



ANNEE UNIVERSITAIRE 2021-2022

THESE DE PHARMACIE

Evaluation de l'efficacité *in vivo* de la pyronaridine-artésunate dans le traitement du paludisme non compliqué à Faladjè, cercle de Kati au Mali

Présentée et soutenue publiquement le lundi 26 Septembre 2022 à 10h00 devant le
Jury de la Faculté de Pharmacie(FAPH) par

Mme CISSE Fatoumata

Pour l'obtention du grade de docteur en Pharmacie (diplôme d'état)

JURY

PRESIDENT DU JURY :

Professeur Amagana DOLO

MEMBRES DU JURY :

Professeur Kassoum KAYENTAO

Docteur Seydina S.A DIAKITE

CO-DIRECTEUR DE THESE :

Docteur Antoine DARA

DIRECTEUR DE THESE :

Professeur Abdoulaye DJIMDE

DEDICACES ET REMERCIEMENTS

DEDICACES

- Grâce et reconnaissance éternelles à **DIEU !!**

Le tout puissant, le Clément et le Très Miséricordieux, souverain en tout. De qui tout provient et vers qui tout retourne. Merci de m'avoir donné la vie, la santé et la patience sans quoi ce travail n'aurait pas eu lieu.

- **Au prophète Mohamed** : Rassouloulahi (Paix et Salut sur Lui)
- **En la mémoire de mes parents génétiques : Feu Kolla CISSE et Feu Mariam DIAKITE**

Vous m'avez donné la vie, j'aurais tant aimé vous rendre fiers de moi par ce travail mais tout ce que DIEU fait est irréprochable car il est bonté. Vous resterez à jamais encrés dans mon cœur et dans mes souvenirs, je n'ai plus peur d'affronter cette vie pleine d'obstacles car désormais j'ai deux anges bienveillants qui illumineront toujours mon chemin. Dormez éternellement en paix et que DIEU vous garde dans son paradis AMINE !!

- **A ma tendre mère Kadiatou DIAKITE et mon tendre père Madani SANOGO**

Vous êtes mes modèles de vie pour toujours, mon support sur terre. Être parent est une science de la vie dont vous êtes les savants, par amour vous avez fait de nous les plus heureux des enfants. Éduquer est un art donc vous êtes les artistes de ma belle vie, vous m'avez appris le sens de l'honneur, de la dignité, de l'humilité, de la morale, de la justice et du pardon. Ce travail est le fruit de votre soutien et accompagnement inconditionnels depuis le début jusqu'à nos jours, je prie l'Eternel pour qu'il vous accorde une bonne santé et une longue vie à mes côtés afin de vous rendre chaque jour fiers de moi.

- **A ma chère confidente, amie de tous les temps et avant tout sœur Oumou Madani SANOGO**

Toi seule me connais mieux que quiconque dans cette vie, si mon parcours sur cette terre venait à être résumé en un livre tu en serais certainement l'unique auteure. Tu as toujours été là pour moi quand et où il le fallait. Depuis notre belle enfance, ça toujours été toi et moi contre les autres, que le tout PUISSANT amplifie davantage nos liens sacrés j'espère de tout cœur que dans le futur nos enfants prendront exemple sur nous.

- **A mes oncles Siacka DIAKITE et Madou DIAKITE, à mes tantes Aicha et Mah**

Grand merci à vous pour vos conseils, vos encouragements et vos prières. Que DIEU vous accorde une bonne santé et une longue vie pieuse AMINE !

- **A mes chers sœurs et frères, cousins et cousines**

Moussa CISSE, Nana CISSE, Souleymane KONE, Lavieille DIAKITE, Lili DIAKITE, Noura DIAKITE, Alassane DIAKITE, Ballan DIAKITE :

Merci à tous pour votre présence et soutien sans faille, puisse DIEU garder intacte notre belle fraternité à jamais AMINE !

- **A tous nos regrettés de nos familles :**

Qu'ALLAH par sa miséricorde vous accueille dans sa noble demeure du Paradis AMINE !
Vous resterez toujours dans nos cœurs.

- **A mes amis(es) d'enfance et camarades du cursus éducatif particulièrement à Siaka COULIBALY, Kamissa Sékou SAMAKE, Souleymane MAIGA, Moussa KANE, Alima A DIARRA, Fatoumata KEITA, Baba KOITA, Bintou NIANGALY, Fatoumata FOMBA, Moussa SIDIBE, Bo DIALLO, Makan SISSOKO, Zeynab Colète TOGOLA, Awa GASSAMBE, Djenèba HAIDARA, Toumani SANGARE, Abdoulaye TOGOLA, Marie B COULIBALY, Lamine SANOGO , Aïssa TEMBELY, Sidi Mohamed KONE, Yahaya KEITA, Abdoulaye SANGARE, Nana Kadidia TOGOLA, Cheick Tidiane DIAKITE et mon tendre Sinnignon Loïc Junior AKPLOGAN :**

Que de belles personnes avec de belles âmes, vous m'avez rendue cette vie chaque jour plus agréable et amusante malgré les moments difficiles. Je vous dédie ce travail. J'espère que l'éducation sociale que nous avons reçue des parents, nous servira de meilleur guide pratique dans notre vie.

Qu'ALLAH le Tout Puissant nous assiste et nous protège contre les méfaits de nos propres excès, AMINE !!

REMERCIEMENTS

- A toute la population de Faladjè, grand merci.
- Au Doyen de la Faculté de Pharmacie Boubacar Traoré
- Au corps professoral de la Faculté de Pharmacie, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu.
- Au personnel du MRTC/DEAP, pour votre disponibilité et votre franche collaboration.
- A nos maîtres du MRTC/DEAP, pour votre engagement et votre souci constant pour une formation de qualité.
- A l'équipe de l'unité de chimiorésistance du MRTC/DEAP : Particulièrement au Professeur Abdoulaye DJIMDE, aux Docteurs Antoine DARA, Mamadou TEKETE, Dinkorma OUOLOGUEM, Souleymane DAMA, Amadou NIANGALY, Bakary FOFANA, Sékou Sissoko, Nouhoum DIALLO, Nianwalou DARA, Amadou BAMADIO, Kadiatou HAIDARA, Diagassan DOUMBIA, Fatoumata I BALLO, Amadou DAOU, Fanta SOGORE, Bilaly TRAORE, Yacouba BARRE, Bintou DIARRA, Bassirou DIAKITE, aux biologistes Aliou TRAORE et Aboubecrin HAIDARA, aux internes Backoroba DIARRA, Djenèba DIALLO, Abdoul SAMAKE, Boi KONE, Souleymane KONE

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

Professeur Amagana DOLO, PharmD, PhD

- **Professeur titulaire de Parasitologie-Mycologie FAPH**
- **Directeur de l'École Doctorale des Sciences et des Technologies du Mali (EDSTM /USTTB)**
- **Coordinateur du D.E.S de Biologie Clinique**
- **Enseignant-Chercheur à la FAPH**

Cher maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Vos qualités d'homme de science dont la réceptivité facile à l'égard du cadet en manque d'expérience et en quête de savoir que nous sommes, votre gentillesse et votre modestie envers vos collègues et vos étudiants ont forcé l'admiration de tous.

Veillez recevoir ici cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance et notre considération !

Puisse DIEU vous accorder santé et longévité, AMINE !

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Professeur Kassoum KAYENTAO

- **Directeur de recherche en biostatistique/Santé publique**
- **Responsable adjoint de l'Unité paludisme et grossesse du MRTC**
- **Enseignant-Chercheur à la FMOS**

Cher Maitre nous sommes fiers de vous compter parmi nos juges. Votre disponibilité et votre abord facile nous ont tout de suite mis en confiance. Soyez remercié d'avoir accepté, sans réserve d'évaluer cette thèse à sa juste valeur et de nous faire part de vos pertinentes remarques.

Veillez recevoir notre profonde gratitude.

Que DIEU vous accorde santé et longévité, AMINE !

A notre Maître et juge

Docteur Seydina S.A DIAKITE

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

Cher Maître, nous avons eu l'honneur de vous associer à ce travail. Votre calme, votre simplicité, votre disponibilité font de vous un Maître aux qualités recherchées.

Veillez recevoir, cher maitre, l'expression de nos sincères remerciements.

Puisse DIEU vous accorder santé et longévité, AMINE !

A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR DE THESE

Docteur Antoine DARA, PharmD, PhD

- **Maître de Conférences en Biologie Moléculaire et Bio-informatique à la Faculté de Pharmacie**
- **Responsable du laboratoire de génomique du MRTC-Parasito**
- **Chercheur au MRTC Parasitologie**

Cher Maître, durant ce parcours à vos côtés, nous avons beaucoup appris de vos valeurs humaines et scientifiques. Votre savoir-faire dans la rigueur en tout point a forgé en nous courage et persévérance, cela a eu un impact positif sur notre travail.

Recevez donc l'expression de notre immense reconnaissance pour votre encadrement et votre accompagnement tout au long de ce travail dont nous en avons assez appris.

Puisse DIEU vous accorder santé et longévité, AMINE !

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

Professeur Abdoulaye DJIMDE, PharmD, PhD

- **Professeur titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FAPH**
- **Directeur du MRTC Parasitologie**
- **Chef de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance (MEDRU)**
- **Directeur du Programme DELGEME**
- **Membre de l'académie Africaine des sciences**
- **Membre de l'académie Malienne des sciences**

Cher Maitre, en cet instant solennel permettez-nous de vous témoigner tous les honneurs ressentis de nous savoir sous le mentorat et la responsabilité du chercheur émérite et humble que vous êtes. Nous espérons à travers ce travail refléter quelques éclats de transfert de savoir réussi aux jeunes, une idéologie qui vous tient tant et dont vous n'avez cessé de faire monter autour de vous.

Recevez ici cher Maitre toute notre gratitude et notre respect !

Puisse DIEU vous accorder santé et longévité, AMINE !

Liste des sigles et abréviations :

ADN	Acide désoxyribonucléique
ART	Artémisinine
AQ	Amodiaquine
ALT	Alanine AminoTransférase
AST	Aspartate AminoTransférase
BB	Bleu de Bromophénol
°C	Degré Celsius
CA1	Microsatellite CA1
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CI50	Concentration inhibitrice 50
CI90	Concentration inhibitrice 90
CO2	Dioxyde de Carbone
CHMP	Comitee for Medicinal Products for Human Use
Cm	Centimètre
CRF	Case Report Form
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
CPS	Chimio prévention du Paludisme Saisonnier
DHA	Dihydroartémisinine
DEAP	Département d'Épidémiologie des Affections Parasitaires
DHFR	DiHydroFolate Réductase
DHPS	DiHydroPtéroate Synthétase
dl	Décilitre
DNTPs	Désoxy Nucléotide Triphosphate
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
EDTA	Éthylène Diamine Tétra Acétique
ETP	Échec Thérapeutique Précoce
ETT	Échec Thérapeutique Tardif
ECT	Échec Clinique Tardif

EPT	Échec Parasitologique Tardif
FAPH	Faculté de Pharmacie
Fe	Fer
FMOS	Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie
G	Gramme
G6PD	Glucose-6 Phosphate Déshydrogénase
GPARC	Global Plan for Artemisinin Resistance Containment
H	Heure
Hte	Hématocrite
ICSH	International Council for Standardization in Haematology
IM	Intra Musculaire
IV	Intra Veineuse
IL-1	Inter-Leukine -1
Kg	Kilogramme
L	Litre
LAMP	Loop-mediated isothermal Amplification
LDH	Lactate Déshydrogénase
MRTC	Malaria Research and Training Center
MEDRU	Molecular Epidemiology and Drug Resistance Unit
mg	Milligramme
mmol	Millimole
ml	Millilitre
mmHg	Millimètre de mercure
MSP2	Merozoïte Surface Protein 2
µm	Micro Molaire
Mn	Minute
mM	Milli Molaire
nM	Nano Molaire
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
O₂	Dioxygène

P	<i>Plasmodium</i>
Poc	<i>Plasmodium ovale curtisi</i>
Pow	<i>Plasmodium ovale wallikeri</i>
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
PCT	Parasite Clearance Time
PCR	Polymerase Chain Reaction
PfATPase6	<i>Plasmodium falciparum</i> ATPase6
PfATP6769N	<i>Plasmodium falciparum</i> ATP6 769 N
PfK13	<i>Plasmodium falciparum</i> KELCH 13
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein 1
Pb	Paire de base
QBC	Quantitative Buffy Coast
RCPA	Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute medium
RSA	Ring Stage Survival Assay
RAVEC	Recensement Administratif à Vocation d ' Etat Civil
SLIS	Système local d'informations sanitaires
SP	Sulfadoxine-Pyriméthamine
SERCACa^{2+}	Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}
THb	Taux d'hémoglobine
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAS	Tension artérielle systolique
TPI	Traitement Préventif Intermittent
Tf	Trophozoites falciparum
TCP	Temps de la Clairance Parasitaire
UV	Ultra -Violet
USTTB	Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako
WANECAM	West African Network for Clinical Trials of Antimalarial Drugs

Table des matières :

I. INTRODUCTION	2
II. OBJECTIFS	6
II. 1. Objectif général	6
II. 2. Objectifs spécifiques.....	6
III. GENERALITES SUR LE PALUDISME	8
III. 1. Historique	8
III. 2. Cycle évolutif du <i>Plasmodium</i>	9
III. 2.1. Agents pathogènes.....	9
III. 2.2. Vecteurs.....	9
III. 2.3.a. La schizogonie hépatique	10
III. 2.3.b. La schizogonie endoérythrocytaire	11
III. 2.4. La phase sexuée chez le moustique.....	11
III. 3. Physiopathologie	12
III. 3.1. Accès palustre non compliqué	12
III. 3.2. Accès pernicieux	13
III. 4. Les manifestations cliniques	13
III. 4.1. Le paludisme de primo-invasion.....	14
III. 4.2. Accès de reviviscence	14
III. 4.3. Paludisme viscéral évolutif	14
III. 4.4. La fièvre bilieuse hémoglobinurique	14
III. 4.5. Le neuropaludisme et autres formes graves.....	15
III. 5. Resistance au paludisme.....	15
III. 6. Immunité anti palustre.....	16
III. 7. Diagnostic biologique	16
III. 7.1. Diagnostic direct	16
III. 7.2. Diagnostic indirect	17
III. 8. Les stratégies de lutte contre le paludisme au Mali	17
III. 8.1 Les mesures curatives.....	17
III. 8.2. Les mesures préventives.....	18
III. 9. Les antipaludiques.....	18

III. 9.1 Selon le mode d'action des antipaludiques	18
a. Schizonticides.....	18
b. Les gamétocytocides	19
c. Sporontocides	19
III. 9.2. Selon la structure chimique des antipaludiques	19
<i>Source</i> : Sulfadoxine C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S - PubChem (nih.gov)/.....	32
Modifié le 20-08-2022.....	32
III. 9.3. Autres antipaludiques : ce sont des antibiotiques	32
III.9.4. Les combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine	33
III. 10.1. Histoire de la Pyronaridine-Artésunate.....	33
III.10.2. Les caractéristiques de la Pyronaridine-Artésunate (86)	38
III.10.2.1. Nom de la combinaison thérapeutique :.....	38
III.10.2.2. Structures chimiques des deux substances actives de la combinaison thérapeutique	38
III.10.2.3. Mécanisme d'action :	38
III.10.2.4. Les formulations et la composition du Pyramax®.....	38
III.10.2.5. Pharmacocinétique :	39
III.10.2.6. Indication thérapeutique :.....	39
III.10.2.7. Posologie et mode d'administration :.....	39
III.10.2.8. Contre-indication :.....	40
III. 11. La résistance aux antipaludiques.....	40
III. 12. Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance	41
III. 12.1. Test <i>in vivo</i>	42
III. 12.1. 1. Avantages du test <i>in vivo</i>	42
III. 12.1. 2. Inconvénients du test <i>in vivo</i>	42
III. 12.2. Tests <i>in vitro</i>	42
III. 12.2.1. Tests optiques.....	42
III. 12.2.2. Nouveaux tests	43
III. 12.2.3. Avantages des tests <i>in vitro</i>	44
Les tests <i>in vitro</i> ont pour l'avantage :	44
III. 12.2.4. Inconvénients des tests <i>in vitro</i>	44

IV. METHODOLOGIE.....	46
IV. 1. Lieu d'étude	46
IV. 2. Le choix du lieu d'étude.....	46
IV. 3. Type d'étude.....	47
IV. 4. Période de l'étude.....	47
IV. 5. Population d'étude	47
IV. 6. Échantillonnage et taille de l'échantillon.....	47
IV. 7. Considérations éthiques	47
IV. 8. Critères d'inclusion et de non-inclusion	47
IV. 8.1. Critères d'inclusion	47
IV. 8.2. Critères de non-inclusion	48
IV. 9. Critères de jugement de l'efficacité thérapeutique <i>in vivo</i>	48
IV. 9.1. Principaux critères d'évaluation	48
IV. 9.1.1. L'échec thérapeutique précoce (ETP).....	48
IV. 9.1.2. Echec clinique tardif	48
IV. 9.1.3. Echec parasitologique tardif.....	49
IV. 9.1.4. Réponses clinique et parasitologique adéquate	49
IV. 10. Méthodes de collecte des données	49
IV. 10.1. Collecte des données démographiques et cliniques	49
IV. 10.2. Données biologiques	50
IV. 10.2.1. Goutte épaisse	50
IV. 10.2.2. La confection des confettis	51
IV. 10.2.3. Etude hématologique (107).....	51
IV. 11. Traitement	52
IV. 12. Correction moléculaire de la réponse thérapeutique.....	53
IV. 12. 1. Principe de la PCR classique :	54
IV. 12.2. Extraction de l'ADN plasmodial sur les lames des patients.....	54
IV.12.2.1. Matériels et réactifs :.....	54
IV.12.2.2. Mode opératoire :.....	54
IV. 12.3. Amplification de l'ADN plasmodial :.....	55
IV. 12.3.1. Matériels :.....	55

IV.12.3.2. Préparation des réactifs de PCR :.....	55
IV.12.3.3. Techniques d'amplification de <i>m</i> sp2, <i>Cal</i>	55
IV. 12.4. Révélation de l'ADN à la photographie :	60
IV. 12.4.1. Matériels :.....	60
IV. 12.4.2. Réactifs et préparation pour la révélation de l'ADN :	60
IV.12.4.3. Interprétation des résultats <i>m</i> sp2 et <i>Cal</i> :.....	61
IV. 13. Analyse et gestion des données.....	62
V. 14. Contrôle de qualité des lames réalisées sur le terrain et des gels d'électrophorèse	62
RESULTATS	63
V. RESULTATS	64
V. 1. Profil de l'étude PYRAMAX.....	64
V. 2. Caractéristiques de base à l'inclusion	64
V. 3. Efficacité thérapeutique <i>in vivo</i> avant la correction moléculaire.....	66
V. 6. Le temps de la clairance parasitaire	68
V. 7. La clairance des densités parasitaires en fonction du temps	68
V. 8. La clairance des parasites à J3 post traitement.....	69
V. 9. La clairance de la fièvre	70
Figure 20 : Dynamique de de la fièvre au cours du suivi	70
V. 10. Evolution de l'anémie durant le traitement à la Pyronaridine-Artésunate	70
V.12. Evolution des symptômes cliniques sous traitement.....	71
VI. COMMENTAIRES ET DISCUSSION	74
VII. CONCLUSION.....	79
VIII. RECOMMANDATIONS	81
IX. REFERENCES.....	83

Liste des figures

Figure 1: Anopheles gambiae.....	10
Figure 2: Cycle de développement du Plasmodium particulièrement de falciparum chez l'homme et le moustique	12
Figure 3: Structure de la Quinine	19
Figure 4 : Structure de la Méfloquine	21
Figure 5 : Structure de la Luméfantrine	22
Figure 6: Structure de la Pyronaridine	23
Figure 7 : Structure de la Primaquine.....	24
Figure 8: Structure du Proguanil	26
Figure 9: Structure de la Pyriméthamine	27
Figure 10: Structure de l'artémether	28
Figure 11: Structure de l'artésunate	29
Figure 12: Structure de la dihydroartémisinine.....	29
Figure 13: Structure de la Sulfadoxine.....	32
Figure 14: Procédure d'adoption de l'opinion scientifique par le CHMP par la procédure de l'article 58 de Pyramax®.....	35
Figure 15: La localisation géographique du village de Faladjè	46
Figure 16:Diagramme du Flux récapitulatif des inclusions	64
Figure 17: Photo du gel de Ca1 (A) et msp2 (B)	67
Figure 18: Distribution de la demi-vie de clairance parasitaire	68
Figure 19: Dynamique de de la fièvre au cours du suivi	70
Figure 20: Clairance des parasites à J3 post traitement	69
Figure 21:Evolution de la gamétocytémie au cours du suivi	71
Figure 22: Tendance à la réduction du taux de l'anémie suite au traitement	70
Figure 23: Evolution des symptômes cliniques après traitement.....	72

Liste des tableaux

Tableau I : Posologie de la pyronaridine-artésunate	53
Tableau II : Mélange réactionnel pour un volume final de 25 µl (MSP2) première amplification.	56
Tableau III: Mélange réactionnel pour un volume final de 25 µl (MSP2) deuxième amplification	57
Tableau IV: Programme de la première amplification MSP2.....	57
Tableau V : Programme de la deuxième amplification MSP2.....	58
Tableau VI: Mélange réactionnel pour un volume final de 25µl (Ca1) première amplification.....	58
Tableau VII : Mélange réactionnel pour un volume final de 25 µl (Ca1) deuxième amplification	59
Tableau VIII: Programme du microsatellite Ca1 première amplification.	60
Tableau IX: Programme de la deuxième amplification Ca1 :.....	60
Tableau X: Caractéristiques démographiques et cliniques de base	65
Tableau XI: Réponse clinique et parasitologique brute à J28 post traitement....	66
Tableau XII: Réponse clinique et parasitologique corrigée à J28 post traitement	67
Tableau XIII : Résumé du temps nécessaire pour éliminer 50%, 90%, 95% et 99% de la parasitémie (heures)	69

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Le paludisme ou malaria est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante, potentiellement mortelle due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Il est transmis à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique, l'anophèle femelle de la famille des Culicidés et du genre *Anopheles*. Chez l'homme, le paludisme est causé par six espèces qui sont (1): *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium knowlesi*. Ces espèces sont réparties dans différentes régions dans du monde. *Plasmodium falciparum* le plus virulent est également l'espèce prédominante en Afrique. *Plasmodium malariae* est présente principalement en Afrique subsaharienne et au Sud-Ouest du Pacifique. *Plasmodium vivax* est le parasite le plus largement répandue dans le monde. *Plasmodium ovale* comprend deux sous-espèces distinctes qui sont *P. ovale curtisi* (Poc) et *P. ovale wallikeri* (Pow). *Plasmodium knowlesi* est retrouvé en Asie du Sud.

L'OMS dans son rapport de 2021 fait état de 241 millions de cas de paludisme dans le monde dont 627 000 décès (2). La région Afrique de l'OMS continue d'enregistrer la majeure partie de cette hausse avec 95 % de tous les cas de paludisme (228 millions de cas) ; 96 % de tous les décès dus au paludisme (602 000 décès) ; 80 % de tous les décès dus au paludisme dans la région concernent des enfants de moins de 5 ans (3).

Au Mali le Système local d'informations sanitaires (SLIS) a enregistré 2 666 266 cas de paludisme en 2020, dont 843 961 cas graves et 1 708 décès. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes restent les couches les plus affectées.

Malgré les efforts internationaux (OMS) et nationaux (PNLPs), le paludisme demeure toujours un problème de santé publique dont les effets sont particulièrement visibles avec un impact socioéconomique très préoccupant. Avec l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTAs) depuis l'année 2000(4), le monde a enregistré d'énormes succès contre le paludisme. Dès lors l'OMS a recommandé les CTAs comme médicaments de référence pour le traitement du paludisme non compliqué (4,5). Leur utilisation généralisée a fortement contribué à la diminution drastique de la mortalité liée au paludisme permettant ainsi à de nombreux pays endémiques de tendre vers l'élimination du paludisme. Cependant, après quelques années d'utilisation des CTAs, les premiers cas de résistance à l'Artémisinine et à ses dérivés furent observés avec un retard de clairance parasitaire, notamment, au niveau de la frontière Cambodgio-Thaïlandaise (6). Ainsi, en 2009, Dondorp et al. ont rapporté la

preuve d'un retard de clairance parasitaire avec l'Artésunate à Pailin, dans l'ouest du Cambodge, et à Wang Pha, dans le nord-ouest de la Thaïlande (7). Également, Phyo et al. ont constaté un allongement considérable du temps de clairance parasitaire entre 2001 et 2010 avec l'Artésunate en Thaïlande (8). La perte de l'efficacité des CTAs en Afrique aurait des conséquences dramatiques en termes de santé publique et provoquer l'accroissement des coûts économiques du paludisme ainsi que l'apparition et/ou la diffusion rapide de la résistance aux molécules partenaires des CTAs à savoir la Luméfantrine, l'Amodiaquine, la Méfloquine, la Sulfadoxine-Pyriméthamine, la Pipéraquline et la Pyronaridine (9).

Face à cette menace, des initiatives mondiales furent envisagées pour développer de nouveaux médicaments partenaires afin de protéger les dérivés de l'Artémisinine dans les CTAs. C'est dans cette optique qu'une nouvelle CTA, la Pyronaridine-Artésunate (PYRAMAX) a vu le jour. Elle fut la première CTA à avoir obtenu un avis positif en 2012 de l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) en vertu de l'article 58 (10) ainsi qu'à être inscrite sur la liste des médicaments pré-qualifiés de l'OMS indiquée dans le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* et *P. vivax* chez les adultes et les enfants de 5 kg et plus (11) indication élargie en Novembre 2015(12). Malgré qu'elle ne soit pas à nos jours recommandée par l'OMS, le Pyramax a prouvé son efficacité et son innocuité dans les pays hyper endémiques où les autorités compétentes nationales l'ont autorisé à travers des études cliniques menées en Afrique et en Asie (13–16).

Depuis 2002, les CTAs sont sur le marché malien. Quant au Pyramax, en 2015 le Mali a activement participé aux essais cliniques de phase IIIb/IV à travers le projet WANECAM (13) portant sur l'efficacité et l'innocuité de la nouvelle CTA avec des sous études. Les résultats de ces études ont révélé que la combinaison Artésunate-Pyronaridine était efficace contre le paludisme non compliqué à *P. falciparum* et fut proposé comme une alternative de retraitement dans les cas de multi résistances du parasite face aux autres antipaludiques (11).

Afin de lutter contre l'émergence de la résistance aux dérivés de l'artémisinine, l'OMS dans sa politique a mis en place en Janvier 2011 un plan spécifique GPARC (Global Plan for Artémisinine Resistance Containment) dont deux des objectifs consistent en la surveillance de l'efficacité des antipaludiques et en la recherche sur la résistance aux dérivés de l'Artémisinine(17). Cette surveillance doit cependant être maintenue et renforcée. Au Mali, le Pyramax est la dernière CTA à avoir l'autorisation de mise sur le marché au Mali. Donc, il serait important d'évaluer son efficacité dans différentes localités du Mali. Basée sur les études antérieures (Sagara et al., 2016), notre hypothèse était que la Pyronaridine-Artésunate a

une efficacité non corrigée supérieure à 92% pendant un suivi de 28 jours. C'est dans cette optique que nous avons mené une étude prospective afin d'évaluer l'efficacité du Pyramax sur un de nos sites d'étude de Faladjè où l'infection à *P. falciparum* est prédominante.

