



U.S.T.T-B



Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple – Un But – Une Foi

Université des Sciences, des Techniques
et des Technologies de Bamako

Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie

DER de Santé Publique et Spécialités

N° DERSP/FMOS/USTTB

Mémoire

Master en Santé Publique

Option épidémiologie

Année Universitaire 2018 - 2019

Etude des marqueurs moléculaires de résistance de *Plasmodium falciparum* aux médicaments du traitement combiné aux dérivés de l'artémisinine dans deux localités d'endémicité différente au Mali en 2016 : Dangassa et Nioro du Sahel

Présenté et soutenu le

Par :

Dr Bourama KEITA

Président :
Membre :
Directeur : Pr Seydou DOUMBIA
Co-directeur : Dr Seidina AS DIAKITE

Remerciements

A ma Famille : Pour la confiance et l'amour dont elle a fait preuve à mon endroit durant cette formation.

A mes amis et collègues : pour leur accompagnement indéfectible.

Aux membres de l'Unité Immunogénétique de l'ICER-Mali : pour leur encouragement et leur disponibilité constante.

A mes maitres de stage de l'ICER-Mali : nos sincères reconnaissances au responsable de l'unité d'Immunogénétique et Parasitologie de l'ICER-Mali, le Professeur Mahamadou Diakité, pour sa disponibilité et pour toutes les actions entreprises afin de faciliter cette formation. Egalement au Dr Seidina AS Diakité, Dr Sory Diawara et au Dr Drissa Konaté, pour non seulement, l'exemplarité de leur dévouement, la constance de leur présence à nos côtés ; mais aussi pour la clarté avec laquelle les principes de travail nous ont été transmis.

A la direction du DERSP : pour son engagement à mettre à disposition les enseignants de qualité, et sa disponibilité à trouver les solutions aux différents problèmes en dépit de leur complexité.

A l'encadrement : pour la qualité des enseignements dispensés, la disponibilité et la volonté de transmettre son savoir.

Au chef du DER : Nos vifs remerciements pour toutes les actions qu'il entreprend en vue d'améliorer les conditions des apprenants.

A nos Maitres, nos collègues et tout le personnel du l'ICER/FMOS/FAPH : pour les gestes de solidarité exemplaire dont nous avons bénéficiés au cours de notre stage dans le service.

Au chef du Département d'Entomologie Médicale et des maladies à transmission Vectorielle : Pour l'accueil et les démarches entreprises en vue de faciliter le déroulement de notre stage dans votre département.

A nos collègues apprenants de la septième promotion du Master1 : Pour la bonne collaboration et l'esprit d'équipe.

Au Doyen de la Faculté de Médecine et d'OdontoStomatologie : pour la confiance mise sur nous en acceptant de nous encadrés.

A toutes les personnes qui de près ou de loin, nous ont aidés au cours de cette formation.

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
AQ	Amodiaquine
ART	Artémisinine
AS	Artésunate
CQ	Chloroquine
CRF	Case Report Form (Formulaire de Report des Cas)
CSCom	Centre de Santé Communautaire
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d' Artémisinine
DEAP	Département d' Epidémiologie et des Affections Parasitaires
DEMEVE	Département d' Entomologie Médicale et des maladies à transmission Vectorielle
DERSP	Département d' Enseignement et de Recherche en Santé Publique
DHA	Dihydroartémisinine
EDSM	Enquête Démographique et de Santé du Mali
FAPH	Faculté de Pharmacie
FMOS	Faculté de Médecine et d' Odontostomatologie
GE	Goutte Epaisse
GIS	Geographic Information System (Système d' Information Géographique)
Hb	Hémoglobine
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide à Haute Performance)
ICER-Mali	Centre International d' Excellence en Recherche du Mali
MQ	Méfloquine <i>Malaria Research and Training Center</i> (Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme)
MRTC	
PfARPS10	<i>Plasmodium falciparum</i> Apicoplast Ribosomal Protein S10
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquine Resistance Transporter
PfDHFR	<i>Plasmodium falciparum</i> Dihydrofolate-reductase
PfDHPS	<i>Plasmodium falciparum</i> Dihydropteroate-synthetase
PfExo	<i>Plasmodium falciparum</i> Exonuclease
PfFd	<i>Plasmodium falciparum</i> Ferredoxin
PfMDR	<i>Plasmodium falciparum</i> Multidrug Resistance
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
RN	Route Nationale
SOP	Standard Operating Procedures (Procédures Standard Opératoires)
SP	Sulfadoxine-Pyriméthamine
USTTB	Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako
WACCBIP	West African Center for Cell Biology of Infectious Pathogens
WHO	World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)

Table des matières

1. INTRODUCTION	9
2. QUESTION DE RECHERCHE	11
3. REVUE DE LA LITTERATURE	12
3.1. ANTIPALUDEENS UTILISES CONTRE LE PALUDISME	12
3.2. NOTION DE LA RESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES	12
3.3. HISTORIQUE ET EVOLUTION DES RESISTANCES AUX ANTIPALUDIQUES	14
3.3.1. Quinine.....	14
3.3.2. Chloroquine.....	14
3.3.3. Antipaludiques de synthèse.....	15
3.3.4. Association sulfadoxine-pyriméthamine (SP)	15
3.3.5. Méfloquine (MQ).....	16
3.3.6. Artémisinine et dérivés - Traitement de première intention menacé	16
3.4. MARQUEURS MOLECULAIRES DE RESISTANCE	17
4. OBJECTIFS.....	22
4.1. OBJECTIF GENERAL	22
4.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES	22
5. METHODOLOGIE	23
5.1. CADRE DE L'ETUDE	23
5.2. TYPE D'ETUDE ET PERIODE D'ETUDE	25
5.3. POPULATION D'ETUDE	25
5.3.1. Critères d'inclusion.....	25
5.3.2. Critères de non inclusion.....	26
5.4. ECHANTILLONNAGE.....	26
5.5. VARIABLES MESUREES	26
5.6. TECHNIQUES DE LABORATOIRE UTILISEES	27
5.6.1. Procédures standard opératoires (SOP) de la goutte épaisse.....	27
5.6.2. Frottis mince (FM)	29
5.6.3. Procédures Standard Opératoires (SOP) : Confection du confetti (papier filtre).....	31

5.6.4. Extraction de l'ADN plasmodial par la méthode du méthanol à partir du confetti	33
5.6.5. Détermination du taux d'hémoglobine	33
5.7. DEFINITIONS OPERATIONNELLES	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.8. TECHNIQUES ET OUTILS DE COLLECTE DES DONNEES	35
5.9. DEROULEMENT D'ETUDE	36
5.10. GESTION ET ANALYSE DES DONNEES	37
5.11. CONSIDERATIONS ETHIQUES	37
6. RESULTATS	39
6.1. RESULTATS GLOBAUX	39
6.2. RESULTATS DESCRIPTIFS	39
7. DISCUSSION	45
8. LIMITES DE NOTRE ETUDE	48
9. CONCLUSION	48
10. RECOMMANDATIONS	48
11. PERSPECTIVES	49
12. RÉFÉRENCES	50
13. ANNEXES	54
FICHE DE CONSENTEMENT LIBRE ET VOLONTAIRE POUR LA PARTICIPATION A UNE ETUDE DE RECHERCHE CLINIQUE	54
FICHE D'ASSENTIMENT LIBRE ET VOLONTAIRE POUR LA PARTICIPATION A UNE ETUDE DE RECHERCHE CLINIQUE	LIX

Liste des figures

Figure 1 : carte des deux sites d'étude.....	25
Figure 2 : Technique lecture d'une lame	28
Figure 3 : Technique de la goutte épaisse et frottis minces.....	30
Figure 4 : Analyseur et Microcuvette Hemocue	34
Figure 5 : Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+	35
Figure 6 : parasitémie moyenne en fonction du site	40
Figure 7 : taux moyen d'hémoglobine en fonction du site d'étude	41
Figure 8: Proportion d'isolats de <i>P. falciparum</i> en fonction du nombre de mutation du fond génétique de résistance à l'artémisinine accumulé.....	43
Figure 9 : Prévalences des marqueurs de résistance à la pyriméthamine (<i>Pfdhfr</i> _51I-59R-108N) , A la sulfadoxine (<i>Pfdhps</i> _437G,-540E), à l'amodiaquine (<i>Pfmdr-1</i> _86Y) et à la lumefantrine (<i>Pfmdr-1</i> _184Y) dans les deux sites d'étude	44

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques des participants de l'étude à Dangassa et Nioro.....	39
Tableau II : prévalence globale des mutations du fond génétique de résistance à l'artémisinine dans les deux sites Dangassa et Nioro du sahel	42

Résumé

La résistance aux antipaludiques est un facteur clé limitant le contrôle du paludisme dans la plupart des régions endémiques palustres. Nous avons mené cette étude pour estimer la proportion des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine, à la luméfántrine, à l'amodiaquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine à Dangassa et Nioro-du-sahel au Mali, deux zones éco-climatiques différentes.

Au total, nous avons collecté 270 échantillons de sang auprès de patients positifs à *P. falciparum* en 2016 (214 à Dangassa et 56 à Nioro-du-sahel). L'ADN parasitaire extrait a été utilisé pour le génotypage des gènes de résistance aux antipaludéens étudiés en utilisant la plateforme robotique Agena MassARRAY® iPLEX (Agena Bioscience, Hamburg, Germany).

Sur les six (6) mutations constitutives du fond génétique de résistance à l'artémisinine les mutations *Pfcr1_1356T* et *Pff1_D193Y* étaient les plus fréquentes avec respectivement 46,4% et 4,3% à Dangassa contre 51% et 9,4% à Nioro du Sahel. Les mutations *Pfcr1_326S*, *Pfprps10_127M*, *Pfprps10_128Y*, *Pfmdr-2_484I* étaient très faiblement retrouvées à Dangassa avec des proportions de moins de 1%. Cependant, nous n'avons pas trouvé d'isolat présentant le fond génétique de résistance à l'artémisinine à Dangassa et à Nioro du Sahel. Les marqueurs moléculaires de résistance les plus fréquemment rencontrés étaient ceux de la pyriméthamine (*Pfdhfr_51I-59R-108N*) avec 14% à Dangassa et 19% à Nioro, de la luméfántrine (*Pfmdr-1_184Y*) avec 18,2% à Dangassa et 25% à Nioro et de l'amodiaquine (*Pfmdr-1_86Y*) avec respectivement 7% à Dangassa et 5,4% à Nioro. Le marqueur de résistance à la sulfadoxine (*Pfdhps_437G-540E*) a été retrouvé chez 1,9% des isolats de Dangassa, aucun isolat de Nioro n'a présenté ce marqueur.

Notre étude révèle une plus grande prévalence du marqueur de résistance à la luméfántrine suivi de celui de la pyriméthamine et de l'amodiaquine. Nous n'avons pas retrouvé de fond génétique de résistance à l'artémisinine alors que toutes les mutations constitutives de ce fond étaient présentes à Dangassa.

