration inhibitrice semi-maximale [CI<sub>50</sub>]). Avec la mutation L775F, une autre mutation précédemment décrite capable de conférer une résistance de haut grade (13), a été identifiée dans la souche de laboratoire 3D7\_FS avec le décalage le plus faible de la CI<sub>50</sub>. Le séquençage des deux derniers parasites, 3D7\_MM et EEF192, a montré la mutation E134V dans le site eEF2 de *P. falciparum*.

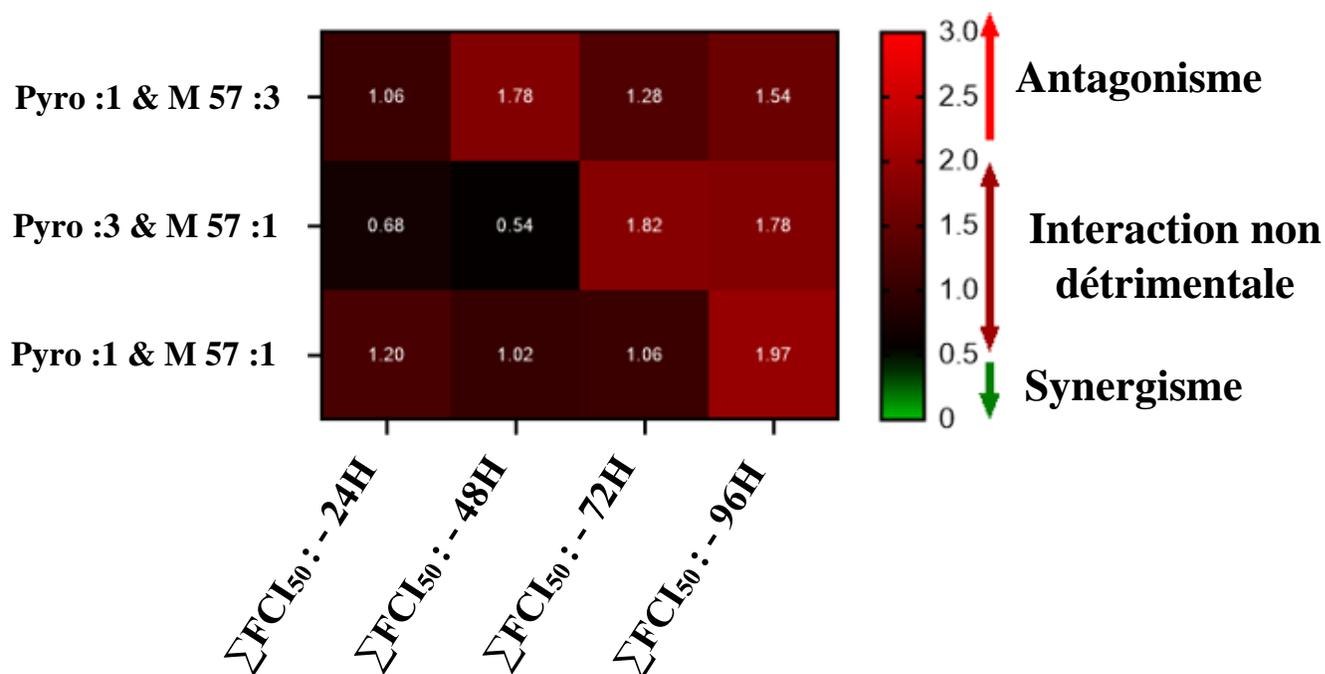
**Tableau VII** : Résumé du séquençage des parasites recrudescents au traitement de M5717.

Nom d'échantillon	Souche	Résistance	CI <sub>50</sub> (nM)	Génome de référence	Position SNP dans Pf3D7_14 5110	Allèle sauvage	Allèle mutant	Acide aminé sauvage	Acide aminé mutant	Marqueur moléculaire
3D7_FS-MT	3D7	Haute	78,71	3D7	2256	A	T	L	F	<b>L755F</b>
3D7_MM-MT	3D7	Haute	144,9	3D7	401	A	T	E	V	<b>E134V</b>
EEF209-MT	Parasite de terrain	Haute	2626	3D7	557	A	G	Y	C	<b>Y186C</b>
EEF192-MT	Parasite de terrain	Haute	192,33	3D7	401	A	T	E	V	<b>E134V</b>

## 5.5. Test d'isobogramme basé sur les données de pharmacodynamie :

### 5.5.1. Le M5717 ne montre aucune interaction avec la Pyronaridine par la méthode de calcul de la somme fractionnelle des Concentration Inhibitrice à 50 ( $\Sigma FIC_{50}$ ) :

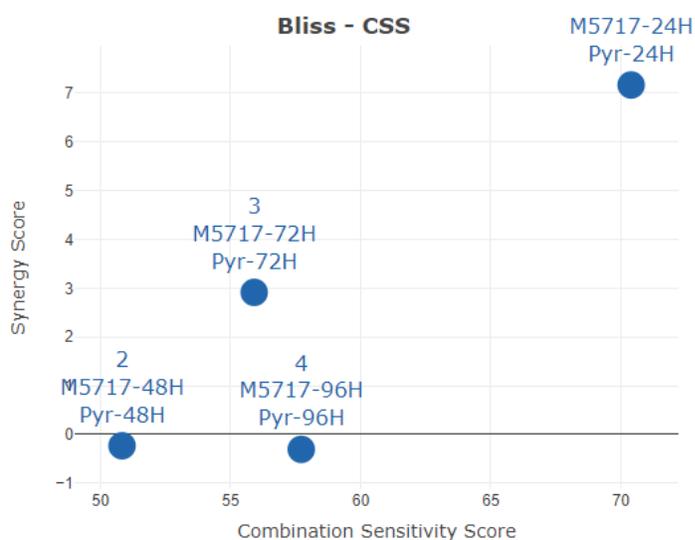
La sensibilité *ex vivo* des combinaisons ont été évaluée sur 3 différentes souches de *P. falciparum* isolés directement sur le terrain. Les parasites ont été exposés à différentes concentrations de M5717 et de Pyronaridine (1 : 3 ; 3 : 1 et 1 : 1) et l'inhibition de la croissance des parasites de même que leurs viabilités ont été surveillées aux temps 24, 48, 72 et 96 heures après exposition. Après incubation suivant les différent temps, la moyenne des concentrations inhibitrices fractionnelles ( $\Sigma FCI_{50}$ ) furent calculées pour déterminer les interactions. Ainsi quand la  $\Sigma FCI_{50}$  est supérieure à 2 on parle d'antagonisme ; si elle est inférieure ou égale à 0.5 on parle de Synergisme et quand elle est comprise entre 0,5 et 2 ( $0,5 \leq \Sigma FCI_{50} < 2$ ) on parle d'interaction indéterminée. Ainsi, nous avons remarqué que les valeurs de nos  $\Sigma FCI_{50}$  à tous les temps sont comprise entre 0,5 et 2 (Figure 13), ce qui suggère qu'il n'y a pas d'interaction déterminée entre la Pyronaridine et le M5717 par la méthode ( $\Sigma FCI_{50}$ ).