OBJECTIFS

II. OBJECTIFS

II. 1. Objectif général

Evaluer l'efficacité de la Pyronaridine-Artésunate dans le traitement du paludisme non compliqué chez la population âgée de 6 moins et plus à Faladjè, Kati.

II. 2. Objectifs spécifiques

1. Déterminer la réponse clinique et parasitologique adéquate de la combinaison Pyronaridine-Artésunate à 28 jours de suivi avant et après la correction moléculaire ;
2. Mesurer le temps de la clairance parasitaire après traitement à la combinaison Pyronaridine-Artésunate ;
3. Mesurer le temps de la clairance de la fièvre après traitement à la combinaison Pyronaridine-Artésunate ;
4. Déterminer l'association entre le traitement à la Pyronaridine -Artésunate et l'anémie ;
5. Déterminer le taux de portage des gamétocytes chez les sujets traités au cours du suivi après traitement à la Pyronaridine- Artésunate.

GENERALITES SUR LE PALUDISME

III. GENERALITES SUR LE PALUDISME

III. 1. Historique

Le paludisme est une maladie qui touche non seulement les humains mais aussi certains animaux. Malgré les efforts mondiaux pour son éradication, il continue de ôter de nombreuses vies humaines quelle que soit leur race ou leur origine(18) ainsi sur les économies, ce qui constitue un véritable fléau pour les pays en développement. Le paludisme (du latin *paludis* qui signifie marais), appelé aussi **malaria**, est une parasitose due à un protozoaire transmis par la piqûre de la femelle d'un moustique, l'anophèle, qui provoque des fièvres intermittentes(19). Les écrits rapportés de différentes périodes de notre longue histoire indiquent que le paludisme a été présent dans la plupart des grandes civilisations humaines, même les plus anciennes. L'apparition de la maladie pourrait remonter à l'origine même de l'homme en Afrique, avant de s'étendre vers l'Europe et l'Asie(20). L'origine de la maladie est peu documentée mais selon les fouilles archéologiques, l'expansion du paludisme concorderait avec l'apparition de l'agriculture (21). C'est au IV^e siècle avant J.C que Hippocrate a réalisé ses premières descriptions cliniques des fièvres palustres en évoquant la triade classique **frissons-sueur-fièvre** selon des séquences quotidiennes, tierces ou quartes. Quelques années plus tard, les Grecs et les Romains ont révélé une corrélation étiologique entre les fièvres intermittentes et la proximité de marécages (21). Il a fallu attendre le 06 novembre 1880 pour qu'un médecin de l'armée française Alphonse Laveran découvre la cause du paludisme à l'hôpital militaire de Constantine (Algérie) et reçoit ainsi le Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1907 (18), il décrit en ces mots les éléments qu'il observa « *des corps sphériques, de volume variable, pigmentés, doués de mouvements amiboïdes, et des corps en croissant pigmentés* » dès lors il n'eut plus aucun doute qu'il s'agissait de parasites, il confirma la nature parasitaire de ces éléments en 1880 à l'hôpital militaire de Constantine après découverte dans le sang d'un malade atteint de paludisme des *éléments filiformes* ressemblant à des *flagelles* qui s'agitaient avec une grande vivacité, en déplaçant les hématies voisines. C'est ainsi qu'il appela le parasite *Oscillaria malariae* puis nommé *Plasmodium* en Italien (22). Il faut cependant souligner que son prédécesseur Ronald Ross qui reçut le même honneur cinq ans plus tôt avait déjà prouvé que la transmission du paludisme chez les oiseaux était due à un moustique et que les moustiques (anophèles) étaient les vecteurs de la malaria (18). En 1898, Grassi décrivit le cycle de transmission complet du parasite et prouva que le paludisme est transmis à l'homme par des moustiques du genre Anophèles (23). Successivement, furent mis en évidence les espèces *P. falciparum* (Welch,

1897) ; *P. vivax* (Grassi et Leletti, 1890) ; *P. malariae* (Laveran, 1891) et *P. ovale* (Stephens, 1992). La phase de division dans le foie précédant la phase érythrocytaire a été décrite en 1947 par Henry Shortt et Cyril Garnham (24). Trente ans après William Trager et J.B. Jensen développèrent une technique de culture en continue des parasites responsables du paludisme (TRAGER et JENSEN, 1976). Ainsi la séquence complète du génome de *Plasmodium falciparum* fut élucidée en 2002 (25).

III. 2. Cycle évolutif du *Plasmodium*

Le cycle du *Plasmodium* est assez complexe et nécessite deux hôtes à savoir :

- ✓ Un hôte intermédiaire l'homme chez qui s'effectue la totalité du cycle asexué ou schizogonique, se déroulant lui-même en une phase intra hépatique ou schizogonie hépatique et une phase intra-érythrocytaire ou schizogonie endo érythrocytaire.
- ✓ Un hôte définitif et vecteur, le moustique chez qui s'effectue le cycle sexué ou phase sporogonique.

III. 2.1. Agents pathogènes

Les parasites du paludisme sont des protozoaires unicellulaires appartenant au phylum des *Apicomplexa* (sporozoaires). Ils se développent autant chez l'homme (multiplication asexuée) que chez le moustique (multiplication sexuée). Les plasmodies changent sans cesse de formes et de taille selon les stades du cycle évolutif (26). Le paludisme est la conséquence de l'infection par l'une ou plusieurs des espèces plasmodiales suivantes (27):

- ✓ *Plasmodium falciparum*, responsable de la fièvre tierce maligne,
- ✓ *Plasmodium vivax*, responsable de la fièvre tierce bénigne avec une distribution plus étendue que *P. falciparum*, sauf en Afrique subsaharienne,
- ✓ *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* responsables de la fièvre tierce bénigne,
- ✓ *Plasmodium malariae*, responsable de la fièvre quarte bénigne,
- ✓ *Plasmodium knowlesi*, responsable du paludisme du singe, a été retrouvée comme infection humaine à fièvre irrégulière dans quelques pays d'Asie du sud-Est.

III. 2.2. Vecteurs

La transmission du paludisme à l'homme est assurée par l'anophèle femelle qui a une activité maximale comprise entre le crépuscule et le petit matin. Ainsi l'intensité de la transmission est dépendante des facteurs liés au parasite, au vecteur, à l'hôte humain et à l'environnement (28). En Afrique trois principales espèces de moustiques sont incriminées dans la transmission du paludisme à l'homme qui sont : *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles*

funestus (29).



Figure 1: *Anopheles gambiae*

Source : *Anopheles gambiae* — Wikipédia (wikipedia.org)

III. 2.3 La phase asexuée chez l'homme

III. 2.3.a. La schizogonie hépatique

Il s'agit du cycle de reproduction asexuée qui se déroule dans les hépatocytes parasités (27). Le cycle commence par la pique de l'anophèle femelle, qui via ses glandes salivaires inocule le plasmodium à l'homme sous forme de sporozoïtes(30), cellules infectantes caractéristiques de tous les sporozoaires. Les sporozoïtes se dirigent ensuite vers le foie via le système vasculaire en traversant le tissu endothélial pour infecter les cellules hépatiques et enclencher une prolifération(31), d'autres siègent dans le foie pendant des mois voire même des années prenant ainsi le nom de hypnozoïtes avant de migrer dans la circulation sanguine. C'est la phase hépatique qui conduit à la production de plusieurs schizontes par hépatocyte. L'éclatement de l'hépatocyte qui devient de plus en plus gros par le Schizonte va libérer de nombreux *mérozoïtes* qui migreront via la voie sanguine vers les hématies. Cette phase est asymptomatique et varie en durée d'une espèce à une autre. Les *sporozoïtes* de *P. vivax* et *P. ovale* peuvent rester à l'état de dormance dans les hépatocytes sous la forme *d'hypnozoïtes* pendant des mois voire même des années avant de se développer(32).

III. 2.3.b. La schizogonie endoérythrocytaire

Les *mérozoïtes*, une fois dans le sang pénètrent dans les érythrocytes et initient une réplication asexuée pendant laquelle le parasite se nourrit de la cellule hôte, insère ses protéines dans la paroi érythrocytaire et détoxifie les produits de dégradation de l'hémoglobine en hémozoïne lui permettant ainsi de se développer en *trophozoïtes* « ring » puis en *schizontes* matures ou *corps en rosace* après maturation. Ainsi la rupture de la membrane du globule rouge par le *Schizonte* mature libère des *mérozoïtes* qui réinfectent rapidement des hématies saines. Cette étape dure 48 Heures pour le *P. falciparum*, le *P. vivax* et le *P. ovale*, 72 Heures pour le *P. malariae* et 24 Heures pour le *P. knowlesi*. Sous l'influence de facteurs de stress, apparaissent dans les hématies des formes sexuées : les gamétocytes mâles et femelles(33).

III. 2.4. La phase sexuée chez le moustique

Pendant le cycle sanguin asexué, certains mérozoïtes se différencieront en formes sexuées appelées gamétocytes (27) . L'anophèle femelle lors de son repas sanguin sur un paludéen absorbe des *trophozoïtes*, des *schizontes*, des *rosaces*, et des *gamétocytes*. Les éléments asexués sont digérés et seuls les gamétocytes ingérés poursuivent le cycle. Au niveau de l'estomac de l'insecte, les gamétocytes femelles évoluent en une macrogamète sans division nucléaire et le gamétocyte mâle subit une ex flagellation qui donne plusieurs gamètes mâles mobiles qui finiront par féconder les gamètes femelles. Il en résulte un zygote mobile appelé *ookinète*, qui après avoir traversé l'épithélium intestinal, s'arrête sur la face externe du gastre, devient *oocyste*. Les oocystes se deviennent des *sporozoïtes* qui migrent dans les glandes salivaires où ils s'accumulent, rendant ainsi la femelle d'anophèle infectieuse prête à infecter un autre hôte humain. Généralement, chez l'anophèle l'ensemble du cycle se déroule en 10 à 20 jours, suivant la température et l'espèce plasmodiale en cause (34).

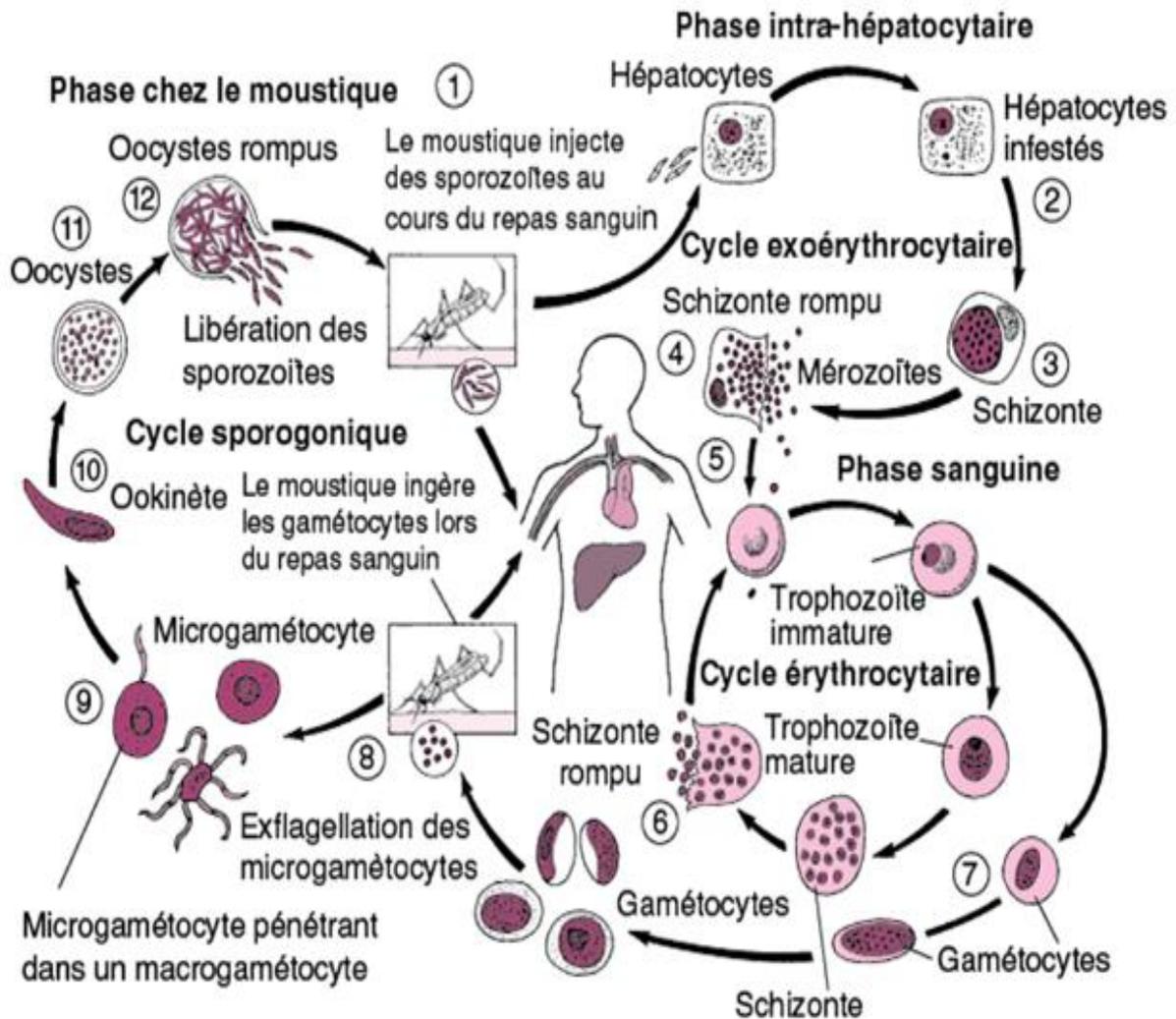


Figure 2: Cycle de développement du *Plasmodium* particulièrement de *falciparum* chez l'homme et le moustique

Source : <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> visité le 24-08-20

III. 3. Physiopathologie

Bien que son impact dans certains organes ait été clairement défini, la physiopathologie du paludisme reste encore jusqu'à nos jours incomplètement compris. Elle peut être divisée en accès palustre non compliqué et en accès pernicieux.

III. 3.1. Accès palustre non compliqué

Les symptômes du paludisme commencent à se développer à partir du stade intra érythrocytaire du cycle de développement du parasite. La fièvre, principal symptôme de l'accès palustre non compliqué est due à l'éclatement des rosaces qui libèrent dans le torrent circulatoire du pigment malarique (hémozoïne) ; celui-ci se comporte comme une véritable substance pyrogène. L'éclatement des rosaces conduit à la lyse des hématies ce qui peut

contribuer à l'anémie. Le foie intervient par l'activité phagocytaire des cellules de Kuppfer, et par la transformation de l'hémoglobine libérée en bilirubine libre, d'où le subictère (35).

III. 3.2. Accès pernicieux

Défini selon l'OMS par la détection de formes asexuées du parasite sur un frottis sanguin et la présence d'au moins un des critères suivants (36):

- En clinique (prostration, troubles de la conscience, détresse respiratoire, convulsions répétées, collapsus pulmonaire, saignements anormaux, ictère, hémoglobinurie)
- Et en laboratoire (anémie sévère, hypoglycémie, acidose, insuffisance rénale, hyperlactémie, hyperparasitémie)

Seule l'espèce *Plasmodium falciparum* est responsable de l'accès pernicieux qui est essentiellement le résultat de la séquestration des hématies parasitées dans les vaisseaux au niveau des différents organes, en particulier du cerveau. IL y a donc une formation de rosettes par adhérence des hématies parasitées entre elles et avec des hématies saines. En effet, la présence de tubérosités (ou knobs), à la surface des hématies ralentit la circulation par des phénomènes d'auto agglutination et de cytoadhérence par des ligands réagissant avec des récepteurs des endothéliums vasculaires. Ceci provoque une anoxie, provoquant une obnubilation puis un coma fébrile. Cependant certaines hypothèses sont émises pour expliquer la physiopathologie du paludisme grave (37):

- Une augmentation de la perméabilité de la barrière méningée entraînant une fuite du liquide céphalorachidien et un œdème cérébral ;
- Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF et IL-1)
- Des phénomènes immuno-pathologiques avec dépôt d'immuns complexe ;
- Le phénomène de cytoadhérence de certaines souches de *Plasmodium falciparum* lié à la présence de protubérances particulières (knobs) qui les rendent adhérents aux cellules endothéliales des capillaires cérébraux et encombrent la lumière vasculaire (38).

III. 4. Les manifestations cliniques

Le paludisme et ses complications sont la résultante d'une cascade d'évènements physiopathologiques, influencés à la fois par le parasite et les facteurs liés à l'hôte (y compris l'immunité et les facteurs de susceptibilité génétiques). L'accès palustre à *P. falciparum* se présente dans la grande majorité des cas par un tableau infectieux non spécifique d'aspect pseudo-grippal caractérisé par de la fièvre, des frissons et des douleurs abdominales. Ces symptômes apparaissent au bout de 7 jours ou plus (généralement 10 à 15 jours) après la piqure infectante du moustique. Nous distinguons le paludisme de primo-invasion, l'accès de

reviviscence, l'accès pernicieux ou neuropaludisme, le paludisme viscéral évolutif et la fièvre bilieuse hémoglobinurique.

III. 4.1. Le paludisme de primo-invasion

Caractérisé par une fièvre allant de 39°C à 40°C, il s'accompagne de myalgie et de céphalées brutale. Cette fièvre diminue d'intensité (frisson et sueur) après quelque temps. Ces signes s'accompagnent souvent de petits troubles digestifs de type « embarras gastrique » (nausée, vomissement et/ou diarrhée). L'hémolyse se traduit souvent de façon différée par la pâleur, le sub-ictère ou l'hépto-splénomégalie.

Source : *Le paludisme simple : accès de primo-invasion à P. falciparum (123dok.net)*, consulté le 05-09-2022

III. 4.2. Accès de reviviscence

Il s'observe avec l'acquisition d'un certain degré d'immunité et correspond aux crises schizogoniques toutes les 48 heures (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*) ou 72 heures (*P. malariae*). Caractérisées par un grand frisson inaugural, une fièvre à 40°C durant quelques heures puis de sueurs profuses, les crises surviennent toutes les 48 heures (fièvre tierce) ou 72 heures (fièvre quarte) selon l'espèce en cause. La périodicité manque souvent en raison d'un poly parasitisme. Seule la fièvre tierce à *P. falciparum* est susceptible d'évoluer vers un paludisme cérébral (39).

III. 4.3. Paludisme viscéral évolutif

Il survient chez les sujets jeunes vivant en zones endémiques, insuffisamment ou non prémunis et se soumettant à une chimio prophylaxie incorrecte. La splénomégalie en est le signe majeur associée à une hépatomégalie. Les signes généraux (fébricule intermittente, asthénie, amaigrissement) et d'hémolyse (pâleur, ictère) sont très variables, allant d'une forme pauci symptomatique à une forme qui pourrait se confondre avec une leucémie(39).

III. 4.4. La fièvre bilieuse hémoglobinurique

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

III. 4.5. Le neuropaludisme et autres formes graves

P. falciparum est le plus souvent responsable de cette forme. Les sujets non immuns et les enfants de moins de 5 ans constituent sa couche de prédilection et sans traitement l'évolution se fait inéluctablement vers la mort (43). L'OMS a établi des critères qui, isolés ou associés, font poser le diagnostic du paludisme grave et compliqué permettant ainsi une meilleure prise en charge(44). Il s'agit de la présence des formes asexuées de *P. falciparum* dans le sang associé à l'un des signes suivants :

- Neuropaludisme : Score de Blantyre ≤ 2 ou score de Glasgow ≤ 9
- Troubles de la conscience : Score de Blantyre < 5 et > 2 ou score de Glasgow < 15 ou > 9
- Convulsions répétées >1 /24 heures
- Prostration : extrême faiblesse (incapacité de se tenir droit)
- Vomissements itératifs
- Syndrome de détresse respiratoire
- Ictère clinique
- Acidose métabolique : bicarbonates plasmatiques <15 mmol/L Lactatémie ≥ 5 mmol/L
- Anémie grave (Hb < 5 g/dl, Ht $<15\%$)
- Hyperparasitémie $\geq 4\%$ chez le sujet non immun, ou $\geq 20\%$ chez le sujet immun
- Hypoglycémie (glycémie $< 2,2$ mmol/L)
- Hémoglobinurie macroscopique
- Insuffisance rénale : diurèse < 400 ml/ 24h ou créatinémie $> 265\mu\text{M}$ chez l'adulte ; diurèse < 12 ml/ kg/ 24h ou créatinémie élevée pour l'âge chez l'enfant
- Collapsus circulatoire : Tension Artérielle Systolique < 50 mmHg avant 5 ans, TAS < 80 mmHg après 5 ans.
- Hémorragie anormale
- Œdème pulmonaire (radiologique).

III. 5. Résistance au paludisme

Il s'agit d'un état réfractaire d'origine héréditaire qui résulte de la présence chez l'homme d'une substance non favorable au développement du parasite ou de l'absence de récepteurs impliqués dans la pénétration du parasite dans les cellules hôtes. Les facteurs de cette résistance sont présents dans la membrane des érythrocytes ou à l'intérieur de ces cellules et s'observent généralement avec les cas de la drépanocytose, de thalassémies et du déficit en G6PD où il y a une inhibition du développement plasmodial (45–48).

III. 6. Immunité anti palustre

L'infection du plasmodium induit des réponses immunitaires de la part du système immunitaire regroupées en réponses pré-érythrocytaires généralement constituées de réponses cellulaires contre les hépatocytes infectés, qui inhibent le développement du parasite intracellulaire et en réponses érythrocytaires qui provoquent lors de l'invasion des hématies par des parasites des modifications importantes de leur surface membranaire, résultant de l'exposition de multiples molécules parasitaires. Chez les populations des régions où le paludisme est endémique, l'infection palustre induit de fortes réponses immunes humorales. Après plusieurs années d'infections répétées, l'homme peut acquérir une immunité appelée prémunition qui devient labile en l'absence de contacts fréquents entre l'être humain et le parasite (49,50).

III. 7. Diagnostic biologique

Actuellement, différentes méthodes diagnostiques du paludisme sont disponibles. Cependant, l'examen microscopique d'un frottis sanguin et d'une goutte épaisse demeure la méthode de référence (51) pour le diagnostic du paludisme dans les pays en développement et est surtout recommandé pour le suivi des sujets inclus dans le protocole OMS de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques. Le diagnostic est d'abord clinique puis confirmé par un diagnostic biologique afin de réduire l'utilisation des antipaludiques dans le traitement injustifié pour des fièvres non palustres (52). Ainsi un diagnostic précoce et un traitement efficace confèrent à une meilleure prise en charge des cas de paludisme.

III. 7.1. Diagnostic direct

Le diagnostic direct met en évidence le *Plasmodium* dans le sang circulant. Le sang est recueilli par ponction veineuse sur tube contenant un anticoagulant (EDTA) ce qui permet de multiplier les techniques diagnostiques avec le même prélèvement. C'est un diagnostic fiable regroupant les méthodes suivantes (53–55) : la goutte épaisse, le frottis sanguin, le quantitative Buffy Coat test (QBC), les tests de diagnostic rapide (tests immunochromatographiques), la technique LAMP et la PCR qui est plus spécialisée et coûteuse. Les étalements peuvent également être réalisés à partir d'un prélèvement capillaire par piqûre au bout du doigt ou du talon pour les bébés.

L'association goutte épaisse/ frottis mince reste la méthode de référence permettant l'identification et la quantification des espèces plasmodiales. C'est une technique de concentration qui consiste à étaler 5-10 μ L de sang (Goutte épaisse) au milieu d'une lame porte objet. Après séchage la lame est fixée au méthanol séché puis colorée ou GIEMSA

préparé à 10% (15-20 mn), puis la lecture est faite au microscope à l'objectif 100 en immersion. Ainsi le noyau du Plasmodium est coloré au rouge vif et le cytoplasme en bleu (51).

III. 7.2. Diagnostic indirect

Les méthodes de diagnostic indirect recherchent les anticorps dans le sérum du malade, indicateurs d'une infection antérieure (persistance des anticorps même après l'infection) elles sont donc sans valeur diagnostique réelle dans les zones d'endémie palustre. Parmi ces méthodes, il y a : l'immunofluorescence indirecte, l'hémagglutination passive et le test Elisa (55).

III. 8. Les stratégies de lutte contre le paludisme au Mali

III. 8.1 Les mesures curatives

Conformément aux recommandations de l'OMS, le Programme National de Lutte contre le Paludisme au Mali (PNLP) a établi des directives nationales pour la prise en charge des cas de paludisme(56).

✓ Pour le traitement du paludisme simple, les CTAs demeurent les plus efficaces car elles permettent de traiter efficacement le paludisme en 3 jours par voie orale. Sont indiquées :

- Artémether 20mg – Luméfantrine 120mg comprimé : 5kg à 34kg
- Artémether 80mg – Luméfantrine 480mg comprimé : ≥ 35 kg et adultes
- Artésunate 25mg –Amodiaquine 67.5mg comprimé : $\geq 4,5$ kg à <9 kg
- Artésunate 50mg –Amodiaquine 135mg comprimé : ≥ 9 kg à <18 kg
- Artésunate100mg –Amodiaquine 270mg comprimé : ≥ 18 kg et plus
- Dihydroartémisinine 20mg – Pipéraquline 160mg comprimé : 5kg à < 13 kg
- Dihydroartémisinine 40mg – Pipéraquline 320mg comprimé : 13kg à ≥ 75 kg
- Artésunate 20mg – Pyronaridine 60mg sachet : 5kg à < 20 kg
- Artésunate 60mg – Pyronaridine 180mg comprimé : 20kg à ≥ 65 kg

✓ Le traitement du paludisme grave et compliqué repose sur deux éléments essentiels à savoir le traitement d'urgence des complications et le traitement spécifique antipaludique avec :

- Artésunate injectable IV et IM
- Artémether injectable IM
- Quinine injectable IM ou IV en perfusion glucosée à 10%

Le traitement sera ensuite complété par voie orale avec une CTA dès que l'état du malade le permettra.

Dans les zones périphériques où le plateau technique ne permet pas la prise en charge du cas grave, un traitement pré transfert est sollicité qui consiste à administrer une première dose d'antipaludique efficace par voie parentérale ou rectale avant de transférer le malade dans une structure sanitaire pour une prise en charge.

III. 8.2. Les mesures préventives

Les mesures préventives permettent la protection soit contre l'infection soit contre le développement de la maladie chez les personnes infectées. Cependant dans le but de renforcer les mesures de prévention, de diagnostic et de traitement du paludisme l'OMS a recommandé en Octobre 2021 l'utilisation du vaccin antipaludique RTS,S/AS01 (RTS,S), recommandation fondée sur les résultats d'un programme pilote en cours au Ghana, au Kenya et au Malawi qui a permis d'atteindre plus de 800 000 enfants depuis 2019(57). Au Mali, les grands axes focaux de la lutte contre le paludisme recommandés par l'OMS sont(58) :

- La lutte antivectorielle : L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides, l'utilisation de bio larvicides pour la destruction des gîtes larvaires ; la pulvérisation intra domiciliaire ;
- Le Traitement Préventif Intermittent (TPI) avec la Sulfadoxine-Pyriméthamine pendant la grossesse entre le 4^{ème} mois et l'accouchement qui consiste à administrer chez les femmes enceintes six doses de SP pendant les deux derniers trimestres de la grossesse à raison d'une dose chaque mois.
- La Chimio prévention du paludisme saisonnier (CPSe) chez les enfants de 3 à 59 mois qui consiste à administrer quatre doses de SP et Amodiaquine (AQ) à un mois d'intervalle pendant la période de haute transmission (Juillet-Octobre-Novembre).

