

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique (MESRS)

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple –Un But –Une Foi



UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVESITAIRE 2018- 2019

N° / /

Polymorphisme génétique de la *dihydroptéroate Synthétase* de
Plasmodium falciparum (Pfdhps) par la technique de séquençage des isolats collectés au
cours de la chimio-prévention du paludisme saisonnier à Dioro, Missira et Sélingué

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 27/12/2019 devant la Faculté de Pharmacie pour
l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)

PAR

M. TRAORE Tahirou

JURY

Président du jury : Professeur Ababacar I. MAIGA

Membres : Professeur Kassoum KAYENTAO

Docteur Dade Ben Sidy HAIDARA

Monsieur Ibrahim KEITA

Co-directeur de thèse : Docteur Youssouf DIARRA

Directeur de thèse : Professeur Ousmane KOITA



ADMINISTRATION

DOYEN : M. Boubacar TRAORE, Professeur

VICE-DOYEN : M. Ababacar I MAIGA, Professeur

SECRÉTAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

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

PROFESSEURS HONORAIRES

| N° | PRENOMS | NOM | SPECIALITE |
|----|------------------|----------|-----------------------------|
| 1 | Boubacar Sidiki | CISSE | Toxicologue |
| 2 | Mahamadou | CISSE | Biologie |
| 3 | Daouda | DIALLO | Chimie Générale et Minérale |
| 4 | Souleymane | DIALLO | Bactériologie - Virologie |
| 5 | Kaourou | DOUCOURE | Physiologie |
| 6 | Ousmane | DOUMBIA | Chimie Thérapeutique |
| 7 | Boukassoum | HAÏDARA | Législation |
| 8 | Gaoussou | KANOUTE | Chimie analytique |
| 9 | Alou A. | KEÏTA | Galénique |
| 10 | Mamadou | KONE | Physiologie |
| 11 | Mamadou | KOUMARE | Pharmacognosie |
| 12 | Brehima | KOUMARE | Pharmacognosie |
| 13 | Abdourahamane S. | MAÏGA | Parasitologie |
| 14 | Elimane | MARIKO | Pharmacologie |

DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

| N° | PRENOMS | NOM | SPECIALITE |
|----|----------------|---------|---------------------------|
| 1 | Mounirou | BABY | Hématologie |
| 2 | Bakary Mamadou | CISSE | Biochimie |
| 3 | Abdoulaye | DABO | Biologie/Parasitologie |
| 4 | Mahamadou | DIAKITE | Immunologie-Génétique |
| 5 | Alassane | DICKO | Santé Publique |
| 6 | Abdoulaye | DJMIDE | Parasitologie – Mycologie |



| | | | |
|----|----------|--------|----------------------------|
| 7 | Amagana | DOLO | Parasitologie – Mycologie |
| 8 | Akory Ag | IKNANE | Santé Publique / Nutrition |
| 9 | Ousmane | KOITA | Biologie-Moléculaire |
| 10 | Boubacar | TRAORE | Parasitologie-Mycologie |

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

| N° | PRENOMS | NOM | SPECIALITE |
|----|-------------------|------------|------------------------------------|
| 1 | Flabou | BOUGOUDOGO | Bactériologie – Virologie |
| 2 | Aldjouma | GUINDO | Hématologie |
| 3 | Kassoum | KAYENTAO | Santé /Bio-Statistique |
| 4 | Bourèma | KOURIBA | Immunologie Chef de DER |
| 5 | Ousmane | TOURE | Santé Publique/Santé environnement |
| 6 | Issaka | SAGARA | Bio-statistique |
| 7 | Mahamadou Soumana | SISSOKO | Bio-statistique |

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

| N° | PRENOMS | NOM | SPECIALITE |
|----|---------------------|------------|--------------------------------|
| 1 | Mohamed | AG BARAIKA | Bactériologie-virologie |
| 2 | Charles | ARAMA | Immunologie |
| 3 | Boubacar Tiétiè | BISSAN | Biologie clinique |
| 4 | Djibril Mamadou | COULIBALY | Biochimie clinique |
| 5 | Seydou Sassou | COULIBALY | Biochimie clinique |
| 6 | Souleymane | DAMA | Parasitologie Entomologie méd. |
| 7 | Djénéba Koumba | DABITAO | Biologie moléculaire |
| 8 | Laurent | DEMBELE | Biotechnologie Microbienne |
| 9 | Kléligui Casimir | DEMBELE | Biochimie clinique |
| 10 | Seydina S. A. | DIAKITE | Immunologie |
| 11 | Yaya | GOÏTA | Biochimie Clinique |
| 12 | Ibrahima | GUINDO | Bactériologie-virologie |
| 13 | Antoine | DARA | Biologie Moléculaire |
| 14 | Aminatou | KONE | Biologie moléculaire |
| 15 | Birama Apho | LY | Santé publique |
| 16 | Dionkorma | OUOLOGUEM | Biologie cellulaire |
| 17 | Almoustapha Issiaka | MAIGA | Bactériologie-Virologie |
| 18 | Oumar | SANGARE | Epidémiologie |
| 19 | Fanta | SANGHO | Santé Publique/Santé |



| | | | |
|--|--|--|---------------|
| | | | communautaire |
|--|--|--|---------------|

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

| N° | PRENOMS | NOM | SPECIALITE |
|----|--------------------|-----------|------------------------------------|
| 1 | Djénéba | COULIBALY | Nutrition/Diététique |
| 2 | Issa | DIARRA | Immunologie |
| 3 | Fatou | DIAWARA | Epidémiologie |
| 4 | Merepen dit Agnès | GUINDO | Immunologie |
| 5 | Falaye | KEÏTA | Santé publique/Santé Environnement |
| 6 | N'Deye Lallah Nina | KOITE | Nutrition |
| 7 | Amadou Birama | NIANGALY | Parasitologie-Mycologie |
| 8 | Djakaridia | TRAORE | Hématologie |

DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

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

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

| N° | PRENOMS | NOM | SPECIALITE |
|----|---------|-----|------------|
| - | Néant | - | - |

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

| N° | PRENOMS | NOM | SPECIALITE |
|----|----------------|-----------|------------------------|
| 1 | Loséni | BENGALY | Pharmacie hospitalière |
| 2 | Bakary Moussa | CISSE | Galénique |
| 3 | Yaya | COULIBALY | Législation |
| 4 | Issa | COULIBALY | Gestion |
| 5 | Balla Fatogoma | COULIBALY | Pharmacie hospitalière |
| 6 | Mahamane | HAIDARA | Pharmacognosie |
| 7 | Hamma Boubacar | MAÏGA | Galénique |
| 8 | Moussa | SANOGO | Gestion |
| 9 | Adiaratou | TOGOLA | Pharmacognosie |

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

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

DER : SCIENCES DU MÉDICAMENT

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

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

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

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

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

| N° | PRENOMS | NOM | SPECIALITE |
|----|------------------|---------|----------------------|
| 1 | Dominique Patomo | ARAMA | Pharmacie chimique |
| 2 | Mody | CISSE | Chimie thérapeutique |
| 3 | Ousmane | DEMBELE | Chimie thérapeutique |
| 4 | Tidiane | DIALLO | Toxicologie |
| 5 | Madani | MARIKO | Chimie Analytique |
| 6 | Hamadoun Abba | TOURE | Bromatologie |



4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

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

DER : SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

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

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

| N° | PRENOMS | NOM | SPECIALITE |
|----|---------|---------|------------------|
| 1 | Lassana | DOUMBIA | Chimie appliquée |

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

| N° | PRENOMS | NOM | SPECIALITE |
|----|----------------|--------|-----------------------------|
| 1 | Mamadou lamine | DIARRA | Botanique-Biologie végétale |
| 1 | Abdoulaye | KANTE | Anatomie |
| 2 | Boureima | KELLY | Physiologie médicale |

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

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

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

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

DEDICACE ET REMERCIEMENTS

DEDICACE

Je rends grâce à Dieu, le Tout Puissant et à son bien-aimé et prophète Muhammad (paix et salut de Dieu soit sur lui). Gloire est au Créateur qui nous a prêté la vie et la santé pour réaliser ce travail.

Je dédie ce travail à mon père, feu Yaya Traoré (paix a son âme) pour m'avoir donné la chance d'aller à l'école afin d'accéder au savoir et à l'éducation. Le Seigneur n'a pas voulu te montrer ce jour qu'il en soit loué, physiquement loin de moi mais spirituellement toujours présente dans mon coeur, dans ton sommeil éternel, je dédie ce travail à ton mémoire

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent

AU TOUT PUISSANT, LE TOUT MISERICORDIEUX, LE TRES MISERICORDIEUX

À ma mère : Rokia Sawadogo

Je ne saurais comment qualifier ta présence inoubliable dans mon cœur. Toi qui as suivi mes premiers pas dans les études surtout primaires, tu m'as toujours aidée à surmonter les difficultés par tes grandes bénédictions, ton courage et surtout ton amour pour moi. Que Dieu nous donne une longue vie couronnée de paix, de succès et d'amour ! À travers ce travail, je te remercie infiniment et sache que ce travail est le vôtre.

A ma grand-Sœur Feue Sanata Traore Dite Batoma

Ton courage, ta bonté, ta ponctualité et ton amour resteront graver dans ma mémoire à jamais. Que Dieu t'accueille dans son paradis

Je pris jours et nuit Que Dieu donne longue vie à ton Unique fille Kadidia ma nièces

A ma tante Fanta Diallo

Je ne sais quoi te dire, merci pour toutes ces années de bonheur passées à tes côtés, que DIEU te prête longue vie.

A mes Frères et sœurs :

Nous avons bénéficié ensemble d'une éducation exemplaire de nos parents. Mettons-la à profit pour nous rendre dignes et utiles dans cette société difficile. Nous devons œuvrer pour la cause de la communauté familiale, la solidarité et le travail avec dévouement main dans la main.

A Mon Ami et grand Frère M. Broulaye Koné depuis Kolondieba

Les mots me manquent aujourd'hui pour vous qualifier Je n'oublierai jamais le soutien moral et matériel les conseils et encouragement que tu m'as apporté. Bonheur et longévité à toi et toute ta famille, je prie Dieu pour que j'en fasse de même.

A Mon tuteur Bréhima Dembélé et son épouse Awa Ballo et toute la Famille Dembélé à Sikasso Mancourani Que pendant mon séjour dans votre famille m'ont traité comme leur propre enfant. Chez vous je n'ai pas versé une seule goutte de larme. C'est le témoignage de vos fois de musulman pieux connues de tous. Que le tout puissant Allah vous récompense pour tout ce que vous avez fait pour moi.

A la famille Sangaré à Kalaban Coura pour les meilleurs moments passés ensemble et ceux venant après. Je n'oublierai jamais les moments où les deux familles se confondaient en une seule et unique famille. J'ai été considéré comme un membre de cette famille et je ne me suis senti autre que cela.

J'adresse mes sincères remerciements à :

❖ **Au corps professoral et à tout le personnel de la Faculté de Pharmacie (FAPH);**

Pour votre enseignement et éducation scientifique. En plus du savoir, vous nous avons appris le savoir-faire et le savoir être. Nous sommes très fiers d'avoir été l'un de vos apprenants. Trouvez ici l'expression de toute ma Gratitude.

Au personnel de la Pharmacie Souleymane KONE ; Pharmacie Deh Siby (ex Benkadi) et la Pharmacie Amani à Korofina

Je vous remercie infiniment !!!!

Toutes les victimes du paludisme à travers le monde particulièrement ceux du Mali.

Aux personnels du CScom de Sebecoro I le DTC et son épouse ainsi que tous les stagiaires du centre :

Je vous présente mes sincères remerciements pour votre coopération pour l'élaboration de ce travail. Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A tous mes camarades ;



De la dixième (10ème) promotion du Numerus Clausus, pour votre courtoisie, votre sens de l'humour et de savoir vivre. De la faculté pour votre sympathie. D'enfance pour votre sens de savoir vivre. Je m'abstiens de vous citer au risque d'omettre involontairement un nom Quelconque. Je garderai le souvenir des bons amis avec qui j'ai passé le moment le plus marquant de ma vie. Courage et bonne chance dans la vie professionnelle.

A tous mes ami(e) de la faculté : Issiaka Diarra ,Moustapha Traore, Lamine Diarra , N'TCHI KONE , Ismail Berthe dit Houstazie, Boubacar Sanogo ,Fatoumata Diabaté , Fatoumata Toure , Laurent Berthe ,yaran Mmounkoro ,Guigitte .

Bonne chance à tous dans la vie professionnelle.

A tous mes camarades internes au LBMA

Merci pour les moments passés ensemble Merci pour votre aide et soutien pour l'élaboration de ce travail.

A mes aînés de la Faculté : Docteur Hamadou BOUARE, Docteur Salimata DIALLO, Docteur Modibo TELLY, Docteur Seydou TRAORE et Docteur Sekou TRAORE

Vous n'avez jamais manqué de me soutenir, votre aide et votre disponibilité m'ont été

D'un grand apport, soyez rassurées de ma profonde gratitude.

A tout le personnel du LBMA, ce travail est le fruit de votre soutien technique et moral. Trouvez ici l'expression de toute ma profonde gratitude.

A Monsieur Ibrahim KEITA,

Vous nous avez guidés dans la conception et l'élaboration de ce travail. Nous avons su Apprécier votre disponibilité, votre humanisme, et surtout votre attachement profond au travail bien fait.

Chers maîtres merci ; Ce travail est aussi le vôtre et nous pensons qu'il répondra à vos attentes.



HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maitre et Président du Jury

Professeur Ababacar .I MAIGA

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

Cher Maître C'est un grand honneur et réel plaisir que vous nous faites en acceptant de présider ce jury, malgré vos multiples et importantes occupations.

Auprès de vous Nous avons pu bénéficier d'un enseignement de qualité.

Recevez ici cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Juge

Professeur Kassoum KAYENTAO

- **Maitre de recherche en Biostatistique/Santé publique**
- **Responsable adjoint de l'unité paludisme et grossesse de MRTC**
- **Enseignant-Chercheur**

Nous avons beaucoup apprécié votre disponibilité et vos qualités humaines. Vos Qualités d'homme de science, votre gentillesse, votre modestie envers vos collègues et vos étudiants ont forcé l'admiration de tous. Nous vous prions cher maître, de recevoir l'expression de nos profondes reconnaissances.

A notre Maître et Juge

Dr Dade Ben Sidy Ben HAIDARA

- **Docteur en Médecine ;**
- **Médecin épidémiologiste à la direction régionale de la santé de Sikasso,**
- **Médecin chef de l'hôpital National de Sikasso**
- **Ancien médecin chef du centre de santé de référence de Sélingué,**

Cher maître,

Nous sommes ravis à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Votre esprit de collaboration nous a beaucoup marqué. Cher maître, trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude.

A notre Maître et Jury

M. Ibrahim KEITA

- **Assistant en Biologie moléculaire à la FMOS ;**
- **Attaché de recherche au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée.**

Cher Maître,

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

A notre Maître et co-directeur de thèse

Docteur Youssouf DIARRA

- **Docteur en Pharmacie ;**
- **Attaché de recherche au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée.**

Cher maître, ce fut pour nous une grande fierté de compter parmi vos étudiants. Votre souci pour le travail bien fait et pour nous assurer une formation solide font de vous un maître respecté...

Recevez ici l'expression de notre grande estime

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Ousmane KOITA

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

Cher Maître,

Nous avons été très séduits par votre conviction pour la recherche, votre disponibilité et la qualité de votre enseignement.

Vous avez été toujours ouvert aux étudiants et vous nous avez toujours appris que « *pour un étudiant rien ne valait une formation de qualité* »

Vous nous avez accueilli à bras ouvert au LBMA, nous initié dans la recherche et fini par diriger les activités de notre thèse, ce qui fait de ce travail, le vôtre !!!

Ce fut un honneur pour nous d'être comptés parmi vos élèves.

Soyez rassuré honorable maître de notre reconnaissance.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

| | |
|-----------------------|---|
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| <i>An. arabiensis</i> | <i>Anopheles arabiensis</i> |
| <i>An. gambiae</i> | <i>Anopheles gambiae</i> |
| <i>An. funestus</i> | <i>Anophles funestus</i> |
| AQ | Amodiaquine |
| CPS | Chimio prévention du paludisme saisonnier |
| CQ | Chloroquine |
| CTA | Combinaison Thérapeutique à base d'artémisinine |
| CI50 | Concentration inhibitrice 50 |
| CSCom | Centre de santé communautaire |
| dGTP | Désoxyguanosine triphosphate |
| dNTPs | Désoxynucleotides triphosphates |
| dTTP | Désoxythymidine triphosphate |
| ELISA | Enzyme -Linked Immunosorbent Assay |
| ETT | Echec Thérapeutique Tardif |
| ETP | Echec Thérapeutique Précoce |
| FRC | Formulaire de Report des Cas |
| HRM | High Resolution Melting |
| HRP2 | Histidine Rich Protein 2 |
| ID | Identifiant |
| INSP | Institut National de Santé Publique |
| IP | Indice Plasmodique |
| ICEMR | International Center of Excellence for Malaria Research |
| JC | Jésus Christ |
| LBMA | Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |



| | |
|------------------------|---|
| p LDH | <i>Plasmodium</i> lactate déshydrogénase |
| LDH | <i>lactate dehydrogenase</i> |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| <i>Pfcr</i> | <i>Plasmodium falciparum</i> chloroquino-resistance transporter |
| <i>Pfdhps</i> | <i>Plasmodium falciparum</i> dihydropteroate Synthetase |
| <i>Pfdhfr</i> | <i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase |
| PNLP | Programme National de Lutte contre le Paludisme |
| RCPA | Réponse clinique et parasitologique adéquate |
| SP | Sulfadoxine -Pyriméthamine |
| SNP | Single-nucleotide polymorphism |
| TDR | Test de Diagnostic Rapide |
| Tf | Trophozoïtes |
| TPI | Traitement Préventif Intermittent |
| TPI_n | Traitement Préventif Intermittent Chez le nourrisson |
| VIH | Virus de l'Immunodéficience humaine |