**Figure 17** : Heatmap plot montrant les interactions par la méthode de calcul des CI50 fractionnelle.

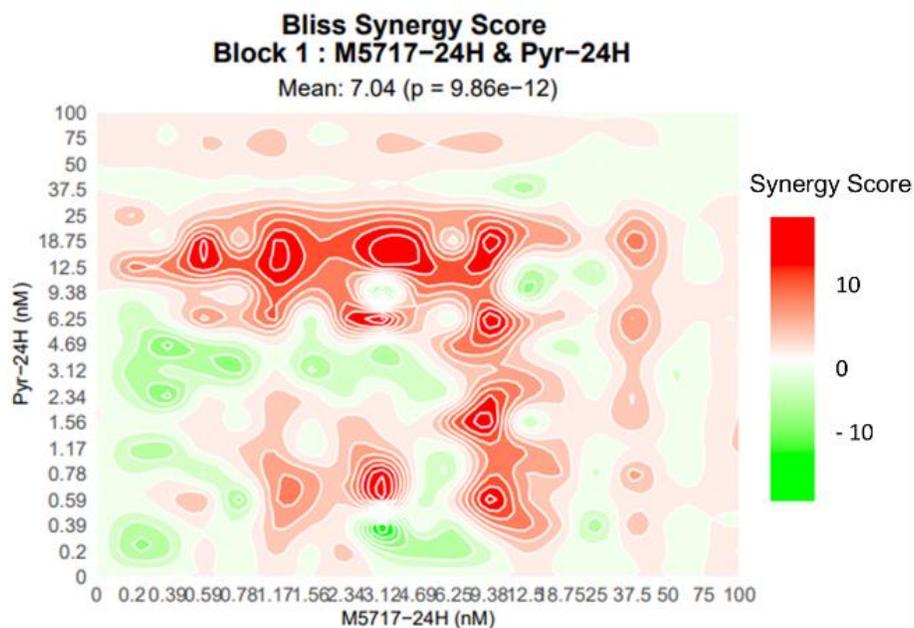
### 5.5.2. L'interaction M5717 – Pyronaridine tend vers une additivité par la méthode de prédiction de Bliss (Modèle de référence) :

La méthode de calcul des IC50 fractionnaires étant une méthode statique, elle est donc limitée dans la prédiction des interactions médicamenteuses. Ainsi nous avons utilisé SynergyFinder2 (un outil de prédiction des interactions médicamenteuses) pour prédire de façon dynamique les interactions M5717 – Pyronaridine en les comparant à un modèle préexistant dit de Bliss (modèle de référence). Le modèle de Bliss suggère qu'il y a zéro interaction entre deux ou plusieurs médicaments combinés ayant des mécanismes d'action différents. La Pyronaridine et M5717 ayant un mécanisme d'action différent justifiant ainsi le choix du modèle de Bliss. La SynergyFinder2 se base sur ce modèle de référence pour prédire les interactions entre la Pyronaridine et le M5717 en calculant la synergie score en fonction de la sensibilité de la combinaison (Figure 14). Les valeurs de la synergie score déterminent la nature des interactions (axe des Y) et les valeurs de la sensibilité score déterminent l'efficacité (taux d'inhibition de la population parasitaire en %) de la combinaison (axe des X). Ainsi si la valeur de la synergie score est supérieure à 10 : on dit que l'interaction est synergique, si elle est comprise entre 10 et -10 : on parle d'additivité et si elle est inférieure à -10 : on parle d'antagonisme. Ainsi sur la Figure 14, on a remarqué que la combinaison Pyronaridine -M5717 à toutes les heures tend vers une additivité (synergie score comprise entre 10 et -10), cependant l'effet additive est plus stable dans les combinaisons à 48h, 72h et 96h (synergie score très proche de zéro) qu'à 24h qui se rapproche du synergisme (Synergie score > 10).

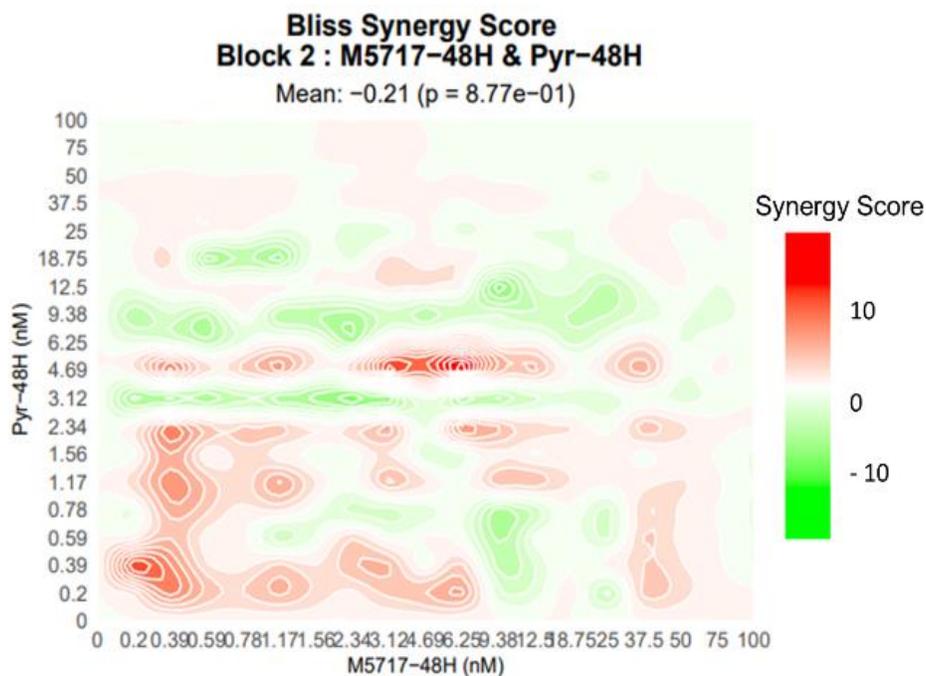


**Figure 18 :** Interaction médicamenteuse par détermination de la synergie score en fonction du score de sensibilité de la combinaison.

Illustration du résultat de l'interaction médicamenteuse par la méthode de prédiction de Bliss (Modèle de référence).