Mots clés : Résistance, Marqueurs moléculaires, Antipaludique, Paludisme, *Plasmodium falciparum*

Summary

The Global Technical Malaria Strategy urges countries and global partners to monitor the effectiveness of anti-malarial drugs to choose the most appropriate drug combinations in the national therapeutic policy. We assessed the prevalence of molecular markers of resistance of *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) to artemisinin, Lumefantrine, Amodiaquine and sulfadoxine-pyrimetamine in two climatic geographical zones (Dangassa with high malaria endemicity and Nioro-du-sahel with low malaria endemicity) in Mali.

A total of 270 patients tested positive for *P. falciparum* in 2016 (214 in Dangassa and 56 in Nioro du Sahel) were enrolled from whom we obtained blood samples for parasite DNA extraction and genotyping of antimalarial resistance genes using the Agena MassARRAY® iPLEX robotic platform (Agena Bioscience, Hamburg, Germany)..

Of the six (6) constitutive mutations of artemisinin-resistant genes, the *Pfcrt*_I356T and *Pffd*_D193Y mutations were the most frequent with 46.4% and 4.3% respectively in Dangassa versus 51% and 9.4% in Nioro du Sahel. The *Pfcrt*_326S (1%), *Pfarps10*_127M (0.5%), *Pfarps10*_128Y (0.6%), *Pfmdr-2*_484I (0.5%) mutations were less frequent in Dangassa. However, no isolate was found with the genetic background of resistance to artemisinin in Dangassa. No *Pfmdr-2*_484I and *Pfarps10*_128Y mutations were detected in Nioro du Sahel. The most common molecular resistance markers were pyrimethamine (*Pfdhfr*_51I-59R-108N) with 14% in Dangassa and 19% in Nioro du Sahel, Lumefantrine (*Pfmdr-1*_184Y) with 18.2% in Dangassa and 25% in Nioro and amodiaquine (*Pfmdr-1*_84Y) with 7% in Dangassa and 5.4% in Nioro, respectively. Sulfadoxine resistance marker (*Pfdhps*_437G-540E) was found in 1.9% in Dangassa and 0% in Nioro du Sahel.

Our study has shown a higher prevalence of the marker of resistance to lumefantrin followed by that of pyrimethamine and amodiaquine. We did not find any genetic background of resistance to artemisinin, however all the six constitutive mutations of the artemisinin resistance genetic background were present in Dangassa.

Keywords : Resistance, Molecular markers, Malaria, Malaria, *Plasmodium falciparum*

1. Introduction

Le paludisme est de loin la plus importante des maladies parasitaires tropicales dans le monde. Les espèces plasmodiales responsables du paludisme chez l'homme sont *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi*. *P. falciparum* est l'espèce la plus virulente et celle qui développe le plus de résistance aux antipaludiques [1]. Au niveau mondial, le nombre de cas de paludisme est estimé à 219 millions avec 435 000 décès en 2017 contre 217 millions de cas et 451 000 décès en 2016 [2]. Ces données mettent en évidence l'absence de progrès significatifs ces dernières années malgré le déploiement d'importants moyens dans la lutte contre le paludisme. Les enfants de moins de 5 ans sont les plus vulnérables à cette maladie. En 2017, ils ont représenté 61 % (266 000) des décès associés au paludisme dans le monde [2]. La Région africaine supporte une part disproportionnée de la charge mondiale du paludisme. En 2016, 90% des cas de paludisme et 91% des décès dus à cette maladie ont été enregistrés dans la région africaine [2].

Au Mali, le paludisme demeure l'endémie majeure et la première cause de morbidité et de mortalité dans les groupes les plus vulnérables, à savoir les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes [3]. Malgré les progrès accomplis dans la prévention et la prise en charge des cas, les statistiques sanitaires nationales révèlent que le paludisme se situe toujours au 1^{er} rang des affections et représente 42% des motifs de recours aux soins dans les formations sanitaires [4]. Cette persistance de la transmission du paludisme est due à plusieurs facteurs dont ceux liés aux parasites comme la résistance aux antipaludiques.

La résistance est la capacité du parasite à survivre et/ou à se multiplier en dépit de l'administration et de l'absorption d'un médicament donné à doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées mais dans les limites de la tolérance du malade. La résistance des parasites aux antipaludéens constitue un véritable défi pour les programmes nationaux de lutte contre le paludisme. Les premiers cas de résistance à la chloroquine (CQ) ont été rapportés en Asie du sud-est [5], et progressivement elle s'est étendue à toutes les zones d'endémies palustres [6]. Ce phénomène s'est élargi à d'autres antipaludiques de structures chimiques différentes ou apparentées. La dynamique de l'émergence et de la résistance des parasites résulte de l'interaction complexe entre les antipaludiques, l'hôte, le parasite et le vecteur [7]. L'arsenal de traitement du paludisme a été renforcé à partir des années 2000 par l'artémisinine. Actuellement les dérivés de l'artémisinine constituent une arme très efficace dans la lutte contre le paludisme,

notamment dans les formes sévères [8]. La grande efficacité de l'artémisinine repose sur sa capacité à tuer les parasites au stade très jeune de leur développement avant même qu'ils n'atteignent les stades susceptibles d'induire les manifestations cliniques. Pour protéger l'efficacité de ces molécules, l'OMS a recommandé leur utilisation en association avec d'autres molécules partenaires comme luméfántrine, amodiaquine, méfloquine et la sulfadoxine pyriméthamine, appelé Combinaison Thérapeutique à base d'artémisinine (CTA). Ainsi le Mali a révisé en 2005 sa politique nationale de lutte contre le paludisme [9]. Le programme national de lutte contre le paludisme préconise l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine ou CTA (Artéméther-Luméfántrine et artésunate-Amodiaquine) pour les formes simples, l'artésunate, l'Artéméther ou la quinine injectable pour les formes sévères du paludisme. A côté de ces combinaisons thérapeutiques l'association Sulfadoxine Pyriméthamine est utilisée en traitement préventif intermittent chez les femmes enceinte et SP+Amodiaquine en chimioprévention saisonnière chez les enfants de moins de 5 ans.

Cependant, l'émergence et la propagation de la résistance de *P. falciparum* à ces différentes molécules constitue une menace importante pour ces nouvelles stratégies. En effet, le *Plasmodium falciparum* s'est continuellement adapté et a développé des résistances, y compris même aux dernières combinaisons à base d'artémisinine. Depuis 2008, il a été observé que les parasites en Asie du sud étaient capables de survivre aux dérivés de l'artémisinine [10]. Ceci se traduit par une réduction importante de la vitesse d'élimination des parasites chez les patients traités avec un dérivé de l'artémisinine seul ou en association avec une molécule partenaire [11]. L'une des préoccupations de la communauté scientifique est la propagation des parasites résistants à ces molécules en Afrique subsaharienne, comme ce fut le cas avec la chloroquine [12].

Cette propagation des parasites résistants à l'artémisinine aurait des conséquences désastreuses en termes de santé publique [13]. L'utilisation des CTA répond à un souci de retarder l'émergence de la résistance à l'artémisinine. Même si aucun cas de résistance clinique et parasitologique à l'artémisinine n'a pas encore été décrit en Afrique [2], une surveillance de cette propagation des parasites résistants à l'artémisinine et aux molécules partenaires s'y impose. Les marqueurs moléculaires de résistance constituent un outil très important dans la surveillance de l'émergence et de la propagation de la résistance.

Il apparait donc nécessaire de surveiller l'émergence de la résistance du Plasmodium aux dérivés de l'artémisinine d'une part et de collecter des données sur la propagation de la résistance des parasites aux molécules partenaires d'autre part selon les recommandations de l'OMS. Cela permettra de procéder de façon judicieuse au choix des molécules partenaires à associer aux dérivés de l'artémisinine dans les différentes régions géographiques. L'identification des marqueurs moléculaires de résistance aux différentes molécules antipaludéens et l'amélioration des techniques moléculaires de détection de ces marqueurs ont rendu ce travail déployable dans plusieurs régions.

Nous nous proposons dans cette étude, d'étudier les marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludéens usuels dans différentes zone endémiques au Mali. Elle permettra de collecter des données de base permettant de suivre la dynamique de ces marqueurs au Mali.

2. Question de recherche

La fréquence des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques usuels varie-t-elle en fonction des zones d'endémicité du paludisme au Mali ?

3. Revue de la littérature

3.1. Antipaludéens utilisés contre le paludisme

Sur la base du mode d'action, les antipaludéens ont été principalement classés en trois groupes : les dérivés de la quinolone, de l'antifolate et de l'artémisinine. La plupart des médicaments antipaludiques ciblent les stades érythrocytaires asexués du parasite, et sont donc appelés médicaments schizonticides pour le sang. Les médicaments schizonticides dans les tissus ciblent les hypnozoïtes (stade de sommeil du parasite) dans le foie, tandis que les médicaments gamétocytocides tuent les stades sexuels du parasite dans le sang. Ces antipaludiques ont un mode d'action et un mécanisme différent sur le parasite. En raison de l'émergence et de la propagation d'un parasite résistant à la CQ et à la SP, des antipaludéens sont administrés sous forme de thérapies combinées (CTA) actuellement disponibles [1].

Dans ces combinaisons, chaque antipaludique cible un mécanisme d'action différent sur le parasite, réduisant ainsi la probabilité d'émergence du parasite multirésistant [1]. Comprendre le mécanisme d'action des médicaments, peut guider l'identification du marqueur moléculaire spécifique de la résistance aux médicaments et permet ainsi de surveiller le niveau et l'étendue de la résistance par le biais de ces marqueurs. Ainsi, une évaluation continue des marqueurs et des études d'efficacité thérapeutique dans les régions d'endémie palustre aideront à détecter le parasite résistant, ainsi qu'à comprendre le degré et l'étendue de la résistance dans une zone donnée. Ces études contribueront à apporter en temps utile des modifications pour une politique thérapeutiques efficace lorsque le taux d'échec du traitement dépassera 10%, conformément aux directives de l'OMS [1].

3.2. Notion de la résistance aux antipaludiques

Malgré les efforts déployés pour la découverte de nouveaux médicaments antipaludiques et la mise en place effective par les systèmes de santé de combinaisons thérapeutiques pour le traitement antipaludique, le *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances, y compris contre les CTA. L'émergence et la propagation de la résistance des parasites aux antipaludiques dans une zone donnée dépendent du degré de diversité génétique au sein de la population parasitaire et de l'intensité de la transmission. 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, et devenir 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.

