

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple-Un But-Une Foi



UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020-2021

N° _____ /

**Facteurs Associés aux Mutations sur les Gènes *PfK13*,
Pfmdr1, et *Pfprt* dans la Localité Sélingué ; Mali**

THESE

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

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

Par

Mr Abdoulaye CAMARA

JURY

Président du jury : Professeur Sékou Bah

Membres : Professeur Mouctar DIALLO

Docteur Modibo TELLY

Co-directeur de thèse : Docteur Youssouf DIARRA

Directeur de thèse : Professeur Ousmane KOITA

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE
ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2020-2021

ADMINISTRATION

Doyen : Boubacar TRAORE / Professeur

Vice-doyen : Sékou BAH / Maître de Conférences

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable : Ismaël CISSE, Contrôleur des finances.

PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Mahamadou	CISSE	Biologie
4	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
5	Souleymane	DIALLO	Bactériologie-virologie
6	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
7	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
8	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
9	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
10	Alou A.	KEÏTA	Galénique
11	Mamadou	KONE	Physiologie
12	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
13	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
14	Abdourahamane S	MAÏGA	Parasitologie
15	Saibou	MAÏGA	Législation
16	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
17	Sékou Fantamady	TRAORE	Zoologie

DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MÉDICALES

1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie-parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique
6	Abdoulaye	DJIMDE	Biologie / Parasitologie
7	Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
8	Akory Ag	IKNANE	Santé publique/ Nutrition
9	Ousmane	KOÏTA	Biologie-Moléculaire
10	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
2	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/Bio-statistique
3	Bourèma	KOURIBA	Immunologie chef de DER
4	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
5	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
6	Ousmane	TOURE	Santé publique/ Santé environnement

3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie Clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biologie Clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biologie Clinique
6	Antoine	DARA	Biologie Moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie

8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
10	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
11	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOITA	Biologie Clinique
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé Publique
16	Almoustapha Issiaka	MAIGA	Bactériologie-Virologie
17	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
18	Fanta	SANGHO	Santé publique/Santé communautaire
19	Oumar	SANGHO	Epidémiologie

4. ASSISTANTS / ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/ Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Falaye	KEITA	Santé publique/Santé environnement
6	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
7	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
8	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRES DE CONFÉRENCES / MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOM	SPÉCIALITÉS
	- Néant - -		

3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGÉS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
6	Mahamane	HAIDARA	Pharmacognosie
7	Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
8	Moussa	SANOGO	Gestion
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS / ATTACHÉS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie
4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
5	Assitan	KALOGA	Législation
6	Ahmed	MAÏGA	Législation
7	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique
8	Aboubacar	SANGHO	Législation
9	Bourama	TRAORE	Législation
10	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutique
11	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
12	Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
13	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

DER : SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Benoit Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFÉRENCES / MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOM	SPÉCIALITÉS
1	Sékou	BAH	Pharmacologie, Chef de DER

3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOM	SPÉCIALITÉS
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
2	Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
6	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

4. ASSISTANTS / ATTACHÉS DE RECHERCHE

N°	PRÉNOMS	NOMS	SPÉCIALITÉS
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

DER : SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
2	Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONFERENCE / MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITES
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliqué

3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
2	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
3	Boureima	KELLY	Physiologie Médicale

4. ASSISTANTS / ATTACHES DE RECHERCHE

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

5. CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba	COULIBALY	Droit commercial
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Moussa I	DIARRA	Biophysique
7	Babacar	DIOP	Chimie
8	Aboubacary	MAIGA	Chimie organique

9	Massambou	SACKO	SCMP/SIM
10	Modibo	SANGARE	Anglais
11	Satigui	SIDIBE	Pharmacie Vétérinaire
12	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
13	Fana	TANGARA	Mathématiques
14	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
15	Mamadou B	TRAORE	Physiologie
16	Boubacar	ZIBEIROU	Physique

DEDICACE

Je dédie cette thèse :

A Allah, Le Tout Puissant et à son bien-aimé et prophète Muhammad (paix et salut sur lui) pour m'avoir prêté la vie et la santé pour réaliser ce travail.

A mes parents, pour l'éducation que vous m'avez inculquée et les sacrifices consentis à mon égard. Je ne saurais trouver les mots justes pour vous qualifier. Recevez ici, ma reconnaissance pour vos soutiens indéfectibles tout au long de mon parcours et je vous remercie infiniment qu'Allah vous donne longue vie.

A mon frère, feu Abdourahamane CAMARA, pour ton soutien. Nous prions pour le repos éternel de votre âme ainsi que pour tous nos illustres disparus. Dors en paix.

Remerciement

Mes remerciements s'adressent :

Au TOUT PUISSANT, LE TOUT MISERICORDIEUX, LE TRES MISERICORDIEUX A mon père, Amadou CAMARA, pour toutes les valeurs enseignées. Tu seras toujours dans mes prières qu'Allah te prête longue vie et la santé. J'espère que tu seras fier de moi comme je l'ai toujours été de toi !!!

A ma mère, Sokona DIAKITE, pour m'avoir offert un climat maternel sublime qui m'a permis d'arriver à ce niveau. Chère mère, tu m'as fait un prêt en assumant irréfutablement votre rôle de mère que je ne pourrai jamais vous rembourser. Ce travail est le résultat de vos prières et bénédictions de tous les jours. Puisse Allah vous donner une bonne santé et une longue vie à nos côtés.

A mes Tontons et tantes, pour vos conseils, votre soutien et vos encouragements. Spéciale mention à Tonton Bouyaki Sylla et à sa femme pour votre accompagnement durant mon cursus universitaire. Recevez ici, toutes ma gratitude. Puisse Allah vous prêter longue vie et la santé.

A mes sœurs et à mes frères : Mariam, Nantène, feu Abdourahamane, et Adama CAMARA.

Grace à vos conseils j'ai toujours eu cette confiance en moi. Merci d'être toujours là pour m'épauler dans les moments difficiles, et croyez à mon attachement fraternel très profond. Puisse Dieu nous accorder une bonne santé et une longue vie pour vivre ensemble dans l'entente et la cohésion.

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

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

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

A mes aînés **Dr Youssouf DIARRA, Dr Modibo TELLY, Dr Hamadou BOUARE, Dr Tahirou TRAORE, Dr Bakary COULIBALY,** pour leur encadrement et leurs contributions dans la réalisation de ce travail. Mention spéciale à Dr Youssouf Diarra, pour vos conseils et votre soutien.

Aux membres de la Promotion feu Moussa Harama, la onzième promotion du numerus clausus ; j'ai tissé de bon lien avec vous et j'espère que nous continuerons cette sincère collaboration dans la vie professionnelle.

A mes amis de la faculté, Mamadou Sangaré, Dr Oumar COULIBALY, Dr Issiaka BAGAYOKO, Sinè DIAKITE, Alassane DJIRE, Dr Seydou Zié SANOGO, Dr Abdoulaye SISSOKO, Dr Kabiné DOUMBIA, Demba SAMAKE, Dr Souleymane KABA, Ibrahim BAGAYOKO, Alpha DIALLO pour les moments passés à la faculté en votre compagnie. Avec vous, j'ai vu les défis de la vie se transformer en acquis. Grand merci à vous tous. Vous êtes plus que des amis, vous êtes de la famille.

A l'ADERS, Amicale des Etudiants ressortissants de la 3^{ème} Région et Sympathisants dont j'ai eu l'honneur d'être l'administrateur en 2018. Cette association fut pour moi un cadre idéal d'échanges intenses avec des camarades.

Au personnel de la pharmacie NENE et Iyatou, un grand MERCI pour votre accueil.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maitre et Président du Jury

Professeur Sékou Bah

- ✓ **Titulaire d'un PhD en Pharmacologie ;**
- ✓ **Professeur de Pharmacologie à la FAPH ;**
- ✓ **Titulaire d'un master en santé communautaire internationale ;**
- ✓ **Vice doyen de la faculté de pharmacie ;**
- ✓ **Membre du comité technique de pharmacovigilance ;**
- ✓ **Chef de service de la pharmacie hospitalière du CHU Point G**

Permettez-nous de vous remercier pour l'honneur que vous nous faites, en acceptant de présider ce jury et de juger ce travail. Votre modestie et votre caractère scientifique élevé font de vous un maître exemplaire. Soyez rassuré de mon profond respect et de ma reconnaissance. Qu'Allah vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maitre et membre du Jury

Professeur Mouctar DIALLO

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

Vous m'avez fait un grand honneur en acceptant de participer à ce Jury de Thèse. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Qu'Allah vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maitre et membre du Jury

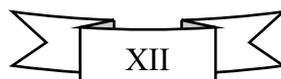
Dr Modibo TELLY

- ✓ **Pharmacien,**
- ✓ **Titulaire d'un master en Epidémiologie,**
- ✓ **Attaché de recherche au LBMA.**

Vous avez accepté de faire partie de ce Jury et de donner votre appréciation sur cette Thèse. Je vous prie de recevoir mes remerciements les plus sincères.

Abdoulaye CAMARA

Thèse de pharmacie 2021



Qu'Allah vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maitre et co-directeur de thèse

Docteur Youssouf DIARRA

- ✓ **Pharmacien ;**
- ✓ **Titulaire d'un master en Epidémiologie ;**
- ✓ **Chef d'unité de parasitologie au LBMA.**

Cher Maitre,

Votre disponibilité, votre bienveillance, votre rigueur intellectuelle ont accompagné tous ces moments d'échanges particulièrement enrichissants au cours de cette thèse. Tous mes sincères remerciements et toute mon humble reconnaissance pour ses connaissances acquises en biologie moléculaire et le partage de ses belles expériences.

Qu'Allah vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maitre et directeur de thèse

Professeur Ousmane KOITA

- ✓ **Pharmacien Biologiste (PharmD, PhD) ;**
- ✓ **Professeur Titulaire en Biologie moléculaire ;**
- ✓ **Responsable de l'enseignement de Biologie cellulaire et moléculaire à la FAPH;**
- ✓ **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée**

Cher Maitre,

Nous avons été très séduits par votre conviction pour la recherche, votre disponibilité et la qualité de votre enseignement. Ce fut un honneur pour nous d'être comptés parmi vos élèves.

Votre modestie et votre ouverture au monde des apprenants vous procurent respect et considération. Soyez-en félicité pour ce caractère !!!!

Que LE TOUT PUISSANT vous accorde santé et longue vie afin que d'autres générations d'apprenants puissent bénéficier de la qualité de votre enseignement. Amen !!!

Liste des sigles et Abréviations

ABC	ATP Binding Cassette
AL	Artémether+ Luméfantrine
ART	Artémisinine
ATP	Adénosine-triphosphate
CD36	Cluster of Differentiation 36
CQ	Chloroquine
CTA	Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
IFN-γ	Interféron gamma
EPO	Erythropoïétine
FPIX	Ferriprotoporphyrine IX
G6PD	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GMS	Greater Mekong Subregion
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HRP-2	Histidin Rich Protein 2
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL-1β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IM	Intramusculaire
INSP	Institut National de Santé Publique
IV	Intraveineuse
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LFA1	Lymphocyte Function-Associated Antigen-1
LTα	Lymphotoxin- α
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
Mdr1	Multi-drug resistance protein 1
MQ	Mefloquine
NIH	National Institutes of Health
NO	Oxyde nitrique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction

<i>Pfprt</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
<i>PfEMP1</i>	<i>P. falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
<i>PfK13</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> kelch 13
<i>Pfmdr1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug drug resistance gene 1
Pgh1	P-glycoprotein homologue 1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
QBC	Quantitative Buffy Coat
RSA	Ring Stage Survival Assay
SDRA	Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TDRs	Tests Diagnostiques Rapides
TLR	Toll-like receptors
TNF-α	Tumor Necrosis Factor- α

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Zones épidémiologiques	8
Tableau II: Plan de suivi des patients pendant 28 jours.....	34
Tableau III: Master Mix du ExoSAP	37
Tableau IV: Condition de cycling du ExoSAP cleaning	37
Tableau V: Répartition des enfants en fonction des caractéristiques socio démographiques	41
Tableau VI: Répartition des paramètres cliniques en fonction des bras d'allocation.....	42
Tableau VII: Répartition des patients en fonction de la recrudescence et de la réinfection.	42
Tableau VIII: Prévalence des mutations de <i>Pfcr</i> avant et après traitement (AA et AL)44	
Tableau IX: Prévalence des mutations de <i>Pfmdr1</i> avant et après traitement (AA et AL)	45
Tableau X: Répartition des mutations de <i>Pfcr</i> selon les tranches d'âge.....	48
Tableau XI : Répartition des mutations de <i>Pfmdr1</i> selon les tranches d'âge	49
Tableau XII: Répartition des mutations de <i>Pfcr</i> en fonction des bras d'allocation.....	50
Tableau XIII: Répartition des mutations de <i>Pfmdr1</i> en fonction des bras d'allocation..	51
Tableau XIV: Répartition des mutations de <i>Pfcr</i> en fonction des infections récurrentes.	52
Tableau XV: Répartition des mutations de <i>Pfmdr1</i> en fonction des infections récurrentes	53
Tableau XVI: Répartition des patients en fonction des paramètres cliniques et parasitologiques.....	54
Tableau XVII: Répartition des mutations de <i>Pfcr</i> en fonction des tranches de parasitémiés.	55
Tableau XVIII: Répartition des mutations du gène <i>Pfmdr1</i> en fonction des tranches de parasitémie.....	56
Tableau XIX: Répartition des mutations de <i>Pfcr</i> en fonction de la fièvre.....	57
Tableau XX: Répartition des mutations de <i>Pfmdr1</i> en fonction de la fièvre.....	58
Tableau XXI: Répartition des mutations de <i>Pfcr</i> en fonction du taux d'hémoglobine ..	59
Tableau XXII: Répartition des haplotypes de <i>Pfmdr1</i> en fonction du taux d'hémoglobine	60
Tableau XXIII : Prévalence des mutations de <i>PfK13</i> avant et après traitement	60

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de développement du <i>Plasmodium</i>	10
Figure 2: Mécanismes d'induction de la fièvre palustre.....	12
Figure 3: Phénotypes d'adhérence impliqués dans le phénomène de séquestration parasitaire	14
Figure 4: Deux mécanismes proposés de sensibilité et de résistance à l'artémisinine chez <i>Plasmodium falciparum</i>	19
Figure 5: Prévalence des mutations de Kelch 13 impliquées dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine entre 2010 et 2020 à travers le monde (D'après WWARN Molecular Surveyor).....	21
Figure 6: Prévalence des mutations de <i>mdr1</i> impliquées dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine et leurs molécules partenaires entre 2010 et 2020 à travers le monde (D'après WWARN Molecular Surveyor).....	24
Figure 7: Topologie et fonction du transporteur de résistance à la chloroquine de <i>Plasmodium falciparum</i> (<i>Pfcr</i>)	26
Figure 8: Carte sur l'origine et la migration des souches de <i>P. falciparum</i> résistantes à la CQ construit à partir de l'identification des haplotypes microsatellites en amont du gène <i>Pfcr</i>	27
Figure 9: Les déterminants de résistance aux antipaludiques	30
Figure 10: Répartition des patients selon les caractéristiques de dépistages.....	41

Tables des matières

1	INTRODUCTION	1
2	OBJECTIFS	4
2.1	Objectif principal	4
2.2	Objectifs spécifiques.....	4
3	GENERALITES	5
3.1	Epidémiologie du paludisme	5
3.1.1	Aspects généraux sur le paludisme	5
3.1.1.1	Situation du paludisme dans le monde	5
3.1.1.2	Situation du paludisme en Afrique	5
3.1.1.3	Situation du paludisme au Mali	6
3.1.2	Transmission du paludisme	6
3.1.3	Immunité contre le paludisme	7
3.1.3.1	L'immunité naturelle	7
3.1.3.2	L'immunité acquise	7
3.1.4	Zones épidémiologiques et indices	7
3.1.4.1	Zones épidémiologiques	7
3.1.4.2	Indices paludométriques	8
3.2	Agent pathogène	8
3.3	Hôte humain et cycle du paludisme.....	9
3.4	Signes cliniques du paludisme.....	10
3.4.1	Les formes simples du paludisme	10
3.4.1.1	Paludisme asymptomatique	10
3.4.1.2	Paludisme symptomatique.....	11
3.4.2	Paludisme grave	13
3.5	Diagnostic biologique.....	15
3.6	Traitement du paludisme	16

3.6.1	Paludisme non compliqué à <i>P. Falciparum</i>	16
3.6.2	Paludisme non compliqué à <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i>	16
3.6.3	Paludisme non compliqué chez les femmes enceintes	17
3.6.4	Paludisme grave	17
3.7	Prevention du paludisme	17
3.8	Chimiorésistance	18
3.8.1	Mutation dans le domaine hélicoïdal de la protéine Kelch (K 13).....	18
3.8.1.1	Définition.....	18
3.8.1.2	Mécanisme de survenue.....	18
3.8.1.3	Répartition	20
3.8.2	Polymorphisme du gène multi-drug résistance et leur nombre de copies (MDR	
1)	21	
3.8.2.1	Définition.....	21
3.8.2.2	Mécanisme de survenue.....	21
3.8.2.3	Répartition	22
3.8.3	Protéine du gène crt du <i>P. falciparum</i> (<i>Pfcr</i>)	24
3.8.3.1	Définition.....	24
3.8.3.2	Mécanisme de résistance	24
3.8.3.3	Répartition	26
3.9	Les facteurs associés à la résistance aux antipaludiques	28
4	MATERIEL ET METHODES.....	31
4.1	Cadre de l'étude.....	31
4.1.1	Lieu de l'étude.....	31
4.2	Enrôlement et suivi des patients	32
4.2.1	Type et période de l'étude	32
4.2.2	Critères d'inclusion	32
4.2.3	Critères de non inclusion.....	33

4.2.4	Déroulement du processus de l'enrôlement	33
4.3	Suivi des patients	33
4.3.1	Plan de suivi des patients	34
4.3.2	Collectes et traitement des échantillons	34
4.4	Traitement des échantillons dans le Laboratoire	35
4.4.1	Extraction d'ADN et Géotypage des échantillons	35
4.4.2	Séquençage des gènes <i>Pfk13</i> , <i>Pfmdr1</i> et <i>Pfcr1</i>	35
4.5	Analyse des séquences après séquençage.....	39
4.6	Considérations éthiques et déontologiques.....	39
4.7	Gestion et analyse des données	40
5	RESULTATS.....	41
5.1	Aspects cliniques et démographiques.....	41
5.2	Aspects moléculaires	43
6	COMMENTAIRES ET DISCUSSION	62
7	CONCLUSION.....	66
8	RECOMMANDATIONS	67
9	REFERENCES	68
10	ANNEXES	XXI
10.1	Annexe 1.....	XXI
10.2	Annexe 2.....	XXIII
10.3	Annexe 3.....	XXV

INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie potentiellement mortelle provoquée par des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques du genre *Anopheles* infectés, appelés « vecteur du paludisme ». Il existe 5 espèces de *Plasmodium* susceptibles de causer la maladie à l'homme dont deux sont redoutables à savoir : le *P. falciparum* et le *P. vivax*(1).

A l'échelle mondiale, le paludisme reste une priorité de santé publique car c'est l'une des premières causes infectieuses de mortalité dans les zones endémiques (2). Plus de 40% de la population mondiale soit 3,3 milliards de personnes vivent dans ces zones (3) . En 2019, l'OMS estime qu'il eut 229 millions de cas de paludisme et 409 000 cas de décès dans le monde dont 94% en Afrique, plus particulièrement dans la zone subsaharienne (4). Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituent les groupes les plus vulnérables face à cette maladie (1). Au Mali, le paludisme est le premier motif de consultation, d'hospitalisation et de mortalité dans les structures sanitaires(5). Selon le PNLP, 1 757 292 cas confirmés et 186 cas de décès ont été rapportés en 2018 dont 34,32% des cas étaient des enfants de moins de 5 ans (6).

Des études épidémiologiques et de génétique moléculaire ont récemment montré que la résistance aux dérivés de l'artémisinine était principalement médiée par des mutations dans le domaine de l'hélice de la protéine Kelch de *PfK13* (7). Le gène *Pfk13* qui code pour cette protéine, est situé sur le chromosome 13 et porte plusieurs mutations ponctuelles associées à un changement d'acide aminé dont cinq, N458Y, Y493H, R539T, I543T et C580Y, sont associés à la résistance aux dérivés de l'artémisinine (8). Parmi ces mutations, le C580Y est le marqueur le plus répandu en Asie du Sud-Est et a récemment été détecté en Guyane française et en Papouasie-Nouvelle-Guinée (9). En Afrique, où l'efficacité des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisines reste encore élevée, le mutant K13 le plus retrouvé est l'allèle A578S. De plus, une émergence de la mutation R561H a été récemment observée au Rwanda (9–11). A ce jour, aucune des mutations associées à la résistance partielle à l'artémisinine dans le gène *PfK13* n'a été trouvée au Mali. Cependant, des polymorphismes synonymes (T478T, Y493Y, K503K et Q613Q) et non synonymes (A522C, A578S et G638R) ont été identifiées dans certaines études (10,12).

La base génétique de la résistance à l'artémisinine n'étant pas totalement connue, plusieurs polymorphismes comme le nombre de copie du gène *Pfmdr1* ou des mutations spécifiques dans les codons 86, 184, 1034, 1042 et 1246 ont été associées à une diminution de sensibilité à

l'artémisinine ainsi qu'aux molécules partenaires (13). Situé sur le chromosome 5, le gène *Pfmdr1* code pour l'homologue 1 de la glycoprotéine P (*Pgh1*), un transporteur de type ABC (14). Des études sur *Pfmdr1* ont identifié cinq mutations d'acides aminés répandues dans le monde, dont deux mutations amino-terminales (N86Y et Y184F) plus fréquentes en Asie et en Afrique et trois mutations carboxy-terminales (S1034C, N1042D et D1246Y) plus retrouvées dans les isolats sud-américains (7). Les mutations N86Y, Y184F et D1246Y ont également été observées dans certaines études menées au Mali avec une diminution de sensibilité à l'AL chez les parasites porteurs de l'haplotype N86, 184 F et D1246 (N F D) tandis que l'haplotype 86Y, Y184 et 1246Y (YYY) était associé à une diminution de la sensibilité à l'ASAQ (10,15).

Un autre marqueur important dans la résistance aux antipaludiques est le gène *Pfcr1*. Situé sur le chromosome 7, *Pfcr1* code pour une protéine transporteur de la membrane de la vacuole alimentaire du *Plasmodium falciparum*. Deux haplotypes majeurs de ce gène (*Pfcr1* -CVIET et *Pfcr1* -SVMNT) sont associés à la résistance aux médicaments en particulier la chloroquine et les molécules partenaires tels que l'amodiaquine et la piperaquine (16,17). L'haplotype *Pfcr1* -CVIET est largement répandu en Afrique et en Asie tandis que *Pfcr1* -SVMNT est plus retrouvé dans les régions d'Amérique du Sud, d'Asie et du Pacifique (16). La mutation K76T est le principal médiateur de la résistance à la chloroquine, en augmentant l'exportation de la chloroquine de la vacuole alimentaire, ainsi loin de sa cible (17).

L'apparition et l'extension des résistances aux antipaludiques dépendent des facteurs liés aux parasites, aux propriétés de chaque antipaludique et à l'état immunitaire des patients (18). Quant aux facteurs liés aux parasites, la biomasse parasitaire est associée à l'apparition des mutants résistants. Un grand nombre de ces mutations apparaissent au hasard lors des divisions cellulaires réalisées par le *Plasmodium* au cours de la méiose chez le moustique et la mitose chez l'hôte humain (14). De plus, tout comme les virus, les parasites possèdent une variabilité génétique qui leur permettent d'échapper au système immunitaire de l'hôte et de créer une chimiorésistance (19). Un autre facteur important est l'utilisation des médicaments à des concentrations sous optimales de principe actif à la suite de l'administration de dose incomplète ou de médicaments contrefaits. En outre, il a été démontré que l'utilisation continue de l'artémisinine en monothérapie peut sélectionner des parasites résistants (14).