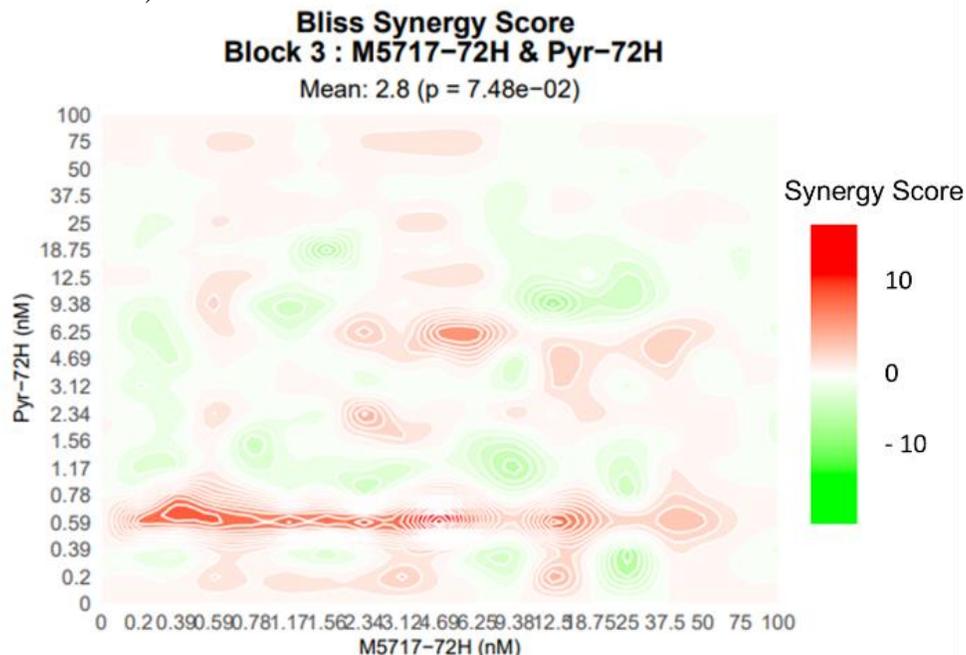


**Figure 19:** Diagramme thermique Prediction des interactions M5717-Pyronaridine par la méthode de Bliss après 24h.

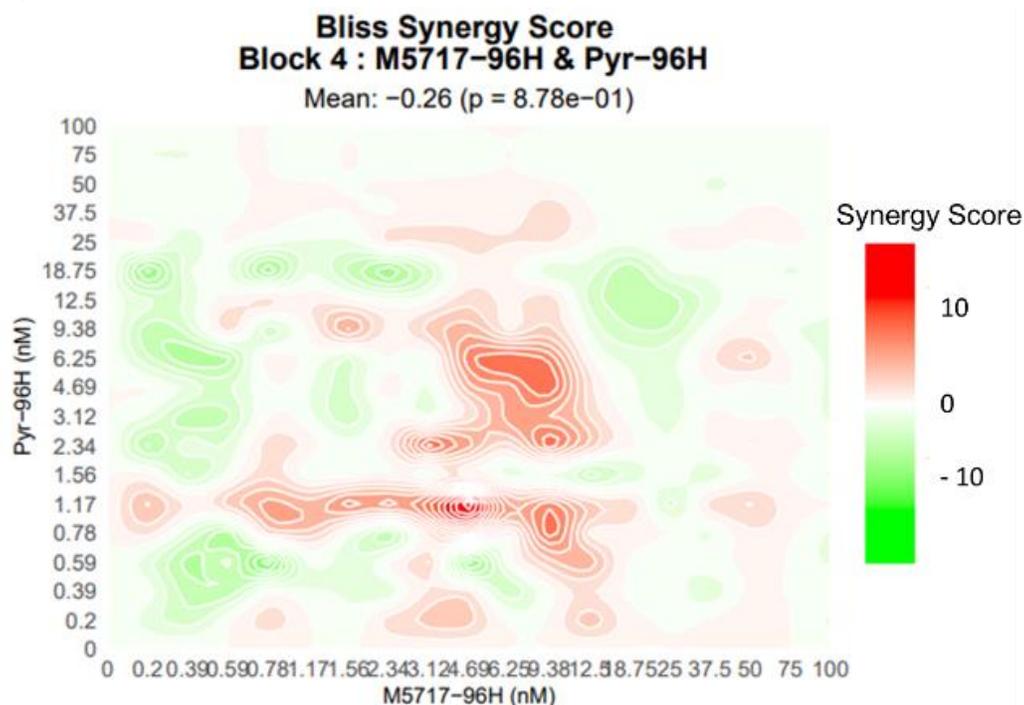


**Figure 20 :** Diagramme thermique prédiction des interactions M5717-Pyronaridine par la méthode de Bliss après 48h.

Illustration du résultat de l'interaction médicamenteuse par la méthode de prédiction de Bliss (Modèle de référence).



**Figure 22 :** Diagramme thermique prédiction des interactions M5717-Pyronaridine par la méthode de Bliss après 72h.



**Figure 21 :** Diagramme thermique prédiction des interactions M5717-Pyronaridine par la méthode de Bliss après 96h.

La méthode de prédiction de SynergyFinder2 basée sur le modèle de Bliss. Nous avons observé que sur les images d'illustrations de diagramme thermique une clarté progressive en fonction du temps d'incubation sur la carte thermique respectivement à 24h, 48h, 72h et 96h. Ceci nous indique une additivité entre la Pyronaridine et le M5717 avec une moyenne des synergies scores des temps d'incubation : 7,04 ; -0,21 ; 2,8 et -0,26 et valeur  $p$  :  $p = 9.86 \times 10^{-12}$ ,  $p = 8.77 \times 10^{-01}$  ;  $p = 7.48 \times 10^{-02}$  et  $p = 8.78 \times 10^{-01}$  toujours dans un intervalle de l'additivité en fonction de synergie score.

# DISCUSSION

## 6. Discussions :

*Plasmodium* est un parasite intra érythrocytaire qui est obligé de prendre le contrôle de son hôte, détourner sa machinerie pour synthétiser et transporter les protéines nécessaires à son développement. Tout composé capable de cibler la synthèse ou le transport des protéines est un candidat prometteur dans la lutte contre le paludisme. Le M5717, un inhibiteur du facteur 2 d'élongation s'inscrit dans cette lancée. En effet, le facteur 2 d'élongation est un gène indispensable à la synthèse des protéines chez les eucaryotes.

Plusieurs études ont été effectuées sur des souches de laboratoire de *P. falciparum* (Dd2, 3D7 et 7G8) montrant une sensibilité des parasites de laboratoire au M5717 (13,102,103). Dans cette étude, nous avons effectué un test *ex-vivo* de M5717 sur des isolats cliniques de *P. falciparum* et de *P. malariae* provenant du terrain (Kati, Faladjé). Nos résultats ont montré une excellente activité contre non seulement des isolats de terrain de *P. falciparum* mais également contre les isolats de terrain de *P. malariae*. Les  $CI_{50}$  du M5717 avoisine celle du Dihydroartémisinine (DHA) chez *P. falciparum* et est légèrement en dessous de celle du DHA chez *P. malariae* ce qui suggère que le M5717 est non seulement efficace sur *P. falciparum* mais aussi sur *P. malariae* qui est responsable de 2% des cas de paludisme au Mali (104). Cependant nos résultats sont comparable à une étude précédemment effectuée sur les isolats de terrain de *P. malariae* et *P. falciparum* par Aniweh et al (104).

L'émergence des parasites résistants aux antipaludiques actuels entrave les efforts de lutte contre le paludisme (105,106) et le M5717 ne fait pas exception. Des points de mutations sur le gène facteur 2 de d'élongation (*eEF2*) sont connus pour rendre des souches de laboratoires résistants au M5717 à travers des études *in-vitro* et *in-vivo* sur un modèle de souris et chez l'homme (13,107)(108). Nos résultats rapportent également que cette résistance peut se propager sur les isolats de terrain exposés aux médicaments en monothérapie. Nous avons observé des parasites phénotypiquement résistants (recrudescence) au médicament candidat M5717 par le calcul des concentrations inhibitrices à 50% ( $CI_{50}$ ) (Tableau V). Notre résultat est similaire à une étude effectuée dans le cadre de l'évaluation du risque de résistance pour les antipaludiques en développement (109).

Le séquençage ciblé du locus de *eEF2* suivi par l'analyse bio-informatique de l'ADN des parasites recrudescents, nous a permis d'identifier des mutations d'une haute résistance au M5717 avec des

changements nucléotidiques majoritairement de nucléotide (A en T) de l'allèle sauvage à l'allèle mutant (Tableau VI). Nous observons que ces mêmes points de mutations ont été retrouvés dans un modèle de souches de laboratoire *in-vitro* et *in-vivo* dans le modèle de souris *P. berghei*, et chez l'homme (85,107,109). A la différence de ces études précédentes, nos résultats font une exception importante en reflétant les réalités du terrain.

En effet les travaux récents sur des souris humanisées ont montré la Pyronaridine comme étant un potentiel partenaire thérapeutique pour le développement du M5717 (87). Cependant nos travaux ont montré qu'il n'existe pas d'interaction détrimentale entre la Pyronaridine et le M5717 par la méthode de calcul de la somme des CI<sub>50</sub> fractionnaires (Figure12). Cette interaction est une interaction d'additivité confirmée par la méthode de prédiction de Bliss avec les moyennes des synergies scores (Figure 13). Nous observons par la prédiction de Bliss que plus le temps d'incubation augment l'effet d'additivité devient plus stable. Nous pensons que l'interaction entre M5717 et Pyronaridine semble être une interaction Temps – Concentration dépendante.

Cependant, pour mieux étudier cette interaction entre M5717 – Pyronaridine nous suggérons de nouvelles données qui prennent en compte les variabilités génétiques des parasites avec une analyse basée sur la méthode du Checkerboard et sur un modèle plus adapté qui prend en compte les limites des méthodes précédentes comme « General Pharmacodynamic Interaction (GPDI) » (112)(113). Contrairement aux méthodes actuelles (méthode d'isobogramme, la méthode de concentration inhibitrice fractionnelle (FCI) et le modèle de la prédiction de Bliss), elles sont faciles à implémenter mais moins flexible à interpréter les résultats produits. Ces approches sont limitées, elles nécessitent la connaissance préalable des mécanismes d'actions et ne tient pas comptes la cinétique entre les médicaments et les parasites(113).

# CONCLUSION

## **7. Conclusion et perspective :**

Les résultats de cette étude montrent que le M5717 seul est efficace sur les isolats cliniques de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium malariae* de Kati Faladjé. Malgré l'efficacité de M5717 seul, des parasites mutants ont pu être générés avec une haute résistance à M5717. La combinaison entre M5717 et la Pyronaridine a un avantage pharmacodynamique additif par le modèle de prédiction de Bliss.

### **Perspective :**

Ces résultats pourront être améliorés en utilisant d'autres méthodes, comme celle basée sur les outils de modélisation mathématique par la méthode de Checkerboard et un modèle comme General Pharmacodynamic Interaction (GPDI) plus adapté qui prend en compte les limites de ces méthodes et approches précédentes.