Toutefois, le phénotype de résistance acquis après mutation n'est pas toujours un avantage en l'absence de pression médicamenteuse. Ces mutations peuvent avoir un coût en termes de performances biologiques. Lorsque la CQ est supprimée de zones où les parasites sont chloroquinorésistants, les souches sensibles à la CQ pourraient être favorisées par rapport aux souches résistantes et les remplacer en grande partie [5]. Bien que les populations sensibles réapparaissent au détriment des souches résistantes en l'absence de sélection par la CQ, il faut cependant s'attendre à une nouvelle sélection de la population résistante si une monothérapie ou une combinaison thérapeutique à base de CQ est à nouveau utilisée [5].

Ainsi, plusieurs facteurs favorisent l'émergence de résistances tels que :

- une mauvaise utilisation des antipaludiques par les individus infectés (automédications abusives, mauvaise observance) conduisant à des traitements incomplets,
- une indisponibilité des médicaments efficaces ou le déploiement inadéquat des médicaments sous forme de monothérapies et
- la consommation de contrefaçons sous dosées, facteurs permettant à des parasites viables de survivre à des concentrations suboptimales d'antipaludiques et d'être sélectionnés pour leur aptitude à résister. Ainsi, des résistances ont émergé contre la majorité des antipaludiques dans la plupart des régions endémiques. Cela concerne aussi bien les anciennes molécules ayant longtemps été utilisées en monothérapie (chloroquine,

amodiaquine, sulfadoxine-pyriméthamine, quinine, méfloquine) que certaines des nouvelles molécules utilisées en bithérapie (atovaquone, artésunate, luméfantine).

3.3. Historique et évolution des résistances aux antipaludiques

3.3.1. Quinine

Alors que l'arsenal de médicaments antipaludiques dans le monde occidental était limité à la quinine extraite de l'écorce de quinquina, jusqu'à la première guerre mondiale, le déclin des stocks de quinine en Allemagne ont conduit au développement des premiers antipaludiques de synthèse, les 8-aminoquinoléines, tels que la pamaquine et la primaquine. Cependant ces composés s'étant avérés plus toxiques que la quinine, cette dernière est restée le principal antipaludique utilisé par la suite. Les premiers cas de résistance à la quinine ont été documentés au Brésil en 1908 puis en 1938 chez les travailleurs des chemins de fer allemands revenant de la frontière entre le Brésil et la Bolivie mais restent sporadiques [14].

3.3.2. Chloroquine

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-Venezuela [15]. Des analyses génétiques ont, plus tard, démontré l'existence d'au moins 4 foyers d'émergence différents de chloroquinorésistance : un en Asie qui s'est ensuite propagé en Afrique, un en Papouasie Nouvelle Guinée, et deux en Amérique du Sud [16] ; 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) [17] avec des conséquences catastrophiques. En 1989, la chloroquinorésistance s'était propagée à toute l'Afrique subsaharienne[15].

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 [18]. 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[19] et plus tard en Amérique du Sud [20] limite également son utilisation, un traitement par un CTA approprié étant recommandé dans ces pays. La

chloroquinorésistance de *P. malariae* a été décrite une seule fois, au sud de Sumatra en Indonésie [21].

3.3.3. Antipaludiques de synthèse

Pendant la seconde Guerre Mondiale, le manque d'antipaludiques, notamment la quinine, a stimulé le développement d'antipaludiques synthétiques comme la mépacrine et simultanément, d'antipaludiques dérivés de la pyrimidine. En effet, la pyrimidine est présente dans les acides nucléiques et les systèmes protéiques qui entrent en jeu dans son métabolisme peuvent être inhibées par des antipaludiques de la famille des sulfonamides. Cette recherche a entraîné le développement d'antifolates comme le proguanil (Paludrine®) et le chlorproguanil.

Les premiers rapports sur l'utilisation du proguanil en prophylaxie ou en traitement étaient très encourageants [22] malgré une action schizonticide lente comparée à la quinine ou la mépacrine [23]. Cependant, alors qu'en Malaisie, 1 seule dose de 100 mg de proguanil permettait une guérison totale en 1947, les taux d'échec aux traitements ont rapidement augmenté en 1949, une dose 100 fois supérieure ne permettant pas de guérir certains patients [24]. Le même exemple s'est reproduit au Brésil indiquant que la résistance n'était pas limitée aux isolats d'Asie du Sud Est [25].

3.3.4. Association sulfadoxine-pyriméthamine (SP)

Disponible à partir de 1971, l'utilisation de la combinaison SP a fortement augmenté du fait de son efficacité sur les souches CQ-résistantes, de sa bonne tolérance et de son faible coût. Son utilisation accrue a conduit à l'apparition d'une résistance à la SP en Asie du Sud-Est dans les années 1970, en Amérique du Sud puis en Afrique dans les années 1980 [26]. En 1993, le Malawi fut le premier pays d'Afrique de l'Est à changer sa politique de traitement en passant de la CQ à la SP, suivi par d'autres pays africains à la fin des années 1990. Cependant, l'utilisation intensive de cette combinaison a provoqué la propagation très rapide de la résistance à l'Afrique subsaharienne.

L'expansion de cette résistance en Afrique était particulièrement problématique, la SP étant la seule alternative aux amino-4-quinoléines, disponible, efficace, et bien tolérée. Malgré la résistance, la SP reste utilisée dans les zones d'endémie palustre de forte transmission, pour les traitements préventifs intermittents des populations vulnérables que sont les femmes enceintes et les enfants [27].

3.3.5. Méfloquine (MQ)

La MQ est apparue comme un successeur de la CQ en Asie du Sud Est, dans les années 1980. La résistance à la MQ s'est développée cinq ans après son introduction, en Thaïlande, au Cambodge et au Vietnam, pays où ce médicament a été largement utilisé en monothérapie. L'utilisation répandue de la quinine, molécule structuralement apparentée à la MQ, a pu favoriser cette émergence dans ces zones [6]. Contrairement à l'Asie, la MQ n'a jamais été utilisée en Afrique où la CQ a directement été remplacée par la SP, l'AQ et les CTA.

3.3.6. Artémisinine et dérivés - Traitement de première intention menacé

La découverte de l'artémisinine par l'équipe du Professeur Youyou Tu dans les années 1970 est l'une des plus grandes avancées en médecine du 20^{ème} siècle qui a été récompensée en 2015 par le Prix Nobel de Médecine. La structure chimique de l'artémisinine sera obtenue en 1976, ce qui permettra de développer des dérivés semi-synthétiques (artéméther, artésunate (AS) en 1987, dihydroartémisinine (DHA) en 1992). En dehors de la Chine, ces composés sont longtemps restés ignorés. Cependant, face à la propagation, en Asie du Sud-Est, de la résistance à tous les antipaludiques disponibles, ces molécules ont fait l'objet d'études cliniques démontrant leurs très bonnes efficacités et tolérances. [28]

Dès le début des années 1980, l'effet d'une monothérapie à base d'artémisinine combinée à une molécule partenaire a été étudié afin de réduire le temps et les coûts de traitement, mais aussi de limiter le risque de développement des résistances. L'artémisinine permet de fortement réduire la charge parasitaire dans les 3 premiers jours de traitement alors que la molécule partenaire élimine les parasites restants. L'OMS a recommandé l'utilisation des CTA dans le traitement du paludisme non compliqué en 2001. Dans les années qui suivirent, la majorité des pays d'endémie palustre ont adopté les CTA, le nombre de traitements CTA délivrés passant de 11 millions en 2005 à plus de 300 millions en 2015 [28].

Malheureusement les premiers cas de résistance ont été reportés dès 2008 [29]. La résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine est détectée, à l'heure actuelle, dans cinq pays de la sous-région du Grand Mékong : le Cambodge, le Myanmar, la République Démocratique Populaire du Laos, la Thaïlande et le Vietnam[30]. La résistance à l'artémisinine se caractérise par un taux d'échec aux traitements plus élevé et un ralentissement de la clairance parasitaire [31] sans modification de la sensibilité à la DHA évaluée par les méthodes standard d'inhibition de croissance [32]. Dans la majorité des cas, les patients répondent correctement au traitement grâce à une molécule

partenaire efficace. Cependant, à la frontière Cambodge-Thaïlande, les parasites sont devenus résistants à presque tous les antipaludiques disponibles.

Contenir la résistance aux dérivés de l'artémisinine et prévenir sa diffusion dans d'autres pays, notamment en Afrique où l'endémicité parasitaire est la plus importante, est aujourd'hui une priorité majeure de santé publique car aucun autre antipaludique de même efficacité et tolérance n'est actuellement disponible. Un suivi régulier de l'état de la résistance dans les pays d'endémie palustre est un prérequis indispensable pour élaborer des stratégies pour mieux en prévenir la diffusion.

3.4. Marqueurs moléculaires de résistance

Les marqueurs moléculaires sont des signatures au niveau du génome des micro-organismes associés clairement à une résistance clinique et biologique prouvé *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* aux molécules. Ces marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques sont très utiles pour la surveillance de la résistance.

Des marqueurs moléculaires ont été décrits pour un grand nombre de molécules antipaludiques. Les molécules efficaces dans le traitement du paludisme ciblent des processus biologiques essentiels pour le parasite mais différents ou absents chez l'hôte. La compréhension des mécanismes de résistance passe le plus souvent par une bonne connaissance des modes d'action des antipaludiques. Des études d'investigations d'isolats de terrain, de croisements génétiques et de gènes candidats ont permis d'identifier les gènes responsables de la résistance à la plupart des antipaludiques. Ces marqueurs moléculaires permettent ainsi, de surveiller et de suivre l'émergence et la propagation des résistances sur le terrain afin d'adapter au mieux les politiques de traitement.

3.4.1. Marqueurs moléculaires de résistance à la chloroquine

L'utilisation intensive de la CQ a conduit à l'émergence de souches de *P. falciparum* résistantes. Des études de croisements génétiques entre une souche sensible HB3 (Honduras) avec une souche résistante Dd2 (Indochine) ont permis de mettre en évidence une région du chromosome 7 responsable de la résistance à la CQ [33], puis l'implication du gène *pfert* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) fortement polymorphique et codant pour un transporteur transmembranaire de la vacuole digestive [34].

Certaines substitutions nucléotidiques ont montré un lien étroit avec le phénotype de résistance de la plupart des souches de laboratoire et de terrain de *P. falciparum*. Cependant, seule la mutation *pfcr* K76T, identifiée en 2000, a un rôle clé dans l'émergence du phénotype de résistance à la CQ, sans que son rôle soit précisément défini. La présence de mutations empêcherait l'accumulation de la CQ dans la vacuole grâce à la capacité de la protéine *pfcr* à exporter la CQ vers l'extérieur [35].

