

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI

Un peuple - Un but - Une foi



Université des Sciences, des Techniques et
des Technologies de Bamako



FACULTE DE PHARMACIE

Année universitaire : 2018- 2019

N°...../

Titre

Polymorphisme du gène *PfK13* et les mutations associées au
retard de la clairance parasitaire dans les localités de Missira et
Sélingué en 2016

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 5/12/2019 devant la faculté de pharmacie pour
l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)

Par

M. Bakary COULIBALY

Jury:

Président du jury: Pr Ababacar MAIGA

Membres: Pr Mouctar DIALLO
Dr Vincent SANOGO

Co-directeur de thèse: Dr Youssouf DIARRA

Directeur de thèse : Pr Ousmane KOITA

**LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE ANNÉE
UNIVERSITAIRE : 2018-2019**

ADMINISTRATION

DOYEN : M. Boubacar TRAORE, Professeur

VICE-DOYEN : M. Ababacar MAIGA, Professeur

SECRÉTAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

AGENT COMPTABLE : M. Famalé DIONSAN, Contrôleur des Finances.

PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologue
2	Mahamadou	CISSE	Biologie
3	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
4	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
5	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
6	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
7	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
8	Alou A.	KEÏTA	Galénique
9	Mamadou	KONE	Physiologie
10	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
11	Brehima	KOUMARE	Pharmacognosie
12	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
13	Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
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	Amagana	DOLO	Parasitologie – Mycologie
7	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique / Nutrition
8	Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
9	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie – Virologie
2	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
3	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
4	Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER
5	Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique
6	Souleymane	DAMA	Parasitologie Entomologie méd.
7	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
8	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
9	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie clinique
10	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
11	Yaya	GOÏTA	Biochimie clinique
12	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-virologie
13	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/ Biostatistiques
14	Aminata	KONE	Biologie moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé publique
16	Dionkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
17	Issaka	SAGARA	Santé publique/Biostatistiques
18	Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
19	Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire
20	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé publique/ Biostatistiques

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
4	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
5	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
6	Oumar	GUINDO	Epidémiologie
7	Falaye	KEÏTA	Santé publique/Santé Environnement
8	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
9	Yacouba	MAÏGA	Biostatistiques
10	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
11	Oumar	SANGHO	Epidémiologie

12	Djakaridia	TRAORE	Hématologie
----	------------	--------	-------------

DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Saïbou	MAÏGA	Législation
3	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
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	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
7	Moussa	SANOGO	Gestion
8	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
2	Antoine	DARA	Sciences pharmaceutiques
3	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
4	Adama	DENOU	Pharmacognosie
5	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
6	Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
7	Assitan	KALOGA	Législation
8	Ahmed	MAÏGA	Législation
9	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique
10	Aboubacar	SANGHO	Législation
11	Bourama	TRAORE	Législation
12	Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques
13	Sylvestre	TRAORE	Gestion pharmaceutique
14	Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
15	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

DER : SCIENCES DU MÉDICAMENT

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie chimique
2	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
3	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

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

DER : SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
2	Cheick F.	TRAORE	Biologie/ Entomologie
3	Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
2	Boureima	KELLY	Physiologie médicale

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

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

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Adourahamane	COULIBALY	Anthropologie médicale
4	Souleymane	COULIBALY	Psychologue
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Modibo	DIARRA	Nutrition
7	Moussa I	DIARRA	Biophysique
8	Babacar	DIOP	Chimie
9	Atimé	DJIMDE	Bromatologie
10	Yaya	KANE	Galénique
11	Boubacar	KANTE	Galénique
12	Aboubakary	MAÏGA	Chimie organique
13	Massambou	SACKO	SCMP/SIM
14	Modibo	SANGARE	Anglais
15	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
16	Mme Fatoumata	SOKONA	Hygiène du milieu
17	Fana	TANGARA	Maths
18	Abdel Kader	TRAORE	Pathologies médicales
19	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
20	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

**DEDICACE ET
REMERCIEMENTS**

Dédicace et remerciements

Dédicace

Je dédie cette thèse à ma mère **Feue Aïssata COULIBALY** (Paix à son âme)

Mère nous aurions aimé que tu sois parmi nous aujourd'hui mais DIEU en a décidé autrement. Je n'oublierai jamais l'amour que tu m'as donné tout en me montrant le bon chemin à suivre.

Chère mère dors en paix car tes vœux sont exaucés.

Remerciements

Au terme de mes études en Pharmacie dans cette prestigieuse Faculté de Pharmacie, je tiens à remercier tous ceux qui ont cru en moi, m'ont aidé et soutenu pour que ce jour soit : la présentation de ma thèse pour l'obtention du **grade de DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)**.

Mes remerciements vont à l'endroit de :

❖ **ALLAH tout puissant**

Pour m'avoir donné la santé et le courage nécessaires de mener à bien ce travail

Ma reconnaissance t'est éternelle et que demander d'autre que de permettre à mes mains d'apporter le réconfort, la guérison à tous ceux à qui l'occasion me sera donnée de prodiguer mes soins.

❖ **MES PARENTS**

Macky COULIBALY, Feue Aïssata COULIBALY et Fanta SAMAKE

Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous faites pour moi. Votre soutien sans faille a constitué une source de motivation et de réconfort durant toutes ces années. J'espère vous rendre fier grâce à ce travail tout en espérant pouvoir encore le faire dans les années à venir tant sur le plan académique que professionnel et familial. Merci pour toutes les valeurs que vous m'avez inculquées.

Je remercie le seigneur de m'avoir donné des parents tels que vous car l'on ne peut rêver mieux.

Merci pour tout

❖ **Mes frères et sœurs**

Dramane, Ramatou, Fatoumata, Mariam, Ibrahima, Aminata, Safiatou, Oumou, Modibo, Goundo Mady, Djènèba, Ali, Bintou

Nous avons acquis très jeune le goût du travail. Ce travail est le fruit de notre éducation. Qu'il soit une source de satisfaction pour mes aînés et une source de motivation, une exhortation à l'amour du travail bien fait pour mes cadets.

❖ **La famille DJIRE**

Au terme de ce travail je remercie M. DJIRE Mountaga et sa femme Mariam COULIBALY de m'avoir bien accueilli et aidé sur le plan financier, matériel et moral.

Merci pour tout. Ce travail est le vôtre.

❖ **Mes oncles et tantes de la famille COULIBALY**
Broulaye , Issa, SEYDOU ,Daouda, Sanata, Feue Aminata(Yaye),

L'homme que je suis aujourd'hui vous doit tout. Malgré vos difficultés vous m'avez tout donné sans vous soucier du lendemain. Vos conseils et vos bénédictions m'ont guidé tout au long de mes études. Je sais que vous n'avez cessé de prier pour moi. Considérez ce travail comme celui de votre digne fils.

❖ **Mes belles sœurs**

Fatoumata DOUMBIA et Djelika SANOGO je vous remercie pour votre soutien et votre disponibilité.

❖ **Docteur COULIBALY Ibrahima**

C'est le moment pour moi de dire merci à un grand monsieur

Médecin, spécialiste en Radiologie et Imagerie médicale, cher grand frère vous avez été pour toute la famille une fierté et un exemple à suivre à cause de votre persévérance, votre courage et votre connaissance encyclopédique.

Vous avez été pour nous cadets un aîné mais surtout un maître depuis nos premiers pas à l'école.

Cher maître merci pour tout votre encadrement et tes conseils.

❖ Mali.

Berceau de mes ancêtres.

Patrie de naissance et pays de mon cœur, je ne peux en ce moment si important ne pas avoir une pensée pour ces terres où j'ai grandi et fait mes classes.

Un peuple, Un but, Une foi, trois mots qui résonnent dans le cœur de tout un peuple et qui tout au long de ces années m'ont servi et m'ont permis d'avancer. Que ceux-ci continuent d'être un idéal pour tout le peuple malien afin que pour des années encore l'unité règne dans ce pays que j'aime tant.

Digne fils de ce pays, j'espère qu'un jour mes compétences serviront les miens et permettront à ce beau pays d'aller de l'avant.

❖ Mes maîtres du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée.

Merci pour toutes les heures consacrées à notre formation et pour la confiance placée en nous durant notre séjour dans le service. Ayez l'assurance que vos enseignements sont tombés dans des oreilles attentives.

Merci pour tout.

❖ Mes collègues thésards du LBMA

Tahirou TRAORE, Moustaf OULALE, Amadou Hadji GUITTEYE, Amadou DIAKITE, Beatrice TOGO, Mariam TRAORE et Boubacar MACALOU

Merci pour les moments passés ensemble dans le service et en dehors. Je ne peux que vous souhaiter bon courage pour vos soutenances et bonne carrière.

❖ L'ensemble du personnel du LBMA.

Vous avez rendu plus simple notre intégration dans le service et avez été un lien important avec nos patients. Les succès obtenus sont le fruit de votre abnégation.

Merci et du courage pour l'avenir.

❖ Mes amis de la faculté

Nouhoum BA, toi avec qui j'ai partagé le lit d'une place pendant 3 ans recevez ici mes remerciements les plus sincères.

Magni DEMBELE, Ousmane Nouhoum COULIBALY, Samba BAGAYOKO, Seydou Zié SANOGO, Amady DEMBELE et Amadou Abdoulaye MAIGA

Merci pour les conseils prodigués et le soutien sans faille que j'ai pu trouver auprès de vous.

❖ **La promotion Yéminegue Albert DEMBELE**

A tous mes promotionnaires **de la dixième promotion du numéris clausus** je dis merci. J'ai tissé de bons liens avec vous et j'espère que nous continuerons cette sincère collaboration avec vous dans la vie professionnelle.

❖ **La Pharmacie Mah Sandji**

Je remercie le personnel de l'officine de pharmacie Mah Sandji particulièrement Dr GUENDEBA Ousmane assistant, Dr Aligui YATTARA gérant, Mahamane Baba TRAORE et Amadou YATTARA.

Merci pour la formation que j'ai reçue auprès de vous.

**HOMMAGES AUX
MEMBRES DU JURY**

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maitre et Président du Jury

Professeur Ababacar MAIGA

- **Professeur titulaire de Toxicologie à la faculté de Pharmacie ;**
- **Vice-Doyen de la Faculté de Pharmacie ;**
- **Ancien Directeur Adjoint de la DPM.**

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

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

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

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

A notre Maitre et Juge

Professeur Mouctar DIALLO

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

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

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

A notre Maître et juge

Docteur Vincent Sanogo

- **Pharmacien diplômé de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie (FMPOS)**
- **Paludologue certifié au 6ème cours international de paludologie de l'OMS à Ouidah**
- **Chef de division Prévention et prise en charge des cas au PNLP**
- **Point focal Fond mondial**

Cher Maître, c'est un réel plaisir que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Votre rigueur scientifique et votre intérêt pour le travail bien fait en général font de vous un Maître à admirer. Soyez rassuré de notre reconnaissance la plus profonde.

A Notre Maître et Co-directeur de thèse

Docteur Youssouf DIARRA :

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

Cher Maître, bien que vous ne soyez là aujourd'hui

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

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

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

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

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Ousmane KOITA

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

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

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

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

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

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ACPR	Réponse Clinique et Parasitologique Adéquates
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ALAT	ALanine Amino Transférase
AM	Artéméther
<i>An arabiensis</i>	<i>Anopheles arabiensis</i>
<i>An funestus</i>	<i>Anopheles funestus</i>
<i>An gambiae s.s</i>	<i>Anopheles gambiae s.s</i>
AQ	Amodiaquine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
AS+AQ	Artesunate+Amodiaquine
ASACO	Association de Santé Communautaire
BHE	Barrière Hemato-Encephalique
CD	Chloroquine-Dapsone
CDC	Centers for Deaseas Controle and prevention
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice 50
CPS	Chimiothérapie du Paludisme Saisonnier
CSCom	Centre de Santé Communautaire
CT	Cycle Threshold (seuil du cycle)
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artemisinine
dATP	désoxyAdénosine TriPhosphate
dCTP	désoxyCytidine TriPhosphate
ddNTP	didésoxyNucléotide TriPhosphate
dGTP	désoxyGuanosine TriPhosphate
DHPS	DiHydroPteroate Synthase
dNTPs	désoxyNucléotides TriPhosphate
dTTP	désoxyThymidine TriPhosphate
ETF	Early Traitement Faillure
FRC	Formulaire de Report des Cas

G=(G1 G2 et S)	Interphase
G6PD	Glucose-6-Phosphate Deshydrogenase
HERG	<i>human Ether-à-go-go-Related Gene</i>
HRP2	Histidin Rich Protein 2 (Proteine Riche en Histidine 2)
IFI	Immunofluorescence indirecte
INR	Rapport international normalisé
INRSP	Institut National de recherche en Santé Publique
<i>k13</i>	Kelch 13
LBMA	Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
LCF	Late Clinical Faillure
LPF	Late Parasitological Faillure
M	Mitose
<i>mdr1</i>	Multi-drug resistance protein 1
NIH	National Institutes of Health
ODRS	Office de développement rurale de Sélingué
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PABA	acide P-aminobenzoïque
Pan-LDH	Malaria pan Lactate Dehydrogenase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Photo-induced Electron Transfer
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pfk13</i>	<i>Plasmodium falciparum kelch 13</i>
<i>Pfmdr1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug drug resistance gene 1
pLDH	<i>Plasmodium</i> lactate dehydrogenase
PQ	Primaquine
PT	Taux de prothrombine
PTT	Temps de thromboplastine
<i>Pv</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>QBC</i>	<i>Quantitative Buffy Coat</i>
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
SP	Sulfadoxine Pyriméthamine
TCP	Temps de Clairance Parasitaire
TDR	Test de Diagnostic Rapide

TPI	Traitement Préventif Intermittent
TPIe	Traitement Préventif Intermittent de l'enfant
TPIp	Traitement Préventif Intermittent pendant la grossesse
TQ	Tafénoquine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition du paludisme dans le monde (OMS, 1999)	6
Figure 2 : Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'homme et le moustique	12
Figure 3 : mécanisme d'action des antipaludiques [42].	17
Figure 4 : Structure chimique de la quinine	20
Figure 5 : Structure chimique de la Mefloquine	21
Figure 6 : Structure chimique de l'amodiaquine	22
Figure 7 : Structure chimique de l'artémisinine	23
Figure 8 : Structure chimique de l'artéméther et l'artésunate	24
Figure 9 : Structure chimique de la dihydroartémisinine	24
Figure 10 : Structure chimique de la luméfantine	25
Figure 11 : Structure chimique de la primaquine	26
Figure 12 : Localisation géographique du site de Missira	34
Figure 13 : Carte sanitaire de la zone de selingué	35

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : taxonomie du vecteur du paludisme	9
Tableau 2: Protocole d'administration des molécules AL en fonction du poids	37
Tableau 3: Protocole d'administration des molécules ASAQ en fonction du poids	38
Tableau 4: Listing des examens faits par rendez-vous.....	38
Tableau 5: Composition du mélange réactionnel (Master mix) pour la PET-PCR.....	39
Tableau 6: Répartition des patients selon le site d'étude	44
Tableau 7: Répartition des patients selon le sexe	44
Tableau 8: Répartition des patients selon la tranche d'âge.	44
Tableau 9: Répartition des patients selon la molécule administrée	45
Tableau 10 : Répartition des patients en fonction de la parasitemie.....	45
Tableau 11: Répartition des patients selon la parasitemie à J2.....	45
Tableau 12 : Répartition des patients selon la parasitemie à J3.....	45
Tableau 13: Répartition des patients selon la fièvre à J1	46
Tableau 14: Répartition des patients selon la fièvre à J2	46
Tableau 15 : Répartition des patients selon la fièvre à J3	46
Tableau 16: Répartition des patients selon l'échec thérapeutique précoce	46
Tableau 17: Répartition des patients selon l'échec clinique tardif	47
Tableau 18: Répartition des patients selon l'échec parasitologique tardif	47
Tableau 19: Répartition des patients selon les réponses cliniques et parasitologiques adéquates	47
Tableau 20: Répartition des patients en fonction du temps de clairance parasitaire.....	47
Tableau 21: Répartition des patients selon les mutations rencontrées	48
Tableau 22: Répartition des mutations en fonction du temps de clairance parasitaire	48
Tableau 23: Composition du mélange réactionnel (Master Mix) de la 1 ^{ère} réaction de <i>PfK13</i>	xxviii
Tableau 24: Composition du mélange réactionnel (Master Mix)de la 2 ^{ème} réaction de <i>PfK13</i>	xxix
Tableau 25: Master Mix du ExoSAP	xxx
Tableau 26: Cycle sequencing.....	xxxi