LISTE DES FIGURES

| | |
|--|------------------------------------|
| Figure 1: Propagation des souches chloroquino-résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> | 10 |
| Figure 2 : Répartition du paludisme dans le monde..... | 11 |
| Figure 3 : Distribution des cas de paludisme au Mali | 12 |
| Figure 4 : Répartition des mutations du gène <i>Pfdhps</i> dans le monde à la position 437et 540 | 13 |
| Figure 5 : Répartition des mutations du gène <i>Pfdhps</i> dans le monde à la position 581 | 14 |
| Figure 6 : Répartition des mutations du gène <i>Pfdhps</i> dans le monde à la position 613 | 14 |
| Figure 7 : <i>Anopheles gambiae</i> | 16 |
| Figure 8: Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l’homme et chez le moustique | 19 |
| Figure 9 : Structure chimique de la Sulfadoxine..... | 23 |
| Figure 10 : Structure chimique de la Pyriméthamine..... | 25 |
| Figure 11: Structure chimique de l’amodiaquine..... | 27 |
| Figure 12: Mécanismes de résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyrimethamine | 30 |
| Figure 13 : Mutations sur le gène <i>Pfdhps</i> associées à la résistance de <i>P. falciparum</i> à la Sulfadoxine..... | 31 |
| Figure 14: Principe du HRM..... | 34 |
| Figure 15 : Principe de tracée des courbes de fusion | 35 |
| Figure 16 : Courbe de fusion d’un ADN normal et d’un ADN muté..... | 35 |
| Figure 17 : Cartographie de la zone irriguée de Dioro..... | Erreur ! Signet non défini. |
| Figure 18: Localisation géographique du site de Missira | Erreur ! Signet non défini. |
| Figure 19: Carte sanitaire de la zone de Sélingué | Erreur ! Signet non défini. |
| Figure 20: Facteurs démographique des 13 patients | 47 |
| Figure 21 : Répartition des patients en fonction de la parasitémie..... | 48 |
| Figure 22 : Arbre phylogénétique (<i>Neighbor-joining and Tamura-Nei model</i>) des 13 souches de <i>P. falciparum</i> et la souche de référence <i>Pf3D7</i> généré à partir des séquences de leur gène <i>Pfdhps</i> | 50 |
| Figure 23: Arbre phylogénétique (<i>Neighbor-joining and Tamura-Nei model</i>) des 13 souches de <i>P. falciparum</i> généré à partir des séquences de leur gène <i>Pfdhps</i> | 51 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|------------------------------------|
| Tableau I : Faciès du paludisme au Mali. | 13 |
| Tableau II: Taxonomie du vecteur du paludisme..... | 17 |
| Tableau III: Classification des réponses au traitement..... | 33 |
| Tableau IV: Composition du mélange réactionnel de la 1ere réaction | Erreur ! Signet non défini. |
| Tableau V : Composition du mélange réactionnel de 2eme réaction..... | Erreur ! Signet non défini. |
| Tableau VI: Master Mix du ExoSAP (exonuclease +phosphatase alcaline)..... | Erreur ! Signet non défini. |
| Tableau VII: Préparation de la réaction de séquençage de l'ADN..... | Erreur ! Signet non défini. |
| Tableau VIII : Répartition des séquences de bonne qualité en fonction du site d'origine..... | 47 |
| Tableau IX: Répartition des séquences en fonction du type de mutation | 49 |

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|------------------------------------|
| LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS | xix |
| LISTE DES FIGURES..... | xxi |
| LISTE DES TABLEAUX..... | xxii |
| TABLE DES MATIERES | xxiii |
| 1 INTRODUCTION..... | 1 |
| 2 OBJECTIFS | 5 |
| 2.1 OBJECTIF GENERAL | 5 |
| 2.2 OBJECTIFS SPECIFIQUES :..... | 5 |
| 3 GENERALITES: | 8 |
| 3.1 DEFINITIONS :..... | 8 |
| 3.1.1 Paludisme :..... | 8 |
| 3.1.2 Mutation:[18]..... | 8 |
| 3.2 HISTORIQUE..... | 8 |
| 3.2.1 Paludisme | 8 |
| 3.2.2 Historique sur la résistance de façon globale (surtout <i>Pfprt</i>) | 9 |
| 3.2.3 Répartition géographique du paludisme..... | 10 |
| 3.2.4 Répartition géographique de la résistance à la Sulfadoxine..... | 13 |
| 3.3 BIOLOGIE | 15 |
| 3.3.1 VECTEUR | 15 |
| 3.3.2 PARASITE (agent causal)..... | 17 |
| 3.4 PARASITE | Erreur ! Signet non défini. |
| 3.4.1 CYCLE DE VIE DES PLASMODIES | 18 |
| 3.5 Diagnostic du Paludisme | 20 |
| 3.5.1 Diagnostic clinique | 20 |
| 3.5.2 Frottis mince et goutte épaisse :..... | 20 |
| 3.5.3 Diagnostic Biologique : [29]..... | 20 |
| 3.5.4 Quantitative Buffy-coat :..... | 20 |
| 3.5.5 Diagnostic immunologique : ELISA et IFI [20]..... | 21 |
| 3.5.6 Tests de diagnostic rapides: TDR [20]..... | 21 |
| 3.6 TRAITEMENT DU PALUDISME..... | 21 |
| 3.6.1 Antipaludiques | 22 |
| 3.7 Molécules utilisent pour la Chimio-prévention du paludisme Saisonnier (CPS)..... | 23 |
| 3.7.1 Sulfonamides : Sulfadoxine :..... | 23 |
| 3.7.2 Diaminopyrimidiques : la Pyriméthamine..... | 25 |
| 3.7.3 Amodiaquine :..... | 27 |



| | | |
|--------|--|-----------------------------|
| 3.8 | Contre-indications de la CPS [11] | 28 |
| 3.9 | RESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES [40]..... | 28 |
| 3.10 | Mécanismes de la chimiorésistance aux antipaludiques | 29 |
| 3.10.1 | Aminoquinoléines : la chloroquine | 29 |
| 3.10.2 | Antimétabolites : résistance de <i>P. falciparum</i> à la SP | 30 |
| 3.10.3 | Positions dont les mutations sont reconnues être associées à la résistance de <i>Plasmodium</i> à la sulfadoxine | 31 |
| 3.10.4 | Les CTA : résistance de <i>P. falciparum</i> aux CTA | 31 |
| 3.11 | Méthodes d'étude de la résistance aux antipaludiques | 32 |
| 3.11.1 | Test de sensibilité <i>in vivo</i> :[47] | 32 |
| 3.11.2 | Test de sensibilité <i>in vitro</i> | 33 |
| 3.12 | Etudes moléculaires : | 34 |
| 4 | METHODOLOGIE | 38 |
| 4.1 | Période et type d'étude | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.3 | Population d'étude : | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.4 | Taille de l'échantillon..... | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.5 | Echantillonnage..... | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.6 | Diagnostic du paludisme..... | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.7 | Recherche des mutations sur le gène <i>Pfdhps</i> | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.8 | LIEUX D'ETUDE | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.9 | Collecte et Traitement des échantillons : | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.9.1 | Extraction de l'ADN de <i>Plasmodium falciparum</i> | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.9.2 | Séquençage des échantillons..... | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.10 | Analyses des séquences :..... | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.11 | Considérations éthiques et déontologiques | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.12 | Gestion des données : | Erreur ! Signet non défini. |
| 5 | RESULTATS | 47 |
| 5.1 | Répartition et sélection des souches en fonction de la qualité des données du séquençage | 47 |
| 5.2 | Variables démographiques..... | 47 |
| 5.3 | Parasitémie..... | 48 |
| 5.4 | Mutations associées à la résistance à la sulfadoxine..... | 48 |
| 5.4.1. | Position (codon) 540 du gène <i>Pfdhps</i> | 49 |
| 5.4.2. | Position (codon) 613 du gène <i>Pfdhps</i> | 49 |
| 5.4.3. | Position (codon) 581 du gène <i>Pfdhps</i> | 49 |
| 5.5. | Phylogénie..... | 50 |
| 6 | Commentaires et Discussion : | 53 |

| | |
|--|-------|
| 7.1 Conclusion | 56 |
| 7.2 Recommandations:..... | 56 |
| 7 REFERENCE | 58 |
| 7.1 Test de Diagnostic Rapide (TDR) | xix |
| 8 ANNEXE..... | xx |
| 8.1 Testde La goutte épaisse | xx |
| 8.2 Protocole de l'extraction de l'ADN de <i>Plasmodium falciparum</i> avec le Kit Qiagen DNA Blood Mini kit (250) | xxii |
| FICHE SIGNALETIQUE | xxv |
| IDENTIFICATION SHEET | xxvii |



1 INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie causée par des hématozoaires appartenant au genre *Plasmodium*. La maladie est transmise par la piqûre infectante d'un anophèle femelle (genre Anophèles) [1].

Il existe plusieurs types de *Plasmodium* mais Six (6) sont pathogènes pour l'Homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi* [2]. Le paludisme demeure une maladie potentiellement mortelle. D'après le dernier rapport publié par l'OMS sur le paludisme, le nombre de cas de paludisme a été estimé à 219 millions dans le monde en 2017. Au total, les dix pays d'Afrique les plus durement touchés par la maladie auraient enregistré 3,5 millions de cas de paludisme supplémentaires par rapport à 2016. Le paludisme reste responsable de plus de 435 000 décès chaque année, majoritairement en Afrique [3]. Ces décès sont imputables à deux complications principales: le neuropaludisme et l'anémie.

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

Au Mali, le paludisme représente également 45,74 % de l'ensemble des consultations pour les enfants de moins de cinq ans. Il est la première cause de décès des enfants de moins de cinq ans et d'anémie chez les femmes enceintes [4].

Cependant, depuis plusieurs années, des moyens de lutte et de prévention ont été initiés par l'OMS à travers les programmes nationaux de lutte contre le paludisme en vue de diminuer la morbi-mortalité voir même l'éradication de la maladie. Le Mali s'est doté d'un Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) en 1993, qui depuis sa création, a entrepris la mise en œuvre des mesures de lutte recommandée par l'OMS contre cette maladie dont la Chimio- prévention du paludisme saisonnier (CPS) chez les enfants de 3 à 59 mois [5].

La chimio prévention du paludisme saisonnier consiste à administrer des molécules antipaludiques aux enfants sains de 3 à 59 mois pendant la période de forte transmission du paludisme. Elle a pour objectif de diminuer le nombre de cas de paludisme simple et grave chez les enfants de moins de cinq ans qui constituent l'une des couches les plus vulnérables [6] . C'est dans ce but, que depuis 2012, la CPS est recommandée par l'OMS dans les zones de forte transmission saisonnière comme la sous-région du Sahel.

Au Mali, elle consiste en l'administration d'un cycle de traitement complet par la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) et l'Amodiaquine (AQ) à des enfants pendant cette période[6].

Par ailleurs, un des problèmes majeur dans la lutte contre le paludisme est le phénomène de résistances aux antipaludiques[7]. La résistance des parasites responsables du paludisme aux antipaludiques a démarré par la chloroquine [8]. Le gène de la résistance à la chloroquine a été identifié en 2000. La substitution de la Lysine par la Thréonine en position 76 du gène *Pfcr* conduit à la mutation qui joue un grand rôle dans le mécanisme de résistance à la chloroquine[9]. Elle a débuté en Asie du sud-est avant de se propager vers l'ouest jusqu'à l'Afrique[10]. Ce même phénomène s'est répété avec la Sulfadoxine-pyriméthamine. Cependant, l'Afrique subsaharienne est moins atteinte par la résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP, en atteste la recommandation de la CPS chez les enfants de 3 à 59 mois dans la zone du Sahel[11]. L'efficacité de l'utilisation de la SP plus l'Amodiaquine dans le cadre de la CPS du paludisme chez les enfants de moins de cinq s'est avérée efficace en Afrique sub-saharienne selon différentes études [11,13]. Malgré tout, la surveillance des résistances demeure recommandée. Aussi, les mutations sur le gène *Plasmodium falciparum* dihydroptéroate synthétase(*Pfdhps*) aux positions 436, 437, 540, 581 et 613 sont reconnues être liées à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine. Parmi ces mutations, celles rencontrées aux positions 540 et 437 sont les principales associées à la résistance à la sulfadoxine[14]. Actuellement, l'OMS recommande aux pays d'endémie palustre de procéder à un suivi régulier de l'efficacité des médicaments antipaludiques tous les 24 mois au niveau des sites sentinelles afin de détecter des modifications de leur efficacité thérapeutique[15].

La résistance aux médicaments en général, aux antipaludiques en particulier résulte de mutations spontanées qui ont pour effet de modifier la structure et l'activité au niveau moléculaire, de la cible du médicament à l'intérieur du pathogène ou d'empêcher le médicament de parvenir à cette cible[16].

Ainsi, des systèmes de surveillance ont été mis en place pour surveiller la sensibilité des espèces Plasmodiales aux antipaludiques

Il existe diverses méthodes d'évaluations, elles peuvent se faire soit in vivo par suite d'administration d'antipaludiques et le suivi du patient jusqu'à la clairance parasitaire, soit ex vivo où le parasite est exposé à une concentration de médicament et indiquant la concentration inhibitrice 50 (CI50).

Enfin d'autres méthodes de biologie moléculaire telle que la PCR-RFLP, HRM et le séquençage sont utilisés pour la recherche des points de mutations sur les gènes.

Hypothèse de recherche :

L'utilisation massive de la sulfadoxine au cours des campagnes de CPS pourrait conduire à la sélection des allèles mutants de *Pfdhps* associées à la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine.

OBJECTIFS

2 OBJECTIFS

2.1 OBJECTIF GENERAL

- ❖ Caractériser les mutations du gène *dhps* de *P. falciparum* chez les enfants ayant reçu les doses de SP+AQ au cours de la CPS dans les localités de Dioro, Missira et Sélingué.

2.2 OBJECTIFS SPECIFIQUES :

- ❖ Identifier les mutations déjà connues et non connues de *Pfdhps* associées à la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine.
- ❖ Examiner la diversité du gène *dhps* de *P. falciparum* dans les trois localités Dioro, Missira et Sélingué.

GENERALITES

3 GENERALITES:

3.1 DEFINITIONS :

3.1.1 Paludisme :

Le paludisme, aussi appelé malaria (de l'italien mala : mauvais et aria : air signifiant mauvais air), est une *Protozoonose*, une érythrocytopathie due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* qui se transmettent à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Le paludisme peut être prévenu par une lutte anti vectorielle et au moyen de médicaments antipaludiques[17].

3.1.2 Mutation:[18]

Une mutation est une variation génétique d'une forme allélique à une autre.

3.1.3 Résistance aux antipaludiques

L'OMS a défini la chimiorésistance comme l'aptitude d'une souche de parasite 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 [19]

3.2 HISTORIQUE

3.2.1 Paludisme

Le paludisme est l'une des plus vieilles maladies que l'humanité ait connues[20].

L'origine de la maladie est peu documentée, cependant les fouilles archéologiques suggèrent que l'expansion du paludisme concorderait avec l'apparition de l'agriculture[21].

Depuis l'antiquité chinoise et plus précisément à l'époque de l'empereur de Chine Huang Ti (appelé Nei Ching, en 2 700 avant JC) on peut voir les premières traces écrites évoquant les symptômes de la malaria. Connu sous le nom de l'« Empereur jaune », Nei Ching est considéré comme l'auteur des tous premiers textes médicaux chinois connus. À cette époque, le paludisme était symbolisé par un dragon à trois têtes: la première, un marteau, représente les maux de tête; la seconde, un seau d'eau glacée, symbolise les frissons et la troisième, un diadème de fer porté au rouge, représente la fièvre [21].

L'historique du paludisme peut être présentée en plusieurs étapes [20] :

- en 400 ans avant JC, Hippocrate décrivait le paludisme du kyste hydatique en Grèce ;

- en 1630 Don Francisco Lopez apprenait à des Indiens du Pérou les vertus de l'écorce du quinquina ;
- en 1820 Pelletier et Caventou isolent l'alcaloïde actif, la quinine ;
- en 1830 Maillot utilise la quinine dans la campagne d'Algérie ;
- en 1880 l'agent pathogène est découvert par Laveran à Constantine ;
- en 1880 Marchiafana et Golgi décrivaient trois espèces de *Plasmodium* parasite de l'homme : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* ;
- De 1895 à 1897, Ross suspecta la transmission de la maladie par le moustique du genre Anophèles avant que la confirmation ne soit faite par Grassi en 1898 ;
- en 1970 le Professeur Zhenxing Wei (Chine) réalisait un extrait de l'artémisinine ;
- en 1977 un chercheur de l'entreprise pharmaceutique Guilin synthétisa l'artésunate ;
- en 1978 le Professeur LiYin produisait pour la première fois l'artéméther ;
- en 1992 la firme Rhône-Poulenc aujourd'hui Aventis en accord avec l'OMS et l'usine pharmaceutique de Kunming produisirent de l'artéméther injectable ; en 2001, en Asie du Sud-est, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine est suspectée ;
- en 2006 au Cambodge, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine a été identifiée pour la première fois [20].

De nos jours, la recherche reste orientée dans la lutte anti vectorielle, le traitement curatif et prophylactique, la vaccination. La lutte anti vectorielle est confrontée à un problème technique (résistance aux insecticides) et un problème économique (de coût et de mise en valeur des insecticides). Le traitement antipaludique requiert actuellement de nouveaux produits efficaces contre les souches de *P. falciparum* résistantes aux amino-4-quinoléines [20]

3.2.2 Historique sur la résistance de façon globale (surtout *Pfprt*)

Depuis son développement dans les années 1940, l'efficacité élevée, la bonne tolérance, la stabilité chimique, le faible coût et la facilité de production de la CQ ont contribué à en faire l'antipaludique le plus largement utilisé dans le monde. Cependant, une résistance de *P. falciparum* à la CQ a été détectée pour la première fois en 1957 à la frontière Cambodge Thaïlande et Colombie-Vénézuéla. Des analyses génétiques ont, plus tard, démontré l'existence d'au moins 4 foyers d'émergence différents de chloroquino-résistance : un en Asie qui s'est ensuite propagé en Afrique, un en Papouasie Nouvelle Guinée, et deux en Amérique du Sud ; la résistance à la CQ a ensuite diffusé dans d'autres pays d'Asie, puis au cours des trente années suivantes, en Afrique (1er cas documenté

dans l'Est en 1977, avec des conséquences catastrophiques. En 1989, la chloroquinorésistance s'était propagée à toute l'Afrique sub-saharienne. [22]

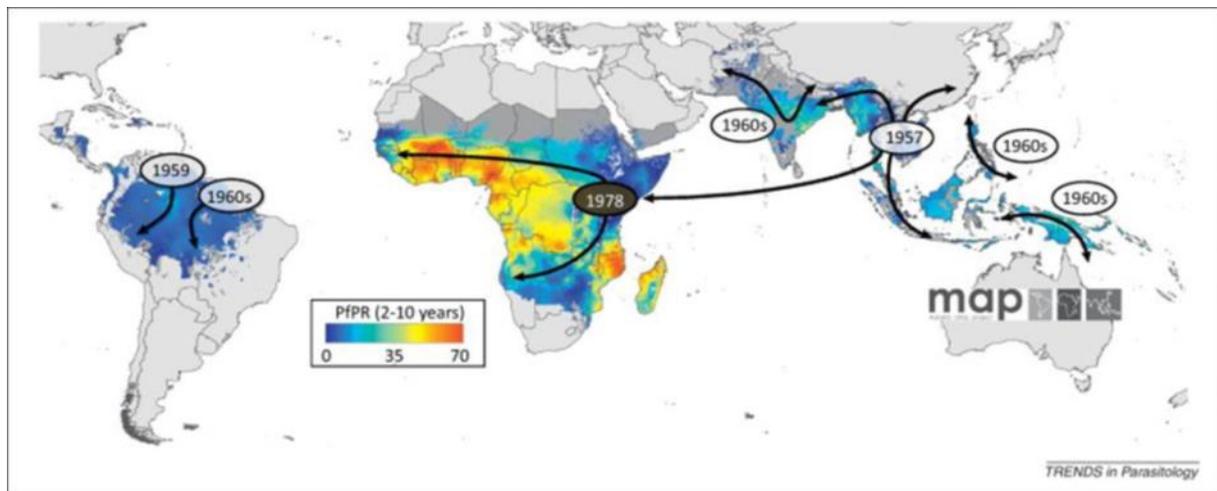


Figure 1: Propagation des souches chloroquino-résistance de *Plasmodium falciparum*

Aujourd'hui, la résistance de *P. falciparum* à la CQ est présente dans tous les pays d'endémie palustre à l'exception de quelques pays d'Amérique Centrale et des Caraïbes. Même si l'émergence de la résistance de *P. falciparum* à la CQ a forcé les pays d'endémie palustre à abandonner cette molécule, la CQ est encore recommandée dans les cas de paludisme causé par les espèces de *Plasmodium non-falciparum*. Cependant, l'apparition de résistance de *P. vivax* à la CQ en Papouasie Nouvelle Guinée et plus tard en Amérique du Sud limite également son utilisation, un traitement par un CTA approprié étant recommandé dans ces pays. La chloroquino-résistance de *P. malariae* a été décrite une seule fois, au sud de Sumatra en Indonésie.[22]

REPARTITION GEOGRAPHIQUE

3.2.3 Répartition géographique du paludisme

Dans le monde

En 2016, près de la moitié de la population mondiale étaient exposée au risque de contracter le paludisme. Le paludisme est considéré endémique dans 91 pays et territoires contre 108 en 2000[17]. La plupart des cas et des décès dus à cette maladie surviennent en Afrique subsaharienne. Les régions OMS de l'Asie du Sud-Est, des Amériques et de la Méditerranée orientale sont également affectées[23].