3.4.2. Mutations des gènes de multi-résistance au Molécules - gène *Pfmdr-1* et 2

Le gène *Pfmdr-1* (*P. falciparum* multi-drug resistance), initialement évoqué comme gène candidat de la résistance à la CQ, a été identifié en recherchant des homologues de la famille des transporteurs MDR (*multidrug resistance*) impliqués dans la résistance des cellules cancéreuses de mammifères. Ce gène *Pfmdr-1*, situé sur le chromosome 5, code pour un second transporteur, *P. falciparum* glycoprotéine homologue 1 (Pgh1) localisé dans la membrane de la vacuole digestive avec son domaine de liaison à l'ATP dirigé vers le cytoplasme [36]. Chez Plasmodium, ce transporteur induirait un mécanisme auxiliaire permettant aux molécules d'entrer dans la vacuole digestive. Sanchez et al ont montré que Pgh1 était capable de transporter la CQ et que le polymorphisme du gène *Pfmdr-1* affectait la spécificité de substrat [37]. Cinq mutations ponctuelles (SNP), N86Y, Y184F, S1034C, N1042D et D1246Y, ont été détectés et altèreraient les propriétés physicochimiques de Pgh1 du fait de substitutions par des acides aminés plus polaires.

Ces modifications affecteraient ainsi la capacité de liaison et le transfert de molécules et influenceraient la sensibilité à plusieurs molécules antipaludiques [38]. Des polymorphismes à la fois sur les gènes *pfmdr-1* et *Pfcr* agiraient également sur la sensibilité aux CTA, notamment la combinaison *Pfcr* 76T et l'haplotype *pfmdr-1* 86Y-164Y-1246Y qui serait associée à une recrudescence et une réinfection après un traitement à AS-AQ [39]. De même, les allèles sauvages *Pfcr* K76 et *Pfmdr-1* N86 et D1246 associés à la mutation *Pfmdr-1* 184F seraient sélectionnés après un traitement à la luméfantine. Cependant, le rôle conjoint de ces mutations reste encore à étayer et le nombre de molécules associées pour traiter les patients complexifie leur étude. En effet, les mutations *Pfmdr-1* N86Y et D1246Y moduleraient le niveau de résistance à la CQ des parasites déjà porteurs de mutations sur le gène *Pfcr* [40].

Bien que des mutations clés du gène *Pfmdr-1* affectent la sensibilité à différents antipaludiques ciblant la vacuole digestive, la résistance de *P. falciparum* à la MQ, à l'halofantrine, à la LUM et à la quinine, mais non à la CQ [41], est également associée à la duplication/amplification du gène *Pfmdr-1* [40]. Cette duplication a pour conséquence de diminuer la concentration intracellulaire en antipaludiques, les mécanismes à l'origine de ce phénomène (réduction de l'entrée ou augmentation de l'efflux de molécules) restant inconnus.

Plasmodium falciparum multi-drug resistance protein-1 (*pfmrp1*) est une protéine de la super famille des ABC transporteurs [42]. Deux mutations ponctuelles (SNPs) fréquents en Afrique, I876V et K1466R, ont été sélectionnés par les traitements artéméther/luméfantrine et SP mais ils n'ont jamais été associés avec une sensibilité altérée des isolats africains [43]. Des mutations de *pfmrp1* différentes ont été observées chez des isolats du Nord-est du Myanmar et étaient associées à des sensibilités réduites à la CQ, à la MQ, et à la luméfantrine. L'altération de la croissance parasitaire et l'augmentation de la sensibilité à la CQ observées chez des parasites déficients pour *pfmrp1* suggèrent que la protéine est impliquée dans le fitness parasitaire et l'efflux d'antipaludiques [44].

3.4.4. Marqueurs moléculaires de résistance à la SP

La résistance *in vitro* de *P. falciparum* aux antifolates et aux sulfonamides est due à une acquisition séquentielle de mutations ponctuelles spécifiques sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*, respectivement [45]. Les substitutions N51I, C59R and S108N du gène *Pfdhfr* confèrent la résistance à la pyriméthamine (PYR) alors que A16V et S108T confèrent la résistance au cycloguanil. Les substitutions A437G, K540E and A581G du gène *Pfdhps* sont les plus impliquées dans la résistance à la sulfadoxine. Les mutations sur ces enzymes cibles altèreraient la conformation du site actif où se fixent les inhibiteurs, diminuant ainsi leurs affinités de liaison, tout en conservant la fonction principale de ces enzymes [46].

La mutation *Pfdhfr* S108N est, en général, la première à apparaître lorsque les parasites sont exposés à la SP. Cette mutation conduit à un niveau de résistance modéré qui s'accroît lorsque le parasite accumule de nouvelles mutations : A16V, N51I, C59R et I164L [46]. Une exposition prolongée conduit à l'accumulation de mutations sur les 2 enzymes DHFR ou DHPS [47]. L'haplotype A437G/K540E est le plus fréquent en Afrique. La combinaison de cet haplotype aux trois mutations *Pfdhfr* N51I, C59R et S108N forme un quintuple mutant très fortement résistant à

la SP, qui s'est maintenant largement propagé en Afrique. Chaque mutation confère une réduction de sensibilité.

Récemment, il a été introduit une notion de génotypes « super-résistants » lorsque le quintuple génotype est complété par les mutations *Pfdhps* A581G ou A613S/T ou que la mutation *Pfdhfr* I164L se combine à l'allèle *Pfdhfr* N51I, C59R, S108N [48].

3.4.5. Marqueurs moléculaires de résistance à l'artémisinine

La protéine Pfk13 est décrite comme plus proche de la protéine KLHL chez l'homme qui code pour une protéine séquestrant de façon consécutive le facteur de transcription Nrf2 sur la membrane cellulaire. Soumis à un stress oxydatif, le complexe Nrf2 /KLHL19 est clivé et Nrf2 transloque vers le noyau où il induit la transcription des gènes impliqués dans la protection cellulaire contre le stress[49]. Lorsque le K13 de type sauvage détecte des oxydants tels que l'artémisinine, il subit un changement de conformation pour libérer le facteur de transcription qui régule ensuite l'expression des gènes impliqués dans la lutte contre les dommages oxydatifs. On pense donc que la réponse des parasites de types sauvages est trop peu importante et trop tardive, de sorte que l'action de l'artémisinine est trop puissante et trop rapide pour que les parasites puissent la surmonter avec succès.

Cependant, chez les parasites résistants à l'artémisinine, les mutations de l'hélice K13 déstabilisent l'interaction du facteur de transcription K13, ce qui entraîne une activation consécutive des modifications transcriptionnelles qui poussent le parasite à résister aux dommages oxydatifs causés par l'artémisinine [10]. Par ailleurs, le traitement avec l'artémisinine provoque l'entrée du parasite en phase dormante moins susceptible à l'action destructrice du médicament[50] [51], ce qui se traduit parfois par un cycle cellulaire plus long et un stade anneau assez prolongé [52].

Chez les parasites sensibles à l'artémisinine, le K13 lie un facteur de transcription putatif et la cible pour dégradation. Par contre pour les parasites résistants à l'artémisinine, les mutations sur le gène K13 empêcheraient de façon consécutive l'interaction de K13 avec son partenaire, et provoqueraient ainsi la dérégulation de la réponse antioxydante. Dans cet état, les parasites sont mieux préparés pour gérer le stress oxydatif imposé par l'artémisinine [53].

Le polymorphisme de Pfk13 a donc un rôle majeur dans la résistance à l'artémisinine. Parmi les mutations que l'on y retrouve, une a été mise en évidence comme étant capable de perturber la fonction de la protéine. Il s'agit de la mutation A578S (alanine en sérine), et ceci grâce à la modification de l'interaction avec les autres protéines via l'altération des charges de surface [54].

Jusqu'à présent, et malgré la présence de souches de parasites présentant également des mutations du gène kelch13 en Afrique, aucune corrélation n'a pu être établie avec une perte de sensibilité du parasite sur ce continent [31]. Cela pourrait refléter l'importance du fond génétique des parasites dans lesquels les mutations émergent. Il est très important de noter que l'impact des diverses mutations dans le gène pf k13 sur la clairance parasitaire et sur le taux de survie des parasites au stade anneau était dépendant du fond génétique des parasites [55]. Une étude d'association au niveau du génome entier de *P. falciparum* a décrit un fond génétique de résistance aux ARTs présent chez les parasites résistant et fortement associé à l'apparition des mutations au niveau du gène de kelch13 [56]. Ces mutations sont les suivantes :

- *Pfarp10_V127M* et *D128Y / H* (PF3D7_1460900),
- *Pffd_D193Y* (Pf3D7_1318100),
- *Pfcrt_N326S* et *I356T* (Pf3D7_0709000), et
- *Pfmdr-2_T484I* (Pf3D7_1447900).

Au Mali, nous n'avons pas une base de référence pour les mutations associées à la résistance du *P. falciparum* aux antipaludiques. La surveillance du fond génétique de mutations associées à l'émergence de kelch13 permet de détecter précocement leur émergence et aussi de suivre leur propagation dans différentes régions géographiques du pays. Il apparaît donc nécessaire de surveiller l'émergence de la résistance des populations de Plasmodium aux CTA 10 ans après sa mise en œuvre pour le traitement du paludisme afin de procéder de façon judicieuse au choix des molécules partenaires à associer aux dérivés de l'artémisinine dans les différentes régions géographiques du Mali. Cette étude permettra de fournir des données importantes sur la résistance de *P. falciparum* dans différentes zones endémiques au Mali afin d'éclairer les prises de décisions.

4. Objectifs

4.1. Objectif général

Etudier la fréquence des marqueurs moléculaires de résistance à l'artémisinine et aux principales molécules utilisées dans le traitement du paludisme au Mali, à Dangassa et à Nioro en 2016.

4.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer la fréquence des mutations constitutives du fond génétique de résistance à l'artémisinine chez les isolats de *Plasmodium falciparum* à Dangassa et Nioro pendant la saison de transmission 2016 ;
- Déterminer les prévalences des principales mutations et haplotypes associées à la pyriméthamine, à la sulfadoxine, à l'amodiaquine et à la luméfantrine chez les isolats de *Plasmodium falciparum* à Dangassa et Nioro pendant la saison de transmission 2016 ;
- Comparer les prévalences des marqueurs étudiés à Dangassa et Nioro pendant la saison de transmission 2016

5. Méthodologie

5.1. Cadre de l'étude

Cette étude entre dans le cadre d'un projet de recherche sur la diversité génomique du *Plasmodium* au Mali financé par le DELTAS Africa, une initiative de l'Académie Africaine des Sciences à travers le Centre Ouest Africain de Biologie Cellulaire des Pathogènes Infectieux (WACCBIP) basé à l'Université de Ghana (Grant DEL-15-007 : Awandare). Au cours de cette étude, nous avons aussi bénéficié de l'accompagnement technique de l'Institut Sanger du Royaume Unit dans le cadre du consortium « MalariaGEN ».

L'étude s'est déroulée dans deux faciès épidémiologiques différents au Mali : le village de Dangassa et la ville de Nioro du Sahel.