III. 9. Les antipaludiques

Les antipaludiques se présentent selon plusieurs classifications mais les plus classiques sont celles adoptées par l'OMS.

III. 9.1 Selon le mode d'action des antipaludiques

a. Schizonticides

La plupart des anti-malariques (antipaludiques) sont des schizonticides (ou schizontocides). Ils ont une action sur les formes asexuées endo-érythrocytaires. Ils suppriment (traitement curatif) ou préviennent (prophylaxie suppressive) l'apparition des symptômes(59,60). Les schizonticides comprennent un antipaludique naturel, la quinine et de nombreux antipaludiques de synthèse. Ce sont des lysosomotropes, des antimétabolites et des antibiotiques. On distingue

❖ **Les schizonticides sanguins** : ils attaquent directement les schizontes dans la circulation générale, empêchant ainsi l'infection des nouveaux globules rouges.

❖ **Les schizonticides tissulaires** : ils agissent surtout pendant la phase hépatique et peuvent de ce fait être utilisés en prophylaxie pour prévenir l'invasion sanguine des parasites (59).

b. Les gamétocytocides

Ils détruisent les formes sexuées des parasites, capables d'assurer la transmission de l'infection au moustique, permettant ainsi son interruption(59).

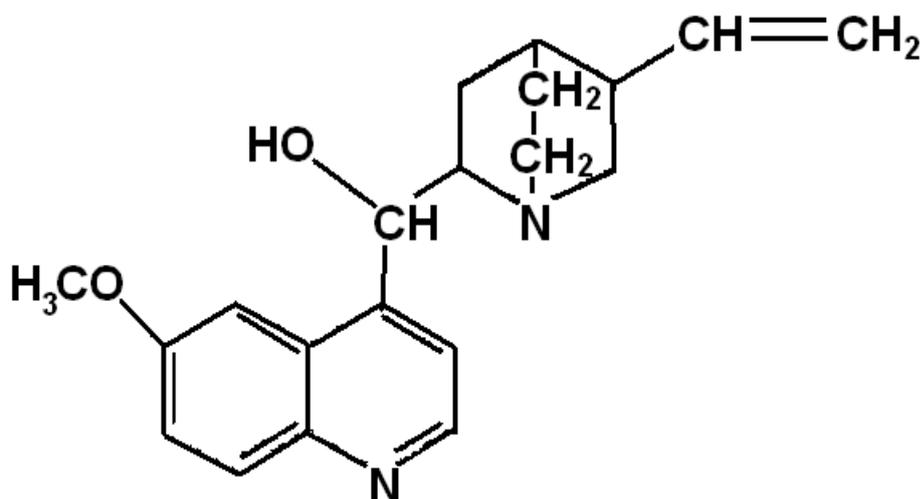
c. Sporontocides

Ils n'ont pas d'effet direct sur les gamétocytes présents dans le sang humain mais ils bloquent le cycle sporogonique chez le moustique(59).

III. 9.2. Selon la structure chimique des antipaludiques

❖ 4-méthanolquinoléine : (quinine, méfloquine et Luméfántrine) ; ces médicaments sont des schizonticides sanguins d'action rapide. La quinine et ses isomères agissent également contre les gamétocytes de la phase sanguine du *P. vivax* et *P. malariae*.

- Quinine : $C_{20}H_{24}N_2O_2$



L'Hydrate de methoxy-6 ethenyl-3 rubanol-9 ou méthyle cupréine

Source : Quinine.pdf /consulté le 23/08/2022

Figure 3: Structure de la Quinine

✓ **Mécanisme d'action :**

Comme pour tous les antipaludiques, le mécanisme d'action exact de la quinine garde encore quelques mystères. Ce produit se concentre dans le plasma et se fixe sur les hématies dans lesquelles il pénètre. Il intervient manifestement dans l'hématozoaire en s'intercalant dans l'ADN ; mais aussi sur plusieurs sites ce qui expliquerait la rareté des résistances. L'élément actif de la molécule est probablement le noyau benzénique, oxyquinoléique, que l'on retrouve dans les amino-quinoléines. La quinine bloque le cycle schizogonique au niveau des mérozoïtes libres dans le plasma ou encore des trophozoïtes avant leur transformation en schizontes. C'est un produit préconisé dans le traitement des accès palustres même en zone de chloroquinorésistance.

✓ **Formulation :**

Utilisée par voie orale, injectable ou rectale, la quinine est un antipaludique naturel (61)

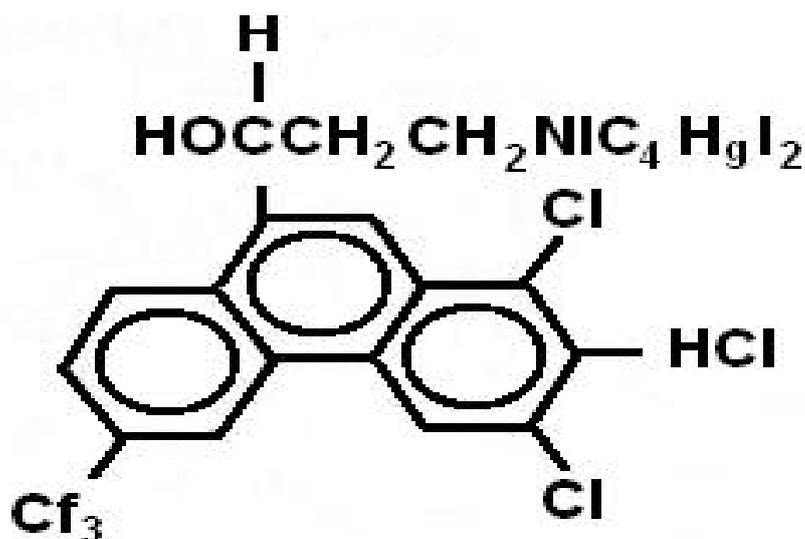
✓ **Pharmacocinétique :**

La quinine est rapidement et presque complètement absorbée par voie digestive ; le pic de concentration plasmatique est obtenu en une à trois heures. Près de 70 % de la quinine plasmatique sont liés aux protéines. La quinine est en majorité métabolisée en métabolite inactif par le foie. La quinine est éliminée dans les urines et disparaît presque totalement en 24 heures après l'arrêt du traitement. Le passage transplacentaire et les taux dans le lait sont faibles. De petites quantités pénètrent dans le liquide céphalorachidien. La pharmacocinétique de la quinine est caractérisée par une grande variabilité de l'absorption orale, de la liaison protéique, du volume de distribution et de la clairance métabolique (par le cytochrome P450 3A4) en fonction des individus, de la gravité et de l'évolution de la maladie. Le métabolisme conduit à un métabolite actif, la 3- hydroxy-quinine. En l'absence de dose de charge, l'état stable des concentrations plasmatiques n'est atteint qu'en 2 à 3 jours (62).

✓ **Utilisation :**

Elle peut s'utiliser par voie orale ou parentérale (IM ou IV). Elle reste le traitement d'urgence par excellence de l'accès pernicieux.

• **Méfloquine** : $C_{17}H_{16}F_6N_2O$



[2,8-bis(trifluoromethyl)quinolin-4-yl] -piperidin-2-ylmethanol

Source : Mefloquine | $C_{17}H_{16}F_6N_2O$ - PubChem (nih.gov) /

Modifié le 20-08-2022

Figure 4 : Structure de la Méfloquine

✓ **Mécanisme d'action :**

Leur mécanisme d'action est très proche de celui de la quinine en se fixant sur des phospholipides de la membrane érythrocytaire, et surtout à la ferriprotoporphyrine IX. Des récepteurs communs à la quinine, et sans doute à la chloroquine, pourraient rendre compte de certains retards d'efficacité de la méfloquine ou de l'halofantrine lorsque ces substances ont été préalablement administrées.

✓ **Formulation :**

Méfloquine (LARIAM®) : disponible uniquement en comprimé voie orale,

✓ **Pharmacocinétique :**

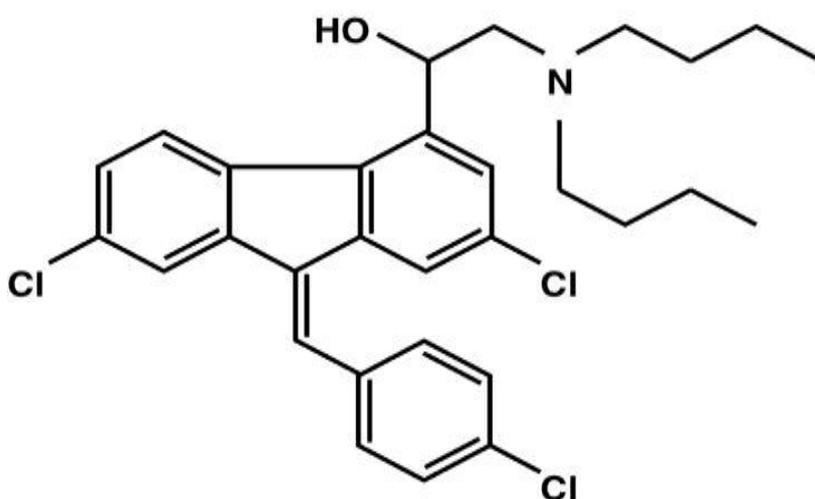
La méfloquine est une molécule très lipophile dont l'absorption est améliorée par la prise concomitante d'un repas riche en lipides. La méfloquine est liée à plus de 98 % aux protéines plasmatiques. Elle est métabolisée au niveau hépatique, notamment par le cytochrome P450 3A4, en dérivés inactifs. Sa demi-vie d'élimination moyenne est de 3 semaines. L'infection non compliquée ne modifie pas l'absorption de la méfloquine ; en revanche, le volume de distribution et la clairance sont diminués, ce qui explique que les concentrations soient plus élevées. Des résultats opposés ont été retrouvés dans un contexte d'infection sévère à P.

falciparum, avec une diminution des concentrations par rapport aux données décrites chez le volontaire sain. Néanmoins, toutes ces modifications pharmacocinétiques ne durent que quelques jours, le temps de guérir l'infection. Les concentrations de méfloquine diminuent en fin de grossesse. Chez l'enfant, les paramètres pharmacocinétiques sont proportionnels au poids corporel(63)

✓ Utilisation :

La méfloquine se présente sous forme de comprimés, utilisés en traitement curatif ou en chimio prophylaxie.

• Luméfantine : : $C_{30}H_{32}Cl_3NO$



2-(dibutylamino)-1-[(9Z)-2,7-dichloro-9

[(4chlorophényl)méthylidène]fluorène-4 yl]éthanol

Source : Lumefantrine | $C_{30}H_{32}Cl_3NO$ - PubChem (nih.gov)/

Modifié le 20-08-2022

Figure 5 : Structure de la Luméfantine

✓ Mécanisme d'action :

La luméfantine fait partie des amino-alcools qui sont de très bons schizonticides. Elle interagirait comme les autres amino-alcools avec une protéine membranaire du globule rouge (la stomatine) et serait transférée dans le parasite par une voie de recapture des phospholipides exogènes (64). Si le mode d'action des amino-4-quinoléines est connu, les bases moléculaires qui sous-tendent l'effet des amino-alcools ne sont pas encore totalement élucidées.

✓ Formulation :

Uniquement disponible sous forme de préparation orale dans laquelle elle est associée à l'artéméter : Comprimés contenant 20 mg d'artéméter et 120 mg de luméfantine.

✓ Pharmacocinétique :

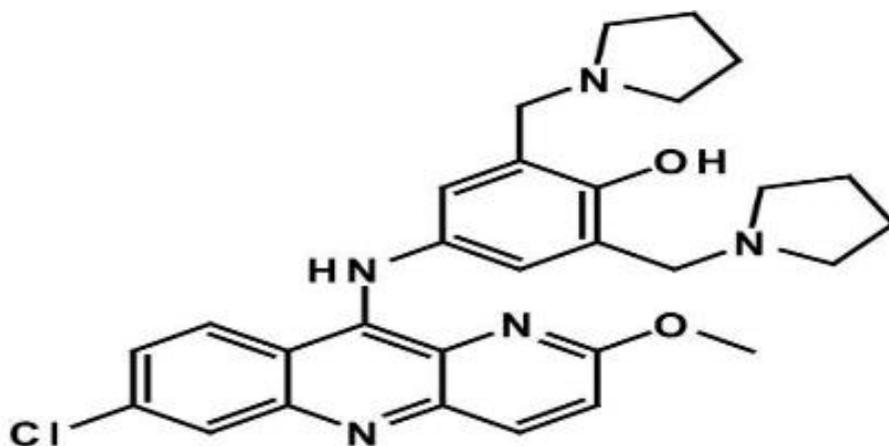
La biodisponibilité orale est variable et hautement dépendante de l'administration concomitante d'aliments gras (65)(66). L'absorption augmente de 108% après un repas et est plus lente chez les malades présentant un accès palustre aigu que chez les convalescents. Le pic des concentrations plasmatiques s'observe environ 10 heures après administration. Sa demi-vie d'élimination est d'environ 3 jours.

✓ Utilisation :

Elle est utilisée dans le traitement, le contrôle, la prévention, et l'amélioration du paludisme.

❖ **4-aminoquinoléines** : (chloroquine, amodiaquine et hydroxychloroquine, pyronaridine) ; ce sont des schizonticides sanguins d'action confrontée aujourd'hui à des résistances des parasites d'où leur abandon progressif au profit d'autres substances.

• Pyronaridine : $C_{29}H_{32}ClN_5O_2$



2-Methoxy-7-chloro-10-(3',5'-bis(pyrrolin-1-ylmethyl) -4'-hydroxyphenylamino) benzo(b)-1,5-naphthyridine

Source : Pyronaridine.pdf / Consulté le 23-08-2022

Figure 6: Structure de la Pyronaridine

✓ Mécanisme d'action :

La pyronaridine est le premier dérivé benzonaphthyridine synthétisé en 1970 en Chine. Pendant 30 ans elle fut utilisée en Chine pour le traitement du paludisme en monothérapie(67). Plus récemment l'intérêt accordé à la pyronaridine a été renouvelé comme

étant un partenaire possible des dérivés de l'artémisinine dans les CTAs. Elle existe sous la forme base et sel, agit par Inhibition de la topoisomérase II de l'ADN. L'action se fait au niveau de la vacuole digestive en inhibant la bio cristallisation de l'hème.

✓ Pharmacocinétique :

L'absorption après administration orale ou intramusculaire(67) de la pyronaridine est rapide et le temps de demi-vie plasmatique après des doses répétées est de $194.8 \pm 47,8$ h(68). Les concentrations plasmatiques de la pyronaridine sont dose dépendante. La demi-vie d'élimination de la pyronaridine a été estimée à 13,2 jours(67) chez les adultes atteints du paludisme et de 9,6 jours(69) chez les enfants.

✓ Formulation :

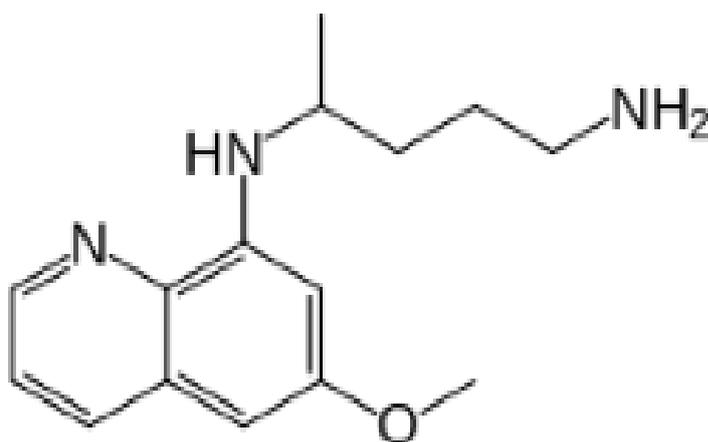
Capsules de 50mg et 100mg, en combinaison thérapeutique Pyronaridine (180mg) /Artésunate (60mg)

✓ Utilisation :

Utilisé en association pour le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* et au stade sanguin de *P. vivax*

❖ **8-aminoquinoléines** : primaquine et tafénoquine, ce sont des schizonticides tissulaires. Ils agissent également à d'autres étapes du cycle de vie des parasites.

• Primaquine : $C_{15}H_{27}N_3O_9P_2$



4-N-(6-méthoxyquinoléine-8-yl) pentane-1,4-diamine ; acide phosphorique

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=PRIMAQUINE/>

Modifié le 20-08-2022

Figure 7 : Structure de la Primaquine

✓ Mécanisme d'action :

Le mécanisme d'action n'est pas bien compris. Il peut agir en générant des espèces réactives d'oxygène ou en interférant avec le transport des électrons dans le parasite.

Lorsqu'une personne est infectée par le paludisme, les parasites du paludisme se déplacent vers le foie pour atteindre leur maturité. Lorsqu'ils sont matures, les parasites entrent dans la circulation sanguine, où ils provoquent des symptômes. Certains types d'infections palustres peuvent rester dans le foie pendant des mois, voire des années, et provoquer des rechutes répétées, ou le retour des symptômes. Les deux médicaments sont actifs sur les hypnozoïtes hépatiques et les gamétocytes sanguins.

✓ Formulation :

Existe généralement sous forme de comprimés.

✓ Pharmacocinétique :

La Pharmacocinétique moins étudiée.

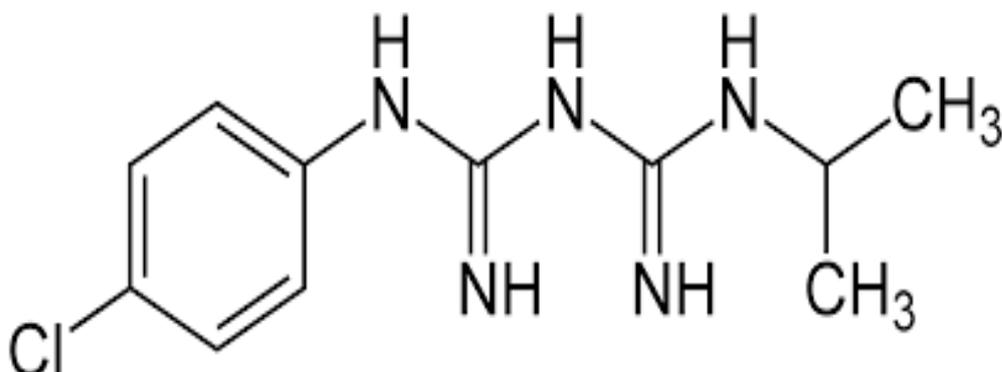
Absorption, destin et excrétion : Elle est bien absorbée après administration orale et rapidement métabolisé. Sa demi-vie d'élimination est d'environ 6 heures. Les métabolites de la primaquine ont des propriétés oxydantes et peuvent provoquer une hémolyse chez les patients déficients en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD).

✓ Utilisation :

La primaquine est utilisé sur les formes sexuée du *Plasmodium* mais aussi sur les hypnozoïtes pour prévenir les rechutes d'infections dues à *P. vivax* et *P. ovale* (traitement) et comme gamétocytocide afin de réduire la transmission de *P. falciparum* dans les régions où le paludisme est endémique(70). Utilisé aussi chez les voyageurs pour la prévention.

❖ **Biguanides** : (proguanil et chlorproguanil) Ils possèdent une action lente. Ce sont des schizontocides tissulaires avec une activité sporontocide. Ces médicaments inhibent la synthèse des folates parasitaires (nécessaires pour la synthèse des acides nucléiques).

• **Proguanil : C₁₁H₁₆ClN₅**



(1E) -1-[amino-(4-chloroanilino) méthylidène] -2-propan-2-ylguanidine

Source : Proguanil | C11H16ClN5 - PubChem (nih.gov)

Modifié le 20-08-2022

Figure 8: Structure du Proguanil

✓ **Mécanisme d'action :**

Pro- drogue agissant à travers le cycloguanil.

Il fait partie des biguanides avec une activité schizontocide surtout sur *P. falciparum*, l'action est lente et se fait par inhibition spécifique de la Dihydrofolate réductase (DHFR) de l'hématozoaire. La DHFR est une enzyme clé du métabolisme de l'acide folique en acide tétrahydrofolique, facteur essentiel qui intervient dans les réactions de transfert de groupement monocarboné lors de la biosynthèse des purines, pyrimidines et protéines.

✓ **Formulation :**

Uniquement sous des formes orales.

✓ **Pharmacocinétique :**

Le proguanil est éliminé à 60% sous forme de métabolites hépatiques et 40% sous forme inchangée ; 60% de la dose administrée est éliminée dans les urines (sous forme inchangée et de métabolites). La demi-vie du proguanil et de son métabolite actif le cycloguanil sont respectivement de 15 et 12h /jour.

On ne connaît pas d'interactions médicamenteuses ayant une traduction clinique.

Du fait d'une élimination rénale importante, la posologie doit être adaptée au débit de filtration glomérulaire en dessous de 60 ml/min. Pas d'adaptation de posologie en cas de cirrhose, mais la plus grande prudence est recommandée en cas d'insuffisance hépatocellulaire.

✓ Utilisation

Le proguanil est un antimalarique schizontocide d'action lente, préventif, et actif sur les espèces de *Plasmodium* dont *P. falciparum* chloroquino résistant.

(<https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/proguanil>).

❖ **Diaminopyrimidines :** (pyriméthamine) Ils ont le même mécanisme d'action que les précédents, donc le même type d'activité. Utilisée dans le cas du paludisme, la pyriméthamine crée des résistances. C'est pourquoi elle est souvent associée à d'autres substances pour une synergie d'action (ex : sulfadoxine + pyriméthamine)

• Pyriméthamine : $C_{12}H_{13}ClN_4$



5-(4-chlorophenyl) -6-ethylpyrimidine-2,4-diamine

Source : Fansidar (medicines.org.au)/consulté le 23-08-2022

Figure 9: Structure de la Pyriméthamine

✓ Mécanisme d'action :

La pyriméthamine a une action schizontocide surtout sur *P. falciparum* mais aussi une action gamétocytocide sur *P. vivax*. Il a un mécanisme d'action antifolinique sur les hématozoaires mais aussi un peu sur les cellules de l'hôte ce qui explique les effets secondaires.

✓ Formulation :

Existe généralement en forme comprimé et suspension buvable pour les enfants (sirop).

✓ Pharmacocinétique :

La demi-vie de la sulfadoxine est d'environ 8 jours. L'absorption digestive des 2 substances est bonne. En cas de retraitement, toujours avec 3 fois la dose unitaire, il faut attendre 8 jours avant de réitérer le traitement. La pyriméthamine a une $\frac{1}{2}$ vie de 4 jours. L'élimination des produits est rénale.

(<https://pharmacomedicale.org/medicaments/parspecialites/item/sulfadoxine-pyrimethamine>).

✓ Utilisation :

Utiles toujours en association dans la prévention et le traitement du paludisme non compliqué.

❖ **Hydroxynaphthoquinones** : (atovaquone) L'atovaquone à activité schizontocide sanguin est usuellement utilisé en association avec le proguanil.

❖ **9-phénanthéneméthanol** : (halofantrine) Ce sont des schizontocides sanguins.

❖ **Sesquiterpènes lactones** : (Artémisinine et dérivés)

✓ Structures :

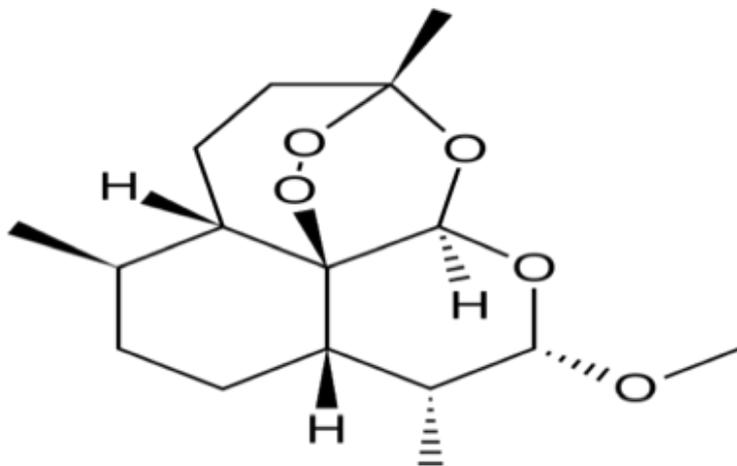


Figure 10: Structure de l'artémether

Source : Artemether | C16H26O5 - PubChem (nih.gov)

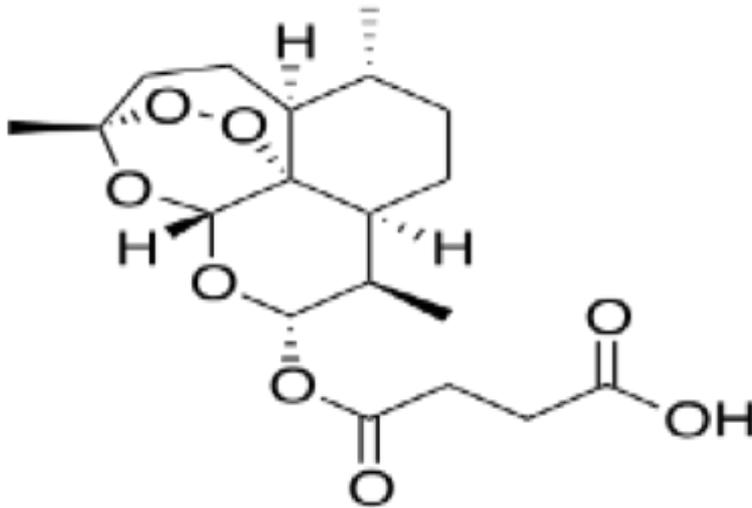


Figure 11: Structure de l'artésunate

Source : Artesunate | C19H28O8 - PubChem (nih.gov)

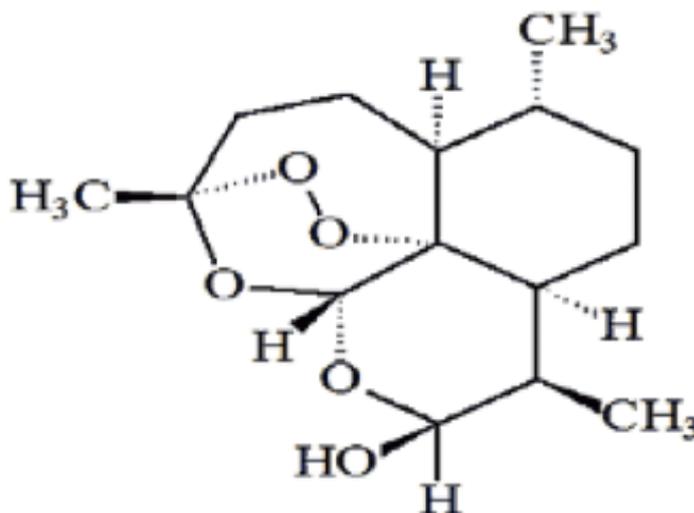


Figure 12: Structure de la dihydroartémisinine

Source : Dihydroartemisinin | C15H24O5 - PubChem (nih.gov)

✓ Mécanisme d'action des dérivés de l'ART :

Ce sont des schizontocides actifs sur les souches de *Plasmodium* résistantes aux autres antipaludéens. L'artémisinine et dérivés sont plus actifs contre Plasmodium sp que les autres

antipaludéens. Leur pont peroxyde intramoléculaire, donne en présence du fer (Fe), des radicaux libres qui détruisent le parasite. Les chélateurs du fer qui pénètrent dans les cellules inhibent l'effet de l'Artémisinine et ses dérivés. Les principaux sont l'Artésunate, l'Artémether et la Dihydroartémisinine.