Table des matières

1. INTRODUCTION	1
2. OBJECTIFS	3
2.1 Objectif général.....	3
2.2. Objectifs spécifiques	3
3. GENERALITES	4
3.1 Définitions.....	4
3.2 Historique	4
3.3 Répartition géographique de la résistance aux antipaludiques	6
3.3.1 Dans le monde	6
3.3.2 En Afrique	7
3.3.3 Au Mali.....	7
3.4 Biologie du vecteur et l'agent pathogène	8
3.4.1 Vecteur	8
3.4.2 Agent pathogène.....	9
3.4.3 Cycle de vie des plasmodies.....	10
3.5 Diagnostic du paludisme.....	12
3.5.1 Diagnostic de présomption.....	12
3.5.2 Diagnostic parasitologique [31]	13
3.5.3 Diagnostic immunologique : ELISA et IFI [31]	14
3.5.4 Les tests de diagnostic rapide : TDR [31]	14
3.5.5 Outils moléculaires d'étude de <i>plasmodium falciparum</i>	15
3.6 Traitement du paludisme	17
3.6.1 Le traitement du paludisme selon les recommandations du PNLP.....	17
3.6.2 Classification des antipaludiques[41]	17
3.6.3 Modes d'action des antipaludiques : [42]	19
Effets indésirables[42].....	21
3.7 Prophylaxie: [43]	28
3.7.1 Lutte antivectorielle :.....	28
3.7.2 Chimio prophylaxie :.....	29
3.8 Résistance du <i>Plasmodium</i> aux antipaludiques :.....	31
3.8.1 Les aminoquinoléines : la chloroquine	31
3.8.2 La résistance aux CTA	32
4. METHODOLOGIE	34

4.1 Lieux de l'étude.....	34
4.2 Période et type de l'étude	36
4.3 Echantillonnage.....	36
4.4 Critères d'inclusion.....	36
4.5 Critères de non inclusion	36
4.6 Diagnostic des cas de paludisme simple à <i>Plasmodium falciparum</i>	37
4.7 Administration des médicaments	37
4.8 Suivi des patients	38
4.9 Collecte et conservation des échantillons	39
4.10 Recherche des mutations sur le gène Pfk13.....	39
4.10.1 L'extraction de l'ADN	39
L'extraction de l'ADN a été faite avec le kit Qiagen selon le protocole du fabricant à partir du sang séché sur le papier filtre de type Whatman 903™ (GE Healthcare, Cardiff, UK). (cf. annexes)	39
4.10.2 La PET-PCR.....	39
4.10.3 Le séquençage des échantillons	41
4.10.4 Analyse bio-informatique des séquences après séquençage	41
4.11. Considérations éthiques et déontologiques	41
4.12. Gestion des données	42
4.13. Définition des cas d'échec thérapeutique selon l'OMS.....	42
5. RESULTATS.....	44
6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION	50
7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	54
7.1 Conclusion	54
7.2 Recommandations	54
8. REFERENCES.....	56
9. ANNEXES	xxiii
9.1 La technique du Test de Diagnostic Rapide (TDR) :.....	xxiii
9.2 La technique de la goutte épaisse :.....	xxiv
9.3 Protocole de l'extraction de l'ADN avec le Kit Qiagen	xxvi
9.4 Protocole du Séquençage par la méthode de Sanger	xxviii
9.5 Fiche signalétique.....	xxxiii

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie causée par un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*.

Ce parasite est transmis d'une personne à une autre par un moustique du genre *Anophèles* [1].

Le paludisme est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays tropicaux [1] et demeure un problème de santé publique malgré plusieurs décennies d'efforts de lutte contre le paludisme [2].

Selon le dernier rapport de l'OMS publié en novembre 2018 le nombre de cas de paludisme a été estimé à 219 millions de cas du paludisme dans le monde en 2017 contre 217 millions de cas en 2016. Le nombre de décès dû au paludisme a été également estimé à 435000 contre 451000 en 2016 et 607000 en 2010 [3]. Dans la période allant de 2010 à 2017, l'incidence de paludisme sur le plan mondial a reculé de 18% [3]. Les enfants de moins de 5 ans sont les plus vulnérables face au paludisme. En 2017 ils ont représenté 61 % (266000) des décès associés au paludisme dans le monde [3].

Le paludisme est la première cause de mortalité (13 %) et de morbidité (15,6 %) dans la population générale [4]. La mortalité spécifique liée à cette érythrocytopathie dans la population des enfants de moins de 5 ans est estimée entre 25 et 35% de la mortalité infanto-juvénile globale [5]. Ces décès sont imputables à deux complications principales: le neuropaludisme et l'anémie.

La région Afrique de l'OMS est la plus touchée avec 200 millions de cas et a représenté 93 % des cas de décès mondiaux liés au paludisme, causés majoritairement par *Plasmodium falciparum* à 99,7% de cas [3].

Au Mali, en 2018 un rapport du PNLP (Programme National de Lutte contre le Paludisme) a fait ressortir plus de 2834132 cas suspects de paludisme dont 1757292 cas confirmés et avec 186 cas de décès [6]. Le paludisme est la principale cause de décès des enfants de moins de cinq ans et d'anémie chez les femmes enceintes [7].

Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine CTA ont été adoptés comme traitement de première ligne du paludisme à *Plasmodium falciparum* non compliqué dans la plupart des pays où le paludisme est endémique y compris le Mali [8].

La résistance d'un pathogène en général du *Plasmodium* en particulier à une molécule s'acquiert par suite d'une pression médicamenteuse forte et conduit à la sélection des mutants. Elle peut aussi s'obtenir lorsqu'il y a une observance insuffisante durant le traitement [9].

Récemment, un marqueur moléculaire de résistance à l'artémisinine a été identifié, à savoir des mutations sur le gène du *P. falciparum* kelch (Pfk13) située sur le chromosome 13 et code pour une protéine de 727 acides aminés [8]. Les mutations dans la région appelée hélice de la protéine Kelch (K13 hélice) sont étroitement corrélées avec le retard de clairance parasitaire, qui définit le phénotype de résistance à l'artémisinine [8].

Les récentes preuves de l'existence d'une résistance émergente à un inhibiteur principal, notamment les CTA, en Asie du Sud-Est font craindre que de telles populations de parasites ne se propagent en Afrique reflétant la résistance des parasites à la chloroquine, à la sulfadoxine et à la pyriméthamine [10].

La prévalence de ces marqueurs moléculaires est mal connue en Afrique subsaharienne. Mais toute fois des mutations circulantes qui ne sont pas associés au retard de clairance parasitaire ont été trouvées un peu partout en Afrique [11]. Compte tenu de l'importance cruciale des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine dans le contrôle et l'élimination du paludisme dans ces régions, il est urgent de comprendre si des mutations de l'hélice K13 associées à l'élimination retardée des parasites sont déjà en circulation [10].

Au Mali, de nos jours aucune mutation sur le gène *PfK13* associées au retard de clairance parasitaire n'a été identifiée, mais l'obtention des mutations aux positions 578 et 581 est une alerte dans la surveillance de la résistance à cause de leur proximité avec la position 580 connue pour son association au retard de clairance parasitaire [10].

Le retard dans la clairance parasitaire se définit comme étant des patients qui ont une parasitémie au troisième jour de leur traitement (J3) par les CTA. Il est considéré comme indicateur d'échec thérapeutique selon les recommandations de l'OMS [12].

Face à ces menaces de résistance aux antipaludiques, l'OMS recommande de procéder à un suivi régulier des antipaludiques dans les zones d'endémie palustre tous les 24 mois [13].

L'hypothèse de cette étude : est de vérifier s'il y existe une possible association entre le retard de clairance parasitaire et d'autres mutations ponctuelles autres que la mutation à la position 580 sur le gène *PfK13*.

Pour tester cette hypothèse, nous avons initié une étude dans deux localités du Mali afin de corréler les mutations ponctuelles du gène *PfK13* aux échecs thérapeutiques.

OBJECTIFS

2. OBJECTIFS

2.1 Objectif général

Examiner le polymorphisme du gène *PfK13* et établir la liaison des nouvelles mutations au retard de clairance parasitaire au cours de l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de deux CTA (AL, ASAQ) à Sélingué et à Missira

2.2. Objectifs spécifiques

- ✓ Rechercher les différentes mutations circulantes à Missira et Sélingué sur *PfK13* dans le domaine de Propeller durant l'administration de l'AL et ASAQ
- ✓ Estimer le temps moyen de clairance parasitaire après l'utilisation des CTA
- ✓ Rechercher les mutations présentes chez les cas de clairance parasitaire retardée

GENERALITES

3. GENERALITES

3.1 Définitions

- **Le paludisme**

Le paludisme est une maladie provoquée par des hématozoaires appartenant au genre *Plasmodium*. Deux espèces parmi les cinq qui infectent l'homme, *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*, ont un impact majeur en santé publique. *Plasmodium falciparum* provoque une infection aiguë, potentiellement mortelle chez les enfants de moins de cinq ans et des femmes enceintes. C'est le parasite le plus répandu sur le continent Africain [8].

- **La résistance aux antipaludiques**

La résistance aux antipaludiques est définie comme l'aptitude d'une souche de *P. falciparum* à continuer son développement malgré l'administration et l'absorption du médicament employé aux doses thérapeutiques recommandées. La résistance d'un pathogène en général et du *Plasmodium* en particulier à une molécule s'acquiert par suite d'une pression thérapeutique forte et conduit à la sélection des mutants. Elle peut aussi s'acquérir lorsqu'il y a une mauvaise observance durant le traitement ou une utilisation systématique en chimio prophylaxie [14].

- **Clairance parasitaire retardée**

Le retard de clairance parasitaire est défini comme la persistance de la parasitémie chez les patients après 72 heures de traitement avec une CTA orale [15].

3.2 Historique

- **Historique du paludisme**

De l'italien pour « mauvais air », le paludisme a probablement influencé dans une large mesure les populations humaines et l'histoire humaine.

Les symptômes du paludisme ont été décrits dans les anciens écrits médicaux chinois. En 2700 av. J.-C., plusieurs symptômes caractéristiques de ce que l'on appellerait plus tard le paludisme ont été décrits dans le « *Nei Ching* ». Le *Nei Ching* a été édité par l'empereur Huang Ti. Le paludisme est devenu largement reconnu en Grèce au 4ème siècle avant notre ère, et était responsable du déclin de nombreuses populations.

Découverte du parasite du paludisme (1880) [16]

Charles Louis Alphonse Laveran, chirurgien de l'armée française stationné à Constantine, en Algérie, a été le premier à remarquer des parasites dans le sang d'un patient atteint de paludisme. Cela s'est produit le 6 novembre 1880. Pour sa découverte, Laveran a reçu le prix Nobel en 1907.

Différenciation des espèces de paludisme (1886) [16]

Camillo Golgi, un neurophysiologiste italien, a établi qu'il y avait au moins deux formes de la maladie, une avec une périodicité tierce (fièvre tous les deux jours) et une avec une périodicité quarte (fièvre tous les trois jours). Il a également observé que les formes produisaient un nombre différent de mérozoïtes (nouveaux parasites) à maturité et que la fièvre coïncidait avec la rupture et la libération de mérozoïtes dans le courant sanguin. Il a reçu un prix Nobel de médecine pour ses découvertes en neurophysiologie en 1906.

Désignation des parasites du paludisme humain (1890, 1897) [16]

Les enquêteurs italiens Giovanni Batista Grassi et Raimondo Filetti ont d'abord introduit les noms *Plasmodium vivax* et *P. malariae* pour deux des parasites du paludisme qui affectent l'homme en 1890. Laveran avait cru qu'il n'y avait qu'une seule espèce, *Oscillaria malariae*. Un Américain, William H. Welch, a passé en revue le sujet et, en 1897, a nommé le parasite malin du paludisme de Tertian, *P. falciparum*. Il y avait beaucoup d'arguments contre l'utilisation de ce nom; cependant, l'utilisation était tellement répandue dans la littérature que le changement de nom donné par Laveran n'était plus considéré comme possible. En 1922, John William Watson Stephens a décrit le quatrième parasite du paludisme humain, *P. ovale*. *P. knowlesia* été décrite par Robert Knowles et Biraj Mohan Das Gupta en 1931 chez un macaque à longue queue. La première infection humaine documentée avec *P. knowlesi* était en 1965.

Découverte de la transmission des parasites du paludisme à l'homme par le moustique (1897-1898) [16]

Le 20 août 1897, Ronald Ross, un officier britannique du service médical indien, fut le premier à démontrer que les parasites du paludisme pouvaient être transmis des malades infectés aux moustiques. Dans ses travaux ultérieurs sur le paludisme aviaire, Ross a montré que les moustiques pouvaient transmettre les parasites du paludisme d'un oiseau à l'autre. Cela a nécessité un cycle sporogonique (l'intervalle de temps pendant lequel le parasite s'est développé chez le moustique). Ainsi, le problème de la transmission du paludisme a été résolu. Pour sa découverte, Ross a reçu le prix Nobel en 1902.

• Historique de la résistance aux antipaludiques (1957 à nos jours)

En 1957 la chloroquinorésistance est constatée en Asie et en Amérique du sud [17].

En 1970 le Professeur Zhenxing Wei (Chine) réalisait un extrait de l'artémisinine [18]

En 1979 en Afrique, la résistance à la chloroquine a été observée pour la première fois en Tanzanie [19].

En 2001, en Asie du Sud-est, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine est suspectée [20].

En 2006 au Cambodge, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine a été identifiée pour la première fois [20]. La même année, la chloroquine a été retirée du traitement du paludisme simple à *P.falciparum* au Mali [21].

Actuellement, la recherche demeure orientée vers la lutte anti vectorielle, le traitement curatif et prophylactique et la recherche sur le vaccin.

3.3 Répartition géographique de la résistance aux antipaludiques

3.3.1 Dans le monde

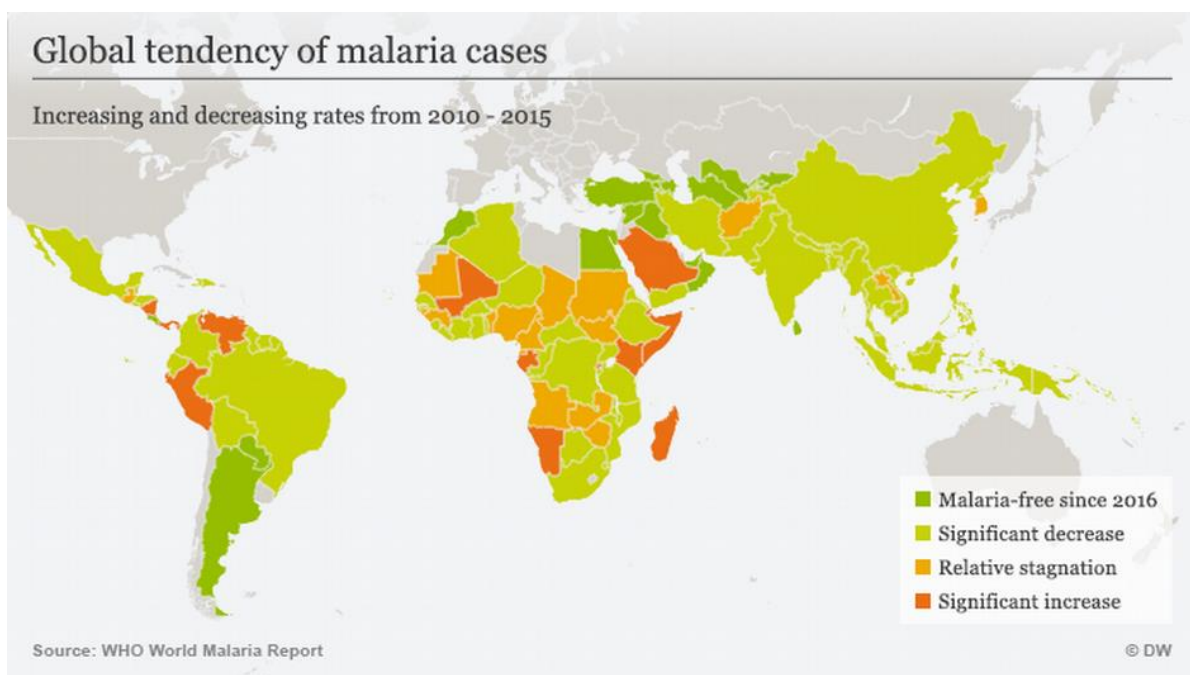


Figure 1 : Répartition du paludisme dans le monde (OMS, 1999)

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

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. Il est au premier rang des priorités de l'OMS pour ses ravages directs et conséquences socio- économiques. Selon l'OMS près de la moitié de la population mondiale est exposée au paludisme [22].