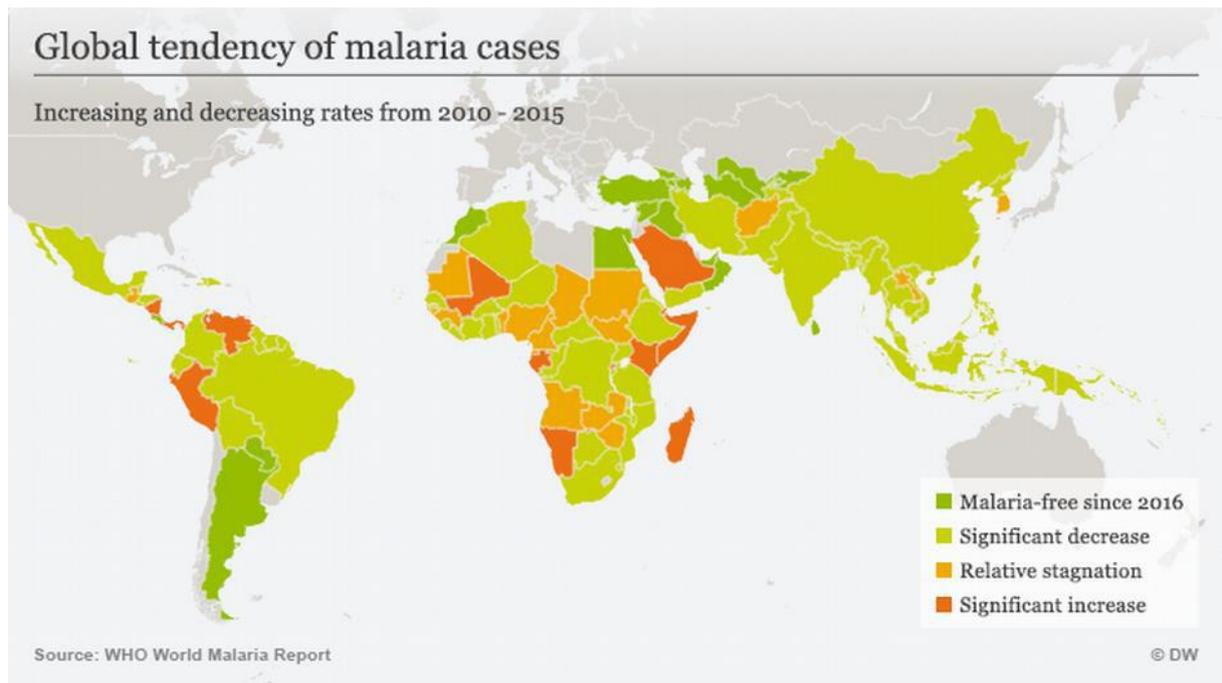


Figure 2 : Répartition du paludisme dans le monde

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

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. Il est au premier rang des priorités de l’OMS pour ses ravages et ses conséquences sociaux économiques.

La transmission du paludisme est élevée dans toute la zone intertropicale entre le 30° de latitude Nord et le 30° de latitude Sud :

- En Afrique intertropicale, dans tous les pays sauf le Lesotho : le paludisme est dû à *P. falciparum* et à *P. ovale*, ou plus rarement à *P. malariae* ;
- dans l’Océan Indien : Madagascar, Archipel des Comores, Zanzibar,
- En Amérique latine, il y a une diminution globale des cas, sauf au Honduras, en Colombie, en Guyane française et au Surinam. Il y a une forte proportion d’infection à *P. vivax*,

En Asie : dans tous les pays de l’Asie du sud-est, sauf à Brunei ; dans la plupart des centre-sud, en particulier Inde, Pakistan, Afghanistan, Bangladesh[23].

En Afrique

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituent les groupes à risque.

La chimio prévention du paludisme saisonnier par l'administration d' antipaludiques pendant la saison de haute transmission aux enfants de 3 à 59 mois s'est avérée être une arme efficace dans l'arsenal de prévention contre le paludisme même si certains études en Afrique ont révélé des mutations sur les gènes du *P. falciparum* à la SP[24]

Au Mali

La transmission du paludisme est endémique avec un pic saisonnier pendant la saison des 1 (Août-Novembre). Le paludisme est la première cause de consultation, d'hospitalisation et de mortalité dans les formations sanitaires.[5] .

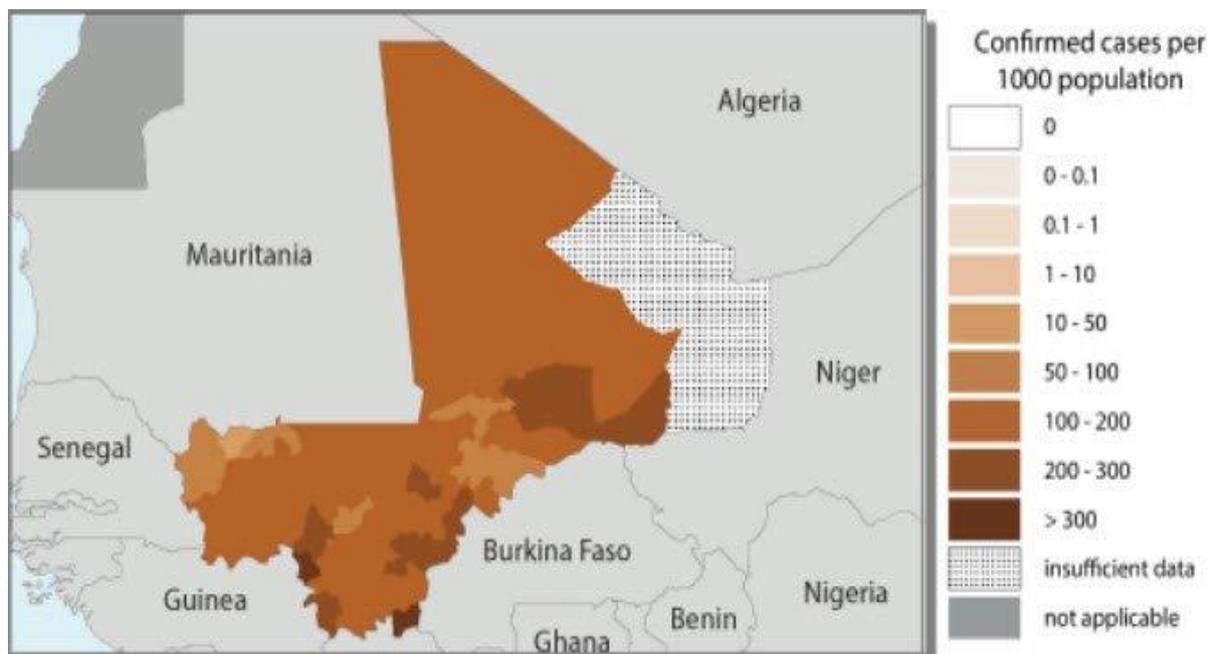


Figure 3 : Distribution des cas de paludisme au Mali [25]

Tableau I : Faciès du paludisme au Mali.

| Faciès Epidémiologiques | Transmission Paludisme | Endémicité IP | Région Géographique | Caractéristiques |
|---|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--|
| Faciès soudano guinéen | -Intense (-6 mois/an) | Holoendémique IP > 75 % | Sikasso | Prémunition acquise 5 ans. |
| Faciès nord soudanien et Sahel | -Intense (3-4 mois/an) | Hyperendémique IP : 5 – 75 % | Ségou, Koulikoro, Mopti | Prémunition 9 ans. Neuropaludisme, fréquent à 1-9 ans. |
| Faciès saharien | -Sporadique -voire Epidémique | Epidémique IP < 10 % | Gao, Kidal, Tombouctou | Adultes aussi exposés risque paludisme grave et compliqué. |
| Faciès des Barrages | -Bimodale (Plurimodale) | Mésoendémique IP : 26 – 50 % | Sélingué, Manantali, Markala | Anémie palustre élevée chez moins 9ans. |
| Faciès urbain | | Hypoendémique IP < 10 % | Bamako, Mopti ville | Adultes bamakois risque paludisme grave. |

3.2.4 Répartition géographique de la résistance à la Sulfadoxine

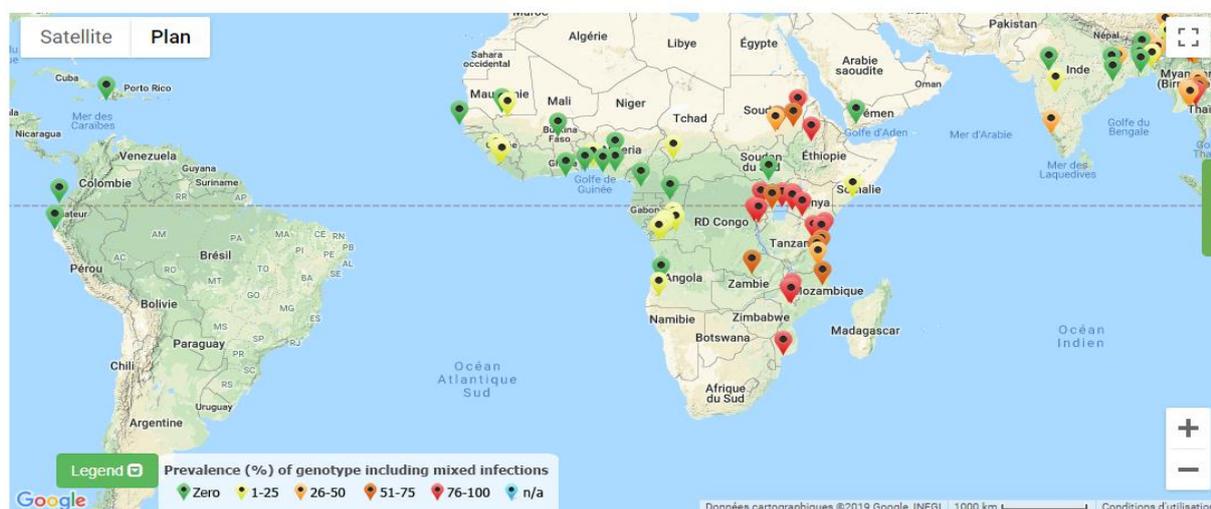


Figure 4 : Répartition des mutations du gène *Pfdhps* dans le monde à la position 437et 540

Source : <http://www.wwarn.org/dhfr-dhps-surveyor/#0>

A ce jour, très peu de mutations ont été signalées au Mali sur la position 613 du gène *Pfdhps*.

3.3 BIOLOGIE

Le paludisme est dû à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques *Anopheles* infectés, appelés «vecteurs du paludisme», qui piquent principalement entre le crépuscule et le petit matin [20].

3.3.1 VECTEUR

La transmission du paludisme s'effectue par son hôte définitif, la femelle, hématophage, d'un moustique, du genre *Anopheles*. Il en existe plusieurs espèces et les plus dangereuses pour l'Homme s'avèrent être celles qui sont anthropophiles et endophiles (respectivement qui préfèrent piquer les hommes et qui se reposent à l'intérieur des habitations). On considère que plus d'une cinquantaine d'espèces pourrait transmettre le paludisme [26].

L'Homme est le principal réservoir de parasites. Ces insectes vivent en milieu humide à des températures quasiment toujours supérieures à 18°C. Ils n'évoluent généralement pas au-dessus de 1500 mètres d'altitude. Les Larves se développent dans une eau douce et non polluée et ne s'éloignent que de 300 mètres du lieu de leur naissance[26].

Les *Anopheles* femelles piquent en soirée ou la nuit, une fois le soleil couché. Cet hôte définitif du *Plasmodium* a une durée de vie de 3 à 12 Semaines et prend des repas sanguins pour la maturation de ses œufs. *Anopheles gambiae* est considérée comme le principal vecteur africain de l'infection à *P. falciparum*. Un *anophèle* infecté devient infectant et transmet alors la maladie au bout de 4 semaines [26].



Figure 7 : *Anopheles gambiae*[26]

Source : National géographiq

Au Mali, des études conduites par Touré en 1983 ont montré que *Anopheles gambiae s.l.* comporte *An. arabiensis* et les trois formes chromosomiques d'*An. gambiae s.s* nommées Mopti, Savane et Bamako. La forme Mopti se rencontre fréquemment dans les zones d'inondation du fleuve Niger, elle coexiste avec la forme Bamako dans les régions humides du sud, avec des fréquences faibles. La forme Savane se rencontre dans les zones du sud et du centre.

La transmission du paludisme est assurée en saison sèche froide (Novembre –Février) par *An. Arabiensis* et la forme Mopti d'*An. Gambiae s.s* lui succèdent en période sèche chaude (Mars-Juin). Les formes Savane et Bamako de *An. Gambiae s.s* deviennent les principaux vecteurs pendant la saison des pluies (Juillet-Octobre). Ainsi, le long de l'année les vecteurs se relayent dans la transmission du *plasmodium*[27].

Systematique :[28]

Il existe plus de 3 500 espèces répertoriées à ce jour au sein de la famille des *Culicidae* qui regroupe l'ensemble des insectes connus sous le nom vernaculaire de moustiques (**Tableau II**). Classés dans l'ordre des Diptères (2 ailes) et le sous-ordre des Nématocères (antennes filiformes). Ces insectes sont caractérisés par des antennes longues et fines à multiples articles, des ailes pourvues d'écailles et la présence, chez les femelles au moins, de pièces buccales en forme de trompe rigide appelée proboscis. Les *Culicidae* sont répartis en deux sous-familles : *Anophelinae* et *Culicinae*.

Tableau II: Taxonomie du vecteur du paludisme

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

3.3.2 PARASITE (agent causal)

Le *Plasmodium* est le parasite responsable du paludisme. C'est un parasite intracellulaire obligatoire, amiboïde, colonisant les hématies et produisant un pigment. Les *Plasmodiums* sont des protozoaires appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa*. Cet embranchement est caractérisé par la présence d'un complexe apical généralement constitué d'un conoïde facilitant à la pénétration dans la cellule hôte, d'un anneau polaire et de rhoptries. Ces derniers sécrètent probablement une enzyme protéolytique ainsi que des microtubules sous membranaires conférant la mobilité à la cellule [29]

- **Systematique** [30]

Embranchement : Apicomplexa,

Classe : Sporozoea,

Sous-classe : Coccidia,

Ordre: Eucoccida,

Sous-ordre : Haemosporina,

Famille: Plasmodidae,

Genre: *Plasmodium*

3.3.3 CYCLE DE VIE DES PLASMODIES

Le cycle de développement du *Plasmodium* nécessite deux hôtes obligatoires : l'homme et le moustique. Chez l'homme s'effectue la multiplication asexuée ou schizogonie. Chez l'anophèle femelle s'effectue le cycle sexué ou sporogonie[20]

- **Chez l'homme :**

Il se déroule en deux phases : une phase hépatique (ou exo-érythrocytaire) et une phase sanguine (ou érythrocytaire) [31,32]

- ✓ **La phase hépatique :**

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

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

- ✓ **La phase sanguine :**

La rupture des corps bleus libère des mérozoïtes qui pénètrent les globules rouges par endocytose, et se transforment en trophozoïtes. Les trophozoïtes grossit et se transforme en schizontes sanguin qui est appelé corps en rosace à maturité et qui contient de nombreux mérozoïtes dont le nombre varie selon l'espèce *plasmodiale*. L'éclatement de l'hématie libère les mérozoïtes dans la circulation sanguine. Chaque mérozoïtes envahit une nouvelle hématie, poursuivant ainsi le cycle intraérythrocytaire.

Au cours de la multiplication dans les hématies, le parasite va produire au dépend de l'hémoglobine un pigment appelé l'hémozoïne. Parallèlement apparaissent dans l'hématie des taches de Maurer (*P.falciparum*), des granulations de Schüffner (*P.vivax* et *P. ovale*) ou des ponctuations de Ziemann (*P.malariae*)

Le cycle sanguin dure 48 heures chez le *P.falciparum*, *P.vivax* et *P. ovale*, 72 heures chez le *P.malariae*. C'est l'éclatement simultané des corps en rosace d'une même génération qui provoque l'accès fébrile typique du paludisme. Après plusieurs cycles schizogoniques sanguins, certains

3.4 Diagnostic du Paludisme

Le diagnostic du paludisme est un problème préoccupant pour la prise en charge efficace de cette maladie. En zone d'endémie palustre, le diagnostic repose souvent sur le seul diagnostic de fièvre. Il n'y a pas de symptôme pathognomonique du paludisme. Inversement, la présence du parasite dans le sang ne suffit pas à lui seul à expliquer les symptômes et les signes cliniques du paludisme.