✓ **Pharmacocinétique :**

➤ **Artémether :**

L'absorption orale est rapide, le pic de concentration est obtenu au bout de 2 h, et la fixation aux protéines plasmatiques est de 95%.

Il est métabolisé par le CYP3A4 et le CYP2C19 en Dihydroartémisinine métabolite actif, puis en métabolites inactifs. Il est éliminé sous formes de métabolites dans les urines et les fèces.

➤ **Artésunate :**

L'artésunate est essentiellement administré par voie orale et intraveineuse mais les voies intramusculaires et intra-rectales peuvent également être utilisées. L'AS est une pro drogue rapidement hydrolysée dans la circulation systémique par une estérase mais également via le cytochrome P450 2A6 (71) en Dihydroartémisinine (DHA), métabolite actif principalement responsable de l'activité antipaludique. Après prise orale, l'artésunate est en partie hydrolysé en DHA dans la lumière du tube digestif. La biodisponibilité de la DHA après administration orale est supérieure à 80 % chez des adultes sains ou impaludés.

Après administration intraveineuse rapide, le pic de DHA (Tmax) survient de façon variable en fonction des études mais est, en moyenne, toujours inférieur à 25 minutes.

Après administration orale d'AS, les concentrations plasmatiques d'AS sont détectables environ 15 minutes après la prise et le pic est observé dans la première heure suivant la prise, témoignant d'une absorption rapide.

L'AS et la DHA ne sont pas très fortement liés aux protéines plasmatiques (environ (80 %)). La demi-vie d'élimination de l'Artésunate est en moyenne de 15 à 45 minutes selon les études et celle de la DHA de 30 à 100 minutes(72)(73).

➤ **Dihydroartémisinine :**

La Dihydroartémisinine est rapidement absorbée après administration orale et les pics de concentrations sont atteints au bout de 2 heures et demie environ. L'absorption par la voie rectale est un peu plus lente, avec des pics de concentrations obtenus environ 4 heures après administration. Près de 55% de la Dihydroartémisinine se fixent aux protéines plasmatiques. Sa demi-vie d'élimination est d'environ 45 minutes du fait qu'elle est éliminée par glycuronidation intestinale et hépatique (74). La DHA peut atteindre des concentrations

élevées dans les érythrocytes parasités. Il est probable que sa liaison endopéroxyde soit essentielle à l'activité antipaludique, en provoquant l'altération du système membranaire du parasite par l'intermédiaire de la formation des radicaux libres, ce qui inclut notamment : l'inhibition du calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique/endoplasmique de *Plasmodium falciparum* ; l'interférence avec le transport des électrons mitochondriaux ; l'interférence avec les protéines de transport du parasite ; la perturbation de la fonction mitochondriale du parasite.

Source : Arténimol : substance active à effet thérapeutique - VIDAL , consulté le 28/09/2022

Formulation :

➤ **Artéméther :**

- Formes injectables dosées à 20 mg
- Comprimés en combinaison thérapeutique : Artéméther (20mg) / Lumefantrine (120mg)

➤ **Artésunate :**

- Comprimés dosés à 50 mg
- Poudre pour préparations injectables, 60mg d'artésunate anhydre en ampoules de 1ml+ bicarbonate de sodium à 5% en ampoules de 0,6 ml.
- En combinaison thérapeutique : Artésunate-Amodiaquine, Artésunate-Méfloquine , Artésunate-Pyronaridine

➤ **Dihydroartémisinine :**

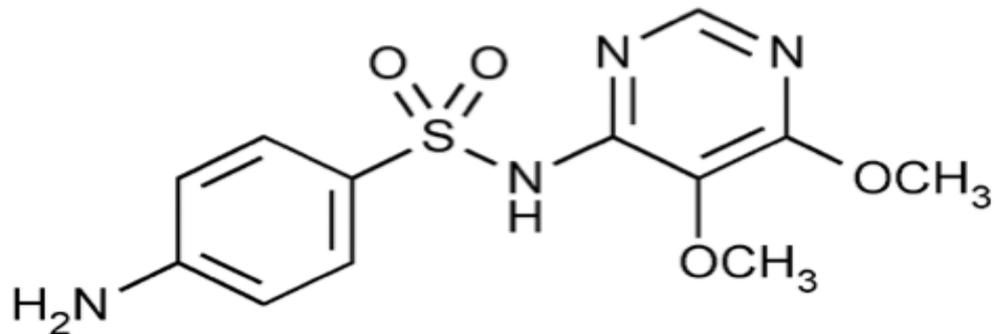
- Comprimés contenant 20 mg, 60 mg ou 80 mg de dihydroartémisinine ;
- Suppositoires contenant 80 mg de dihydroartémisinine

✓ **Utilisation :**

Utilisés actuellement en association et est nommée "CTA" pour "Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine". Elles permettent de traiter la maladie lorsque les autres antipaludéens, comme la quinine, la chloroquine, ne fonctionnent pas. Ce traitement a permis de diminuer significativement le nombre de décès causés par la maladie.

❖ **Sulfonamides :** (sulfadoxine, sulfamétopyrazine). Ils inhibent également la synthèse des folates parasitaires. Schizontocides sanguins ; ils sont utilisés en association avec la pyriméthamine.

● **Sulfadoxine : C₁₂H₁₄N₄O₄S**



4-amino-N-(5,6-dimethoxypyrimidin-4-yl) benzenesulfonamide

Source : Sulfadoxine | C₁₂H₁₄N₄O₄S - PubChem (nih.gov)/

Modifié le 20-08-2022

Figure 13: Structure de la Sulfadoxine

✓ **Mécanisme d'action :**

Les antifoliques provoquent le blocage de la synthèse de l'acide dihydrofolique, indispensable à l'édification de l'ADN de l'hématozoaire mais leur action est lente. Ils sont actifs sur les souches de *P. falciparum* chloroquinorésistantes et très peu actifs sur *P. vivax*. On les associe souvent à des inhibiteurs de la Dihydrofolate réductase.

✓ **Formulation :**

Utilisée généralement en association sous forme comprimés.

✓ **Pharmacocinétique :**

La sulfadoxine et la sulfalène sont des sulfamides à longue durée d'action (demi-vie environ 200 heures pour la sulfadoxine et 65 heures pour la sulfalène). Ils sont fortement liés aux protéines plasmatiques et sont essentiellement éliminés par voie urinaire.

✓ **Utilisation :**

Les antifoliques sont utilisés en association ou seul pour la prévention et le traitement du paludisme simple.

III. 9.3. Autres antipaludiques : ce sont des antibiotiques

❖ **Les cyclines** : (doxycycline, tétracycline) sont des schizontocides sanguins et tissulaires.

❖ **La lincosamide** : (clindamycine) à une action semblable aux cyclines.

❖ **Les sulfones** : (dapsonne) d'activité similaire aux sulfonamides

III.9.4. Les combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine

L'OMS recommande les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) pour traiter le paludisme non compliqué causé par *P. falciparum*(53). Les CTAs sont les antipaludiques les plus efficaces dont on dispose aujourd'hui. Leur choix repose sur les résultats des études d'efficacité thérapeutiques contre les souches locales de paludisme à *P. falciparum*. L'artémisinine et ses dérivés ne doivent pas être utilisés en monothérapie orale car cela favorise l'apparition d'une résistance à l'artémisinine. De plus, les associations médicamenteuses en dose fixe (combinant deux principes actifs différents en un seul comprimé) sont nettement préférables et vivement recommandées. C'est ainsi que les CTAs furent développées dont le principe repose sur l'association de l'artémisinine ou de ses dérivés qui ont une demi vie courte à une molécule partenaire qui possède des propriétés antipaludiques et qui a une demi vie plus longue afin d'assurer une large couverture de protection après le traitement. Actuellement, l'OMS recommande cinq CTAs contre le paludisme à *P. falciparum* et le Mali dans la prise en charge des cas de paludisme simple a adopté les CTAs suivantes(56): Artémether–Luméfantine, Artésunate–Amodiaquine, Dihydroartémisinine – Pipéraquine et Artésunate – Pyronaridine la toute dernière mise sur le marché malien qui fait objet de cette étude et dont nous avons jugé nécessaire d'évaluer son efficacité.

III. 10. La Pyronaridine-Artésunate : Pyramax®

III. 10.1. Histoire de la Pyronaridine-Artésunate

Le Pyramax® est une nouvelle combinaison fixe de deux molécules actives : artésunate (figure 11) dérivé de l'artémisinine et pyronaridine (figure 6). Elle est indiquée dans le traitement de l'accès palustre non compliqué du paludisme à *P. falciparum* ou à *P. vivax* chez les adultes et chez les enfants (75). Deux formes ont été développées par le laboratoire pharmaceutique : la forme (comprimé) pour les adultes et la forme (granule dispersible) dans l'eau pour les enfants. L'association de ces deux molécules a une action schizonticide sur les formes sanguines des parasites *P. falciparum* et *P. vivax* (76). Le Pyramax a été codéveloppé par Medecines for Malaria Venture (MMV) et Shin Poong Pharmaceuticals (75).

MMV est un partenariat pour le développement de produit (PDP), créé en 1999 et basé en Suisse. Il est leader dans la recherche pour le développement et l'accès à des prix abordables de traitements contre le paludisme. Depuis sa création il a ainsi permis la commercialisation de six nouveaux médicaments antipaludéens dont des formes pédiatriques adaptées au

traitement du paludisme chez les plus jeunes : Pyramax® et Eurartésim® en sont deux exemples (77)(78)

Shin Poong Pharmaceuticals est une industrie pharmaceutique basée en Corée du Sud (Séoul) et créée en 1962. Dès le milieu des années 1980 elle a travaillé avec l'OMS et d'autres organisations non gouvernementales (79)

« L'Article 58 » a été introduit en 2004 pour permettre au Comité des médicaments à usage (CHMP) de l'EMA, en coopération avec l'Organisation mondiale de la santé (OMS), d'émettre des avis sur les médicaments et les vaccins à usage humain qui sont destinés exclusivement à des marchés situés en dehors de l'Union européenne (UE). « L'Article 58 » vise à contribuer à relever les défis de santé publique dans les pays à revenu faible et moyen (PRFM) en fournissant un mécanisme par lequel l'expertise scientifique et de fabrication aux fabricants, à l'OMS, aux ARN des PFR-PRI et à l'ensemble de la communauté internationale. Afin de fournir une voie unique de développement et d'évaluation, en 2015 l'EMA conjointement avec la Commission européenne et en collaboration avec la Fondation Bill & Melinda Gates, a procédé à un examen stratégique de l'utilisation, du rôle et de la vision de son programme "Article 58" et la vision de son avis scientifique "Article 58"(80)

En 1999, suite au besoin de développer une nouvelle combinaison thérapeutique pour le traitement du paludisme : Pyronaridine-Artésunate, l'OMS a mis en place MMV. MMV est ainsi une organisation indépendante qui travaille en étroite collaboration avec l'OMS. Shin Poong accepta de s'occuper du développement de ce nouveau traitement. MMV apporta son expertise scientifique sur la réalisation des essais cliniques tant au niveau de leur développement que pour leur coordination au niveau international. Ce qui a permis à Shin Poong de se concentrer sur le développement et la production du produit ainsi que sur la préparation du dossier sur le plan réglementaire. Le partenariat entre MMV et Shin Poong permet aujourd'hui de travailler sur l'accès et la distribution du médicament (12,75). Pour l'instruction du dossier de Pyramax®, MMV et Shin Poong ont choisi la procédure de l'article 58 du règlement européen afin d'obtenir directement l'inscription de ce dernier sur la liste des médicaments pré-qualifiés de l'OMS. Pyramax® fut éligible le 2 juin 2006 pour l'article 58 et le dossier fut déposé le 9 Avril 2010. L'indication demandée était : « Traitement de la forme aigue, non compliquée du paludisme causé par *Plasmodium falciparum* ou par *Plasmodium vivax* chez les patients pesant 15 kg et plus ; Pyramax® est efficace contre les formes résistantes ou susceptibles d'être résistantes de *Plasmodium falciparum* et peut être utilisé pour traiter les patients connus pour être résistants aux autres traitements. » (75,81). En résumé (figure 14) Pyramax® a reçu son opinion scientifique plus de 5ans et demi après avoir

été éligible à la procédure de l'article 58 et près de 2ans après avoir déposé le dossier dans le cadre de l'article 58.(80)

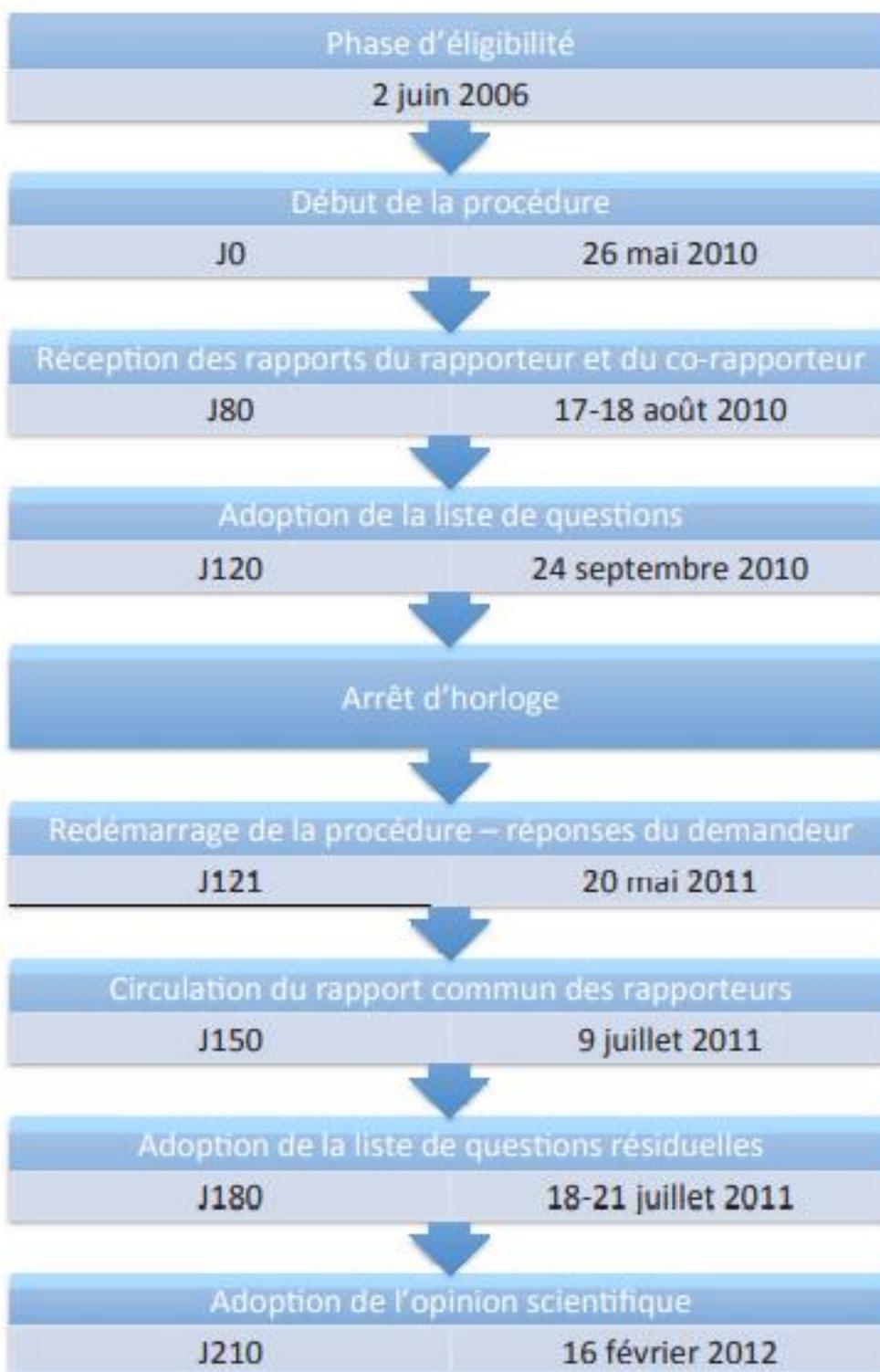


Figure 14: Procédure d'adoption de l'opinion scientifique par le CHMP par la procédure de l'article 58 de Pyramax®

Source : <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01565970>. 2017

En parallèle de cette procédure, Pyramax® a reçu une AMM de l'Autorité compétente de la Corée du Sud-Est, pays d'origine de Shin Poong le 17 Aout 2011(80). Le développement de Pyramax® a été réalisé en différentes étapes durant lesquelles plusieurs études cliniques ont été conduites. Une première étude de phase I pour tester le produit chez des volontaires sains adultes. Puis deux études de phase II pour déterminer la dose à utiliser et étudier sa pharmacocinétique, l'une a porté sur les enfants et l'autre sur les adultes tous contaminés par *P. falciparum* (formes non compliquées). Cinq études de phase III ont été menées pour étudier l'efficacité et la sécurité du Pyramax®. Les trois premières ont été réalisées sur des patients (adultes ou enfants) atteints de formes non compliquées à *P. falciparum*. Deux études de non infériorité ont permis de comparer Pyramax® aux traitements de référence (Méfloquine/Artésunate et Artémether/Luméfántrine) chez 2543 patients asiatiques et africains (adultes et enfants de plus de 20kg). Le principal critère d'évaluation était la PCR corrigée avec la RCPA (critère défini par l'OMS) à 42 jours. La troisième étude a été menée chez des enfants africains de moins de 12 ans pesant de 6 kg à 25 kg pour tester l'efficacité et la sécurité d'une forme pédiatrique sous forme de granules de dosage 60/20mg. Ce qui a permis de fournir des données pour l'utilisation de Pyramax® chez les enfants. Enfin deux études de phase III ont été menées chez des enfants et des adultes atteints de paludisme non compliqué à *P. vivax* pour tester l'efficacité et la sécurité de Pyramax® chez ces populations. Ces études menées chez 456 patients en Asie et comparant Pyramax® au traitement de référence (Chloroquine) ont montré la non infériorité de la nouvelle CTA, PCR corrigée à 28 jours (82). Le principal risque identifié lors des études cliniques fut l'hépatotoxicité de Pyramax® (cytolyse hépatique avec augmentation des ALAT et ASAT), des données recueillies ont montré que potentiellement cette hépatotoxicité était plus importante quand Pyramax® était réadministré pour traiter une nouvelle infection par le paludisme. Shin Poong a donc prévu de réaliser des études cliniques pour comprendre le mécanisme de l'hépatotoxicité de Pyramax® et étudier cette dernière après ré-administration de Pyramax®. Au vu des éléments suscités Pyramax® a reçu l'opinion scientifique en 2012 avec l'indication recommandée par le CHMP suivante : *traitement de l'accès palustre non compliqué à Plasmodium falciparum et vivax chez les adultes et les enfants de plus de 20kg, dans des zones de faible transmission avec des preuves de résistance à l'artémisinine.*

Pyramax® doit être utilisé en simple cure de 3jours. Il peut être pris avec ou sans nourriture. Il doit de plus être administré dans des infrastructures où une surveillance de la fonction hépatique peut être surveillée. Les résultats des études ont conclu à un mécanisme dose-

dépendent semblable à celui du paracétamol avec la formation d'un métabolite actif hépatotoxique, toxicité qui peut être traitée par l'administration de glutathion(75,81,83).

La principale étude clinique ayant permis d'étendre l'indication de Pyramax® est celle du Réseau Ouest Africain de Développement des Médicaments Antipaludiques (WANECAM – West African Network for Clinical Trials of Anti-malarial Drug). Ce réseau permet la collaboration entre des pays africains de l'Ouest (Burkina Faso, Gambie, Guinée et Mali) et des pays du Nord (Allemagne, Angleterre, Suède et France) avec un financement de l'European and Developing Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP) (13). Cette étude de phase IIIb/IV a évalué l'efficacité et la sécurité de l'administration répétée de différentes combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (développées par MMV) : pyronaridine / artésunate (Pyramax®), dihydroartémisinine/pipéraquline (Eurartésim) en comparaison aux combinaisons de traitement de première ligne : artémether/luméfantrine ou artésunate/amodiaquine (suivant les centres) durant une période de 2 ans chez les adultes et les enfants atteints de formes non compliquées à *Plasmodium falciparum*. L'étude s'est déroulée en Afrique de l'Ouest, zone de transmission modérée du paludisme de 2011 à 2016 et a inclus 4757 patients dont 1015 ont reçu le Pyramax® (comprimés chez les adultes et granules chez les enfants). L'évaluation a été focalisée sur les résultats obtenus pour les patients ayant reçus Pyramax® sous formes de comprimé (patients pesant plus de 20kg) (13,82). Une analyse intermédiaire d'un sous-groupe de l'étude (patients ayant reçu la pyronaridine/artésunate vs ceux ayant reçu artémether/luméfantrine) a permis d'évaluer la sécurité de l'administration répétée de Pyramax® en recueillant la survenue d'évènements hépatiques et de tous autres évènements indésirables(84). Les résultats de cette analyse publiés en Octobre 2015 ont montré l'absence d'une augmentation de la fréquence et du type d'évènements indésirables lors du retraitement des patients par Pyramax® par rapport à ceux ayant reçu une seule cure(13,84).

En date du 19 Novembre 2015 au vu des données soumises, le CHMP a donné une opinion scientifique positive pour l'extension de la gamme de Pyramax® et étendre la possibilité de retraiter en cas de réinfection des patients ayant déjà reçu une cure de Pyramax®. La nécessité de réaliser des tests hépatiques systématiques avant le traitement des patients n'ayant pas de signes cliniques d'un tel problème a été supprimée. Cependant la contre-indication de ne pas traiter les patients atteints d'une maladie hépatique sous-jacente ou présentant des signes cliniques d'insuffisance hépatique perdure (85).

Le Pyramax®, a aujourd'hui l'indication pour traiter les patients (adultes et enfants) présentant un accès palustre non compliqué à *Plasmodium falciparum* ou *vivax*, patients qui

peuvent être retraités en cas de réinfection par ces espèces du *Plasmodium*, la forme pédiatrique (granule pour solution buvable) pour traiter les enfants pesants entre 5 et 20kg et la forme adulte (comprimé) pour les patients pesant 20kg et plus. En mars 2016 la forme pédiatrique fut inscrite sur la liste des médicaments pré-qualifiés de l’OMS, quatre mois après avoir obtenu une opinion scientifique positive du CHMP. Actuellement le Pyramax® est autorisé dans plus de 20 pays africains et asiatiques(12).

Au Mali (PNLP), le Pyramax® est désormais inclus dans les lignes directives nationales pour la prise en charge des cas de paludisme non compliqué chez les adultes et les enfants (56) .

Considérant l’avis scientifique positif sur l’artésunate-pyronaridine émis au titre de l’article 58 de l’Agence européenne des médicaments (EMA), l’OMS a officialisé son inclusion dans la liste des médicaments préqualifiés pour le paludisme, la liste modèle des médicaments essentiels et la liste modèle des médicaments essentiels pour les enfants , sa recommandation devrait faire un des objets de la révision des lignes directives de l’OMS sur le paludisme(53).

III.10.2. Les caractéristiques de la Pyronaridine-Artésunate (86)

III.10.2.1. Nom de la combinaison thérapeutique :

Pyramax® : Pyronaridine tétraphosphate-Artésunate

III.10.2.2. Structures chimiques des deux substances actives de la combinaison thérapeutique

- ✓ Pyronaridine (figure 6)
- ✓ Artésunate (figure 11)

III.10.2.3. Mécanisme d’action :

La pyronaridine inhibe la formation de la β -hématine, empêchant ainsi le parasite du paludisme de neutraliser l’hème, qui est toxique pour le parasite. De plus, en formant un complexe médicament-hématine la pyronaridine inhibe la dégradation de l’hématine par le glutathion et augmente la lyse des globules rouges induite par l’hématine. Ces deux actions entraînent la mort du parasite. Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer l'activité des artémisinines ; la génération de radicaux libres à l'intérieur de la vacuole alimentaire du parasite et l'inhibition de l'endoplasme sarcoplasmique du réticulum endoplasmique du parasite sont largement acceptées.

III.10.2.4. Les formulations et la composition du Pyramax®

Le Pyramax® se présente sous forme de :

- ✓ Comprimé de 180 mg de Pyronaridine tétraphosphate et 60mg d’Artésunate
- ✓ Granules (sachets) de 60 mg de Pyronaridine tétraphosphate et 20 mg d’Artésunate

III.10.2.5. Pharmacocinétique :

Il n'y a pas d'interaction pharmacocinétique entre le pyronaridine tétraphosphate et l'artésunate à la dose recommandée. Au cours des essais cliniques, les concentrations minimales de pyronaridine et d'artésunate chez les enfants se situaient généralement dans la fourchette observée chez les adultes. Après l'administration des comprimés Pyramax à des volontaires sains et à des patients atteints de paludisme, les concentrations plasmatiques maximales sont généralement atteintes entre 0,5 et 1,0 heure après la dose d'artésunate, entre 1 et 2 heures après la dose de DHA et entre 2 et 8 heures après la dose de pyronaridine. L'exposition à l'artésunate et à la pyronaridine a augmenté de 34 % et 20 % respectivement lorsque Pyramax était administré avec un repas riche en graisses, mais ces effets n'ont pas été jugés cliniquement significatifs. Les patients peuvent prendre les comprimés Pyramax sans tenir compte des repas.

La pyronaridine s'associe préférentiellement aux cellules sanguines, présentant un rapport de concentration sang total/plasma d'environ 1,5:1. La pyronaridine est fortement liée aux protéines sériques humaines *in vitro* (92 à 95%). La liaison de l'artésunate et du DHA aux protéines plasmatiques est modérée (62 à 93 %) et l'albumine est la principale protéine de liaison du DHA dans le plasma humain.

III.10.2.6. Indication thérapeutique :

Le Pyramax® est un schizonticide sanguin, indiqué dans le traitement de l'infection palustre aiguë non compliquée causée par *Plasmodium falciparum* ou par *Plasmodium vivax* chez les adultes de 20 kg et plus (comprimés) et les enfants pesants entre 5 et 20 kg (granules buvables).

III.10.2.7. Posologie et mode d'administration :

- ✓ Posologie (tableau 1)
- ✓ Les comprimés ou les granules de Pyramax® doivent être pris par voie orale en une seule dose quotidienne pendant trois jours consécutifs, avec ou sans nourriture
- ❖ Remarque : En cas de vomissements dans les 30 minutes suivant l'administration de la première dose, une nouvelle dose doit être administrée. Si la dose répétée est vomie, le patient doit recevoir un autre antipaludéen. Si une dose est oubliée, elle doit être prise dès que possible et le traitement recommandé doit être poursuivi jusqu'à ce que le traitement complet soit terminé.