Les premiers cas de résistance à la chloroquine ont été rapportés en plusieurs points du monde entre 1957 et 1960 (Colombie et Venezuela, Cambodge et Thaïlande, Papouasie Nouvelle Guinée, Philippines) [23]. La résistance s'est peu à peu propagée dans les zones d'endémie.

La chloroquine est présentement retirée de la liste des médicaments pour la prise en charge du paludisme à *P. falciparum* [23].

En Amérique du Sud, des cas de parasitémie ont été récemment relevés au troisième jour du traitement aux CTA [23].

La résistance à l'artémisinine sévit actuellement en Asie du sud-est, notamment au Cambodge depuis 2006, à Lao PDR depuis 2013, à Myanmar depuis 2008, en Thaïlande depuis 2008 et au Viêtnam depuis 2009 [23].

3.3.2 En Afrique

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne [24]

Les enfants de moins de 5ans et les femmes enceintes constituent les groupes à risque [25].

La résistance de *Plasmodium* à la monothérapie de la Chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine continue d'évoluer en Afrique de l'est, du sud et centrale.

Cette résistance est beaucoup plus faible en Afrique de l'ouest.

Actuellement, aucun cas de résistance à l'artémisinine et ses dérivés n'a été confirmé en Afrique [26].

Cependant, une réduction de la sensibilité à l'artémisinine est présente dans certaines zones endémiques en Afrique [27].

Beaucoup d'études sur l'efficacité des CTA sont en cours dans la plupart des zones endémiques. De nos jours, aucun cas de mutation sur le gène *Pfk13* n'a été signalé associé à une clairance parasitaire retardée. Les résultats des différentes études menées montrent que les CTA sont encore efficaces en Afrique [20].

3.3.3 Au Mali

Au Mali il existe 5 faciès épidémiologiques de transmission du paludisme [28].

- la zone de transmission saisonnière longue de 4 à 6 mois (zone soudano-guinéenne);
- la zone de transmission saisonnière courte de 3 à 4 mois (zone sahélo-soudanienne) ;

- la zone de transmission sporadique voir épidémique (zone saharienne) correspondant aux régions du nord (Gao, Tombouctou et Kidal), certains districts des régions de Koulikoro (Nara) et de Kayes (Nioro, Yélimané, Diéma et Kayes);
- la zone de transmission bi ou plurimodale saisonnière du Delta Intérieur et des barrages (Sélingué, Manantali et Markala) ;
- La zone peu propice à l'impaludation particulièrement le milieu urbain comme Bamako. La transmission se fait essentiellement en saison des pluies. Cette transmission continue même en saison sèche pour les zones irriguées [29].

Au Mali comme partout en Afrique aucun cas de résistance aux CTA n'a été observé.

3.4 Biologie du vecteur et l'agent pathogène

Le paludisme est dû à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques Anophèles infectés appelés vecteurs du paludisme», qui piquent principalement entre le crépuscule et la nuit

3.4.1 Vecteur

Le paludisme est transmis exclusivement par les piqûres de moustiques *Anopheles*. Parmi plus de 500 espèces d'*Anopheles* reconnues à ce jour, 41 sont des vecteurs majeurs du paludisme, dont le plus grand nombre (39%) se trouve en Asie du Sud-est, alors que les vecteurs les plus compétents, *An. gambiae* et *An. arabiensis*, sont en Afrique. Chaque espèce vectrice présente ses caractéristiques comportementales, géographiques et écologiques qui lui sont spécifiques et qui déterminent l'épidémiologie locale du paludisme [30].

Toutes les espèces importantes de vecteurs piquent la nuit.

Les *Anopheles* se reproduisent dans l'eau et chaque espèce a ses préférences ; certaines par exemple préfèrent l'eau douce de faible profondeur comme les flaques, les rizières et les empreintes laissées par les sabots d'animaux [30].

La transmission est plus intense aux endroits où les espèces de vecteurs ont une durée de vie relativement longue (ce qui permet au parasite de compléter son cycle de développement à l'intérieur du moustique) et piquent plutôt les êtres humains que les animaux [30].

Systematique

Il existe plus de 3 500 espèces répertoriées à ce jour au sein de la famille des Culicidae [31].

Tableau 1 : taxonomie du vecteur du paludisme

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

3.4.2 Agent pathogène

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

Les *Plasmodiums* sont des protozoaires appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa*. Cet embranchement est caractérisé par la présence d'un complexe apical généralement constitué d'un conoïde facilitant à la pénétration dans la cellule hôte, d'un anneau polaire et de rhoptries. Ces derniers sécrètent probablement une enzyme protéolytique ainsi que des microtubules sous membranaires conférant la mobilité à la cellule [31].

- **Systematique** [32]

Embranchement : Apicomplexa,

Classe : Sporozoa,

Sous-classe : Coccidia,

Ordre: Eucoccida,

Sous-ordre : Haemosporina,

Famille: Plasmodidae,

Genre: *Plasmodium*

- **Différentes espèces plasmodiales**

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

3.4.3 Cycle de vie des plasmodies

Le cycle de développement du plasmodium nécessite deux hôtes obligatoires : l'Homme et le moustique. Chez l'Homme s'effectue la multiplication asexuée ou schizogonie. Chez l'anophèle femelle s'effectue le cycle sexué ou sporogonie [33].

3.4.3.1 Chez l'Homme : [33].

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

- **La phase hépatique :**

L'anophèle femelle infesté en piquant l'homme lui inocule dans le sang, le parasite sous forme de sporozoïtes. Ceux-ci restent dans la circulation sanguine pendant une demi-heure avant de pénétrer dans les cellules du foie.

Une fois dans l'hépatocyte, les sporozoïtes restent quiescents (hypnozoïtes) pour *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax* ou par multiplication nucléaire, ils deviennent des schizontes intra hépatocytaires (corps bleus). Cette phase dure 7 à 21 jours en fonction de l'espèce

plasmodiale, elle est cliniquement muette et correspond à la phase d'incubation de la maladie. [33].

- **La phase sanguine : [33]**

La rupture des corps bleus libère des mérozoïtes qui pénètrent les globules rouges par endocytose, et se transforment en trophozoïte. Le trophozoïte grossit et se transforme en schizonte sanguin qui est appelé corps en rosace à maturité et qui contient de nombreux mérozoïtes dont le nombre varie selon l'espèce plasmodiale. L'éclatement de l'hématie libère les mérozoïtes dans la circulation sanguine. Chaque mérozoïte envahit une nouvelle hématie, poursuivant ainsi le cycle intraérythrocytaire. Au cours de la multiplication dans les hématies, le parasite va produire au dépend de l'hémoglobine un pigment appelé l'hémozoïne. Parallèlement apparaissent dans l'hématie des taches de Maurer (*P.falciparum*), des granulations de Schüffner (*P.vivax* et *P.ovale*) ou des ponctuations de Ziemann (*P.malariae*). Le cycle sanguin dure 48 heures chez le *P.falciparum*, *P.vivax* et *P.ovale*, 72 heures chez le *P.malariae*. C'est l'éclatement simultané des corps en rosace d'une même génération qui provoque l'accès fébrile typique du paludisme.

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

3.4.3.2 Chez l'anophèle [33]

Encore appelé cycle sporogonique, il débute dès l'infection de l'anophèle femelle ayant piqué un impaludé porteur de gamétocytes.

Les gamétocytes passent dans son estomac, le gamétocyte femelle (ou macro gamétocyte) se transforme et devient immobile. Le gamétocyte mâle (micro gamétocyte) va subir une exflagellation qui l'allongera et le rendra mobile.

La fécondation du macro gamétocyte par le micro gamétocyte aboutit à la formation d'un œuf mobile dans la lumière du tube digestif appelé ookinète. Celui-ci va traverser et aller s'enkyster sur sa face externe formant un oocyste. Une fois mûr l'oocyste éclate et libère des sporozoïtes qui vont gagner les glandes salivaires de l'anophèle d'où ils seront inoculés à l'homme lors d'une nouvelle piqûre.

La durée du cycle chez l'anophèle est de 10 à 40 jours selon la température extérieure et les espèces.

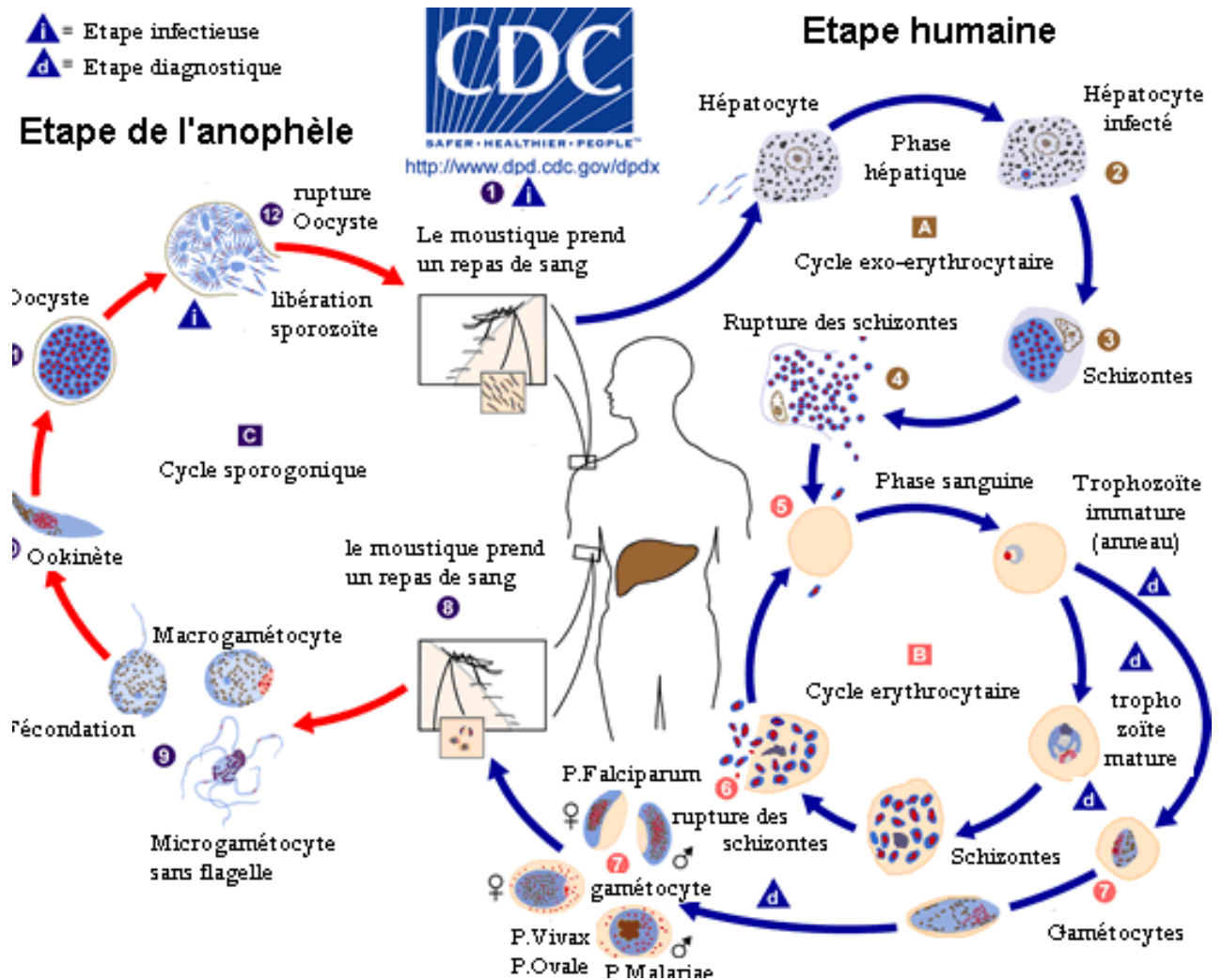


Figure 2 : Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'homme et le moustique

(Source : <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology>) consulté le 22.07.2017

3.5 Diagnostic du paludisme

Etablir le diagnostic uniquement grâce aux signes cliniques est délicat. Il va falloir s'appuyer sur des tests biologiques pour orienter ou non vers un Paludisme. Il est bien évidemment recommandé de diagnostiquer sans retard la maladie pour améliorer la prise en charge et sa surveillance.

3.5.1 Diagnostic de présomption

L'hémogramme révèle une anémie de type hémolytique, normochrome ou hypochrome, avec ou sans réticulocytose. Au cours des accès aigus et dans les accès pernicioeux, on retrouve parfois une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, remplaçant la leuconéutropénie habituelle, une thrombopénie est en rapport avec la séquestration splénique des plaquettes, tandis que dans les accès de reviviscence et le paludisme viscéral évolutif, une leucopénie est de règle, de même qu'une thrombopénie et une hypergammaglobulinémie

3.5.2 Diagnostic parasitologique [31]

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

Le frottis mince et la goutte épaisse

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

Le frottis mince permet :

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

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

Quantitative Buffy-Coat:

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

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

3.5.3 Diagnostic immunologique : ELISA et IFI [31]

Ces méthodes constituent le diagnostic indirect du paludisme.

Le principe d'IFI consiste à mettre en contact, un antigène figuré de parasite sur goutte épaisse et/ou sur frottis sanguin, et un sérum animal ou humain. Si ce sérum contient des anticorps spécifiques contre cet antigène le complexe immun persistera après le lavage, et sera fluorescent en lumière ultra-violet grâce au fluorochrome associé aux anticorps.

Quant au principe d'ELISA, il consiste à fixer sur un support solide des éléments contenus dans le liquide biologique. Ensuite, les antigènes solubles sont détectés à l'aide d'un complexe immun marqué par l'enzyme, et sera révélé par addition d'un substrat spécifique de l'enzyme.

Ces techniques apportent des informations précieuses qui permettent de confirmer le paludisme, lorsque la parasitémie a été réduite par exemple par un traitement anti palustre. Elles permettent également de suivre la guérison par la décroissance du taux des anticorps, et ont aussi un intérêt en zone d'endémie.

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

3.5.4 Les tests de diagnostic rapide : TDR [31]

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

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

La forme la plus simple est celle d'une bandelette qui est placée dans des puits contenant du sang et/ou une solution tampon. La bandelette de nitrocellulose peut être placée dans une cassette en plastique ou sur une carte. Les tests rapides antigéniques sont simples

d'utilisation, rapides et d'un apport précieux en poste isolé. Cependant, les tests rapides ont des limites :

- ✓ les faux négatifs sont dus à une faible parasitémie de l'ordre de 100 parasites par μL , soit 0,002% d'hématies infectées. Or, il est fréquent de mettre en évidence en pathologie d'importation ou chez le voyageur non immun en zone d'endémie sous chimioprophylaxie non ou mal adaptée des parasitémies très faibles. Le résultat des TDR peut donc être faussement négatif.
- ✓ les faux positifs, moins bien connus, sont dus à une lecture trop tardive après le dépôt des réactifs, à la présence d'auto anticorps ou de facteur rhumatoïde à des taux élevés. De plus, la persistance de la circulation de l'HRP2 après disparition des parasites du sang circulant est trouvée jusqu'à 15 jours après négativité des tests microscopiques.

3.5.5 Outils moléculaires d'étude de *plasmodium falciparum*

3.5.5.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) comme moyen de diagnostic et de surveillance [31]

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

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

3.5.5.2 Photo-induced Electron Transfer PCR (PET-PCR) comme moyen de diagnostic.

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

3.5.5.3 Génotypage

Plusieurs gènes de *Plasmodium falciparum* présentent un polymorphisme génétique important. Ce phénomène est exploité pour l'empreinte génétique et pour l'évaluation de la dynamique des populations de parasites [35].