En plus des facteurs précités, l'état du système immunitaire du patient joue un rôle primordial dans l'efficacité du traitement. Dans les zones de faible transmission, les patients n'ont pas les mécanismes de défense immunitaire nécessaires pour contrôler les infections indépendamment de la sensibilité aux antipaludiques, qui se traduit par une proportion élevée d'infections

symptomatiques dans ces zones contrairement aux zones de forte transmission, où les infections sont asymptomatiques(14,20). Indépendamment du temps d'exposition au parasite, l'âge de l'hôte reste un facteur important pour le développement d'une immunité protectrice contre un large répertoire antigénique du parasite même si cette immunité reste fragile (21). Cependant, certaines caractéristiques de l'hôte et du parasite avant traitement, y compris la densité initiale du parasite ($\geq 100\ 000 / \mu\text{L}$ de sang), l'âge du patient (<5 ans), le taux d'hémoglobine (<10 g / dL) et une température corporelle ($\geq 37,5$ °C) ont été retrouvés associées à un retard de clairance parasitaire après traitement par CTA en Tanzanie (22).

Même si ces facteurs c'est-à-dire l'âge, la parasitémie, le taux d'hémoglobine et la température corporelle ont été décrits comme associés à un retard de clairance parasitaire après traitement par CTA, on ne sait pas s'ils sont responsables de la persistance de la parasitémie au cours du suivi, comme précédemment observée en Tanzanie, plutôt que de la sensibilité réduite des parasites aux dérivés de l'artémisinine (22). La présente étude vise à identifier s'il existe une association entre ces facteurs (l'âge, la parasitémie, le taux d'hémoglobine et la température corporelle) et la présence des mutations sur les gènes *PfK13*, *Pfmdr1* et *Pfcrt*. La connaissance de ces facteurs pourrait aider les biologistes dans la recherche de solution pour stopper l'émergence des parasites mutants et l'obtention des traitements adaptés. Ceci pourrait aussi aider à appréhender la gestion de ces parasites mutants d'un point de vue clinique.

L'hypothèse que nous voulons tester dans la présente étude est la suivante : les facteurs parasitologiques et cliniques tels que la parasitémie, l'âge, le taux d'hémoglobine et la température corporelle ne seraient pas associés aux mutations sur les gènes *PfK13*, *Pfmdr1* et *Pfcrt*.

OBJECTIFS

2 OBJECTIFS

2.1 Objectif principal

Déterminer les facteurs parasitologiques et cliniques associés aux mutations des gènes *PfK13*, *Pfmdr1* et *Pfcrt* à partir des isolats collectés dans la commune rurale de Sélingué.

2.2 Objectifs spécifiques

- ✓ Estimer la prévalence des souches de *P. falciparum* recrudescents en utilisant les marqueurs *msh1*, *msh2* et *glurp* ;
- ✓ Estimer la fréquence des mutations ponctuelles sur les gènes *PfK13*, *Pfmdr1* et *Pfcrt* des cas d'échecs thérapeutiques en utilisant la méthode Sanger ;
- ✓ Identifier les facteurs parasitologiques, cliniques et démographiques associés aux mutations sur les gènes *PfK13*, *Pfmdr1* et *Pfcrt*.

GENERALITES

3 GENERALITES

Le paludisme est l'une des maladies infectieuses les plus importantes au monde et son histoire s'étend jusqu'à l'antiquité. Il est dû à une infection des hématies par des protozoaires du genre *Plasmodium* qui sont transmis à l'homme par l'anophèle femelle lors d'un repas sanguin (23,24). Sur 172 espèces de *Plasmodium*, cinq espèces causent la maladie à l'homme. Il s'agit de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi* (25). Parmi ces cinq, le *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus virulente car 90% des décès liés au paludisme lui sont attribués(3).

3.1 Epidémiologie du paludisme

3.1.1 Aspects généraux sur le paludisme

3.1.1.1 Situation du paludisme dans le monde

Le paludisme reste la principale cause de mortalité dans le monde. C'est la maladie la plus répandue en Afrique et en Asie, avec le plus grand nombre de cas indigène tandis que dans les pays développés, les cas de paludisme sont importés des zones d'endémies palustres. De façon globale, le taux de mortalité dû au paludisme varie de 0,3 à 2,2% et, de 11 à 33% dans les cas de formes sévères de paludisme dans les régions à climat tropical (25). On estime à 229 millions, le nombre de cas de paludisme produits dans le monde en 2019 et à 409 000 le nombre de décès associés. La plupart de ces cas (94%) ont été enregistrés en Afrique suivie de l'Asie du Sud Est (3%), de la Méditerranée orientale et du Pacifique occidental. Les enfants de moins de 5 ans sont les plus vulnérables représentant 67 % (274 000) des décès survenus dans le monde en 2019 (4).

Dans la période allant 2000 à 2019, l'incidence du paludisme a reculé sur le plan mondial, passant de 80 à 57 cas pour 1000 personnes à risque. Aussi, le taux d'incidence a considérablement ralenti entre 2015 et 2019, tombant à 2% en 2015 et demeurant ainsi jusqu'à nos jours (4).

3.1.1.2 Situation du paludisme en Afrique

L'Afrique est la région de l'OMS la plus touchée avec 215 millions de cas enregistrés en 2019, soit 94% de la charge mondiale. Durant la même année, le nombre de décès associé à la maladie était de 384 000 cas, soit une baisse de 44% par rapport au chiffre de l'année 2000 (4). La quasi-totalité de ces infections étaient dues à *Plasmodium falciparum*. Sur 29 pays les plus touchés, 5 pays de cette région à eux seuls, ont représenté plus de la moitié des cas de paludisme survenus dans le monde : le Nigéria (27 %), la République démocratique du Congo (12 %), l'Ouganda

(5 %), le Mozambique (4%) et le Niger (3 %). Cependant, de 2000 et 2019, l'incidence du paludisme a baissé dans cette région passant de 363 à 225 cas sur 1000 personnes à risque(4).

Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes courent un risque beaucoup plus élevé que d'autres de contracter le paludisme et d'être gravement atteints. En 2019, près de 12 millions de femmes enceintes auraient été exposées à une infection palustre dans 33 pays de cette région où la transmission du paludisme est modérée à élevée (4). Durant cette même année, la prévalence de l'exposition au paludisme pendant la grossesse a été plus forte dans la sous-région Afrique centrale (40 %) suivie de près par la sous-région Afrique de l'Ouest (39%) tandis que dans les sous-régions de l'Afrique de l'Est et du Sud, la prévalence était de 24% (4).

3.1.1.3 Situation du paludisme au Mali

Au Mali, le paludisme est la première cause de consultation, d'hospitalisation et mortalité dans les différentes structures sanitaires. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes paient chaque année le plus lourd tribut de cette maladie (5). Selon le rapport du PNL, en 2018, les formations sanitaires ainsi que les agents de santé communautaire ont répertorié 3 457 267 cas suspects de paludisme parmi lesquels 2 345 481 cas ont été confirmés. Le taux de létalité palustre estimé sur la même période est de 1,33‰, soit 1001 décès sur 244 533 cas graves confirmés. 34,32% des cas confirmés étaient les enfants de moins de 5 ans (6).

3.1.2 Transmission du paludisme

Le mode de transmission le plus fréquent du paludisme est la piqûre de moustique femelle infecté du genre *Anophèles* mais cependant, d'autres voies de transmission sont possibles selon la phase sanguine du cycle de développement tels que la transmission congénitale, transfusionnelle, par greffe d'organe ou transmission accidentelle chez les personnels de santé par manipulation du sang contaminé. En pratique, ces transmissions sont tout à fait exceptionnelles et n'influencent pas l'épidémiologie de la maladie (26). La transmission du paludisme nécessite des conditions climatiques, telles que le régime de précipitations, la température et l'humidité (température > 18°C pour *P. falciparum* et > 16° pour *P. vivax*) et l'altitude (< 1500 m en Afrique) (27).

Schématiquement, il existe 5 faciès épidémiologiques de paludisme en Afrique dont le Mali est situé dans le faciès sahélien des savanes sèches et des steppes où la transmission saisonnière est courte < 6 mois (Paludisme instable) (28). Au Mali, On distingue 5 zones de transmission saisonnière :

Une zone de transmission saisonnière longue de 4 à 6 mois (zone soudano-guinéenne) ;

Une zone de transmission saisonnière courte de 3 à 4 mois (zone sahélo-soudanienne) ;

Une zone de transmission sporadique, voire épidémique (zone saharienne) correspondant aux régions du nord (Gao, Tombouctou et Kidal), certains districts des régions de Koulikoro (Nara) et de Kayes (Nioro, Yélimané, Diéma et Kayes) ;

Une zone de transmission saisonnière bi ou plurimodale du delta intérieur du Niger et des barrages (Sélingué, Manantali et Markala) ;

Une zone de transmission faible, peu propice à l'impaludation en milieu urbain comme Bamako (29).

3.1.3 Immunité contre le paludisme

L'immunité contre le paludisme est un facteur extrêmement important qui soulève de nombreuses questions. Elle est complexe et peut être répartie en deux : l'immunité naturelle et acquise (26,27).

3.1.3.1 L'immunité naturelle

Bien qu'encore imparfaitement connus, il existe des facteurs génétiques conférant probablement une immunité naturelle ou partielle chez certains sujets. Des facteurs érythrocytaires (le trait drépanocytaire (AS), le groupe sanguin Duffy négatif) ou non érythrocytaires (le groupe HLA, le polymorphisme de la réponse immune et les facteurs ethniques) ont été évoqués comme étant impliqués dans l'établissement de cette immunité (26).

3.1.3.2 L'immunité acquise

Elle s'acquiert progressivement en réponse à une situation d'exposition continue. Cette immunité n'est pas stérilisante et ne permet pas d'éliminer totalement le parasite. Ce qui explique qu'en zone de transmission intense, les enfants payent un lourd tribut à cette maladie, à partir de leur jeune âge (4 à 6 mois) lorsque la protection maternelle transmise devient moins importante et jusqu'à l'âge de 4 à 6 ans. Progressivement une tolérance du sujet s'établit face à des parasitémies de plus en plus importantes. En zone de transmission intense, il est exceptionnel qu'un sujet adulte fasse un accès grave. Les caractéristiques de cette protection, lui valent la désignation « état de prémunition » au lieu de l'immunité (26).

3.1.4 Zones épidémiologiques et indices

3.1.4.1 Zones épidémiologiques

La variation de transmission du paludisme d'une région à l'autre permet de définir les zones épidémiologiques.

Tableau I : Zones épidémiologiques

Zones	Transmission	Immunité chez l'adulte	Type de paludisme
Holoendémique	Intense toute l'année	Solide	Paludisme stable
Hyperendémique	Intense avec variation saisonnière	Significative	Paludisme stable
Mesoendémique	Variable	Non significative	Paludisme instable
hypoendémique	Faible	Nulle	Paludisme instable

3.1.4.2 Indices paludométriques

Ces indices sont des outils permettant aux épidémiologistes d'évaluer le niveau d'endémicité d'une région donnée

Indice plasmodique (IP) : c'est le pourcentage des patients examinés ayant des hématozoaires dans le sang.

Indice splénique (IS) : c'est le nombre de sujets présentant une splénomégalie par rapport à 100 sujets examinés.

Enquêtes séro-immunologiques : elles consistent à évaluer les taux d'anticorps par classe d'âge et de suivre leurs variations saisonnières. Leur valeur est plus grande que celle de l'indice splénique car les étiologies de splénomégalies tropicales sont multiples.

Indice sporozoïtique et oocystique : c'est le pourcentage des anophèles femelles présentant respectivement des sporozoïtes dans les glandes salivaires et des oocystes sur la paroi externe de l'estomac. Elle peut refléter l'anthropophilie du moustique.

3.2 Agent pathogène

Le paludisme est causé par des protozoaires appartenant à l'embranchement des Apicomplexa et au genre *Plasmodium* (30). Environ 250 espèces de *Plasmodium* sont actuellement considérées comme parasites de mammifères, d'oiseaux et de reptiles dont plus d'une trentaine ont été signalées chez les primates non humains (Singes et Gibbons) (31). Parmi ces espèces, cinq sont connues pour infecter et induire significativement le paludisme chez l'homme. Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* (3). Ces espèces diffèrent de par leur critères biologiques, cliniques, leur répartition géographique et leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques. Dans la suite de ce travail, nous ne nous intéresserons qu'au *Plasmodium*

falciparum car il est celui qui crée le plus de résistances aux antipaludiques et est responsable des formes sévères de cette maladie (26).

3.3 Hôte humain et cycle du paludisme

Le cycle de développement du *Plasmodium* est « dixène », c'est-à-dire nécessite deux hôtes : chez l'homme, l'hôte intermédiaire, se déroule la phase asexuée alors que chez le moustique femelle (hôte définitif) a eu lieu la phase sexuée (26,30).

✓ Chez l'homme

Lors d'un repas sanguin, l'anophèle femelle infecté inocule des sporozoïtes qui après une trentaine de minutes maximum dans la peau, la lymphe et le sang ; seuls quelques-uns parviennent à gagner les hépatocytes. Une fois à l'intérieure de celles-ci, ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires ou « corps bleus » qui par la suite s'éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes dans le sang (de l'ordre 10 000 à 30 000 mérozoïtes) après une maturation de 7 à 15 jours (26).

Les mérozoïtes ainsi libérés à leur tour envahissent les érythrocytes, à l'intérieur desquels ils subissent une maturation en trophozoïtes puis en schizontes. Cette étape correspond à la phase symptomatique de l'infection et dure 24, 48 ou 72 heures selon les espèces. Après un certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes se différencient en gamétocytes mâle ou femelle qui vont rester dans le sang pendant 10 à 15 jours (26).

✓ Chez l'anophèle femelle

Les gamétocytes (mâles et femelles) ingérés lors de son repas sanguin sur un sujet infecté, se fusionnent en un œuf libre, mobile appelé ookinète qui se transforme dans le tractus digestif en oocyste après s'être fixé à la paroi externe de l'estomac. A l'intérieur de ce dernier, se multiplient les cellules parasitaires qui vont donner naissance à des centaines de sporozoïtes. Ces sporozoïtes sont ensuite inoculés avec la salive du moustique, lors de son prochain repas sanguin (26).

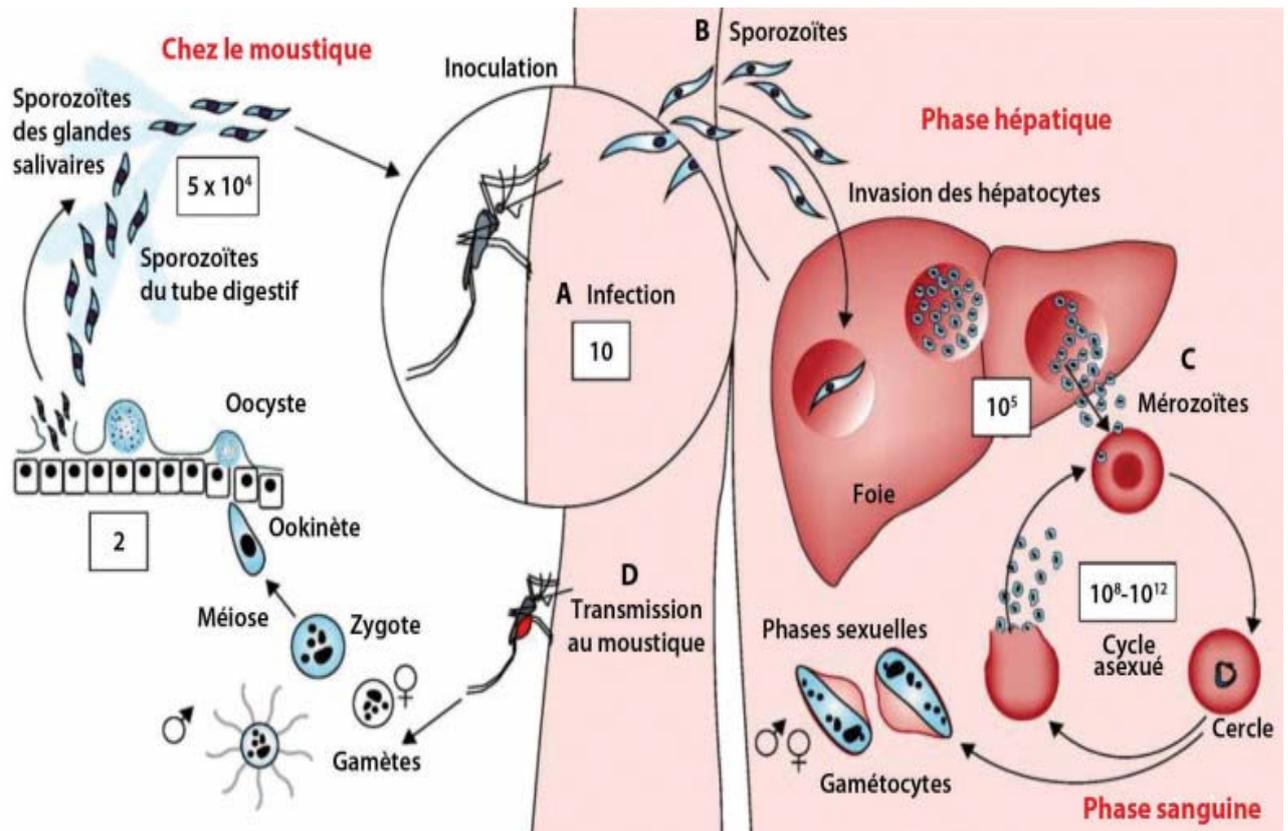


Figure 1 : Cycle de développement du *Plasmodium*

3.4 Signes cliniques du paludisme

Les symptômes du paludisme apparaissent généralement au bout d'une dizaine de jours chez les sujets non immunisés après une piqûre infestante de moustique, mais peuvent être beaucoup plus longue chez les personnes ayant acquis un certain degré d'immunité. La sévérité de ces manifestations dépend des interactions complexes entre l'hôte, le parasite et les facteurs environnementaux (1,32).

3.4.1 Les formes simples du paludisme

3.4.1.1 Paludisme asymptomatique

Comme son nom l'indique, cette forme de paludisme se produit sans symptômes manifestes, de ce fait, elle représente un vaste réservoir caché d'infection active permettant une persistance du parasite et sa propagation éventuelle à d'autres hôtes humains. Il n'y a pas de définition standard par rapport à la parasitémie asymptomatique car son impact clinique, ou seuil pyrogénique est en fonction du niveau et de la fréquence d'exposition antérieure au parasite et de l'âge de l'individu (32,33).

Le paludisme asymptomatique est plus fréquent chez les populations vivant dans les zones à moyenne et forte transmission du paludisme. Ces personnes développent une immunité contre

la maladie et le parasite qui se caractérise non seulement par une faible parasitémie mais aussi par une diminution de l'apparition des symptômes ainsi que de leur sévérité. D'autres facteurs tels que l'état de santé général, la prédisposition génétique de l'hôte, et les facteurs parasitaires associés à la virulence de l'infection peuvent favoriser la progression de l'infection palustre vers une forme asymptomatique (33).

Cependant, on sait peu de choses sur les conséquences silencieuses ou à long terme des infections asymptomatiques sur la santé. Une étude menée en Indonésie dans la région de Sumba, a révélé chez les personnes atteintes d'infections asymptomatiques, des niveaux plus élevés de marqueurs inflammatoire, du facteur de von Willebrand et du facteur plaquettaire 4 mais aussi une numération plaquettaire et un taux d'hémoglobine plus faibles contrairement aux individus non infectés (32).

3.4.1.2 Paludisme symptomatique

Les manifestations cliniques sont diverses dans leur expression et leur gravité et dépendent à la fois de l'espèce plasmodiale et de son hôte. Les symptômes d'un accès palustre simple sont peu spécifiques et similaires pour toutes les espèces, et correspondent à celui d'un syndrome pseudo grippal, ce qui rend le seul diagnostic peu fiable : fièvre, maux de tête, douleurs musculaires, affaiblissement, vomissements, diarrhées, toux (19,30).

Ces accès palustres sont caractérisés par une succession de frissons, de sueurs et de fièvre, synchronisés avec le cycle de développement et l'éclatement des globules rouges. La périodicité de ces accès fébriles varie selon les espèces : toutes les 24 heures pour *P. Knowlesi* (fièvre quotidienne), toutes les 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* (fièvre tierce) et toutes les 72 heures pour *P. malaria* (fièvre quarte) (30,32).

En effet, les accès fébriles résultent de la libération des exo antigènes parasitaires tels que l'hémozoïne et le glycosylphosphatidylinositol (GPI) après destruction des érythrocytes infectés. Ces exo antigènes sont ensuite reconnus par les récepteurs de type Toll-like (TLR), exprimés sur les cellules du système immunitaire inné (macrophages et cellules dendritiques), dont l'activation stimule une production de cytokines et médiateurs pro-inflammatoires pyrogénique. Ainsi, une reconnaissance du GPI par le récepteur TLR2 et celle de l'hémozoïne par le TLR9 entraîne une production de TNF- α , d'IL-1 β , et d'IL-6 par les macrophages. Ces cytokines pyrogènes, qui jouent un rôle majeur dans le contrôle de la multiplication parasitaire, atteindront les régions thermorégulatrices de l'hypothalamus où elles induisent une augmentation de la température (21,32).

Au fur et à mesure que la parasitémie augmente, la quantité d'exo antigènes parasites et de cytokines pro-inflammatoire augmente aussi, ce qui entraîne une élévation de la température corporelle. Ainsi la parasitémie minimale requise pour déclencher la fièvre permet de définir le seuil pyrogénique. Ce seuil varie avec l'âge chez les individus continuellement exposés au paludisme. En outre, des différences significatives ont été observées entre les seuils pyrogéniques selon différentes souches de *P. falciparum*, qui s'expliquent par une variation du niveau de virulence de celles-ci dans l'induction d'une réponse inflammatoire (32).