5.1.1. Nioro du Sahel

Nioro du Sahel est situé à 241 km au Nord-Est de Kayes (chef-lieu de la première région administrative du Mali) et à 447 km de Bamako. Il est situé entre les latitudes 14°30 et 16°30 Nord et les longitudes 11°00 et 9°00-Ouest. Nioro du Sahel est le chef-lieu de la commune et du Cercle du même nom. Il compte 16 communes et couvre une superficie de 11 060 km².

Le climat est du nord sahélien avec deux saisons bien marquées : l'hivernage va de juillet à septembre. En année moyenne, on enregistre en moyenne 300 mm de pluies (figure 3). Il fait très chaud en avril, mai et juin (45°C, figure 2). Ce qui caractérise surtout Nioro du Sahel est le fort taux d'évaporation des eaux de surface avec 80%. Ceci explique en grande partie le tarissement précoce des points d'eaux naturels. Les mares de Korkodio et de Gakou constituent des réservoirs d'eaux importants.

La végétation est essentiellement composée d'arbustes épineux avec une domination d'Acacia (peuplement d'Acacia Sénégalaise au nord du cercle).

La population du cercle est cosmopolite : Soninké, Peuls, Maures, Kagoro et Bambara y vivent en paix. Cette population est estimée à environ 253 000 habitants (sources DNCT).

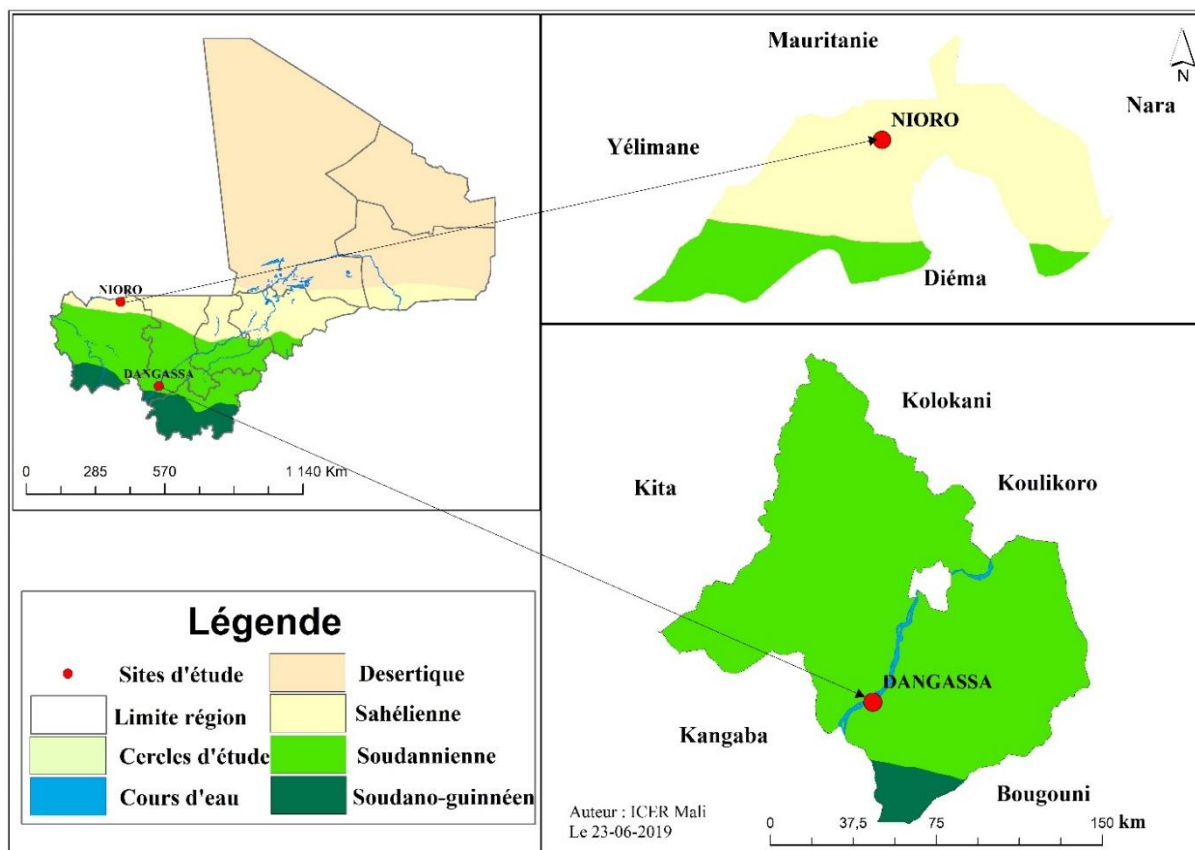
L'agriculture et l'élevage restent les deux occupations majeures de la population. Le commerce et l'artisanat sont assez bien développés dans la ville de Nioro du Sahel. La commune urbaine de

Troungoumbé abrite le plus grand marché à bétail de la région. La population du cercle est confrontée à d'énormes problèmes de santé, d'éducation, de communication. Le manque d'infrastructure et d'équipements est senti à tous les niveaux. La couverture sanitaire en termes d'infrastructures construites est passée du simple au triple (07 CSCOM en 2001 contre 14 en 2005 et 21 en 2015. Par rapport à l'accessibilité géographique de la population aux services socio-sanitaires, le taux est passé à 42% pour les populations situées à moins de 5 km et à 62% pour celles résidentes à moins de 15 km. Le taux de consultation prénatale est passé de 37% en 2001 à 65% en 2005. Le taux d'accouchement assisté demeure constant à 31%. Les maladies courantes sont le paludisme et les infections respiratoires chez les enfants.

5.1.2. Village de Dangassa

Le village de Dangassa est situé à 82 km au sud-ouest de Bamako sur la route nationale 7 (RN7), dans la commune rurale de Niagadina, dans le district sanitaire de Oueléssebougou, région de Koulikoro. Autre fois, Dangassa s'appelait Tintinibilé (plateau rouge), le village aurait été fondé vers le 13ème siècle par Manssa Dan camara. Il s'installa sur un plateau où poussait une herbe appelée en malinké Ngasan. Quand son frère Kamadjan lui rendit visite et dit « nous viendrons nous installer à Dan ka Ngasanfièra » ce qui signifie en malinké (le plateau où pousse l'herbe Ngasan) que le village prend le nom de Dangassa. Ce village compte 11000 habitants composés essentiellement par les malinkés mais on y retrouve aussi les bambara, les peuhls, les somonos, les dogons etc. (Source : CSCOM de Dangassa).

Il est limité à l'Est par le village de Ballala, au Nord-Est par le village de Makono à l'Ouest par le village de Niagadina, au nord par le fleuve Niger et au Sud par le village de Faraba.



Source : unité GIS/RS du MRTC-FMOS-USTTB- Juin 2019

Figure 1 : carte des deux sites d'étude

5.2. Type d'étude et période d'étude

Nous avons mené une étude transversale prospective qui consistait à collecter des données chez les patients reçus en consultation aux centres de santé de Nioro du Sahel et Dangassa au cours de la saison de transmission palustre du mois d'août à décembre 2016.

5.3. Population d'étude

La population d'étude était constituée par tous les patients âgés de 6 mois et plus qui se sont présentés aux centres de santé de Nioro et Dangassa pour paludisme.

5.3.1. Critères d'inclusion

Les personnes répondant aux critères suivants ont été inclus dans cette étude :

- ❖ être âgé de 6 mois et plus
- ❖ avoir donné son consentement libre et éclairé ;
- ❖ avoir un taux d'Hb \geq 8,5 g/dl ;
- ❖ avoir un TDR positif.
- ❖ avoir une goutte épaisse (GE) positif

5.3.2. Critères de non inclusion

Toute personne présentant une des conditions suivantes n'a pas été incluse dans notre étude :

- ❖ avoir une parasitémie faible inférieure à 5000Pf / μ l de sang
- ❖ présence des autres espèces plasmodiales que *P. falciparum*

5.4. Echantillonnage

L'échantillonnage a été exhaustif car nous avons inclus tous les patients qui se sont présentés aux centres de santé avec des symptômes de paludisme, ayant accepté de participer à l'étude et chez qui une goutte épaisse a été réalisée.

5.5. Variables mesurées

Chez tous les participants, nous avons mesuré les variables suivantes :

- sociodémographiques : âge, sexe, résidence ;
- cliniques : température ;
- parasitologiques : espèce plasmodiale et parasitémie ;
- hématologiques : taux d'hémoglobine

En outre, des variations au niveau des codons suivants ont été recherchées chez les isolats de *P. falciparum*:

- les codons *Pfdhfr* 51, 59, 108, 164 ;
- les codons *Pfdhps* 436, 437, 540, 581, 613
- les codons *Pfmdr-1* 86, 184, 1246
- les codons *Pfarps10* 127, 128
- le codon *Pffd* 193

- les codons *Pfprt* 326, 356
- le codon *Pfmd-r2* 484

5.6. Techniques de laboratoire utilisées

5.6.1. Procédures standard opératoires (SOP) de la goutte épaisse

5.6.1.1.Principe

C'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang et l'identification des différentes espèces.

5.6.1.2. Matériel

- Lames et vaccinostyles
- Des gants de protection en latex à usage unique
- Lames de microscope à usage unique
- Des lancettes stériles à usage unique,
- De l'éthanol à 70°
- Du coton hydrophile
- Boîte de collection des aiguilles sécurisées
- Un bac pour le séchage des lames
- Des formulaires de rapport de résultats ou un registre ;
- Un stylo à bille ;
- Un crayon à mine

5.6.1.3. Mode opératoire

Prélever une grosse goutte de sang capillaire (environ 5-10µl) en la déposant directement à l'extrémité d'une lame (l'autre extrémité étant généralement réservée au frottis sanguin mince). A l'aide du coin de la deuxième lame, étaler la goutte sur 1 cm de diamètre en tournant pendant quelques secondes. Laisser sécher avec soins, ne jamais fixer la goutte (cela altère la coloration).

5.6.1.4. Coloration

Il y a deux méthodes de coloration avec le Giemsa : la méthode rapide (colorant à 10 %) et la méthode lente (colorant à 3 %). On emploie la méthode lente pour colorer un plus grand nombre de lames, c'est le cas dans les enquêtes transversales ou épidémiologiques et pour les travaux de recherche sur le terrain. La méthode rapide est la technique de coloration la plus courante pour la coloration simultanée de 1 à 15 lames.

5.6.1.5. Lecture et quantification

Une goutte d'huile à immersion est placée sur la goutte épaisse (GE). Les parasites sont recherchés en utilisant l'objectif à immersion (x100) du microscope optique. Pour le comptage des parasites, la lame est examinée de gauche à droite ou de haut en bas (figure 2) afin d'identifier les parties de la GE où la répartition des leucocytes est distribuée de façon homogène.