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

Les amorces fluorogéniques à transfert d'électrons photo-induites (PET) auto-désactivantes utilisées dans le test PET-PCR fournissent un test de PCR en temps réel plus pratique et moins coûteux que les PCR en temps réel basés sur des sondes classiques dans la mesure où il n'y a pas de sondes internes (par ex. sondes TaqMan) ou de colorants intercalants [13].

Il a été montré comme étant aussi robuste et rentable par rapport à la PCR nichée [34]. Il est capable de détecter des parasites de faibles densités d'infections, même 1 parasite/ μ L.

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

3.6 Traitement du paludisme

3.6.1 Le traitement du paludisme selon les recommandations du PNL

Le paludisme simple se traite efficacement par voie orale. Les traitements les plus efficaces aujourd'hui sont les Combinaisons Thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). Elles permettent de traiter efficacement le paludisme simple en 3 jours.

Les CTA recommandées au Mali par la politique sont: Artemeter-Lumefantrine et Artesunate-Amodiaquine.

Le paludisme grave se traite avec: Artésunate injectable, Artémether injectable, Quinine injectable. Passer à la voie orale dès que l'état du patient le permet.

3.6.2 Classification des antipaludiques[41]

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

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

Les antipaludiques sont classés en fonction de leur mode d'action ou la structure chimique.

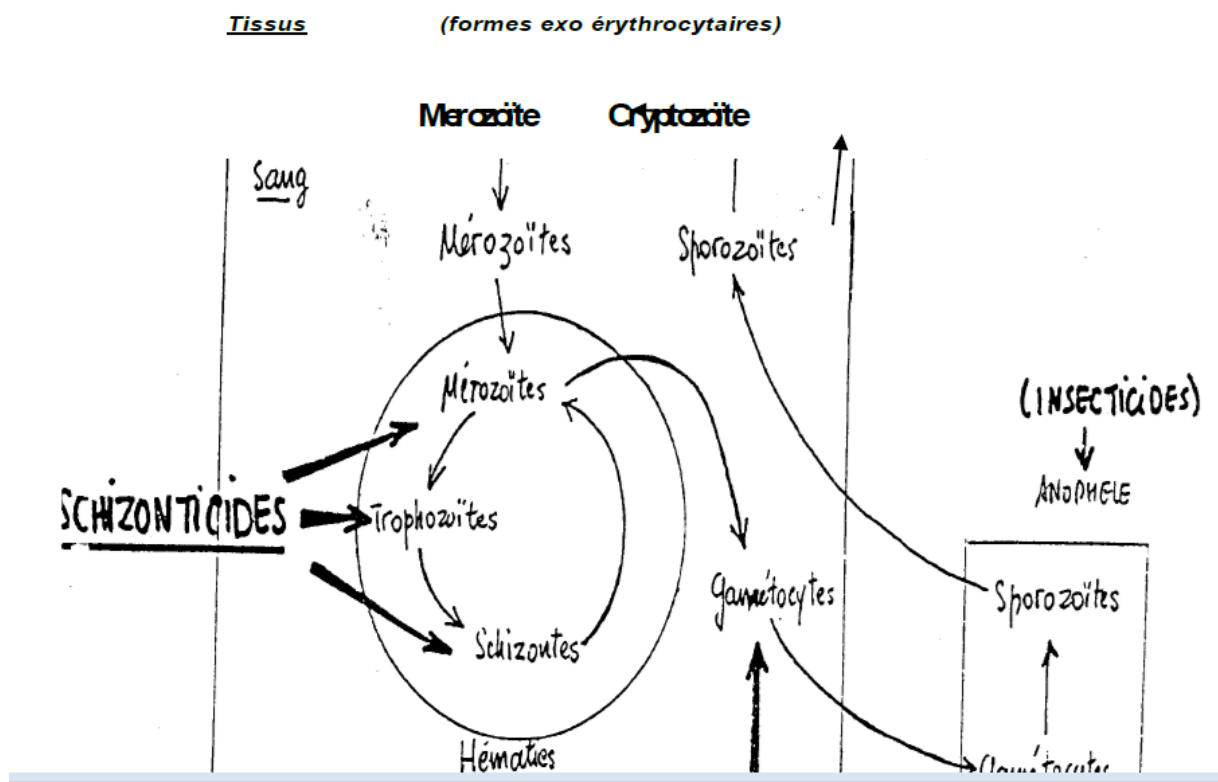


Figure 3 : mécanisme d'action des antipaludiques [42].

3.6.2.1. Schizonticide érythrocytaires :

Amino-4-quinoléines : chloroquine (Nivaquine®), amodiaquine (Flavoquine®), pipéraquline.

Amino-alcools : quinine (Quinimax®, Surquina®, Quinine Lafranc®), méfloquine (Lariam®), halofantrine (Halfan®), luméfantrine.

Sesquiterpènes : artémisinine et ses dérivés : dihydroartémisinine, artéméther, artésunate.

Antimétabolites :

o **Antifoliques** : sulfadoxine, dapsonne,

o **Antifoliniques** : proguanil (Paludrine®), pyriméthamine (Malocideâ),

o **Antibiotiques** : cyclines (Doxypalu®, Granudoxy®Gé, Vibraveineuse®), clindamycine (Dalacine®, Zindacine®),

o **Analogues de l'ubiquinone** : atovaquone.

3.6.2.2 Schizonticides intrahépatiques :

Amino 8 quinoléines : primaquine (Primaquine®), tafénoquine.

Antimétabolites : proguanil, cyclines.

3.6.2.3. Gamétocytocides :

Amino-8-quinoléines : primaquine (Primaquine®), tafénoquine.

Associations d'antipaludiques à effet synergique schizonticide :

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

Certaines de ces associations sont déjà anciennes :

Quinine + tétracyclines en zones de quininorésistance (forêts d'Asie du sud-est et Amazonie)

Sulfadoxine + pyriméthamine (Fansidar®)

Méfloquine + sulfadoxine + pyriméthamine (Fansimef®, utilisé en Asie du sud-est),

Chloroquine + proguanil (Savarine®), utilisée en chimioprophylaxie seulement),

Les « nouveaux » antimalariques sont tous associés, au moins en bithérapie :

- soit en associations libres (2 sortes de comprimés) : artésunate + sulfadoxine/pyriméthamine (Arsudar®), artésunate + amodiaquine (Arsucam®), artésunate + méfloquine (Artequin®) ;
- soit en associations fixes (FDC : fixed dose combination) : atovaquone + proguanil (Malarone®), chlorproguanil + dapsons (Lapdap®), artéméther + luméfantrine (Coartem®/Riamet), artésunate + amodiaquine (AS/AQ®, Coarsucam®), artésunate + méfloquine (AS/MQ®).

3.6.3 Modes d'action des antipaludiques : [42]

- **Inhibition de la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive du plasmodium :**

- Chloroquine, amodiaquine, pipéraquline

- Quinine, méfloquine, halofantrine, luméfantrine

- **Alkylation des métabolites de l'hémoglobine, production de radicaux libres :**
artémisinines
- **Blocage de la fabrication des acides nucléiques :**

- Cytochrome bc → baisse d'ATP : atovaquone

- Inhibition de la DHPS : sulfadoxine, dapsons (antifoliques)

- Inhibition de la DHFR : pyriméthamine, cycloguanil (antifoliniques)

Pharmacocinétique des antipaludiques couramment utilisés en association [43].

.

□ **La Quinine : c'est un schizonticide endo-érythrocytaire**

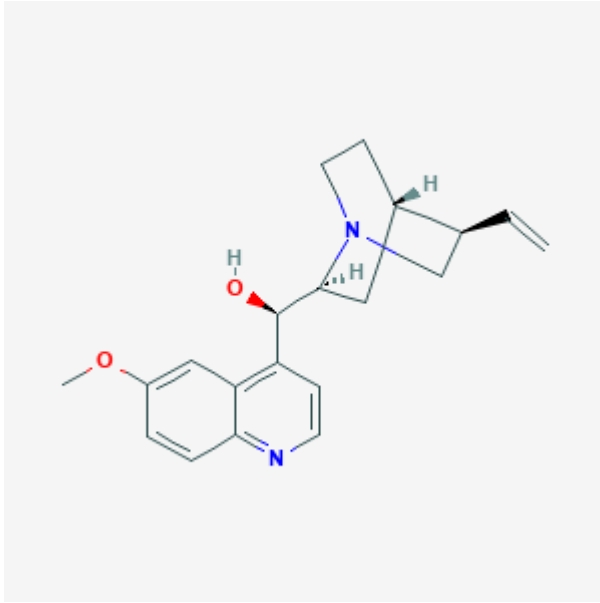


Figure 4 ::Structure chimique de la quinine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3034034#section=2D-Structure>

La quinine est un alcaloïde extrait des écorces du Quinquina.

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

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

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

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

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

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

Elimination: Elle est rénale 20% sont éliminés sous forme inchangée, 80% sous forme de métabolites dont un actif, d'où adaptation de posologie chez les insuffisants rénaux [42].

Effets indésirables[42]

Ils sont dose-dépendants :

- Fréquent, peu grave : cinchonisme (acouphènes, vertiges, céphalées, troubles de la vision, baisse aigüe de l'acuité auditive, troubles digestifs, vasodilatation périphérique).
- Hypoglycémie par augmentation de la sécrétion d'insuline.

Les signes de toxicité surviennent pour des concentrations plasmatiques élevées lors d'accès palustres graves. Ce sont principalement :

- Toxicité cardiovasculaire : trouble de la conduction, troubles du rythme, allongement de l'espace QT,
- Toxicité oculaire perte passagère de vision par atteinte des cellules rétiniennes,
- Toxicité auditive : altération de l'audition pour des fréquences élevées, acouphènes,
- Toxicité neurologique : vertiges,
- Toxicité cutanées photosensibilisation,
- Toxicité hématologique.

Le gène *P. falciparum sodium/hydrogen exchanger gene (Pfnhe-1)* est considéré comme le gène de résistance à la quinine [44].

Méfloquine

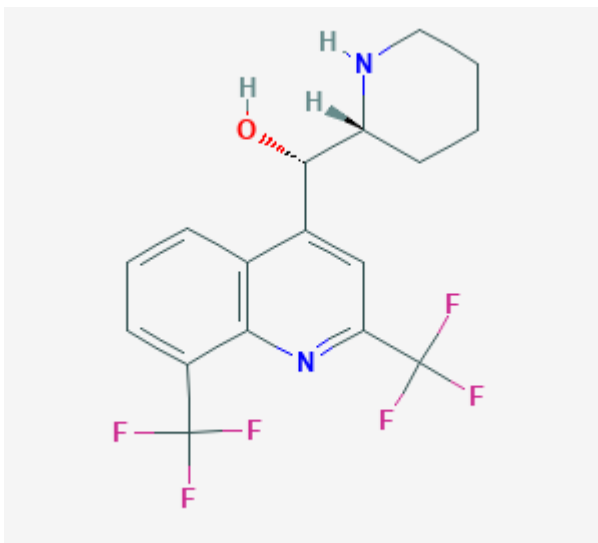


Figure 5 : Structure chimique de la Mefloquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40692#section=2D-Structure>

L'administration se fait seulement par voie orale.

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

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

Elimination: Lente inférieur à 10% sous forme inchangée dans les urines, 90% dans les fèces, $T_{1/2} \approx 15-22$ jours [42].

Effets indésirables [42]

Les effets indésirables sont relativement fréquents mais bénins, ce sont des troubles neuropsychiatriques qui peuvent survenir plusieurs semaines après l'arrêt du traitement du fait de la longue demi-vie de la méfloquine. Ces effets neuropsychiatriques (1/2000 en traitement curatif et 1/15000 en prophylaxie) sont : confusion, agitation, insomnie, vertiges, convulsions, diplopie, troubles de la conscience. Ils sont vraisemblablement dose-dépendants et favorisés par la prise d'alcool.

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

La méfloquine peut entraîner des troubles du rythme cardiaque, le plus souvent des bradycardies.

Amodiaquine :

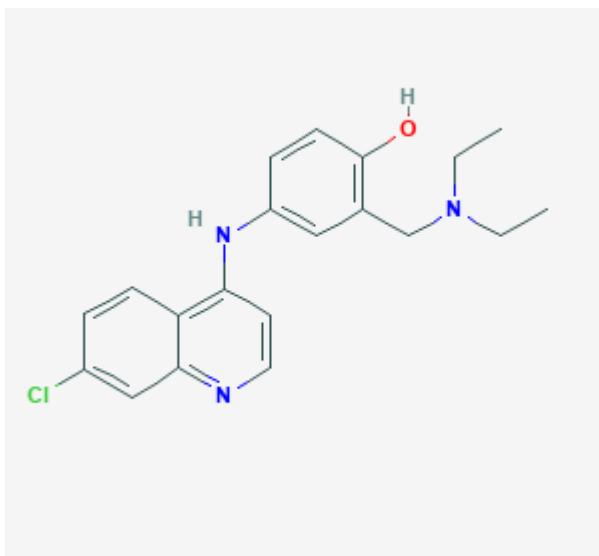


Figure 6 :: Structure chimique de l'amodiaquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2165#section=2D-Structure>

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

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

Effets indésirables : [42]

Rares aux doses utilisées en paludologie, des effets indésirables peuvent survenir dans le traitement de maladies du collagène qui nécessitent des doses trois fois plus élevées. Dans ce cas, peuvent apparaître :

- Des troubles nerveux : vertiges, céphalées
- Des troubles oculaires : rétinopathie non réversible

Le gène de résistance

Les gènes associés à la résistance sont le *pfcr1* et *pfmdr1*.

Dérivés de l'artémisinine : artéméter, artésunate, dihydroartémisinine

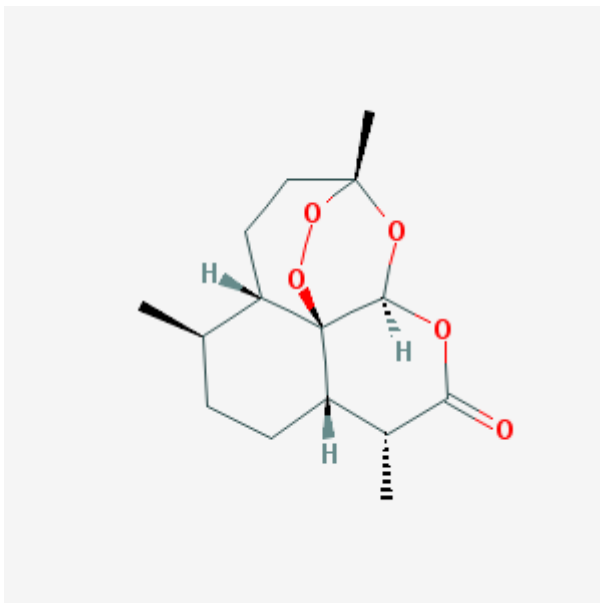
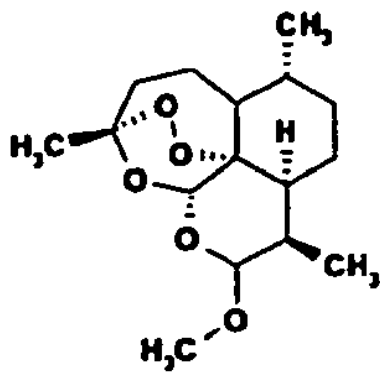
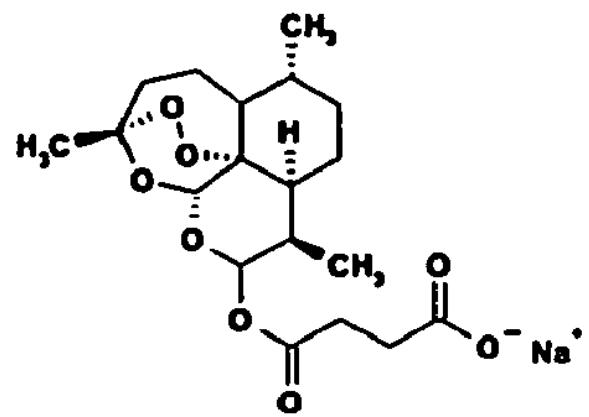


Figure 7 : Structure chimique de l'artémisinine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68827#section=2D-Structure>



Arthéméther



Artésunate de sodium

Figure 8 : Structure chimique de l'artéméther et l'artésunate

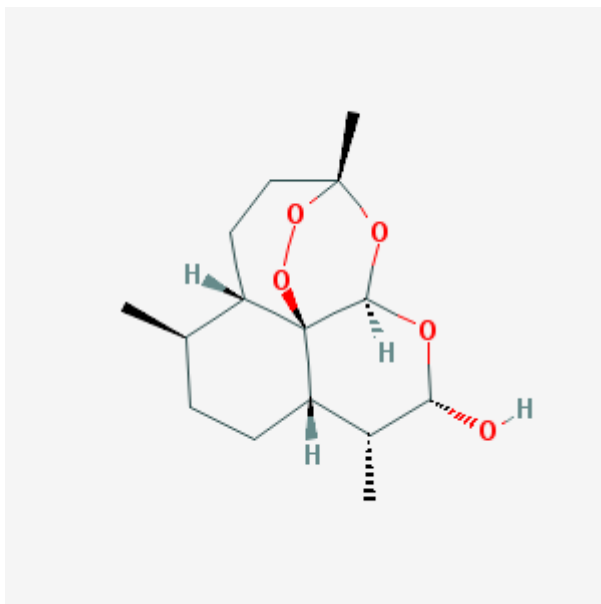


Figure 9 : Structure chimique de la dihydroartémisinine

Source: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3000518#section=2D-Structure>

Les deux autres dérivés ont pour métabolite actif la dihydroartémisinine.