## **8. Recommandation :**

Au regard de nos résultats nous formulons quelques recommandations suivantes :

### **Bailleurs :**

Soutenir la recherche et le développement des nouvelles molécules d'antipaludiques très efficaces.

### **Aux chercheurs :**

Continuer le criblage des molécules antipaludiques et d'optimiser les méthodes élargies du développement de nouvelles molécules pour minimiser ou d'éviter les risques de la résistance parasitaire.

### **Aux autorités sanitaires et administratives :**

Accompagner les recherches et promouvoir la recherche pour faciliter les études qui pourront aboutir au développement de médicaments efficaces. Prendre en compte les résultats des recherches, les élargir afin de mettre à jour les stratégies de lutte contre le paludisme.

## 9. Référence :

1. Mayengue PI, Kouhounina Batsimba D, Niama RF, Ibara Ottia R, Malonga-Massanga A, Fila-Fila GPU, et al. Variation of prevalence of malaria, parasite density and the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection throughout the year at three different health centers in Brazzaville, Republic of Congo. *BMC Infect Dis* [Internet]. déc 2020 [cité 31 janv 2023];20(1):190. Disponible sur: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-020-4913-3>
2. Atchade PS, Doderer-Lang C, Chabi N, Perrotey S, Abdelrahman T, Akpovi CD, et al. Is a *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) enzyme-linked immunosorbent (ELISA)-based assay a valid tool for detecting risky malaria blood donations in Africa? *Malar J* [Internet]. déc 2013 [cité 8 sept 2021];12(1):279. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-279>
3. Bichara C, Flahaut P, Costa D, Bienvenu AL, Picot S, Gargala G. Cryptic *Plasmodium ovale* concurrent with mixed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae* infection in two children from Central African Republic. *Malar J* [Internet]. déc 2017 [cité 23 mai 2022];16(1):339. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-1979-5>
4. Bass CC, Johns FM. THE CULTIVATION OF MALARIAL PLASMODIA (*PLASMODIUM VIVAX* AND *PLASMODIUM FALCIPARUM*) IN VITRO. *J Exp Med* [Internet]. 1 oct 1912 [cité 23 mai 2022];16(4):567-79. Disponible sur: <https://rupress.org/jem/article/16/4/567/6835/THE-CULTIVATION-OF-MALARIAL-PLASMODIA-PLASMODIUM>
5. Cox-Singh J, Singh B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol* [Internet]. sept 2008 [cité 23 mai 2022];24(9):406-10. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492208001797>
6. wmr2022-global-briefing-kit-fre.pdf.
7. AnnuaireSNISS\_2021.pdf.
8. Slater AFG, Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* [Internet]. janv 1992 [cité 3 juin 2023];355(6356):167-9. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/355167a0>

9. Menard D, Dondorp A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. juill 2017 [cité 16 nov 2023];7(7):a025619. Disponible sur: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a025619>
10. Le Bras J, Durand R. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. Fundam Clin Pharmacol [Internet]. avr 2003 [cité 17 nov 2023];17(2):147-53. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-8206.2003.00164.x>
11. Abd-Rahman et al. - 2022 - Scoping Review of Antimalarial Drug Candidates in .pdf.
12. Belete TM. Recent Progress in the Development of New Antimalarial Drugs with Novel Targets. Drug Des Devel Ther [Internet]. sept 2020 [cité 31 janv 2023];Volume 14:3875-89. Disponible sur: <https://www.dovepress.com/recent-progress-in-the-development-of-new-antimalarial-drugs-with-nove-peer-reviewed-article-DDDT>
13. Baragaña B, Hallyburton I, Lee MCS, Norcross NR, Grimaldi R, Otto TD, et al. A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. Nature [Internet]. 18 juin 2015 [cité 24 mai 2022];522(7556):315-20. Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/nature14451>
14. Shibeshi MA, Kifle ZD, Atnafie SA. Antimalarial Drug Resistance and Novel Targets for Antimalarial Drug Discovery. Infect Drug Resist [Internet]. nov 2020 [cité 23 mai 2022];Volume 13:4047-60. Disponible sur: <https://www.dovepress.com/antimalarial-drug-resistance-andnbspnovel-targets-for-antimalarial-dru-peer-reviewed-article-IDR>
15. Bertrand PA. FIEVRES INTERMITTENTES ET QUINQUINA A LA COUR DE LOUIS XIV. 1999;
16. Roussel P. Alexandre le Grand. :13.
17. WHO\_MONO\_27\_(2ed)\_(part1)\_fre.pdf.
18. Orsi F, Zimmermann JB. Le marché des antipaludéens, entre régulation et défaillance: Mondes En Dév [Internet]. 19 juin 2015 [cité 17 nov 2023];n° 170(2):21-40. Disponible sur: <https://www.cairn.info/revue-mondes-en-developpement-2015-2-page-21.htm?ref=doi>

19. Ringwald P. Les antipaludiques actuels : résistances, nouvelles stratégies. Bull Académie Natl Médecine [Internet]. oct 2007 [cité 17 nov 2023];191(7):1273-84. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001407919329462>
20. Rapport 2021 sur le paludisme dans le monde, Données et tendances régionales. 2021;15.
21. D. WEINMAN RM. Infectious blood diseases of man and animals, volume II, academic press,. 1968. 576 p.
22. World Health Organization. World Malaria Report. Vol. WHO/HTM/GM, World Health. 2010. 238 p.
23. Gunalan K, Niangaly A, Thera MA, Doumbo OK, Miller LH. Plasmodium vivax Infections of Duffy-Negative Erythrocytes: Historically Undetected or a Recent Adaptation? Trends Parasitol. 2018;34(5):420-9.
24. Win TT, Jalloh A, Tantular IS, Tsuboi T. Herzensfluss-Institut - Lebensberatung Partnerschaftsheilung-Wirbelsäulenbegradigung. 2004;10(7):1235-40.
25. Tachibana M, Tsuboi T, Kaneko O, Khuntirat B, Torii M. Two types of Plasmodium ovale defined by SSU rRNA have distinct sequences for ookinete surface proteins. Mol Biochem Parasitol. 2002;122(2):223-6.
26. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite plasmodium ovale occur globally. J Infect Dis. 2010;201(10):1544-50.
27. Collins WE, Jeffery GM. Plasmodium malariae : Parasite and Disease. 2007;20(4):579-92.
28. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M, Asia S east. Biology of f Human Malaria Plasmodia Including Plasmodium Knowlesi. Mediterr Jounal Hemotology Infect Dis. 2012;4(1).
29. Taylor T ATMalaria. Hunter's Trop Med Emerg Infect Dis [Internet]. 2013;695-717.
30. Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-singh J, et al. Erratum: Anaemia in African children: Malaria or iron deficiency? (Lancet (2003) 361 (2249-50)). Lancet. 2003;362(9394):1504.

31. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. BIOLOGY OF HUMAN MALARIA PLASMODIA INCLUDING PLASMODIUM KNOWLESII. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 9 mars 2012 [cité 25 mai 2022];4(1):e2012013. Disponible sur: <http://www.mjhid.org/index.php/mjhid/article/view/2012.013>
32. Sandosham AA. *Perspectives in Medicine: Malaria*. :16.
33. Hume JCC, Lyons EJ, Day KP. Human migration, mosquitoes and the evolution of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* [Internet]. mars 2003 [cité 23 mai 2022];19(3):144-9. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492203000084>
34. Rodriguez MH, Hernández-Hernández F de la C. Insect–malaria parasites interactions: the salivary gland. *Insect Biochem Mol Biol* [Internet]. juill 2004 [cité 26 mai 2022];34(7):615-24. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174804000657>
35. Argy N, Houzé S. Épidémiologie et cycle parasitaire d'un fléau mondial, le paludisme. *Actual Pharm* [Internet]. mars 2018 [cité 13 nov 2023];57(574):18-20. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0515370018300041>
36. PALUDISME D'IMPORTATION.pdf.
37. Macpherson GG. A Quantitative Ultrastructural Analysis of Parasitized Erythrocyte Sequestration. 1985;17.
38. Danthu C. Le paludisme, une symptomatologie aspécifique. *Actual Pharm* [Internet]. mars 2018 [cité 2 nov 2022];57(574):21-4. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0515370018300053>
39. Danthu C. Le paludisme, une symptomatologie aspécifique. *Actual Pharm* [Internet]. mars 2018 [cité 23 mai 2022];57(574):21-4. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0515370018300053>
40. Ho et al. - 2013 - The Cognitive Mediation Model Factors Influencing.pdf.
41. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors* [Internet]. 2010 [cité 26 mai 2022];3(1):5. Disponible sur: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-3-5>

42. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae* : Parasite and Disease. Clin Microbiol Rev [Internet]. oct 2007 [cité 26 mai 2022];20(4):579-92. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00027-07>
43. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae* : Parasite and Disease. Clin Microbiol Rev [Internet]. oct 2007 [cité 26 mai 2022];20(4):579-92. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00027-07>
44. Schuster FL. Cultivation of *Plasmodium* spp. Clin Microbiol Rev [Internet]. juill 2002 [cité 26 mai 2022];15(3):355-64. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.15.3.355-364.2002>
45. Zaw MT, Lin Z. Two sympatric types of *Plasmodium ovale* and discrimination by molecular methods. J Microbiol Immunol Infect [Internet]. oct 2017 [cité 26 mai 2022];50(5):559-64. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1684118216301396>
46. WHO\_MAL\_94.1070\_fre.pdf.
47. Thellier et al. - 2002 - Diagnosis of malaria using thick bloodsmears defi.pdf.
48. Ambroise Thomas P PC et al. Le diagnostic du paludisme: actualités et perspectives. Cah Santé Ed. 1993;
49. microscopy in the diagnosis of malaria.pdf.
50. Organisation mondiale de la Santé. Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme [Internet]. 2e ed. Genève: Organisation mondiale de la Santé; 2014 [cité 7 juin 2022]. 2 p. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/164472>
51. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. J Clin Microbiol [Internet]. mars 2006 [cité 7 juin 2022];44(3):1087-9. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.44.3.1087-1089.2006>
52. Hollingdale MR. Is culture of the entire *Plasmodium* cycle, in vitro, Now a Reality? Parasitol Today. 1992;8(7):223.
53. Schuster FL. Cultivation of *Plasmodium* spp. Society. 2002;15(3):355-64.

54. Russell B, Suwanarusk R, Malleret B, Costa FTM, Snounou G, Kevin Baird J, et al. Human ex vivo studies on asexual *Plasmodium vivax*: The best way forward. *Int J Parasitol.* 2012;42(12):1063-70.
55. Aguiar ACC, Pereira DB, Amaral NS, De Marco L, Krettli AU. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* ex vivo susceptibility to anti-malarials and gene characterization in Rondônia, West Amazon, Brazil. *Malar J.* 2014;13(1):1-7.
56. Mascarenhas A, Chery L, Gomes E, Rathod PK, Ferreira MU, Duraisingh T. Enhanced Ex Vivo *Plasmodium vivax* Intraerythrocytic Enrichment and Maturation for Rapid and Sensitive Parasite Growth Assays. 2018;1-9.
57. Camargo-Ayala PA, Cubides JR, Niño CH, Camargo M, Rodríguez-Celis CA, Quiñones T, et al. High *Plasmodium malariae* prevalence in an endemic area of the colombian amazon region. *PLoS ONE.* 2016;11(7):1-17.
58. Yman V, Wandell G, Mutemi DD, Miglar A, Asghar M, Hammar U, et al. Persistent transmission of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* species in an area of declining *Plasmodium falciparum* transmission in Eastern Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(5):1-16.
59. Roucher C, Rogier C, Sokhna C, Tall A, Trape JF. A 20-year longitudinal study of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* prevalence and morbidity in a West African population. *PLoS ONE.* 2014;9(2):1-13.
60. Betson M, Clifford S, Stanton M, Kabatereine NB, Stothard JR. Emergence of Nonfalciparum *Plasmodium* Infection Despite Regular Artemisinin Combination Therapy in an 18-Month Longitudinal Study of Ugandan Children and Their Mothers. *J Infect Dis.* 2018;217(7):1099-109.
61. Fuehrer HP, Noedl H. Recent advances in detection of *Plasmodium ovale*: Implications of separation into the two species *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):387-91.
62. Langford S, Douglas NM, Lampah DA, Simpson JA, Kenangalem E, Sugiarto P, et al. *Plasmodium malariae* Infection Associated with a High Burden of Anemia: A Hospital-Based Surveillance Study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(12):1-16.

63. Dembele L, Diallo N, Sogore F, Diarra B, Ballo FI, Daou A, et al. *Ex Vivo Plasmodium malariae* Culture Method for Antimalarial Drugs Screen in the Field. ACS Infect Dis [Internet]. 12 nov 2021 [cité 2 nov 2022];7(11):3025-33. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.1c00262>
64. Huang R yue, Pei L, Liu Q, Chen S, Dou H, Shu G, et al. Isobologram Analysis: A Comprehensive Review of Methodology and Current Research. Front Pharmacol [Internet]. 29 oct 2019 [cité 23 juill 2022];10:1222. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.01222/full>
65. Marti GE, Stetler-Stevenson M, Blesing JJH, Fleisher TA. Introduction to Flow Cytometry. :7.
66. Cady FM, Morice WG. Flow Cytometric Assessment of T-cell Chronic Lymphoproliferative Disorders. Clin Lab Med [Internet]. sept 2007 [cité 12 juill 2022];27(3):513-32. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272271207000492>
67. Villas BH. Flow cytometry: an overview. Cell Vis J Anal Morphol. 1998;5(1):56-61.
68. published\_guideline\_7661-7\_1.pdf.
69. Stone W, Mahamar A, Sanogo K, Sinaba Y, Niambele SM, Sacko A, et al. Pyronaridine–artesunate or dihydroartemisinin–piperaquine combined with single low-dose primaquine to prevent Plasmodium falciparum malaria transmission in Ouélessébougou, Mali: a four-arm, single-blind, phase 2/3, randomised trial. Lancet Microbe [Internet]. janv 2022 [cité 17 nov 2022];3(1):e41-51. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666524721001920>
70. Llanos-Cuentas A, Lacerda MV, Rueangweerayut R, Krudsood S, Gupta SK, Kochar SK, et al. Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of Plasmodium vivax malaria (DETECTIVE): a multicentre, double-blind, randomised, phase 2b dose-selection study. The Lancet [Internet]. mars 2014 [cité 10 nov 2022];383(9922):1049-58. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613625684>
71. C. BISSEYE. Thèse de doctorat, Université de Ouagadougou, Burkina Faso. 2011.

72. Pascale Vandoolaeghe LS. Le vaccin antipaludique RTS,S/AS01 chez les enfants âgés de 5 à 17 mois au moment de la première vaccination The RTS,S/AS01 malaria vaccine in children aged 5-17 months at first vaccination. 2018;8688:1-15.
73. Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: In-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(12):1043-9.
74. Shanks GD. Historical Review: Problematic Malaria Prophylaxis with Quinine. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 3 août 2016 [cité 7 févr 2023];95(2):269-72. Disponible sur: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.16-0138>
75. Lacava AC. Complicações oculares da terapêutica com a cloroquina e derivados. *Arq Bras Oftalmol* [Internet]. août 2010 [cité 7 févr 2023];73(4):384-9. Disponible sur: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27492010000400019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492010000400019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
76. Niu YR, Wei B, Chen B, Xu LH, Jing X, Peng CL, et al. Amodiaquine-induced reproductive toxicity in adult male rats: A MODIAQUINE I MPAIRS M ALE R EPRODUCTION. *Mol Reprod Dev* [Internet]. févr 2016 [cité 7 févr 2023];83(2):174-82. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.22603>
77. Davis TME, Hung TY, Sim IK, Karunajeewa HA, Ilett KF. Piperaquine: A Resurgent Antimalarial Drug. *Drugs* [Internet]. 2005 [cité 7 févr 2023];65(1):75-87. Disponible sur: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-200565010-00004>
78. Chan GG, Koch CM, Connors LH. Blood Proteomic Profiling in Inherited (ATTRm) and Acquired (ATTRwt) Forms of Transthyretin-Associated Cardiac Amyloidosis. *J Proteome Res* [Internet]. 7 avr 2017 [cité 7 févr 2023];16(4):1659-68. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.6b00998>
79. González R, Hellgren U, Greenwood B, Menéndez C. Mefloquine safety and tolerability in pregnancy: a systematic literature review. *Malar J* [Internet]. déc 2014 [cité 7 févr 2023];13(1):75. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-75>