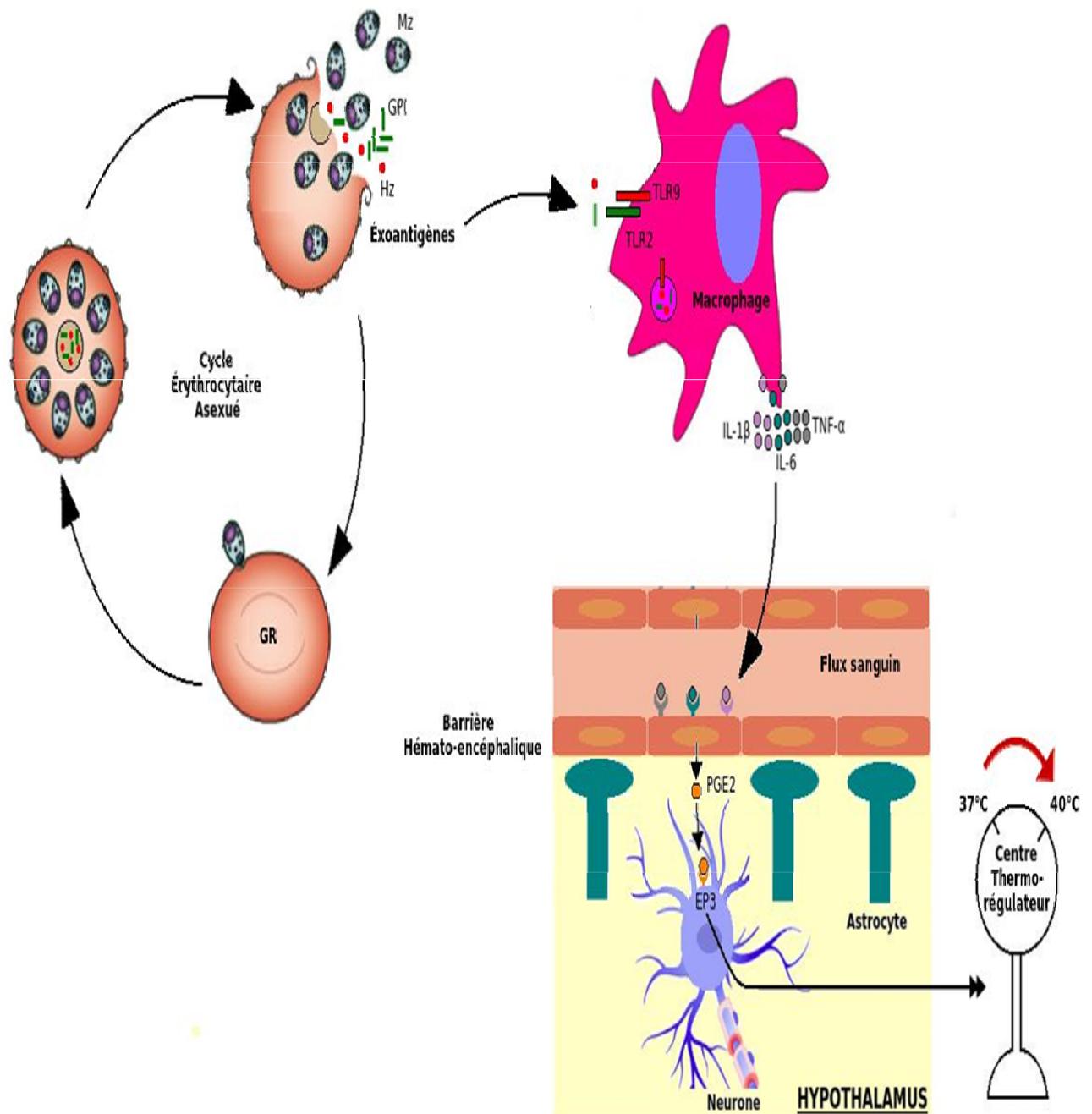


Figure 2: Mécanismes d'induction de la fièvre palustre

3.4.2 Paludisme grave

Le paludisme grave est défini selon l’OMS par la détection de formes asexuées du parasite sur un frottis sanguin et l’identification d’au moins un des critères suivants : en clinique (prostration, troubles de la conscience, détresse respiratoire, convulsions répétées, collapsus pulmonaire, saignements anormaux, ictère, hémoglobinurie) et en laboratoire (anémie sévère, hypoglycémie, acidose, insuffisance rénale, hyperlactémie, hyperparasitémie). La plupart des cas graves de paludisme sont observés avec l’espèce *P. falciparum* et dans une moindre mesure avec l’infection à *P. vivax* et *P. knowlesi* (32,33).

✓ Neuropaludisme

Le neuropaludisme ou « accès pernicieux » regroupe toutes les manifestations neurologiques qui font suite à une atteinte du système nerveux central lors d’un accès palustre. Cette forme clinique est généralement observée chez les patients non immunisés, surtout les enfants de moins de 5ans mais aussi chez les voyageurs dans le cadre du paludisme d’importation. Il se caractérise par l’apparition progressive de troubles de la conscience, d’une prostration ou de tous autres signes de dysfonctionnements neurologiques associés à une fièvre élevée et à un syndrome pseudo-grippal (21).

Deux mécanismes majeurs, interdépendants, contribuent à la pathogenèse du neuropaludisme : l’obstruction des micro-vaisseaux cérébraux suite à la séquestration des érythrocytes infectés et l’induction d’une réponse pro-inflammatoire exacerbée et l’activation des cellules endothéliales (32).

La séquestration parasitaire est l’un des principaux mécanismes physiopathologiques de l’accès palustre grave à l’origine de l’atteinte cérébrale et du paludisme gestationnel. Elle repose sur l’adhésion des globules rouges parasités à la surface des cellules endothéliales vasculaires de l’hôte et à la capacité des globules rouges parasités de s’agglutiner avec les globules rouges non parasités (rosetting) et parasités par les plaquettes (clumping) via des protubérances à la surface de la membrane du GR appelées knobs. Ces protubérances constituent le site de contact entre les cellules endothéliales et les protéines palustres exprimées à la surface des globules rouges infectés, notamment PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1) (21).

La séquestration permet aux formes matures asexuées de *Plasmodium falciparum* (trophozoïtes âgés et schizontes) de pouvoir échapper à la clairance splénique de l’hôte ainsi favorisant l’augmentation de la biomasse parasitaire par une multiplication facilitée dans l’environnement anaérobie des veinules postcapillaires (21).

L'autre mécanisme à l'origine du neuropaludisme est l'induction d'une réponse pro-inflammatoire exacerbée et l'activation des cellules endothéliales. En effet, les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, LT α), produites après libération des exo antigènes parasitaires activent les cellules endothéliales qui vont augmenter l'expression des molécules d'adhésion telles que CD36, ICAM1 et LFA1 à leur surface, exacerbant ainsi le phénomène de séquestration des globules rouges infectés, des plaquettes et des leucocytes. Après cela, elles pourront sécréter à leur tour des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines (MCP-1) contribuant aussi à l'inflammation locale, et au recrutement des leucocytes (monocytes, macrophages, neutrophiles et les lymphocytes). Par conséquent, l'inflammation locale et l'activation endothéliale pourraient être exacerbées (32).

Les principales conséquences de cette hyperactivité sont une majoration de la symptomatologie clinique, une dysrégularisation de certains mécanismes cellulaires mais également une déstabilisation de la réaction immunitaire nécessaire au contrôle du parasite par une régulation positive ou négative de chimiokines et cytokines pro- et anti-inflammatoires (21).

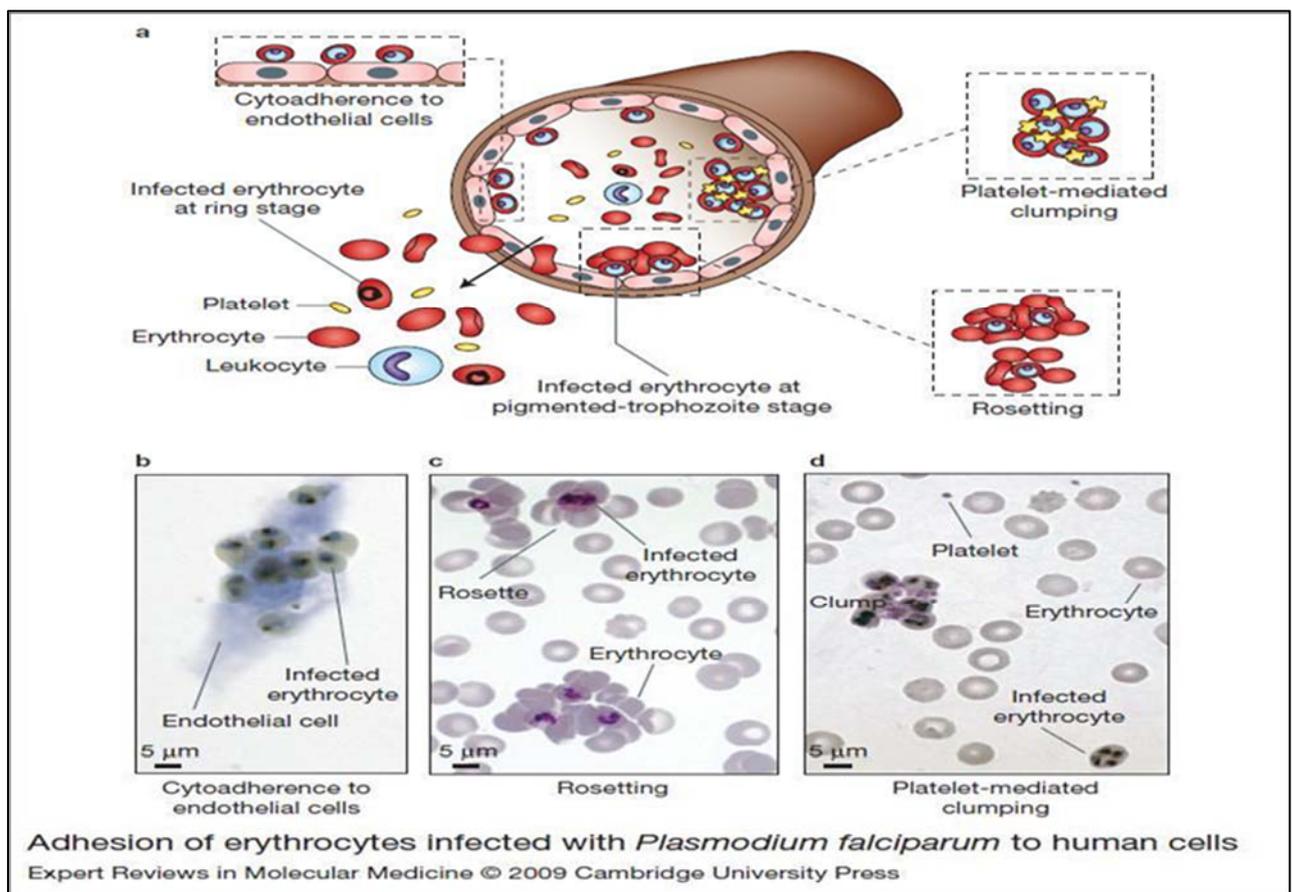


Figure 3: Phénotypes d'adhérence impliqués dans le phénomène de séquestration parasitaire

✓ **L'anémie sévère**

L'anémie sévère palustre, caractérisée par un taux d'hémoglobine inférieur à 5g/dl repose sur une élimination excessive des globules rouges infectés et sains et aussi à une anomalie de la production des érythrocytes (dysérythroïèse). Elle est due à deux processus, à savoir la rupture des hématies parasitées et la clairance splénique au cours du quelle, les globules rouges infectés ou non sont soit phagocytés par les macrophages ou soit séquestrés dans la rate. La particularité dans cette forme d'anémie palustre, est l'élimination des globules rouges non parasités par phagocytose en exploitant le processus de Rosseting, ce qui provoque ainsi leur séquestration dans la rate (32,33).

Dans les conditions physiologiques, l'érythroïèse est le processus permettant le renouvellement des globules rouges. Il s'est avéré que ce processus est perturbé lors des infections palustres entre autres par une diminution de la synthèse de l'érythropoïétine (EPO) et par l'inhibition de la réponse des progéniteurs érythrocytaires à l'EPO en raison d'un déséquilibre de la balance de cytokine pro- et antiinflammatoire. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence qu'une libération excessive d'IFN- γ et de TNF- α , associée au NO (oxyde nitrique), contribuent à une dysérythroïèse et une érythrophagocytose (32).

✓ **Détresse respiratoire**

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë est l'une des complications les plus redoutables du paludisme. Il se caractérise par l'incapacité des poumons à fonctionner correctement provoquant ainsi une augmentation de la fréquence respiratoire et une dyspnée et peut rapidement progresser vers un décès. La physiopathologie de ce syndrome reste mal connue mais il est probablement lié à une lésion de l'endothélium des capillaires pulmonaires. Tout comme dans le neuropaludisme, il a été démontré que la réponse inflammatoire exacerbée est impliquée dans le développement du SDRA (32).

3.5 Diagnostic biologique

Selon les recommandations de l'OMS, le diagnostic biologique du paludisme est considéré comme une urgence médicale imposant un rendu de résultats dans les 2 heures suivant le prélèvement. Deux techniques standards permettent le diagnostic de l'espèce et la mesure de la parasitémie, à savoir : la goutte épaisse et le frottis mince. La goutte épaisse est une technique manuelle qui consiste à examiner quelques μ l de sang après hémolyse des globules rouges colorés à la méthode de giemsa alors que le frottis mince est obtenu à partir de l'étalement d'une goutte de sang sur lame, colorée au May Grünwald Giemsa (MGG), ou Wright-Giemsa. A

défaut de l'expertise de l'examineur et du microscope, particulièrement en zone endémique, les tests de diagnostic rapide peuvent être utilisés. Ces tests ont pour principe la détection de certaines protéines spécifiques de *Plasmodium* (antigènes HRP-2 ou enzymes pLDH, aldolase), en chromatographie sur support solide (21,34).

Au-delà de ces techniques précitées, il existe d'autres techniques sophistiquées de diagnostic du paludisme tels que le QBC test malaria et les méthodes d'amplification génique (PCR, LAMP). Ces techniques sont sensibles et spécifiques et détectent des charges parasitaires très faibles ou des infections mixtes comportant plusieurs espèces, difficilement détectables en microscopie. Leurs utilisations sont fortement limitées par le coût élevé et le défaut d'accessibilité en raison de la nécessité de matériel spécifique (34).

3.6 Traitement du paludisme

3.6.1 Paludisme non compliqué à *P. Falciparum*

Selon l'OMS, les infections non compliquées à *P. falciparum* doit être traitées par les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine. Associant 2 principes actifs ayant des modes d'action différents, les CTA sont aujourd'hui les antipaludiques les plus efficaces dont on dispose. Le choix de ces CTA est basé sur le profil de résistance parasitaire local (35).

Artéméther 80 mg + Luméfantrine 480 mg, 2 fois par jour pendant 3 jours

Artésunate 200 mg + Amodiaquine 540 mg (ASAQ), 1 fois par jour pendant 3 jours

Artésunate 200 mg + Méfloquine 440 mg, 1 fois par jour pendant 3 jours

Dihydroartémisinine 40 mg + Pipéraquine 320 mg, 1 fois par jour pendant 3 jours (27).

3.6.2 Paludisme non compliqué à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*

Dans cette forme de paludisme, la chloroquine (Nivaquine) garde toujours sa place mais il convient de s'assurer du diagnostic de l'espèce. Dans les zones où la résistance de *P. vivax* à la chloroquine a été observée, les infections doivent être traitées par un CTA, de préférence une combinaison dans laquelle le médicament partenaire a une longue demi vie. À l'exception de la combinaison artésunate + sulfadoxine- pyriméthamine (AS+SP), toutes les CTA sont efficaces contre les infections à *P. vivax* au stade sanguin (26,35).

Chez l'adulte, le traitement à la Nivaquine (comprimé dosé à 100 mg) est de 5 comprimés par jour pendant 5 jours ou 6 comprimés les premier et deuxième jours et 3 comprimés le troisième jour. Afin de prévenir des cas de rechute à *P. vivax* ou *P. ovale*, la primaquine devrait être

ajoutée au traitement ; le dosage et la fréquence d'administration devront être ajustés en fonction de l'activité enzymatique de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) de chaque patient (26).

3.6.3 Paludisme non compliqué chez les femmes enceintes

A l'exception de la quinine et de l'artémisinine, les médicaments antipaludiques sont contre indiqués chez les femmes enceintes lors du premier trimestre de la grossesse en cas d'accès palustre grave. Les autres molécules utilisables en cas d'accès palustre simple sont la méfloquine durant le 2ème et 3ème trimestre de la grossesse et l'association atovaquone-proguanil pendant toute la grossesse. Chez la femme enceinte, le paludisme peut également être traité par les CTA excepté la combinaison artésunate + sulfadoxine/pyriméthamine (SP) qui ne doit pas être administrée au cours du premier trimestre de la grossesse (27,36).

Afin d'éviter une rechute à *P. vivax* ou *P. ovale* chez la femme enceinte ou la femme allaitante, il est recommandé de faire une prophylaxie hebdomadaire par 300 mg de chloroquine suivie de 14 jours de traitement à la primaquine 30 mg par jour après la fin de la grossesse/de la période d'allaitement (36).

3.6.4 Paludisme grave

Les patients atteints de paludisme grave sont traités par de l'artésunate en IV ou en IM pendant au moins 24 heures, jusqu'à ce qu'ils supportent les médicaments par la voie orale. Pour les adultes, la dose thérapeutique d'artésunate est de 2,4 mg/kg par voie parentérale au moment de l'admission (0h) puis 12h et 24h, suivie d'une fois par jour jusqu'à ce que le patient tolère un traitement de 3 jours par la voie orale. A défaut de l'artésunate, il est préférable d'utiliser de l'artéméther plutôt que la quinine (36).

La quinine intraveineuse reste l'antipaludique d'urgence. La dose de charge recommandée par l'OMS est de 24 mg/kg/j de quinine tant chez l'adulte que chez l'enfant, indépendamment de la zone géographique. Dans les zones de résistance (forêts d'Asie du sud-est et Amazonie) où les souches de *P. falciparum* sont résistantes à la quinine, la doxycycline doit être administrée en même temps que la quinine à raison de 200 mg pour les enfants de plus de 12 ans et 100 mg pour ceux de 8 à 12 ans pendant 7 jours (27).

3.7 Prévention du paludisme

La prévention du paludisme est surtout basée sur un ensemble de précaution visant à réduire le contact homme/vecteur (5). En ce sens, deux formes de lutttes antivectorielles sont efficaces dans beaucoup de situations : les moustiquaires imprégnées d'insecticide et la pulvérisation

d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations. Également, Il peut être prévenu au moyen d'une chimioprophylaxie qui supprime le stade sanguin de l'infection palustre, ce qui évite que la maladie ne se déclare (1).

Vu l'évolution de l'épidémiologie du paludisme dans certaines zones endémiques, l'OMS recommande le traitement préventif intermittent (TPI) et la chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) comme stratégie supplémentaire dans la prévention des accès palustres chez les groupes de population à haut risque (37).

3.8 Chimiorésistance

3.8.1 Mutation dans le domaine hélicoïdal de la protéine Kelch (K 13)

3.8.1.1 Définition

Par rapport à un orthologue de mammifère Keap1 connu, la protéine Kelch du parasite (« K13 ») est une protéine de 726 acides aminés qui se compose d'un domaine spécifique à *Plasmodium*, d'un domaine BTB-POZ et d'un domaine d'hélice à six pales (38,39). K13 appartient à la superfamille kelch des protéines, dont le domaine de l'hélice comporte plusieurs sites d'interaction protéine-protéine et intervient dans diverses fonctions cellulaires tels que la dégradation des protéines régulées par l'ubiquitine et les réponses au stress oxydatif (40).

3.8.1.2 Mécanisme de survenue

Les artémisinines sont des prodrogues activées par clivage du pont endo peroxyde médié par le fer hémique, entraînant la formation des intermédiaires réactifs de l'oxygène qui ciblent les groupes nucléophiles dans les protéines et les lipides du parasite. Etant donné que les protéines Kelch de mammifères peuvent détecter les oxydants et autres facteurs de stress, les mutations de l'hélice K13 étaient raisonnablement impliquées dans la résistance à l'artémisinine (38).

Chez les parasites sensibles, la protéine kelch « K13 » de type sauvage détecte des oxydants comme l'artémisinine et subit une modification conformationnelle afin de libérer le facteur de transcription, qui régule ensuite à la hausse l'expression des gènes impliqués dans la lutte contre les dommages oxydatifs. Dans cette situation, il est admis que la réponse des parasites est trop peu et trop tardive, de sorte que les artémisinines sont trop puissantes et rapides à surmonter avec succès les parasites. En revanche, les mutations de l'hélice K13, chez les parasites résistants déstabilisent l'interaction K13-facteur de transcription, ainsi conduisant à une activation de changements transcriptionnels qui « amorcent » le parasite à résister aux dommages oxydatifs causés par les artémisinines (38).

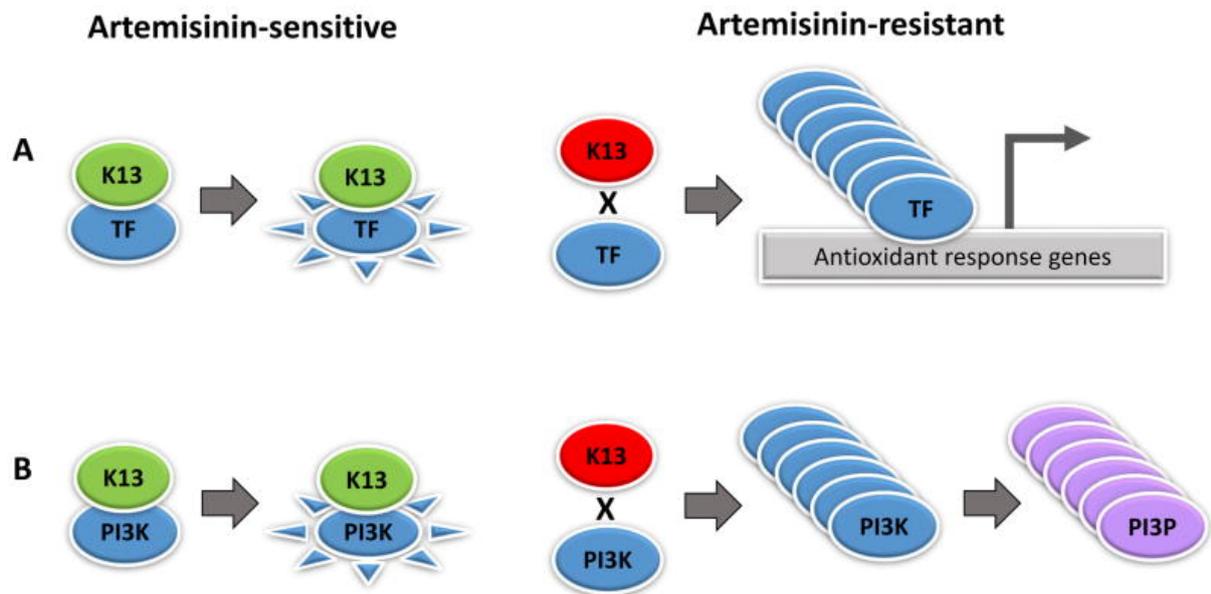


Figure 4: Deux mécanismes proposés de sensibilité et de résistance à l'artémisinine chez *Plasmodium falciparum*.

Chez les parasites sensibles, K13 de type sauvage (vert) se lie à un facteur de transcription putatif et le cible pour sa dégradation tandis que le mutant K13 en rouge ne parvient pas à se lier au facteur de transcription putatif, qui peut réguler positivement les gènes associés à la réponse antioxydante. Dans cet état, les parasites sont mieux préparés pour gérer le stress oxydatif causé à la suite de l'activation des artémisinines, par exemple, en repliant les protéines oxydées.

Chez les parasites sensibles à l'artémisinine, le K13 de type sauvage se lie à PI3K et le cible pour sa dégradation alors que chez les parasites résistants, le mutant K13 n'arrive pas à se lier à PI3K, entraînant une hausse des niveaux de PI3K et de PI3P. Les niveaux de ce dernier (PI3P) peuvent vraisemblablement favoriser la survie des parasites exposés aux artémisinines, par exemple, les événements de fusion membranaire médiatisés impliqués dans la croissance du parasite (38).

Les mutations conférant une résistance dans *Plasmodium* se trouvent soit à la surface du domaine kelch K13, ce qui pourraient justifier sa non interaction avec le substrat présenté pour l'ubiquitination ou soit dans le noyau de l'hélice où elles peuvent déstabiliser la structure K13. La façon exacte dont les mutations K13 (et les changements au niveau des locus secondaires) confèrent une résistance à l'artémisinine a intrigué les chercheurs pendant quelques années. Plusieurs hypothèses ont été avancées dont celles-ci : -une diminution de l'activation de l'artémisinine via un défaut du catabolisme de l'hémoglobine.

Une modification du stress du réticulum endoplasmique (RE) ou une réponse protéique dépliée à la hausse (réponse au stress amélioré) ou une capacité accrue à entrer dans l'état de repos.

Une expression accrue d'un substrat d'ubiquitination critique (mécanisme d'échappement post-stress) ou découplage des voies de stress et de mort cellulaire (39).

3.8.1.3 Répartition

La combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (ACT) est désormais utilisée dans le monde entier comme traitement de première intention du paludisme à *falciparum*. Cette approche très réussie est maintenant menacée par un retard significatif de la clairance parasitaire à l'artémisinine en monothérapie (41).