III.10.2.8. Contre-indication :

- ✓ Hypersensibilité connue à la pyronaridine ou à l'artésunate ou à tout composant de la formulation.
- ✓ Patients présentant des signes cliniques ou des symptômes d'atteinte hépatique (tels que nausées et/ou douleurs abdominales associée à un ictère) ou une maladie hépatique grave connue (c'est-à-dire une cirrhose décompensée, stade B ou C de Child-Pugh).
- ✓ Insuffisance rénale sévère

III. 11. La résistance aux antipaludiques

❖ La chimiorésistance :

Définie par l'OMS comme étant “ l'aptitude d'une souche de parasites du paludisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées mais comprises dans les limites de tolérance du sujet ”. Cette définition formulée en 1965 et 1973, a été complétée en 1986 suite à une meilleure compréhension du métabolisme des sulfamides chez certains individus, par la phrase “ la forme active du médicament contre le parasite doit pouvoir accéder au parasite ou à l'intérieur de l'hématie parasitée pendant toute la durée nécessaire à son action normale (87). Il faut clairement distinguer un échec thérapeutique, c'est-à-dire l'absence de disparition de parasites ou de la résolution des signes cliniques après un traitement antipaludique, avec une résistance vraie à un médicament antipaludique. Pour certains médicaments qui présentent des grandes variations pharmacocinétiques interindividuelles malgré l'administration d'un dosage correct, l'apparente résistance peut facilement s'expliquer par des concentrations sanguines insuffisantes.

❖ Résistances aux méthanol-quinoléines :

Une association apparente a été établie entre l'augmentation du nombre de copies du gène *Pfmdr-1* l'augmentation de son expression avec une diminution de la sensibilité du *P. falciparum* à la méfloquine et à l'halofantrine(88). Selon certains auteurs la résistance à l'halofantrine et celle à la méfloquine peuvent apparaitre sans une augmentation de l'expression du gène *Pfmdr-1*(89). Une mutation ponctuelle de *Pfcrt* codant pour une protéine transmembranaire, de la vacuole digestive de *P. falciparum* est responsable de la résistance à la chloroquine(90). Jusqu'à nos jours il n'y a pas de marqueur moléculaire pour l'amodiaquine. On pense que des variations alléliques sur le *Pfcrt* et sur le *Pfmdr1* auraient une relation avec une élévation de résistance à l'amodiaquine(91).

❖ Résistance aux anti métabolites :

Les mutations sur les gènes codant pour la DHFR en position 108 principalement mais aussi en position 51, 59, et 164 sont responsables de la résistance aux antifoliques. Celles en position 59 et 108 seraient à l'origine des cas de résistance observés *in vitro* (92,93). La résistance à la pyriméthamine est due à une substitution de la sérine par l'asparagine en position 108. Les mutations ponctuelles sur le gène codant pour la DHPS, sont les bases moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine (94). Les mutations telles serine-phénylalanine en position 436, alanine-thréonine/sérine en position 613, alanine-glycine en position 581, alanine-glycine en position 437, et lysine-acide glutamique en position 540 ont été impliquées dans la résistance *in vitro* (94). La résistance aux antipaludiques augmentent régulièrement, elle est plus importante pour la chloroquine 84,5%, que la sulfadoxine-pyriméthamine 8,1% au Mali (95,96).

❖ La résistance aux dérivés de l'artémisinine : Le gène *k13 propeller*

Le gène *K13-propeller* code pour la protéine Kelch dont certaines mutations dans le domaine β -propeller ont été associées à une augmentation de la demi-vie de la clairance parasitaire après traitement à l'artémisinine au Cambodge (97). Il est localisé sur le chromosome 13 en position 43700 (PF3D7_1343700). Le gène de 2181 pb (paires de bases) code pour une protéine de 726 acides aminés. Le *PfK13* a été décrit comme étant associé à la résistance *in vivo* et *in vitro* de *P. falciparum* à l'artémisinine en Asie du Sud-est par Arieu et al en 2014.

La protéine Kelch se présente sous forme d'hélice. Le carboxy-terminal du PF3D7_1343700 code pour six motifs kelch répétitifs qui se trouvent dans une grande région avec diverses fonctions cellulaires R. Il y a une homologie entre la protéine *K13* et la protéine KLHL12 KLHL2 (impliquées dans la dégradation des protéines ubiquitines) et la protéine KEAP1 (impliquée dans l'adaptation de la cellule au stress oxydatif) (98).

Comme dans de nombreuses protéines Kelch, des mutations dans le domaine kelch sont prédites pour modifier la structure de la protéine ou de modifier sa charge modifiant en même temps sa fonction biologique. De tels changements pourraient éventuellement permettre l'émergence d'une protéine mieux adaptée pour résister aux facteurs de stress spécifiques associés à l'exposition aux dérivés de l'artémisinine. La protéine de 726 acides aminés comprend un domaine N terminal contenant les séquences spécifiques à *P. falciparum* et un domaine Kelch propeller (C terminal) séparés par un domaine BTB/POZ (97)

III. 12. Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance

L'OMS a standardisé l'évaluation de la chimiorésistance pour l'espèce *Plasmodium falciparum*. Il s'agit d'évaluation *in vivo* et *in vitro*.

III. 12.1. Test *in vivo*

Il consiste à administrer, à un sujet porteur de *P. falciparum*, la dose ordinairement recommandée de l'antipaludique à tester, et à contrôler la parasitémie au bout d'un temps donné. L'évaluation de l'efficacité des schémas thérapeutiques se fait directement avec les tests de l'OMS. Ces tests proposent des suivis de 28 jours pour la chloroquine et l'amodiaquine, 42 jours pour la sulfadoxine-pyriméthamine, la luméfantine-artéméter (Coartem®) et le test de 63 jours pour la méfloquine(99). Le test standard de l'OMS de 28 jours(99) consiste à soigner les patients atteints d'infection mono spécifique à *P. falciparum* avec contrôle de la parasitémie aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28.

III. 12.1. 1. Avantages du test *in vivo*

- ❖ Adhésion facile de la population au protocole d'étude car elle y trouve un intérêt médical immédiat ;
- ❖ Réalisation plus simple et aisée (même par un agent de santé de base) ;
- ❖ Détermination du niveau de la résistance afin d'adopter un schéma thérapeutique adéquat.

III. 12.1. 2. Inconvénients du test *in vivo*

- ❖ Interprétation difficile des résultats liée aux troubles du métabolisme du médicament, au niveau immunitaire du malade, et aux troubles d'absorption du médicament ;
- ❖ Longue durée pour le diagnostic de la résistance.

III. 12.2. Tests *in vitro*

Ils consistent à mesurer l'inhibition de la maturation en schizontes des parasites isolés chez un sujet, en présence des doses croissantes d'un antipaludique donné. Après le macrotest mis au point par l'OMS et vite abandonné, ce sont les microtests qui sont actuellement utilisés. On distingue :

III. 12.2.1. Tests optiques

Le microtest OMS(100) et le semi-microtest de Le Bras(101) ont été mis au point à la fin des années 70 , ils sont basés sur la capacité des doses croissantes d'antipaludiques testés à empêcher la maturation des trophozoïtes de *P. falciparum* en schizontes, le prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI (Rostewell Park Memorial Institute) et incubé à 37°C, en présence de CO₂ et de O₂, pendant 24 à 48 heures . Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le microtest OMS, et en concentration inhibitrice 50% (CI50) ou 90% (CI90), pour le semi-microtest. Parmi les microtests nous avons le microtest isotopique de Desjardins(102)et le semi- microtest de Le bras et Deloron qui sont appelés des tests isotopiques. Ces tests sont des modifications,

respectivement, du microtest OMS et du semi-microtest optique. Après 18 heures d'incubation, à chaque cupule un radio-isotope est ajouté (hypoxanthine triturée). La croissance des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites. La mesure de la radioactivité se fait dans un compteur à scintillation. Les résultats sont donnés en coup par minute et l'activité du médicament est exprimée en CI50 ou en CI90.

III. 12.2.2. Nouveaux tests

III. 12.2.2.1. Le test de Ring Stage Survival Assay (RSA)

Le RSA (0-3h) fournit une plateforme pour la caractérisation moléculaire de la résistance à l'artémisinine. Le test RSA0-3h peut être mis en œuvre lorsque la surveillance de la résistance à l'artémisinine est nécessaire.

❖ Le test de RSA *in vitro* :

C'est un test qui permet de mesurer le taux de survie des parasites au stade anneau (0-3h et 9-12h) adaptés à la culture après les avoir exposés à 700 nM de DHA ou 0.1% de diméthylsulfoxyde.

❖ Le test de RSA *ex vivo* :

Les tests RSA *ex vivo* sont faits sur les parasites prélevés chez les patients directement avant d'instaurer le traitement.

III. 12.2.2.2. Test moléculaire

Il s'agit de mettre en évidence un polymorphisme au niveau de la séquence de l'ADN parasitaire qui est associé au phénotype de résistance au médicament par la technique de la PCR et ou du séquençage.

❖ Principe de la PCR :

Elle est fondée sur l'amplification exponentielle *in vitro* de l'ADN plasmodial en présence d'amorces spécifiques, de nucléotides, de l'ADN polymérase et d'un milieu tampon. La révélation se fait sous UV.

❖ Technique :

Cette technique décrite en 1985 par Kary Mullis (103) ; permet une amplification enzymatique *in vitro* de la quantité d'ADN dont on disposait initialement. Elle impose de connaître la séquence des régions qui délimitent le segment de l'ADN à amplifier. On utilise les amorces complémentaires à ces régions, qui ont entre autres comme fonction la reconnaissance de la région à amplifier et l'initiation de la synthèse de l'ADN néoformé. Le processus d'amplification comporte des cycles successifs, chacun comprenant :

- Une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN

- Une phase d'hybridation de l'ADN avec les deux amorces spécifiques : elle a lieu grâce à un abaissement de la température, chaque oligonucléotide se fixant sur un brin d'ADN
- Une extension des amorces (élongation) grâce à l'ADN polymérase à 70°C ou à 72°C

Cette technique a eu de l'ampleur avec la découverte en 1988 d'une ADN polymérase thermorésistante. Il s'agit de la Taq polymérase, isolée d'une bactérie thermophile « *Thermus aquaticus* ». Cette bactérie est adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude. Il est maintenant possible d'automatiser ces réactions grâce à des appareils programmables en température et en temps (Thermocycleur).

❖ PCR nichée :

C'est une double PCR. La deuxième PCR se fait sur le produit de la première PCR. Cette technique permet d'obtenir une plus grande sensibilité en PCR. Dans ce cas, deux couples d'amorces sont utilisés :

- Un couple d'amorces externes :

Ce couple d'amorces permet tout d'abord d'obtenir un fragment de l'ADN amplifié, comme en PCR classique. Les amorces sont donc spécifiques des deux séquences bornant le segment d'ADN à amplifier. Les fragments de l'ADN obtenus, servent alors de matrice pour une seconde PCR.

- Un couple d'amorces internes :

Ce couple d'amorces borne une région située à l'intérieur du fragment nucléotidique obtenu avec le premier couple d'amorces. D'où le terme de PCR nichée, car ces amorces sont nichées, emboîtées, dans les premières.

III. 12.2.3. Avantages des tests *in vitro*

Les tests *in vitro* ont pour l'avantage :

- ❖ La possibilité de tester plusieurs antipaludiques sur les mêmes souches plasmodiales à la fois;
- ❖ La possibilité de faire un diagnostic beaucoup plus précoce de la résistance ;
- ❖ Pas de problème de biodisponibilité ni de troubles du métabolisme des médicaments ;
- ❖ Pas de problème de disponibilité des patients.

III. 12.2.4. Inconvénients des tests *in vitro*

- ❖ Nécessité d'un matériel lourd et d'un personnel qualifié ;
- ❖ Conditions rigoureuses de prélèvement et de culture des parasites très difficile sur le terrain (risque de contamination) ;
- ❖ Difficulté de cultiver certaines souches sauvages ;
- ❖ Incapacité de déterminer les échecs thérapeutiques.

METHODOLOGIE

IV. METHODOLOGIE

IV. 1. Lieu d'étude

Notre étude s'est déroulée à Faladjè et environnants. Faladjè est un village rural qui relève de la commune de N'Djiba, cercle de Kati, région de Koulikoro (figure 14). Faladjè est situé à 80 Km de la ville de Bamako avec une population de plus de 3500 habitants (RAVEC 2009). Le paludisme y est saisonnier, **hyper-endémique** et intense entre les mois de Juillet et Octobre. La population majoritaire est constituée de Bambara, qui cohabitent avec les Peuls, Soninkés et Maures. Le site de Faladjè a également déjà fait l'objet de plusieurs études effectuées par l'équipe du MRTC/DEAP depuis les années(104–106).

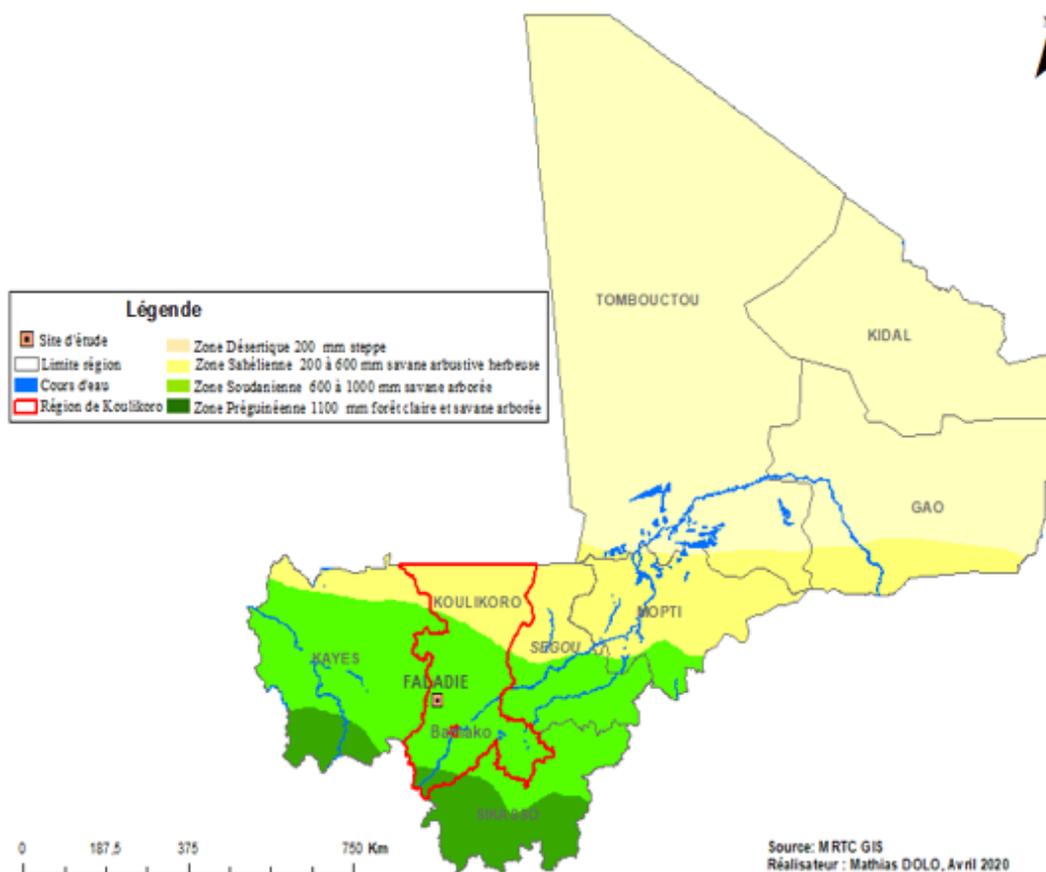


Figure 15: La localisation géographique du village de Faladjè

IV. 2. Le choix du lieu d'étude

Le site de Faladjè a été choisi à cause de son accessibilité géographique ainsi que de l'adhérence de la population aux études antérieures et la présence permanente de l'équipe de recherche du MRTC/DEAP depuis plusieurs années.

IV. 3. Type d'étude

Nous avons mené une étude d'observation prospective longitudinale d'évaluation de l'efficacité de la combinaison Pyronaridine-Artésunate contre le paludisme non compliqué à Faladjè.

IV. 4. Période de l'étude

L'étude s'est déroulée d'Octobre 2019 à Février 2021 pendant les périodes de transmission intense du paludisme. Une équipe médicale était basée sur le site d'étude pendant ces périodes couvertes par notre étude. La durée du suivi de chaque participant était de 28 jours après l'administration de la première dose du médicament.

IV. 5. Population d'étude

Les participants de 6 mois et plus constituaient notre population d'étude. L'étude a concerné tous les patients atteints de paludisme à *Plasmodium spp* confirmé par la microscopie et ayant donné leur consentement/assentiment.

IV. 6. Échantillonnage et taille de l'échantillon

Nous avons procédé à un échantillonnage exhaustif concernant tous les patients résidant à Faladjè âgés de 6 mois et plus. L'échantillonnage a porté sur 452 participants. Notre taille d'échantillon nous donne un intervalle de confiance de 95% (risque α de 5%).

IV. 7. Considérations éthiques

Le protocole ainsi que les formulaires de consentement et d'assentiment libres et éclairés ont été soumis et approuvés par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine et d'Odonstomatologie (FMOS) et de la Faculté de Pharmacie (FAPH). Avant l'exécution du protocole, la permission communautaire a été obtenue pour la conduite de l'étude sur le site de Faladjè.

IV. 8. Critères d'inclusion et de non-inclusion

IV. 8.1. Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion suivants :

- les patients âgés de 6 mois et plus, présentant un paludisme non-compliqué ;
- les patients présentant une infection à *Plasmodium spp* avec une parasitémie supérieure ou égale à 1000 trophozoïtes/ μ L de sang ;
- être résidant de Faladjè ;
- donner son consentement libre et éclairé pour les adultes, un consentement/assentiment du tuteur pour les enfants mineurs.

IV. 8.2. Critères de non-inclusion

Les critères suivants ont fait l'objet de non-recrutement dans notre étude :

- les personnes n'ayant pas accepté de participer à l'étude ;
- patients ayant reçu un traitement antipaludique depuis moins de 14 jours ;
- présence d'affections chroniques nécessitant une prise en charge particulière ;
- l'anémie sévère (taux d'hémoglobine <5g/dL) ;
- femme enceinte.

IV. 9. Critères de jugement de l'efficacité thérapeutique *in vivo*

IV. 9.1. Principaux critères d'évaluation

Guérison clinique et parasitologique à J14. Conversion d'une lame positive à *Plasmodium spp* à l'admission en une lame négative en l'absence de signes ou symptômes attribuables au paludisme. Les principaux critères d'évaluation étaient basés sur le temps de clairance des parasites dans le sang, la proportion de sujets avec une parasitémie négative après 24, 48 et 72 heures, le temps de clairance de la fièvre, la proportion de patients apyrétiques (température axillaire 37,5°) après 24, 48 et 72 heures, la présence de gamétocytes et la densité gamétocytaire aux jours 7 et 14 de suivi et l'évaluation de l'anémie par la mesure du taux d'Hb à J0, J14 et J28.

L'évaluation de l'efficacité du traitement s'est faite selon le protocole de l'OMS 2003 et regroupe : L'échec thérapeutique précoce (ETP), l'échec thérapeutique tardif (ETT) qui comprend l'échec clinique tardif (ECT) et l'échec parasitologique tardif (EPT), la réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA)

IV. 9.1.1. L'échec thérapeutique précoce (ETP)

- Apparition des signes de danger ou de paludisme grave aux jours 1, 2 ou 3 en présence de parasite.
- La densité parasitaire au jour 2 supérieure à celle du jour 0, quel que soit la température axillaire.
- Présence de parasite au jour 3 et une température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C
- La densité parasitaire au jour 3 dépassant d'au moins 25% celle du jour 0.

IV. 9.1.2. Echec clinique tardif

- Apparition de signes de danger ou de paludisme grave après le jour 3, en présence de parasite, en absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique précoce.

- Présence de parasite et une température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C ou antécédent de fièvre un jour quelconque entre le jour 4 et le jour 28, en l'absence de tout critère d'échec thérapeutique précoce

IV. 9.1.3. Echec parasitologique tardif

Présence de parasites un jour quelconque entre le jour 7 et le jour 28 et une température axillaire inférieure à 37,5°C, en l'absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique précoce ou d'échec clinique tardif.

IV. 9.1.4. Réponses clinique et parasitologique adéquate

Absence de parasite au jour 28, quel que soit la température axillaire, en l'absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique précoce, d'échec clinique tardif ou parasitologique tardif.

IV. 9.2. Critères secondaires d'évaluation

L'évaluation de l'évolution des signes et symptômes cliniques pendant le suivi

IV. 10. Méthodes de collecte des données

Les participants recrutés dans notre étude ont été hospitalisés pendant trois jours et pris en charge au centre de santé par une équipe médicale expérimentée dans les essais cliniques. Les données démographiques, cliniques et biologiques ont été collectées au moyen d'un questionnaire individuel standardisé (CRF) élaboré conformément aux objectifs de l'étude puis enregistrées sur un logiciel connu sous le nom de *REDCap*.

IV. 10.1. Collecte des données démographiques et cliniques

Chaque participant a bénéficié d'un examen clinique complet à l'admission. Les données cliniques ont été recueillies par un clinicien du site par l'interview directe associée à l'examen physique du volontaire. Les informations cliniques collectées ont porté sur le poids, la taille, la température corporelle, la recherche de la splénomégalie par palpation de la rate, les fréquences cardiaques et respiratoires, la recherche de signe de gravités. Le même examen a été effectué aux jours de visites prévue ou imprévue. Nos données ont été systématiquement portées dans des registres et sur des fiches techniques. Ces fiches étaient régulièrement contrôlées et placées dans des chemises individuelles. Après le suivi complet, les registres et les fiches techniques étaient gardés dans une cantine métallique à l'abri des insectes et des rongeurs. Les registres d'observation, les lames porte-objets et les confettis portaient le même numéro d'étude pour chaque participant en concordance aux bonnes pratiques cliniques. Les lames étaient rangées dans des boîtes de l'OMS et les confettis étaient placés dans des enveloppes portant également le même numéro que les lames et gardés dans une cantine

métallique. Un registre spécifique servait de support de collecte de données pour les cas se présentant au centre de santé qu'ils soient ou non inclus dans l'étude.

IV. 10.2. Données biologiques

Elles ont été collectées à partir des prélèvements directs de sang capillaire au bout du doigt (ou du gros orteil) ou veineux. Des gouttes épaisses et frottis minces avec confection systématique de confetti ont été réalisés chaque 12 heures pendant les trois premiers jours (H0 à H72) puis aux jours 7, 14, 21, 28 et aux jours de visites imprévues.

La mesure du taux d'hémoglobine a été effectuée aux jours 0, 14, 28 et tout autre jour si ceci est jugé nécessaire par le clinicien. La glycémie a été évaluée aux jours d'inclusion (H0).

Les prélèvements ont été faits par un personnel qualifié et ont servi à :

- Diagnostiquer le paludisme par la goutte épaisse ;
- Déterminer le taux d'hémoglobine ;
- Confectionner des papiers buvards ou confettis pour les analyses moléculaires (PCR).

IV. 10.2.1. Goutte épaisse

IV. 10.2.1.1. Principe

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

IV. 10.2.1.2. Matériels

Nous avons utilisé les matériels suivants : Blouse, gants stériles, lames porte-objet, vaccinostyles stériles à usage unique, alcool à 70°C, coton hydrophile, poubelle, Giemsa à 10%, bacs de coloration, éprouvette graduée, râteliers, boîte à OMS, eau de-ionisée, crayon à papier, chronomètre, huile à immersion, compteur manuel, papier hygiénique, microscope optique binoculaire, une table de lecture et une chaise.

IV. 10.2.1.3. Mode opératoire

Les lames étaient marquées par un crayon indélébile. L'index ou le majeur de la main gauche ou le gros orteil était désinfecté par un tampon d'alcool, puis essuyé avec un morceau de coton sec afin d'enlever le reste de l'alcool. Une ponction capillaire était faite au niveau de ce doigt ou gros orteil et la première goutte était essuyée avec un morceau de coton sec. Récupérer la seconde goutte sur une lame porte-objet. Avec l'extrémité d'une 2eme lame, étaler la goutte par des mouvements spiralés (défibrination) pendant une à deux minutes sur un centimètre de diamètre environ.

Laisser sécher à plat sur un support à la température ambiante pendant quelques minutes, la préparation est gardée à l'abri de la poussière, et des mouches. Garder dans du Giemsa à 10% pendant 15 minutes. Rincer avec l'eau propre, en faisant couler le liquide très délicatement sur la lame. Laisser sécher sur le râtelier.

IV. 10.2.1.4. Examen microscopique

La lecture des gouttes se faisait sur place par un biologiste à l'aide d'un microscope optique binoculaire à l'objectif 100 avec huile à immersion. La densité parasitaire était déterminée en comptant le nombre de parasites sur 200 leucocytes et le tout apporté à 8000 leucocytes par millimètre cube de sang. La gamétocytémie était déterminée sur 1000 leucocytes. Le frottis mince était utilisé pour le diagnostic d'espèce. Après la lecture, les lames étaient conservées dans des boîtes de l'OMS. Pour le contrôle de qualité, les 25% des lames ont été relues par un microscopiste qui n'a pas participé à l'étude troisième lecture

IV. 10.2.2. La confection des confettis

Il s'agissait de déposer quelques gouttes de sang sur un papier buvard appelé confetti. Elle était effectuée au poste de biologie.

IV. 10.2.2.1. Principe

Consiste à collecter du sang parasité sur un papier buvard.

IV. 10.2.2.2. Matériels

Elle nécessitait un matériel minimal et un personnel qualifié et était composé de : papier buvard, gants stériles, vaccinostyles stériles, coton hydrophile, alcool à 70°C, paire de ciseaux, crayon etc.

IV. 10.2.2.3. Technique

Découper du papier buvard à l'aide d'une paire de ciseaux environ 4 cm de long sur 2 cm. Diviser un des bouts de confetti (1/2 cm de largeur sur 1 cm de hauteur). Inscrive le numéro d'identification du papier buvard à l'aide du crayon. Imbibes les languettes de sang puis laisser sécher à la température ambiante.

IV. 10.2.2.4. Gestion des confettis

Les confettis étaient séchés, accrochés à du scotch, à l'abri des mouches et de la poussière, puis conservés et transportés dans des enveloppes individuelles à température ambiante.

IV. 10.2.3. Etude hématologique (107)

Le taux d'hémoglobine a été mesuré à l'aide d'un appareil portable de type « HemoCue® Hb 301 System ». Optimisé pour le dépistage de l'anémie dans les établissements de soins

primaires et dans le cadre des collectes de sang, « HemoCue® Hb 301 System » est une solution simple et pratique qui fournit l'accès facile et rapide à des résultats de qualité professionnelle sans compromettre la précision.

- Principe :

Il consiste en la mesure de l'absorbance du sang total à un point isobestique Hb/HbO₂ ; double longueur d'onde (506 nm et 880 nm) pour mesurer l'hémoglobine et compenser la turbidité. Plus besoin de faire un nouvel étalonnage, il est déjà effectué à l'usine avec la méthode de référence ICSH.