80. Bouchaud O, Imbert P, Touze JE, Dodoo AN, Danis M, Legros F. Fatal cardiotoxicity related to halofantrine: a review based on a worldwide safety data base. *Malar J* [Internet]. déc 2009 [cité 7 févr 2023];8(1):289. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-8-289>
81. Croft SL, Duparc S, Arbe-Barnes SJ, Craft JC, Shin CS, Fleckenstein L, et al. Review of pyronaridine anti-malarial properties and product characteristics. *Malar J* [Internet]. déc 2012 [cité 23 mai 2022];11(1):270. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-270>
82. Meshnick SR. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol* [Internet]. déc 2002 [cité 7 févr 2023];32(13):1655-60. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751902001947>
83. Nixon GL, Moss DM, Shone AE, Lalloo DG, Fisher N, O'Neill PM, et al. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 mai 2013 [cité 7 févr 2023];68(5):977-85. Disponible sur: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dks504>
84. Nzila A. The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 4 avr 2006 [cité 7 févr 2023];57(6):1043-54. Disponible sur: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkl104>
85. Gaillard T, Madamet M, Pradines B. Tetracyclines in malaria. *Malar J* [Internet]. déc 2015 [cité 7 févr 2023];14(1):445. Disponible sur: <http://www.malariajournal.com/content/14/1/445>
86. Gaillard T, Dormoi J, Madamet M, Pradines B. Macrolides and associated antibiotics based on similar mechanism of action like lincosamides in malaria. *Malar J* [Internet]. déc 2016 [cité 7 févr 2023];15(1):85. Disponible sur: <http://www.malariajournal.com/content/15/1/85>
87. Rottmann M, Jonat B, Gump C, Dhingra SK, Giddins MJ, Yin X, et al. Preclinical Antimalarial Combination Study of M5717, a *Plasmodium falciparum* Elongation Factor 2 Inhibitor, and Pyronaridine, a Hemozoin Formation Inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 24 mars 2020 [cité 23 mai 2022];64(4):e02181-19. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02181-19>

88. Croft SL, Duparc S, Arbe-Barnes SJ, Craft JC, Shin CS, Fleckenstein L, et al. Review of pyronaridine anti-malarial properties and product characteristics. *Malar J* [Internet]. déc 2012 [cité 7 févr 2023];11(1):270. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-270>
89. Organisation mondiale de la santé. Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. Série de Rapports techniques, n° 529, Genève : Organisation mondiale de la santé., 1973;128.
90. Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*. 1994;264(5157):388-93.
91. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial target: Permeability of antibiotics. *science*. 1994;264(April):382-8.
92. WHO/ CDS/ RBM/ 2001.35. Les combinaisons thérapeutiques antipaludiques. Rapport d'une consultation technique de l'OMS.
93. Touray MG, Warburg A, Laughinghouse A, Krettli AU, Miller LH. Developmentally Regulated Infectivity of Malaria Sporozoites for Mosquito Salivary Glands and the Vertebrate Host. *J Exp Med*. 1992;175(6):1607-12.
94. COWMAN AF KS. The *pfmdr* gene homologues of *Plasmodium falciparum*. *Acta Leiden*. 1991;60(1):121-9.
95. Bray PG, Ward SA. A comparison of the phenomenology and genetics of multidrug resistance in cancer cells and quinoline resistance in *plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*. 1998;77(1):1-28.
96. Bolhuis H, Van Veen HW, Poolman B, Driessen AJM, Konings WN. Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol Rev*. 1997;21(1):55-84.
97. DURAISINGH MT, DRAKRLEY CJ, MULLER O, BAYLEY R SG et al. Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *Pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology*. 1997;177:1429-33.

98. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. Vol. 344, New England Journal of Medicine. 2001. p. 257-63.
99. NEVEU Natassia. UNE COMPLICATION MAJEURE DU PALUDISME : LE NEUROPALUDISME. 2017.
100. Ochong E, Broek I van den, Keus K. Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the Plasmodium falciparum multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates f. Am J Trop Med Hyg. 2003;69(2):184-7.
101. Fanta MS. Etude de la prévalence de Plasmodium malariae et de sa susceptibilité *ex-vivo* aux molécules à activité antiplasmodiale à Faladjé, Mali.
102. Russell B, Chalfein F, Prasetyorini B, Kenangalem E, Piera K, Suwanarusk R, et al. Determinants of In Vitro Drug Susceptibility Testing of *Plasmodium vivax*. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. mars 2008 [cité 26 oct 2022];52(3):1040-5. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01334-07>
103. Karyana M, Burdarm L, Yeung S, Kenangalem E, Wariker N, Maristela R, et al. Malaria morbidity in Papua Indonesia, an area with multidrug resistant Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum. Malar J [Internet]. déc 2008 [cité 26 oct 2022];7(1):148. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-7-148>
104. Dembele L, Aniwéh Y, Diallo N, Sogore F, Sangare CPO, Haidara AS, et al. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium falciparum* comparative susceptibility to antimalarial drugs in Mali. J Antimicrob Chemother [Internet]. 15 juill 2021 [cité 28 déc 2022];76(8):2079-87. Disponible sur: <https://academic.oup.com/jac/article/76/8/2079/6281095>
105. Rapport 2021 sur le paludisme dans le monde, Principaux messages. 2021;24.
106. Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, MacInnis B, Campino S, Rockett KA, et al. Multiple populations of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in Cambodia. Nat Genet [Internet]. juin 2013 [cité 28 déc 2022];45(6):648-55. Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ng.2624>

107. Angulo-Barturen I, Jiménez-Díaz MB, Mulet T, Rullas J, Herreros E, Ferrer S, et al. A Murine Model of falciparum-Malaria by In Vivo Selection of Competent Strains in Non-Myelodepleted Mice Engrafted with Human Erythrocytes. Keiser J, éditeur. PLoS ONE [Internet]. 21 mai 2008 [cité 24 janv 2023];3(5):e2252. Disponible sur: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0002252>
108. McCarthy JS, Yalkinoglu Ö, Odedra A, Webster R, Oeuvray C, Tappert A, et al. Safety, pharmacokinetics, and antimalarial activity of the novel plasmodium eukaryotic translation elongation factor 2 inhibitor M5717: a first-in-human, randomised, placebo-controlled, double-blind, single ascending dose study and volunteer infection study. Lancet Infect Dis [Internet]. déc 2021 [cité 15 mai 2023];21(12):1713-24. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309921002528>
109. Ding XC, Ubben D, Wells TN. A framework for assessing the risk of resistance for anti-malarials in development. 2012;
110. Nkrumah LJ, Muhle RA, Moura PA, Ghosh P, Hatfull GF, Jacobs WR, et al. Efficient site-specific integration in Plasmodium falciparum chromosomes mediated by mycobacteriophage Bxb1 integrase. Nat Methods [Internet]. août 2006 [cité 17 nov 2022];3(8):615-21. Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/nmeth904>
111. Nuralitha S, Murdiyarso LS, Siregar JE, Syafruddin D, Roelands J, Verhoef J, et al. Within-Host Selection of Drug Resistance in a Mouse Model Reveals Dose-Dependent Selection of Atovaquone Resistance Mutations. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. mai 2017 [cité 17 nov 2022];61(5):e01867-16. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01867-16>
112. Martinez-Irujo JJ, Villahnosu ML, Alberdi E, Santiago E. A Checkerboard Method to Evaluate Interactions Between Drugs.
113. Wicha SG, Chen C, Clewe O, Simonsson USH. A general pharmacodynamic interaction model identifies perpetrators and victims in drug interactions. Nat Commun [Internet]. 14 déc 2017 [cité 25 janv 2023];8(1):2129. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41467-017-01929-y>

## 10. Annexes :

### Annexes 1 : Préparation des marqueurs

Deux marqueurs sont utilisés :

#### ✓ Syber Green (SG) :

Il a la capacité de se fixer sur les acides nucléiques

- Ajoutez 2,5 µl de Syber Green 10.000X dans 497,5 µl de solution 1X HBSS pour obtenir une solution 50X de Syber Green.
- Préparer des aliquotes de 20 µl dans des tubes à centrifuger de 1,5 ml et conserver à - 20 ° C (à cette température la solution peut être conservée pendant 6 mois maximum)

#### ✓ Préparation de la solution Mitotracker (MT) :

Colore le noyau et se fixe sur les cellules en activité.