Plus de 200 mutations ont été rapportées dans le monde, mais seules quelques-unes (en particulier celles qui prévalent dans le GMS) ont été associées à une clairance retardée du parasite et à une sensibilité réduite au TAR dans le RSA. Même à proximité géographique du GMS, les mutations *PfK13* sont très diverses et spécifiques à la région, montrant les antécédents de consommation de drogue et les trajectoires évolutives divergentes de ces parasites (11). *PfK13*-C580Y est la mutation prédominante des parasites de la zone frontalière entre la Thaïlande et le Cambodge, le sud du Laos et le Vietnam tandis que les mutations Y493H, R539T et I543T sont plus courantes dans les zones frontalières thaïlanno-cambodgienne et thaïlanno-birmane. La mutation F446I est la plus répandue dans le nord du Myanmar et dans la zone frontalière sino-birmane et son association à la résistance aux ART ont été rapportés plusieurs fois. Dans la zone frontalière sino-birmane, plusieurs mutations sporadiques (N458Y, C469Y et F495L) ont été associées à des valeurs RSA relativement élevées (11).

A ce jour, les principales mutations observées dans les isolats africains sont le C580Y et le Y493H, trouvés respectivement dans deux échantillons du Cameroun et un échantillon du Ghana. Les mutants (P574L, A675V et R561H) précédemment observés dans le GMS, ont également été détectés au Rwanda, dont le R561H a été associé à une clairance parasitaire retardée à l'ART. La mutation A578S est la plus prédominante en Afrique car elle a été signalée dans tous les pays africains ou les mutations de *Pfk13* ont été typées (9,42).

Aucune des mutations associées à un retard de clairance parasitaire, rapporté au Cambodge et dans d'autres pays de l'Asie du Sud-Est n'a été observée au Mali. Cependant, la mutation A578S de l'hélice K13 a été trouvée dans 1 des 87 échantillons prélevés lors de l'évaluation de l'efficacité de l'artésunate en monothérapie mais n'a pas été associée à une clairance retardée.

Tout comme la mutation A578S, deux autres non synonymes, A522C et G638R, ont été signalé et n'étaient liées à un temps de clairance parasitaire prolongé (12,43).

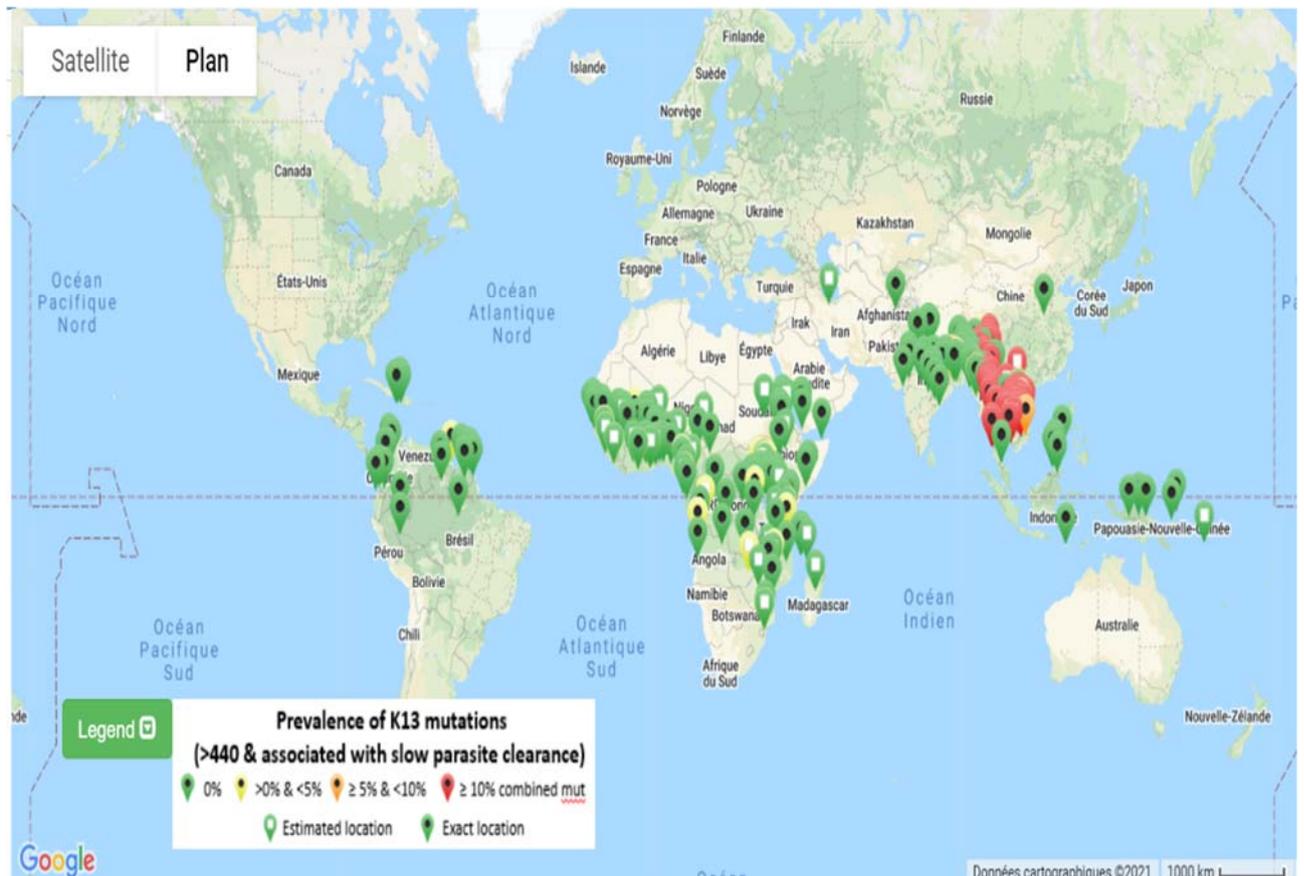


Figure 5: Prévalence des mutations de Kelch 13 impliquées dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine entre 2010 et 2020 à travers le monde (D'après WWARN Molecular Surveyor).

3.8.2 Polymorphisme du gène multi-drug résistance et leur nombre de copies (MDR 1)

3.8.2.1 Définition

La protéine Mdr1 est un transporteur de cassette de liaison à l'ATP et un homologue de la P-glycoprotéine humaine conférant une résistance multiple aux médicaments. Il a une longueur de 1419 acides aminés (pour l'isoforme 3D7) et comporte 12 domaines transmembranaires putatifs (7).

3.8.2.2 Mécanisme de survenue

Pfmdr1 ou encore appelé homologue 1 de la glycoprotéine P est un transporteur de cassette de liaison à l'ATP (ABC) et fonctionne comme une pompe à efflux. Le gène *Pfmdr1*, situé sur le chromosome 5, code pour ce transporteur (Pgh1) qui est localisé dans la membrane de la vacuole digestive avec un domaine de liaison à l'ATP dirigé vers le cytoplasme. Chez

Plasmodium, ce transporteur induirait un mécanisme auxiliaire permettant aux molécules d'entrer dans la vacuole digestive. Cependant, les transporteurs ABC sont souvent associés à la résistance multidrogue dans différents organismes. Les polymorphismes du gène *Pfmdr1*, N86Y, Y184F, S1034C, N1042D et D1246Y, affectait la spécificité du substrat suite à une altération des propriétés physicochimiques de Pgh1 liée à la substitution des acides aminés plus polaires (14,44).

Ces modifications affecteraient ainsi la capacité de liaison et le transfert de molécules et influenceraient sur la sensibilité à la LUM, l'ART, la quinine, la MQ, l'halofantrine et la CQ. Des polymorphismes à la fois sur les gènes *Pfmdr1* et *Pfcr1* agiraient également sur la sensibilité aux CTA, notamment la combinaison *Pfcr1* -76T et l'haplotype *Pfmdr1*-86Y, 164Y,1246Y qui serait associée à une recrudescence et une réinfection après un traitement à AS-AQ. De même, les allèles sauvages *Pfcr1*-K76 et *Pfmdr1*-N86 et D1246 associée à la mutation *Pfmdr1*-184F seraient sélectionnés après un traitement à AL (14).

Des études *in silico* ont montré l'influence des différentes mutations sur la résistance des médicaments. La mutation N86Y située dans la région transmembranaire 1 de la protéine provoque un changement d'affinité aux médicaments, alors que Y184F semble moduler la cinétique *Pfmdr1*. Le D1246Y modifie la fonction du transporteur ABC en fonction de son substrat. Les mutations dans les résidus 1042 et 1034, agissant comme une partie de poche de liaison pour MQ, QN, et CQ ont modifié les affinités de liaison (44).

Bien que les mutations clés du gène *Pfmdr1* affectent la sensibilité à différents antipaludiques ciblant la vacuole digestive, l'augmentation du nombre de copies du gène *Pfmdr1* a été liée à une réduction de sensibilité de *P. falciparum* aux médicaments antipaludiques, tels que les combinaisons AS-MQ et AL. Il a été rapporté que le nombre de copie du gène *Pfmdr1* plutôt que les SNP exerce une plus grande influence sur la médiation de la résistance aux médicaments antipaludiques à certains composés dû au fait que de nombreuses protéines de transport exigent une attention complémentaire concertée aux variations du nombre de copies (CNV) dans la médiation de l'activité antipaludique (14,45).

3.8.2.3 Répartition

Des études sur *Pfmdr1* ont identifié cinq mutations d'acides aminés répandues dans le monde. Les mutations amino-terminales (N86Y et Y184F) sont plus fréquentes chez les parasites asiatiques et africains, tandis que les mutations carboxy-terminales (S1034C, N1042D et D1246Y) sont retrouvées le plus souvent dans les isolats sud-américains ainsi que dans certains

isolats africains. La variante *Pfmdr1*-Y184F a été observée au Cambodge tandis que le F1226Y était plus retrouvé à la frontière entre la Thaïlande et le Myanmar. En plus de cela, une amplification génique de *Pfmdr1* a été également trouvée dans cette zone, ainsi que dans le centre de Myanmar et à l'est de la Thaïlande et le Cambodge occidental (7,44).

Dans *Pfmdr1*, les haplotypes N86, F184 et D1246 (NFD) ont été sélectionnés dans les échantillons de recrudescence après un traitement par AL. Avec l'introduction de l'artéméthér-luméfantrine en Tanzanie et au Mozambique, les tendances de la prévalence de NFD se sont avérées à la hausse ce qui confirme l'hypothèse de la pression médicamenteuse à l'AL. Les mutations D1246Y et N86Y prédisent la résistance et la recrudescence à l'AQ et à la quinine en Ouganda. Des études menées au Kenya, à Zanzibar et en Angola ont révélé un nombre notable de mutations *Pfcrt* 76T et de *Pfmdr1*-86Y associées à une récurrence de l'infection. En Afrique de l'ouest, les réinfections portaient l'allèle *Pfmdr1*-N86 plus fréquemment sous traitement ARM-LU, et 86Y a augmenté, si les personnes étaient traitées avec ARS-AQ. En 2006, au Burkina Faso, une fréquence pour les séquences de type sauvage était détectée pour Y184F dans *Pfmdr1* après traitement ARM-LU tandis qu'une fréquence élevée des mutations N51I, C59R a été observée après traitement avec AQ + SU-PY (44,45).

Au Mali, les données d'une étude ont révélé une très faible prévalence de la mutation *Pfmdr1* 86Y, qui s'est avérée être associée à une résistance à l'amodiaquine dans 2 échantillons à Dangassa et un échantillon à Nioro du Sahel. Cependant, les auteurs n'ont pas pu trouver une association entre cette mutation et la résistance à l'amodiaquine dans un essai in vivo. Étonnamment, une prévalence élevée de *Pfmdr1*-Y184F, a été également observée à la fois dans les échantillons collectés à Dangassa et à Nioro Sahel. La mutation *Pfmdr1*-Y184F est associée à une sensibilité réduite à la luméfantrine. Cette découverte est intrigante car la luméfantrine n'a jamais été mise à disposition en monothérapie au Mali (15).



Figure 6: Prévalence des mutations de *mdr1* impliquées dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine et leurs molécules partenaires entre 2010 et 2020 à travers le monde (D'après WWARN Molecular Surveyor).

3.8.3 Protéine du gène *crt* du *P. falciparum* (*Pfcr*)

3.8.3.1 Définition

Le *Plasmodium falciparum* transporteur de résistance à la chloroquine (*Pfcr*) est une protéine de 48,6 kDa contenant 424 acides aminés, 10 domaines transmembranaires et est localisé dans la vacuole digestive du parasite. Le gène *Pfcr*, situé sur le chromosome 7, code pour cette protéine (46,47).

3.8.3.2 Mécanisme de résistance

Au cours de son développement intra érythrocytaire, *P. falciparum* prend chez son hôte de grandes quantités d'hémoglobine pour satisfaire à ses besoins en nutriments et pour contrer les menaces de stabilité osmotique de la cellule hôte qui résultent d'une augmentation de la perméabilité aux ions de la membrane plasmique de l'érythrocyte infecté. La vacuole digestive du parasite sert d'organelle où l'hémoglobine endocytosée est dégradée en hème. Ce dernier par oxydation se transforme en ferriprotoporphyrine IX (FPIX) ou hématine, une substance toxique

pour le parasite. Pour détoxifier cette substance le parasite la transforme en pigment malarique ou hémozoïne (48,49).

Plusieurs molécules antipaludiques, y compris la chloroquine et la quinine interfèreraient avec la minéralisation de l'hème en formant des complexes hautement toxiques qui finissent par tuer le parasite tout en perforant les membranes intracellulaires (49).

La résistance à la chloroquine ainsi qu'aux molécules partenaires tels que l'Amodiaquine, la piperaquine est médiée par *Pfcr*t et est associée à une réduction de l'accumulation de CQ par le parasite. Il existe plusieurs hypothèses concernant la fonction de *Pfcr*t, une protéine de transport de la membrane de la vacuole digestive. Cette protéine est codée par le gène *Pfcr*t qui se trouve sur le chromosome 7. Des polymorphismes sur ce gène ont été associés à une réduction d'accumulation de la chloroquine au sein de la vacuole digestive du parasite ce qui conduit à l'hypothèse que *Pfcr*t contrôle l'accès de la CQ à sa cible (49,50).

La principale mutation conférant une résistance dans *Pfcr*t est la substitution d'une lysine (K) par une thréonine (T) à la position 76. Cette mutation se produit dans une région de la protéine qui est censée intervenir dans la reconnaissance du Substrat (50).

Malgré le grand nombre de données épidémiologiques et de données sur la réponse aux médicaments in vitro démontrant le rôle critique des mutations du *Pfcr*t dans le développement de la résistance à la CQ, les mécanismes biochimiques sont restés énigmatique avec des hypothèses sur l'accès réduit de la CQ aux parasites tels que la fuite de médicament chargé, l'efflux du médicament, l'afflux réduit, la partition modifiée de la CQ ou des taux de renouvellement de l'hème modifiés suite à des changements de gradient de pH, de protéines de liaison à l'hème ou des niveaux de glutathion (46,51).

Par ailleurs, comme mentionné en haut, le gradient de pH joue un rôle important dans l'accumulation et la concentration de la chloroquine au niveau de la vacuole digestive du parasite. De plus, la cristallisation de la FPIX ainsi que le rapport FPIX soluble/FPIX insoluble dépendent aussi du pH du milieu. De ce fait et du fait que la chloroquine n'agit qu'avec l'hématine soluble, il paraît évident que le gradient de pH devrait être impliqué dans le mécanisme de la chloroquinorésistance. En effet, une diminution du pH a été observée dans la vacuole digestive des plasmodies chloroquinorésistantes par rapport aux sensibles (48).

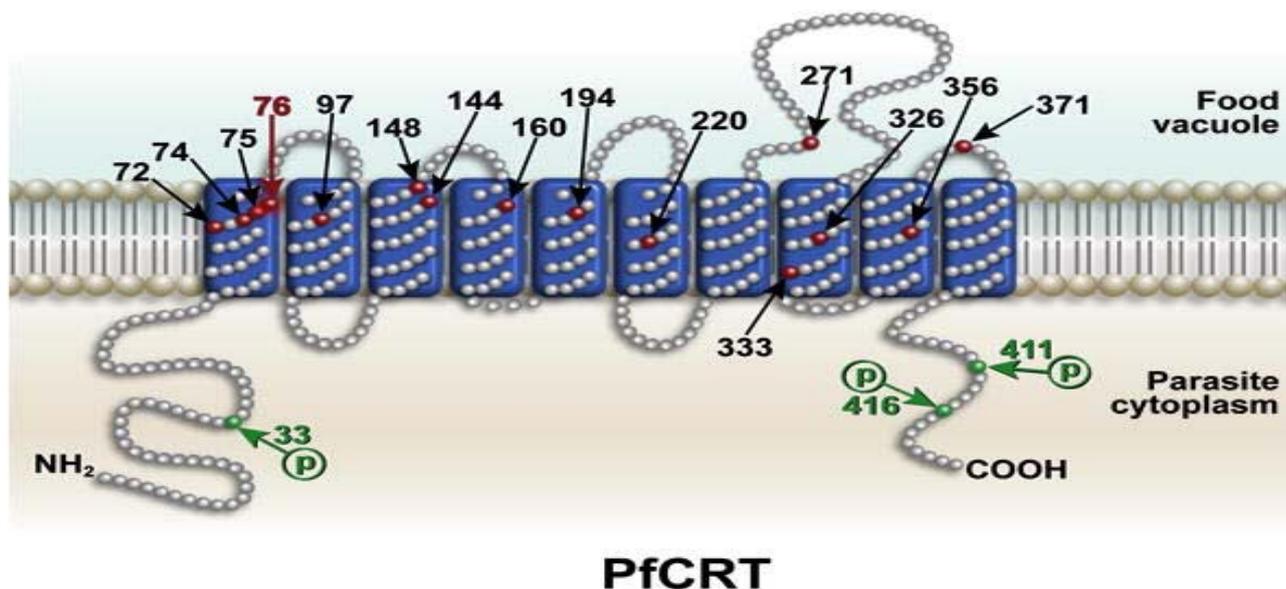


Figure 7: Topologie et fonction du transporteur de résistance à la chloroquine de Plasmodium falciparum (*PfCRT*) .

3.8.3.3 Répartition

La chloroquine (CQ) a été pendant des décennies l'étalon-d'or pour la prévention et le traitement du paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum*. Cependant, l'émergence et la propagation de la résistance à la CQ (CQR), détectée pour la première fois en Colombie et en Thaïlande et se déplaçant plus tard en Afrique, a contribué à une détérioration de la situation du paludisme dans le monde. Cependant, trois foyers indépendants de la résistance à la chloroquine ont été découverts en Asie du Sud-Est (haplotype *PfCRT* CVIET), en Papouasie occidentale (haplotype *PfCRT* SVMNT) et aux Philippines (haplotype *PfCRT* CVMNT). La migration de l'haplotype CVIET d'Asie du Sud-Est vers l'Afrique est la plus importante voie de diffusion de la chloroquinorésistance (14,51).

La chloroquinorésistance a été identifiée pour la première fois lors d'une étude Thaïlondo-cambodgienne et s'est ensuite propagée en Afrique. Entre les années 1960 et le milieu des années 1970, la résistance au CQ s'est développée à toutes les parties de l'Asie du Sud-Est. En plus de l'haplotype CVIET ; le type SVMNT qui a prévalu dans le pacifique et en Amérique du Sud, a été signalé au Laos et en Inde (47).

En Afrique, la résistance à la chloroquine est apparue pour la première fois au Kenya et en Tanzanie puis s'est étendue dans les autres pays de la sous-région tels que la partie orientale, centrale et occidentale. L'haplotype CVIET (mutations d'acides aminés aux codons 72-76) est le plus prédominant sur ce continent. Le type SVMNT, communément retrouvé en Amérique

du Sud et le Pacifique, a été trouvé en Tanzanie. De plus l'haplotype SVIET, précédemment décrit en Papouasie occidentale, a été signalée en République démocratique du Congo (47).

Au Mali, une étude sur les marqueurs moléculaires impliqués dans la chloroquino-résistance a révélé la présence de la mutation *Pfcr*t-76T dans 60 échantillons de patients atteints d'une infection post-traitement. En plus de cela, les mutations I74, E75, S220 et I371 ont été retrouvées dans certains parasites porteurs de l'allèle muté 76T pouvant maintenir la fonction *Pfcr*t native et conférer en même temps une résistance à la chloroquine (52,53).

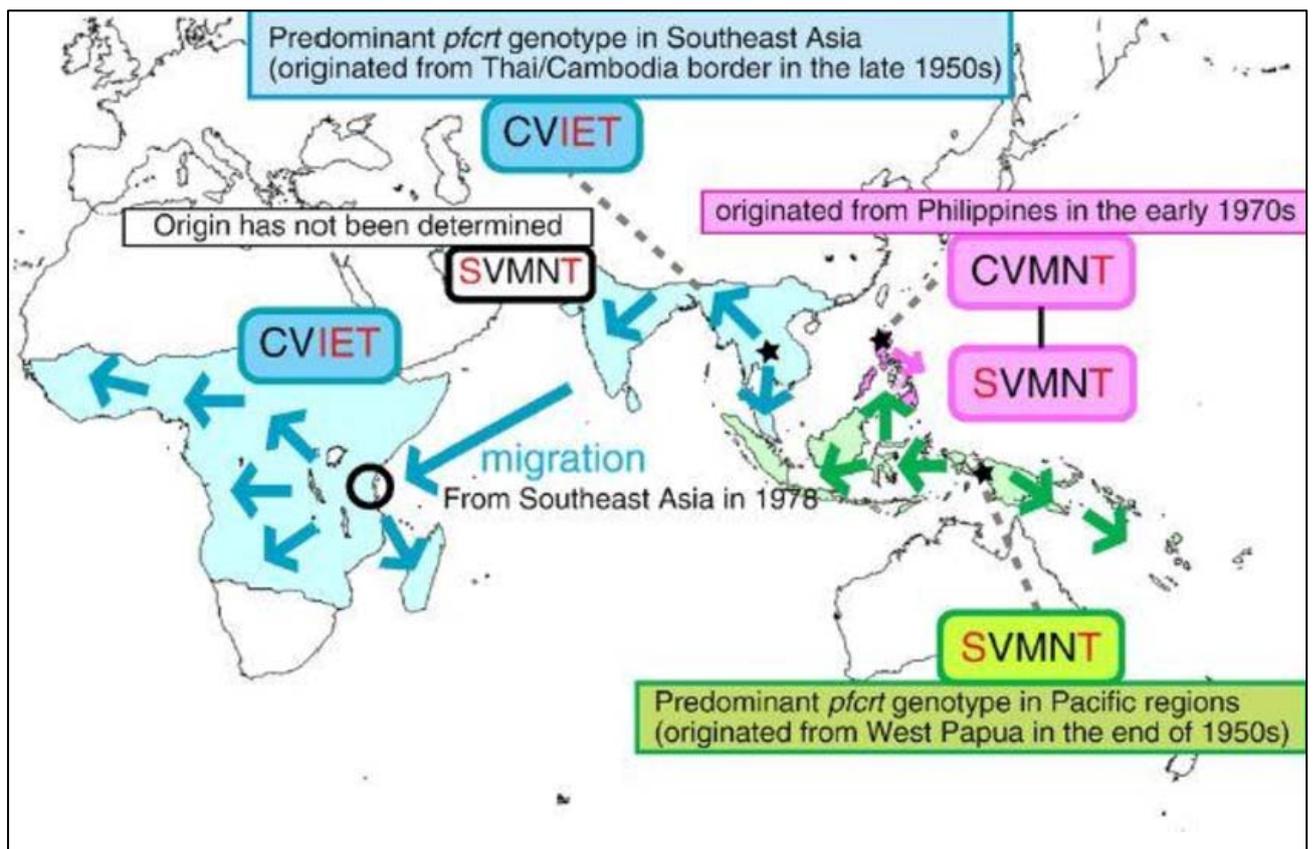


Figure 8: Carte sur l'origine et la migration des souches de *P. falciparum* résistantes à la CQ construit à partir de l'identification des haplotypes microsatellites en amont du gène *Pfcr*t.