- Mode opératoire :

La pratique s'effectue en trois étapes simples

1. Remplir la microcuvette de sang (environ 10 µL) capillaire, veineux ou artériel
2. Placer la microcuvette dans l'analyseur puis fermer l'appareil
3. Le résultat (la mesure du taux d'hémoglobine exprimée en g/dl) s'affiche sur l'interface imprimante de l'appareil en 10 secondes

IV. 11. Traitement

Tous les patients ont été hospitalisés et ont été traités au centre de santé. Les patients ont été traités par voie orale avec la combinaison Pyronaridine-Artésunate (Pyramax) en fonction du poids corporel, chaque patient a reçu entre 1 et 4 comprimés pyronaridine : artésunate (180 :60 mg) ou granules (60 :20 mg) une fois par jour pendant 3 jours. L'intervalle actuel de niveau de dose couvrant ces régimes est entre 7,5 :2,5 mg/kg à 15 :5 mg/kg de pyronaridine : artésunate.

Les cas d'échecs thérapeutiques ont été traités avec la quinine par voie orale ou injectable en fonction de l'état du patient.

Dès le premier traitement (J0), les sujets ont été suivis activement aux jours J1, J2, J3, J7, J14, J21 et J28 ou autres jours de visite imprévue. Grâce à la disponibilité permanente des cliniciens au centre de santé, ils ont bénéficié d'un suivi passif de 24H/24H. Au cours des différents suivis actifs, une goutte épaisse était faite, des confettis collectés, et un examen physique complet effectué.

Tableau I : Posologie de la pyronaridine-artésunate

Poids	Posologie Jour 1	Posologie Jour 2	Posologie Jour 3
5 à < 8 kg	1 sachet 60mg /20mg	1 sachet	1 sachet
8 à < 15 kg	2 sachets	2 sachets	2 sachets
15 à < 20 kg	3 sachets	3 sachets	3 sachets
20 à < 24 kg	1 comprimés 180mg/60mg	1 comprimés	1 comprimés
24 à <45 kg	2 comprimés	2 comprimés	2 comprimés
45 à < 65 kg	3 comprimés	3 comprimés	3 comprimés
≥65kg	4 comprimés	4 comprimés	4 comprimés

IV. 12. Correction moléculaire de la réponse thérapeutique

L'étude de biologie moléculaire a été effectuée dans le laboratoire de l'Unité d'Épidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance (MEDRU) du Département d'Épidémiologie des Affections parasitaires (DEAP) de la Faculté de Pharmacie (FAPH) de l'Université des Sciences des Techniques et de Technologies de Bamako (USTTB). Nous avons procédé à l'extraction, à l'amplification, à la migration, à la révélation par photographie à la lumière ultra violette de l'ADN plasmodial et à l'interprétation des résultats obtenus. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est la technique que nous avons utilisée pour l'analyse de l'ADN.

Le matériel biologique qui a servi à faire l'analyse moléculaire est l'ADN plasmodial extrait à partir des lames de J0 et celles des jours d'échec. La PCR nichée a été utilisée sur l'ADN des parasites prélevés avant et après traitement pour distinguer la réinfection de la recrudescence, nous avons analysé le polymorphisme génétique du *msp2* et *Cal* à J0 et au jour d'échec du même participant.

PCR classique :

IV. 12. 1. Principe de la PCR classique :

Elle est basée sur l'amplification exponentielle *in vitro* de l'ADN en présence d'amorces spécifiques, de nucléotides, de Taq polymérase et d'un milieu tampon.

IV. 12.2. Extraction de l'ADN plasmodial sur les lames des patients

IV.12.2.1. Matériels et réactifs :

Les matériels requis étaient : blouse, paire de gants, papier hygiénique, lames de gouttes épaisses, rasoir, marqueur indélébile, racks, tubes Eppendorf, Becher, poubelle, pipette (100, 200, 1000), embout (100, 200, 1000), QIAamp DNA Mini Kit, hotte, plaque chauffante, Bain-marie, Vortex, thermomètre, congélateur, chronomètre, éthanol.

IV.12.2.2. Mode opératoire :

L'extraction de l'ADN plasmodial a été faite à l'aide du Kit QIAGEN.

- Cette extraction consiste à raser soigneusement à l'aide d'un rasoir propre la goutte épaisse colorée ou non de la lame, en transférant les débris dans le rebord d'un tube de micro-centrifugation de 1,5 ml.
- En utilisant au total 180µL de tampon ATL, laver la lame et recueillir le lavage dans le tube de micro centrifugation tout en poussant les débris initiaux vers le fond du tube. Incuber à 65°C pendant 10 minutes au bain-marie puis centrifuger brièvement.
- Ajouter 20µL de solution mère de protéinase K, bien mélanger au vortex, et incuber à 56°C dans le bloc thermique pendant 10 minutes avec quelques passages intermittents au vortex
- Centrifugez brièvement, puis ajoutez 200µL de tampon AL, mélangez bien au vortex et incubez à nouveau à 56°C en bloc thermique pendant 10min avec quelques passages au vortex par intermittence.
- Centrifugez brièvement à nouveau et ajoutez 200µL d'éthanol. Mélanger par vortex et centrifuger brièvement.
- Appliquer le mélange à la colonne de spin QIAamp et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min.
- Placer la colonne dans un tube de collecte propre de 2ml et ajouter 500µL de AW1. Centrifuger comme ci-dessus
- Placer la colonne dans un tube de collecte propre de 2ml et ajouter 500µL de AW2. Essorez pendant 3 minutes à pleine vitesse
- Transférer la colonne dans un tube de micro-centrifugation de 1,5 ml propre et étiqueté. Ajouter 100 µL de tampon AE. Incuber à température ambiante pendant 1 min, puis centrifuger à pleine vitesse pendant 1 min.

- Conserver l'éluant à 4°C

IV. 12.3. Amplification de l'ADN plasmodial :

IV. 12.3.1. Matériels :

Les matériels utilisés étaient : blouse, gants, marqueur indélébile, tubes de 200µl ou 500µl et 1500µl, pipettes (2 ; 10 ; 20 ; 100 ; 200 et 1000µl) embout (2 ; 10 ; 20 ; 100 ; 200 et 1000µl), racks, portoirs pour pipettes, thermocycleur, poubelle.

IV.12.3.2. Préparation des réactifs de PCR :

- DNTPs : Une solution de travail équimolaire des quatre dNTPs de 2mM était préparée à partir d'un stock de 100mM.
- Solution tampon (PCR Buffer) : concentrées à 10X, elles étaient fournies par les compagnies commerciales avec le Mg²⁺. Pour le stock de travail, on préparait les aliquotes de 5X avec une teneur de 7,5mM MgCl₂ et 17,5mM MgCl₂.
- Amorces (Primers) : elles venaient de Sigma sous forme de poudre (lyophilisée), à partir de la poudre, le stock de travail 100 µM (ou 100 X) était préparé ; la concentration finale dans le tube réactionnel était de 1µM.
- Tri borate d'éthidium : pour constituer une solution de stock de travail d'un litre avec une concentration de 5 fois ou 5X et avec un pH=8. On prenait 54g de Tris base (89mM) ; 27,5g d'acide borique (89mM) ; et 0,37g d'acide éthylène -Diamine- tétra -Acétique Na (2mM), pour dissoudre dans un litre d'eau de-ionisée. La solution finale était 0,5 fois concentrée soit 0,5X.
- Colorants de migration : Il s'agit du bleu de bromophénol (BB). Pour préparer on prenait 35ml de glycérol, 15ml d'eau de-ionisée et 0.125g de bleu de bromophénol
- Marqueur de poids moléculaire : ce marqueur de poids moléculaires constituait la solution de référence. Pour le ré suspension, on dilue 100µl de paires de bases de l'ADN dans 400µl d'eau stérile. Puis on associe 100µl du colorant bleu six fois concentré, pour former un mélange de 600µl.

IV.12.3.3. Techniques d'amplification de *msp2*, *Ca1*

IV.12.3.3.1. Détermination des polymorphismes de *msp2* :

❖ Première amplification pour *msp2* :

- Identifier les tubes de 200 ou 500 µl conformément aux numéros des confettis à traiter
- Préparer le master mix dans un tube de 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction par réaction,
- Repartir dans chaque tube identifié 24 µl de Master mix
- Ajouter 1 µl d'ADN extrait au Qiagen dans chaque tube correspondant

- Centrifuger brièvement les tubes,
- Placer les tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié,

Couples d'amorces de la première amplification :

MSP2 :

- S2 : GAAGGTAATAAAAACATTGTC
- S3 : GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG

Tableau II : Mélange réactionnel pour un volume final de 25 µl (MSP2) première amplification.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction en µL
Buffer/MgCl₂	5X/7,5mM	1X/1,5mM	5
10X dNTPs	10X/2mM	1X/200uM	2,5
Amorces (S2 et S3)	100X/10µM	1X/100nM	0,25
Taq polymérase	5U/µl	0,025U	0,125
Eau	-	-	16,125
Volume total			24

On ajoute dans chaque tube 1 µl de l'ADN extrait au Qiagen.

❖ Deuxième amplification :

- Identifier les tubes de 200 ou 500 µl conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter,
- Préparer le Master mix dans un tube de 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon les tableaux ci-dessous,
- Repartir dans chaque tube identifié 24 µl de Master mix,
- Ajouter un volume du produit de la 1ère amplification dans chaque tube correspondant en fonction de la présence de la bande (0,5 µl) ou des trainées (0,1 µl),
- Centrifuger brièvement les tubes, fermer et placer les tubes dans le Thermocycleur pour l'amplification selon le programme approprié,
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose : 1,8% pour MSP2
- Faire la photo du gel,
- Interpréter la photo.

Couples d'amorces de la deuxième amplification :

MSP2 : [500 pb]

- **S1 : GAGTATAAGGAGAAGTATG**
- **S4 : CTAGAACCATGCATATGTCC**

Tableau III: Mélange réactionnel pour un volume final de 25 µl (MSP2) deuxième amplification

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction en µL
Buffer/MgCl₂	5X/17,5mM	1X/ 3,5mM	5
10X dNTPs	2mM	200uM	2,5
Amorces (S1 et S4)	10µM	100nM	0,25
Taq polymérase	5U/µl	0,05U	0,125
Eau	-	-	16,125
Volume total			24

On ajoute 1 µl du produit de la 1ère amplification

❖ Différents programmes d'amplification

Tableau IV: Programme de la première amplification MSP2

	Étapes	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	94°C	3 min
2	Dénaturation	94°C	25 sec
3	Hybridation	42°C	60 sec
4	Elongation	65°C	2 min
5	Retourner à l'étape 2 pour 29 cycles		
6	Elongation finale	72°C	3 min
7	Conservation	4°C	Infini

Tableau V : Programme de la deuxième amplification MSP2

Etapas		Température	Temps
1	Dénaturation initiale	94°C	3 min
2	Dénaturation	94°C	25 sec
3	Hybridation	50°C	60 sec
4	Elongation	70°C	2 min
5	Retourner à l'étape 2 pour 29 cycles		
6	Elongation finale	72°C	3 min
7	Conservation	4°C	Infini

IV. 12.3.3.2. Détermination du polymorphisme du microsatellite Ca1**❖ Première amplification**

Couples d'amorces pour Ca1 :

Ca1-1R : CAATTCTGCTTCAGTTGGATT

Ca1-1L : AACATGAATCTTGCAACAAATA

Tableau VI: Mélange réactionnel pour un volume final de 25µl (Ca1) première amplification.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction en µL
Buffer/MgCl₂	5X/17,5mM	1X/ 3,5mM	5
10X dNTPs	2mM	200µM	2,5
Amorces (Ca1-1L et Ca1-1R)	100 Um	1µM	0,25
Taq polymérase	5U/µl	0,025U	0,125
Eau	-	-	16,125
Volume total			24

On ajoute 1 µl de l'extrait d'ADN par tube.

Deuxième amplification :

Couple d'amorces pour Ca1 :

Ca1-L : ATTATGAACAATTCAGAC

Ca1-R : GTTGTTATAGCTAATGAG

Tableau VII : Mélange réactionnel pour un volume final de 25 µl (Ca1) deuxième amplification

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction en µL
Buffer/MgCl₂	5X/17,5mM	1X/ 3,5mM	5
10X dNTPs	2mM	200µM	2,5
Amorces (Ca1-R et Ca1-L)	100 µM	1µM	0,25
Taq polymérase	5U/µl	0,025U	0,125
Eau	-	-	16,125
Volume total			24

On ajoute 1 µl du produit de la première amplification

Tableau VIII: Programme du microsatellite Ca1 première amplification.

	Etapes	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	5 min
2	Dénaturation	92°C	30 sec
3	Hybridation	45°C	30 sec
4	Elongation	65°C	30 min
5	Retourner à l'étape 2 pour 44 cycles		
6	Elongation finale	65°C	5 min
7	Conservation	4°C	Infini

Tableau IX: Programme de la deuxième amplification Ca1 :

	Etapes	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	5 min
2	Dénaturation	92°C	30 sec
3	Hybridation	45°C	30 sec
4	Elongation	65°C	30 min
5	Retourner à l'étape 2 pour 19 cycles		
6	Elongation finale	65°C	5 min
7	Conservation	4°C	Infini

IV. 12.4. Révélation de l'ADN à la photographie :**IV. 12.4.1. Matériels :**

Les matériels utilisés étaient : Blouse, paire de gant, balance analytique, (peser des produits), flacons d'erenmeyer, spatule, le four à micro-onde, pipette 20 µl, embout 20 µl, le moule, le scotch, le peigne, le back de migration, le générateur, laboratory film (parafilm M), la chambre à UV (ultra-violet), l'ordinateur, l'imprimante.

IV. 12.4.2. Réactifs et préparation pour la révélation de l'ADN :**IV. 12.4.2.1.TBE (Tris Borate EDTA) :**

Ce sont des poudres à dissoudre dans de l'eau de-ionisée. Nous dissolvons le TBE (Tris ase (89mM) = 108 g, Acide borique (89mM) =55 g, EDTA (2mM) = 0,74 g) dans un litre d'eau

de-ionisée pour obtenir un stock de travail. Cette solution est à 10X. La solution finale utilisée est de 0,5X.

IV. 12.4.2.2. Solution de migration :

Elle était constituée du TBE à une concentration de 0,5X.

IV.12.4.2.3. Colorant de migration :

Appelé « dye », le bleu de bromophénol (BB) est le colorant qui permet de suivre la migration sur le gel et de maintenir le produit de migration, assez longtemps dans les puits en augmentant les poids.

IV.12.4.2.4. Marqueur de poids moléculaire (PM) :

Il constitue la solution de référence et sa dilution était faite dans du dye et de l'eau de-ionisée. À un volume de marqueur étaient ajoutés un volume de dye et 9 volumes d'eau de-ionisée et la solution prête pour l'usage. En effet le dye augmente d'une part le poids de l'ADN et d'autre part permet de suivre l'évolution de l'électrophorèse.

IV.12.4.2.5. Gel de migration :

Il est fait à partir de 2 g de poudre d'agarose dissoute dans 100ml de TBE à 0,5X. La solution est ensuite chauffée dans un four à micro-onde pendant 3 min, permettant ainsi la dissolution complète de l'agarose. Après le chauffage, on y ajoute du bromure d'éthidium (3µl), puis le gel est coulé dans le moule de migration contenant les peignes. Au bout de 30 min, le gel est prêt à être utilisé pour la migration.

IV.12.4.2.6. Le bromure d'éthidium :

C'est un produit qui va s'insérer entre les brins d'ADN et les rend fluorescents à la lumière ultra violette.

IV.12.4.3. Interprétation des résultats *msp2* et *Cal* :

L'interprétation de la photographie du gel tient compte des conditions suivantes :

- 1) Conformité de la taille du produit de la deuxième amplification par rapport à celle attendue
- 2) Taille du produit de la deuxième amplification : (entre 400pb et 700pb pour *msp2*) ;
- 3) Taille du produit de la deuxième amplification : (autour de 264 pb pour *Cal*) ;
- 4) L'absence de bandes au niveau des contrôles négatifs ;
- 5) Les échantillons présentant des bandes de même taille sont considérés comme identiques ;
- 6) Les échantillons présentant des bandes de taille différentes sont non identiques
- 7) Les échantillons présentant plusieurs bandes sont considérés comme des infections mixtes.

IV. 13. Analyse et gestion des données

Nos données ont été saisies et analysées respectivement à l'aide des logiciels *REDcap* et R.

V. 14. Contrôle de qualité des lames réalisées sur le terrain et des gels d'électrophorèse

Le contrôle de qualité pour la phase de terrain a porté sur les 25% des lames de l'étude qui ont été relues par un microscopiste du MRTC n'ayant pas participé à la phase de terrain. Le contrôle de qualité des photos de gels a été aussi fait par un investigateur non impliqué dans l'analyse moléculaire.

RESULTATS

V. RESULTATS

Nous avons inclus au total 452 participants dans notre étude.

V. 1. Profil de l'étude PYRAMAX

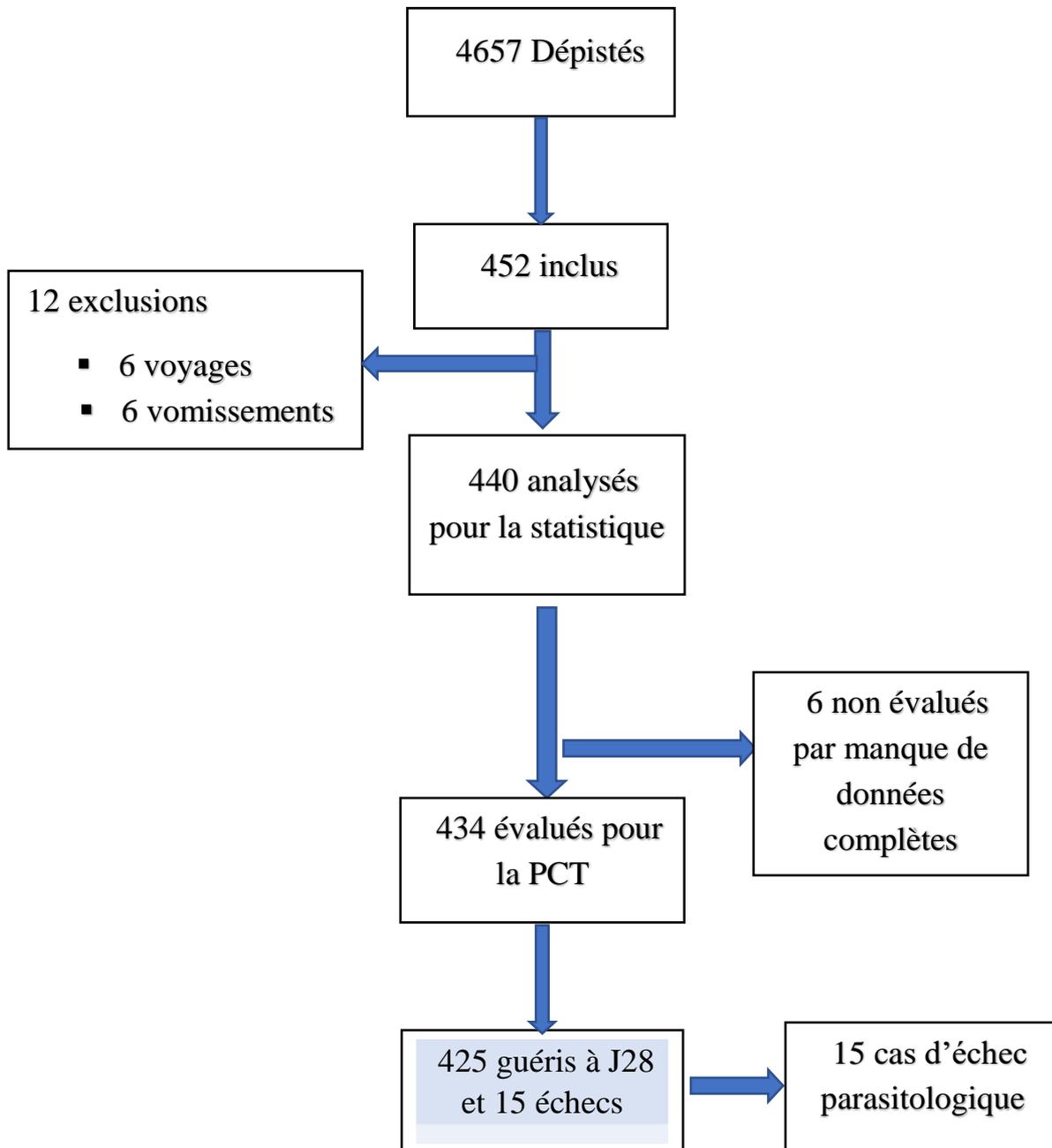


Figure 16: Diagramme du Flux récapitulatif des inclusions

V. 2. Caractéristiques de base à l'inclusion

Au total 440 patients ont reçu la Pyronaridine-Artésunate. Le sexe féminin était prédominant avec 52%. Les moins de 5 ans étaient faiblement représentés dans notre étude 15,98%. 87%

des patients étaient fébriles à l'inclusion. 42,5% des patients présentaient une anémie à l'inclusion. L'espèce *falciparum* était la plus prévalente 99,3% (tableau X).

Tableau X: Caractéristiques démographiques et cliniques de base

Pyronaridine-Artésunate	
Caractéristiques/variables	Effectifs (%) /moyenne
Sexe	
Masculin	212 (48%)
Féminin	228 (52%)
Age(années), moyenne (SD)	8 (3,7)
Catégories d'âge	
< 5ans	70 (15 ,98%)
≥5ans	368 (84 ,01%)
Poids corporel en kg	
Moyenne, (SD)	24,8(10,4)
Groupes de poids en kg	
< 20	149 (33,8%)
≥ 20	291(66 ,2%)
THb moyen g/dl, (SD)	11(1,6)
Anémie à l'inclusion n (%)	187 (42,5%)
Fièvre à l'inclusion n (%)	383 (87%)
Espèces plasmodiales n (%)	
<i>P. falciparum</i>	437 (99,3%)
<i>P. malariae</i>	3 (0,70%)
<i>P. ovale</i>	0,00%
<i>P. vivax</i>	0,00%
Mixte (<i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i>)	0,00 %
Parasitémie moyenne géométrique formes asexuées /μL de sang, [SD (min-max)] à J0	30242[53.680,73 (1000 - 517680)]
Portage gamétocytes n (%)	22 (5%)

N=Nombre total, *n*= Effectif, %= Pourcentage, THb= Taux d'hémoglobine, μL= microlitre,

Les données sont n (%) ou moyenne,

V. 3. Efficacité thérapeutique *in vivo* avant la correction moléculaire

L'analyse statistique a porté sur les 440 patients, la RCPA non corrigée à J28 post traitement était de 97%. Il n'y avait pas d'échec thérapeutique précoce (**tableau XI**).

Tableau XI: Réponse clinique et parasitologique brute à J28 post traitement

EFFICACITE	EFFECTIF n (%)
ETP	0
ECT	2 (0,45)
EPT	13 (2,95)
RCPA	425 (96,60)
Total	440 (100)

ETP = Echec Thérapeutique Précoce, ECT= Echec Clinique Tardif, EPT= Echec Parasitologique Tardif, RCPA= Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate

V. 4. Efficacité thérapeutique *in vivo* après la correction moléculaire

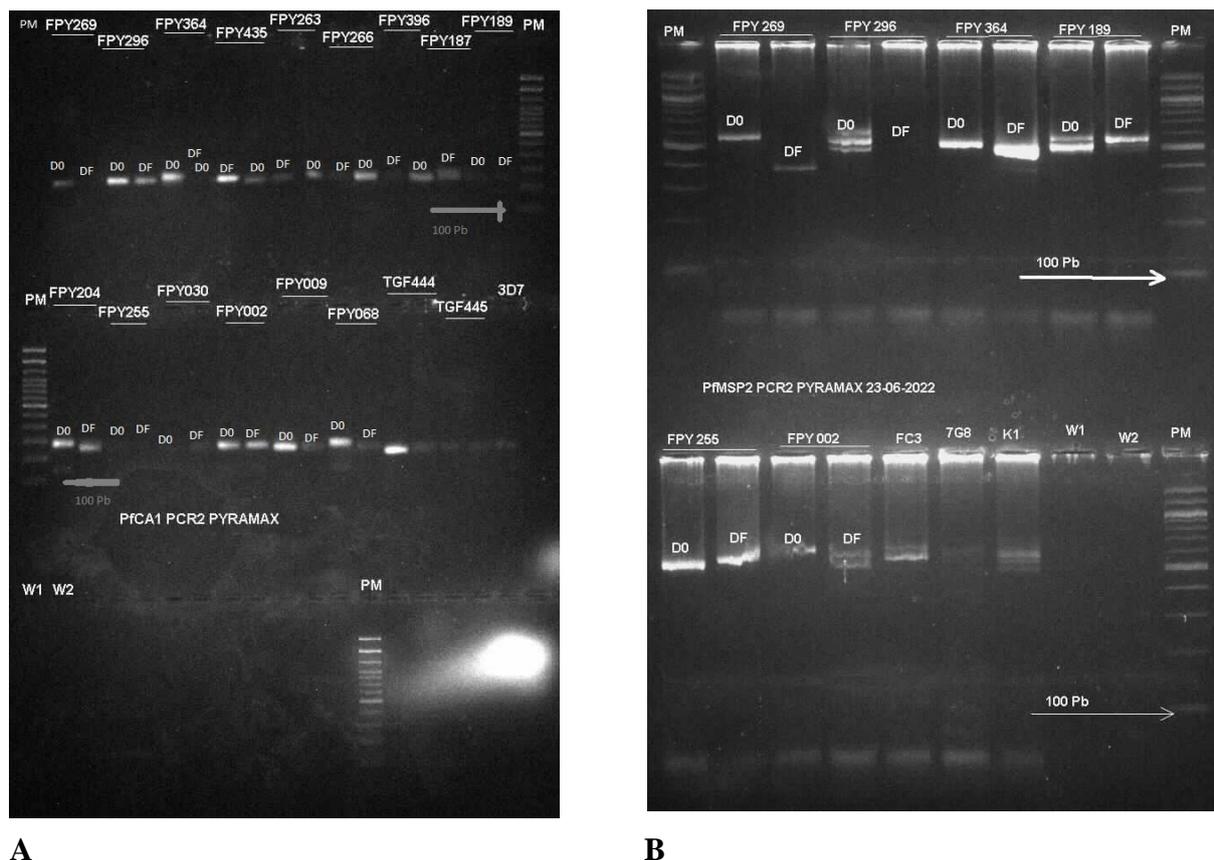
L'analyse après la correction moléculaire a porté sur 440 patients. Le profil d'un échantillon n'a pas pu être déterminé à cause de sa faible parasitémie. La RCPA corrigée à jour 28 était de 99,8%. Un cas d'échec parasitologique tardif a été identifié ; il n'y a eu aucun ETP ni ECT (**tableau XII**).

Tableau XII: Réponse clinique et parasitologique corrigée à J28 post traitement

EFFICACITE	EFFECTIF n (%)
ETP	0
ECT	0
EPT	1(0,2)
RCPA	438(99,8)
Total	440 (100)

ETP = Echec Thérapeutique Précoce, ECT= Echec Clinique Tardif, EPT= Echec Parasitologique Tardif, RCPA= Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate

V. 5. Polymorphisme du *Pfmsp2* et du microsatellite *Ca1*

**Figure 17: Photo du gel de *Ca1* (A) et *msp2* (B)**

PM : Poids moléculaire, Pb : Paire de base, DO : Jour d'inclusion, DF : Jour d'échec, msp2 : protéine à la surface de mérozoite 2, Ca1 : microsatellite Ca1

V. 6. Le temps de la clairance parasitaire

La demi-vie médiane de la clairance parasitaire était de 2 heures et 45 minutes (figure 18) Interquartiles (2,14-2,83).