- Ajoutez 92 µl de DMSO à un tube de MT (fourni sous forme de poudre lyophilisée à 50 µg) pour obtenir un résultat de 1 mM.
- Faire une solution de 1 mM MT.
- Conserver à -20 ° C pendant 6 mois maximum.
- Ajouter 6 µl de solution de MT 1 mM à 794 µl de solution 1X HBSS pour obtenir une solution de MT de 7,5 µM.
- Préparer des aliquotes de 20 µl dans des tubes à centrifuger de 1,5 ml.
- Conserver à -20 ° C pendant 6 mois maximum.

### Annexes 2 : Processus de sélection des mutations :

**Médicament utilisé :** M5717 : IC50 = 1 nM , CI = 10 M

**Dose de M5717 pour induire une mutation et une résistance :** 5 x IC50 de M5717

- 1.25 µL de M5717 est ajouté à 10 mL de milieu complet
- Parasitémie 5 % et hématocrite 4 %.
- Gazeux à mélanger et à incuber à 37°C pendant 48h
- Lavage pour éliminer l'effet du médicament puis culture continue après 48 h d'incubation.
- La pression est répétée tous les trois cycles

✓ **Protocole pour le séquençage ciblé du gène cible *PfeEF2* de M5717 pour le dépistage des mutations de résistance**

**a. Extraction de l'ADN génomique du parasite**

Pour l'extraction de l'ADN génomique du parasite, les cultures sont d'abord lysées avec 0,1 à 0,2% de saponine. Les échantillons sont ensuite lavés deux fois avec du PBS et l'ADN génomique est extrait à l'aide du kit QIAamp DNA Blood Midi ou Mini (Qiagen).

**b. Séquençage ciblé du gène *PfeEF2* et analyse des mutations**

Le gène cible M5717 (DDD107498) *PfeEF2* (PF3D7\_1451100) est amplifié par PCR à l'aide d'amorces externes flanquant le gène entier de 2,5 kb (**Tableau 1**, p7580 et p7582). Nous utilisons KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) 1.25 mL (cat. # KK2601, Roche). L'ADN génomique d'une souche parentale sensible (par exemple, 3D7) est inclus et utilisé comme contrôle. Un exemple de mise en place du test est le suivant :

<i>Eau de qualité PCR</i>	<i>Jusqu'à 50 µL</i>
<i>2X Mélange prêt à l'emploi KAPA HiFi HotStart</i>	<i>25 µL</i>
<i>10 µM Amorce avant p7580</i>	<i>1 µL</i>
<i>10 µM Amorce inverse p7582</i>	<i>1 µL</i>
<i>ADN génomique</i>	<i>Selon les besoins (10-100 ng sont généralement suffisants)</i>

Les conditions de PCR sont les suivantes : 95°C pendant 3 minutes, 45 tours de 98°C pendant 20 secondes, 55°C pendant 30 secondes, et 68°C pendant 2,5 minutes, avec une extension finale de 3 minutes à 68°C. L'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée pour confirmer la taille du produit PCR. Le séquençage Sanger des produits PCR est effectué à l'aide de 10 amorces de séquençage couvrant le gène *PfeEF2*, en plus des amorces PCR p7580 et p7582 (**Tableau 1**).

Une couverture de séquence double brin de haute qualité à travers le gène *PfeEF2* est requise. Les séquences sont alignées sur le *PfeEF2* de type sauvage (WT) de la souche de référence du génome 3D7 et analysées pour détecter la présence de mutations. Les électrophérogrammes sont inspectés visuellement pour identifier les séquences mixtes indiquant des sous-populations multiples (voir la **figure 1** pour un exemple).

**Tableau 1.** Amorces utilisées pour l'amplification PCR et le séquençage de *PfeEF2*.

Nom de l'amorce	Séquence (5'→ 3')	Fonction PCR
p7580	CTTTACGGTAGATCAAGTTCGTG	Flanc extérieur, séquençage
p7582	AATATTACCGTGTATTTGTATGTAC	Flanc extérieur, séquençage
p7584	CATTACATATTTGTTGTAGTAGTGG	Séquençage
p7617	GTCATTATCTCTACATATACTGAC	Séquençage
p7618	CGTAATTGTGATCCTAATGGTCC	Séquençage
p7619	TCATTGTATCTGATCCAGTCGTC	Séquençage
p7620	ATGTTGTTAGTGGTGTGTATGGTG	Séquençage
p7621	CCAGAACCAAAAGATACAGTACC	Séquençage
p7622	AATCTACCCTTATCAGATGTAGG	Séquençage
p7623	TAAACGGTTGTGTTTGTITGGTG	Séquençage
p7624	GAGTACCTAATTTCTGTTCTTCTG	Séquençage
p7870	TAGCTTCTGGTAAACCTTCAGC	Séquençage

### Matériels :

1. Flacon T25 (430372 Bouchon style phénolique)
2. Centrifugeuse (GT1R Centrifugeuse Fisher Brand, Cust ref : 15868722)
3. Incubateur (Fisher Brand, version softwar 50111927-E)
4. Gaz mixte ( Air Liquide UK Limited, FDS N° 6505)
5. Congélateur (SAMSUNG RT46K6331SP/MA) 4 °C et 80 °C
6. Pipette sérologique 1 mL, 5 mL et 10 mL (TD-EX 20°C NON PYROGÉNIQUE)
7. Falcon Tube de 15 mL et 50 mL (Deltalab s.l08191 Rubi (BCH) Espagne)
8. Aspirateur (INTEGRA VACUSAFE)
9. Microscope (Carl Zeiss, Axio Lab.A1 430037-9010-000)
10. Lames de microscope 50 PCS (FROSTED)
11. Hotte de laboratoire (TELSTAR Bio-II-A)
12. Tube CryoPure 1 (réf 72 379)
13. Embouts de barrière à filtre 10µ, 200 µL et 1000 µL (Genesee Scientific : 800.789.5550)

✓ **Plan d'analyse des données :**

**Séquençage du panel de gènes ciblés**

1. Le séquençage produira des données brutes au format Fastq (lectures).
2. Les données brutes seront soumises à une analyse de contrôle de la qualité (CQ).
3. Alignement des lectures de bonne qualité à un génome de référence (Chromosome 14 de la souche 3D7) avec l'outil Hisat2
4. Appel, annotation et filtrage des variants
5. Visualisation avec IVG
6. Interprétation

## **Fiche signalétique :**

**Auteur :** SAMAKE Abdoul Karim

**Téléphone :** +223 74288343

**Adresse email :** abdoulkarimsamake7@gmail.com/abdoulksamake@icermali.org

**TITRE :** Evaluation de l'efficacité *ex-vivo* de M5717 et la pharmacodynamie de sa combinaison avec la Pyronaridine sur des isolats cliniques de *Plasmodium spp* au Mali.

**Année de soutenance :** 2022-2023

**Ville de soutenance :** Bamako

**Pays d'origine :** Mali

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et la Faculté de pharmacie (FAPH).

**Secteur d'intérêt :** Parasitologie, Biologie moléculaire

### **Introduction :**

Le déclin de plusieurs molécules antipaludiques de première intention dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* est dû à la multi-résistance en monothérapie. La combinaison thérapeutique à base d'artémisinine et ces dérivés (les CTA) sont apparier dans la lutte contre le paludisme face aux échecs des médicaments antipaludiques en monothérapie. A présent l'émergence de la résistance parasitaire est entrain de gagne d'espace en présence CTA. Un besoin urgent de nouveaux médicaments antipaludiques aux spectres larges s'imposes.