3.4.1 Diagnostic clinique

Les signes accompagnant un accès palustre simple à *Plasmodium falciparum* sont très variables et peuvent se confondre avec d'autres maladies telles que la grippe, les hépatites, la typhoïde, une méningite, une gastro-entérite etc... Le malade se plaint fréquemment de fièvre, de maux de tête, de douleurs divers (quelque fois raideur de la nuque), de douleurs abdominales et de diarrhées. Le jeune enfant peut être irritable, peut refuser de s'alimenter et vomir. La fièvre peut malgré tout être absente. Elle est tout d'abord continue plutôt tierce (pics de fièvre un jour sur deux) et elle peut ou non s'accompagner de frissons. Un paludisme à *Plasmodium falciparum*, qui n'est pas traitée rapidement, peut évoluer vers un paludisme grave, souvent mortel [34]

3.4.2 Frottis mince et goutte épaisse :

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

3.4.3 Diagnostic Biologique : [29]

C'est un diagnostic d'urgence, consistant à mettre en évidence le parasite présent dans le sang, permettant de faire le diagnostic de certitude de l'infestation palustre.

Toutes ses techniques sont des méthodes de diagnostic direct.

3.4.4 Quantitative Buffy-coat :

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

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

3.4.5 Diagnostic immunologique : ELISA et IFI [20]

Ces méthodes constituent le diagnostic indirect du paludisme.

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

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

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

Le diagnostic immunologique ne peut remplacer le diagnostic parasitologique direct, du fait que les anticorps apparaissent avec un retard de plusieurs jours sur la parasitémie et disparaissent plus tard.

3.4.6 Tests de diagnostic rapides: TDR [20]

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

Plusieurs tests de diagnostic rapide (TDR) par immunochromatographie sont disponibles. Ils sont classés en fonction du nombre d'antigènes détectés; certains permettent la mise en évidence de la *pLDH* (*Plasmodium* lactate déshydrogénase) : *Pf* pour *P. falciparum*, *Pv* pour *P. vivax* ; Pan-LDH commune aux quatre espèces plasmodiales. La sensibilité et la spécificité revendiquées par les constructeurs de ces tests sont comparables.

Ces tests ne doivent pas être employés seuls. Le parasite doit être mis en évidence par d'autres tests.

3.5 TRAITEMENT DU PALUDISME

Le paludisme est une maladie évitable dont on guérit. L'objectif premier du traitement est d'obtenir une guérison complète, c'est-à-dire l'élimination rapide et totale des plasmodies dans le sang du patient, pour éviter qu'un paludisme non compliqué n'évolue vers une forme grave potentiellement mortelle ou vers une infestation chronique provoquant une anémie. Du point de vue de la santé

publique, le traitement est destiné à réduire la transmission de l'infection en diminuant le réservoir infectieux, et à éviter l'apparition et la propagation d'une résistance aux antipaludiques[35]

3.5.1 Antipaludiques

Un antipaludique est un composé naturel ou de synthèse qui, administré par voie orale, parentérale ou rectale, à dose unique ou répétée, permet de détruire le parasite ou de bloquer sa croissance dans le but de prévenir ou de guérir la maladie palustre [36]

Classification des antipaludiques selon leur mécanisme d'action [37]

La Classification des antipaludiques repose sur les modes d'action et leur structure chimique.

➤ Les schizonticides

○ Schizonticides érythrocytaires :

- Amino-4-quinoléine : chloroquine, amodiaquine, pipéraquline
- Arylamino-alcools :
- ✓ quinoléine méthanol : quinine, méfloquine, halofantrine, luméfantrine
- ✓ qinghaosu et dérivés de l'artémisinine (artéméther, artésunate, dihydroartémisinine)

Les antipaludéens à effet intraérythrocytaire traversent la membrane des globules rouges puis celle du parasite et pénètrent dans sa vacuole digestive où ils s'accumulent. La résistance aux antipaludéens intra-érythrocytaires serait due à des expulsions des antipaludéens par les parasites.

○ Schizonticides érythrocytaires et tissulaires :

- Antifoliques : sulfamides (sulfadoxine)
- Antifoliniques : pyriméthamine, proguanil
- Antibiotiques : doxycycline

➤ Gaméticides :

Amino-8-quinoléines : primaquine, tafénoquine

3.6 Molécules utilisées pour la Chimio-prévention du paludisme Saisonnier (CPS)

3.6.1 Sulfonamides : Sulfadoxine :

- Structure :

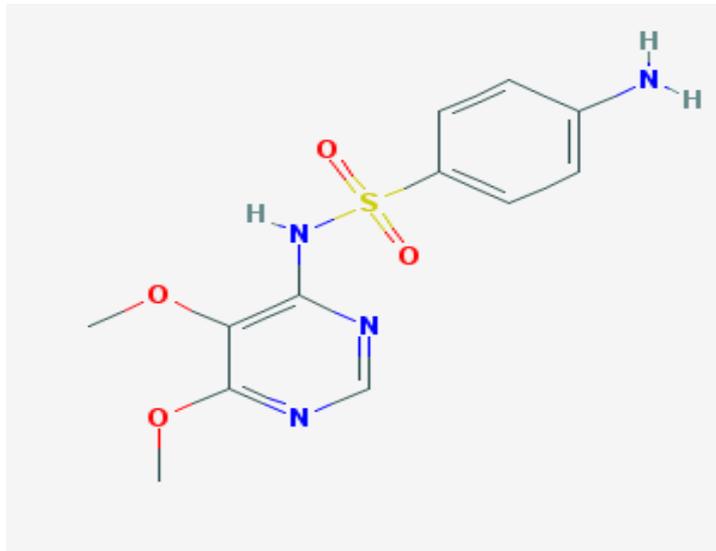


Figure 9 : Structure chimique de la Sulfadoxine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17134#section=2D-Structure>

- Mécanisme d'action

Sulfadoxine agit en inhibant la dihydroptéroate synthétase qui produit l'acide folique [38].

- Propriétés pharmacologiques [36]

Actuellement les sulfamides à longue demi-vie (sulfadoxine dans FANAZIL et sulfalène dans KELFINE) sont les plus utilisés, surtout associé à un anti folique. La sulfadoxine a une bonne absorption, une demi-vie d'élimination plasmatique de 7 à 8 jours.

Les sulfamides retard sont presque totalement absorbés puis ils se fixent partiellement sur les protéines plasmatiques. Une prise orale de 1500mg, donne au bout de 3 heures un taux plasmatique de 15 à 20mg. Ce taux décroît lentement avec une demi-vie de 120 à 180 heures pour la sulfadoxine. Ce taux sérique est maintenu pendant une semaine, cependant on note des variations individuelles qui paraissent dépendre de l'acétylation rapide ou lente.

L'élimination se fait après acétylation hépatique par les urines, en grande partie (80%) sous forme libre et le reste sous forme acétylée ou glucuronoconjuguée.

Son activité sur les schizontes érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* est bonne, quelques fois peu lente, mais nulle sur *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*. La tolérance est bonne, cependant elle détermine des allergies cutanées limitées à un simple érythème dans la plupart des cas, mais parfois s'étendant aux toxidermies bulleuses graves (syndrome de Lyell ou de Stevens Jonson) engageant le pronostic vital. Les manifestations graves surviennent un cas pour 5000 traitements après prises répétées et on déplore 1 mort pour 20000 lors d'utilisation prophylactique.

Autres familles : les sulfones (Promine, Dapsone).

Dans ce groupe on retient également la Sulfalène et la Sulfaméthoxazole

- **Gène impliqué dans la résistance à la sulfadoxine**

P. falciparum dihydropteroate synthase (*Pfdhps*). La dihydropteroate synthase (*DHPS*) est une autre enzyme intervenant dans la synthèse des folates le gène qui code pour cette enzyme est situé sur le chromosome 8 [39].

3.6.2 Diaminopyrimidiques : la Pyriméthamine

- Structure :

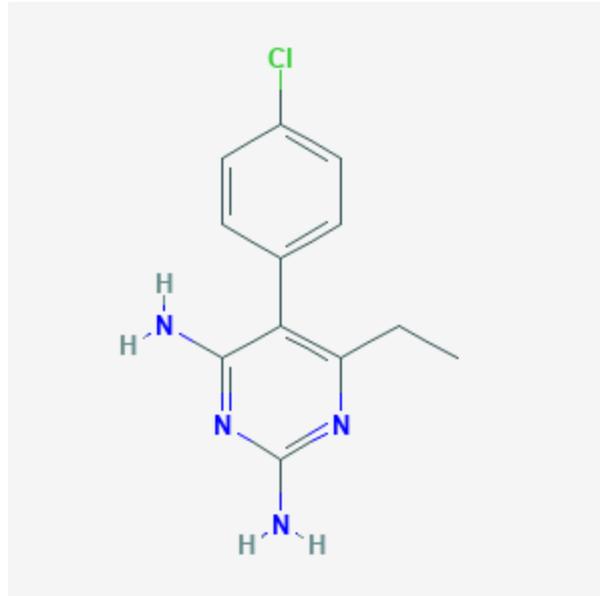


Figure 10 : Structure chimique de la Pyriméthamine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4993#section=2D-Structure>

- Mécanisme d'action

Pyriméthamine inhibe la DHFR qui intervient dans la production d'acide folique. L'inhibition de la DHFR bloque la transformation du dihydrofolate en tétrahydrofolate qui est un cofacteur essentiel dans la biosynthèse du thymidilate, des bases puriques et de nombreux acides aminés.[38]

Propriétés pharmacologiques :[36]

La pyriméthamine est un schizontocide sanguin d'action lente et un sporotocide.

Mais elle est sans action sur les formes intra-hépatiques. Cependant son activité schizonticide est plus marquée que celle du proguanil, parce qu'il agit directement et non par l'intermédiaire d'un métabolite. Elle est active également sur *Toxoplasma gondii* et *Pneumocystis carinii*. A la différence du triméthoprime elle n'a pas de propriétés antibactériennes.

Une prise unique de 100mg donne un taux plasmatique d'environ 0,60ng/ml à la 24ème heure et des traces 30 jours après.

Elle est bien absorbée avec un pic plasmatique obtenu 2 à 3 heures après l'administration une demi-vie longue de 4 à 5 jours. Son efficacité sur les schizontes érythrocytaires des plasmodies est lente mais bonne.

Le taux plasmatique efficace sur les souches sensibles est de 10 ug/ml.

Cette concentration est présente dans le sérum pendant environ 15 jours. Elle a une cinétique voisine de celle des sulfamides retard, il apparaît donc licite de les associer.

La pyriméthamine est généralement bien tolérée aux doses préconisées en prophylaxie en raison de 25 à 50mg par semaine chez l'adulte. Cependant lors de l'administration prolongée, chez les enfants malnutris, des anémies mégalo-blastiques peuvent être observées.

Chez la femme enceinte le risque d'anémie est très important. L'élimination très prolongée se fait par voie urinaire et fécale sous forme métabolisée. La pyriméthamine passe dans le lait maternel et traverse la barrière placentaire. Les dérivés les plus intéressants sont la **Metoprime et Triméthoprime** qui sont plutôt des antibactériens que des antimalariques.

Autres familles : les quinazolines : WR158122, les triazines : cycloguanil

- **Gène impliqué dans la résistance à la Pyriméthamine**

P. falciparum dihydrofolate réductase (*Pfdhfr*). Ce gène, situé sur le chromosome 4, code pour la dihydrofolate réductase intervenant dans la voie de synthèse des folates. Elle est la cible des médicaments anti-folates (pyriméthamine, par exemple) qui, en inhibant son activité enzymatique, entraînent le blocage de la synthèse des pyrimidines et la réplication de l'ADN parasitaire par la suite[1].

3.6.3 Amodiaquine :

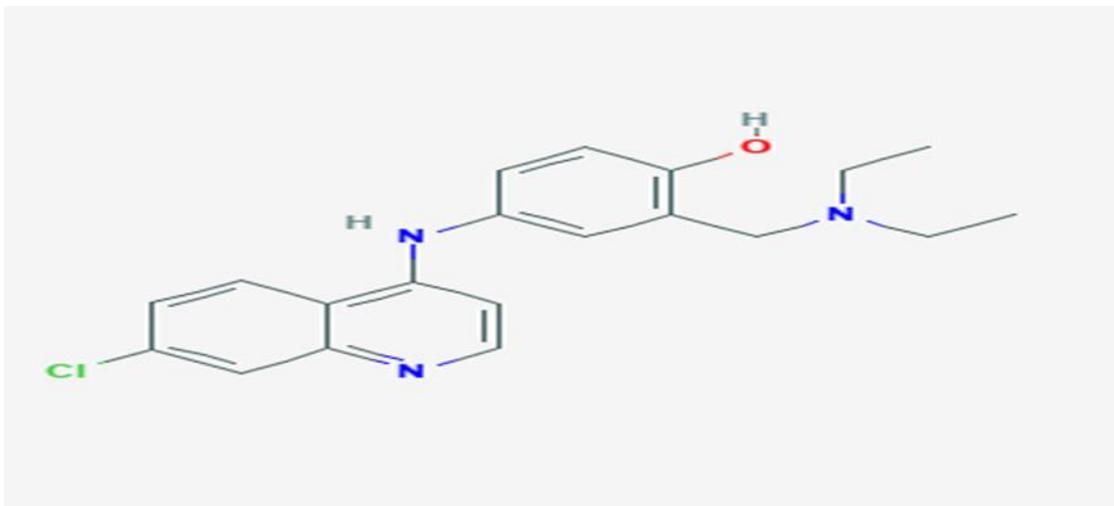


Figure 11 : Structure chimique de l'amodiaquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/319061512#section=Top>

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

Après prise orale, l'absorption est totale et rapide. Le pic sérique est atteint entre la 2^e et la 4^e heure.

Les amino-4 quinoléines se fixent aux protéines sériques et dans certains tissus (foie, reins, rate, cœur). L'élimination rénale est très lente, d'où la possibilité de prises espacées.

Effets indésirables[37].

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

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

3.7 Contre-indications de la CPS [11]

La CPS ne doit pas être administrée à :

- Un enfant souffrant d'une maladie fébrile aiguë ou d'une maladie grave, incapable de prendre des médicaments par voie orale ;
- Un enfant séropositif pour le VIH et recevant du cotrimoxazole en traitement préventif ;
- Un enfant qui a reçu une dose de SP ou d'AQ au cours du mois précédent ;
- Un enfant allergique à la SP ou à l'AQ ;
- Les cas de crise de paludisme (confirmé) survenant au cours de la période d'administration de la CPS ne doivent pas être traités par des schémas thérapeutiques faisant intervenir SP ou AQ.

3.8 RESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES [40]

Malgré les efforts déployés pour la découverte de nouveaux médicaments antiplasmodiaux et la mise en place effective par les systèmes de santé de combinaisons thérapeutiques pour le traitement antipaludique, *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances, y compris contre les CTA. La chimiorésistance parasitaire est l'aptitude d'une souche de parasite 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. Elle provient de la diminution d'affinité des récepteurs membranaires de l'hématozoaire pour le médicament, de l'impossibilité du médicament à pénétrer l'hématozoaire, et l'impossibilité du médicament à s'intercaler entre les chaînes d'ADN du parasite. Ceci s'explique d'abord par la grande diversité génétique de *P. falciparum* due à un taux élevé de mutations dans son génome et par les masses très importantes de parasites portées par les individus infectés. Même si les mutations capables de conférer une résistance à un nouveau médicament sont extrêmement rares et peu probables, le nombre élevé de parasites infectant les humains fait que ces mutations finissent par apparaître et par être sélectionnées par la pression médicamenteuse. Les erreurs de réplication de l'ADN dans les cellules introduisent des mutations au hasard dans le génome et permettent le processus d'évolution. Ces mutations sont à l'origine de la grande variabilité génétique de *P. falciparum* et lorsque celles-ci ne sont ni létales pour le parasite, ni silencieuses, elles peuvent dans certains cas avantager sa survie en lui permettant par exemple d'échapper au système immunitaire de son hôte, de supporter la présence de molécules toxiques dans son environnement ou de se multiplier plus rapidement que d'autres clones. Certaines mutations permettent au parasite de survivre en présence d'un antipaludique, qui devient résistant. La mutation est ensuite transmise à ses

descendants, générant ainsi une population capable de résister à une molécule. La fréquence des mutations et la vitesse à laquelle les résistances se développent dépendent des caractéristiques de la molécule utilisée, du contexte épidémiologique (intensité de la transmission) et de la façon dont les médicaments sont utilisés.

3.9 Mécanismes de la chimiorésistance aux antipaludiques

Face à la résistance plasmodiale, la compréhension des modes d'action cellulaire des médicaments antipaludiques est essentielle pour optimiser leur emploi et pour comprendre les mécanismes qui sont impliqués dans la résistance. Le *Plasmodium* dispose pour son développement intra érythrocytaire d'un métabolisme et de moyens de défenses spécifiques qui constituent autant de cibles aux antipaludiques. On distingue :

La vacuole nutritive du parasite qui est le siège de la digestion de l'hémoglobine, de la cristallisation de l'hème et où l'on retrouve des moyens de défense contre le stress oxydant. Un cytoplasme comportant le cytosol et deux organites essentiels, les mitochondries et l'apicoplaste. Ils sont nécessaires à la biosynthèse des acides nucléiques.

Une membrane plasmique, constituée de phospholipides, de canaux calciques et parasitophores, qui est le siège du trafic nutritionnel[40].

Les différents gènes impliqués dans la résistance de différentes classes d'antipaludiques

3.9.1 Aminoquinoleines : la chloroquine

Le gène de la résistance à la chloroquine a été identifié en 2000. La substitution de la Lysine par la Thréonine en position 76 du gène *Pfcr* conduit à la mutation qui joue un grand rôle dans ce mécanisme de résistance à la chloroquine [41].

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

3.9.2 Antimétabolites : résistance de *P. falciparum* à la SP

D'après des données issues de la recherche, la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine, une thérapie contre le paludisme largement utilisée notamment à la suite de l'échec de la chloroquine, a pris naissance en d'Asie du Sud-Est et se propage encore vers l'Afrique subsaharienne[42].