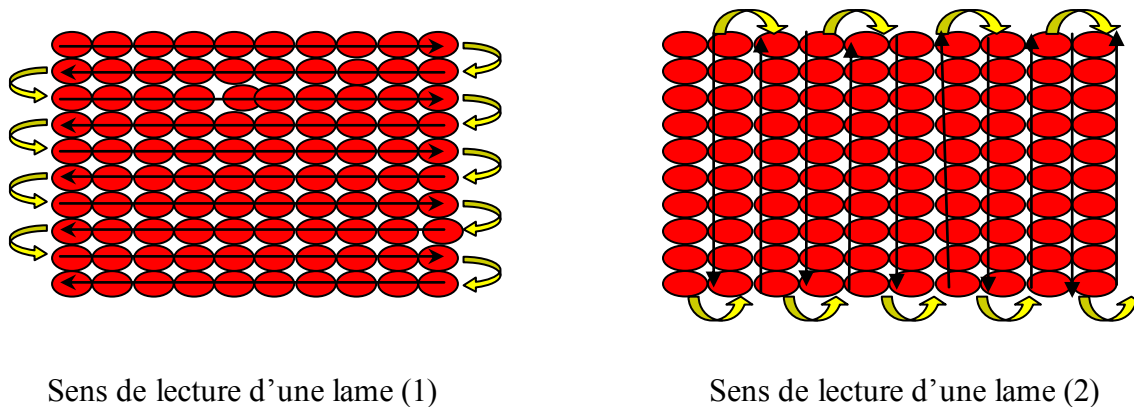


Figure 2. Technique de lecture d'une lame

Les formes asexuées (trophozoïtes) et les formes sexuées (gamétocytes) de chaque espèce plasmodiale observée sont comptées en notant simultanément les leucocytes. Le comptage se faisait sur 300 leucocytes. Une lame n'est déclarée négative qu'après lecture d'au moins 100 champs de la GE sans détecter une forme plasmodiale. La densité parasitaire par μl de sang est calculée en divisant le nombre de parasites comptés sur 300 leucocytes multiplié par 7500 (nombre moyen de leucocytes par μl de sang).

5.6.1.6. Avantages et inconvénients

- **Avantages :** La réalisation de la GE est relativement simple et donne une concentration parasitaire d'environ 20 fois plus élevée que celle d'un frottis mince et peut détecter des parasites au taux extrêmement faibles (5 parasites/ μl) soit une parasitémie de 0.0001%.
- **Inconvénients :** Le temps de coloration de la GE est classiquement long (45 minutes) et la lecture nécessite des microscopistes avec expériences. En outre, le diagnostic des espèces plasmodiale est difficile à la GE.

5.6.2. Frottis mince (FM)

5.6.2.1. Principe

Le frottis mince est utilisé pour l'examen morphologique plus détaillé et pour déterminer les espèces de parasites. Elle consiste à étaler de façon homogène une goutte de sang sur une lame porte objet. En général, le prélèvement se fait à partir du sang capillaire au bout du doigt.

5.6.2.2. Matériel

- Lancette stérile à usage unique
- Sous paillasse
- Coton alcoolisé
- Gant à usage unique
- Lame porte objet dégraissée à usage unique
- Sac poubelle
- Etiquettes ou crayon

5.6.2.3. Prélèvement

- Piqûre au niveau du 3^{ème} ou 4^{ème} doigt de la main gauche
- Chez les nourrissons de moins de 6 mois, la piqûre se fait au niveau du talon ou du gros orteil.
- Nettoyer l'endroit choisi avec l'alcool
- Piquer d'un coup sec et rapide
- Essuyer la première goutte de sang avec un tampon de coton sec
- Presser le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang
- Confectionner les frottis sanguins minces, sur une surface dure et plane
- Déposer 2,5-5µl de sang sur la lame.

5.6.2.4. Confection frottis mince (FM)

- Glisser le bord du frottoir jusqu'à ce qu'elle touche la goutte de sang (laisser fuser)
- Étaler d'un coup sec et régulier en respectant un angle de 45°. Tout le sang doit être étalé avant d'atteindre l'autre extrémité de la lame.
- La queue du FM à couche monocellulaire doit être régulière et non striée.

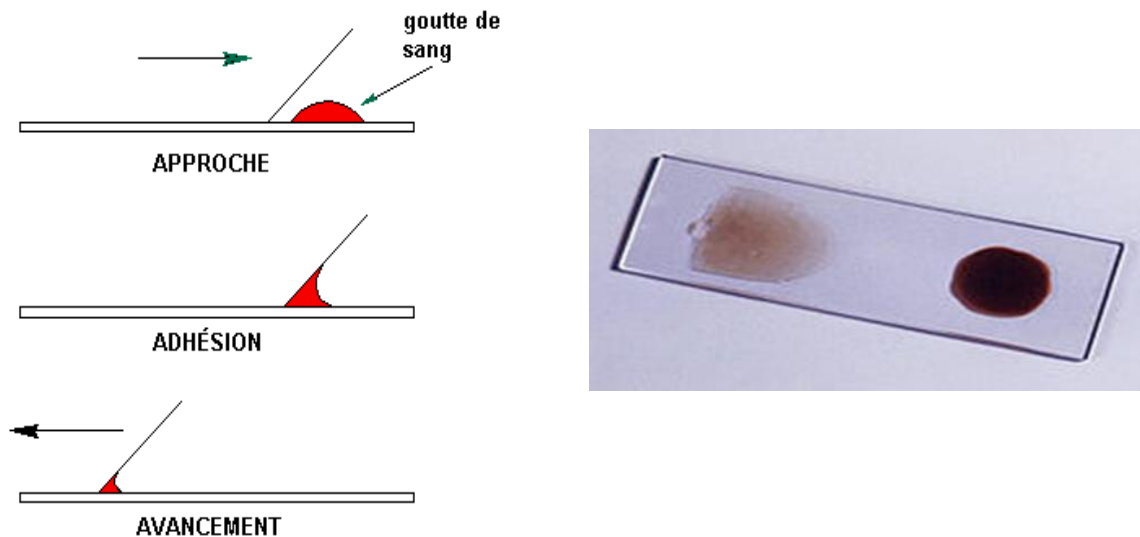


Figure 3 : Technique de la goutte épaisse et frottis minces

5.6.2.5. Fixation et Séchage du frottis sanguin mince

- Après séchage, fixer le frottis mince en la lame dans le méthanol pendant 3 à 5 secondes
- Laisser sécher le frottis mince sur une surface plane

5.6.2.6. Coloration

- Recouvrir le frottis avec une solution de Giemsa à 10% pendant 10-15 minutes pour la coloration rapide ou de Giemsa à 3% pendant 30 minutes pour la coloration longue classique
- Rincer doucement la lame sous un filet d'eau distillée ou du robinet dans l'évier
- Laisser sécher le frottis à l'air libre au moins pendant 1h au minimum ou utiliser un séchoir
- Le pH du colorant doit être légèrement alcalin (pH = 7,2 – 7,4). Une coloration acide pourrait empêcher la mise en évidence des parasites.

5.6.2.7. Lecture

- ajouter une goutte de l'huile d'immersion sur le frottis mince (vers la queue) puis lire avec l'objectif $\times 100$; sélectionner une zone dans laquelle les globules rouges sont bien étalés sans exposition des uns sur des autres.
- Examiner la queue ou les bords du frottis et identifier les espèces de parasites en notant les caractéristiques suivantes :

- la forme du trophozoïte
- le nombre de trophozoïtes dans le globule rouge

- la taille du globule rouge infecté
- le nombre de mérozoïte par schizonte
- la forme du gamétocyte
- et autres parasites dans les globules rouges infectés.

Compter tous les globules rouges, puis les globules rouges infectés dans au moins cinq champs. Calculer le pourcentage de globules rouges infectés. Une fois le comptage terminé, on calcule le nombre relatif de parasites par rapport au nombre de leucocytes et l'on exprime le résultat en « nombre de parasites par champ microscopique ou en pourcentage d'hématies infectées ».

5.6.2.8. Avantages

Le frottis mince est une technique rapide pour la détermination de l'espèce plasmodiale (diagnostic d'urgence). La lecture est facile car on recherche les parasites à l'intérieur des globules rouges.

5.6.2.9. Inconvénients

La réalisation du frottis sanguin mince est difficile et demande de l'expérience. La technique est peu sensible pour détecter des parasitémies faibles.

5.6.3. Procédures Standard Opératoires (SOP) : Confection du confetti (papier filtre)

5.6.3.1. Matériel

- Papier buvard
- Gants stériles
- Vaccinostyle stérile
- Coton hydrophile
- Alcool 70%
- Ciseaux
- Poubelle pour vaccinostyles

- Registre
- Crayons
- Enveloppes
- Agrafeuse
- Agrafe
- Scotch type OMS
- Insecticides (Timor[®])
- Cantine + cadenas

5.6.3.2. Lieu de prélèvement

Face latérale de l'annulaire gauche indemne de toute pathologie

5.6.3.3. Mode opératoire

- Découper du papier buvard à l'aide d'une paire de ciseaux environ 4 cm de long sur 2 cm.
- Diviser un des bouts du confetti en quatre dents (1/2 cm de largeur sur 1 cm de hauteur).
- Mettre en confiance le patient
- Inscrire le numéro d'identification du patient sur le buvard à l'aide du crayon
- Désinfecter la face latérale de l'annulaire gauche à l'aide d'un coton hydrophile imbibé d'alcool à 70°.
- Prendre ledit doigt du patient entre le pouce, l'index et le majeur et le piquer à l'aide d'un vaccinostyle stérile.
- Ensuite, imbiber les 4 dents du papier buvard de sang en massant doucement toujours le doigt piqué de bas en haut.
- Après le prélèvement, appliquer du coton sec sur la partie piquée du doigt pour faire hémostase.

- Laisser sécher le confetti en l'accrochant sur un scotch adhésif suspendu à l'intérieur d'un carton qui se ferme bien. Laisser sécher complètement le confetti à l'abri de la poussière et des mouches.

5.6.3.4. Gestion du confetti

Après séchage, mettre chaque confetti dans une enveloppe portant le numéro d'identification du patient, la date du prélèvement et les garder soigneusement dans une cantine à l'abri des insectes et rongeurs. Enfin, consigner chaque jour dans un registre, le numéro des confettis confectionnés.

5.6.4. Extraction de l'ADN plasmodial par la méthode du méthanol à partir du confetti

- Découper approximativement 3 à 4 morceaux de 3mm² de confetti imprégné de sang (confetti séché) dans un tube Eppendorf de 500 µl. Chaque échantillon doit être découpé dans un tube séparément.
 - Ajouter 50-100 µl de méthanol dans chaque tube contenant les morceaux de confettis de manière à les immerger entièrement.
 - Fermer les tubes et les laisser incuber pendant 15 mn à la température ambiante.
 - Enlever le méthanol sans faire tomber les morceaux de confettis et les sécher complètement sous vide ou à l'air libre pendant environ 1 à 2 heures.
 - Après séchage, ajouter dans chaque tube 150µl d'eau distillée et/ou eau déionisée et fermer.
 - Chauffer les tubes dans un block chauffant pendant 15 minutes entre 95-100°C. Vortexer les tubes chaque 5 minutes pendant l'incubation pour extraire l'ADN plasmodial.
- L'ADN extrait peut se conserver à - 20°C pendant des semaines et à -70°C pendant des années.