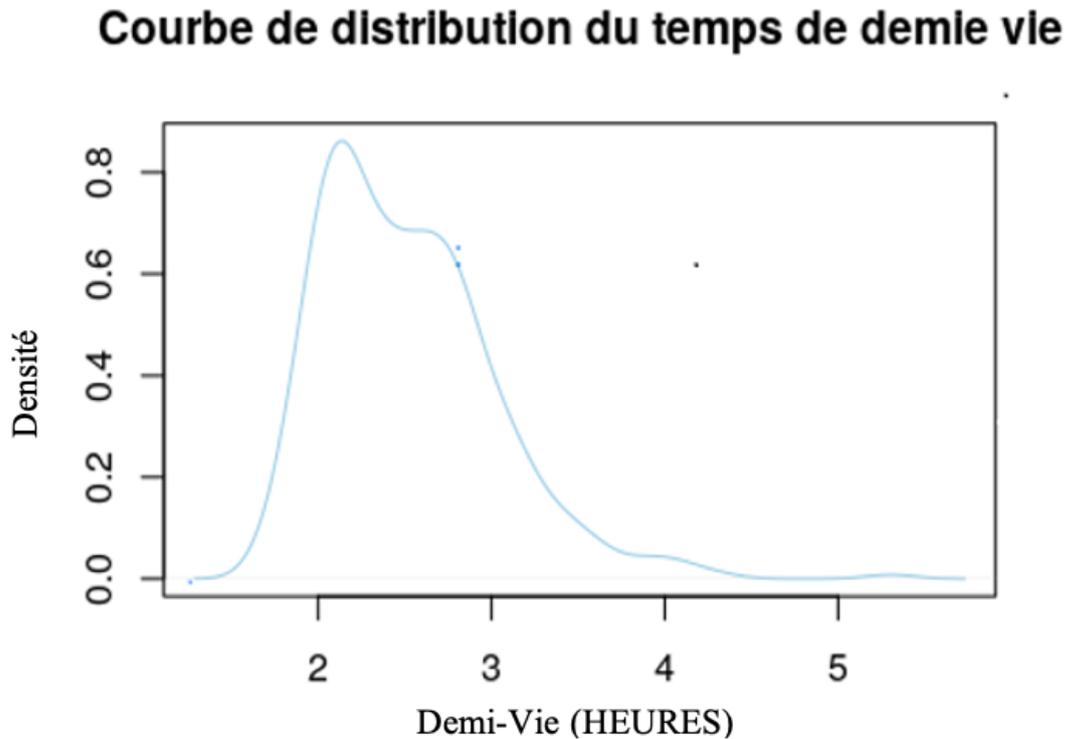


Figure 18: Distribution de la demi-vie de clairance parasitaire

V. 7. La clairance des densités parasitaires en fonction du temps

72 heures après le traitement, aucun des patients n'avait une parasitémie détectable au microscope (figure 20). Le temps médian pour éliminer 50% des parasitémies initiales était de 5h38 min et 10,6 heures pour éliminer 90% des parasitémies initiales (**tableau XIII**).

Tableau XIII : Résumé du temps nécessaire pour éliminer 50%, 90%, 95% et 99% de la parasitémie (heures)

STATISTIQUES			
	Médiane (Heure)	Gamme	Interquartiles
PCT50	5,38	(0,16 - 25,21)	(3,78 – 6,90)
PCT90	10,65	(2,87 – 56,50)	(8,87 – 13,36)
PCT95	13,05	(4,75 – 72,22)	(11,11 – 16,07)
PCT99	18,82	(9,11 -108,70)	(16,25 – 22,52)

V. 8. La clairance des parasites à J3 post traitement

A H24, 64% des patients avaient éliminé leurs parasites (**figure 19**). A J3, tous les patients avaient éliminé leur parasite. Au cours du suivi post traitement nous avons observé l'apparition de quelques cas positifs (cas d'échecs thérapeutiques) à J14, J21 et J28

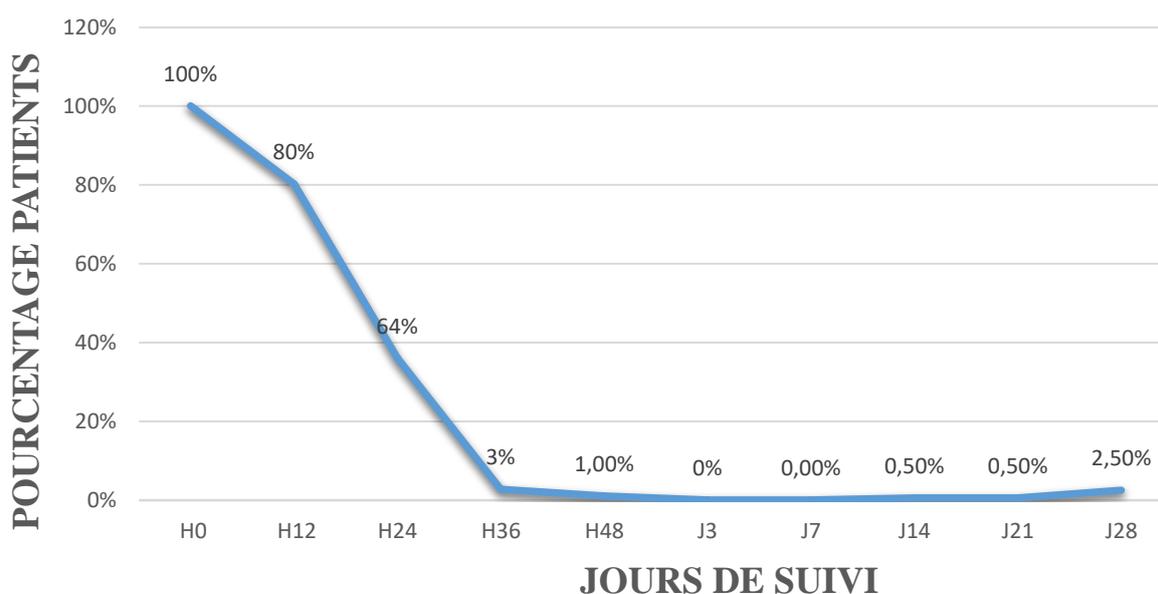


Figure 19 : Clairance des parasites à J3 post traitement

V. 9. La clairance de la fièvre

A l'inclusion 87% des patients avaient de la fièvre (**figure 20**) (température axillaire \geq à 37,5°C) et à J3 de suivi post traitement 12% étaient encore fébriles.

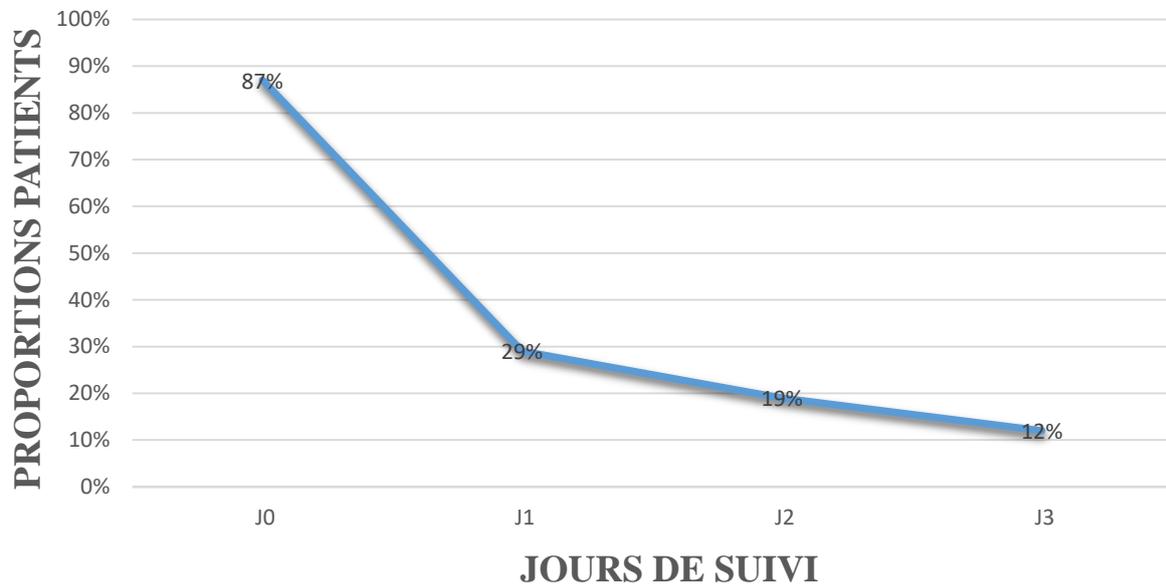


Figure 20 : Dynamique de de la fièvre au cours du suivi

V. 10. Evolution de l'anémie durant le traitement à la Pyronaridine-Artésunate

A l'inclusion 20,90% des patients présentaient une anémie (**figure 21**) (THb< 10g /dl), ce pourcentage est significativement ($p < 0,0001$) passé à 6,81% à J28.

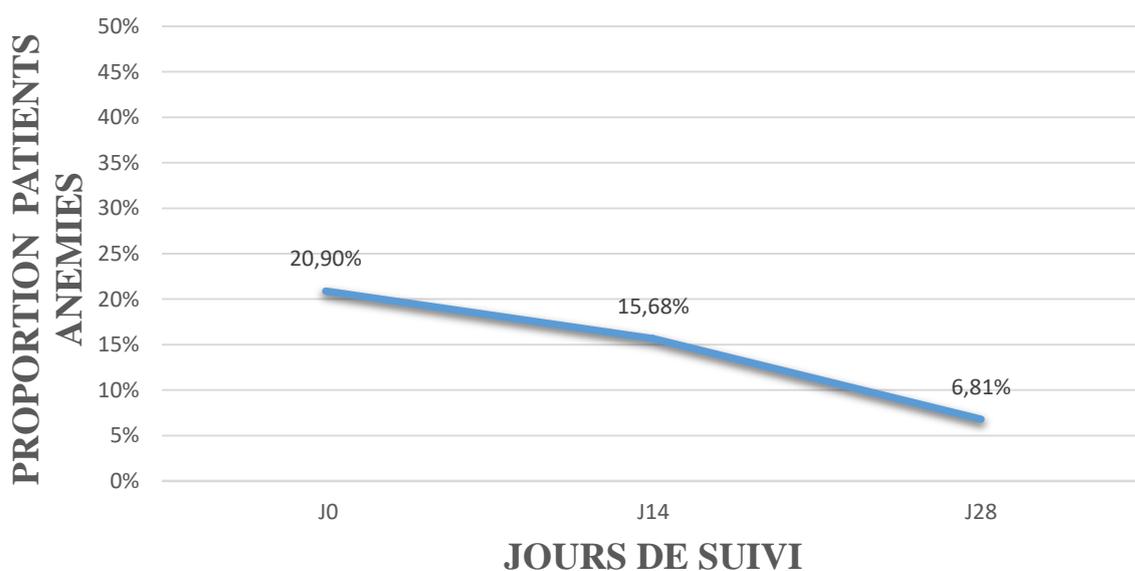


Figure 21: Tendence à la réduction du taux de l'anémie suite au traitement

V. 11. Evolution de la gamétoctémie au cours du suivi

A J0 le taux de portage des gamétoctes était de 5% (**figure 22**), ce taux a légèrement augmenté de H12 à H24 puis est devenu constant de H24 à H48 et ensuite a diminué progressivement de H72 à J28. Il n'y avait pas de différence significative du taux de portage entre H24 et H36 ($p = 0,99$; 95% IC).

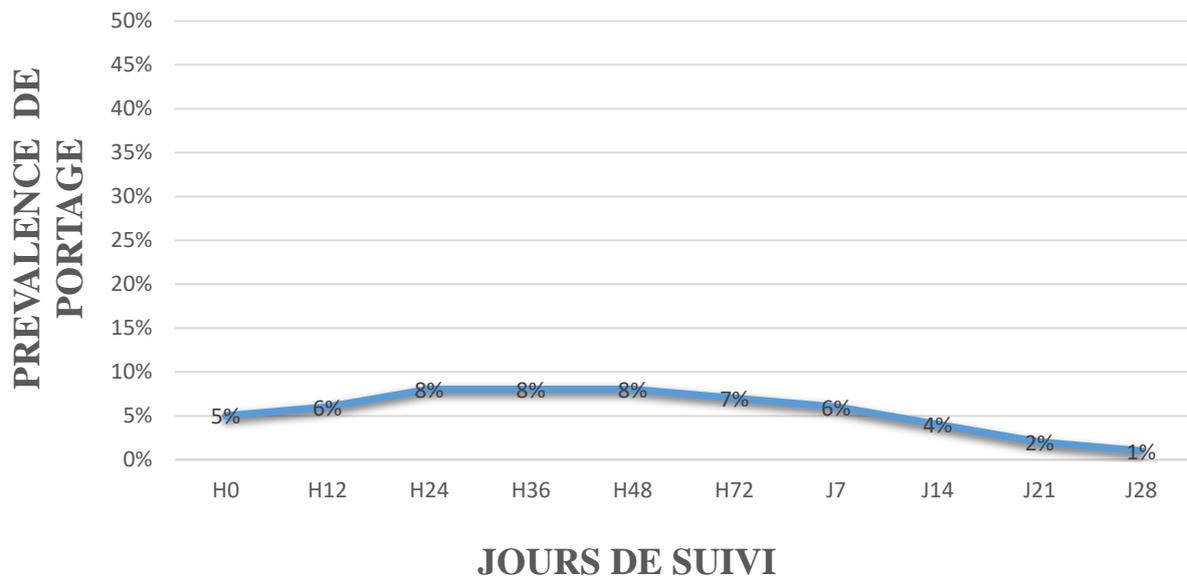


Figure 22: Evolution de la gamétoctémie au cours du suivi

V.12. Evolution des symptômes cliniques sous traitement

A l'inclusion tous les patients présentaient au moins un des signes apparemment de l'infection palustre. Après l'initiation du traitement, nous avons observé une clairance totale des signes cliniques dès le deuxième jour du traitement seules les céphalées et la douleur abdominale ont légèrement persisté (**figure 23**).

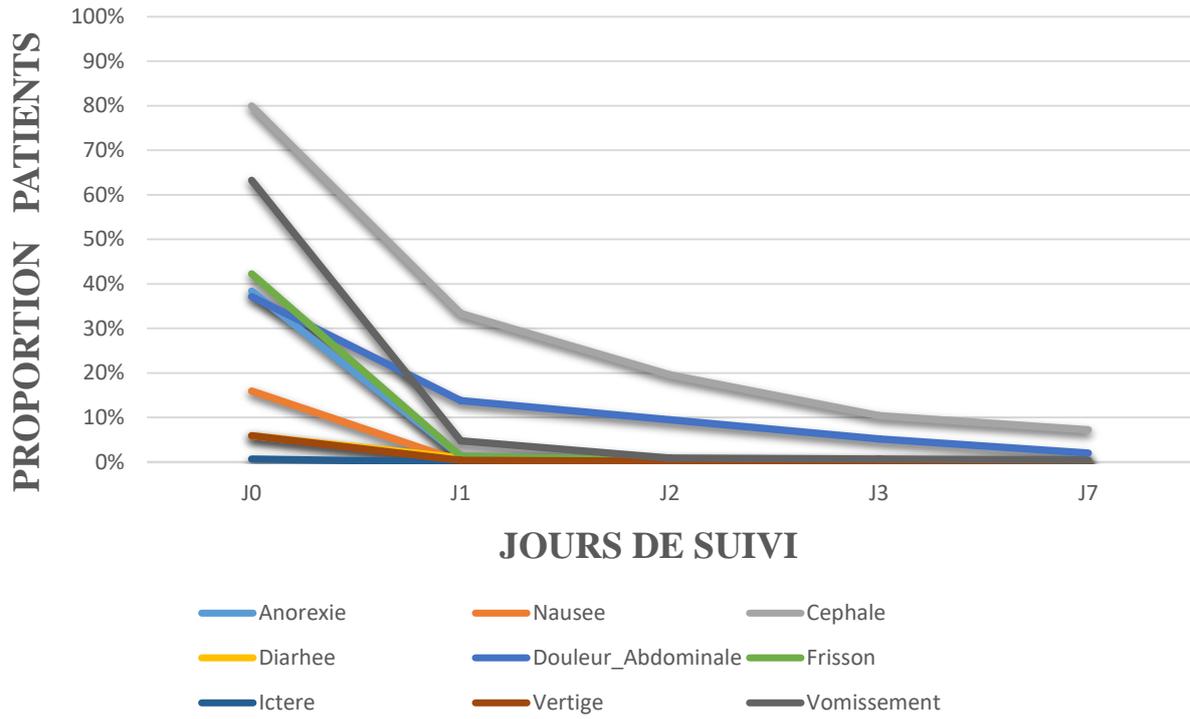


Figure 19: Evolution des symptômes cliniques après traitement

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

VI. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Cette étude prospective longitudinale s'est déroulée à Faladjè qui est une zone à paludisme hyper endémique saisonnier. Le choix de la localité se justifiait également par son accessibilité géographique facile. L'étude visait à évaluer l'efficacité *in vivo* de la combinaison Pyronaridine-Artésunate sur *Plasmodium* spp en déterminant le temps de la clairance parasitaire ainsi que la réponse clinique et parasitologique adéquate à 28 jours de suivi.

✓ Les caractéristiques de base de la population d'étude

Le sexe féminin représentait 52% de notre population d'étude. Ce résultat était proche de ceux de deux sous études de l'essai WANECAM réalisées par Sagara et *al.* qui étaient de 50% et de 49% respectivement (Mali, Burkina Faso, Guinée, 2011-2016)(14) et (Mali, Burkina Faso, 2011-2013) (13).

Les moins de 5 ans étaient faiblement représentés dans notre étude 15,98%. Ce chiffre est similaire à celui trouvé par Sagara et *al* au Mali et au Burkina (2011-2013) qui était de 17% mais inférieur à celui du Mali, Burkina Faso, Guinée (2011-2016) par Sagara et *al* qui était de 23% (14). Cette différence pourrait s'expliquer par l'implémentation de la stratégie de CPS chez les enfants de moins de 5 ans.

Dans notre étude, 66% de nos patients pesaient 20 kg et plus qui était proche de celui trouvé au Mali et au Burkina par Sagara et *al* (2011-2013)(13) dont 68% de leur population d'étude avaient un poids corporel supérieur ou égale à 20 kg.

Le taux moyen d'Hb dans notre étude était de 11g/dl et ce taux concordait avec celui de Johanna et *al* au Kenya (108) qui ont eu un taux moyen de 11,8 g/dl malgré le fait que cette étude ait ciblé une population beaucoup plus juvénile avec un intervalle d'âge très restreint (6mois à inférieur ou égale à 12 ans) par rapport à notre étude dont la gamme était plus élargie (6mois et plus).

L'espèce *P. falciparum* était prédominante à 99,3%. Cela s'explique par le fait que notre site de Faladjé est une zone hyper endémique à prédominance *P. falciparum*. Ce résultat est similaire à celui de Sagara et *al* publié en 2018 (14) qui ont eu 99% de *P. falciparum*. La parasitémie moyenne dans notre étude était de 30242 parasites/ μ L de sang. Cette parasitémie pourrait s'expliquer par le fait que l'enrôlement dans notre étude s'est tenu pendant la période de forte transmission du paludisme (juillet-octobre).

La fièvre était définie comme une température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C. A l'inclusion 87% de nos patients présentaient de la fièvre qui était supérieur à celui de Sagara

et *al.* en 2016 (13) qui ont trouvé 64% de patients fébriles à l'inclusion. Cette fréquence importante dans notre étude peut s'expliquer par le fait que la plupart de ces patients avaient une forte parasitémie.

A l'inclusion, 5% de nos patients étaient porteurs de gamétocytes. Ce taux était inférieur à celui de Dabira et *al.* en Gambie et en Zambie 2018-2019(109) qui ont eu 17,2% de portage chez des patients asymptomatiques.

✓ **Évaluation de l'efficacité du traitement**

Dans notre étude, nous avons obtenu une RCPA non corrigée de 96,6%. Ce résultat est similaire à celui de Sagara et *al.* 2011-2016 (14) qui ont trouvé 96,9% de RCPA non corrigée pour la Pyronaridine-Artésunate. Cependant, ce taux est supérieur à ceux de Johanna et *al.* (Kenya 2018) (108) et de Sagara et *al.* (Mali, Burkina Faso 2011-2013) (13) qui ont trouvé respectivement 91,6% et 92,7%. En revanche, Dabira et *al.* (Gambie et Zambie 2018-2019) (109) ont eu une RCPA non corrigée de 98% avec le régime de 3 jours. Ce taux était légèrement supérieur au nôtre et pourrait s'expliquer par les faibles densités parasitaires collectées dans cette étude (20-38960 parasites / μ L) contre (1000-517160 parasites / μ L) et probablement du fait que les patients étaient asymptomatiques à l'inclusion.

Par comparaison aux CTAs de première intention recommandée par l'OMS, notre taux d'efficacité était supérieur à ceux rapportés par Sagara et *al.* en 2018 (Mali, Burkina Faso et Guinée) (14) qui étaient respectivement de 82,3% et 89% pour l'Artémether-Luméfantrine et l'Artésunate-Amodiaquine. Notre taux était également supérieur à celui d'une étude menée au Kenya par Johanna et *al.* en 2016 qui ont rapporté une RCPA non corrigée de 88,2% pour AL (108).

L'OMS définit une CTA efficace lorsqu'elle atteint une RCPA corrigée supérieure à 95% à J28 post traitement. Nous avons trouvé une RCPA corrigée de 99,8% qui est au-dessus du seuil de l'OMS. Ce taux était similaire à celui de Sagara et *al.* en 2018(14) qui était de 99,7% mais supérieur à ceux rapportés par Sagara et *al.* (2011-2013)(13) Kayentao et *al.* (Oct. 2012)(110) et Johanna et *al.* (Kenya 2018)(108) qui ont trouvé respectivement 95,2%, 97,1% et 98,9% pour la pyronaridine-artésunate. En revanche, Dabira et *al.* (Gambie et Zambie 2018-2019)(109) ont trouvé une RCPA corrigée de 100% pour la PA avec le régime de 3jours.

Nous n'avons pas enregistré d'échec thérapeutique précoce dans notre étude. Ce résultat concordait avec celui de Johanna et *al.* (Kenya 2016) (108) qui n'ont pas eu également d'ETP.. Avant la correction moléculaire 15 cas d'échecs (ECT et EPT) ont été enregistrés dans notre étude et étaient supérieurs à ceux trouvés par Johanna et *al.* (108)qui ont eu 8 échecs (ECT et

EPT), cette différence pourrait s'expliquer par la taille petite des échantillons de cette étude par rapport à notre étude 101 contre 440 inclus.

Des études antérieures d'efficacité et d'innocuité de la Pyronaridine-Artésunate ont rapporté un ensemble de signes et symptômes cliniques comme étant des événements indésirables survenus durant et ou après le traitement par la PA (13,14,108,109). Dans notre étude au cours du suivi, nous avons plutôt observé une amélioration nette de ces signes et symptômes cliniques déjà présentés à l'inclusion par nos patients dont certains sont des signes évocateurs de l'infection palustre (**tableau IV**), ce qui nous amène à dire que le traitement par la PA a considérablement contribué à l'amélioration de ces signes et symptômes cliniques. Cette observation est soutenue d'une part, par Sagara et *al* en 2016 (13) et en 2018(14) qui ont également rapporté respectivement une diminution des signes cliniques entre les premiers épisodes et les épisodes répétés de paludisme chez les patients traités avec la pyronaridine-artésunate. D'autre part, des études réalisées en Gambie et en Zambie 2018-2019 par Dabira et *al* (109) chez des patients asymptomatiques traités suivant différents régimes thérapeutiques avec la pyronaridine-artésunate ont rapporté une moindre incidence des symptômes émergents du paludisme avec les régimes de 3 jours

✓ **Clairance parasitaire, clairance de la fièvre, portage des gamétocytes et anémie au cours du suivi**

Dans notre étude, 24 heures après l'initiation du traitement, 64% des patients avaient éliminé leurs parasites. Cette proportion était plus élevée comparée à celles de Sagara et *al* 2018 (14) avec 38,1% de patients à H24 ayant éliminé leurs parasites dans le bras PA et seulement 29,0% dans le bras AL. Tous nos patients étaient exempts de parasites à J3 post traitement. Ce résultat concorde avec les résultats de Dabira et *al* 2019 (109) qui ont également observé une clairance à J3 post traitement avec le régime de 3 jours par contre Aminatou et *al*(106) n'ont pas observé cette clairance parasitaire après 72 heures de traitement sur le même site de Faladjè entre octobre 2015 et mars 2016 car ils avaient toujours des patients positifs à J3. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que cette étude a évalué l'efficacité de l'artésunate en monothérapie alors que notre étude a évalué celle de la combinaison pyronaridine-artésunate d'où une efficacité synergique des deux antipaludiques. De même le PCT rapporté par cette étude (2.8 h) était plus long comparé à celui de notre étude (2.4h), ce qui confirme l'efficacité de deux molécules antipaludiques en combinaison. Ceci étant, une remarque pertinente est à souligner quant à la distribution de la demi-vie de clairance parasitaire entre cette étude et la nôtre. Nous avons observé que la courbe de la distribution de demi-vie de clairance parasitaire de l'artésunate en monothérapie en 2015 à Faladjè est similaire à celle (figure18) de la

présente étude de l'artésunate en association avec la pyronaridine également conduite à Faladjè, ce qui nous indique que l'artésunate a toujours la même efficacité dans le traitement du paludisme à Faladjè.

Le temps médian de la clairance de la fièvre était de 24 heures et concordait avec celui de Johanna et *al* au Kenya (108) qui ont eu 24,8 heures. Vingt-neuf pourcent (29%) de nos patients avaient la fièvre (t° axillaire $\geq 37,5$) après 24 heures de traitement, 19% à J2 et 12% étaient encore fébriles à J3. Ces résultats diffèrent de ceux de Johanna et *al* au Kenya (108) qui ont eu une clairance de 100% à J3 post traitement pour la pyronaridine-artésunate ainsi que pour AL. Cette persistance de la fièvre jusqu'à J3 dans notre étude n'est pas due à la présence des parasites dans le sang car nous avons observé une clairance parasitaire totale à J3. Ainsi elle pourrait s'expliquer par l'effet des toxines de parasites encore présentes dans le sang ou la présence de pathologies sous-jacentes au paludisme.

Le portage de gamétocytes dans notre étude était de 5% à J0, 6% à J7, 4% à J14 et ont persisté jusqu'au jour 21 et 28. Cette diminution lente et progressive des gamétocytes s'explique par le fait que la PA a une action limitée dans l'élimination des formes sexuées du *Plasmodium* qui dépend principalement du composant non artémisinine (111,112). En revanche, Dabira et *al* (Gambie, Zambie 2019) (109) ont eu une clairance gamétocytaire à J21 avec le régime de 3 jours. Cela pourrait s'expliquer par le fait que cette étude avait de faibles densités gamétocytaires par rapport à notre étude.

A l'inclusion 20,90% des patients présentaient une anémie et ce pourcentage est passé de 15,68% à J14 à 6,81% à J28. Cette diminution de l'anémie laisse déduire une correction de l'anémie suivant le traitement à la PA. Johanna et *al* (Kenya 2018) (108) ont également rapporté une amélioration des concentrations du taux d'Hb qui avaient diminué au jour 3 puis se sont rétablies au jour 28.