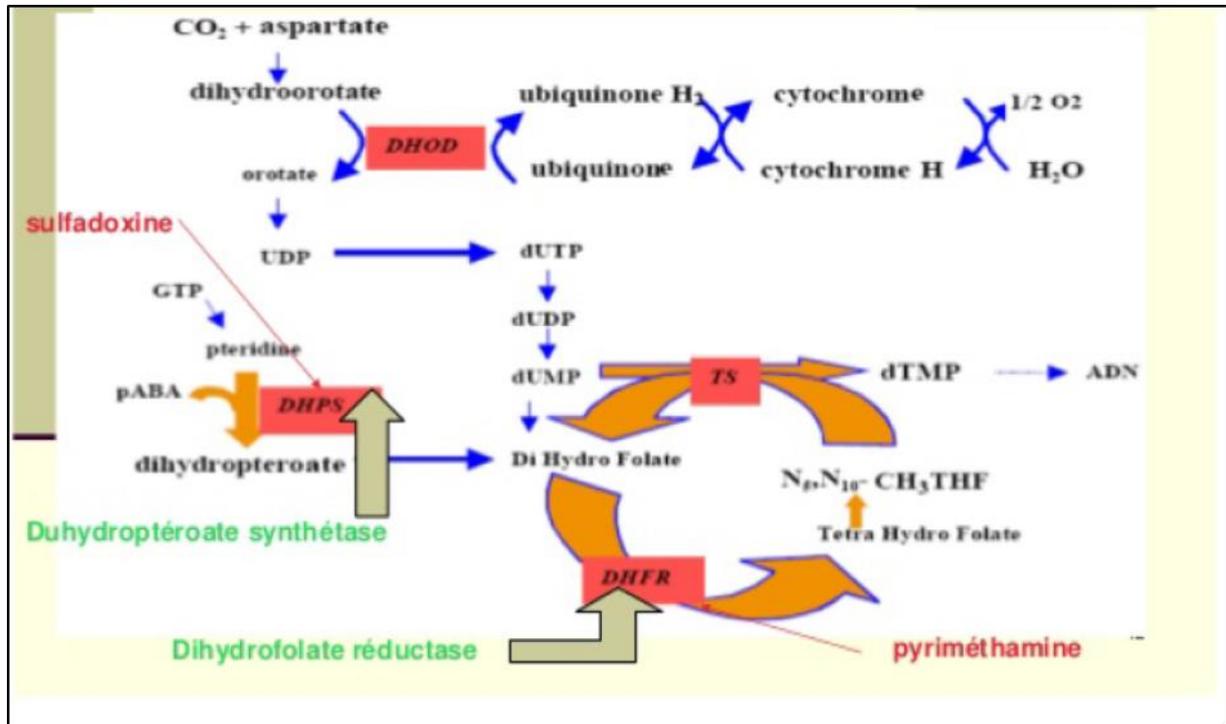


Figure 12 : Mécanismes de résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine [43]

3.9.3 Positions dont les mutations sont reconnues être associées à la résistance de *Plasmodium* à la sulfadoxine

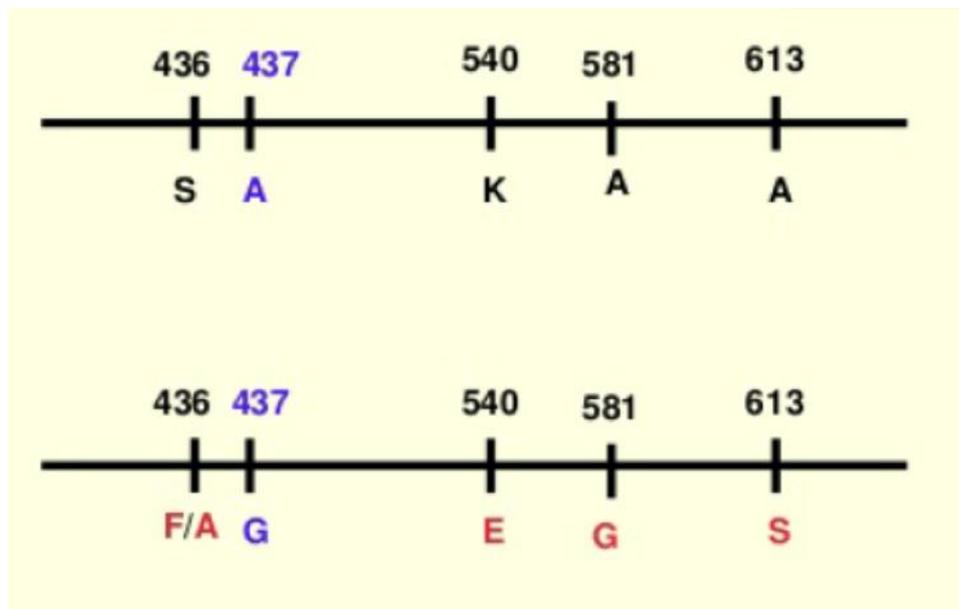


Figure 13 : les mutations sur le gène *Pfdhps* associées à la résistance de *P. falciparum* à la Sulfadoxine [43]

Les mutations aux positions 437 et 540 sont majoritairement celles qui modifient la configuration de la *dhps* [44], les autres constituent des facteurs favorisant la résistance.

3.9.4 Les CTA : résistance de *P. falciparum* aux CTA

Au cours des dernières années, le nombre de personnes infectées par le paludisme, ou qui en sont mortes, a diminué de manière significative[45]. Ce succès est attribué à un accroissement de l'investissement dans la prévention et dans les mesures de traitement, notamment les moustiquaires de lit imprégnées d'insecticide et l'utilisation des thérapies combinées à base d'artémisinine qui se sont avérées très efficaces.

Toutefois, ces gains récents en vies sauvées sont menacés par l'apparition de la résistance à l'artémisinine et sa propagation dans de nombreuses régions d'Asie du Sud-Est [46]. Le gène *PfK13* a été identifié comme gène associé à la résistance aux dérivés d'artémisinine. La résistance aux thérapies couramment utilisées à base d'artémisinine a été fermement établie dans l'ouest du Cambodge, la Thaïlande, le Vietnam, la Birmanie orientale et dans le nord du Cambodge, tandis que des signes de résistance émergente ont été observés dans le centre de la Birmanie, le sud du Laos et le nord-est du Cambodge.

Par contre, le continent Africain est exempt de cas confirmés de résistance aux CTA à ce jour. Tout de même, on assiste à une diminution de leur efficacité rapportée par quelques études.

3.10 Méthodes d'étude de la résistance aux antipaludiques

3.10.1 Test de sensibilité in vivo :[47]

Plusieurs tests d'efficacité thérapeutique ont été mis au point mais le plus utilisé actuellement, est celui de l'OMS de 1994 (OMS, 1994) modifié en 1996 (OMS, 1996) et en 2001 (OMS, 2002). C'est un test simplifié, standard de 28 jours de suivi dont l'interprétation tient compte des réponses clinique et parasitologique. Le test consiste à administrer à un sujet atteint d'un paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum* (infection mono spécifique), la dose ordinairement recommandée de l'antipaludique à étudier. Les contrôles cliniques et parasitologique sont effectués à J2, J3, J7, J14 et J28. L'efficacité du traitement est exprimée en thème de réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA), en échec thérapeutique précoce (ETP) et en échec thérapeutique tardif (ETT). Il permet le recueil des données cliniques et épidémiologiques sur le terrain.

Tableau III: Classification des réponses au traitement

| | | |
|--|----------------------------------|--|
| E | | Apparition de signes de danger ou d'un paludisme grave aux jours 1, 2 ou 3, en présence d'une parasitémie |
| T | | -Parasitémie au J2 supérieur à celle du J0, quel que soit la température axillaire |
| P | | -Parasitémie au J3 avec température axillaire $\geq 37^{\circ}\text{C}$ Parasitémie au J3 $\geq 25\%$ du J0. |
| E T T | E | -Apparition de signe de danger ou de paludisme grave après le jour 3, en présence d'une parasitémie, en l'absence préalable de tout critère d'Echec Thérapeutique Précoce. |
| | C T | -Présence d'une parasitémie et température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ (ou antécédent de fièvre) n'importe quand entre jour 4 et jour 28, en l'absence préalable de tout Critères d'Echec Thérapeutique Précoce. |
| | E P T | -Présence d'une parasitémie n'importe quand entre jour 7 et jour 28 et température axillaire $<37,5^{\circ}\text{C}$, en l'absence préalable de tout critère d'Echec Thérapeutique Précoce ou d'Echec Clinique Tardif. |
| A C P R | | -Absence de parasitémie au jour 28, quelle que soit la température axillaire, en l'absence préalable de tout critère d'Echec Thérapeutique précoce, d'Echec Clinique Tardif, ou d'Echec Parasitologique Tardif. |

3.10.2 Test de sensibilité in vitro

Il existe actuellement plusieurs tests in vitro tels que le micro test de RIECKMAN (1968) adopté par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le test isotopique de DESJARDINS (1978), le semi-micro test de LE BRAS et DELERON (1983) et le DELI test de Brasseur. Légèrement différents par des détails techniques et par le mode d'interprétation, ces méthodes donnent des résultats corrélés.

Ces tests consistent à mettre en culture des parasites, aux stades trophozoïtes, en présence d'antimalariques à dose croissante et à étudier l'inhibition de leurs multiplications. L'activité antipaludique est appréciée en fin de test, soit par lecture microscopique (numération des schizontes sur goutte épaisse), soit par la mesure de l'incorporation d'hypoxanthine tritiée (Méthodes radio isotopiques) ou la mesure de la LDH (Lactae déshydrogénase) de *P. falciparum* (DELI test). Les résultats sont exprimés en concentration inhibitrice 50% (CI50) qui représente la dose d'antipaludique pour laquelle on observe une diminution de moitié de la croissance obtenue dans les puits témoins (en l'absence d'antimalariques). Pour le DELI test, elle est évaluée par la diminution de 50 % de la densité optique comparativement à la densité optique du surnageant de culture des puits témoins.

3.11 Etudes moléculaires :

Elles consistent à détecter les mutations génétiques qui modifient les cibles, les fonctions de transport des médicaments ou leurs affinités. Actuellement beaucoup de techniques sont utilisées pour l'étude des mutations sur le génome du parasite. Au LBMA, nous disposons du HRM et du séquençage comme méthodes utilisées à cet effet.

❖ HRM : High Résolution Melting (Fusion à Haute Résolution)

Le HRM est une technique de biologie moléculaire permettant la détection de mutations de polymorphisme génétique et de différences épigénétiques dans des échantillons d'ADN double brin

• Principe :

L'analyse HRM est réalisée à partir d'échantillons d'ADN double brin. La région de l'ADN potentiellement porteuse de la mutation est d'abord amplifiée par PCR. L'amplicon est alors chauffé très progressivement et précisément d'environ 50°C à 95°C. À un certain point, les deux brins d'ADN se séparent : c'est ce processus que l'on appelle *fusion* de l'ADN. Le principe de la HRM est d'observer cette fusion en temps réel.

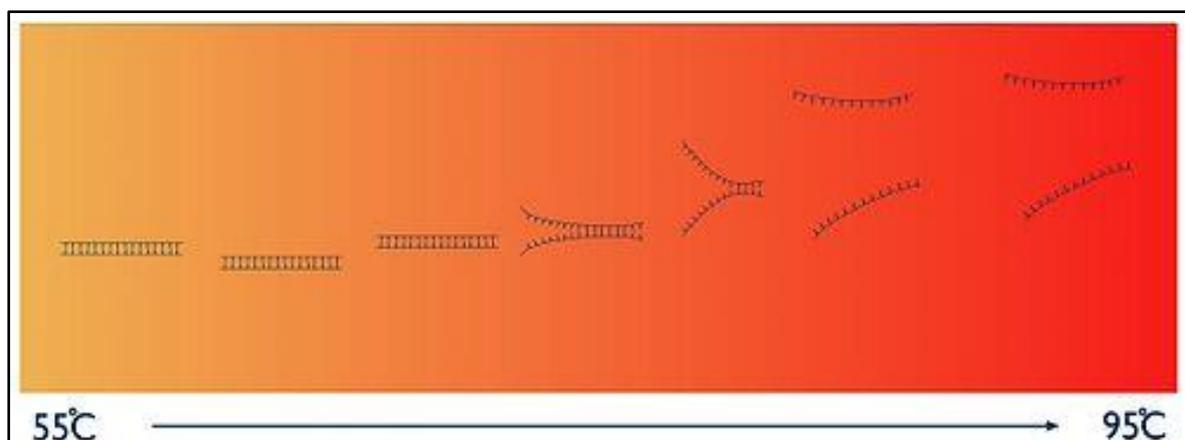


Figure 14 : Principe du HRM

Cela est possible grâce à des composés particuliers, appelés colorants intercalant, qui ont la propriété de devenir plus fluorescents lorsqu'ils sont fixés à de l'ADN double brin. En l'absence de double brin, ils ne peuvent pas se fixer et leur niveau de fluorescence est très faible. Au début de l'analyse HRM, à la plus basse température, l'intensité de fluorescence est très importante, car l'ensemble de l'amplicon est présent sous forme double brin. Mais, au fur et à mesure que la température augmente et que les brins se séparent, la fluorescence diminue. L'enregistrement de l'intensité de fluorescence en fonction de la température est appelée courbe de fusion

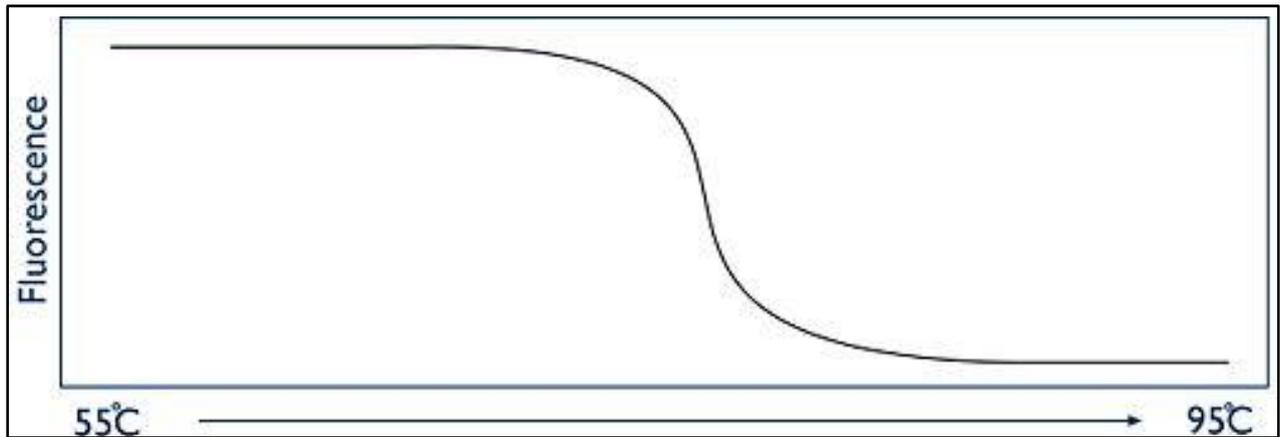


Figure 15 : Principe de tracée des courbes de fusion

Un changement, même mineur, dans la séquence de l'ADN conduit à une variation de la cinétique de fusion, qui peut être détectée grâce à la haute résolution utilisée.

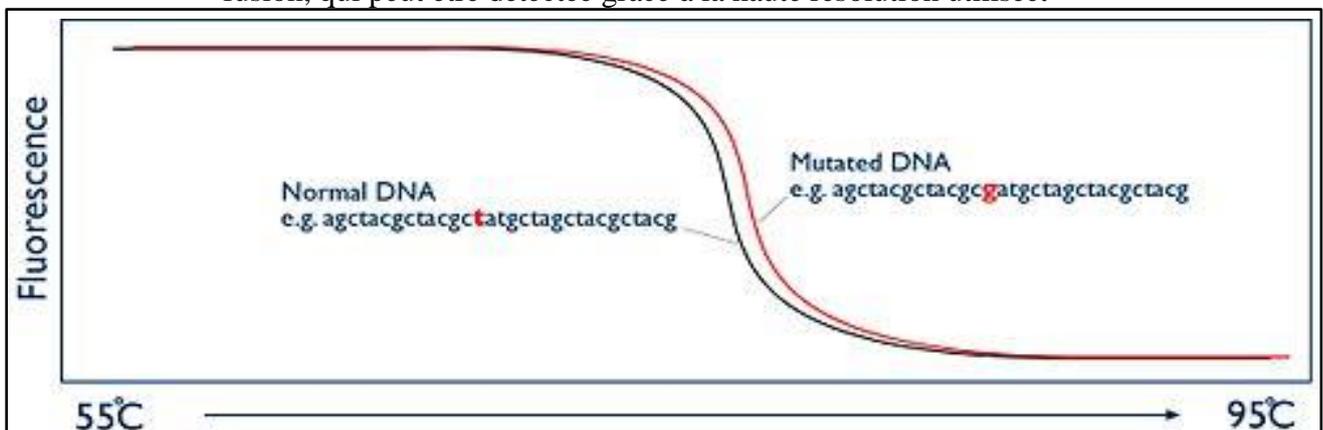


Figure 16 : Courbe de fusion d'un ADN normal et d'un ADN muté

❖ **Séquençages par la méthode de FREDERICH SANGER :[48]**

Cette méthode repose sur l'allongement par l'ADN polymérase d'un brin à partir d'une amorce, en utilisant un autre brin d'ADN comme matrice. Cet allongement est réalisé en présence des quatre désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), monomères utilisés par la polymérase, et d'un analogue didésoxyribonucléotide (ddNTP) qui joue le rôle de terminateur de chaîne.

Du fait de l'incorporation spécifique de l'analogie par la polymérase, on obtient un mélange de fragments qui se terminent sélectivement aux positions correspondant au nucléotide choisi

Le principe de la méthode de séquençage est illustré comme suit :

On effectue ainsi quatre réactions en parallèle, chacune avec l'un des quatre ddNTP, et l'on sépare les fragments obtenus par électrophorèse. Afin de pouvoir identifier les fragments d'ADN synthétisés par la polymérase et en particulier pour pouvoir les distinguer de l'ADN matrice, on les marque avec un traceur fluorescent. Celui-ci est accroché à l'une de ses deux extrémités, soit en 5', sur l'amorce de séquençage, soit en 3' sur le didésoxyribonucléotide terminateur.

En plus de la technique de séquençage développée par Sanger, il existe d'autres techniques de telle que : séquençage de Gilbert Maxam, la pyroséquençage, séquençage Illumina

METHODOLOGIE

4 METHODOLOGIE

4.1 Contexte de l'étude

La présente étude s'inscrit dans le cadre du Projet PMI 2018-2019 intitulé : "Evaluation de l'approche CPS : caractérisation moléculaire des gènes *dhfr* et *dhps* de *Plasmodium falciparum* associés à la résistance à la sulfadoxine et à la pyriméthamine à Sélingué, Missira et Dioro (Mali)".

4.2 Type, période et population d'étude :

L'étude réalisée est de type transversal analytique et s'est déroulée d'octobre 2018 à juin 2019. Elle a porté sur des enfants de 3 à 59 mois se présentant au centre de santé et ayant reçus des doses de SP/AQ au cours de la campagne de CPS. L'étude consistait à prélever des échantillons de sang pour l'analyse des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP.

4.3 Sites d'étude :

L'étude s'est déroulée à Dioro, Missira et Selingué qui ont bénéficié de la CPS de juillet à octobre 2018 avec un taux de couverture respectif de 77,73%, 57,55% et 66,95%

4.3.1 Dioro

Dioro est situé au bord du fleuve Niger et est entouré par le canal d'irrigation des champs de culture du riz faisant beaucoup de gîtes larvaires pendant la période hivernal et de riziculture. C'est une zone endémique du paludisme peuplée de 47.836 habitants. La commune rurale de Dioro dispose d'un CSCom accessible pour tous les villages environnants dont les capacités ont été renforcées par le LBMA dans le cadre de l'exécution du programme ICEMR en Afrique de l'Ouest.