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

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

Élimination : Ils sont éliminés sous formes de métabolites dans les urines et les fèces. Le temps de demi-vie $T_{1/2}$ de l'artéméther et la dihydroartémisinine est d'environ 2 heures [42].

Effets indésirables : [41]

- Ils sont Bien tolérés,

-Allergie dans 1 cas sur 3000,

- Dans de rares cas, des Palpitations, céphalées, étourdissement, toux, douleurs abdominales, arthralgie, myalgie en cas de surdosage

Le gène de résistance

Pour les dérivés de l'artémisinine le gène associé à la résistance parasitaire est le gène Pfk13 (*plasmodium falciparum* kelch 13)

La luméfantrine

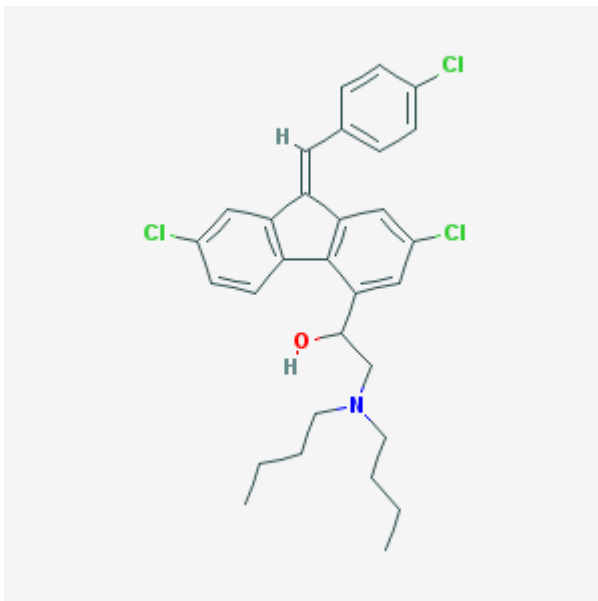


Figure 10 : Structure chimique de la luméfantrine

Source: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6437380#section=2D-Structure>

Absorption : Elle débute 2 heures après son administration, la luméfantrine est un composé très lipophile. Le pic de concentration est atteint 6-8 heures après son administration. Un repas riche en graisse augmente d'un facteur 2 l'absorption de la luméfantrine chez un

impaludé. A jeun, le taux d'absorption est inférieur à 10% donc toujours prendre avec un repas ou avec une boisson lactée.

Métabolisme : elle est métabolisée en desbutyl-luméfantrine par le CYP3A4, métabolite 5-6 fois plus antipaludéen que la luméfantrine *in vitro*, ce métabolite ne représente que 1% de l'exposition systémique à la luméfantrine,

Élimination : elle est fécale, principalement sous forme inchangée. La luméfantrine inhibe le CYP2D6. Son temps de demi-vie $T_{1/2}$ = 2-3 jours.

Effets indésirables : [42]

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

Les gènes associés à la résistance sont *Pfcr1* et *Pfmdr1* [45].

La Primaquine (Primaquine®) :

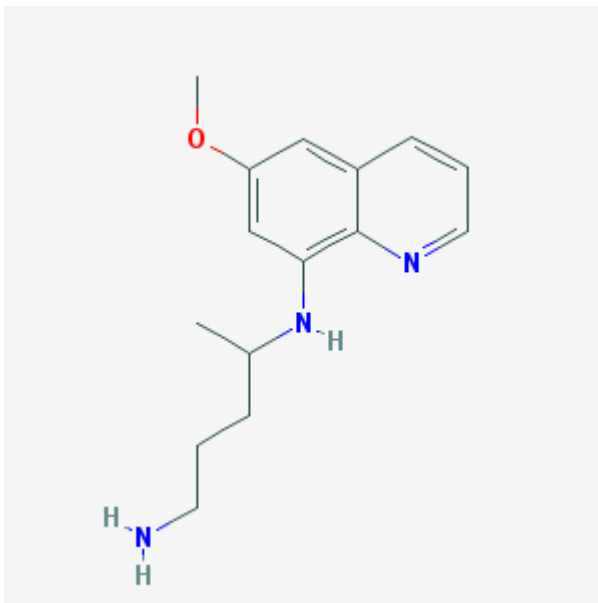


Figure 11 : Structure chimique de la primaquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4908#section=2D-Structure>

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

Effets indésirables :

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

L'hémolyse due à la primaquine est dose-dépendante chez les déficitaires en G6PD [42].

Dérivés de l'artémisinine en monothérapie:[43]

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

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

La sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar®) : [43]

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

Association atovaquone + proguanil (Malarone®) : [43]

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

Dosage adultes et enfants > 40 kg : comprimés à 250 mg d'atovaquone et à 100 mg de proguanil;

Dosage enfants de 11 à 40 kg : comprimés à 62,5 mg d'atovaquone et à 25 mg de proguanil.

3.7.6 Association artéméther + luméfántrine (Coartem®/Riamet®) : [43]

Cette association se présente en comprimés à 20 mg d'artéméther et à 120 mg de luméfántrine et est prescrit pour le traitement de l'accès palustre simple à *P. falciparum* : 4 comprimés en 2

prises par jour pendant 3 jours (dose adulte). Il n'est pas utilisé en chimioprophylaxie. Les effets secondaires sont des troubles du sommeil, des céphalées, des étourdissements, des troubles digestifs, un prurit. Il n'y a pas de cardiotoxicité. Il y a une présentation pédiatrique : Coartem® dispersible formulation pédiatrique.

3.7.7 Association artésunate + amodiaquine : [43]

Cette association se trouve sous forme **libre** (Arsucam®) et sous forme fixe (AS/AQ®, Coarsucam®). Elle est prescrite dans le traitement de l'accès palustre simple à *P. falciparum* en Afrique. La posologie est d'une prise par jour pendant 3 jours. Il y a quatre dosages selon l'âge : 3-11 mois, 1 comprimé AS/AQ 25 mg/67,5 mg ; 1 à 6 ans, 1 comprimé 50 mg/135 mg ; 7 à 13 ans, 1 comprimé 100 mg/270 mg; 14 ans et au-dessus, 2 comprimés (100 mg/270 mg).

Association artésunate + méfloquine : [43]

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

3.7 Prophylaxie: [43]

3.7.1 Lutte antivectorielle :

La lutte antivectorielle est essentiellement basée sur :

- L'aménagement de l'environnement destiné à diminuer le nombre de gîtes anophéliens,
- La technique de l'insecte stérile : elle permet l'éradication ou la diminution d'une population d'insectes, les mâles irradiés par un rayonnement gamma (bombe au Cobalt 60) deviennent sexuellement stériles à cause de mutations dominantes au niveau du sperme.
- Les aspersion intra-domiciliaires d'insecticides à effet rémanent,
- Les moustiquaires imprégnées d'insecticides : outil majeur de prévention du paludisme au niveau communautaire, stratégie de lutte recommandée par l'OMS. Mais la résistance des vecteurs est préoccupante, et il est nécessaire de ré-imprégner régulièrement les moustiquaires pour maintenir leur efficacité. Actuellement, il y a un développement de moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée d'action (MIILDA) [OLYSET®, PERMANET®] avec une efficacité de 5 ans.
- Les ports de vêtements imprégnés d'insecticides (utilisés par les armées)

□ Les répulsifs (insecticides ou repellents). Beaucoup de répulsifs sont disponibles sur le marché. Deux produits sont recommandables en pratique : le DEET et le KBR 3023.

3.7.2 Chimio prophylaxie :

3.7.2.1 Chimio prophylaxie des expatriés et des voyageurs :

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

□ Schéma prophylactique pour l'adulte suivant les groupes 1, 2 ou 3 :

o **Pays du groupe 1** : chloroquine (Nivaquine®) 100 mg/j, séjour + 4 semaines après,

o **Pays du groupe 2** : association chloroquine (100 mg/j) + proguanil (200 mg/j) (Savarine®) 1 comprimé par jour, séjour + 4 semaines après ; ou association atovaquone + proguanil (Malarone®) : dose chez les sujets de plus de 40 kg : 1 comprimé adulte (250 mg/100 mg) par jour, séjour + une semaine après.

o **Pays du groupe 3** : trois choix sont possibles :

□ **choix n°1** : Lariam®, comprimés à 250 mg, 1 comprimé par semaine, 10 jours avant + séjour + 3 semaines après,

□ **choix n°2** : Malarone® : même dose que pour les pays du groupe 2, séjour + une semaine après,

□ **choix n°3** : doxycycline (Doxypalu®, Granulodoxyl®Gé), comprimés à 100 et 50 mg: 100 mg chez l'adulte et chez l'enfant de plus de 8 ans ou pesant plus de 40 kg, 50 mg chez l'enfant de plus de 8 ans pesant moins de 40 kg, séjour+ 4 semaines après.

□ Schéma prophylactique chez la femme enceinte suivant les groupes 1, 2 ou 3 :

o **pays du groupe 1** : Nivaquine®

o **pays du groupe 2** : Savarine® ou Malarone®,

o **pays du groupe 3** : séjour déconseillé, si séjour indispensable : Lariam® ou Malarone®

□ Schéma prophylactique Nivaquine chez l'enfant

o **pays du groupe 1** : Nivaquine®

o **pays du groupe 2** : association chloroquine (Nivaquine®) 1,5 mg/kg/j + proguanil (Paludrine®) 3 mg/kg/j (la Savarine® n'étant prescrite qu'à partir de 15 ans) ou Malarone®, comprimé enfant (62,5 mg/25 mg) suivant poids : 1 cp/j de 11 à 20 kg, 2 cp/j de 21 à 30 kg, 3 cp/j de 31 à 40 kg à heure fixe et en prise unique.

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

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

3.7.2.2 Traitement Préventif Intermittent (TPI) des femmes enceintes et des enfants des pays en voie de développement.

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

Le traitement préventif intermittent chez les enfants (TPIe) réduit la prévalence de l'infection palustre.

La chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) est recommandée chez les nourrissons de 3-11 mois et les enfants de 12-69 mois. Elle associe amodiaquine et sulfadoxine-pyriméthamine. Chez les nourrissons : un demi-comprimé de 153 mg d'AQ une fois par jour pendant 3 jours et une dose unique d'un demi-comprimé de 500/25 mg de SP. Chez l'enfant, un comprimé entier de 153 mg d'AQ une fois par jour pendant 3 jours et une dose unique d'un comprimé entier de 500/25 mg de SP. La CPS est r pendant la période durant laquelle le risque de contracter le paludisme est le plus élevé pour les. La CPS doit être couplée à

l'utilisation des moustiquaires imprégnées, ce qui permet de réduire de façon substantielle le paludisme maladie, le paludisme infection et l'anémie. La mise en œuvre du traitement préventif intermittent du paludisme chez les enfants de moins de 5 ans (TPIe) est très lente : sur les 16 pays auxquels l'OMS a recommandé d'adopter le TPIe, 6 seulement l'ont fait.

3.7.2.3 Effets indésirables des médicaments antimalariques en chimioprophylaxie :

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

3.8 Résistance du *Plasmodium* aux antipaludiques :

3.8.1 Les aminoquinoléines : la chloroquine

Le gène de la résistance à la chloroquine a été identifié en 2000. La substitution de la Lysine par la Thréonine en position 76 du gène PfCRT conduit à la mutation qui joue un grand rôle dans ce mécanisme de résistance à la chloroquine [46].

***P. falciparum* chloroquine transporter (PfCRT): [23]**

Ce gène situé sur le chromosome 7 code pour un transporteur membranaire de la vacuole digestive. La mutation sur le codon 76 (K→T), associée à sept autres points de mutation, permet au parasite de limiter l'accumulation de chloroquine dans sa vacuole digestive, où elle exerce son action inhibitrice. PfCRT est également impliqué dans la baisse de sensibilité du parasite à l'amodiaquine et à la quinine. Dans les zones où les allèles de résistance ne sont pas fixés, on observe une augmentation de la fréquence de l'allèle sauvage après abandon de la chloroquine. L'analyse de ce locus renseigne sur la pression médicamenteuse exercée au sein des populations.

3.8.2 La résistance aux CTA

Les CTA ont un rôle important dans le succès de la lutte contre le paludisme au niveau mondial. Protéger leur efficacité de traitement est donc une priorité mondiale en matière de santé.

La plupart des études menées entre 2010 et 2017 montrent que les CTA restent efficaces, avec des taux d'efficacité globalement supérieurs à 95 % en dehors de la sous-région du Grand Mékong.

En Afrique, aucune résistance (partielle) aux artémisinines n'a été rapportée à ce jour. Même si la multi-résistance, qui inclut la résistance (partielle) aux artémisinines et aux médicaments partenaires, a été détectée dans 4 pays de la sous-région du Grand Mékong, on a pu observer une réduction massive du nombre de cas de paludisme et de décès associés dans cette sous-région. La surveillance de l'efficacité des médicaments antipaludiques a permis une mise à jour rapide des politiques de traitement dans la plupart des pays de la sous-région.

Le temps de clairance parasitaire comme paramètre de contrôle des CTA:

Le contrôle de routine de l'efficacité thérapeutique des CTA est un facteur essentiel dans le changement de la politique de traitement et la détection précoce des changements de *P. falciparum* vis-à-vis des CTA. L'OMS recommande un monitoring récurrent de l'efficacité des CTA dans les pays endémiques à *P. falciparum*. Les résultats de ces études d'efficacité thérapeutique des CTA ont permis aux chercheurs de déterminer :

- La proportion des patients qui ont une parasitémie au troisième jour de leur traitement (J3), ce qui est récemment considéré comme indicateur de choix pour l'identification d'une résistance suspecte de *P. falciparum* aux CTA.
- La proportion des échecs thérapeutiques sur un suivi de 28 ou 42 jours selon la CTA administrée

La résistance à l'artémisinine est actuellement un concept qui change relativement à certains paramètres. Un marqueur de résistance à l'artémisinine a été récemment identifié. Les mutations dans la région Kelch 13 (K13) propeller sont associées à la clairance parasitaire retardée *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*. La liste de ces mutations s'allonge de plus en plus, ce qui affecte directement la définition du concept de « résistance à l'artémisinine ». Actuellement elle se définit comme

□ Résistance suspecte à l'artémisinine : une haute prévalence des phénotypes à clairance parasitaire retardée ou une haute prévalence des mutants K13 [20].

□ Résistance à l'artémisinine confirmée : une combinaison de la clairance parasitaire retardée et de mutations K13 chez le même patient [20].

Le temps de clairance parasitaire s'avère donc un paramètre important dans le test d'efficacité des antipaludiques et plus particulièrement les CTA.

METHODOLOGIE

4. METHODOLOGIE

4.1 Lieux de l'étude

L'étude s'est déroulée à Missira dans le Cercle de Kolokani (Région de Koulikoro) et à Sélingué dans le Cercle de Yanfolila (Région de Sikasso).

Monographie du Site de Missira

Le village de Missira est une zone d'endémie palustre de par la pluviométrie et la présence des marres faisant beaucoup de gîtes larvaires.