5.6.5. Détermination du taux d'hémoglobine

Le taux d'hémoglobine a été mesuré en utilisant un appareil HemoCue[®] Hb201+ et des microcuvette pour l'hémoglobine (figure 4).



Figure 4 : Analyseur et Microcuvette Hemocue[®]

Source : www.hemocue.com

5.6.5.1. Principe de la méthode

La réaction dans la microcuvette repose sur une réaction modifiée de formation d'azoture de méthémoglobine. Les érythrocytes sont hémolysés pour libérer l'hémoglobine. L'hémoglobine est convertie en méthémoglobine laquelle réagit avec de l'azoture pour donner de l'azoture de méthémoglobine dont l'absorbance est mesurée dans l'analyseur. Cette absorbance est directement proportionnelle à la concentration de l'hémoglobine.

5.6.5.2. Matériel et réactifs

- Appareil analyseur HemoCue[®]
- Microcuvette pour l'hémoglobine
- Lancette stérile à usage unique
- Alcool 70°
- Coton hydrophile
-

5.6.5.3. Mode opératoire

- Cibler un doigt, bien désinfecté avec le tampon d'alcool à 70°;

- Piquer en un coup sec avec une lancette ; nettoyer la première goutte de sang, presser le bout du doigt pour avoir une deuxième goutte ;
- Appliquer la microcuvette sur la goutte de sang. La quantité nécessaire est aspirée automatiquement dans la microcuvette par capillarité.
- Après avoir enlevé minutieusement toute trace de sang présente à la surface de la microcuvette, la mettre sur son support et l'insérer ensuite dans le photomètre. Le résultat est exprimé en gramme d'hémoglobine par décilitre de sang (g/dl, figure 5).



Figure 5 : Mécanisme de mesure du taux d'hémoglobine par l'appareil HemoCue 201+

Source : www.hemocue.com

5.8. Techniques et outils de collecte des données

Un formulaire de report des cas a été élaboré et validé avant le démarrage des activités. Les données cliniques, parasitologiques et hématologiques ont été recueillies sur ce formulaire de report de cas et saisies dans une base de données de type Microsoft Excel. La méthode face à face a été utilisée pour l'administration du questionnaire. Les données sociodémographiques ont été obtenues à partir de l'interrogatoire. Les données cliniques ont été obtenues lors de l'examen physique et celles de la biologie par la prise de sang. Le sang collecté sur confettis chez les patients a été utilisé pour extraire l'ADN du parasite. L'ADN parasitaire obtenu était analysé pour la détection des mutations ponctuelles au niveau des nucléotides d'intérêt en utilisant la technique de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight). Chaque patient inclus dans l'étude a fait l'objet d'un prélèvement sanguin capillaire sur confettis au début de l'étude. Sur ces prélèvements sanguins, nous avons effectué les analyses suivantes telles que la goutte épaisse, le test du diagnostic rapide du (TDR) et le taux d'Hb.

5.9. Extraction de l'ADN et le génotypage

Les ADN parasite ont été extraits des papiers buvards imbibés de sang de patients positifs pour *P. falciparum* en utilisant le kit d'extraction Qiagen Kit (No. 56504, Qiagen, Crawley, UK).

Une amplification complète[57] ou partielle [58] du génome du parasite était réalisée à partir de l'ADN ainsi obtenu en utilisant des amorces spécifique du génome de *P. falciparum*. Le génotypage a été réalisé sur le produit de l'amplification en utilisant la plateforme robotique Agena MassARRAY® iPLEX (Agena Bioscience, Hamburg, Germany). Ce système est capable de génotyper simultanément avec précision un grand nombre de mutations nucléotidiques et dans un grand nombre d'échantillon [59]. L'amplification et le génotypage de l'ADN parasite ont été effectués par des partenaires de l'Institut Sanger des Royaume Unis.

5.10. Déroulement d'étude

Avant le démarrage de l'étude, une autorisation communautaire a été obtenue auprès du chef de village, des chefs de familles et des autorités communautaires et administratives. Une formation sur le questionnaire et sur les bonnes pratiques de laboratoire et en clinique a été organisée pour l'équipe de l'étude afin de faciliter la bonne conduite de l'étude.

Une équipe médicale assurait la permanence dans les centres de santé des localités d'étude pendant toute la période de l'étude pour la détection passive des cas de paludisme et les populations étaient encouragées à fréquenter les centres en cas de maladie.

L'inclusion des participants dans l'étude a été effectuée de septembre à décembre 2016 après le consentement individuel éclairé et volontaire des parents et un assentiment pour les enfants de 12 à 17 ans. Les données cliniques ont été recueillies sur un formulaire de report de cas. Un prélèvement sanguin était par la suite effectué au niveau du doigt pour réaliser quelques examens biologiques (TDR, GE et taux d'Hb). Un prélèvement veineux était ensuite fait dans les tubes EDTA pour les autres examens biologiques. Les prélèvements veineux étaient centrifugés pour séparer le plasma du culot. Le plasma était utilisé pour rechercher des facteurs pouvant influencer les manifestations cliniques du paludisme. Les confettis ont été utilisés pour faire le génotypage avec l'appui de nos partenaires du Génome Campus de Sanger au Royaume-Uni.

Les accès palustres simples ont été traités avec l'association artéméther-luméfantrine (Coartem®) et les accès palustres graves ont été traités soit avec la quinine injectable en perfusion soit avec

artéméther injectable. En cas de complications nécessitant des actions thérapeutiques particulières, les patients étaient référés vers des services spécialisés.

5.11. Gestion et analyse des données

Les données ont été saisi sur Microsoft Excel et analysées avec le logiciel Stata version 14. Une analyse descriptive a été faite pour déterminer la fréquence des mutations recherchées et une analyse analytique pour rechercher les facteurs associés aux formes cliniques du paludisme. Les données ont été présentées sous forme de tableaux et figures. Le Chi² de Pearson a été utilisé pour la comparaison des proportions et le Test exact de Fisher pour les valeurs attendues inférieures à 5. Le seuil de signification statistique a été fixé à 0,05 avec une puissance de 80%. L'analyse a été effectuée sur les données complètes.

Une restitution des résultats a été faite à la fin de l'étude aux villageois et aux autorités sanitaires et administratives de Bancoumana et Kati. Les résultats ont également été présentés dans les rencontres scientifiques et feront l'objet de publication.

5.11. Considérations éthiques

Nous avons obtenu une autorisation communautaire auprès des chefs de villages, des chefs de familles et des autorités communautaires et administratives avant le début de l'étude. Le protocole de recherche a été soumis pour approbation au comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB). Nous avons également travaillé selon les bonnes pratiques de recherche clinique sur l'homme et selon les bonnes pratiques de laboratoire telles qu'énoncées dans les conventions internationales. (Déclaration d'Helsinki, Conférence internationale d'harmonisation des bonnes pratiques de recherche biomédicale). En outre, tous les investigateurs de l'étude ont été formés sur ces bonnes pratiques et sur le consentement volontaire, libre et éclairé.

La participation à cette étude était volontaire et le consentement éclairé des participants et les parents/tuteurs pour les enfants a été sollicité avant l'inclusion des participants. Ces derniers ont été informés de tous les aspects de l'étude et l'utilisation ultérieures des échantillons biologiques et des données cliniques. Nous avons utilisé un matériel neuf stérile à usage unique. Les déchets ont été gérés et détruits par l'équipe clinique de terrain conformément aux bonnes pratiques de

recherche clinique. Les numéros d'identification des participants ont été réalisés de façon anonyme. Aucun nom n'a été divulgué au cours de l'étude. Les renseignements recueillis n'ont été utilisés que dans le strict cadre de la présente étude, et nous avons veillé à ce que leur utilisation ne porte préjudice à qui que ce soit.

6. Résultats

6.1. Résultats globaux

Au total, nous avons inclus 173 enfants âgés de moins de 18 ans et 41 adultes âgés de plus de 18 ans. La proportion du sexe féminin était de 56,1% à Dangassa et 26,8% à Nioro du Sahel.

6.2. Résultats descriptifs

Tableau I : Caractéristiques des participants de l'étude à Dangassa et Nioro

Variables	Dangassa		Nioro	
	n	%	n	%
Sexe				
Masculin	93	43,5	41	73,2
Féminin	120	56,1	15	26,8
Classe d'âge (ans)				
Enfant (0-17)	173	80,8	36	64,3
Adulte (≥18)	41	19,2	20	35,7

La majorité des participants ont été enrôlée à Dangassa, soit au total 213 sur 269. Le sexe ratio était 1,3 en faveur de sexe féminin à Dangassa et 2,7 en faveur de sexe masculin à Nioro.

Les enfants de 0-17 ans étaient majoritaires dans les deux villages avec 80,8% à Dangassa et 64,3% à Nioro du sahel.

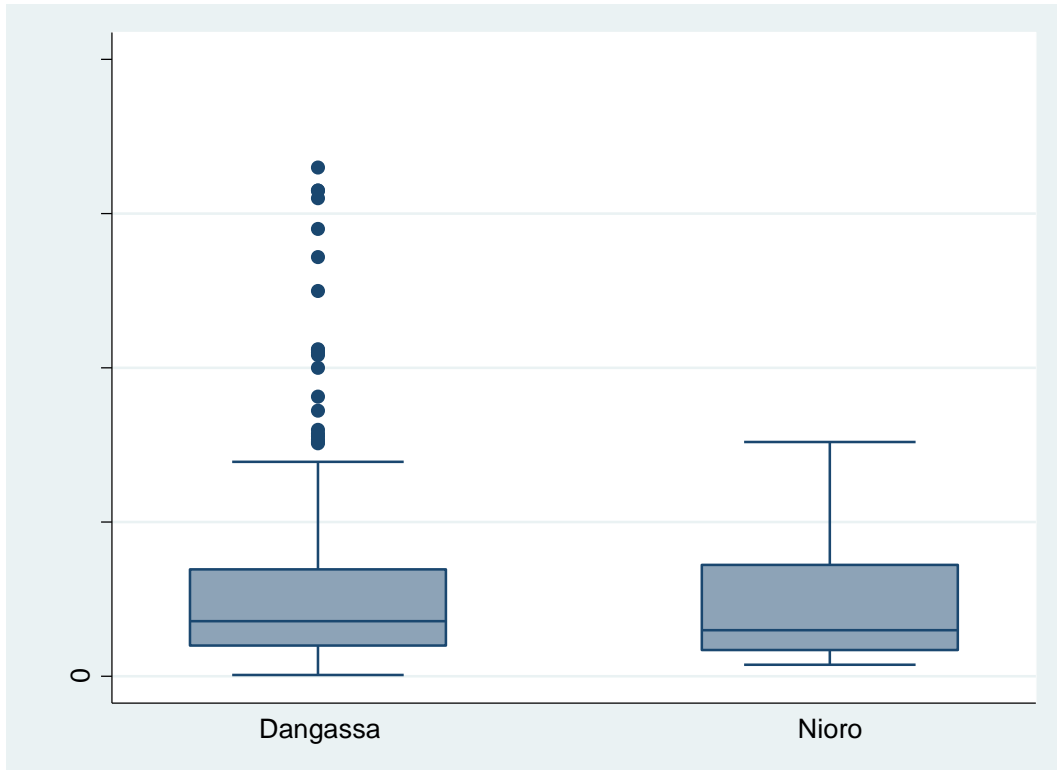


Figure 6. Parasitémie moyenne en fonction du site

Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative de la moyenne parasitaire en fonction des sites d'étude ($p=0,17$).