4.3.2 Missira :

Le faciès de transmission du paludisme est de type nord soudanien et Sahel. La transmission du paludisme y est intense pendant 3 à 4 mois par an et hyper endémique (IP : 5-75%). La zone de Missira est située dans l'entité géographique nommée « Boucle de Baoulé ». Il n'y a aucun poste de santé dans le village. C'est vers le centre de santé communautaire de Sebekoro I que sont acheminés les malades. Sa population est estimée à 1200 habitants composée de sédentaires et de nomades. En 2004, un centre a été mis en place par le LBMA dans le cadre de l'essai clinique d'un médicament en phase II : Aminoquinoleine de type 13 (AQ13).

4.3.3 Selingue :

La commune rurale de Sélingué relève du cercle de Yanfolila situé dans la région de Sikasso. Sa population est estimée à 111 469 habitants. Sélingué est une zone endémique du paludisme. La transmission est assurée d'une part par le barrage de Sélingué et d'autre part la pluviométrie,

Le district sanitaire de Sélingué regroupe un Centre de Santé de Référence et onze (11) aires de santé organisées en centres de santé communautaires (CSCoM).

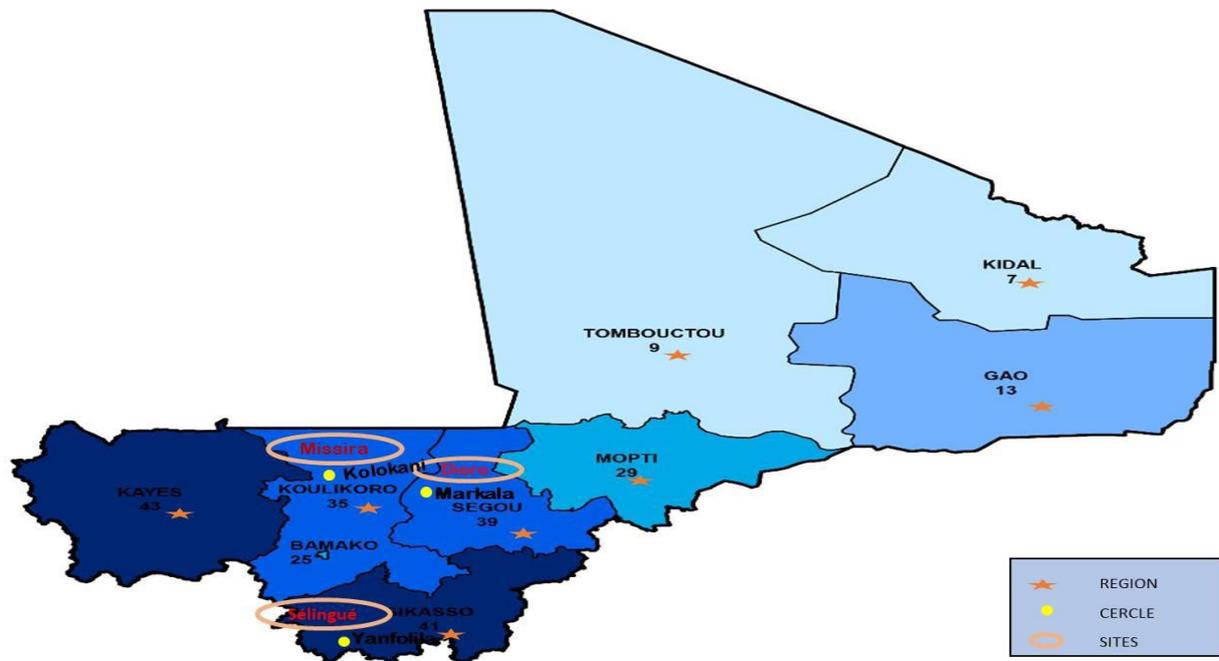


Figure 17 : Cartes du Mali avec les sites d'études.

Source : Institut Géographique du Mali

4.4 Critères d'inclusion :

- Goutte épaisse positive à *P. falciparum*
 - Patients ayant reçu au moins une des quatre doses de la CPS
 - Patients âgés de 3 à 59 mois ;
 - Assentiment des parents ou tuteurs.

4.5 Critères de non inclusion :

- Les enfants âgés de moins de 3 mois et plus de 59 mois
- Patients n'ayant pas reçu une dose de la CPS
- Refus des parents ou tuteurs de l'enfant

4.6 Echantillonnage :

Les échantillons ont été prélevés chez les enfants âgés de 3 à 59 mois.

A leur arrivée au centre de santé, les enfants sont soumis à un examen clinique à un test de diagnostic rapide (TDR) puis à une goutte épaisse pour confirmer l'accès palustre simple à *Plasmodium falciparum*.

Après l'obtention de l'assentiment de l'accompagnant du malade ou des parents du malade, un prélèvement capillaire est fait sur les lames et les papiers confetti, ce dernier servira à faire les différentes analyses moléculaires.

4.6.1 Taille de l'échantillon :

La taille de l'échantillon (480 enfants) est la même que celle proposée et utilisée dans le projet PMI 2017/2018. C'est un échantillonnage raisonnable qui avait permis à l'équipe PMI d'évaluer l'approche CPS en 2017/2018.

4.6.2 Collecte des échantillons de sang :

La collecte des échantillons de sang se faisait en piquant le bout du doigt des patients. Ces échantillons de sang étaient conservés sur du papier confetti. Un minimum de 5 spots de sang par confetti était réalisé par patient.

4.6.3 Choix des échantillons pour les analyses moléculaires :

Une sélection à deux critères a été réalisée pour le choix des échantillons destinés aux analyses moléculaires : 1] les échantillons de tous les enfants enrôlés ayant participé aux 4 passages de la CPS à Missira et à Sélingué soit respectivement 26 et 11 échantillons. 2] pour chaque échantillons de Missira ou de Sélingué correspond 2 échantillons de Dioro de même parasitémie.

5 Analyses moléculaires :

5.1 Recherche des mutations sur le gène *Pfdhps* :

5.1.1 Extraction de l'ADN de *Plasmodium falciparum* :

L'extraction de l'ADN Plasmodiale a été faite avec le kit Qiagen DNA Blood Mini kit (250) selon le protocole du fabricant à partir du sang séché sur le papier filtre de type Whatman 903™ (GE Healthcare, Cardiff, UK). (cf. ANNEXES)

4.8.2 Le séquençage des échantillons

Nous avons fait le séquençage de ces échantillons dans le but de rechercher les mutations sur le gène *Pfdhps*.

Le séquençage s'est déroulé en cinq (5) étapes successives.

Etape 1 : Nested-PCR

Une série de deux réactions de PCR a été utilisée pour amplifier le gène *Pfdhps* (Tableau IV et V). Le produit de la première réaction a été dilué au 1 :10 et a servi de matrice pour la seconde PCR. Le produit de la deuxième réaction contient le gène *Pfdhps* amplifié

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

Tableau IV: Composition du mélange réactionnel de la première réaction

| Concentration Initiale | Réactifs | Volume initiale | Concentration final |
|------------------------|---------------|-----------------|---------------------|
| | ddH2O | 12,4 | |
| 5X | Buffer | 4,0 | 1X |
| 10µM | 1°Forw Primer | 1,0 | 0,5µM |
| 10µM | 1°Rev Primer | 1,0 | 0,5µM |
| 10 Mm | DNTPS | 4,0 | 0,2mM |
| 5U/µl | Taq | 0,2 | 1U |
| Variable | DNA | 1,0 | |
| | TOTAL | 20µL | |

Tableau IV : Composition du mélange réactionnel de deuxième réaction

| Concentration Initiale | Réactifs | Volume initiale | Concentration final |
|------------------------|--------------------|-----------------|---------------------|
| | ddH2O | 12,4 | |
| 5X | Buffer | 4,0 | 1X |
| 10µM | 2°Forw Primer | 1,0 | 0,5µM |
| 10µM | 2°Rev Primer | 1,0 | 0,5µM |
| 10 mM | DNTPS | 4,0 | 0,2mM |
| 5U/µl | Taq | 0,2 | 1U |
| | Diluat (1:10)1°RxN | 1,0 | |
| | TOTAL | 20µL | |

Les conditions du cycle de la PCR nichée

| 1ere Réaction | 2eme réaction |
|--|--|
| 94°C 5:00min 94°C 0:30S 62.3C 0:30S 68°C 1:00min 68°C 5:00min 4°C ∞ | 94°C 5:00min 95°C 00:30S 60.7°C 0:30S 68°C 1:00min 68°C 5:00min 4°C ∞ |

Le produit de la deuxième réaction contient le gène d'intérêt dhps amplifié.

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

Etape 2 : Lavage avec Exosap (Purification de l'amplicon)

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

Tableau V: Master mix du ExoSAP (exonuclease +phosphatase alcaline)

| Réactifs | Volumes |
|--------------------|---------|
| Exonuclease | 2, 5 |
| TSAP | 3, 0 |
| ddH ₂ O | 494, 5 |
| TOTAL | 500 µL |

Purification de l'amplicon étape par étape :

- Préparer le master mix selon le schéma précédent ;
- Ajouter 5µL de ce Master mix à chaque échantillon de 20µL de la deuxième réaction ;
- Placer les tubes dans le thermo cycler puis lancer le cyclage comme illustrés ci-dessous.

Les conditions du cycle de purification par ExoSAP

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

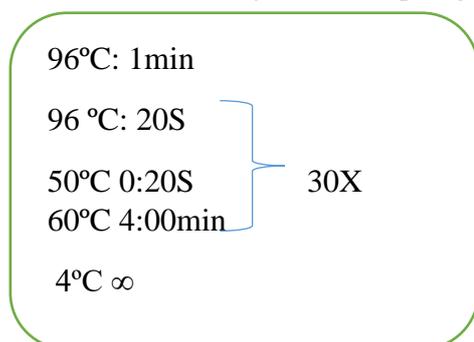
Etape 3 : Cycle de séquençage

Cette étape doit être lancée dans une plaque 96 puits

Tableau VI: Préparation de la réaction de séquençage de l'ADN

| Réactifs | Volume |
|--------------------|--------|
| ddH ₂ O | 8, 0μL |
| DTCS | 8, 0μL |
| Primer | 2.0 μL |
| DNA | 2, 0μL |
| Total | 20μL |

Conditions des cycles de séquençage



Etape 4 :

Précipitation dans des tubes individuels

a) Préparer un tube à centrifuger stérile étiqueté et stérile de 0,5 ml pour chaque échantillon.

b) Préparer un nouveau mélange solution d'arrêt / glycogène comme suit :

2μL d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2), 2 μL Na₂-EDTA à 100 mM (pH 8,0) et 1 μL de 20 mg / ml de glycogène (fourni avec le kit). A chacun des tubes étiquetés, ajouter 5 μL du mélange solution d'arrêt / glycogène.

c) Transférer la réaction de séquençage dans les tubes de 0,5 ml de manière appropriée et bien vortexer.

d) Ajouter 60 μL d'éthanol / H₂O froid à 95% (v / v) à partir du congélateur à -20 ° C et bien mélanger. Centrifuger immédiatement à 14 000 tr / min à 4 ° C pour obtenir 15 minutes. Retirez soigneusement le surnageant avec une micropipette (le culot doit être visible).

Remarque: pour plusieurs échantillons, ajoutez toujours l'éthanol froid / dH₂O immédiatement avant la centrifugation.

- e) Rincer le culot 2 fois avec 200 μ L d'éthanol à 70% (v / v) /H 2O à partir de -20 ° C congélateur. Pour chaque rinçage, centrifuger immédiatement à 14 000 tr / min à 4 ° C pendant au moins 2 minutes. Après centrifugation retirer soigneusement tout le surnageant avec une micropipette.
- f) Sécher sous vide pendant minutes (ou jusqu'à sec).
- g) Resuspendre l'échantillon dans 40 μ L de la solution de chargement de l'échantillon (SLS).
- h) Transférer les échantillons remis en suspension dans les puits appropriés de la plaque d'échantillon.
- i) Superposez chacun des échantillons remis en suspension avec une goutte de Huile minérale (fournie dans le kit).
- j) Chargez la plaque d'échantillon dans le séquenceur et lancez le test souhaité.

Etape 5 : Séquençage

Dans cette dernière étape, la plaque est insérée dans le séquenceur. Le mélange est aspiré par les capillaires du séquenceur et les séquences des fragments sont fournies par le logiciel pour analyse.

5.1.2 Analyses des séquences :

Au cours de cette étude :

Après le séquençage des échantillons, les données brutes sont recueillies et analysées avec le logiciel

Geneious prime version 2019.2.1. La séquence de la souche *Pf3D7* est utilisée comme séquence Consensus pour rechercher les mutations sur les autres séquences.

Après importation des données brutes dans le logiciel, toutes les séquences dont la qualité des données est inférieure à 40% ont été exclues de l'analyse au même titre que les extrémités des séquences qui comportent très souvent des données de faible qualité. Les séquences sont ensuite alignées et analysées avec le logiciel Geneious version 2019.2.1 pour voir les mutations.

6 .Gestion des données :

Les variables démographiques et la parasitémie ont été saisies sur Microsoft **Excel 2013**

La fréquence (%) des patients en fonction de l'âge, du genre, du site et de la parasitémie a déterminé à l'aide du logiciel Microsoft **Excel 2013**.

La recherche de mutation sur les séquences obtenues a été effectuée à l'aide du logiciel Geneious prime version 2019.2.1.L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode Neighbor-

joining et Tamura-Nei model avec le logiciel Geneious prime version 2019.2.1. Afin d'examiner la diversité du gène *Pfdhps* dans les 3 sites d'études (Missira, Sélingué et Dioro).

7 .Considérations éthiques et déontologiques :

Le protocole de recherche de cette étude a été soumis à l'accord du Comité d'éthique de l'INSP, (Ministère de la Santé, Mali). Tout changement ultérieur du protocole sera soumis à l'approbation du comité d'éthique. C'est une étude à risque minimal car il ne s'agit pas de tester un nouveau médicament ou un matériel à usage biomédical. Elle s'appuie sur des tests de diagnostic qui sont utilisés en routine dans les centres de santé dans lesquels nous avons conduit cette étude. Pour cela un assentiment libre et éclairé de la prise du sang et de la participation volontaire fut obtenu des parents répondant aux critères d'enrôlement. Nous, investigateurs, avons eu à :

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

Une compensation de 1000f CFA par visite était remise à chaque participant inclus dans cette étude.

RESULTATS

8 RESULTATS

5.1 Répartition et sélection des souches en fonction de la qualité des données du séquençage

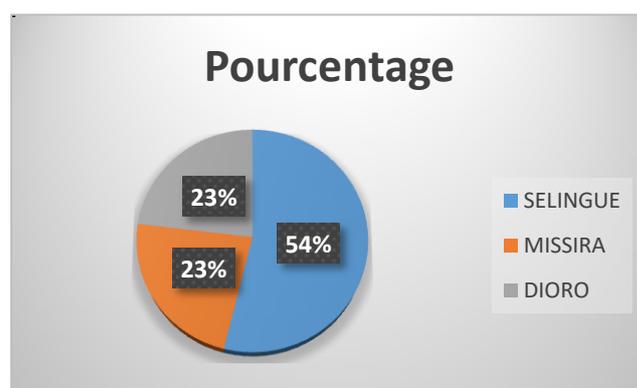
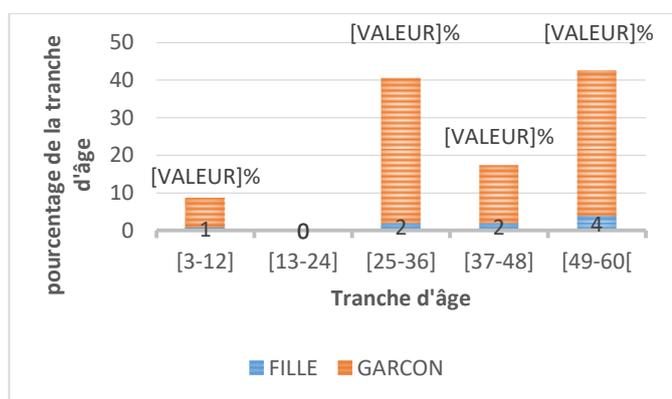
Les ADN extraits à partir des 58 souches de *Plasmodium falciparum* ont été soumis au séquençage de leur gène *Pfdhps*. Un total de 13 séquences de bonne de qualité sur 58 a été obtenu et sélectionné pour la recherche de mutation sur le gène *Pfdhps*, soit un taux de réussite de 22,41%. Le tableau ci-dessous indique la répartition des 13 séquences en fonction du site d'origine.

Tableau VII : Répartition des séquences de bonne qualité en fonction du site d'origine

| ID | Site d'étude | Effectif |
|--------|--------------|----------|
| MS0001 | Missira | 3 |
| MS0006 | | |
| MS0007 | | |
| SL0003 | Sélingué | 7 |
| SL0005 | | |
| SL0007 | | |
| SL0009 | | |
| SL0018 | | |
| SL0023 | | |
| SL0025 | Dioro | 3 |
| DR0138 | | |
| DR0240 | | |
| DR0312 | | |

5.2 Variables démographiques

L'étude a concerné des enfants de 3 à 59 mois. Le sex ratio était 2,25 en faveur du genre féminin (Figure 20a). Les sites d'étude de Missira et Dioro étaient équitablement représentés tandis que Sélingué représentait 54% des patients sélectionnés (Figure 20b)



(a) (b)
Figure 20 : Facteurs démographique des 13 patients

a : répartition en fonction du genre et de l'âge

b : répartition en fonction du site

5.3 Parasitémie

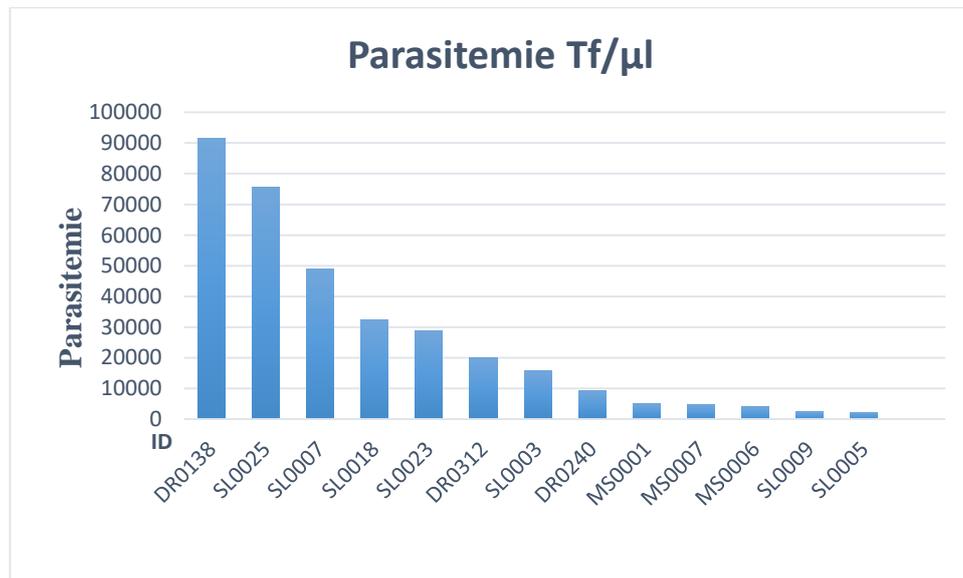


Figure 21: Répartition des patients en fonction de la parasitémie

La parasitémie de tous les patients était comprise entre 2300 et 91625 Tf/µl (**Figure XXI**), ce qui confirme l'accès palustre simple à *P. falciparum*. Parmi les 13 patients, 10 avaient une parasitémie inférieure à **50000 Tf/µl soit 77%**.