Le village est situé à environ 170 km au nord-ouest de Bamako. La zone de Missira est située aux abords immédiats de la réserve de biosphère de la boucle de Baoulé sur la rive droite de la rivière Baoulé qui est la limite naturelle entre les cercles de Kolokani et de Kita. Cette boucle comprend les parties ouest du cercle de Kolokani, la partie est du cercle de Kita, celle du sud du cercle de Diéma et nord-ouest du cercle de Kati. La zone de Missira est contiguë au parc national de la boucle du Baoulé et à la forêt classée du Fina desquelles elle n'est séparée que par le cours du Baoulé.

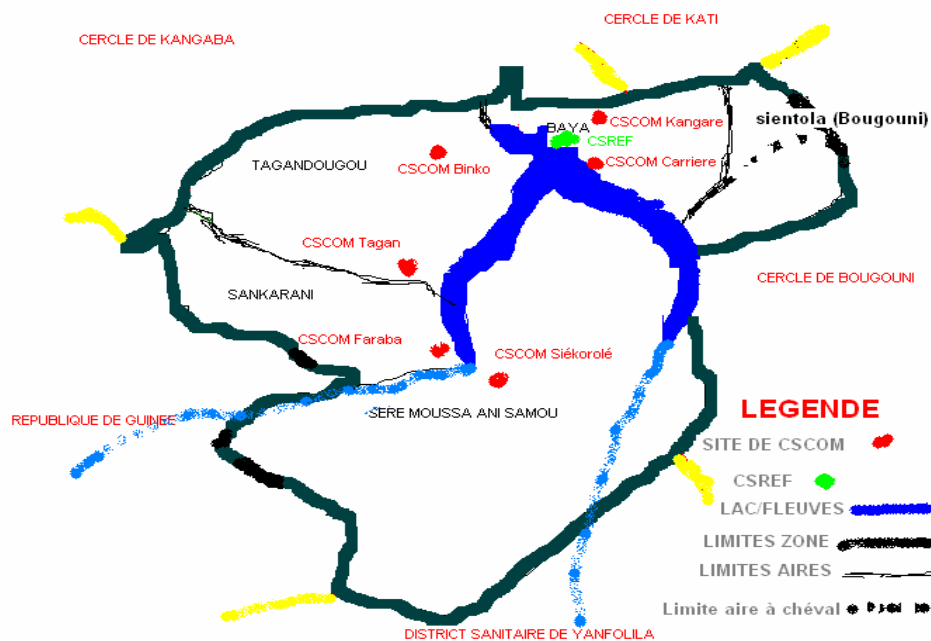


Figure 12 : Localisation géographique du site de Missira

Monographie du site de Sélingué

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

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



CARTE SANITAIRE DE LA ZONE DE SELINGUE/CERLE DE YANFOLILA

Figure 13 : Carte sanitaire de la zone de selingué

Source : Institut Géographique du Mali. Localisation de Sélingué sur la carte du Mali [Internet]. Mai 2018. Institut Géographique du Mali: Institut Géographique du Mali; Disponible sur: [47] www.igm-mali.ml/

4.2 Période et type de l'étude

C'est une étude prospective qui s'est déroulée entre Octobre 2015 et Janvier 2017.

4.3 Echantillonnage

Les patients étaient tous des enfants âgés de 6 à 59 mois qui se présentaient aux différents centres de santé avec les symptômes du paludisme.

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

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

4.4 Critères d'inclusion

- Goutte épaisse positive à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 2000 et 199.999 p/ 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 cérébral) ;
- Sujets pouvant potentiellement rester dans l'étude jusqu'à J42 ;
- Assentiment des parents ou tuteurs.

4.5 Critères de non inclusion

- Prise antérieure d'antipaludiques dans les 4 jours précédents ;
- Patients vivant dans un rayon supérieur à 5 km ;
- Patients ayant un poids corporel inférieur à 9 kg ;
- Co-infection avec d'autres espèces plasmodiales ;
- Evidence de paludisme sévère (densité parasitaire \geq 200.000 parasites par μ L ; présence d'un ou de plusieurs signes de gravité du paludisme.
- Infection au VIH détectée par interrogatoire ;
- Antécédents d'hypersensibilité à l'artéméther, à la luméfantine, à l'artésunate ou à l'amodiaquine ;

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

4.6 Diagnostic des cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum*

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

4.7 Administration des médicaments

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

Tableau 2: Protocole d’administration des molécules AL en fonction du poids

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

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

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

Tableau 3: Protocole d'administration des molécules ASAQ en fonction du poids

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

4.8 Suivi des patients

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

Pendant les 42 jours ils venaient au centre de sante les J1; J2; J3; J7; J14; J21; J28; J35 et J42 soit neuf (9) visites au total. Pendant J1; J2 et J3 les patients prenaient leurs doses de Coartem® ou d'ASAQ-Denk puis subissaient des examens cliniques. Le tableau ci-dessous illustre les examens effectués lors du suivi des patients par visites.

Tableau 4: Listing des examens faits par rendez-vous

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

4.9 Collecte et conservation des échantillons

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

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

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

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

4.10 Recherche des mutations sur le gène PfK13

4.10.1 L'extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été faite avec le kit Qiagen selon le protocole du fabricant à partir du sang séché sur le papier filtre de type Whatman 903TM (GE Healthcare, Cardiff, UK).
(cf. annexes)

4.10.2 La PET-PCR

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

Préparation du mélange réactionnel (Master Mix)

Tableau 5: Composition du mélange réactionnel (Master mix) pour la PET-PCR

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

Conditions d'amplification par la PCR

On s'assurait que les deux fluorophores à savoir FAM et HEX ont été correctement utilisés. Le fluorophore FAM était associé aux marqueurs pour le genre *Plasmodium* et le fluorophore HEX pour l'espèce *falciparum*.

Conditions d'amplification:

1) 95°C	15 minutes	
2) 95°C	20 secondes	} X 45 cycles
3) 63°C	40 secondes	
4) 72°C	30 secondes	

Analyse des données

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

4.10.3 Le séquençage des échantillons

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

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

Le séquençage du Domain *Propeller* de *PfK13* a été fait par la méthode de Sanger (voir annexe)

4.10.4 Analyse bio-informatique des séquences après séquençage

Au cours de cette étude :

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

Après le séquençage des échantillons, les données brutes étaient recueillies et analysées avec le logiciel Geneious R11. La séquence de la souche *Pf3D7 (PF13_0238-814205)* était utilisée comme séquence consensus pour rechercher les mutations sur les autres séquences.

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

4.11. Considérations éthiques et déontologiques

Le protocole de recherche de cette étude a été soumis à la validation du Comité d'éthique de l'INRSP, (Ministère de la Santé et des Affaires Sociales). Tout changement ultérieur du protocole était soumis à l'approbation de ce comité d'éthique. C'était une étude à risque minimal car il ne s'agissait pas de tester un nouveau médicament ou un matériel à usage biomédical. Elle s'appuie sur des tests de diagnostic et du schéma thérapeutique qui sont utilisés en routine dans les centres de santé dans lesquels nous avons conduit cette étude.

Nous précisons que le volume total du sang prélevé par patient ($< 4\text{mL}$) se trouvait dans l'intervalle des quantités admises par le NIH et autres agences, lesquelles sont $\leq 3,0\text{ mL}$ par kg dans un intervalle de temps ≥ 8 semaines. Pour un assentiment éclairé avant la prise du sang, nos investigateurs, avons eu à :

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

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

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

4.12. Gestion des données

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

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

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

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

On a évalué les mutations rencontrées en fonction de quatre paramètres définis par l'OMS comme suit:

4.13. Définition des cas d'échec thérapeutique selon l'OMS

Pour l'analyse de nos données sur le plan clinique, parasitologique et moléculaire nous sommes basés sur les définitions de l'OMS se trouvant dans son guide des méthodes de surveillance de l'efficacité des antipaludiques [12].

✓ **Echec Clinique Précoce (ECP)**

- Signes de danger ou paludisme grave les jours 1, 2 ou 3 en présence de parasitémie;
- Parasitémie au jour 2 plus élevée qu'au jour 0, quelle que soit la température axillaire;
- Parasitémie au jour 3 avec une température axillaire $\geq 37,5$ ° C; et
- Parasitémie au jour 3 $\geq 25\%$ du nombre au jour 0. •

✓ **Echec Clinique Tardif (ECT)**

- Signes de danger ou paludisme grave en présence de parasitémie n'importe quel jour du jour 4 au jour 28 (jour 42) chez les patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce; et
- Présence de parasitémie n'importe quel jour entre le jour 4 et le jour 28 (jour 42) avec une température axillaire $\geq 37,5$ ° C chez les patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce.

✓ **Echec Parasitologique Tardif (EPT)**

- Présence de parasitémie n'importe quel jour entre le jour 7 et le jour 28 (jour 42) avec une température axillaire $< 37,5$ ° C chez les patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce ou d'échec clinique tardif.

✓ **Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (RCPA)**

- Absence de parasitémie au jour 28 (jour 42), quelle que soit la température axillaire, chez les patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce, d'échec clinique tardif ou d'échec parasitologique tardif.

RESULTATS

5. RESULTATS

Tableau 6: Répartition des patients selon le site d'étude

Site d'étude	Fréquence	Pourcentage
Missira	31	6.5
Sélingué	449	93.5
Total	480	100.0

Au total 480 enfants ont été inclus dans cette étude dont la majorité (93,5%) à Sélingué.

Tableau 7: Répartition des patients selon le sexe

Sexe	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
Masculin	238 (53)	17 (54,8)	255 (53,1)
Féminin	211 (47)	14 (45,2)	225 (46,9)
Total	449 (100)	31 (100)	480 (100)

Le sexe masculin était le plus représenté (soit 53,1%) avec un sexe ratio de 1,13.

Tableau 8: Répartition des patients selon la tranche d'âge.

Tranche d'âge en mois	sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
6 -11	24 (5,3)	0 (0)	24 (5.0)
12-23	41 (9 ,1)	02 (6,4)	43 (9.0)
24-35	74 (16,5)	05 (16,1)	79 (16.4)
36-47	139 (31,0)	06 (19,4)	145 (30.2)
48-59	171 (38,1)	18 (58,1)	189 (39.4)
Total	449 (100)	31 (100)	480 (100)

La tranche d'âge la plus représentée était [48- 59 mois] avec 39 ,4 % soit 189 enfants.

L'âge minimum était 6 mois et maximum 59 mois comme indiqué dans le protocole de l'étude.

Tableau 9: Répartition des patients selon la molécule administrée

Molécule administrée	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
AA	224 (49,8)	18 (58,1)	242 (50,4)
AL	225 (50,2)	13 (41,9)	238 (49,6)
Total	449 (100)	31(100)	480 (100)

Parmi les patients inclus 50,4% avaient reçu Artésunate –Amodiaquine (ASAQ) et 49,6% avaient reçu la combinaison Artemeter-Lumefantrine (AL).

Tableau 10 : Répartition des patients en fonction de la parasitémie

Tranche de parasitémie	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
2000-50000	383 (85,3)	21 (67,74)	404 (84.2)
50005-100000	46 (10,24)	07 (22,59)	53 (11.0)
100005-150000	8(1,79)	01 (3.22)	9 (1.9)
150005-200000	12 (2,67)	02 (6,45)	14 (2.9)
Total	449 (100)	31 (100)	480 (100.0)

La majorité des patients avaient une parasitémie comprise entre 2000 et 50000 *P.falciparum* / uL

Tableau 11: Répartition des patients selon la parasitémie à J2.

Parasitémie à J2	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
Oui	244 (56,1)	04 (12,9)	248 (53 ,2)
Non	191 (43,9)	27 (87,1)	218 (46,8)
Total	435 (100)	31 (100)	466 (100)

Au deuxième jour plus de la moitié des patients avaient une parasitémie (soit 53,2%).

Tableau 12 : Répartition des patients selon la parasitémie à J3

Parasitémie à J3	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
Oui	26 (6,1)	00 (00)	26 (5,7)
Non	402 (93,9)	31 (100)	433 (94,3)
Total	428 (100)	31 (100)	459 (100)

Au troisième jour, 5,7 % des patients n'avaient pas éliminé leur parasitémie.

Tableau 13: Répartition des patients selon la fièvre à J1

Fièvre	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
Oui	247 (55,01)	23 (74,1)	270 (56,3)
Non	202 (44,99)	8 (25,9)	210 (43,6)
Total	449 (100)	31 (100)	480 (100)

A leur première visite plus de la moitié (56,3%) des patients avaient la fièvre (56,3%)

Tableau 14: Répartition des patients selon la fièvre à J2

Fièvre	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
Oui	61 (14,05)	04 (12,9)	65 (14)
Non	473 (85,95)	27 (87,1)	400 (86)
Total	434 (100)	31 (100)	465 (100)

A leur deuxième, visite 14% des patients avaient la fièvre.

Tableau 15 : Répartition des patients selon la fièvre à J3

Fièvre	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
oui	10 (2,3)	02 (6,4)	12 (2,6)
non	415 (97,7)	29 (93,6)	444 (97,4)
Total	425 (100)	31 (100)	456 (100)

A leur troisième visite, 2,6% des patients étaient dans un état fébrile.

Tableau 16: Répartition des patients selon l'échec thérapeutique précoce

ETP	Sites (%)		Total(%)
	Sélingué	Missira	
Oui	13(2,7)	0 (0)	13(2 ,7)
Non	436 (93,3)	31(100)	467 (93,3)
Total	449(100)	31(100)	480 (100)

Sur les 480 enfants inclus dans l'étude, 2,7 % des patients ont fait un échec thérapeutique précoce.

Tableau 17: Répartition des patients selon l'échec clinique tardif

ECT	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
Oui	15 (3,3)	0 (0)	15 (3,1)
Non	434 (96,7)	31 (100)	465 (96,9)
Total	449 (100)	31 (100)	480 (100)

Sur les 480 enfants inclus dans l'étude, 3,1 % des patients ont fait un échec thérapeutique tardif.

Tableau 18: Répartition des patients selon l'échec parasitologique tardif

EPT	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
Oui	18 (4)	2(6,5)	20 (4,2)
Non	431 (96)	29 (93,5)	460 (95,8)
Total	449 (100)	31 (100)	480 (100)

Parmi les 480 patients, 4,2% ont fait un échec parasitologique tardif

Tableau 19: Répartition des patients selon les réponses cliniques et parasitologiques adéquates

RCPA	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
Oui	403 (89,7)	29 (93,5)	432 (90)
Non	46 (10,3)	2 (6,5)	48 (10)
Total	480 (100)	31 (100)	480 (100)

Sur les 480 enfants inclus dans l'étude, 90% (432) des patients avaient une réponse clinique et parasitologique adéquate n=432

Tableau 20: Répartition des patients en fonction du temps de clairance parasitaire

TCP en Heure	Sites (%)		Total (%)
	Sélingué	Missira	
24H	204 (45,4)	27 (87,1)	231 (48,1)
48H	219 (48,8)	04 (12,9)	223 (46,5)
72H	26 (5,8)	00 (00)	26 (5,4)
TOTAL	449 (100)	31 (100)	480 (100)

La majorité des patients (soit 48,1 n=231) avaient fait une clairance parasitaire en 24 heures. Le temps de clairance parasitaire moyen était de 37,75 heures et la médiane était de 48heures.

Tableau 21: Répartition des patients selon les mutations rencontrées

Mutations	469C	491F	493H	503K	539T	548S	578S	580Y	613P
Fréquence	2	2	3	1	0	1	1	0	1

Les mutations rencontrées aux positions 469 ; 503 et 613 étaient des mutations silencieuses. Les mutations à la position 493 ont été retrouvées chez 3 patients. Toutefois, ces mutations sont actuellement transitoires.

La mutation rencontrée à la position 578 était non silencieuse elle constitue en la substitution de l'Arginine par la Serine.

Tableau 22: Répartition des mutations en fonction du temps de clairance parasitaire

Temps de clairance	Mutations rencontrées (n= 309)							Total
	469C	491F	493H	503K	548S	578S	613P	
24H	1	0	0	1	1	0	0	3
48H	1	2	2	0	0	1	1	7
78H	0	0	1	0	0	0	0	1
TOTAL	2	2	3	1	1	1	1	11

L'une des mutations transitoires rencontrées à la position 493 était liée à un cas de clairance retardée.