3.9 Les facteurs associés à la résistance aux antipaludiques

La résistance aux antipaludiques se définit comme étant la capacité qu'a une souche parasitaire de se développer malgré l'administration et l'absorption d'un traitement donné à une dose égale ou supérieure à celle usuellement recommandée, et dans la limite de tolérance du sujet. Cependant, plusieurs facteurs peuvent favoriser le développement de cette résistance tels que les facteurs génétiques parasites, l'accès limité aux médicaments et l'utilisation continue de la monothérapie, et l'état immunitaire de l'hôte (19,54).

Tout comme les virus, les parasites possèdent une grande variabilité génétique qui est source d'échappement immunitaire et de chimiorésistance. Deux évènements sont nécessaires à l'émergence de cette résistance à savoir : les mutations génomiques qui apparaissent au hasard avec des taux variables lors des divisions cellulaires (méiose et mitose) et la pression de sélection médicamenteuse. Cependant, l'apparition de mutants résistants est en fonction de la biomasse parasitaire c'est à dire du nombre total de *Plasmodium* et du nombre de souches plasmodiales simultanément présents chez un même malade. Ce risque est théoriquement plus observé dans les zones de forte transmission palustre, où les poly-infestations sont plus fréquentes (14,19). De plus, comme ce fut le cas pour l'association de la chloroquine avec l'amodiaquine et de la sulfadoxine+ pyriméthamine avec la sulfaméthoxazole + triméthoprime ; la présence de résistances croisées est un facteur déterminant du développement des résistances (19).

Un autre facteur important est le comportement humain. L'exemple typique en est le développement de la résistance en Asie du Sud Est, où le paludisme est largement confiné aux zones forestières. Les populations vivant dans ces zones ont souvent un accès limité aux soins de santé et s'automédiquent couramment si elles sont malades. Les médicaments de qualité inférieure ou falsifiés, les monothérapies à base d'artémisinine et l'incapacité à administrer ou à suivre correctement des traitements complets sont des facteurs associés à l'émergence de la résistance dans cette région (20).

Une dose unique d'un antipaludique à base d'artémisinine ne peut probablement pas sélectionner la résistance qui peut être transmise mais les administrations répétées de doses non curatives peuvent le faire. C'est d'ailleurs la méthode utilisée en laboratoire pour sélectionner la résistance. La sélection de parasites résistants dépend de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie de l'antipaludique utilisé. Ainsi, les médicaments ayant une demi-vie longue comme la méfloquine (3 semaines) ou la chloroquine (1-2 mois), favorisent la persistance et l'adaptation des parasites les moins sensibles, lorsque la molécule se trouve à une concentration

plasmatique sub-thérapeutique. De même, une cure incomplète ne permet pas de maintenir une concentration plasmatique adéquate sur un temps suffisamment long pour éliminer la totalité des parasites chez un individu. De plus, le problème de falsification des médicaments, contenant des composés inactifs ou des concentrations suboptimales et l'utilisation continue de la monothérapie sont largement considérés comme des facteurs contribuant au développement et à la propagation de la résistance (14,20,54).

Le contexte épidémiologique global est également critique car dans les zones de faible transmission, l'hôte humain n'a pas les mécanismes de défense immunitaire qui contrôlent les infections indépendamment de la sensibilité aux antipaludiques et contribuent ainsi à un effet curatif significatif et réduisent considérablement la probabilité de transmission d'un parasite mutant résistant. La faible transmission signifie également qu'une proportion plus élevée d'infections sont symptomatiques (conduisant à une rencontre médicamenteuse) et qu'il y a moins d'infections multiclonaux et donc moins de compétition chez l'hôte. Ceci prouve à quel point la réponse immunitaire joue un rôle essentiel sur l'efficacité du médicament. Elle est acquise en fonction de l'âge, après une exposition répétée, chez des personnes vivant dans des régions d'endémie palustre. Les anticorps acquis avec l'âge, constituent une composante importante de la réponse immunitaire antipaludique, en réduisant la densité parasitaire et les symptômes cliniques (14,20,55).

En outre, les facteurs tels que l'état de santé du patient (c'est-à-dire la fièvre avec une relation possible avec la rupture du schizonte), l'efficacité du médicament partenaire, la biomasse parasitaire initiale et l'âge du patient ont été associés à un retard de clairance parasitaires aux CTA (54).

Enfin, les vecteurs peuvent aussi influencer la prolifération des parasites résistants en favorisant leur reproduction dans certains anophèles. Ainsi, en Asie du Sud-Est, la dissémination des souches de *Plasmodium* Chloroquinorésistantes aurait été favorisée par la présence d'un vecteur propice à la multiplication de ces souches, *Anopheles balabacensi* (14).

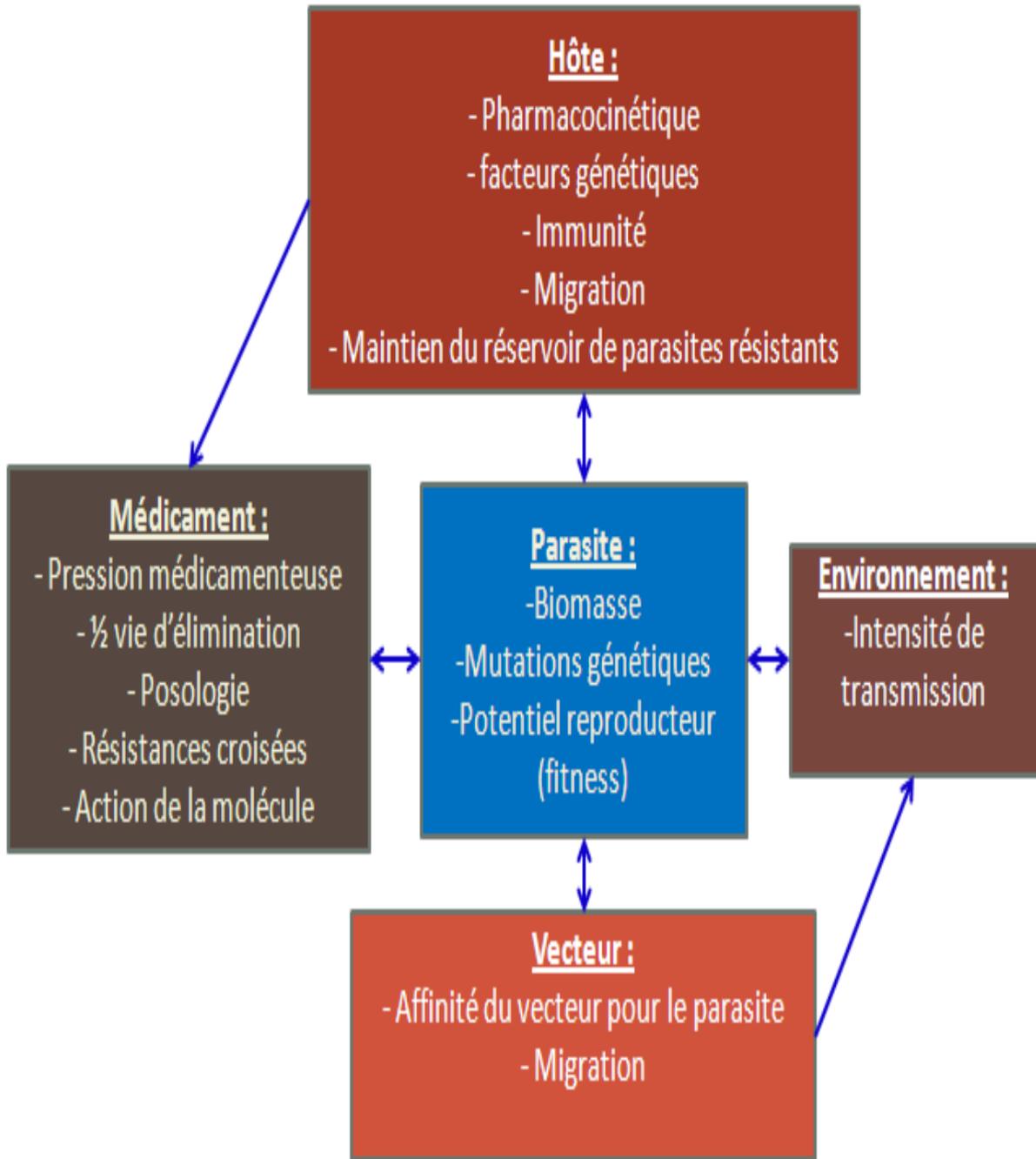


Figure 9: Les déterminants de résistance aux antipaludiques

MATERIEL

ET

METHODES

4 MATERIEL ET METHODES

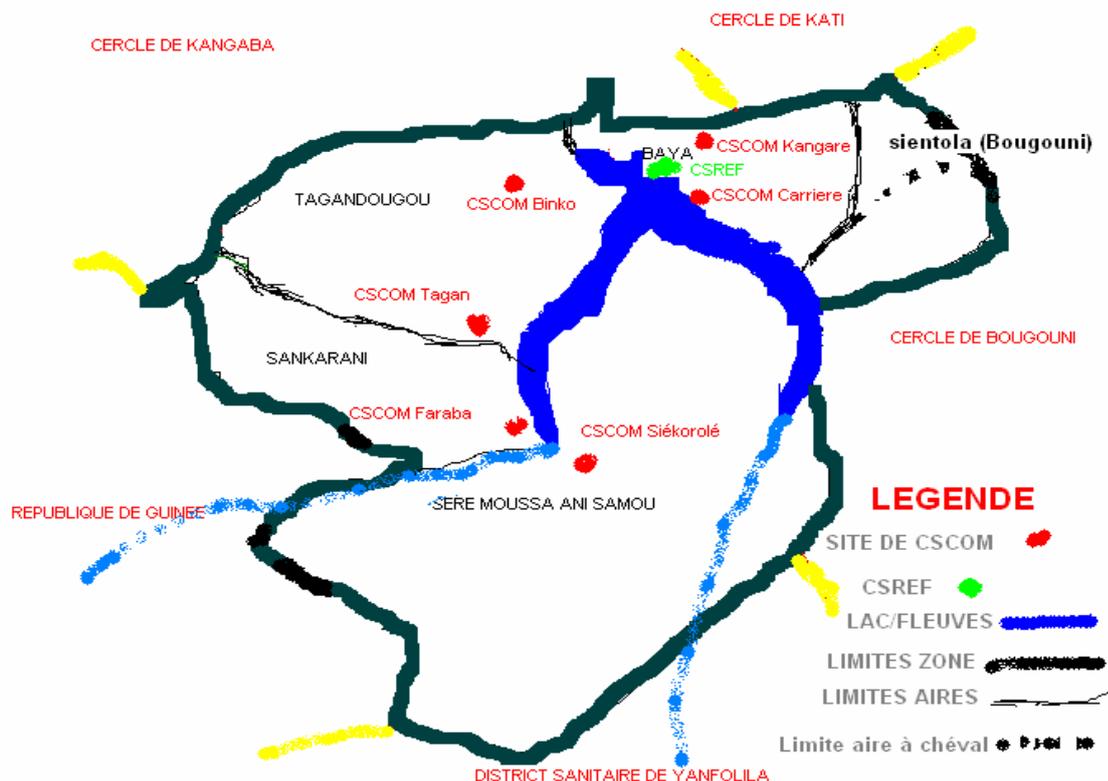
4.1 Cadre de l'étude

4.1.1 Lieu de l'étude

L'étude s'est déroulée, dans la commune rurale de Sélingué qui relève du cercle de Yanfolila région de Sikasso. Représentatif de l'un des faciès épidémiologiques du paludisme au Mali, Sélingué est un district sanitaire qui en 2018 comptait 111.469 habitants et qui de par sa situation géographique a un caractère de transmission bimodale du paludisme à cause de l'existence d'un barrage hydraulique. Pendant la saison pluvieuse, le paludisme touche pratiquement toutes les couches de la population, en particulier les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes qui constituent les groupes les plus vulnérables.

Le district sanitaire de Sélingué regorge un Centre de Santé de Référence (CSRéf) et sept aires de santé organisées en Centre de Santé Communautaire (CSCoM), dont la gestion est sous la responsabilité des Associations de Santé Communautaire (ASACO). En plus des CSCoM adhérant au système de référence/contre référence, le district sanitaire de Sélingué abrite des dispensaires, des maternités (Mafléni, Bambala, etc..) et une infirmerie de l'institut nationale de prévoyance sociale.

Dans le cadre de la collaboration entre le LBMA et le CSRéf de Sélingué, ce dernier a été disposé d'un laboratoire bien équipé qui a été renforcé en termes de capacité (formation des personnels et dotation d'équipements de laboratoire et consommables nécessaires pour conduire les essais cliniques sur les antipaludiques).



CARTE SANITAIRE DE LA ZONE DE SELINGUE/CERLE DE YANFOLILA

Figure 10. Carte sanitaire de la zone de Selingué (Source : Mairie de Selingué)

4.2 Enrôlement et suivi des patients

4.2.1 Type et période de l'étude

Nous avons conduit une étude transversale à Selingué qui s'est déroulée entre Octobre 2015 et Janvier 2017.

4.2.2 Critères d'inclusion

- ✓ Goutte épaisse à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 2000 et 199.999 Tf/ μ L,
- ✓ Patients vivant dans un rayon de 5 km,
- ✓ Patients âgés de 6 à 59 mois,
- ✓ Diagnostic d'accès palustre simple (pas d'évidence de paludisme sévère ou de paludisme cérébral)
- ✓ Sujets pouvant restés dans l'étude jusqu'à J42
- ✓ Assentiment des parents ou tuteurs car l'ensemble de nos patients étaient âgés de 6 à 59 mois.

4.2.3 Critères de non inclusion

- ✓ Prise antérieure d'antipaludiques dans les 4 jours précédents,
- ✓ Patients vivants dans un rayon supérieur à 5 km
- ✓ Évidence de paludisme sévère (glycémie $\leq 2,2$ mM, Hb < 5 g/dl, densité parasitaire ≥ 200.000 par μL , signes de perte de mémoire durant les dernières 24 heures)
- ✓ Co-infection avec d'autres espèces plasmodiales
- ✓ Antécédents d'hypersensibilité des patients aux molécules tels que l'artéméter, la luméfantine, l'artésunate et l'amodiaquine.
- ✓ Incapacité pour le patient d'avaler les médicaments par la voie orale et vomissement de la première dose administrée à 30 min d'intervalle.
- ✓ Autres maladies telles que la pneumonie, la malnutrition sévère, l'insuffisance cardiaque ou rénale chroniques, et maladie chronique compromettant la vie.

4.2.4 Déroulement du processus de l'enrôlement

D'abord avant le démarrage de l'étude, une autorisation a été obtenue auprès de la direction régionale de la santé, des chefs de village, et les autorités communautaires et administratives.

Ensuite, nous avons procédé à l'inclusion des sujets de tous sexes âgés de 6 à 59 mois qui se présentaient avec un accès palustre simple dans l'étude. A leur arrivée au centre de santé, les enfants étaient soumis à un examen clinique puis à un test de diagnostic rapide (TDR) et par finir, une goutte épaisse / frottis mince pour la confirmation de l'accès palustre simple à *Plasmodium falciparum*. Après l'obtention de l'assentiment de l'accompagnant du malade ou des parents du malade, un prélèvement veineux était effectué pour différents tests moléculaires notamment la recherche des marqueurs de résistance et le génotypage. Pour chaque cas confirmé de paludisme, une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine était administrée pour la prise en charge des accès palustres simples et la quinine en injectable, en cas d'accès palustre grave ou en cas d'échec thérapeutique lors du suivi. En cas d'une éventuelle complication nécessitant des actions thérapeutiques particulières, les patients étaient référés vers des services spécialisés.

4.3 Suivi des patients

Les patients enrôlés dans notre étude ont été suivis pendant 42 jours. Pendant les 42 jours, ils venaient au centre selon les jours suivants J0 ; J1 ; J2 ; J3 ; J7 ; J14 ; J21 ; J28 ; J35 et J42 soit 10 visites au total.

Durant les trois premiers jours de la visite à savoir J0 ; J1 ; J2 les enfants recevaient leurs doses d'artemether-lumefantrine (**Coartem®**) ou d'artesunate-amodiaquine (**ASAQ-Denk**) conformément au protocole thérapeutique et subissaient des examens cliniques ainsi que des prélèvements sanguins (cf Tableau II).

4.3.1 Plan de suivi des patients

Le tableau ci- dessous illustre les différents examens effectués lors des jours de suivi.

Tableau II: Plan de suivi des patients pendant 28 jours

Visite	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42
Examen clinique	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Prise de température	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Goutte épaisse	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Traitement par CTA	X	X	X						
Confettis	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Taux d'hémoglobine	X						X		

4.3.2 Collectes et traitement des échantillons

Les lames des gouttes épaisses et des frottis minces étaient lues par deux lecteurs différents et un troisième lorsque l'écart entre les parasitemies trouvées par les deux premiers lecteurs valait 20%. Après la lecture, les lames sont arrangées dans des boites afin de faciliter le transport de celles-ci au laboratoire de biologie moléculaire appliquée (LBMA) pour une relecture et leur conservation. Au bout de chaque lame se trouvait les informations de chaque patient (l'identifiant, le jour de suivi et la date) écrites avec un marqueur indélébile.

Comme observé précédemment dans le Tableau II, un confetti se faisait à chaque visite. Sur ce dernier, se trouvaient également les informations suivantes : l'identifiant, le numéro de suivi, et la date. Après le dépôt des gouttes de sang dans les cercles, on laissait sécher les confettis à l'abri de la poussière et des mouches avant de les introduire dans des enveloppes contenant des dessiccants afin de les protéger contre l'humidité. Nous faisons au minimum trois (03) spots par confetti et par patient.

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

4.4 Traitement des échantillons dans le Laboratoire

4.4.1 Extraction d'ADN et Génotypage des échantillons

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

Le génotypage des échantillons a été fait avec les marqueurs moléculaires dans le but de discriminer les cas de recrudescence des cas de réinfection parmi les cas d'échecs thérapeutiques.

4.4.2 Séquençage des gènes *Pfk13*, *Pfmdr1* et *Pfcr1*

Le séquençage s'est déroulé en 5 étapes successives pour les gènes *Pfk13*, *Pfmdr1* et *Pfcr1*.

Étape 1 : Nested-PCR (PCR nichée)

Une série de deux PCR a été utilisée pour amplifier chaque gène (**cf Annexe**). Avant la seconde amplification, une dilution au 1 :10 a été effectuée sur le produit de la première PCR qui a servi de matrice pour la seconde PCR excepté pour le gène *Pfmdr1* où le produit de PCR était dilué au 1:6).

Remarque : Il n'est pas nécessaire de faire une PCR nichée pour amplifier le gène *Pfmdr1* à moins que la parasitémie soit faible. Juste aller à l'étape de l'ExoSap après la première amplification puis au séquençage (**cf Annexe**).

Pour tous ces gènes, le protocole peut être stoppé au niveau de purification ExoSap et garder l'amplicon entre 2-8°C pour une période pouvant atteindre une semaine.

✓ Conditions du cycle de PCR nichée pour le gène *PfK13*

1^{ère} PCR

2^{ème} PCR

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

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

✓ Conditions du cycle de PCR nichée pour le gène *Pfmdr1*

A ce niveau, le séquençage a porté sur 2 régions du gène *Pfmdr1*. Ci-dessous les conditions du cycle de PCR nichée.

1 région

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

2 région

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

✓ Conditions du cycle de PCR nichée pour le gène *Pfprt*

1^{ère} PCR

94°C	10 :00min	
94°C	0 :30sec	} 35X
59°C	0 :30sec	
72°C	0:30 sec	
72°C	10 :00min	
4°C	∞	

2^{ème} PCR

94°C	10 :00min	
94°C	0 :30sec	} 35X
56°C	0 :30sec	
72°C	0 :30sec	
72°C	10 :00min	
4°C	∞	

Etape 2 : Purification des produits de la PCR par ExoSAP (Purification de l'amplicon)

Cette étape a pour objectif de nettoyer l'amplicon en le débarrassant des autres produits de la PCR tels que le restant de MgCL₂, de dNTPs, d'amorces, enzymes et autres produits de la réaction de PCR.

Tableau III: Master Mix du ExoSAP

Exonuclease I	2,5μL
TSAP	3,0μL
ddH₂O	494,5μL
TOTAL	500,0μL

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

- Préparer le master mix selon le Tableau 3
- Ajouter 5μL de ce Master Mix à chaque l'amplicon de la seconde PCR ;
- Placer les tubes dans le thermocycleur puis lancer le cycling comme illustré dans le **Tableau IV**

Tableau IV: Condition de cycling du ExoSAP cleaning

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

Etape 3 : Cycle du séquençage

Après le nettoyage, les produits de la PCR sont de nouveaux amplifiés dans un mélange contenant à la fois les dNTPs et ddNTPs (Cf **Annexe**). Cette étape doit être lancée dans une plaque de 96 puits.

Condition du cycle de séquençage

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

NB: Le protocole peut être stoppé à ce niveau et gardé l'amplicon entre 2-8°C pour une semaine.

Étape 4 : Précipitation des produits de PCR

Pour la réalisation de cette étape, il faut disposer des matériels suivants :

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

Procédure :

1. Ajouter 2,0µL d'EDTA 0,125M pH=8 dans chaque puits de la plaque contenant un échantillon ;
2. Ajouter 2,0µL de sodium acétate pH=5,2 dans chaque puits ;
3. Ajouter 30,0µL d'éthanol 100% froid dans chaque puits de la plaque contenant un échantillon puis mélanger avec la pipette ;
4. Couvrir la plaque de seal et l'incuber a la température ambiante pendant 15-20minutes ;
5. Centrifuger a 3200rpm pendant 30 minutes à la température de 20,0°C ;
6. Enlever le seal et couvrir la plaque de kimwipes puis l'inverser, ensuite centrifuger a 1000rpm pendant 5 minutes ;
7. Ajouter 30,0µL d'éthanol 70% froid dans chaque puits de la plaque contenant un échantillon puis mélanger avec la pipette ;

8. Couvrir la plaque de seal, puis centrifuger a 3200rpm pendant 15minutes ;
9. Enlever le seal et couvrir la plaque de kimwipes puis l'inverser, ensuite centrifuger a 1000rpm pendant 5 minutes ;
10. Laisser sécher la plaque dans la température ambiante pendant 30 minutes à 1 heure ;
11. Ajouter 10,0 μ L de HiDi Formamide dans chaque puits de la plaque, couvrir la plaque et passer au séquençage. Pour les puits qui ne contiennent pas d'échantillon, on peut mettre de l'eau distillée.

Etape 5 : Séquençage

Dans cette dernière étape, la plaque est insérée dans le séquenceur. Le mélange est aspiré par les capillaires du séquenceur qui effectue l'électrophorèse et donne la séquence des bases. Les séquences sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Geneious R11 pour la détection des mutations a différentes positions.

4.5 Analyse des séquences après séquençage

Après séquençage, les données brutes ont été recueillies et analysées avec le logiciel Geneious R11. La séquence de la souche *Pf3D7* a été utilisée comme séquence consensus (de référence) pour rechercher les éventuelles mutations sur les autres séquences. Après importation des données brutes dans le logiciel, toutes les séquences dont la qualité des données est inférieure à 40% ont été exclues de l'analyse ainsi que les extrémités des séquences qui comportent très souvent des données de faible qualité. Les séquences ont ensuite été alignées et analysées par Geneious pour voir les mutations.

4.6 Considérations éthiques et déontologiques

Le protocole de recherche de cette étude a été soumis et validé par le comité d'éthique de l'INSP, (Ex-INRSP). Tout changement ultérieur du protocole était soumis à l'approbation de ce comité d'éthique. Cette étude avait un risque minimal car elle s'appuyait sur les tests de diagnostic et les schémas thérapeutiques utilisés en routine dans nos centres de santé à l'intérieur desquels nous avons conduit cette étude.