5.4 Mutations associées à la résistance à la sulfadoxine

La recherche des mutations connues sur le gène *Pfdhps* de 13 souches de terrain a été réalisée grâce à l'analyse des données de séquençage (**Tableau IX**).

L'analyse des données du séquençage a permis d'obtenir des mutations anciennes et nouvelles

Tableau VIII: Répartition des séquences en fonction du type de mutation

| ID | Site d'étude | S436A | A437G | K540E | A581G | A613P/S |
|--------|--------------|-------|-------|-------|-------|---------|
| MS0001 | Missira | S | G | K | A | F* |
| MS0006 | | - | - | K | A | A |
| MS0007 | | - | - | E | A | A |
| SL0003 | Sélingué | A | G | K | A | G* |
| SL0005 | | A | A | K | A | A |
| SL0007 | | - | - | K | A | A |
| SL0009 | | - | - | K | A | A |
| SL0018 | | - | - | K | A | F* |
| SL0023 | | - | - | K | A | Y* |
| SL0025 | | - | - | K | A | • |
| DR0138 | Dioro | - | - | K | A | S |
| DRO240 | | - | - | K | A | • |
| DR0312 | | - | - | K | A | P |

* : }
 • : } mutation non connues

5.4.1. Position (codon) 540 du gène *Pfdhps*

L'analyse de la position 540 du gène *Pfdhps*, montre qu'une souche de Missira porte la mutation 540 E et les autres sont de type sauvage à cette position du gène *Pfdhps* sur l'ensemble des 13 souches.

5.4.2. Position (codon) 613 du gène *Pfdhps*

Au niveau de la position 613 du gène *Pfdhps*, la mutation 613P et 613S a été retrouvée chez 2 souches provenant de Dioro sur l'ensemble des 13 souches. Cette position reste toute de même polymorphe avec la présence de 6 mutations connues dont un à Dioro et Missira et 4 à Sélingué.

5.4.3. Position (codon) 581 du gène *Pfdhps*

L'analyse de la position 581 du *Pfdhps*, révèle que les 13 souches des sites ne portent pas de mutation sur ce codon.

5.5. Phylogénie

Afin d'examiner la diversité du gène *Pfdhps* dans les 3 sites d'études (Missira, Sélingué et Dioro), nous avons alignés les 13 séquences avec la séquence de référence du gène *Pfdhps* de la souche *Pf3D7* à partir du logiciel Geneious Prime version 2019.2.1. L'arbre phylogénétique (figure XXIIa et XXIIIb) a été construit en utilisant la méthode Neighbor-joining et Tamura-Nei model a été utilisé comme modèle de distance génétique.

L'arbre (1) représenté sur la figure a, montre la distance génétique entre les 13 souches de terrain et la souche de référence *Pf3D7*. Basé sur le polymorphisme de leur gène *Pfdhps*, la souche SL0009 est la souche qui se ressemble au plus à la souche de référence *Pf3D7* avec distance de 0,0257 et la souche SL0023 la plus éloignée.

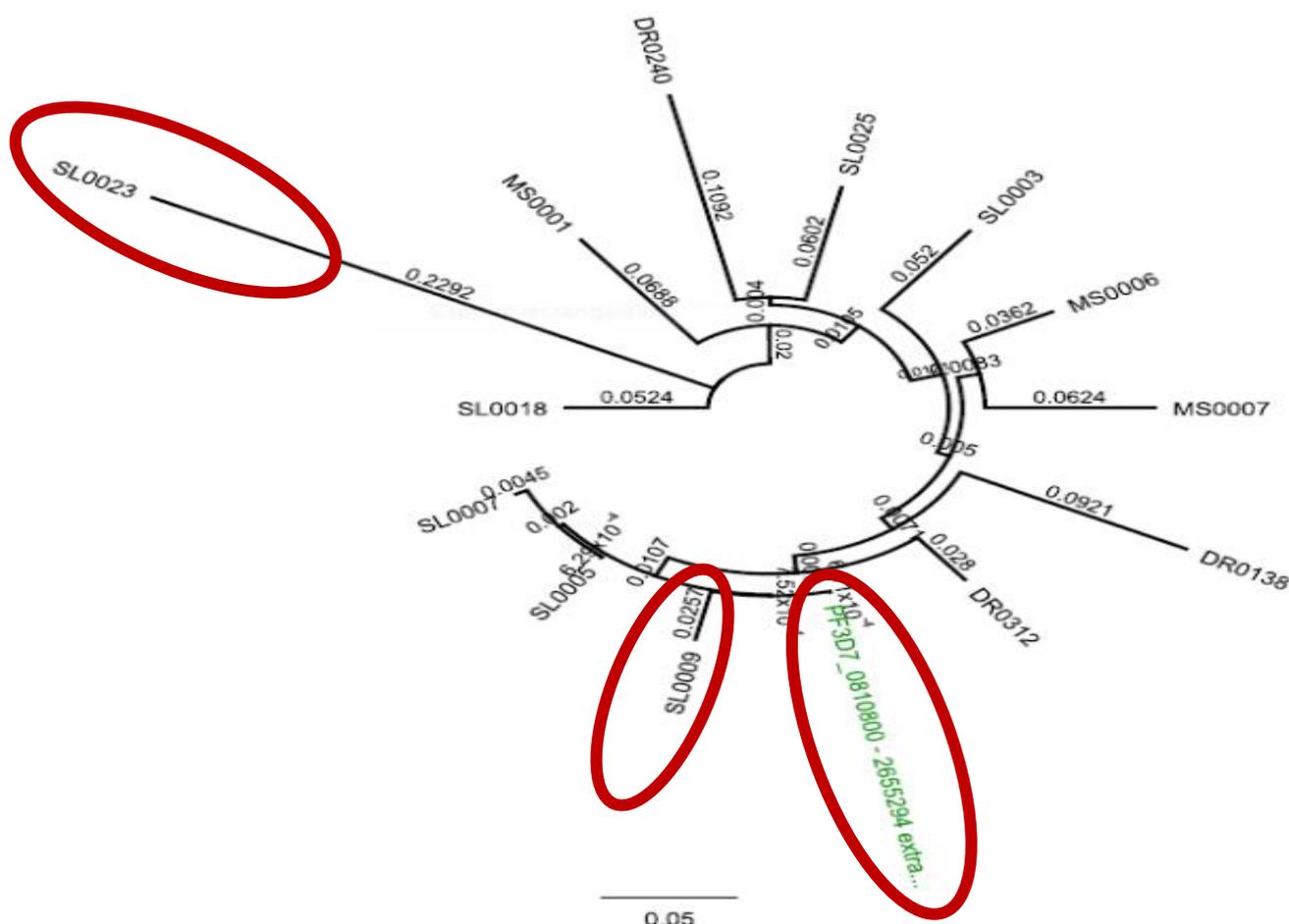


Figure 22 : Arbre phylogénétique (*Neighbor-joining* and *Tamura-Nei model*) des 13 souches de *P. falciparum* et la souche de référence *Pf3D7* générée à partir des séquences de leur gène *Pfdhps*.

La distance génétique entre les 13 souches de *P. falciparum* est illustrée sur la figure b. L'arbre phylogénétique (2) généré basé sur leur gène *Pfdhps*, permet de les caractériser catégoriser en trois

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

9 Commentaires et Discussion :

Notre étude était de type transversal qui avait pour but de caractériser les mutations sur le gène *Pfdhps*, mutations qui peuvent être à l'origine de la résistance des souches de *Plasmodium* à la sulfadoxine.

La Tranche d'âge [25–36] et [49–59] mois était la plus représentée avec 38,46% de la population d'étude. Ce résultat est différent de celui obtenu par **S. I. ALKASSOUM et al** au Niger en 2013 dans une étude menée sur l'évaluation de l'efficacité de la chimio prévention du paludisme saisonnier chez les enfants de 3 à 59 mois dont la classe d'âge [12 -24 mois] était la plus représentée avec 51,1%[49].

Nous avons observé que la plupart de ces enfants étaient du genre féminin. Le sex-ratio de 2,25 était en faveur du sexe féminin. Ce résultat est différent du sex-ratio de 1.08 en faveur du sexe masculin trouvé au Sénégal par **WASSIATOU KINGNIDE et al** en 2008 chez les enfants de moins de cinq ans [50]. Cette différence peut s'expliquer par la taille de l'échantillon .

La majorité des patients, soit 77%, avait une parasitémie inférieure à 50000 Tf / μ l ce qui pourrait témoigner la prise en charge rapide des cas de paludisme dans ces localités.

Au cours de notre étude, nous avons détecté 13 souches portant les mutations sur les positions S436A, A437G, K540 E, A613S/P comme mutation connues à la résistance à la sulfadoxine mais aussi sur les mutations non connues à la position 613 aux acides aminés (F, G, Y et codon stop) de ce gène.

Après analyse des séquences du gène *Pfdhps*, nous avons obtenu des mutations de type « transversion » aux positions 436,437 et 540 qui entraîne des variations génétiques aboutissant des changements d'acides aminés. Il s'agissait notamment des changements respectifs suivants :

TCT->GCT Serine (S) en Alanine (A), GCT ->GGT Alanine (A) -> Glycine (G) et AAA-> GAA Lysine (K) ->Acide Glutamique (E)

Au niveau de la position 613 nous avons révélés deux souches qui portent une variation génétique de type « transversion » entraînant un changement d'acide aminé GCC ->CCC Alanine (A) -> Proline (P) et GCC ->CCC Alanine (A) -> Serine (S) Cette position reste toute de même polymorphe avec la présence du changement d'acide aminé Alanine (A) en phénylamine (F), Tyrosine, Glycine (G) et codon stop

Ces mutations rencontrées au cours de notre étude ont été également trouvée en Inde par **Das Sabyasachi et al en 2012**[51] et en Guinée équatoriale par **Jiang et al en 2019** [52].

Ces mutations ont été également trouvées au Gabon par **Ghyslain Mombo-Ngoma et al en 2011**[53] et au Yémen par **Oumar A A Bamaga al en 2015**.

Les mutations obtenues au cours de notre étude sont différent de celui d'une étude menée en 2018 par **Adnan Yaqoob et al au Pakistan** qui ont trouvé les mutations sur les positions 436,437 et 613 [54]. Ces différences pourraient être dues à la période d'étude et aux profils épidémiologiques du paludisme qui varient d'une localité à une autre et par la même occasion les souches de *Plasmodium* par leurs profils génétiques.

Après avoir Examiné la diversité du gène *dhps* de *P. falciparum* dans les trois sites d'études à partir du logiciel Geneious Prime version 2019.2.1 à partir des méthodes Neighbor-joining et Tamura-Nei utilisée comme model de distance génétique, nous avons obtenu trois clades comme illustré sur la figure (23 b) sur ces clades nous observons que les souches de Sélingué sont plus diversifiées. Elles sont rencontrées dans tous les clades de l'arbre phylogénétique. Cette diversification pourrait être due à la taille de l'échantillon qui est petite et le nombre des souches de Sélingué qui est supérieure aux autres souches (Dioro et Missira).

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7. Conclusion et Recommandations :

7.1 Conclusion

Au terme de ce travail, nous avons caractérisé des mutations sur les positions déjà connues S436A, A437G, K540E et A613S/P du gène *Pfdhps* rapportées dans plusieurs études mais aussi sur les nouvelles mutations du gène *Pfdhps* à la position 613.

L'analyse phylogénétique nous a révélés que ces souches sont génétiquement différentes

7.2 Recommandations:

Au terme de notre étude vu nos résultats nous recommandons :

Au LBMA :

D'approfondir les recherches sur les nouvelles mutations rencontrées lors de l'étude.

Au PNLP :

Soutenir des études de ce genre, pour être alerter en cas de résistance, et surtout pour une meilleure prise en charge du paludisme au Mali.

A LA POPULATION :

A la population de Dioro, Missira et Selingue de veiller à la bonne administration des médicaments auprès des enfants selon le protocole recommandé pour la bonne marche de la CPS.

REFERENCES

10 REFERENCE

1. Ménard D, Ariey F, Mercereau-Puijalon O. Étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (RIIP-Palu). médecine/sciences. 2013 juin;29(6-7):647-55.
2. Pierre Aubry, Bernard-Alex Gaüzère. Paludisme Actualités 2019. 2019. [cité 2 janv 2020]. Disponible sur: <http://medecinetropicale.free.fr/cours/paludisme.pdf>
3. OMS | Rapport sur le paludisme dans le monde 2018 [Internet]. WHO. [cité 21 oct 2019]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/fr/>
4. Anduaem M. Oumer, Seydou Doumbia, Constance Touré, Safoura Berthe, Aligui Yattara, Cheich Oumar Dembele, et al. Rapport de quantification des intrants antipaludiques : Période janvier 2014 à décembre 2018. 2015. Disponible sur: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s22011fr/s22011fr.pdf>
5. PNLP. Enquête sur les Indicateurs du Paludisme (EIPM) 2015. 2016 [cité 24 juill 2019]. Disponible sur: <https://www.dhsprogram.com/pubs/pdf/MIS24/MIS24.pdf>
6. OMS. | WHO policy recommendation: Seasonal Malaria chemoprevention (SMC) for *Plasmodium falciparum* malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-region in Africa [Internet]. WHO. 2012 Mars [cité 29 nov 2019]. Disponible sur: https://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_smc_policy_recommendation/en/
7. Ndiaye D, Dieye B, Ndiaye YD, Tyne DV, Daniels R, Bei AK, et al. Polymorphism in dhfr/dhps genes, parasite density and ex vivo response to pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria parasites in Thies, Senegal. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2013 December; 3:135-42.
8. Ringwald P, Global Partnership to Roll Back Malaria. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring, 1996-2004. Geneva: World Health Organization; 2005 [cité 6 juin 2018]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43302/9241593466_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
9. Gan LSH, Loh JP. Rapid identification of chloroquine and atovaquone drug resistance in *Plasmodium falciparum* using high-resolution melt polymerase chain reaction. 2010 Mai ; 9:134.
Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881075/>
10. Ringwald P, Basco LK. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring : 1996-2004. 2005;
11. OMS. Chimio-prévention du paludisme saisonnier par administration de sulfadoxine pyriméthamine et d'amodiaquine aux enfants. 2013 juill. Disponible sur: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85727/9789242504736_fre.pdf?sequence=1
12. Maiga H, Lasry E, Diarra M, Sagara I, Bamadio A, Traore A, et al. Seasonal Malaria Chemoprevention with Sulphadoxine-Pyrimethamine and Amodiaquine Selects *Pfdhfr-dhps*

Quintuple Mutant Genotype in Mali. Sullivan DJ, éditeur. PLOS ONE .2016 Sept ; 11(9)162718. Disponible sur: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0162718>

13. Zakeri S, Afsharpad M, Raeisi A, Djadid N. Prevalence of mutations associated with antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum* isolates prior to the introduction of sulphadoxine-pyrimethamine as first-line treatment in Iran. *Malar J.* 2007;6(1):148. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-6-148>
14. J. Le Bras, L.Musset, J. Clain. Les résistances aux médicaments antipaludiques. *Médecine Mal Infect.*2006;36(8):401-5.
15. OMS. Status-rep-artemisinin-act-resistance-sept2015.pdf. 2015. Disponible sur: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/status-rep-artemisinin-act-resistance-sept2015.pdf?ua=1>
16. OMS. L'utilisation des antipaludiques. Rapport d'une consultation informelle de l'OMS [Internet]. 2001 [cité 7 juin 2018]. Report No.: 33. Disponible sur: www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_rbm_2001_33/fr/
17. OMS. Rapport sur le paludisme dans le monde 2017. WHO. [cité 24 juill 2019]. Disponible sur: www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/fr/
18. Cotton. R.G.H, Scriver. C.R. Proof of « disease causing » mutation - ProQuest [Internet]. 1998 [cité 24 août 2019]. Disponible sur: <https://search.proquest.com/openview/f770d9145c1bcd575bb5e1e9b4b7556a/1?pq-origsite=gscholar&cbl=30498>
19. OMS. Chimiothérapie du paludisme et resistance aux antipaludiques. Geneve; 1972 oct [cité 24 août 2019]. Disponible sur: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38673/WHO_TRS_529_fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y
20. Diarra Y. Etude d'efficacité des antipaludiques : cas de l'artemether-lumefantrine et la chloroquine dans la commune rurale de Dioro [Internet]. [Bamako]: USTTB/Faculté de Pharmacie; 2016 [cité 17 nov 2016]. Disponible sur: www.keneya.net/fmpos/theses/2016/pharma/pdf/16P05.pdf
21. Yaya S. Le paludisme: Repères historiques, climatiques et anthropiques. En 2013 [cité 8 sept 2017]. p.15-52. Disponible sur: http://www.ruor.uottawa.ca/bitstream/10393/24125/3/Yaya_Sanni_2013_Le_paludisme_rep%C3%A8res_historiques_climatiques_et_anthropiques.pdf
22. Menard S. *Plasmodium falciparum* et résistance aux antipaludiques: aperçu et conséquences des facteurs impliqués dans la sélection et la diffusion des parasites résistants. 2018;203.
23. Pierre Aubry, Docteur Bernard-Alex Gaüzère. Paludisme Actualités 2018 [Internet]. 2018 [cité 25 mai 2019]. Disponible sur: <http://medecinotropicale.free.fr/cours/paludisme.pdf>
24. GENTILINI M, CAUMES Eric, DANIS Martin. *Medecine Tropicale*. 5ème édition-1993 [Internet]. Disponible sur: <https://www.lavoisier.fr/livre/medecine>