Tableau: Répartition des mutations en fonction de la réponse au traitement

Réponse au traitement	n/N	%	469C	491F	493H	503K	548S	578S	613P	Total
ETF	13/480	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0
LCF	15/480	3,1	0	0	0	1	0	1	0	2
EPT	20/480	4,2	0	0	0	0	0	0	0	0
ACPR	432/480	90	2	2	2	1	1	0	1	9
Total	480/480	100	2	2	2	2	1	1	1	11

Nous avons eu 15 cas d'échec clinique tardif parmi lesquels 2 patients avaient des mutations.

Il s'agissait des patients SL0205 ET SL0288

- Le patient SL0205 était venu avec une parasitémie de 9350 Tf/ μ l de sang au premier jour et 7750 Tf/ μ l de sang au deuxième jour. Après 48H sous traitement par la combinaison AL il a fait une clairance parasitaire. Il n'a pas eu de fièvre durant les jours de suivi. Au J28 (jour de l'échec) il est revenu avec une parasitémie supérieure aux précédentes qui était de 33500. Après le séquençage nous avons trouvé chez ce patient une mutation à la position 493.
- Le patient SL0288 avait des parasitémies au J1 et J2 qui étaient respectivement 52275 Tf/ μ l de sang et 3125 Tf/ μ l de sang. Après 48H sous traitement par la combinaison ASAQ il a fait la clairance parasitaire.
Au premier jour il avait un état fébrile avec une température axillaire de 39,1°C qui est devenu normale après 24H (36,3°C).
Au J28 (jour de l'échec) il est revenu avec un état fébrile de 39,0°C mais il n'avait pas de parasitémie (microscope). Après le séquençage nous avons rencontré une mutation à la position 578.

Les autres mutations (9) ont été rencontrées chez les patients qui avaient répondu adéquatement au traitement.

**COMMENTAIRES
ET DISCUSSION**

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Nous avons fait une étude prospective du polymorphisme du gène *Pfk13* et des mutations associées au retard de clairance parasitaire dans les localités de Sélingué et Missira dans le but de tester l'efficacité des CTA. La mutation à la position 580 sur le gène *Pfk13* était associée à un retard de clairance en Asie du Sud-Est [48].

Les localités de Missira et de Sélingué ont été choisies pour cette étude car leur faciès de transmission du paludisme est différent [24]. En effet, à Missira le faciès de transmission du paludisme est de type nord soudanien et Sahel. La transmission y est intense pendant 3 à 4 mois par an. Elle est hyper endémique (IP : 5-75%). C'est un profil épidémiologique caractérisé par une prémunition de 9 ans et la fréquence du neuropaludisme chez les 1 à 9 ans [28]. Ce profil épidémiologique est commun aux régions de Ségou, Koulikoro et Mopti à l'exception de Mopti ville.

Tandis qu'à Sélingué, le faciès de transmission du paludisme correspond au faciès des barrages (Sélingué, Manantali et Markala). Avec comme caractéristique, une anémie palustre élevée chez les moins de 9 ans. La transmission y est Bimodale [24]. La pluviométrie élevée et la présence du barrage hydroélectrique à Sélingué et la présence des marres à Sélingué en font des sites propices à la circulation du parasite du paludisme (*Plasmodium*) et au développement de son vecteur (l'anophèle) à cause des retenus d'eau [24].

Durant l'étude, un système de supervision était mis en place pour prévenir la survenue d'éventuelles erreurs. Une équipe se déplaçait du laboratoire chaque mois pour la supervision des équipes sur les sites d'étude.

Le kit Qiagen a été utilisé pour l'extraction de l'ADN. Ce kit permet d'avoir de l'ADN purifié, débarrassé de toutes impuretés comme l'hémoglobine pouvant entraîner une inhibition lors de la PCR. Ce kit a aussi l'avantage de pouvoir extraire des fragments d'ADN plus long [31].

Le géotypage des échantillons a été fait par séquençage suivant la méthode de Sanger. Cette méthode est décrite comme l'une des plus utilisées et préférées en termes de séquençage du matériel génétique [49] à cause de sa sensibilité de 98-100% décrite dans certaines études [50].

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

Notre étude a porté sur 480 enfants dont 53,1% d'entre eux étaient du sexe masculin. Cette tendance semble être similaire à celle retrouvée dans les données de l'enquête de la banque mondiale à propos de la pyramide des âges. Selon l'enquête de la banque mondiale donnant la pyramide des âges, le sexe ratio (1,04) est en faveur du genre masculin chez la tranche d'âge (0-5ans). Cette tendance est confirmée par d'autres études menées au Mali dont celle menée dans la localité de Missira, Kolokani au Mali par **Darar en 2003** portant sur l'étude épidémio-clinique et moléculaire du Paludisme à *Plasmodium falciparum* par la *msp1* à Missira [51].

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

Certains patients avaient toutefois de fortes parasitémies. Pour la plupart de ces parasitemies, elles proviennent des dépistages volontaires. Les patients qui viennent au centre pour dépistage volontaire sont plus aptes à développer de fortes parasitémies car ces enfants ne sont amenés au centre que lorsqu'ils présentaient des symptômes. Ce constat montre clairement que le dépistage actif contribue activement à détecter précocement les cas de paludisme et leur prise en charge.

Au bout de 24 heures la majorité des patients avaient fait la clairance parasitaire soit 48,1%, et après 72 heures tous nos patients avaient fait la clairance parasitaire. Ce résultat concorde avec celui trouvé par **Ishengoma et al** en 2019 en Tanzanie lors d'une étude similaire portant sur l'efficacité des CTA qui ont eu 100% de clairance parasitaire après 72 heures de traitement.[52].

La moyenne du temps de clairance parasitaire était de 37,75 heures et la médiane 48heures. Ce temps de clairance avait une médiane (48 heures) supérieure à celle (32 heures) d'une étude menée par **Maiga et al** en 2012 à Sikasso sur l'efficacité des CTA [53].

Nous avons trouvé 2.7 % comme le taux d'échec thérapeutique précoce (ETF) nettement supérieur au 0,3% trouvé en Tanzanie par **Ishengoma et al** en 2019 lors d'une étude similaire portant sur l'efficacité des CTA. [52]. Cette différence pourrait être expliquée par l'utilisation d'un seul bras de CTA par **Ishengoma et al** contrairement à notre étude (deux bras).

Dans notre étude le taux d'échec clinique tardif (LCF) était de 3,1% inférieur au 6,1% trouve en Tanzanie **Ishengoma et al** en 2019 lors d'une étude similaire portant sur l'efficacité des CTA [52] et aux 5,8% trouvés au Niger par **Ibrahim et al** dans une étude portant sur la comparaison des CTA en 2016 [54].

Dans notre étude nous avons également trouvé 4,2% comme taux d'échec parasitologique tardif (LPF). Ce résultant est concordant avec les résultats obtenus par **Ibrahim et al** en 2016 au Niger [54] qui ont eu 4,2 % et nettement inférieur au 14% trouvé en Tanzanie par **Ishengoma et al** [52].

Dans notre étude 90% des patients avaient fait des réponses cliniques et parasitologiques adéquates. Ce résultat est concordant avec le résultat obtenu par l'équipe de **Mutabingwa** qui a trouvé 89% de réponse clinique et parasitologique adéquates à l'association Artésunate-Amodiaquine en Tanzanie en 2005 [55].

Sur les 480 échantillons nous avons pu faire le séquençage de 309 échantillons dont seulement deux échantillons de Missira.

Toutes les mutations identifiées ont été trouvées chez les échantillons de Sélingué aux positions 469 ; 491 ; 493 ; 503 ; 548 ; 578 et 613.

Pour les positions 469, 613 et 503 les mutations obtenues étaient silencieuses et constituaient respectivement une substitution du codon TGT en TGC avec le même acide aminé (Cystéine-C), CAA en CAG avec la Phénylalanine (F) puis une substitution du codon AAG en AAA avec toujours le même acide aminé (Lysine-K). Ces mutations ont été récemment rapportées dans une étude faite au Ghana par **Kamau et al** [11] et au Sénégal en 2016 par **Talundzic et**

al [13]. Ces mutations ont été retrouvées chez les sujets qui ont présenté des réponses cliniques et parasitologiques adéquates.

La position 493 qui est connue pour son association au retard de clairance parasitaire en Asie du Sud-Est a montré trois (3) mutations transitoires lors de notre étude. La présence des mutations transitoires à cette position pourrait être une preuve de la pression médicamenteuse engendrée par les CTA qui sont largement utilisées actuellement. La mutation transitoire à la position 493 de *K13* a été précédemment obtenue en RDC et en Tanzanie par **Kamau et al** en 2015 [11].

Parmi les 3 mutations de la position 493, deux d'entre elles ont été retrouvées associées à un temps de clairance parasitaire de 48 heures pendant que la 3ème était associée à un temps de clairance retardé de (72 heures). Ces mutations même transitoires, pourraient être la preuve d'une pression médicamenteuse réelle.

Parmi les mutations obtenues lors de cette étude, celle de la position 491 et 548 sont nouvelles en Afrique. Ces dernières étaient respectivement la substitution du codon TTC en TTT (Phénylalanine-F) et la substitution de GGC en GGT (Glycine-G). Ces positions nécessitent donc des investigations plus poussées dans le but de pouvoir étudier leur association à la résistance aux artémisinines.

La mutation trouvée à la position 578 était non silencieuse. Elle constituait en la substitution de l'acide aminé A (Alanine) par S (Serine). Cette position qui se trouve au voisinage de la position 580, n'est présentement pas connue comme associée à la résistance aux artémisinines. Elle a cependant été déjà identifiée dans beaucoup de pays de la sous-région comme le Ghana, le Sénégal, le Mali et de l'Afrique centrale et de l'est comme le Kenya, le Gabon la RDC [11,9]

Sur les différentes mutations observées deux venaient des patients ayant fait un échec clinique tardif à savoir une à la position 493 et l'autre à la position 578. Par contre toutes les autres mutations soient les 82% venaient des patients ayant fait des réponses clinique et parasitologique adéquates.

Ces mutations présentes chez les patients ayant fait des réponses cliniques et parasitologiques adéquates prouvent que ces parasites sont encore sensibles aux artémisinines. Toutefois, les mutations aux positions 493 et 578 chez les cas d'échec clinique tardif montrent la nécessité de surveiller ces parasites dans la communauté.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1 Conclusion

L'objectif de notre étude était d'étudier le polymorphisme du gène *PfK13* et de voir son association avec le retard de clairance parasitaire au Mali précisément dans les localités de Missira et de Sélingué. Dans notre étude nous n'avons pas trouvé de mutations associées au retard de clairance parasitaire comme en Asie mais nous avons trouvé des mutations transitoires à la position 493 qui montrent que les parasites subissent une pression médicamenteuse par les CTA. Nous avons rencontré une mutation non silencieuse à la position 578S qui est au voisinage de la position 580 connue pour son association à la résistance des CTA est une alerte pour mener des études d'efficacité plus poussée sur cette position et de faire des investigations sur d'autres positions.

7.2 Recommandations

Nous recommandons :

- **Au programme national de lutte contre le paludisme (PNLP)**

De continuer la surveillance de l'efficacité des molécules antipaludiques en général et sur les CTA en particulier.

- **Au LBMA**

De mener des études beaucoup plus poussées surtout in vitro sur les mutations associées à la résistance des parasites aux antipaludiques

- **A la population**

- De respecter les doses indiquées par les prescripteurs pendant la prise des médicaments et à la bonne utilisation des moustiquaires.
- De continuer à aider les acteurs de la santé dans la bonne application des protocoles de surveillance des antipaludiques.
- D'éviter l'automédication.

REFERENCES

8. REFERENCES

1. Breman J. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg.* 1 janv 2001;64(1_suppl):1-11.
2. Dorkenoo AM, Yehadji D, Agbo YM, Layibo Y, Agbeko F, Adjeloh P, et al. Therapeutic efficacy trial of artemisinin-based combination therapy for the treatment of uncomplicated malaria and investigation of mutations in k13 propeller domain in Togo, 2012–2013. *Malar J* [Internet]. déc 2016 [cité 5 août 2019];15(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-016-1381-8>
3. OMS | Rapport sur le paludisme dans le monde 2018 [Internet]. [cité 8 août 2019]. Disponible sur: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/fr/>
4. DOUMBIA.O. Paludisme au Mali, passé, présent et avenir. [Thèse].[MALI]: USTTB; 1997.
5. KAYENTAO K. Epidémiologie du paludisme et évaluation du traitement de l'accès palustre simple a la chloroquine dans le village de Donéguébougou. 1997[Thèse].
6. PNLP. RAPPORT 2018 PNLP.doc.rdf. 2018.
7. Rapport de quantification des intrants antipaludiques: Période janvier 2014 à décembre 2018 - Mali [Internet]. [cité 8 août 2019]. Disponible sur: <http://apps.who.int/medicinedocs/fr/m/abstract/Js22011fr/>
8. Nakeesathit S, Saralamba N, Pukrittayakamee S, Dondorp A, Nosten F, White NJ, et al. Limited Polymorphism of the Kelch Propeller Domain in *Plasmodium malariae* and *P. ovale* Isolates from Thailand. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2016;60(7):4055-62.
9. Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnädig N, Uhlemann A-C, et al. Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nat Commun* [Internet]. sept 2016 [cité 13 août 2019];7(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ncomms11553>
10. Bjorkman A, Kone A, Adams M, Diallo N, Dara A, Maiga AW, et al. Polymorphisms in the K13-Propeller Gene in Artemisinin-Susceptible *Plasmodium falciparum* Parasites from Bougoula-Hameau and Bandiagara, Mali. *Am J Trop Med Hyg.* 3 juin 2015;92(6):1202-6.
11. Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, et al. K13-Propeller Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* Parasites From Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis* [Internet]. 2 nov 2014 [cité 8 août 2019]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiu608>
12. OMS. WHO 2009 TES guidelines.pdf. 2009.
13. Talundzic E, Ndiaye YD, Deme AB, Olsen C, Patel DS, Biliya S, et al. Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* kelch13 Mutations in Senegal Determined by

Using Targeted Amplicon Deep Sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. mars 2017 [cité 23 juill 2019];61(3). Disponible sur: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02116-16>

14. Pradines B, Dormoi J, Briolant S, Bogreau H, Rogier C. La résistance aux antipaludiques. *Rev Francoph Lab*. 2010(422):51-62.
15. Rapp PC. Actualités du Paludisme d'importation. :137.
16. CDC - Malaria - About Malaria - History [Internet]. [cité 5 août 2019]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/>
17. OMS. WHO_CDS_RBM_2001.33_fre.pdf. 2001.
18. Jansen FH. F. Herwig Jansen. Artésunate et artéméther vers l'éradication du paludisme 2002..PDF. 2002.
19. Oumou H. SAADE GD, Ogobara K. DOUMBO MS. Project paludisme urbain-péri-urbain impact des supports imprégnés perméthrine sur l'anémie de la grossesse et morbidité.pdf. [Mali]: USTTB; 2005.
20. OMS. status-rep-artemisinin-act-resistance-sept2015.pdf. 2015.
21. Circulaire 06-1774 Retrait de la chloroquine.txt [Internet]. [cité 14 août 2019]. Disponible sur: http://mail.cnom.sante.gov.ml/index.php?option=com_content&task=view&id=320&Itemid=87
22. Centre des médias [Internet]. [cité 5 août 2019]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room>
23. Didier Menard - Publications List [Internet]. [cité 5 août 2019]. Disponible sur: <http://publicationslist.org/data/didier.menard/>
24. Koita OA, Sangaré L, Sango HA, Dao S, Keita N, Maiga M, et al. Effect of Seasonality and Ecological Factors on the Prevalence of the Four Malaria Parasite Species in Northern Mali. *J Trop Med*. 2012;2012:1-9.
25. Memoire Online - Mortalité hospitalière due au paludisme grave chez les enfants de moins de cinq ans - Dimitri,christian,georges,traïsor Tumuino mambu,Ngoy batala,Baka nduku,Mampangula tukeba [Internet]. [cité 5 août 2019]. Disponible sur: https://www.memoireonline.com/12/08/1704/m_mortlite-hospitaliere-due-a-paludisme-grave-chez-les-enfants-de-moins-de-cinq-ans0.html
26. Fofana B, Djimé AA, Dama S, Sidibe B, Sagara I, Dicko A, 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.
27. Talisuna AO, Karema C, Ogutu B, Juma E, Logedi J, Nyandigisi A, et al. Mitigating the threat of artemisinin resistance in Africa: improvement of drug-resistance surveillance and response systems. *Lancet Infect Dis*. nov 2012;12(11):888-96.