✓ **Limites de l'étude**

Une des limites de notre étude est l'absence d'un bras comparateur. Une autre limite de notre étude était l'absence de suivi des paramètres biochimiques des patients. Ces données constituent des facteurs déterminants quant au profil d'innocuité de la Pyronaridine-Artésunate. Des études cliniques antérieures menées dans différentes régions ont rapporté des augmentations transitoires de ALT (Alanine aminotransférase) et AST (Aspartate aminotransférase) chez certains patients traités avec la PA qui ont été définis comme des événements indésirables. Ainsi, il serait intéressant de faire une surveillance de ces paramètres biochimiques qui allait certainement mieux nous renseigner sur l'incidence des événements indésirables.

CONCLUSION

VII. CONCLUSION

Les résultats de cette étude montrent que la Pyronaridine-Artésunate reste efficace dans le traitement du paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum* à Faladjè. L'efficacité de la Pyronaridine-Artésunate était de 99,8% après correction moléculaire à 28 jours de traitement. Le temps de clairance parasitaire était plus court (2,45 Heures) par rapport à ceux des études antérieures. La correction de l'anémie a été observée chez les patients au cours du suivi.

RECOMMANDATIONS

VIII. RECOMMANDATIONS

- **Aux autorités sanitaires et administratives**
 - Promouvoir la surveillance de l'efficacité de la Pyronaridine-Artésunate à plus grande échelle et dans différentes localités du territoire afin d'anticiper toute éventuelle résistance à cette combinaison vue qu'elle est la toute dernière CTA à avoir l'AMM au Mali
 - Mettre à disposition et solliciter l'utilisation de la Pyronaridine-Artésunate dans le traitement du paludisme non compliqué à cause de sa simplicité d'administration (simple dose journalière)
- **Aux chercheurs**
 - Continuer à monitorer l'efficacité de la combinaison Pyronaridine-Artésunate.
 - Continuer à évaluer la sécurité biochimique de la Pyronaridine-Artésunate.

REFERENCES

IX. REFERENCES

1. Li P, Zhao Z, Xing H, Li W, Zhu X, Cao Y, et al. Plasmodium malariae and Plasmodium ovale infections in the China-Myanmar border area. *Malar J*. 2016;15(1):1–10.
2. OMS. Rapport 2021 sur le paludisme dans le monde Dossier d'information Principaux messages. 2021;
3. OMS. Rapport 2021 sur le paludisme dans le monde. 2021;
4. UNICEF/WHO. Reversing the Incidence of Malaria 2000–2015. WHO Glob Malar Program [Internet]. 2015;1–40. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/184521/1/9789241509442_eng.pdf?ua=1
5. OMS GP to RBM. Les Combinaisons thérapeutiques antipaludiques : rapport d'une consultation technique de l'OMS 4-5 avril 2001 [Internet]. Genève: Organisation mondiale de la Santé; 2001. p. 40. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67179>
6. Denis MB, Tsuyuoka R, Poravuth Y, Narann TS, Seila S, Lim C, et al. Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Cambodia. *Trop Med Int Heal*. 2006;11(9):1360–6.
7. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Hanpithakpong W, Ph D, et al. Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria . *N Engl J Med*. 2009;361(17):1714–1714.
8. Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: A longitudinal study. *Lancet [Internet]*. 2012;379(9830):1960–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60484-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60484-X)
9. Rodenhuis S. Drug resistance. *Curr Opin Oncol*. 1989;1(2):236–40.
10. S D. Pyramax ® : état des lieux réglementaire d'un antipaludéen mis sur le marché par le biais de l'article 58 du règlement européen (CE) n ° 726 / 2004 <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01565970>. 2017.

11. OMS. Utilisation de l'artésunate- pyronaridine pour le traitement du paludisme non compliqué. 2019;(d). Available from: <https://www.who.int/fr/publications-detail/WHO-HTM-GMP-2019.13>
12. Shin Poong PHARM.CO.LTD; MMV. Ajout des granules de Pyramax ® (pyronaridine-artésunate) pour enfants à la liste des médicaments préqualifiés de l'OMS. *Lancet, Dis Infect.* 2016;98.
13. Sagara I, Beavogui AH, Zongo I, Soulama I, Borghini-Fuhrer I, Fofana B, et al. Safety and efficacy of re-treatments with pyronaridine-artesunate in African patients with malaria: A substudy of the WANECAM randomised trial. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):189–98.
14. Sagara I, Beavogui AH, Zongo I, Soulama I, Borghini-Fuhrer I, Fofana B, et al. Pyronaridine–artesunate or dihydroartemisinin–piperaquine versus current first-line therapies for repeated treatment of uncomplicated malaria: a randomised, multicentre, open-label, longitudinal, controlled, phase 3b/4 trial. *Lancet.* 2018;391(10128):1378–90.
15. Pryce J, Hine P, Pryce J, Hine P. Pyronaridine-artesunate for treating uncomplicated. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;(1):CD006404.
16. Compaoré YD, Zongo I, Somé AF, Barry N, Nikiéma F, Kaboré TN, et al. Hepatic safety of repeated treatment with pyronaridine-artesunate versus artemether–lumefantrine in patients with uncomplicated malaria: a secondary analysis of the WANECAM 1 data from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Malar J [Internet].* 2021;20(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03593-6>
17. World Health Organisation. Global Plan for Artemisinin Containment (GPARC). 2011;89.
18. Yaya HS, Ze A. Le fardeau socio-économique du paludisme en Afrique [Internet]. 2013. 188–9 p. Available from: <https://livre.fnac.com/a5083900/Hachimi-Sanni-Yaya-Le-fardeau-socio-economique-du-paludisme-en-Afrique>
19. GILLIES MT, B. DM. Les anophélinés d'Afrique au sud du Sahara (région zoogéographique éthiopienne). publications of the South African Institute for Research; 1968. p. 343.

20. Sallares R, Bouwman A, Anderung C. The spread of malaria to Southern Europe in antiquity: New approaches to old problems. *Med Hist.* 2004;48(3):311–28.
21. Sani Y. Le paludisme : repères historiques, climatiques et anthropiques. 2013;9(2004):587–94. Available from: https://www.ruor.uottawa.ca/bitstream/10393/24125/3/Yaya_Sanni_2013_Le_paludisme_repères_historiques_climatiques_et_anthropiques.pdf Visité le 05 juillet 2019
22. Petithory JC. A propos de la découverte de l'hématozoaire du paludisme par A. Lavarani Bône 1878 - Constantine 1880. *Hist Sci Med.* 1995;29(1):57–62.
23. Majori G. Short History of Malaria and Its Eradication in Italy. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1):e2012016.
24. Bratitsis T, Demetriadis S. Research approaches in computer-supported collaborative learning. *Int J e-Collaboration.* 2013;9(1):1–8.
25. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002;419(6906):498–511.
26. Miller LH, Ackerman HC, Su X, Wellems TE. treatments. 2016;19(2):156–67.
27. Karim OA. Polymorphisme du gène de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase et contrôle génétique des formes asymptomatique et symptomatique de l' infection à *Plasmodium falciparum* au Burkina Faso. 2017;
28. Lyimo IN, Haydon DT, Mbina KF, Daraja AA, Mbehela EM, Reeve R, et al. The fitness of African malaria vectors in the presence and limitation of host behaviour. *Malar J.* 2012;11:1–12.
29. Carnevale P, Robert V. Les anophèles. Les anophèles. 2009.
30. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* [Internet]. 2016;167(3):610–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
31. Frevert U. Sneaking in through the back entrance: The biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol.* 2004;20(9):417–24.

32. Mota Maria M., Prade G, Vanderberg Jerome P., Hafalla Julius C. R., Frevert Ute, Nussenzweig Ruth S., et al. Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science*. 2001;291(5501):141–4.
33. Gissot M, Refour P, Briquet S, Boschet C, Coupé S, Mazier D, et al. Transcriptome of 3D7 and its gametocyte-less derivative F12 *Plasmodium falciparum* clones during erythrocytic development using a gene-specific microarray assigned to gene regulation, cell cycle and transcription factors. *Gene*. 2004;341(1–2):267–77.
34. Rodriguez MH, Hernández-Hernández FDLC. Insect-malaria parasites interactions: The salivary gland. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004;34(7):615–24.
35. Martin Danis and Jean Mouchet. Paludisme d’importation tardif à Plasmodium falciparum de l’adulte. *Med Trop* 66. 2006;310–2.
36. Health I, Malaria RB. Severe malaria. *Trop Med Int Health*. 2014;19 Suppl 1:7–131.
37. Befelatanana JR De. Aspects cliniques et thérapeutiques du paludisme grave au service de Réanimation Médicale du Centre Hospitalier Universitaire. 2018;2018(2):7–9.
38. Laurent V, Buffet P, Jaureguiberry S, Bruneel F. Physiopathologie du paludisme à Plasmodium falciparum: principaux mécanismes et avancées récentes : Paludisme. *La Lett l’infectiologue*. 2012;27(6):222–6.
39. Maurois P. Physiopathologie du paludisme Les mécanismes des manifestations pathologiques du paludisme sont nombreux et complexes; ils impliquent, entre autres, des altérations érythrocytaires et des perturbations humorales, notamment immunologiques. *Médecine/Sciences*. 1986;2:322–30.
40. Mahamadou D, Hassane DM, Zeinabou MTM, Aboubacar I, Osseini A, Harissou A, et al. A Report of Four Cases of Blackwater Fever after Quinine Treatment at Zinder National Hospital, Niger Republic. *Case Rep Infect Dis*. 2019;2019:1–4.
41. Bruneel F, Gachot B, Wolff M, Régnier B, Danis M, Vachon F. Resurgence of blackwater fever in long-term European expatriates in Africa: Report of 21 cases and review. *Clin Infect Dis*. 2001;32(8):1133–40.
42. Vachon F, Fajac I, Gachot B, Coulaud JP, Charmot G. Halofantrine and acute intravascular haemolysis. *Lancet*. 1992;340(8824):909–10.

43. Simon F, Lavarde V. Paludisme. Rev du Prat. 1999;49(1):81–7.
44. Feldmeier H. The prognostic value of finding schizonts of *Plasmodium falciparum* in the peripheral blood The 2 editions of ‘Severe and Complicated Malaria.’ 1994;1993.
45. Badoum ES, Sermé SS, Yaro JB, Coulibaly SA, Kargougou D, Diarra A, et al. Abnormalities of Hemoglobin and Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase Deficiency in Children with Uncomplicated Malaria and Living in Banfora and Saponé, Two Different Malaria Setting of Burkina Faso. Int J Trop Dis Heal. 2019;37(May):1–10.
46. Tishkoff SA, Varkonyi R, Cahinhinan N, Abbes S, Argyropoulos G, Destro-Bisol G, et al. Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: Recent origin of alleles that confer malarial resistance. Science (80-). 2001;293(5529):455–62.
47. Travassos MA, Coulibaly D, Laurens MB, Dembélé A, Tolo Y, Koné AK, et al. Hemoglobin C Trait Provides Protection from Clinical *Falciparum* Malaria in Malian Children. J Infect Dis. 2015;212(10):1778–86.
48. Kreuels B, Kreuzberg C, Kobbe R, Ayim-Akonor M, Apiah-Thompson P, Thompson B, et al. Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth. Blood. 2010;115(22):4551–8.
49. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: More questions than answers. Nat Immunol. 2008;9(7):725–32.
50. Crompton PD, Moebius J, Waisberg M, Garver LS, Miller LH, Barillas C, et al. Mysteries of a Deadly Infectious Disease. Annu Rev Immunol. 2014;32:157–87.
51. Berry A, Iriart X, Magnaval JF. Nouvelles méthodes de diagnostic du paludisme. Rev Francoph des Lab [Internet]. 2009;2009(416):65–70. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X\(09\)70252-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X(09)70252-7)
52. Assessment of the safety of artemisinin compounds. World Health. 2003;2002.
53. World Health Organisation. Lignes directrices de l’OMS sur le paludisme, 16 février 2021 [WHO Guidelines for malaria, 16 February 2021]. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2021 (WHO/UCN/GMP/2021.01). Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Catalogage. 2021;

54. M.P Brenier-Pinchart, C. Pinel, R. Grillo, P. Amboise-Thomas. Le diagnostic du paludisme dans les régions non endémiques: valeurs limites et complémentarité des méthodes actuelles. *Ann Biol Clin*; 2000. p. VOL 58.
55. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: Microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(SUPPL. 6):119–27.
56. Ministère de la Santé et du développement social PNL. Directives nationales de prise en charge des cas de paludisme au Mali. 2020;1–38.
57. Agnandji ST, Lell B, Fernandes JF, Abossolo BP, Kabwende AL, Adegnikaa AA, et al. Efficacy and Safety of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine during 18 Months after Vaccination: A Phase 3 Randomized, Controlled Trial in Children and Young Infants at 11 African Sites. *PLoS Med.* 2014;11(7).
58. Programme National de Lutte contre le Paludisme. Plan stratégique de lutte contre le paludisme 2013-2017. 2013;1–115.
59. Ousmane B. Les antimalariques. Vol. THESE N°35, Faculté de Médecine et de Pharmacie de RABAT. RABAT; 1999. 156 p.
60. MEHDI S EL. Les circonstances de découverte du paludisme d'importation : expérience du service de médecine interne de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech. 2015;117.
61. Dardé ML, Fougère É, Buxeraud J. Les antipaludiques. *Actual Pharm.* 2018;57(581):27–37.
62. Compagnon P, Diquet B. Suivi thérapeutique pharmacologique de la quinine. *EMC - Biol Médicale.* 2006;1(1):1–3.
63. JULLIEN V. Pharmacocinétique des antipaludiques : Paludisme. *La Lett l'infectiologue.* 2012;27(6):239–43.
64. Debert M. Traités de chimie thérapeutique, principaux antifongiques et antiparasitaires. TEC DOC/éd médicales Int ed. 2000;
65. Ezzet F, Karbwang J. Population pharmacokinetics and therapeutic response of CGP 56697 (artemether + benflumetol) in malaria patients. *Br J Clin Pharmacol.*

- 1998;46(6):553–61.
66. White N.J, Van Vugt M EF. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. *Clin Clin Pharmacokinetics*. 1999;37:105–25.
67. Croft SL, Duparc S, Arbe-Barnes SJ, Craft JC, Shin CS, Fleckenstein L, et al. Review of pyronaridine anti-malarial properties and product characteristics. *Malar J*. 2012;11(Iv):1–28.
68. Ramanathan S, Karupiah S, Nair NK, Olliaro PL, Navaratnam V, Wernsdorfer WH, et al. A new and simple solid-phase extraction method for LC determination of pyronaridine in human plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2005;824(1–2):45–50.
69. Ayyoub A, Methaneethorn J, Ramharter M, Djimde AA, Tekete M, Duparc S, et al. Population Pharmacokinetics of Pyronaridine in Pediatric Malaria Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(3):1450–8.
70. Le Bras J, Musset L CJ. Mécanisme D ' Action Des Antipaludiques Et. 2006;36(8):401–5.
71. Andersson AETB, Bjo XLÆA, Gustafsson LL, Masimirembwa AECM. Identification of human cytochrome P 450 s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from *in vitro* data. 2003;429–42.
72. Byakika-Kibwika P, Lamorde M, Mayito J, Nabukeera L, Mayanja-Kizza H, Katabira E, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous artesunate during severe malaria treatment in Ugandan adults. *Malar J*. 2012;11:1–6.
73. Morris CA, Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Jung D, Shin CS, Fleckenstein L. Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. *Malar J* [Internet]. 2011;10(1):263. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/10/1/263>
74. Newton PN, Van Vugt M, Teja-Isavadharm P, Siriyanonda D, Rasameesoraj M, Teerapong P, et al. Comparison of oral artesunate and dihydroartemisinin antimalarial bioavailabilities in acute *falciparum* malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(4):1125–7.

75. April K, March O, Poong S, Co P. New artemisinin combination submitted to EMA for regulatory approval of a dual indication against *P. falciparum* and blood stages of *P. vivax* malaria. 2010;(April).
76. EMA.SmPC. PYRAMAX. 2016; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/opinion-medicine-use-outside-EU/human/pyramax>, Consulté le 19-08-2022
77. Medecines for Malaria Venture ; [INTERNET]. Available from: <http://www.mmv.org/>
78. Medecines for Malaria Venture. MMV-Supported projects, [cité 16 mai 2017]. Available from: <https://www.mmv.org/research-development/mmv-supported-projects>
79. Shin Poong Pharmaceuticals. [INTERNET]. Available from: <http://www.shinpoong.co.kr/engshin/mainFrameset.htm>, Consulté le 19-08-2022
80. European Medicines Agency, European Commission B& MGF. “Article 58” Defining the strategic vision for the EMA process. Sept. 2015; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/article-58-strategic-review-summary_en.pdf, Consulté le 19-08-2022
81. EMA/CHMP/95965/2012, (CHMP) C for MP for HU. Pyramax,pyronaridine tetraphosphate / artesunate. *Sci Med Heal*. 2012;44:1–2.
82. Malaria VM for. Technical briefing on Pyramax, [INTERNET], [cité 24 avril]. 2017; Available from: <https://www.mmv.org/newsroom/film/technical-briefing-pyramax>
83. European Medicines Agency. Summary of opinion on Pyramax. 2015;44(19-November).
84. Medecines for Malaria Venture. New study details safety and efficacy of Re-treatment with Pyramax, [cité 25 mai 2017. *Lancet Infect Deseas*. 2015;(726):1–3.
85. European Medicines Agency. Assessment report Pyramax (Extension, EMA/813257/2015). *Sci Med Heal*. 2015;44(EMA/CHMP/115246/2014):1–107.
86. Shin Poong Pharmaceuticals. PYRAMAX, SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS Annex I. Food Secur Issues Arab Near East [Internet]. 1979;173–202. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/outside-eu-product-information/pyramax-product-information_en.pdf, Consulté le 19-08-2022

87. Bruce-Chwatt L.J., Black R.H., Canfield C.J., Clyde D.F., Petters W. WWH. Chemotherapy of malaria , revised 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 1986. World Heal Organ. 1986;5.
88. Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK, et al. Amplification of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;57(1):151–60.
89. Ritchie GY, Mungthin M, Green JE, Bray PG, Hawley SR, Ward SA. In vitro selection of halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* is not associated with increased expression of Pgh1. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;83(1):35–46.
90. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*. 2000;6(4):861–71.
91. Ochong E, Broek I van den KK. Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates f. *Trop Med Hyg* [Internet]. 2003;69(2):184–7. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/69/2/184.short>
92. Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J. Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(23):8360–4.
93. Zolg JW, Plitt JR, Chen GX, Palmer S. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;36(3):253–62.
94. Wang P, Read M, Sims PFG, Hyde JE. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol*. 1997;23(5):979–86.
95. Djimde AA, Barger B, Kone A, Beavogui AH, Tekete M, Fofana B, et al. A molecular map of chloroquine resistance in Mali. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010;58(1):113–8.

96. Dicko A, Sagara I, Djimdé AA, Touré SO, Traore M, Dama S, et al. Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine one year after implementation of intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali. *Malar J.* 2010;9(1):1–7.
97. Frédéric Arie^{1, 2, †}, Benoit Witkowski³, Chanaki Amaratunga⁴, Johann Beghain^{1, 2, †}, Anne- Claire Langlois^{1, 2}, Nimol Khim³, Saorin Kim³, Valentine Duru³, Christiane Bouchier⁵, Laurence Ma⁵, Pharath Lim^{3, 4, 6}, Rithea Leang⁶, Socheat Duong⁶ SS and D. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. 2016;1(1):23–30.
98. Adams J, Kelso R CL. The kelch repeat superfamily of proteins: Propellers of cell function. *Trends Cell Biol.* 2000;10(1):17–24.
99. OMS. Surveillance de la résistance aux antipaludiques. *Oms.* 2002;3–5.
100. M.H. Coosemans, L. Hendrix, M. Barutwanayo, G. Butoyi EO. WHO_MAL_84.1014, Résistance médicamenteuse de *Plasmodium falciparum* au Burundi (Afrique Centrale). Genève, Suisse; 1984. p. 3.
101. Al R. Sensibilité de *Plasmodium falciparum* dans l'île de Sainte Marie, côte Est de Madagascar : études in vivo et in vitro. *Arch Inst Pasteur Madagascar.* 2000;66:26–31.
102. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative Activity Semiautomated Technique. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;16(6):710–8.
103. Gunter LE, Kochert G, Giannasi DE. Phylogenetic relationships of the Juglandaceae. *Plant Syst Evol.* 1994;192(1–2):11–29.
104. Kayentao K, Maiga H, Newman RD, McMorro ML, Hoppe A, Yattara O, et al. Artemisinin-based combinations versus amodiaquine plus sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated malaria in Faladje, Mali. *Malar J.* 2009;8(1):1–8.
105. H. Kadidia KA. Prévalence moléculaire, biologie et morbidité de *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri*, deux nouvelles espèces de plasmodie à Faladje au Mali. Bamako, MALI: Faculté de Pharmacie/ USTTB; 2018.

106. Kone A, Sissoko S, Fofana B, Sangare CO, Dembele D, Haidara AS, et al. Different *Plasmodium falciparum* clearance times in two Malian villages following artesunate monotherapy. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020;95:399–405. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.082>
107. Une I. Système HemoCue ® Hb 301. 2021; Available from: <https://www.techservsn.com/wp-content/uploads/2021/06/HemoCue-Hb301.pdf>
108. Roth JM, Sawa P, Makio N, Omweri G, Osoti V, Okach S, et al. Pyronaridine-artesunate and artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Kenyan children: A randomized controlled non-inferiority trial NCT02411994 NCT. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2340-3>
109. Dabira ED, Hachizovu S, Conteh B, Mendy A, Nyang H, Lawal B, et al. Efficacy, Safety and Tolerability of Pyronaridine-artesunate in Asymptomatic Malaria-infected Individuals: a Randomized Controlled Trial. *Clin Infect Dis*. 2022;74(2):180–8.
110. Kayentao K, Doumbo OK, Pénali LK, Offianan AT, Bhatt KM, Kimani J, et al. Pyronaridine-artesunate granules versus artemether-lumefantrine crushed tablets in children with *Plasmodium falciparum* malaria: a randomized controlled trial. *Malar J*. 2012;11:1–12.
111. Abdulla S, Achan J, Adam I, Alemayehu BH, Allan R, Allen EN, et al. Gametocyte carriage in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria following treatment with artemisinin combination therapy: A systematic review and meta-analysis of individual patient data. *BMC Med*. 2016;14(1).
112. Okell LC, Drakeley CJ, Ghani AC, Bousema T, Sutherland CJ. Reduction of transmission from malaria patients by artemisinin combination therapies: A pooled analysis of six randomized trials. *Malar J*. 2008;7:1–13.

FICHE SIGNALITIQUE**Nom :** CISSE**Prénom :** Fatoumata**Nationalité :** Malienne**Année de soutenance :** 2021-2022**Ville de soutenance :** Bamako**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie (FAPH)**Secteur d'intérêt :** Parasitologie, Biologie moléculaire**Titre :** EVALUATION DE L'EFFICACITE IN VIVO DE LA PYRONARIDINE-ARTESUNATE DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME NON COMPLIQUE A *Plasmodium spp* A FALADJE, KATI, MALI**Introduction :** La Pyronaridine-Artésunate est la nouvelle CTA à venir compléter l'arsenal thérapeutique contre les infections non compliquées à *P. falciparum* et *P. vivax*. De 2011 à 2016, plusieurs sous études furent menées dans différents pays afin d'évaluer son efficacité et son innocuité. Dans le cadre de la surveillance de la résistance aux dérivés de l'Artémisinine, une étude a été conduite au Mali sur un site où l'infection à *P. falciparum* est prédominante.**Méthode :** d'Octobre 2019 à Février 2021, nous avons mené une étude prospective d'évaluation de l'efficacité de la Pyronaridine-Artésunate chez les sujets de 6 mois et plus à Faladjè. Les patients atteints de paludisme non compliqué étaient traités avec le Pyramax pendant 3 jours et suivi pendant 28 jours. La parasitémie était évaluée toutes les 12 heures jusqu'à l'obtention de trois gouttes consécutives négatives. Le polymorphisme des gènes MSP2 et Ca1 a été évalué par PCR à partir des lames réalisées avant et après traitement pour distinguer les réinfections des recrudescences. Le temps de clairance parasitaire a été calculé en utilisant le logiciel parasite clearance estimator (PCE) de World Wide Antimalarial Resistance Network (WWARN).**Résultats :** Nous avons inclus 452 à Faladjè. La réponse clinique et parasitologique adéquate était de 97%. Après correction moléculaire, l'efficacité de la Pyronaridine-Artésunate était de 99,8% à Faladjè. Le temps médian de la clairance parasitaire était de 5 h 38min IQR (3,78 – 6,90), la demi vie de la clairance parasitaire était de 2 heure 45 minutes IQR (2,14 2,83). Le temps médian de la clairance de la fièvre était de 24 heures.**Conclusion :** Pyronaridine -Artésunate reste efficace sur *P. falciparum* à Faladjè, Mali.**Mots clés :** Pyronaridine, Artésunate, Efficacité, Temps de la clairance parasitaire, *protéine de surface du mérozoïte 2, Ca1*

ABSTRACT**First Name:** CISSE**Last Name:** Fatoumata**Nationality:** Malian**Year of Defense:** 2021-2022**Defended in:** Bamako**Submitted to:** Library of the Faculty of Pharmacy (FAPH)**Field of interest:** Parasitology, Molecular Biology**Title:** EVALUATION OF THE IN VIVO EFFICACY OF PYRONARIDINE-ARTESUNATE IN THE TREATMENT OF UNCOMPLICATED MALARIA *Plasmodium* spp IN FALADJE, KATI, MALI**Background:** Pyronaridine-Artesunate is the new ACT to complete the therapeutic arsenal against uncomplicated *P. falciparum* and *P. vivax* infections. From 2011 to 2016, several sub-studies were conducted in different countries to evaluate its efficacy and safety. As part of the surveillance of resistance to artemisinin derivatives, a study was conducted in Mali in a site where *P. falciparum* infection is predominant.**Methods:** from October 2019 to February 2021, we conducted a prospective efficacy evaluation study of Pyronaridine-Artesunate in subjects 6 months and older in Faladjè. Patients with uncomplicated malaria were treated with Pyramax for 3 days and followed for 28 days. Parasitemia was assessed every 12 hours until three consecutive negative thick smears were obtained. *msp2* and *Cal* gene polymorphism was assessed by PCR from slides taken before and after treatment to distinguish reinfections from recrudescences. Parasite clearance time was calculated using the WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) parasite clearance estimator (PCE) software.**Results:** We included 452 participants from Faladjè. The adequate clinical and parasitological response was 96.6%. After molecular correction, the efficacy of Pyronaridine-Artesunate was 99.8% in Faladjè. The median time of parasite clearance was 5 hours 38 minutes IQR (3.78 - 6.90). The half-life of parasite clearance was 2 hours 45 minutes IQR (2.14 - 2.83). The median time of fever clearance was 24 hours.**Conclusion:** Pyronaridine-artesunate remains effective against *P. falciparum* in Faladjè, Mali.**Keywords:** Pyronaridine, Artesunate, Efficacy, Parasite clearance time, *merozoite surface protein2*, *Cal*

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique ma profession, avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ; De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

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

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque. Je le jure !