25. Severe Malaria Observatory. Paludisme Mali [Internet]. Severe Malaria Observatory. 2017. Disponible sur: <https://www.severemalaria.org/countries/mali>
26. Perrigault M. Place de l'artésunate injectable dans la prise en charge du paludisme grave à *Plasmodium falciparum* au CHU de Rouen. 2016;81.
27. Y. T. Touré. Étude de la sensibilité d'*Anopheles funestus* et d'*Anopheles gambiae* sensu lato aux insecticides dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali. 1982;20(2):125-31. Disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/cahiers/entomo/02302.pdf
28. Sylvie Mangin, Vincent Robert, Didier Fontenille, Benjamin Ollomo, Thierry de Meeûs, Frédéric Simard, et al. Vaincre le paludisme (3) Les systèmes vectoriels. 2012 [cité 11 mai 2019]. Disponible sur: http://www.suds-en-ligne.ird.fr/paludisme/pdf/3-systemes_vectoriels.pdf
29. DIARRA Y. Etude d'efficacité des antipaludiques : cas de l'artéméther-lumefantrine et la chloroquine dans la commune rurale de Dioro [these]. [Bamako]; 2016 [cité 8 juin 2018]. Disponible sur: www.keneya.net/fmpos/theses/2016/pharma/pdf/16P05.pdf
30. DIALLO AK, Maiga AI. Test d'efficacité de la Combinaison Thérapeutique Artéméther plus Luméfántrine dans la Commune Rurale de Dioro : Prévalence des mutations sur les gènes *Pfmdr1* et *Pfk13* chez les parasites isolés lors des échecs thérapeutiques. 2018;130.
31. Julien Bonneville, Charles Defrance, Thomas Miklaveç, Sanisphère [France]. Guide pratique de lutte contre le paludisme en entreprise. Janv. 2007; Disponible sur: <https://www.business-humanrights.org/fr/pdf-guide-pratique-de-lutte-contre-le-paludisme-en-entreprise>
32. Doumbo O. Epidémiologie du paludisme au Mali: www.theses.fr/1992MON20039. [1970-2014, France]: Université des sciences et techniques de Montpellier 2; 1992. Disponible sur: www.theses.fr/1992MON20039
33. Christel RAVERA. Les parasites de la Malaria manipulent-ils les moustiques vecteurs ? 2018. Disponible sur: www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/fr/#Chiffres sur l'évolution du paludisme au niveau régional et mondial.
34. KHIM NIMOL. Approche génomique et bioinformatique de l'émergence et de la diffusion des résistances chez *Plasmodium* au Cambodge. 2015 juin [cité 10 juin 2018]. Disponible sur: tel.archives-ouvertes.fr/tel-01163252
35. OMS | Traitement du paludisme - tour d'horizon [Internet]. WHO. 2018 [cité 6 août 2019]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/fr/>
36. M. Kariba dit Ousmane SAMAKE. Efficacité de la chimio prévention de la sulfadoxine-pyriméthamine sur le paludisme chez les femmes enceintes dans le cercle de Baraoueli [Internet]. [cité 25 mai 2019]. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2006/pharma/pdf/06P31.pdf>
37. D Filisetti, L Monassier. LES ANTIPALUDEENS. 2012 janvier. Disponible sur: http://udsmed.u-strasbg.fr/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco_Chap16-Antipaludeens_2012.pdf

38. Touze JE, Fourcade L, Pradines B, Hovette P, Paule P, Heno P. Les Modes d'action des Antipaludiques Intérêt de l'association Atovaquone-Proguanil. 2002;62(3):6.
39. Didier Ménard¹, Frédéric Arieu², Odile Mercereau-Puijalon². Étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (RIIP-Palu). 2018. Disponible sur: <http://hdl.handle.net/10608/8149>
40. Martin DANIS. Antipaludiques: modes d'action et résistance. 2005. Disponible sur: http://umvf.omsk-osma.ru/infectiologie/www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2005-octobre/DESC-octobre-2005-danis.pdf
41. Gan LSH, Loh JP. Rapid identification of chloroquine and atovaquone drug resistance in *Plasmodium falciparum* using high-resolution melt polymerase chain reaction. Malar J. 2010;9:134.
42. Le Bras J, Musset L, Clain J. Les résistances aux médicaments antipaludiques. Médecine Mal Infect. 2006 Aout ; 36(8):401-5.
43. Institut Pasteur de Madagascar. Mécanismes de résistance des Plasmodies aux antipaludiques;2007. Disponible sur: https://fr.slideshare.net/atelier-paludisme/app-2007-abdallis5?next_slideshow=1
44. Institut Pasteur de Madagascar. Mécanismes de résistance de Plasmodium aux antifolates; 2011; Madagascar. Disponible sur: https://fr.slideshare.net/atelier-paludisme/app-2011s2-noromalalanoelisoa?next_slideshow=2
45. OMS. Rapport sur le paludisme dans le monde 2016 [internet]. Genève; 2017.
Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/malaria-report-response/fr/>
46. WORLDWIDE ANTIMALARIAL RESISTANCE NETWORK. Résistance aux médicaments antipaludiques : Vue d'ensemble [Internet]. WorldWide Antimalarial Resistance Network. 2015 [cité 5 août 2019]. Disponible sur: <https://www.wwarn.org/fr/propos-de-nous/resistance-aux-medicaments-antipaludiques-vue-densemble>
47. Basco L, Ringwald P. Chimiorésistance du paludisme : problèmes de la définition et de l'approche technique. 2000;10(1):1-75.
48. Ahakoud M. Le séquençage de l'ADN : Principes théoriques, indications médicales et expérience du CHU Hassan II de Fès. 2015;160.
49. S. I. ALKASSOUM, Y. HAMA, M. DAOU, O. ADAKAL, H. DJIBO, K. AMINA. Evaluation de l'efficacité de la chimio prévention du paludisme saisonnier chez les enfants de 3 à 59 mois au district sanitaire de Madarounfa au Niger en 2013.2013 [cité 16 juill 2019]. Disponible sur: www.ijisr.issr-journals.org/
50. Wassiatou KINGNIDE, Abiola Annie. Prévalence des mutations de la DHFR et de la DHPS, marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* a la sulfadoxine-pyriméthamine étude menée dans quatre districts sanitaires du Sénégal janvier 2007 [Internet]. 2008 [cité 28 mai 2019]. Disponible sur:

<http://ao.um5.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/14808/P0552008.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

51. Das S, Chakraborty SP, Tripathy S, Hati A, Roy S. Novel quadruple mutations in dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* in West Bengal, India. Trop Med Int Health. 2012;17(11):1329-34.
52. Jiang T, Chen J, Fu H, Wu K, Yao Y, Eyi JUM, et al. High prevalence of Pfdhfr-Pfdhps quadruple mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Bioko Island, Equatorial Guinea. Malar J. 2019 Mars; 18(1):101.
53. Bamaga OAA, Mahdy MAK, Lim YAL. Frequencies distribution of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase mutant alleles associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* population from Hadhramout Governorate, Yemen. Malar J [Internet]. 2015 Décembre; 14(1). Disponible sur: <http://www.malariajournal.com/content/14/1/516>
54. Yaqoob A, Khattak AA, Nadeem MF, Fatima H, Mbambo G, Ouattara A, et al. Prevalence of molecular markers of sulfadoxine-pyrimethamine and artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* from Pakistan. Malar J. 2018;17(1):471.

ANNEXE

10.1 Test de Diagnostic Rapide (TDR)

Les tests de diagnostic rapide que nous disposions étaient des cassettes de la firme Pharmaceutique SD BIOLINE.

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

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

L'utilisation de ces TDRs requiert à chaque fois certains matériels comme :

Un nouveau sachet de test non ouvert ;

Un nouveau tampon imbibé d'alcool à 70° non ouvert ;

Une nouvelle lancette stérile de la solution tampon, une nouvelle paire de gants d'examen jetables ;

Un chronomètre

Un container pour évacuer les déchets tranchants et pointus ;

Une poubelle pour les déchets non pointus et non tranchants ;

Les TDRs étaient utilisés immédiatement après leur ouverture selon le schéma qui suit :

D'abord la vérification de la date de péremption ;

Enfiler la nouvelle paire de gant d'examen ;

Ouvrir et sortir la cassette du sachet ;

Ecrire l'identifiant du patient sur la cassette ;

Nettoyer le 4ème ou le 3ème doigt du patient avec le tampon imbibé d'alcool ;

Laisser le doigt se sécher à l'air libre ;

Piquer le doigt d'un coup sec avec la lancette et jeter cette dernière dans la boîte de sécurité ;

Prélever une goutte de sang avec l'anse de prélèvement et placer la goutte de sang dans l'alvéole de la cassette destinée à recevoir la goutte de sang (carrée marquée de la lettre A) ;

Ajouter 5 à 6 gouttes de la solution tampon dans l'alvéole ronde marquée de la lettre B ;

Observer 5 à 10 minutes puis lire ; le test est dit positif si des lignes apparaissent dans les deux fenêtres (du test et du contrôle) ;

Le test est dit négatif si une ligne apparait dans la fenêtre de contrôle et pas de ligne dans la fenêtre de test ;

Le test est dit invalide s'il n'y a pas de ligne dans la fenêtre de contrôle et apparition d'une ligne dans la fenêtre de test.

11 ANNEXE

11.1 Test de La goutte épaisse

Cet examen microscopique se faisait en 4 étapes :

Etape 1 : Prélèvement de sang

Matériel nécessaire

Lames d'examen de microscope

Lancettes stériles à usage unique

Méthanol ou éthanol

Coton hydrophile

Crayon gras ou stylo graveur

Méthode :

Chez les enfants la piqure se faisait au niveau du 3ème ou 4ème doigt et se faisait sur le côté qui est moins sensible

Nettoyer l'endroit choisi d'abord avec un tampon de coton imbibé d'alcool et avec un tampon sec pour enlever toute trace d'alcool

Piquer d'un coup sec et rapide

Déposer les premières gouttes de sang sur du papier filtre (confettis)

Tenir de la main droite une lame par les bords et de la main gauche le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang qui sera déposé sur une première lame

Ensuite prendre une 2ème lame pour la même opération.

Etape 2 : Préparation et coloration de la goutte épaisse

La goutte épaisse se préparait comme suit :

On fait un étalement épais au centre de la lame.

On étale le sang avec le bout d'une lame propre jusqu'à épaissement uniforme



Au bout de la lame on collait les étiquettes sur lesquelles se trouvent les identifiants des patients.

On laisse sécher les lames à l'air libre pendant 10 minutes à l'intérieur du laboratoire, à l'abri de la poussière et des mouches.

La goutte épaisse se colorait comme suit :

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

Etape 3 : Examen Microscopique à la recherche des parasites du paludisme

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

Le nombre de parasites se comptait sur 300 leucocytes.

Etape 4 : Estimation de la densité parasitaire sur la goutte épaisse :

La densité parasitaire est estimée afin de voir le niveau de gravité de l'infection palustre lié au taux d'hématies parasités.

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

Vu l'estimation que le nombre moyen de leucocyte par μl est 8.000 :

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

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

11.2 Protocole de l'extraction de l'ADN de *Plasmodium falciparum* avec le Kit Qiagen DNA Blood Mini kit (250)

➤ Découpage du papier confetti

Il faut disposer de : Puncheur, de plaque de découpage des confettis, de kimwipes, d'alcool 70 à 100%, portoir de tube 1,5mL, de tubes 1,5mL, de tubes 50mL.

1. Découper 3 spots de sang puis les placer dans les tubes 1,5mL.

NB : Veiller au bon nettoyage du puncheur lors du découpage des confettis.

Lors du découpage, pour passer d'un échantillon à un autre, le puncheur doit être trempé dans la solution d'alcool puis dans de l'eau distillée, ensuite nettoyé avec le kimwipes. Il faut s'assurer que le puncheur est débarrassé de toute trace d'alcool.

- La plaque de découpage doit être nettoyée aussi à l'alcool. Il faut aussi s'assurer que la plaque n'est pas mouillée par l'alcool au moment de découper les confettis. **Extraction de l'ADN avec le Kit Qiagen DNA Blood Mini kit (250)**

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

Toutes les étapes de centrifugation doivent se faire à la température ambiante (18-25 °C)

Avant de commencer il faut s'assurer que :

Les bains-marie sont à 85°C pour l'étape 2, 56 °C pour l'étape 3 et 70 °C pour l'étape 4,

Equilibrer le buffer AE ou l'eau distillée à la température ambiante pour l'élution, l'étape 10,

S'assurer que les buffers AW1 et AW2 ont été préparés avec l'alcool comme indiqué dans le guide du kit d'extraction,

S'assurer que les buffers AL et ATL ne contiennent pas de précipités, sinon les faire dissoudre en les incubant à 56 °C.

Procédure

- Dans les tubes de 1,5mL contenant les 3 spots de sang déjà découpés, ajouter 180µL de buffer ATL,
- Incuber à 85 °C pendant 10 minutes puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,

- Ajouter 20µL de Protéinase K de la solution de stock. Mélange, puis incuber à 56 °C pendant 1 heure. Centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,

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

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

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

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

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

- Ajouter 200µL d'éthanol (96-100%) aux échantillons, bien mélangé puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube, Il est essentiel que l'éthanol et les échantillons soient bien mélangés.

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

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

2. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500µL du buffer AW1. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute.

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

3. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500µL du buffer AW2. Fermer les colonnes puis centrifuger à 14000 rpm pendant 3 minutes.

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

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

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

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

L'ADN ainsi obtenu est conservé à -20 °C

FICHE SIGNALETIQUE

Nom : TRAORE

Prénom : TAHIROU

Téléphone : +22366185313 /+22373382586

Email : tahiroupharma891@gmail.com

Titre de la thèse : Polymorphisme génétique de la *dihydropteroate Synthétase* de

Plasmodium falciparum Pfdhps par la technique de séquençage des isolats collectés au cours de la chimio-prévention saisonnière du paludisme à Dioro, Missira et Sélingué

Nationalité : Malienne

Année universitaire : 2018-2019

Ville de soutenance : Bamako-Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie (FAPH)

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

Résumé

La présente étude s'inscrit dans le cadre du Projet PMI 2018-2019 intitulé : "Evaluation de l'approche CPS : caractérisation moléculaire des gènes *dhfr* et *dhps* de *Plasmodium falciparum* associés à la résistance à la sulfadoxine et à la pyriméthamine à Sélingué, Missira et Dioro (Mali)".

L'étude réalisée est de type transversal analytique et s'est déroulée d'octobre 2018 à juin 2019. Elle a porté sur des enfants de 3 à 59 mois se présentant au centre de santé et ayant reçus des doses de SP/AQ au cours de la campagne de CPS. L'étude consistait à prélever des échantillons de sang pour l'analyse des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP. Objectif était de savoir si l'utilisation de la SP/AQ durant la campagne de protection contre le paludisme chez les enfants de 3 à 59 mois ne conduit pas aux parasites résistants à la sulfadoxine. C'est dans ce but que nous avons choisi 58 échantillons pour cette étude tous âgés de 03 à 59 mois et soumis au séquençage de leur gène *Pfdhps*. Un total de 13 séquences de bonne de qualité sur 58 a été obtenu et sélectionné pour la recherche de mutation sur le gène *Pfdhps*, soit un taux de réussite de 22,41%. Au cours de notre étude, nous avons détecté 13 souches portant les mutations sur les positions S436A, A437G, K540E,



A613S/P comme mutation connues à la résistance à la sulfadoxine mais aussi des mutations non connues à la position 613 aux acides aminés (F, G, Y et codon stop) de ce gène.

Après analyse des séquences du gène *Pfdhps*, nous avons obtenu des mutations de type « transversion » aux positions 436 ; 437 et 540 qui entraîne des variations génétiques entraînant des changements d'acides aminés. Il s'agissait notamment des changements respectifs suivants : TCT-2>GCT Serine (S) en Alanine (A), GCT ->GGT Alanine (A) -> Glycine (G) et AAA-> GAA Lysine (K) ->Acide Glutamique (E)

Au niveau de la position 613 nous avons révélé deux souches qui portent une variation génétique de type « transversion » entraînant un changement d'acide aminé GCC ->CCC Alanine (A) -> Proline (P) et GCC ->CCC Alanine (A) -> Serine (S) Cette position reste toute de même polymorphe avec la présence du changement d'acide aminé Alanine (A) en phénylamine (F), Tyrosine, Glycine (G) et codon stop

Après avoir examiné la diversité du gène *Pfdhps* dans ces 3 sites d'études (Missira, Sélingué et Dioro), à partir du logiciel Geneious Prime version 2019.2.1 par la méthode *Neighbor-joining* et *Tamura-Nei model* utilisé comme modèle de distance génétique, nous avons observé qu'après L'analyse phylogénétique que les 13 souches sont génétiquement différentes.

Mots clés : Polymorphisme ; dihydroptéroate synthétase ; séquençage

IDENTIFICATION SHEET

Last name: TRAORE

First name: TAHIROU

Tel: +223 66185313/73382586

Email : tahiroupharma891@gmail.com

Title: Dihydropteroate Synthetase Genetic Polymorphism *Plasmodium falciparum* *Pfdhps* by the sequencing technique of isolates collected during the seasonal chemo-prevention of malaria in Dioro, Missira and Sélingué

Academic year: 2018-2019

City of defense: Bamako-Mali

Place of deposit: Library of Faculty of Pharmacy

Focus area: Molecular Parasitology, Public Health, and Pharmacology.

Abstract

This study is part of the PMI Project 2018-2019 entitled: "Evaluation of the CPS approach: molecular characterization of the dhfr and dhps genes of *Plasmodium falciparum* associated with resistance to sulfadoxine and pyrimethamine in Sélingué, Missira and Dioro (Mali) ".

It involved children aged 3 to 59 months who presented to the health center and had received doses of SP / AQ during the CPS campaign. The study involved taking blood samples for analysis of molecular markers of MS resistance. The objective was to find out whether the use of SP / AQ during the malaria protection campaign in children aged 3 to 59 does not lead to sulfadoxine-resistant parasites. It is in this but that we chose 58 samples for this study every 0 3 to 59 months and subjected to the sequencing of their *Pfdhps* gene. A total of 13 good quality sequences out of 58 were obtained and selected for the mutation search on the *Pfdhps* gene, representing a success rate of 22.41%. During our study, we detected 13 strains carrying the mutations at positions S436A, A437G, K540 E, A613S / P as known mutations in resistance to sulfadoxine but also unknown mutations at position 613 at amino acids (F, G, Y and stop codon) of this gene.

After analysis of the *Pfdhps* gene sequences, we obtained "transversion" type mutations at positions 436; 437 and 540 which causes genetic variations leading to amino acid changes. These included the following respective changes: TCT-2> GCT Serine (S) to Alanine (A), GCT -> GGT Alanine (A) -> Glycine (G) and AAA-> GAA Lysine (K) -> Glutamic acid (E)



At position 613 we revealed two strains which carry a genetic variation of the type "transversion" causing a change of amino acid GCC -> CCC Alanine (A) -> Proline (P) and GCC -> CCC Alanine (A) -> Serine (S) This position remains polymorphic with the presence of the amino acid change Alanine (A) into phenylamine (F), Tyrosine, Glycine (G) and stop codon

After examining the diversity of the Pfdhps gene in these 3 study sites (Missira, Sélingué and Dioro), using the Geneious Prime software version 2019.2.1 by the Neighbor-joining method and Tamura-Nei model used as a genetic distance model , we observed that after phylogenetic analysis that the 13 strains are genetically different.

Keywords: Polymorphism; dihydropteroate synthetase; sequencing

SERMENT DE GALIEN

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



CLAUDE GALIEN

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

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

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

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

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

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

Je le jure!