L'assentiment éclairé des parents ou tuteurs était recherché et obtenu avant la prise de sang tout en respectant l'intervalle des quantités admises par le NIH et autres agences ($\leq 3,0$ ml par kg dans un intervalle de temps ≥ 8 semaines). Pour un assentiment éclairé, nous, investigateurs, avons eu à :

- ✓ Expliquer le protocole à chaque parent ou tuteur ;

- ✓ Répondre aux questions des parents ou tuteur ;
- ✓ Obtenir un assentiment libre, éclairé et signé ;
- ✓ Remettre une copie originale de l'assentiment signé aux parents ou accompagnants ;
- ✓ Prélever le sang.
- ✓ La décision de participer ou de ne pas participer relevait exclusivement du parent ou tuteur de l'enfant. Ce dernier était informé de la possibilité de se retirer de l'étude à tout moment sans aucune conséquence ou préjudice.
- ✓ Tous les documents de l'étude (y compris les codes de nos données) étaient gardés dans un lieu sécurisé, et les échantillons de sang étaient étiquetés avec un code unique sans le nom du patient pour assurer la confidentialité des informations.
- ✓ Un montant de 1000 FCFA était remis aux parents ou tuteurs lors de chaque visite pour compenser, le temps perdu pour les activités journalières et les coûts liés au transport (aller-retour).

4.7 Gestion et analyse des données

Les informations cliniques et biologiques ont été collectées sur les formulaires de report de cas (FRC). Pour la saisie des données, nous avons utilisé Microsoft® Office Excel et le logiciel STATA version 16 pour les analyses statistiques. Les tests statistiques les plus utilisés ont été le test Khi2 de Pearson pour comparer les variables catégorielles entre elles et le test de Fisher pour les données où les fréquences attendues étaient inférieures à 5. Le seuil de signification statistique a été fixé à $\alpha = 0,05$.

RESULTATS

5 RESULTATS

5.1 Aspects cliniques et démographiques

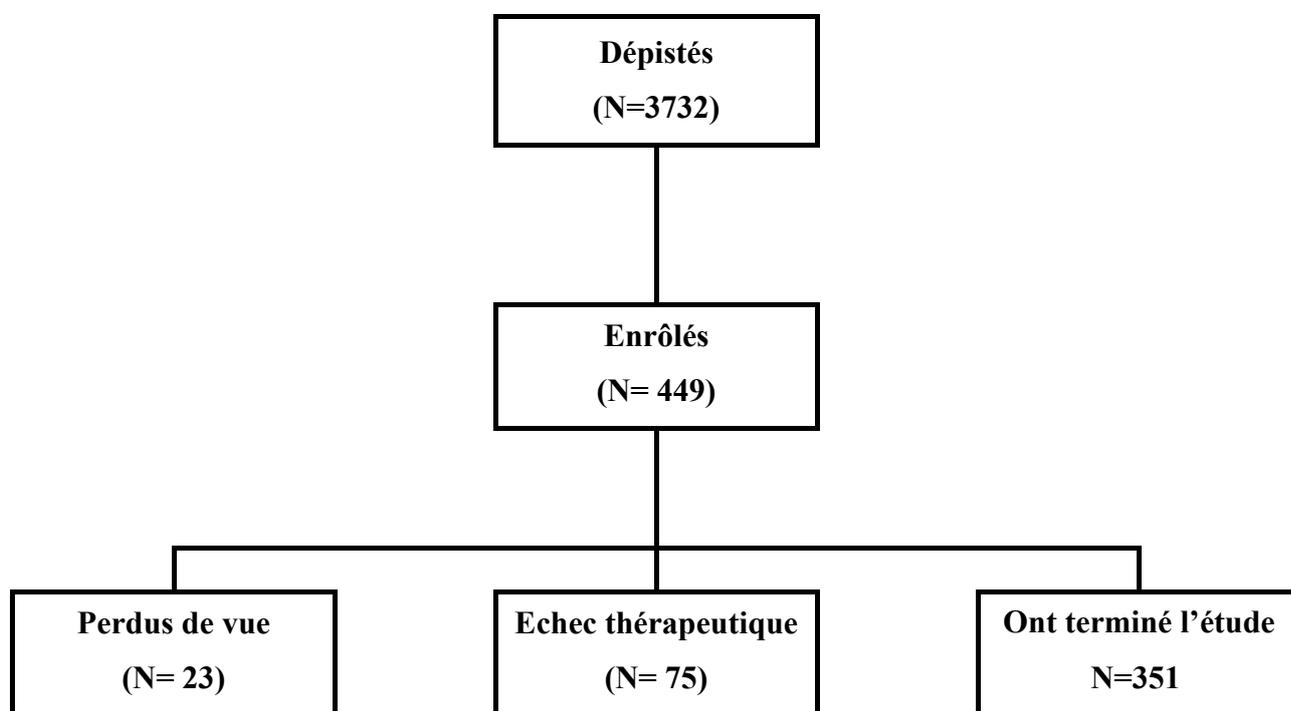


Figure 10: Répartition des patients selon les caractéristiques de dépistages

Tableau V: Répartition des enfants en fonction des caractéristiques socio démographiques

Caractéristiques Socio-démographiques	Fréquence	Pourcentage	Chi2	P value
Sexe du participant				
Masculin	35	46,67		
Féminin	40	53,33		
Tranche d'âge				
6-12 mois	1	1,33		
1-2ans	13	17,33		
2-3 ans	17	22,67		
3-4 ans	30	40		
4-5 ans	14	18,67		
Bras de traitement				
AA	31	41,33	2,253	0,133
AL	44	58,67		

Au total 75 patients ont fait des échecs thérapeutiques au cours de cette étude dont le genre féminin était le plus représenté (53.33%). Le sexe Ratio était 1,14 en faveur du genre féminin.

Nous avons reparti les patients par tranche d'âge afin qu'on puisse observer l'impact de l'âge sur l'apparition des mutations sur nos gènes d'intérêt. Dans notre étude, l'âge minimum était 6 mois et 5 ans, le maximum. La tranche d'âge (3-4 ans) est la plus représentée dans cette étude, soit 40%.

Les patients de notre étude étaient répartis selon deux bras de traitement. Il s'agit du bras AA (Artésunate +Amodiaquine) et AL (Artemether+ Lumefantrine).

Le bras AL était le plus représenté parmi les patients ayant fait un échec thérapeutique avec un pourcentage 58,6% contre 41,33 % pour le bras AA. Cependant, nous n'avons trouvé de différence statistiquement significative dans cette répartition (**Tableau V**)

Tableau VI: Répartition des paramètres cliniques en fonction des bras de traitement.

Paramètres cliniques	Pre traitement		Total
	AA	AL	
Hépatomégalie	0(0)	0(0)	0(0)
Splénomégalie	0(0)	0(0)	0(0)
Ictère	32(43,24)	42(56,76)	74(100)
Maux de tête	30(44,12)	38(55,88)	68(100)
Fatigue	30(44,12)	42(56,76)	72(100)
Déshydratation	0(0)	0(0)	0(0)
Hypotension	0(0)	0(0)	0(0)

Le Tableau VI montre que les paramètres cliniques tels que l'hépatomégalie, la splénomégalie, l'hypotension et la déshydratation n'ont pas été observés chez les patients qui étaient sur ces bras (AA et AL). Toutefois, l'ictère, les maux de tête, et la fatigue ont été observés plus chez les patients sur AL (56,76 %, 55,88%, et 56,76%) que sur le bras AA (43,24%, 44,12%, 44,12%).

Tableau VII: Répartition des patients en fonction de la recrudescence et de la réinfection.

Recrudescence ou Réinfection	Fréquence	Pourcentage
Recrudescence	9	12
Réinfection	66	88

Après utilisation de l’outil d’analyse de génotypage de l’OMS, nous avons remarqué que la 12% (9/75) des cas d’échecs thérapeutiques étaient des recrudescences (**Tableau VII**).

5.2 Aspects moléculaires

Tableau VIII: Prévalence des mutations de *Pfcr* avant et après traitement (AA et AL)

Mutations <i>Pfcr</i>		AA	AL	Total	%	Chi2	p-value
72C	Pré-traitement	30	41	71	97,26	0,0492	0,824
	Post-traitement	30	38	68	100		
72S	Pré-traitement	0	2	2	2,74		
	Post-traitement	0	0	0	0		
73V	Pré-traitement	30	43	73	100	0,1315	0,717
	Post-traitement	30	38	68	100		
74I	Pré-traitement	17	28	45	61,64	0,0514	0,821
	Post-traitement	12	22	34	50		
M74I	Pré-traitement	7	0	7	9,59		0,300*
	Post-traitement	2	1	3	4,41		
74M	Pré-traitement	6	15	21	28,77	2,7231	0,099
	Post-traitement	16	15	31	45,59		
75E	Pré-traitement	17	28	45	61,64	0,0514	0,821
	Post-traitement	12	22	34	50		
75N	Pré-traitement	6	15	21	28,77	2,7231	0,099
	Post-traitement	16	15	31	45,59		
N75E	Pré-traitement	7	0	7	9,59		0,300*
	Post-traitement	2	1	3	4,41		
76K	Pré-traitement	6	13	19	26,03	1,9188	0,166
	Post-traitement	16	15	31	45,59		
K76T	Pré-traitement	7	0	7	9,59		0,300*
	Post-traitement	2	1	3	4,41		
76T	Pré-traitement	17	30	47	64,38	0,0066	0,935
	Post-traitement	12	22	34	50		

*= valeur de p du test exact de Fisher

Les résultats portant sur les mutations sont exprimés en considérant les échantillons de J0 et de Jx comme différents et ainsi comptabilisés individuellement. Ainsi pour le gène *Pfcrt*, le nombre total d'échantillons traités avec succès est de 141. L'allèle 72S de type muté a été trouvé dans 2 échantillons avant traitement (2/73, 2,74%). De plus, l'allèle *Pfcrt* 76T, associé à la résistance à la chloroquine, a été trouvé dans 47 échantillons avant traitement (47/73, 64,38%) et 34 échantillons après traitement (34/68, 50%) (**Tableau VIII**).

Tableau IX: Prévalence des mutations de *Pfmdr1* avant et après traitement (AA et AL)

Mutations <i>Pfmdr1</i>		AA	AL	TOTAL	%	Chi2	p-value
86N	Pré-traitement	24	31	55	74,32	0,2938	0,588
	Post-traitement	22	35	57	90,48		
86Y	Pré-traitement	5	5	10	13,51		0,580*
	Post-traitement	3	1	4	6,35		
N86Y	Pré-traitement	2	7	9	12,16		0,109*
	Post-traitement	2	0	2	3,17		
Y184F	Pré-traitement	5	8	13	17,57		0,200*
	Post-traitement	3	0	3	4,84		
184F	Pré-traitement	16	26	42	56,76	0,0004	0,984
	Post-traitement	18	29	47	75,81		
184Y	Pré-traitement	10	9	19	25,67	0,3541	0,552
	Post-traitement	5	7	12	19,35		
1246D	Pré-traitement	28	43	71	97,26	0,0253	0,874
	Post-traitement	24	39	63	98,44		
D1246Y	Pré-traitement	0	0	0	0	-	-
	Post-traitement	1	0	1	1,56		
1246Y	Pré-traitement	1	1	2	2,74	-	-
	Post-traitement	0	0	0	0		
1034S	Pré-traitement	29	44	73	100	0,0063	0,937
	Post-traitement	25	39	64	100		
1042N	Pré-traitement	29	44	71	100	0,0063	0,937
	Post-traitement	25	39	64	100		

Au total 137 échantillons ont été traités avec succès pour le gène *Pfmdr1*. Dans l'ensemble, l'allèle sauvage 86N a été trouvé dans la majorité des échantillons avant traitement (55/74, 74,32%) et après traitement (57/63, 90,48). De même la fréquence de l'allèle 184F était élevée dans les échantillons avant traitement (42/74, 56,76%) et après traitement (47/62, 75,81%). L'allèle 1246D était surreprésenté dans les isolats après traitement par rapport aux isolats avant traitement dans le bras AL (61,90% contre 60,56%) mais pas dans le bras AA (38,1% contre 39,43%) (**Tableau IX**).

Tableau X: Répartition des mutations de *Pfcr* selon les tranches d'âge.

Haplotypes de <i>Pfcr</i>	6-12 mois n(%)	12-24 mois n(%)	24-36 mois n(%)	36-48 mois n(%)	48-60 mois n(%)	Valeur de p (Test exact de Fisher)
<i>Pfcr</i>- Codon 72						
C	2 (1,44)	24 (17,27)	32 (23,02)	55 (39,57)	26 (18,71)	0,381
S	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (50)	
<i>Pfcr</i>- Codon 73						
V	2 (1,42)	24 (17,02)	33 (23,4)	55 (39,01)	27 (19,15)	
<i>Pfcr</i>- Codon 74						
I	2 (2,53)	14(17,72)	22(27,85)	27(34,18)	14 (17,92)	0,654
M	0 (0)	9 (17,31)	8 (15,38)	23 (44,23)	12 (23,08)	
M/I	0 (0)	1 (10)	3 (30)	5 (50)	1 (10)	
<i>Pfcr</i>- Codon 75						
E	2 (2,53)	14 (17,72)	22 (27,85)	27 (34,8)	14 (17,42)	0,654
N	0 (0)	9 (17,31)	8 (15,38)	23 (44,23)	12 (23,08)	
N/E	0 (0)	1 (10)	3 (30)	5 (50)	1 (10)	
<i>Pfcr</i>- Codon 76						
K	0 (0)	9 (18)	7 (14)	23 (46)	11 (22)	0,546
K/T	0 (0)	1 (10)	3 (30)	5 (50)	1 (10)	
T	2 (2,47)	14 (17,28)	23 (28,4)	27 (33,33)	15 (18,52)	

Nous n'avons pas trouvé d'association entre l'apparition des mutations sur le gène *Pfcr* et les différentes tranches d'âges ($P > 0,05$) (**Tableau X**).

Tableau XI : Répartition des mutations de *Pfmdr1* selon les tranches d'âge

Haplotypes de <i>Pfmdr1</i>	6-12 mois n(%)	12-24 mois n(%)	24-36 mois n(%)	36-48 mois n(%)	48-60 mois n(%)	Valeur de p (Test exact de Fisher)
<i>Pfmdr1</i>- Codon 86						
N	2 (1,79)	19 (16,9)	25 (22,3)	42 (37,5)	24 (21,4)	0,870
NY	0 (0)	2 (18,18)	4 (36,36)	4 (36,36)	1 (9,09)	
Y	0(0)	3(21,43)	4(28,57)	6(42,86)	1(7,14)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 184						
Y	0(0)	8(25,81)	5(16,13)	10(32,2)	8(25,81)	0,456
Y/F	0(0)	1(6,67)	4(26,67)	9(60)	1(6,67)	
F	2(2,25)	15(16,8)	23(25,8)	32(35,9)	17(19,1)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1246						
D	2 (1,5)	23(17,2)	29(21,8)	54 (40,6)	25(18,8)	0,745
D/Y	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0(0)	
Y	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1034						
S	2 (1,46)	24 (17,52)	31 (22,63)	55 (40,15)	25 (18,25)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1042						
N	2 (1,46)	24(17,52)	31 (22,63)	55 (40,15)	25 (18,25)	

Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative dans la répartition des mutations sur le gène *Pfmdr1* (86**Y**, 184**F**, 1246**E**, 1034**C** et 1042**D**) en fonction des tranches d'âges ($P > 0,05$) (**Tableau XI**).

Tableau XII: Répartition des mutations de *Pfcr* en fonction des bras de traitement

Mutations de <i>Pfcr</i>	AA n(%)	AL n(%)	Valeur de p (Test exact de Fisher)
<i>Pfcr</i>- Codon 72			
C	60 (43,17)	79 (56,83)	0,508
S	0 (0)	2 (100)	
<i>Pfcr</i>- Codon 73			
V	60 (42,55)	81 (57,45)	
<i>Pfcr</i>- Codon 74			
I	29 (36,71)	50 (63,29)	0,006 ⁺
M	22 (42,31)	30 (57,69)	
M/I	9 (90)	1 (10)	
<i>Pfcr</i>- Codon 75			
E	29 (36,71)	50 (63,29)	0,006 ⁺
N	22 (42,31)	30 (57,69)	
N/E	9 (90)	1 (10)	
<i>Pfcr</i>- Codon 76			
K	22(44)	28 (56)	0,004 ⁺
K/T	9 (90)	1 (10)	
T	29 (35,8)	52 (64,2)	

⁺ = valeur de p<0.05

Le Tableau XII montre qu'il y avait une différence statistiquement significative dans l'apparition des mutations 74I, 75E et 76T selon le bras d'allocation (p=0.05). Nous avons remarqué qu'il y avait plus de mutants sur le bras AL que le bras AA.

Tableau XIII: Répartition des mutations de *Pfmdr1* en fonction des bras de traitement.

Mutations de <i>Pfmdr1</i>	AA n(%)	AL n(%)	Chi2	Valeur de p
<i>Pfmdr1</i>-Codon 86				
N	46 (41,07)	66 (58,93)		
N/Y	4 (36,36)	7 (63,64)		0,455*
Y	8 (57,14)	6 (42,86)		
<i>Pfmdr1</i>-Codon 184				
Y	15 (48,39)	16 (51,61)		
Y/F	8 (53,33)	7 (46,67)	1,8316	0,400
F	34 (38,2)	55 (61,8)		
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1246				
D	52 (39,1)	81 (60,9)		
D/Y	1 (100)	0 (0)		0,492*
Y	1 (50)	1 (50)		
<i>Pfmdr1</i>-Codon 1034				
S	54 (39,42)	83 (60,58)		
<i>Pfmdr1</i>-Codon 1042				
N	54 (39,42)	83 (60,58)		

*= valeur de p du test exact de Fisher

Nous n'avons pas trouvé d'association entre la répartition des mutations sur le gène *Pfmdr1* et les bras d'allocation ($P > 0,05$) (**Tableau XIII**).

Tableau XIV: Répartition des mutations de *Pfcr*t en fonction des infections récurrentes.

Mutations de <i>Pfcr</i> t	Recrudescence n(%)	Réinfection n(%)	Valeur de p (Test exact de Fisher)
<i>Pfcr</i>t- Codon 72			
C	17 (12,23)	122 (87,77)	>0,999
S	0 (0)	2 (100)	
<i>Pfcr</i>t- Codon 73			
V	17 (12,06)	124 (87,94)	
<i>Pfcr</i>t- Codon 74			
I	10(12,66)	69 (87,34)	>0,999
M	6 (11,54)	46 (88,46)	
M/I	1 (10)	9 (90)	
<i>Pfcr</i>t- Codon 75			
E	10 (12,66)	69 (87,34)	>0,999
N	6 (11,54)	46 (88,46)	
N/E	1 (10)	9 (90)	
<i>Pfcr</i>t- Codon 76			
K	6 (12)	44 (88)	>0,999
K/T	1 (10)	9 (90)	
T	10 (12,35)	71 (87,65)	

Le Tableau XIV montre que la distribution des acides aminés **S**, **I**, **E** et **T** du gène *Pfcr*t n'était pas associée au profil de l'échec thérapeutique (réinfection ou recrudescence). Toutefois, le nombre de mutations apparaissant dans le groupe des cas de réinfection est plus élevé que celui du groupe des cas de recrudescence.

Tableau XV: Répartition des mutations de *Pfmdr1* en fonction des infections récurrentes

Mutations de <i>Pfmdr1</i>	Recrudescence n (%)	Réinfection n (%)	Valeur de p (Test exact de Fisher)
<i>Pfmdr1</i>- Codon 86			
N	12 (10,71)	100 (89,29)	0,865
N/Y	1 (9,09)	10 (90,91)	
Y	2 (14,71)	12(85,71)	
<i>Pfmdr1</i>-Codon 184			
Y	3(9,68)	28 (90,32)	0,376
Y/F	0(0)	15(100)	
F	12(13,48)	77(86,52)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1246			
D	16(12,03)	117 (87,97)	>0,999
D/Y	0 (0)	1 (100)	
Y	0(0)	2(100)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1034			
S	16(100)	121 (88,32)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1042			
N	16(11,68)	12 (88,32)	

Nous n'avons pas trouvé d'association particulière entre l'apparition des mutations clés du gène *Pfmdr1* (86Y, 184F et 1246Y) et le profil de l'échec thérapeutique (réinfection ou recrudescence) ($p>0.05$) (**Tableau XV**).

Tableau XVI: Répartition des patients en fonction des paramètres cliniques et parasitologiques

Paramètres cliniques et parasitologiques	Fréquence	Pourcentage
Température J0		
Fièvre	36	48
Pas de fièvre	39	52
Température J42		
Fièvre	3	5,08
Pas de fièvre	56	94,92
Taux d'hémoglobine J0		
TxHb bas	55	73,33
TxHb normal	20	26,67
Taux d'hémoglobine J28		
TxHb bas	29	52,73
TxHb normal	26	47,27
Tranche des parasitémies		
<5000	31	41,33
5000-50000	35	46,67
50005- 100000	7	9,33
>100000	2	2,67
Evolution des températures		
Evolution	12	20,34
Pas d'évolution	47	79,66
Evolution des TxHb		
Evolution	53	70,67
Pas d'évolution	22	29,33

* Txhb : Taux d'hémoglobine

En termes des paramètres cliniques, nous avons remarqué que 48% (36/75) des patients qui ont fait des échecs thérapeutiques avaient la fièvre au moment de leur inclusion dans le suivi. Trois de ces patients présentaient encore la fièvre au moment de l'échec thérapeutique. Sur un total de 55 (73,3%) patients qui avaient un taux d'hémoglobine bas (Txhb<5mg/dL), 29 (38,7%) patients avaient toujours le taux d'hémoglobine bas à la fin du suivi (J28). Les parasitémies comprise entre 5000 et 50000 étaient les plus représentées avec 35 cas sur les 75 cas d'échecs thérapeutiques, soit 46,67%.

Nous avons constaté une évolution de la température chez 12 patients sur les 59 cas, soit 20,34% des cas ont évolué vers la normale. 70,67 % des taux d'hémoglobine bas ont évolué vers une valeur normale (53/75) (**Tableau XVI**).

Tableau XVII: Répartition des mutations de *Pfcr*t en fonction des tranches de parasitémiés.

Mutations de <i>Pfcr</i> t	Parasitémiés				Valeur de p (Test exact de Fisher)
	<5000 n(%)	5000-50000 n(%)	50005- 100000 n(%)	>100000 n(%)	
<i>Pfcr</i>t- Codon 72					
C	56 (40,29)	67 (48,20)	12 (8,63)	4 (2,88)	0,501
S	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	
<i>Pfcr</i>t- Codon 73					
V	56 (39,72)	69 (48,94)	12 (8,51)	4(2,84)	
<i>Pfcr</i>t- Codon 74					
I	29 (36,71)	37 (46,84)	9 (11,39)	4 (5,06)	0,696
M	24 (46,15)	26 (50)	2 (3,85)	0 (0)	
M/I	3 (30)	6 (60)	1 (10)	0 (0)	
<i>Pfcr</i>t- Codon 75					
E	29 (36,71)	37 (46,84)	9 (11,39)	4 (5,06)	6,696
N	24 (46,15)	26 (50)	2 (3,85)	0 (0)	
N/E	3(30)	6 (60)	1 (10)	0 (0)	
<i>Pfcr</i>t- Codon 76					
K	24 (48)	24 (48)	2 (4)	0(0)	0,562
K/T	3(30)	6(60)	1(10)	0(0)	
T	29(35,80)	39(48,15)	9(11,11)	4(4,94)	

Nous n'avons pas constaté de différence statistiquement significative dans la répartition des mutations de *Pfprt* et les tranches de parasitémiées ($P > 0,05$) (**Tableau XVII**).