28. DOUMBO O. Epidémiologie du paludisme au Mali : étude de la chloroquinorésistance, essai de stratégie de contrôle basée sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associée au traitement systématique des accès fébriles [Internet]. [MALI]: MONTPELIER; 1992. Disponible sur: <http://www.theses.fr/1992MON20039>
29. Barry MA. MMoorrbbiiddiittée ppaalluussttrree ddaannss ddeeuuxx llooccaalliittéess dduu cceerrcllee dde KKoollookkaannii :: NNoossssoouummbboouuggoouu eett DDiiddiéenii. :69.
30. Sylvie M, Vincent R. systemes_vectoriels.pdf. 2012.
31. DIARRA Y. ETUDE D'EFFICACITE DES ANTIPALUDIQUES : CAS DE L'ARTEMETHER-LUMEFANTRINE ET LA CHLOROQUINE DANS LA COMMUNE RURALE DE DIORO. 2016;123.
32. DIALLO AK, Maiga AI. Test d'efficacité de la Combinaison Thérapeutique Artémether plus Luméfantine dans la Commune Rurale de Dioro : Prévalence des mutations sur les gènes Pfm^{dr1} et Pfk¹³ chez les parasites isolés lors des échecs thérapeutiques. 2018;130.
33. Gentilini M. Médecine tropicale. Paris: Médecine sciences publications; 2012.
34. Methods and techniques for assessing exposure to antimalarial drugs in clinical field studies: informal consultation organized by the World Health Organization with the technical support of the worldwide antimalarial resistance network, 22-24 february 2010, Bangkok, Thailand. Geneva: World Health Organization; 2011.
35. Methods and techniques for assessing exposure to antimalarial drugs in clinical field studies: informal consultation organized by the World Health Organization with the technical support of the worldwide antimalarial resistance network, 22-24 february 2010, Bangkok, Thailand. Geneva: World Health Organization; 2011.
36. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck H-P, Snounou G, et al. Plasmodium falciparum msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. Malar J [Internet]. 6 avr 2011;10:79. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-79>
37. Snounou G, Zhu X, Siripoon N, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, et al. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in Plasmodium falciparum populations in Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg. août 1999;93(4):369-74.
38. Peyerl-Hoffmann G, Jelinek T, Kilian A, Kabagambe G, Metzger WG, Sonnenburg FV. Genetic diversity of Plasmodium falciparum and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. Trop Med Int Health [Internet]. 6(8):607-13. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3156.2001.00761.x>
39. Roman DNR, Anne NNR, Singh V, Luther KMM, Chantal NEM, Albert MS. Role of genetic factors and ethnicity on the multiplicity of Plasmodium falciparum infection in children with asymptomatic malaria in Yaoundé, Cameroon. Heliyon. août 2018;4(8):e00760.

40. Magesa SM, Mdira KY, Farnert A, Simonsen PE, Bygbjerg IC, Jakobsen PH. Distinguishing Plasmodium falciparum treatment failures from re-infections by using polymerase chain reaction genotyping in a holoendemic area in northeastern Tanzania. Am J Trop Med Hyg [Internet]. nov 2001;65(5):477-83. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716101?dopt=Abstract>
41. Pr. E. Pichard PrMD. les-anti-paludiques.pdf. 2003.
42. D Filisetti LM. Module de Pharmacologie Clinique 2011/2012. 2011/2012. Vol. 15. Faculté de Médecine de Strasbourg, 2012 DCEM3.
43. Jullien V. Pharmacocinétique des antipaludiques. [Revue] déc 2012
44. Ménard D, Ariey F, Mercereau-Puijalon O. Étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (RIIP-Palu). médecine/sciences. juin 2013;29(6-7):647-55.
45. Groupe d'étude sur les marqueurs moléculaires AS-AQ/AL [Internet]. WorldWide Antimalarial Resistance Network. 2014 [cité 14 août 2019]. Disponible sur: <https://www.wwarn.org/fr/travailler-ensemble/groupe-detude/groupe-detude-sur-les-marqueurs-moleculaires-aqal>
46. Gan LSH, Loh JP. MReathpodiodydentification of chloroquine and atovaquone drug resistance in Plasmodium falciparum using high-resolution melt polymerase chain reaction. 2010;5.
47. IGM | Institut Géographique du Mali [Internet]. [cité 10 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.igm-mali.ml/>
48. Wang Z, Wang Y, Cabrera M, Zhang Y, Gupta B, Wu Y, et al. Artemisinin Resistance at the China-Myanmar Border and Association with Mutations in the K13 Propeller Gene. Antimicrob Agents Chemother. nov 2015;59(11):6952-9.
49. Pillai S, Gopalan V, Lam AK-Y. Review of sequencing platforms and their applications in pheochromocytoma and paragangliomas. Crit Rev Oncol Hematol. 1 août 2017;116:58-67.
50. Müller R, Hahn M, Vogel M, Delling G, Rügsegger P. Morphometric analysis of noninvasively assessed bone biopsies: Comparison of high-resolution computed tomography and histologic sections. Bone. 1 mars 1996;18(3):215-20.
51. Darar HY. Etude épidémio-clinique et moléculaire du Paludisme à Plasmodium falciparum par la MSP-1 à Missira (Cercle de Kolokani). :154.
52. Ishengoma DS, Mandara CI, Francis F, Talundzic E, Lucchi NW, Ngasala B, et al. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated malaria and prevalence of Pfk13 and Pfmdr1 polymorphisms after a decade of using artemisinin-based combination therapy in mainland Tanzania. Malar J [Internet]. déc 2019 [cité 4 août 2019];18(1). Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-019-2730-1>

53. Sanogo K, Plowe CV, Maiga AW, Toure S, Djimde AA, Dama S, et al. No Evidence of Delayed Parasite Clearance after Oral Artesunate Treatment of Uncomplicated *Falciparum* Malaria in Mali. *Am J Trop Med Hyg.* 2 juill 2012;87(1):23-8.
54. IBRAHIM Maman Laminou, SADOU Fatouma., DAOU Maman. COMPARAISON DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE ET DE LA TOLERANCE DES COMBINAISONS ARTEMETHER-LUMEFANTRINE ET ARTESUNATE-AMODIAQUINE AU NIGER.pdf. 2016.
55. Mutabingwa TK, Anthony D, Heller A, Hallett R, Ahmed J, Drakeley C, et al. Amodiaquine alone, amodiaquine+sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine+artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in Tanzanian children: a four-arm randomised effectiveness trial. *Lancet Lond Engl.* 23 avr 2005;365(9469):1474-80.
56. Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ.* 1988;66(5):621.

ANNEXES

9. ANNEXES

9.1 La technique du Test de Diagnostic Rapide (TDR) :

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

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

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

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

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

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

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

- Le test est dit **négatif** si une ligne apparait dans la fenêtre de contrôle et **pas** de ligne dans la fenêtre de test ;
- Le test est dit **invalide** s'il n'y a pas de ligne dans la fenêtre de contrôle mais il y a une ligne dans la fenêtre de test.

9.2 La technique de la goutte épaisse :

Cet examen microscopique se faisait en plusieurs étapes :

- **Etape1 : Prélèvement du sang**

Matériel nécessaire :

Lames d'examen de microscope

Lancettes stériles à usage unique

Méthanol ou éthanol

Coton hydrophile

Crayon gras ou stylo graveur

Méthode :

- Chez les enfants la piqûre se faisait au niveau 3^{ème} ou 4^{ème} doigt et se faisait sur le côté qui est moins sensible ; elle se faisait également sur le talon et le gros orteil.
- Nettoyer l'endroit choisi d'abord avec un tampon de coton imbibé d'alcool et avec un tampon sec pour enlever toute trace d'alcool ;
- Puis on pique d'un coup sec et rapide ;
- On déposait les premières gouttes de sang sur du papier filtre (confettis) ;
- De la main droite on tient une lame par les bords et de la main gauche le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang ;
- Ensuite on prenait une 2^{ème} lame et on recueillait une seconde goutte de sang en la mettant délicatement avec une extrémité de la lame.

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

La goutte épaisse se préparait comme suit :

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

Coloration de la goutte épaisse :

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

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

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

Le nombre de parasites se comptait sur 300 leucocytes.

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

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

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

Vu l'estimation que le nombre moyen de leucocyte par μL est 8.000 [56] :

Le calcul du nombre de parasite par μL se faisait selon la formule suivante :

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

Équation 1 : Formule de calcul de la parasitémie

9.3 Protocole de l'extraction de l'ADN avec le Kit Qiagen

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

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

Avant de commencer, s'assurer que :

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

Procédure :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9.4 Protocole du Séquençage par la méthode de Sanger

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

Etape 1 : PCR NICHEE

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

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

Tableau 23: Composition du mélange réactionnel (Master Mix) de la 1^{ère} réaction de *PfK13*

Réactifs	Pour 20.0µL de réaction	Conc finale
ddH ₂ O	12, 4µL	-----
5X HF TAMPON	4, 0µL	1X
10µM 1° Amorce aller	1, 0µL	0,5µM
10µM 1° Amorce retour	1, 0µL	0,5µM
10mM DNTPs	0, 4µL	0,2 µM
HF Phusion Taq	0, 2µL	1U
ADN	1,0µL	-----
TOTAL	20,0µL	

Tableau 24: Composition du mélange réactionnel (Master Mix) de la 2^{ème} réaction de *PfK13*

Réactifs	Pour 20.0µL de réaction	Conc final
ddH2O	12,4µL	-----
5X HF TAMPON	4,0µL	1X
10µM 2° Amorce aller	1,0µL	0,5µM
10µM 2° Amorce retour	1,0µL	0,5µM
10mM DNTPs	0,4µL	0,2µM
HF Phusion Taq	0,2µL	1U
Diluat (1:10) 1°RxN	1,0µL	-----
TOTAL	20,0µL	

Conditions d'amplification

1^{ère} Réaction

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

2^{ème} Réaction

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

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

Cette étape a pour objectif de nettoyer l'amplicon en le débarrassant des autres produits de la PCR tels que le restant de MgCl₂, de dNTPs, d'amorces, enzymes et autres produits de la réaction de PCR.

Tableau 25: Master Mix du ExoSAP

Exonuclease I	2, 5 μ L
TSAP	3, 0 μ L
ddH2O	494, 5 μ L

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

Condition de cycling de l'ExoSAP cleaning

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

Etape 3: Cycle sequencing

Après le nettoyage, les produits de la PCR sont de nouveaux amplifiés dans un mélange contenant à la fois les dNTPs et ddNTPs . Cette opération est réalisée sur une plaque.

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

Tableau 26: Cycle sequencing

Réactifs	Pour 10,0µL de réaction	Conc final
ddH2O	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	

Conditions de cycling

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

Etape 4 : Précipitation

La précipitation s'est déroulée selon la procédure suivante :

1. Ajouter 2,0µL 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 à la température ambiante pendant 15-20minutes ;
5. Centrifuger à 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 à 1000rpm pendant 5 minutes ;

7. Ajouter 30,0 μ L d'éthanol 70% froid dans chaque puits de la plaque contenant un échantillon puis mélanger avec la pipette ;
8. Couvrir la plaque de seal, puis centrifuger à 3200 rpm pendant 15minutes ;
9. Enlever le seal et couvrir la plaque de kimwipes puis l'inverser, ensuite centrifuger à 1000rpm pendant 5 minutes ;
10. Laisser sécher la plaque à la tempéra
11. ture ambiante pendant 30 minutes à 1 heure ;
12. 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 un séquenceur. Le mélange est aspiré par les capillaires du séquenceur et les séquences des fragments sont fournies par le logiciel pour analyse.

9.5 Fiche signalétique

Nom : COULIBALY

Prénom : Bakary

Tel : (00223)74057319 **E-mail :** boua9c6@gmail.com

Titre de la thèse : Polymorphisme du gène *PfK13* et les mutations associées au retard de clairance parasitaire dans les localités de Missira et Sélingué en 2016.

Nationalité : Malienne

Année Universitaire : 2018-2019

Ville de soutenance : Bamako-Mali

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

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

RESUME

L'émergence de la résistance aux dérivés de l'Artémisinine et ses molécules partenaires à l'ouest du Cambodge menace les progrès récents en matière de contrôle et de l'élimination du paludisme à l'échelle mondiale. Le polymorphisme des mutations du gène *PfK13* est d'une importance capitale d'où l'objet de cette étude, qui était d'examiner le polymorphisme du gène *PfK13* et les mutations associées au retard de clairance parasitaire dans les localités de Missira et Sélingué en 2016. Il s'agissait d'une étude prospective randomisée double aveugle, ouverte à deux bras (ASAQ de la firme pharmaceutique DENK et Coartem de NOVARTIS). Un groupe recevait l'ASAQ (artesunate+amodiaquine) et l'autre Coartem® (artéméter+luméfantrine) selon un code bien établi. Des échantillons de sang prélevés sur du papier filtre ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN par le kit Qiagen (conformément aux instructions du fabricant).

Au total 480 enfants ont été inclus dans l'étude et tous avaient une parasitémie comprise entre 2000 et 199.999 parasites par microlitre de sang.

La confirmation de l'accès palustre a été faite par la PET-PCR. La détection des mutations sur le gène *Pfk13* a été effectuée par séquençage (Sanger sequencing). Elle a été réalisée chez 309 patients. Après séquençage du domaine *Propeller* du gène *Pfk13*, nous avons obtenu des mutations transitoires et non-silencieuses. Pour les positions 469, 613 et 503 les mutations obtenues étaient silencieuses et ne sont actuellement pas connues comme associées au retard de clairance parasitaire, à la résistance aux CTA. Nous avons également trouvé trois (3) mutations transitoires lors de notre étude à la position **493 (493Y)**, qui pourrait être une preuve de la pression médicamenteuse engendrée par les CTAs qui sont largement utilisées actuellement. Nous avons aussi trouvé deux mutations qui sont nouvelles en Afrique, il s'agit des positions **491** et **548**. La mutation non-silencieuse obtenue se trouvait au niveau de la position **578 (578S)** mais n'est présentement pas connue comme associée à la résistance aux artémisinines.

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

IDENTIFICATION SHEET

Last Name: COULIBALY

First Name: Bakary

Tel: (00223)74057319

E-mail: boua9c6@gmail.com

Title: Polymorphism of the *PfK13* gene and mutations associated with parasite clearance delay in the localities of Missira and Sélingué in 2016.

Academic Year: 2018-2019

City of defense: Bamako-Mali

Place of deposit: Library of Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology

Focus area: Molecular Parasitology, Public Health, Pharmacology.

ABSTRACT

The emergence of artemisinin derivative resistance and its partner molecules in western Cambodia is threatening recent progress in controlling and eliminating malaria globally. The polymorphism of mutations of the *PfK13* gene is of paramount importance, hence the purpose of this study, which was to examine the polymorphism of the *PfK13* gene and the mutations associated with parasitic clearance delay in the Missira and Sélingué localities. 2016. This was a double-arm, open-label, double-arm, prospective, randomized study (ASAQ from NOVARTIS, a pharmaceutical firm called DENK and Coartem). One group received ASAQ (artesunate + amodiaquine) and the other Coartem® (artemether + lumefantrine) according to a well-established code. Blood samples taken from filter paper were used for DNA extraction by the Qiagen kit (according to the manufacturer's instructions).

A total of 480 children were included in the study and all had parasitaemia ranging from 2000 to 199,999 parasites per microliter of blood.

Confirmation of malaria access was made by PET-PCR. The detection of mutations on the *Pfk13* gene was carried out by sequencing (Sanger sequencing). It was performed in 309 patients. After sequencing the Propeller domain of the *Pfk13* gene, we obtained transient and non-silent mutations. For positions 469, 613 and 503 the mutations obtained were silent and are currently not known to be associated with parasite clearance delay, CTA resistance. We also found three (3) transient mutations in our study at position 493 (493Y), which could be evidence of the drug pressure generated by ACTs that are widely used today. We also found two mutations that are new in Africa, these are positions 491 and 548. The non-silent

mutation obtained was at position 578 (578S) but is not currently known to be associated with the artemisinin resistance.

Key words: Plasmodium falciparum, Pfmdr1, Pfk13, mutation, CTAs, PET-PCR, Missira, Sélingué, Sequencing and Malaria

SERMENT DE GALIEN



CLAUDE 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!