C'est dans cette lance, nous nous sommes intéresse au M5717 un inhibiteur d'élongation facteur 2 chez *P. falciparum* (*PfeEF2*). Le M5717 a été démontré très efficace en monothérapie sur des parasites souches de laboratoire en *in-vitro* et *in-vivo* sur des ras. Avec un meilleur profil, des parasites mutants résistants ont été sélections dans des parasites souches (*in-vitro* et *in-vivo*) au M5717. Pour contre carre la résistance parasitaire des souches de laboratoire le M5717 est associe en combinaison thérapeutique avec la Pyronaridine. C'est un inhibiteur de la formation d'hémozoïne dérive de la benzonaphtyridine, découvert en Chine dans les années 1970.

## Méthode :

Nous avons mené une étude d'évaluation d'action expérimentale visant à évaluer l'efficacité *ex-vivo* du M5717 sur les isolats cliniques de *P. falciparum* et *P. malariae* et la pharmacodynamie de sa combinaison avec la Pyronaridine sur les isolats cliniques de *P. falciparum*. Cette étude a été menée de janvier 2021 au mai 2022 à Faladjé village rural situé dans le cercle de Kati région de Koulikoro à 80 Km de Bamako. Faladjé est une zone où le paludisme est hyper endémique et très saisonnier. La sélection des parasites d'isolats cliniques de *P. falciparum* résistants au M5717 par la pression médicamenteuse. Le logiciel GraphPad Prism version 9 a été utilisé pour l'analyse de régression non linéaire des données, ayant été préalablement normalisée par rapport aux témoins non traités lors de la détermination des courbes doses-réponses et le calcul de la concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>). Un test d'isobogramme a été effectué à l'aide de Synergy Funder 2 une application web autonome avec des méthodes prédéfinies pour la détermination d'interaction médicamenteuse. La prédiction de Bliss est l'une, des méthodes prédéfinies pour démontrer une additivité indépendante.

## Résultats :

Sur un ensemble de quatre différents isolats d'espèces *P. falciparum* et *P. malariae* nous avons réalisé un test de sensibilité *ex-vivo* au M5717 comparé à un contrôle le Dihydroartémisinine (DHA). Nous avons observé une diminution de la population parasitaire avec une moyenne des concentrations inhibitrices à 50% du M5717 (CI<sub>50</sub>) = 1,46 nM et 3,16 nM et une moyenne (CI<sub>50</sub>) de DHA = 0,60 nM et 8,87 nM respectivement aux *P. falciparum* et *P. malariae*. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le M5717 est efficace sur les isolats de terrain de *P. falciparum* et *P. malariae*. Nous avons observé des parasites phénotypiquement résistants (recrudescence) au médicament candidat M5717 par le calcul des concentrations inhibitrices à 50% (CI<sub>50</sub>). Le séquençage ciblé du locus de *eEF2* dans l'ADN des parasites recrudescents, nous a permis d'identifier des mutations d'une haute résistance au M5717 avec des changements nucléotidiques majoritairement de nucléotide (A en T) de l'allèle sauvage à l'allèle mutant. Nous observons par la prédiction de Bliss que plus le temps d'incubation augmente l'effet d'additivité devient plus stable.

### **Conclusion :**

Les résultats de cette étude montrent que le M5717 seul est efficace sur les isolats cliniques de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium malariae* de Kati Faladjé. Malgré l'efficacité de M5717 seul, des parasites mutants ont pu être générés avec une haute résistance à M5717. La combinaison entre M5717 et la Pyronaridine a un avantage pharmacodynamique additif par le modèle de prédiction de Bliss. Ces résultats pourront être améliorés en utilisant d'autres méthodes, comme celle basée sur les outils de modélisation mathématique par la méthode de Checkerboard et un modèle comme General Pharmacodynamic Interaction (GPDI) plus adapté qui prend en compte les limites de ces méthodes et approches précédentes.

**DATA SHEET:**

**Author:** SAMAKE Abdoul Karim

**Phone:** +223 74288343

**Email:** abdoukarimsamake7@gmail.com/ abdoulksamake@icermali.org

**Title:** Evaluation of the *ex-vivo* efficacy of M5717 and the pharmacodynamics of its combination with Pyronaridine on clinical isolates of *Plasmodium spp* in Mali.

**Year of defense:** 2022-2023

**Defended in:** Bamako

**Nationality :** Malian

**Submitted to :** Bibliothèque de la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et la Faculté de pharmacie (FAPH).

**Field of interest:** Parasitology, Molecular biology

**Background:** The decline of several first-line antimalarial molecules in the treatment of *P. falciparum* malaria is due to multidrug resistance in monotherapy. Artemisinin-based combination therapies and their derivatives (ACTs) are being matched in the fight against malaria by the failure of antimalarial monotherapy drugs. At present, the emergence of parasite resistance is gaining ground in the presence of ACTs. There is an urgent need for new broad-spectrum antimalarial drugs.

With this in mind, we turned our attention to M5717, an inhibitor of elongation factor 2 in *P. falciparum* (PfeEF2). M5717 has been shown to be highly effective as a monotherapy on laboratory strain parasites *in-vitro* and *in-vivo* on mosses. With a better profile, mutant parasites resistant to M5717 were selected in parasite strains (*in-vitro* and *in-vivo*). To counter parasite resistance in laboratory strains, M5717 is combined therapeutically with Pyronaridine. Pyronaridine is an inhibitor of hemozoin formation derived from benzonaphthyridine, discovered in China in the 1970s.

**Method:**

We conducted an experimental action evaluation study to assess the *ex-vivo* efficacy of M5717 on clinical isolates of *P. falciparum* and *P. malariae* and the pharmacodynamics of its combination with Pyronaridine on clinical isolates of *P. falciparum*. This study was conducted from January 2021 to May 2022 in Faladjé, a rural village located in the cercle de Kati, Koulikoro region, 80 km from Bamako. Faladjé is an area where malaria is hyper-endemic and highly seasonal. Parasite

selection of M5717-resistant *P. falciparum* clinical isolates by drug pressure. GraphPad Prism version 9 software was used for non-linear regression analysis of the data, having been previously normalized against untreated controls when determining dose-response curves and calculating the inhibitory concentration 50% (IC50). An isobologram test was performed using Synergy Funder 2, a stand-alone web application with predefined methods for drug interaction determination. Bliss prediction is one of the predefined methods for demonstrating independent additivity.

### **Results:**

On a set of four different isolates of *P. falciparum* and *P. malariae* species, we carried out an *ex-vivo* sensitivity test with M5717 compared to a Dihydroartemisinin (DHA) control. We observed a reduction in the parasite population, with an average 50% inhibitory concentration (IC50) of M5717 = 1.46 nM and 3.16 nM and an average (IC50) of DAH = 0.60 nM and 8.87 nM respectively in *P. falciparum* and *P. malariae*. Taken together, these results suggest that M5717 is effective on field isolates of *P. falciparum* and *P. malariae*. We observed phenotypically resistant parasites (recrudescence) to the drug candidate M5717 by calculating inhibitory concentrations at 50% (IC50). Targeted sequencing of the eEF2 locus in the DNA of recrudescence parasites enabled us to identify mutations of high resistance to M5717 with nucleotide changes predominantly (A to T) from the wild allele to the mutant allele. Bliss prediction shows that the additivity effect becomes more stable as incubation time increases.

### **Conclusion:**

The results of this study show that M5717 alone is effective on clinical isolates of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae* from Kati Faladjé. Despite the efficacy of M5717 alone, mutant parasites were generated with high resistance to M5717. The combination of M5717 and Pyronaridine was shown to have an additive pharmacodynamic advantage by the Bliss prediction model. These results could be improved by using other methods, such as Checkerboard's mathematical modeling tools and a more suitable model such as General Pharmacodynamic Interaction (GPDI), which takes into account the limitations of these previous methods and approaches.

## **Serment de Galien :**

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseils 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'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**Je le jure**