Tableau XVIII: Répartition des mutations du gène *Pfmdr1* en fonction des tranches de parasitémie

Mutations de <i>Pfmdr1</i>	<5000 n(%)	5000-50000 n(%)	50005- 100000 n(%)	>100000 n(%)	Valeur de p (Test exact de Fisher)
<i>Pfmdr1</i>- Codon 86					
N	47(41,96)	53(47,32)	9(8,04)	3(2,68)	0,018⁺
N/Y	4(36,36)	6(54,55)	1(9,09)	0(0)	
Y	0(0)	10(71,43)	3(21,43)	1(7,14)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 184					
Y	11(35,48)	13(41,94)	6(19,35)	1(3,23)	0,037⁺
Y/F	5(33,33)	6(40)	4(26,67)	0(0)	
F	35(39,33)	48(53,93)	3(3,37)	3(3,37)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1246					
D	51(38,35)	66(49,62)	12(9,02)	4(3,01)	0,332
D/Y	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	
Y	0(0)	1(50)	1(50)	0(0)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1034					
S	51(37,23)	69(50,36)	13(9,49)	4(2,92)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1042					
N	51(37,23)	69(50,36)	13(9,49)	4(2,92)	

⁺= p < 0,005

Le Tableau XVIII montre une association entre l'apparition des mutations 86Y et 184 du gène *Pfmdr1* et les différentes tranches de parasitémiées.

Tableau XIX: Répartition des mutations de *Pfcr* en fonction de la fièvre

Mutations des <i>Pfcr</i>	Fièvre n(%)	Pas de Fièvre n(%)	Valeur de p (Test exact de Fisher)
<i>Pfcr</i>- Codon 72			
C	33(46,48)	38(53,52)	>0,999
S	1(50)	1(50)	
<i>Pfcr</i>- Codon 73			
V	34(46,58)	39(53,42)	
<i>Pfcr</i>- Codon 74			
I	22(48,89)	23(51,11)	0,937
M	9(42,86)	12(57,14)	
M/I	3(42,86)	4(57,14)	
<i>Pfcr</i>- Codon 75			
E	22(48,89)	23(51,11)	0,937
N	9(42,86)	12(57,14)	
N/E	3(42,86)	4(57,14)	
<i>Pfcr</i>- Codon 76			
K	8(42,11)	11(57,89)	0,935
K/T	3(42,86)	4(57,14)	
T	23(48,94)	24(51,06)	

Nous n'avons pas trouvé d'association entre la distribution des acides aminés **S, I, E, T** du gène *Pfcr* et la fièvre ($P > 0,05$) (**Tableau XIX**).

Tableau XX: Répartition des mutations de *Pfmdr1* en fonction de la fièvre

Mutations de <i>Pfmdr1</i>	Fièvre n(%)	Pas de Fièvre n(%)	Valeur de p (Test exact de Fisher)
<i>Pfmdr1</i>- Codon 86			
N	27(49,09)	28(50,91)	0,928
N/Y	4(44,44)	5(55,56)	
Y	4(40)	6(60)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 184			
Y	9(47,37)	10(52,63)	0,947
Y/F	5(41,67)	7(58,33)	
F	21(50)	21(50)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1245			
D	35(50)	35(50)	0,493
Y	0(0)	2(100)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1034			
S	36(49,32)	37(50,68)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1042			
N	36(49,32)	37(50,68)	

Le Tableau XX montre qu'il y'avait pas de différence statistiquement significative dans la répartition des mutations du gène *Pfmdr1* en fonction de la fièvre.

Tableau XXI: Répartition des mutations de *Pfcr* en fonction du taux d'hémoglobine

Mutations de <i>Pfcr</i>	Hb bas n(%)	Hb Normal n(%)	Valeur de p (Test exact de Fisher)
<i>Pfcr</i>- Codon 72			
C	52(73,24)	19(26,76)	0,476
S	1(50)	1(50)	
<i>Pfcr</i>- Codon 73			
V	53(72,60)	20(27,40)	
<i>Pfcr</i>- Codon 74			
I	31(68,89)	14(31,11)	0,619
M	17(80,95)	4(19,05)	
M/I	5(71,43)	2(28,57)	
<i>Pfcr</i>- Codon 75			
E	31(68,89)	14(31,11)	0,619
N	17(80,95)	4(19,05)	
N/E	5(71,43)	2(28,57)	
<i>Pfcr</i>- Codon 76			
K	16(84,21)	3(15,79)	0,574
K/T	5(71,43)	2(28,57)	
T	32(68,09)	15(31,91)	

*Hb : Hémoglobine

Nous n'avons trouvé d'association entre l'apparition des mutations du gène *Pfcr* et le taux d'hémoglobine ($P > 0,05$) (**Tableau XXI**).

Tableau XXII: Répartition des haplotypes de *Pfmdr1* en fonction du taux d'hémoglobine

Mutations de <i>Pfmdr1</i>	Hb bas n(%)	Hb Normal n(%)	Valeur de p (Test exact de Fisher)
<i>Pfmdr1</i>- Codon 86			
N	40(72,73)	15(27,27)	>0,999
N/Y	7(77,78)	2(22,22)	
Y	8(80)	2(20)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 184			
Y	13(68,42)	6(31,58)	0,348
Y/F	11(91,67)	1(8,33)	
F	30(71,43)	12(28,57)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1246			
D	50(71,43)	20(28,57)	>0,999
Y	2(100)	0(0)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1034			
S	53(72,60)	20(27,40)	
<i>Pfmdr1</i>- Codon 1042			
N	53(72,60)	20(27,40)	

*Hb : Hémoglobine

Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre l'apparition des mutations du gène *Pfmdr1* et le taux d'hémoglobine ($P > 0,05$) (Tableau XXII).

Tableau XXIII : Prévalence des mutations de *PfK13* avant et après traitement

Mutations <i>PfK13</i>	Pré-traitement	Post-traitement	Total
	n(%)	n(%)	
Mutations transitoires			
T478T	1(1,33)	0(0)	1(1,33)
Y493Y	1(1,33)	0(0)	1(1,33)
K503K	1(1,33)	0(0)	1(1,33)
Q613Q	1(1,33)	0(0)	1(1,33)
C469C	1(1,33)	1(1,33)	2(2,67)
Total	5(6,67)	1(1,33)	6(8)
Mutations			
A578S	1(1,33)	1(1,33)	2(2,67)

Aucune des mutations connues associées à la résistance partielle à l'artémisinine dans le gène *Pfk13* n'a été observée. Cependant, nous avons observé des polymorphismes synonymes dans certains échantillons de prétraitement au niveau des codons : T478 T, Y493 Y, K503 K et Q613 Q, tous dans un échantillon. Le polymorphisme synonyme C469 C a été

trouvé dans deux échantillons et le A578 S allèle mutant a été observé dans deux échantillons (pré-traitement et jour 28) prélevés sur le même patient

**COMMENTAIRES
ET DISCUSSION**

6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION

L'objectif général de notre étude était de déterminer les facteurs parasitologiques et/ou cliniques associés aux mutations sur les gènes (*PfK13*, *Pfmdr1*, *Pfcr1*). Pour atteindre ces objectifs, nous avons mené une étude transversale dans la commune rurale de Sélingué. La localité de Sélingué choisie pour mener cette étude est une zone éco-climatique qui peut être considérée comme adéquate pour conduire une étude sur l'efficacité des CTAs car la transmission du paludisme y est forte (56). La forte transmission du paludisme dans cette zone, qui a un caractère bimodal est assurée par non seulement la pluviométrie mais aussi l'existence d'un barrage hydraulique. Ce barrage favorise la transmission pendant la saison sèche et expose ainsi les populations pendant toute l'année.

Les données cliniques et parasitologiques recueillies lors de cette étude étaient collectées sur des Formulaire de Report de Cas (FRC) puis validées par le coordinateur de l'étude avant d'être acheminés à Bamako pour la saisie. Après une consultation clinique, le diagnostic se confirmait au laboratoire par la microscopie. Les lames de la goutte épaisse étaient lues par plusieurs personnes afin d'éviter des cas de faux positifs/négatifs qui peuvent être à la base de l'inclusion des patients ne répondant pas aux critères ou le retrait d'un patient du suivi qui est négatif à la goutte épaisse. Ceci est une approche qui est recommandée par l'OMS lors des essais cliniques sur les antipaludiques (57). Cette approche sur le terrain nous a permis de collecter les données et échantillons de qualité et minimiser ainsi les biais lors de l'analyse.

Les papiers confettis collectés étaient asséchés à la température ambiante à l'abri de la lumière et des mouches et ensuite conservés individuellement dans des sachets plastiques contenant des dessiccants. Cette procédure était conforme à celle indiquée par la procédure opératoire standard (SOP) du WWARN concernant la collecte de sang sur le papier confetti (58). Ceci permet d'augmenter la chance de disposer de matériel génétique adéquat pour la suite des activités moléculaires. Le matériel génétique (ADN) a été extrait des papiers confettis à partir du kit Qiagen. Ce kit est reconnu pour sa capacité à donner de l'ADN purifié, débarrassé de toutes les impuretés comme l'hémoglobine qui peut interférer sur la qualité de la PCR (59).

Le génotypage des échantillons a été effectué par séquençage suivant la méthode de Sanger. Cette méthode est considérée comme l'une des plus utilisées et préférées en termes de séquençage du matériel génétique. En raison de sa grande efficacité (faible taux d'erreurs de lecture de l'ordre des bases) et de l'utilisation des produits chimiques non toxiques, il est désigné comme la méthode de séquençage de première génération (60,61).

Cette étude a porté sur un total de 75 enfants tous âgés de 6 à 59 mois. La majorité de ces enfants étaient de la tranche d'âge 3-4 ans soit 40% de la population d'étude avec un sexe ratio de 1,14 en faveur du sexe féminin. Le système immunitaire des enfants de moins de 5 ans étant moins développé, d'où l'intérêt de faire une telle étude avec cette tranche d'âge. Ceci permet d'identifier les facteurs autres que les paramètres personnels pouvant être associés à l'efficacité des CTAs. De plus, cette tranche d'âge est bonne pour faire un échantillonnage car elle représente le plus grand pourcentage de la population malienne quand nous nous référons aux données démographiques (62). Par ailleurs, elle répond aux recommandations de l'OMS concernant la tranche d'âge pour les études d'évaluation et de surveillance de l'efficacité des CTAs (63).

Le génotypage des parasites a montré que 12.0% (n=9 cas) des échecs thérapeutiques étaient attribuables à des recrudescences. Ce qui remet en cause l'efficacité des molécules partenaires aux dérivés de l'artémisinine. Nos résultats étaient différents de celui trouvé par Dahlström et al., 2014 (**Objectif spécifique 1**).

Après séquençage, nous avons obtenu des mutations ponctuelles dans les gènes *Pfprt* et *Pfmdr1* qui sont associées à une diminution de la sensibilité à la luméfantine et à l'amodiaquine. Une prévalence plus faible d'allèle 76T de *Pfprt* a été observée dans les isolats après traitement (50%) par rapport aux isolats avant traitement (64,38%). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'un grand nombre d'échantillon avant traitement ont été traités avec succès. En outre, le retrait de la chloroquine pour le traitement du paludisme a entraîné une baisse de la prévalence de l'allèle 76T dans de nombreux pays africains. La prévalence de base de cet allèle dans cette étude était de 64,38%, similaire aux observations rapportées par Diakité et al., 2019, qui ont trouvé une prévalence également élevée de cet allèle à Dangassa (64,3%) et à Nioro-du-Sahel (42,5%) (15) (**Objectif spécifique 2**)

Dans cette étude, une prévalence élevée de l'haplotype N F D ont été trouvés dans les isolats après traitement dans le bras AL par rapport aux isolats avant traitement. Cela n'a pas été observé dans le bras AA, ce qui suggère que les parasites hébergeant les haplotypes NFD sont susceptibles d'être plus tolérants au traitement AL. Globalement, la prévalence de l'allèle 86N était de 74,32% dans les isolats avant traitement, qui est supérieur à celui rapporté dans deux sites d'étude au Mali, Dangassa et Nioro-du-Sahel (15). De plus, l'allèle 184 F a été trouvé dans la majorité de nos isolats de base (56,76%) contrairement au rapport précédemment observé à Dangassa (39,9 %) et Nioro-du-Sahel (48,2 %) (15) (**Objectif spécifique 2**).

Cependant, notre résultat était différent de celui obtenu par Abel O Idowu et al., 2019 dans une étude clinique faite au Nigeria, qui avaient trouvé une fréquence modérée avec la mutation K76T (26,9%). Cette différence peut s'expliquer par la variation du profil épidémiologique du paludisme d'une région à une autre ainsi que par le profil génétique de la souche plasmodiale (64).

Aucune mutation *Pfk13* associée à la résistance à l'artémisinine (connues en Afrique) n'a été trouvée chez aucun des parasites analysés, conformément à certaines études menées en Afrique où les parasites sont en grande partie de type sauvage dans le domaine de l'hélice *PfK13* (11). Cependant, des mutations transitoires ont été détectés dans certaines positions : T478T, Q613Q, Y493Y, K503K, C469C. De même, ces mutations ont été observés par Edwin Kamau et al en 2015, sur des échantillons en provenance de 12 pays de l'Afrique subsahariennes : la mutation C469C (Ghana), la mutation T478T (Côte d'Ivoire, Kenya), la mutation Y493Y (République Démocratique du Congo, Ghana, Tanzanie)(65). Le A578S, considéré comme l'allèle le plus fréquent chez les parasites africains, a été trouvé dans deux échantillons (prétraitement et jour 28) prélevés chez un même patient (9,66). Malgré que ces CTAs soient toujours efficaces dans la prise en charge du paludisme simple à *P. falciparum*, l'apparition de la mutation 578S chez un patient à J0 et J28 suggère que le même parasite est resté pendant toute la période de suivi du patient (persistance) ou le patient a été réinfecté avec une souche du même profil. De plus, ce polymorphisme est situé à proximité de la mutation C580Y, qui s'est avérée être le déterminant génétique le plus critique de la résistance à l'artémisinine en Asie du Sud-Est(65). Dans les deux cas de figures, un renforcement des capacités de détection des parasites résistants devient ainsi une nécessité. Nous avons aussi trouvé une mutation transitoire au niveau de ce codon (Y493Y) chez un patient. La mutation Y493H est l'une des mutations associées à la résistance à l'artémisinine sur le gène *PfK13* en Asie du Sud-Est (11) (**Objectif spécifique 2**).

Les mutations observées dans cette étude sur les gènes *Pfprt* et *Pfmdr1*, y compris les plus prévalentes (K76T, N86Y, Y184F) n'ont pas été retrouvées associées aux tranches d'âge encore moins aux médicaments utilisés. Toutefois, nous avons remarqué qu'il y avait une association entre ces mutations (74I, 75E, 76T de *Pfprt*) et le bras d'allocation (**Objectif spécifique 3**). Contrairement à nos résultats, une étude menée au Nigeria par Happi et al., 2006 a trouvé une corrélation entre l'âge et les mutations *Pfprt*-76T, *Pfmdr1*-86Y (67). Cette association entre les mutations et l'âge a été également rapportée par Djimé et al.,2003 dans une étude menée au Mali sur l'immunité protectrice contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* (53).

Nous avons constaté dans cette étude que les mutations de *Pfcr*t et de *Pfmdr*1 étaient plus retrouvées chez les cas de réinfections que les cas recrudescences (**Objectif spécifique 3**). Une proportion élevée, des parasites porteurs d'allèles *Pfcr*t-76T, *Pfmdr*1-86Y, *Pfmdr*1-184Y a été observée plus avec les cas de réinfection. Ceci peut s'expliquer par la sélection de ces parasites par pression médicamenteuse exercée par essentiellement les médicaments partenaires des dérivés de l'Artémisinine qui maintiennent élevée la fréquence de ces mutations. Ce résultat a également été trouvé au Bénin par Dahlström et al., dans une étude menée sur l'efficacité clinique des thérapies combinées à base d'artémisinine en 2014 (68).

Les parasitémies les plus exposées aux mutations de *Pfcr*t et *Pfmdr*1 dans cette étude étaient comprise entre 5000-50000 parasites/uL, toutefois il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans la répartition des mutations en fonction des différentes tranches de parasitémies exceptée, pour la position 86 du gène *Pfmdr*1 ($p=0,037$). Les mutations *Pfcr*t-74I ; *Pfcr*t-75E ; *Pfcr*t-76T ont été observés chez 4 patients ayant des parasitémies >100 000 parasites/uL mais nous n'avons pas trouvé d'association avec ces parasitémies contrairement aux mutations *Pfmdr*1-86Y et *Pfmdr*1-184F, où il y'avait une association (**Objectif spécifique 3**). Cependant, une étude menée simultanément au Soudan et en Tanzanie a trouvé une association entre le niveau de parasitémie initiale et la capacité à éliminer les parasites porteurs de mutations *Pfcr*t-76T, *Pfmdr*1-86Y (69). De plus, cette association a également été observée en Tanzanie par Mwaiswelo et al.,2019 avec des parasitémies supérieurs à 100 000 parasites/uL (22).

Dans la présente étude, les patients présentant la fièvre avaient des fréquences élevées des mutations *Pfcr*t-76T, *Pfmdr*1-86Y, *Pfmdr*1-184F. Cependant, nous n'avons pas trouvé d'association entre les mutations observées sur les gènes *Pfcr*t et *Pfmdr*1 et la fièvre (**Objectif spécifique 3**). Ce résultat était différent de celui obtenu en Tanzanie par Mwaiswelo et al.,2019 où la fièvre au moment de l'enrôlement a été retrouvée associée à un retard de clairance parasitaire chez les parasites portant ces mutations après traitement (22).

L'analyse des données sur l'anémie qui est un facteur de risque supplémentaire pour un retard de clairance parasitaire (70), a montré une proportion élevée des mutations (K76T, N86Y, Y184F) chez les patients avec un taux d'hémoglobine bas. Cependant, il n'y'avait pas d'association entre ces mutations et la baisse du taux d'hémoglobine chez ces patients ($p>0,05$) (**Objectif spécifique 3**).

CONCLUSION

7 CONCLUSION

Avec la forte prévalence des mutations impliquées dans la résistance de *Plasmodium falciparum* sur les gènes *Pfprt*, *Pfmdr1* et *PfK13*, comme précédemment observée dans certaines études, il était impératif pour nous de déterminer les facteurs associés à la survenue des mutations sur ces gènes. Pour cela, nous avons fait une discrimination des cas de réinfections des cas de recrudescences, une estimation des fréquences des mutations ponctuelles et enfin identifier les facteurs associés à ces mutations.

Cette étude a permis de tirer les conclusions suivantes. Une forte prévalence des mutations 76T (64,38%), 184F (56,76%) et 86N (74,32%) dans cette étude pourraient être liées à une sélection par pression médicamenteuse engendrée par les CTAs. Des mutations transitoires (T478T, Q613Q, Y493Y, K503K) ont été observées chacune dans 1 échantillon. L'allèle A578S et C469C ont été identifiés dans deux échantillons.

Ces mutations transitoires pourraient être des indications de l'apparition de la mutation sur le codon 580 du gène *PfK13*, codon qui est lié au retard de clairance de *P. falciparum* en Asie du Sud-Est.

Ainsi le suivi des mutations transitoires serait d'une nécessité impérieuse au cours de la surveillance de la résistance des *P. falciparum* aux CTA au Mali.

RECOMMENDATIONS

8 RECOMMANDATIONS

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

Au LBMA et ses partenaires

- De continuer à séquencer les cas d'échecs thérapeutiques pour la recherche d'éventuelles mutations associées à la résistance des molécules constituant les CTAs ;
- De continuer le suivi des marqueurs de résistance aux antipaludiques et d'identifier des facteurs pouvant être associés à l'apparition des mutations chez ces marqueurs.

Au PNLP et au ministère de la Santé et des affaires sociales

- De mobiliser plus de moyens pour continuer la surveillance de l'efficacité des CTAs ;
- D'accroître la formation et le développement des capacités des personnels de santé sur les méthodes d'évaluation de la chimiorésistance pour une bonne surveillance de ces molécules.

REFERENCES

9 REFERENCES

1. OMS. Paludisme [Internet]. Organisation mondiale de la santé. 2020 [cité 6 sept 2019]. Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
2. Laurent V, Hilly J, Bedel J, Planquette B, Legriél S, Troché G, et al. Paludisme grave d'importation de l'adulte. *Prat En Anesth Réanimation*. 1 févr 2014;18(1):5-12.
3. Lekana-Douki JB, Boundenga L. Genotyping for *Plasmodium spp.*: Diagnosis and Monitoring of Antimalarial Drug Resistance. *Genotyping* . 5 nov 2018 [cité 16 févr 2020] ; Disponible sur : <https://www.intechopen.com/books/genotyping/genotyping-for-plasmodium-spp-diagnosis-and-monitoring-of-antimalarial-drug-resistance>
4. OMS. Rapport 2020 sur le paludisme dans le monde. 2020 nov [cité 15 déc 2020] p. 19. Report No.: ISBN 978-92-4-001579-1.

Disponible sur : <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020>

5. PNLP-Mali. Enquête sur les Indicateurs du Paludisme (EIPM) 2015 . 07/16 [cité 6 sept 2019]. Disponible sur : <https://www.dhsprogram.com/pubs/pdf/MIS24/MIS24.pdf>
6. PNLP-Mali. Canevas de synthèse des rapports d'activités 2018 et de programmation 2020 pour les journées d'évaluation des structures centrales. 2018.
7. Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnädig N, Uhlemann A-C, et al. Globally prevalent *PfMDR1* mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nat Commun*. 18 mai 2016 [cité 28 oct. 2020] ;7. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4873939/>
8. Oboh MA, Ndiaye D, Antony HA, Badiane AS, Singh US, Ali NA, et al. Status of Artemisinin Resistance in Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* from Molecular Analyses of the Kelch13 Gene in Southwestern Nigeria . Vol. 2018, *BioMed Research International*. Hindawi; 2018 [cité 27 oct 2020]. p. e2305062.

Disponible sur : <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/2305062/>

9. Uwimana A, Legrand E, Stokes BH, Ndikumana J-LM, Warsame M, Umulisa N, et al. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat Med.* Oct. 2020 ;26(10) :1602-8.
10. Diarra Y, Koné O, Sangaré L, Doumbia L, Haidara DBB, Diallo M, et al. Therapeutic efficacy of artemether–lumefantrine and artesunate–amodiaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mali, 2015–2016. *Malar J.* 25 mai 2021 ;20(1) :235.
11. Siddiqui FA, Boonhok R, Cabrera M, Mbenda HGN, Wang M, Min H, et al. Role of *Plasmodium falciparum* Kelch 13 Protein Mutations in *P. falciparum* Populations from Northeastern Myanmar in Mediating Artemisinin Resistance. *mBio.* 25 févr 2020 [cité 15 nov 2020];11(1).

Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7042691/>

12. Dama S, Niangaly H, Ouattara A, Sagara I, Sissoko S, Traore OB, et al. Reduced ex vivo susceptibility of *Plasmodium falciparum* after oral artemether–lumefantrine treatment in Mali. *Malar J.* 2 févr 2017;16(1):59.
13. Kiaco K, Teixeira J, Machado M, do Rosário V, Lopes D. Evaluation of artemether-lumefantrine efficacy in the treatment of uncomplicated malaria and its association with *Pfmdr1*, *Pfcatpase6* and K13-propeller polymorphisms in Luanda, Angola. *Malar J.* 16 déc. 2015 ;14(1) :504.
14. Menard S. *Plasmodium falciparum* et résistance aux antipaludiques : aperçu et conséquences des facteurs impliqués dans la sélection et la diffusion des parasites résistants [Internet] [phdthesis]. Université Toulouse 3 Paul Sabatier ; 2017 [cité 16 juill 2021]. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01919157/document>
15. Diakité SAS, Traoré K, Sanogo I, Clark TG, Campino S, Sangaré M, et al. A comprehensive analysis of drug resistance molecular markers and *Plasmodium falciparum* genetic diversity in two malaria endemic sites in Mali. *Malar J.* 12 nov 2019;18(1):361.
16. Gadalla NB, Tavera G, Mu J, Kabyemela ER, Fried M, Duffy PE, et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* anti-malarial resistance-associated polymorphisms in *Pfprt*,

Pfmdr1 and *Pfnhe1* in Muheza, Tanzania, prior to introduction of artemisinin combination therapy. *Malar J* [Internet]. 25 mars 2015 [cité 20 Janv. 2021] ;14.

Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4392636/>

17. Menard D, Dondorp A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. juill 2017 [cité 2 janv 2021];7(7).

Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5495053/>

18. Ambroise-thomas P. Traitement du paludisme : prévenir les résistances par les associations d'antipaludiques. undefined. 2000 [cité 18 juill 2021] ; Disponible sur : <https://www.semanticscholar.org/paper/Traitement-du-paludisme%3A-pr%C3%A9venir-les-r%C3%A9sistances-Ambroise-thomas/d79e2578a107f49237921df2288e86757f7bf96c>

19. GHARBI (Myriam). Paludisme des voyageurs : évaluation du rôle sentinelle dans la résistance aux antipaludiques [phdthesis]. Université Pierre et Marie Curie ; 2013. Disponible sur : <https://documentation.ehesp.fr/memoires/theses/gharbi.pdf>

20. Woodrow CJ. The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread. *FEMS Microbiol Rev*. Janv. 2017 ;41(1) :34-48.

21. Argy N. Analyse des facteurs d'hôte et facteurs parasitaires dans le paludisme grave d'importation [phdthesis]. Université Sorbonne Paris Cité ; 2015 [cité 25 janv 2021]. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01535631>

22. Mwaiswelo R, Ngasala B, Jovel I, Xu W, Larsson E, Malmberg M, et al. Prevalence of and Risk Factors Associated with Polymerase Chain Reaction-Determined *Plasmodium falciparum* Positivity on Day 3 after Initiation of Artemether-Lumefantrine Treatment for Uncomplicated Malaria in Bagamoyo District, Tanzania. *Am J Trop Med Hyg*. mai 2019;100(5):1179-86.

23. Cox FEG. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev*. Oct. 2002 ;15(4) :595-612.

24. Lix M. Étude descriptive du paludisme d'importation pour une approche diagnostique adaptée à l'enfant en médecine générale. A propos de 282 cas à l'Hôpital Robert Debré (75). 20 sept 2017 ;70.

25. Talapko, Škrlec, Alebić, Jukić, Včev. Malaria: The Past and the Present. *Microorganisms*. 21 juin 2019 ;7(6) :179.
26. ANOFEL. Paludisme . Université Médicale Virtuelle Francophone. 2015 [cité 18 juill 2021]. Disponible sur : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/1.html>
27. Paludisme [Internet]. Médecine tropicale ; 2020 [cité 18 juill 2021]. Disponible sur : <http://medecinetropicale.free.fr/cours/paludisme.pdf>
28. Diallo MLP. Etudiants subsahariens à Toulouse et prévention du paludisme d'importation [exercice]. Université Toulouse III - Paul Sabatier ; 2018 [cité 25 janv 2021]. Disponible sur : <http://thesesante.ups-tlse.fr/2140/>
29. Diahara DT, Danaya DK. Note d'information stratégique et politique sur la prévention du paludisme au Mali. :28.
30. Duru V. Etudes des mécanismes cellulaires et moléculaires de *Plasmodium falciparum* impliqués dans les résistances aux combinaisons à bases de dérivés de l'artémisinine [phdthesis]. Université Montpellier ; 2016 [cité 25 janv 2021]. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01615022>
31. Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, Zaramella M, Caputo A, Garavelli PL. Climate, environment and transmission of malaria. *Infez Med*. 1 juin 2016 ;24(2) :93-104.
32. Baaklini S. Compréhension de la résistance humaine au paludisme : des études génétiques aux approches fonctionnelles [These de doctorat]. Aix-Marseille ; 2017 [cité 7 janv 2021]. Disponible sur : <https://www.theses.fr/2017AIXM0384>
33. Sanka M. Compréhension des mécanismes moléculaires et des facteurs génétiques impliqués dans le paludisme sévère : analyse des profils transcriptomiques et processus biologiques caractéristiques du neuropaludisme et méta-analyse sur des gènes associés à la résistance au paludisme [These de doctorat]. Aix-Marseille ; 2018 [cité 7 janv 2021]. Disponible sur : <https://www.theses.fr/2018AIXM0615>
34. Durieux M-F. Diagnostic biologique du paludisme. *Actual Pharm*. mars 2018 ;57(574):25-9.

35. OMS | Traitement du paludisme - tour d'horizon . WHO. [Cité 16 oct 2019]. Disponible sur : <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/fr/>
36. DHMOSH. Diagnostic, traitement et prévention du paludisme: Directive pour le personnel médical de l'organisation des nations-unies. Avr. 2019 ;5.
37. OMS | Recommandation de politique générale de l'OMS : Chimio-prévention du paludisme saisonnier pour lutter contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* en zone de forte transmission saisonnière dans la sous-région du Sahel en Afrique . WHO. [Cité 24 sept 2019]. Disponible sur : https://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_smc_policy_recommendation/fr
38. Fairhurst RM. Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes. *Curr Opin Infect Dis.* oct 2015;28(5):417-25.
39. Xie SC, Ralph SA, Tilley L. K13, the Cytostome, and Artemisinin Resistance. *Trends Parasitol.* juin 2020 ;36(6) :533-44.
40. Straimer J, Gnädig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP, et al. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science.* 23 janv 2015 ;347(6220) :428-31.
41. He Y, Campino S, Benavente ED, Warhurst DC, Beshir KB, Lubis I, et al. Artemisinin resistance-associated markers in *Plasmodium falciparum* parasites from the China-Myanmar border: predicted structural stability of K13 propeller variants detected in a low-prevalence area. *PLOS ONE.* 18 mars 2019 ;14(3) : e0213686.
42. Matrevi SA, Opoku-Agyeman P, Quashie NB, Bruku S, Abuaku B, Koram KA, et al. *Plasmodium falciparum* Kelch Propeller Polymorphisms in Clinical Isolates from Ghana from 2007 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother.* 22 oct 2019 [cité 28 oct 2020];63(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6811449/>
43. Maïga-Ascofaré O, May J. Is the A578S Single-Nucleotide Polymorphism in K13-propeller a Marker of Emerging Resistance to Artemisinin Among *Plasmodium falciparum* in Africa. *J Infect Dis.* 1 janv 2016;213(1):165-6.

44. Naß J, Efferth T. Development of artemisinin resistance in malaria therapy. *Pharmacol Res.* Août 2019 ;146 :104275.
45. Duah NO, Maveji SA, de Souza DK, Binnah DD, Tamakloe MM, Opoku VS, et al. Increased *Pfmdr1* gene copy number and the decline in *Pfcrt* and *Pfmdr1* resistance alleles in Ghanaian *Plasmodium falciparum* isolates after the change of anti-malarial drug treatment policy. *Malar J.* 30 oct 2013; 12:377.
46. Cooper RA, Hartwig CL, Ferdig MT. *Pfcrt* is more than the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance gene: a functional and evolutionary perspective. *Acta Trop.* 1 juin 2005;94(3):170-80.
47. Mita T, Tanabe K, Kita K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int.* sept 2009;58(3):201-9.
48. Misbahi H. Malaria: Mode of action of chloroquine and mechanism of chloroquine resistance. *J Pharm Clin.* 1 sept 2013; 32:143-53.
49. Sanchez CP, Dave A, Stein WD, Lanzer M. Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol.* août 2010;40(10):1109-18.
50. Martin R, Marchetti R, Cowan A, Howitt S, Bröer S, Kirk K. Chloroquine Transport via the Malaria Parasite's Chloroquine Resistance Transporter. *Science.* 1 sept 2009; 325:1680-2.
51. Lakshmanan V, Bray PG, Verdier-Pinard D, Johnson DJ, Horrocks P, Muhle RA, et al. A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance. *EMBO J.* 6 juill 2005;24(13):2294-305.
52. Djimdé AA, Fofana B, Sagara I, Sidibe B, Toure S, Dembele D, et al. Efficacy, Safety, and Selection of Molecular Markers of Drug Resistance by Two ACTs in Mali. *Am J Trop Med Hyg.* 1 Mars 2008;78(3):455-61.
53. Djimdé AA, Doumbo OK, Traore O, Guindo AB, Kayentao K, Diourte Y, et al. Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* nov 2003;69(5):558-63.

54. Ouji M, Augereau J-M, Paloque L, Benoit-Vical F. *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies: A sword of Damocles in the path toward malaria elimination. *Parasite* . [Cité 25 déc 2019] ;25.

Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5909375/>

55. O’Flaherty K, Maguire J, Simpson JA, Fowkes FJI. Immunity as a predictor of anti-malarial treatment failure: a systematic review. *Malar J* [Internet]. 20 avr 2017 [cité 22 janv 2021] ;16.

Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5397737/>

56. Berthe S, Sissoko MS. Promouvoir l’utilisation généralisée des combinaisons thérapeutiques à base d’artémisinine pour le traitement du paludisme simple au Mali. *Janv 2010* ;32.

57. OMS | Efficacité des médicaments antipaludiques et pharmacorésistance [Internet]. WHO. World Health Organization ; [cité 17 févr 2021].

Disponible sur : http://www.who.int/malaria/areas/treatment/drug_efficacy/fr/

58. University of Maryland, Mahidol University, Global Scientific Solutions for health, WWARN. Molecular Testing for Malaria Standard Operating Procedure (SOP) Collection of blood on filterpaper. :22.

59. Menu E, Mary C, Toga I, Raoult D, Ranque S, Bittar F. Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples. *BMC Res Notes* . 27 mars 2018 [cité 31 mai 2021] ;11.

Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869780/>

60. Lamoril J, Ameziane N, Deybach J-C, Bouizegarène P, Bogard M. Les techniques de séquençage de l’ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-Anal Biol Spéc.* oct 2008;23(5):260-79.

61. Pillai S, Gopalan V, Lam A. Review of sequencing platforms and their applications in pheochromocytoma and paragangliomas. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1 mai 2017 ;116.

62. INSTAT, CPS/SS-DS-PF, ICF. Enquête Démographique et de Santé. Août 2019 ; Disponible sur : <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/FR358/FR358.pdf>
63. OMS. Evaluation et Surveillance de l'efficacité des antipaludiques pour le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* non compliqué. 2004 ; Disponible sur : https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68595/WHO_HTM_RBM_2003.50_fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y
64. Idowu AO, Oyibo WA, Bhattacharyya S, Khubbar M, Mendie UE, Bumah VV, et al. Rare mutations in *Pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* detected in clinical isolates from patients treated with anti-malarial drug in Nigeria. *Malar J.* 18 sept 2019;18(1):319.
65. Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, et al. K13-Propeller Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* Parasites from Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis.* 15 avr 2015;211(8):1352-5.
66. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, et al. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *N Engl J Med.* 23 juin 2016;374(25):2453-64.
67. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Bolaji OM, Sowunmi A, Kyle DE, et al. Association between mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and *P. falciparum* multidrug resistance 1 genes and in vivo amodiaquine resistance in *P. falciparum* malaria-infected children in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg.* juill 2006;75(1):155-61.
68. Dahlström S, Aubouy A, Maïga-Ascofaré O, Faucher J-F, Wakpo A, Ezinmègnon S, et al. *Plasmodium falciparum* Polymorphisms Associated with Ex Vivo Drug Susceptibility and Clinical Effectiveness of Artemisinin-Based Combination Therapies in Benin. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2014;58(1):1-10.
69. Khalil IF, Alifrangis M, Tarimo DS, Staalsø T, Satti GMH, Theander TG, et al. The roles of the *Pfprt* 76T and *Pfmdr1* 86Y mutations, immunity and the initial level of parasitaemia, in predicting the outcome of chloroquine treatment in two areas with different transmission intensities. *Ann Trop Med Parasitol.* juill 2005;99(5):441-8.

70. Zwang J, Dorsey G, Mårtensson A, d'Alessandro U, Ndiaye J-L, Karema C, et al. Plasmodium falciparum clearance in clinical studies of artesunate-amodiaquine and comparator treatments in sub-Saharan Africa, 1999–2009. Malar J. 25 mars 2014; 13:114.

ANNEXES

10 ANNEXES

10.1 Annexe 1

✓ Extraction d'ADN de *Plasmodium falciparum* avec le kit Qiagen

Découpage des papiers confettis

Matériels

Il faut disposer de : Puncheur, de plaque de découpage des confettis, de kimwipes, d'alcool 70 à 90°, portoir de tube 1,5mL, de tubes 1,5mL, de tubes 50mL.

Procédures

Les tubes et les colonnes sont rangés par ordre en fonction des numéros d'échantillon. Chaque colonne correspond au tube qui porte le même numéro d'échantillon

Découper 3 spots de sang puis les placer dans les tubes 1,5mL de l'une des rangées des tubes 1,5mL.

Lors du découpage pour passer d'un échantillon à un autre, le puncheur doit être trempé dans la solution d'alcool puis dans de l'eau distillée ensuite nettoyé avec le kimwipes. Il faut s'assurer que le puncheur est débarrassé de toute trace d'alcool. La plaque de découpage doit être nettoyée aussi à l'alcool. Il faut aussi s'assurer que la plaque n'est pas mouillée par l'alcool au moment de découper les confettis.

Extraction proprement dite

Il faut disposer de :

Au moins 3 bains-marie, portoir de tube 1,5mL, portoir de tube 1,5mL pour le bain-marie, Vortex, éthanol 96-100° pipettes de [20, 200, 1000 µL], centrifugeuse de tube 1,5mL.

Avant de commencer l'extraction, il faut s'assurer que :

- Les bains marie sont à 85°C pour l'étape 2, 56°C pour l'étape 3 et 70°C pour l'étape 4,
- Equilibrer le buffer AE ou l'eau distillée à la température ambiante pour éluer l'étape 12,
- S'assurer que les buffers AW1 et AW2 ont été préparés avec l'alcool comme indiqué dans le guide du kit d'extraction,
- S'assurer que les buffers AL et ATL ne contiennent pas de précipités, sinon les faire dissoudre en les incubant à 56° C.

Procédure

1. Dans les tubes de 1,5ml contenant les 3 spots de sang déjà découpés ajouter 180µl de buffer ATL,
2. Incuber à 85°C pendant 10mn puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.
3. Ajouter 20µl de protéinase k de la solution de stock. Vortexer, puis incuber à 56°C pendant une heure. Centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.
4. Ajouter 200µl de buffer AL aux échantillons. Centrifuger bien et incuber à 70°C pendant 10mn puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.
5. Ajouter 200µl d'éthanol (96 100%) aux échantillons bien vortexer puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,
6. Soigneusement transférer la solution de l'étape 5 dans les colonnes. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1mn. Transférer dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat, bien fermer les colonnes pour éviter la formation des aérosols lors de la centrifugation.
7. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 µl du buffer AW1. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1mn. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat.
8. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 µl de buffer AW2. Fermer les colonnes puis centrifuger à 14000rpm pendant 3mn.
9. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat puis centrifuger à haute vitesse pendant 1mn. Cette étape aide à éliminer le restant de la solution du buffer AW2 de l'étape précédente.
10. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes 1.5ml stériles puis jeter les tubes de collection qui peuvent contenir encore du filtrat. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 150µl du buffer AE ou d'eau distillée. Incuber à la température ambiante (15°C à 25°C) pendant 1mn puis centrifuger à 8000rpm pendant 1mn.

Après l'extraction, l'ADN obtenu était conservé à -20°C

10.2 Annexe 2

✓ Séquençage du gène *Pfk13* :

Protocole de PCR :

1^{ère} réaction

Réactifs	Pour 20.0µL de réaction	Conc final
ddH ₂ O	12,4µL	-----
5X HF Buffer	4,0µL	1X
10µM 1° Forw Primer	1,0µL	0,5µM
10µM 1° Rev Primer	1,0µL	0,5µM
10mM dNTPs	0,4µL	0,2µM
HF Phusion Taq	0,2µL	1U
ADN	1,0µL	-----
TOTAL	20,0µL	

Diluer le produit de PCR de la 1ere réaction au 1 :10

2eme réaction

Réactifs	Pour 20.0µL de réaction	Conc final
ddH ₂ O	12,4µL	-----
5X HF Buffer	4,0µL	1X
10µM 2° Forw Primer	1,0µL	0,5µM
10µM 2° Rev Primer	1,0µL	0,5µM
10mM dNTPs	0,4µL	0,2µM
HF Phusion Taq	0,2µL	1U
Diluât (1:10) 1°RxN	1,0µL	-----
TOTAL	20,0µL	

✓ Séquençage du gène *Pfmdr1* :

Protocole de PCR

1^{ère} Réaction

Réactifs	Pour 15,0µL de réaction	Conc final
ddH ₂ O	5,7µL	-----
2X TaqMan Buffer	7,5µL	1X
10µM 1°Forw Primer	0,4µL	0,5µM
10µM 1° Rev Primer	0,4µL	0,5µM
Template DNA	1,0µL	-----
TOTAL	15,0µL	

Diluer le produit de PCR de la 1^{ère} réaction au 1 : 6 pour la région 2.

2^{ème} réaction

Réactifs	Pour 15,0µL de réaction	Conc final
ddH ₂ O	4,7µL	-----
2X TaqMan Buffer	7,5µL	1X
10µM 2°Forw Primer	0,4µL	0,5µM
10µM 2° Rev Primer	0,4µL	0,5µM
Diluat 1°RxN ADN	2,0µL	-----
TOTAL	15,0µL	

✓ Séquençage du gène *Pfprt* :

Protocole de PCR

1^{ère} Réaction

Réactifs	Pour 15,0µL de réaction	Conc final
ddH ₂ O	5,7µL	-----
2X master mix (Promega)	7,5µL	1X
10µM 1°Forw Primer	0,4µL	0,5µM
10µM 1° Rev Primer	0,4µL	0,5µM
Template DNA	1,0µL	-----
TOTAL	15,0µL	

Diluer le produit de la 1^{ère} PCR au 1 : 10 pour la 2^{ème} réaction.

2^{ème} réaction

Réactifs	Pour 15,0µL de réaction	Conc final
ddH ₂ O	4,7µL	-----
2X master mix (Promega)	7,5µL	1X
10µM 2°Forw Primer	0,4µL	0,5µM
10µM 2° Rev Primer	0,4µL	0,5µM
Diluat 1°RxN ADN	2,0µL	-----
TOTAL	15,0µL	

10.3 Annexe 3

Cycle sequencing Master Mix

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

FICHE SIGNALITIQUE

NOM : CAMARA

PRENOM : ABDOULAYE

TEL : +223 71 13 43 54

Email : blodawaga@gmail.com

Titre de la thèse : Facteurs associés aux mutations sur les gènes *Pfk13*, *Pfmdr1*, et *Pfcr1* dans la localité Sélingué en 2018

Nationalité : Malienne

Année Universitaire : 2021- 2022

Ville de soutenance : BAMAKO- MALI

Lieu de dépôt : bibliothèque de la Faculté de Pharmacie et de Médecine et d'Odontostomatologie.

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

RESUME

Malgré les efforts consentis pour la lutte, le paludisme reste une priorité de santé publique car c'est l'une des premières causes infectieuses de mortalité dans les zones endémiques. Plus de 40% de la population mondiale soit 3,3 milliards de personnes vivent dans ces zones. L'objectif de cette étude était de déterminer les facteurs parasitologiques et cliniques associés aux mutations sur les gènes *PfK13*, *Pfmdr1* et *Pfcr1* à partir des isolats collectés dans la commune rurale de Sélingué. C'est dans ce cadre que nous avons mené une étude transversale ouverte à deux bras (ASAQ de la firme pharmaceutique DENK et Coartem de NOVARTIS) entre Octobre 2015 et Janvier 2017. Un groupe recevait l'ASAQ (artesunate+amodiaquine) et l'autre Coartem® (artéméther+luméfantrine) selon un code bien établi. Au départ 449 enfants âgés de 6 à 59 mois ont été inclus dans l'étude avec une parasitémie comprise entre 2000 et 199.999 parasites par microlitre de sang, parmi lesquels 75 ont fait un échec thérapeutique et c'est sur ces 75 cas que notre étude s'est portée. Le génotypage a été effectué en utilisant les marqueurs moléculaires *msh1*, *msh2* et *glurp* dans le but de discriminer les cas de recrudescence des cas de réinfection et la détection des mutations sur les gènes *Pfk13*, *Pfmdr1* et *Pfcr1* par séquençage

(Sanger sequencing). Après séquençage, nous avons obtenu des mutations ponctuelles connues dans la résistance des parasites sur les gènes *Pfcr1* et *Pfmdr1* dont les plus répandues dans la présente étude étaient *Pfcr1-76T* (64,38%) suivis *Pfmdr1-Y184F* (56,76%) et *Pfmdr1-N86* (74,32%). Des mutations transitoires ont été détectées dans certaines positions du gène *PfK13* : T478T, Q613 Q, Y493 Y, K503 K, C469C. le A578 S, considéré comme l'allèle le plus fréquent chez les parasites africains, a été trouvé dans deux échantillons prélevés chez le même patient. Nous n'avons pas trouvé d'association entre certaines mutations et les facteurs parasitologiques et cliniques tels que l'âge, la température, le taux d'hémoglobine, les bras d'allocation et la parasitémie. Cependant, des différences statistiquement significatives ont été obtenues avec certaines positions tels que 74I, 75E, 76T de *Pfcr1* (bras de traitement) ; 86Y (parasitémie). Malgré l'efficacité des molécules antipaludiques, l'augmentation de la fréquence des mutations interpelle le monde scientifique sur l'amélioration de ces molécules ou leurs conditions d'utilisation.

Mots clés : Facteurs, mutations, gène, *Pfmdr1*, *Pfk13*, *Pfcr1*.

IDENTIFICATION SHEET

Last Name: CAMARA

First Name: ABDOULAYE

Phone: +223 71 13 43 54

Email: blodawaga@gmail.com

Title: Factors associated with mutations in the *Pfk13*, *Pfmdr1* and *Pfcr1* genes in the Sélingué locality in 2018

Nationality: Malienne

Academic Year: 2021-2022

City of defense: Bamako-Mali

Place of deposit: Library of Faculty of Medicine, Pharmacy and Odonto-stomatology

Focus area: Molecular Parasitology, Public Health, Pharmacology.

ABSTRACT

In spite of the efforts made in the fight against malaria, malaria remains a public health priority because it is one of the leading infectious causes of death in endemic areas. More than 40% of the world's population, 3.3 billion people, live in these areas. The objective of this study was to access the parasitological and clinical factors associated with mutations in the *PfK13*, *Pfmdr1* and *Pfcr1* genes from isolates collected in the rural commune of Sélingué in Mali. It is within this framework that we conducted a two-arm open-label clinical trial (ASAQ from the pharmaceutical firm DENK and COARTEM from NOVARTIS) between October 2015 and January 2017. One group received ASAQ (artesunate+amodiaquine) and the other Coartem® (artemether+lumefantrine) according to a well-established code. Initially 449 children aged 6-59 months were included in the study with a parasitaemia between 2000 and 199,999 parasites per microliter of blood, among which 75 had a therapeutic failure and it is on these 75 cases that our study focused. Genotyping was performed using the molecular markers *msp1*, *msp2* and *glurp* in order to discriminate between cases of recrudescence and reinfection and the detection of mutations in the *Pfk13*, *Pfmdr1* and *Pfcr1* genes by sequencing (Sanger sequencing). After sequencing, we obtained point mutations known to be involved in parasite

resistance on the *Pfcr1* and *Pfmdr1* genes, the most prevalent of which in the present study were *Pfcr1-76T* (64.38%) followed by *Pfmdr1-184F* (56,76%) and *Pfmdr1-N86* (74,32%). Transient mutations were detected in some positions of the *Pfk13* gene: T478T, Q613Q, Y493Y, K503K, C469C. A578S, considered the most frequent allele in African parasites, was found in two samples from the same patient. We did not find any association between certain mutations and parasitological and clinical factors such as age, temperature, haemoglobin level, allocation arms and parasitaemia. However, statistically significant differences were observed with some positions such as 74I, 75E, 76T of *Pfcr1* (allocation arm); 86Y (parasitaemia). In spite of the effectiveness of antimalarial molecules, the increase in the frequency of mutations challenges the scientific world to improve these molecules or their conditions of use.

Keywords: Factors, mutations, gene, *Pfmdr1*, *Pfk13*, *Pfcr1*

SERMENT DE GALIEN



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

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

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

la probité et du désintéressement,

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

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

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

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

Je le jure !