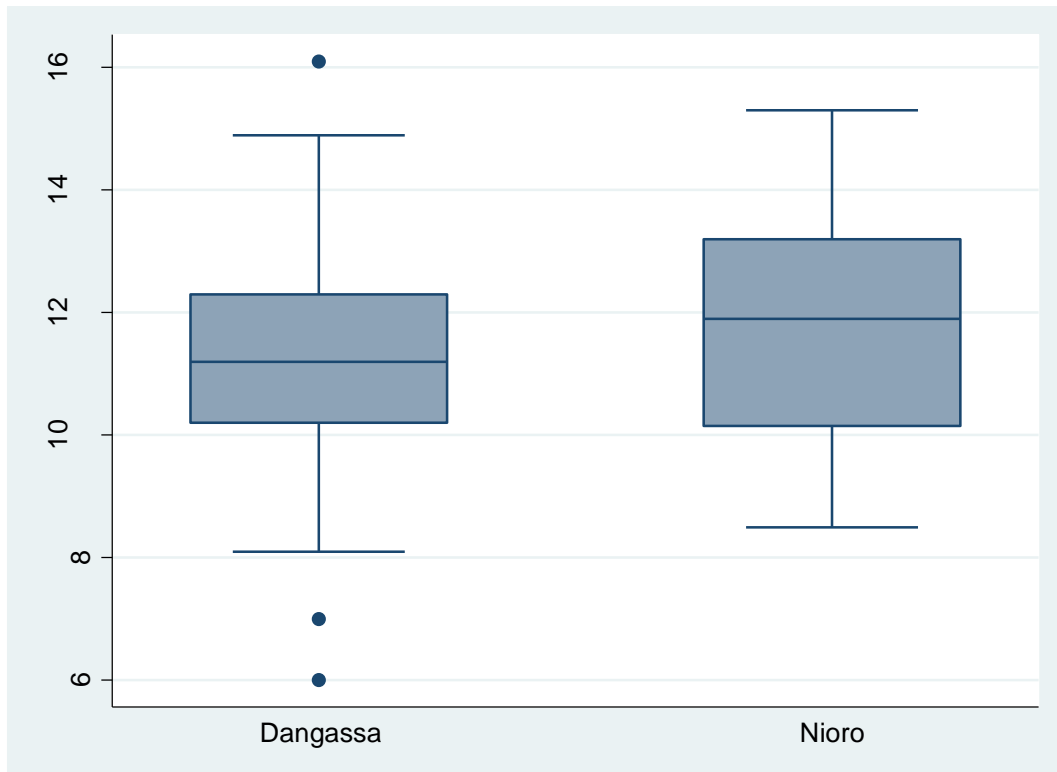


Figure 7. Taux moyen d'hémoglobine en fonction du site d'étude

Nous avons observé que le taux moyen d'hémoglobine était plus élevé statistiquement chez les patients à Nioro du Sahel qu'à Dangassa ($p = 0,03$).

Tableau II : Prévalence globale des mutations du fond génétique de résistance à l'artémisinine dans les deux sites Dangassa et Nioro du Sahel

Mutations	Dangassa		Nioro		P
	n	%	n	%	
<i>Pfarps10_127M</i>	1	0,5	1	2	
<i>Pfarps10_128Y</i>	1	0,6	0	0	
<i>Pffd_193Y</i>	9	4,3	5	9,4	0,161
<i>Pfcrt_326S</i>	2	1	1	2	
<i>Pfcrt_356T</i>	97	46,4	27	51	0,299
<i>Pfmdr-2_484I</i>	1	0,5	0	0	

De toutes les mutations constitutives du fond génétique de résistance à l'artémisinine, les mutations *Pfcrt_I356T* et *Pffd_D193Y* étaient les plus fréquentes avec respectivement 46,4% et 4,3% à Dangassa contre 51% et 9,4% à Nioro. Il n'a pas été observé de différences statistiquement significatives entre les prévalences des mutations dans les deux sites d'étude ($p > 0,05$).

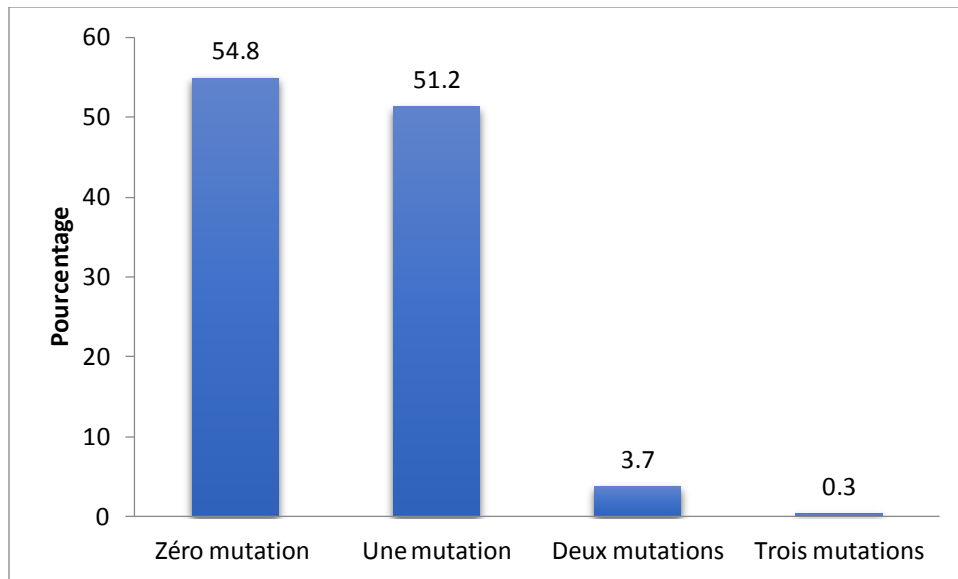


Figure 8. Proportion des isolats de *P. falciparum* en fonction du nombre de mutations du fond génétique de résistance à l'artémisinine accumulé.

Nous avons observé que plus de 41,1% des isolats de *P. falciparum* portait au moins une des mutations étudiées, 3,7% des isolats de *P. falciparum* en portaient deux et seul 0,3% des isolats cumulaient 3 des mutations étudiées. Aucun isolat ne cumulait plus de trois mutations.

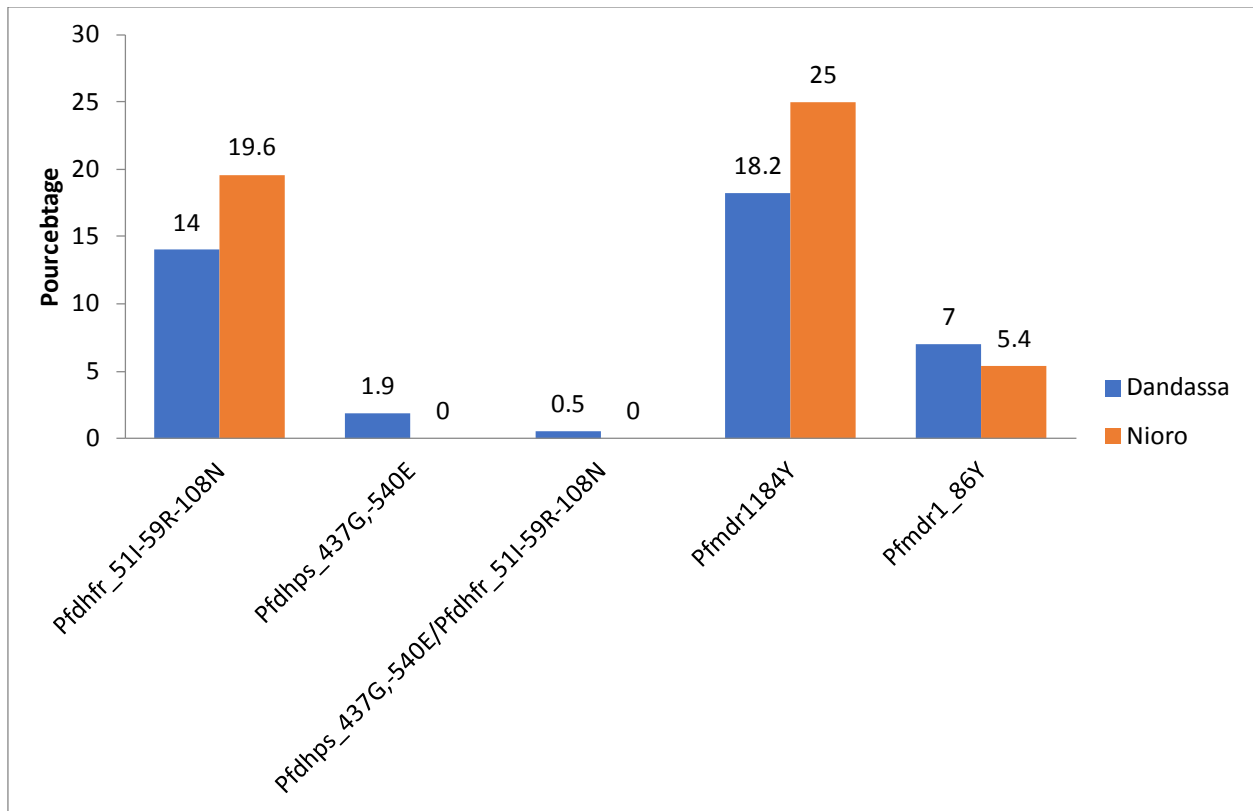


Figure 9 : Prévalences des marqueurs de résistance à la pyriméthamine (*Pfdhfr_51I-59R-108N*), A la sulfadoxine (*Pfdhps_437G,-540E*), à l'amodiaquine (*Pfmdr-1_86Y*) et à la luméfantrine (*Pfmdr-1_184Y*) dans les deux sites d'étude

Les marqueurs de résistance à la pyriméthamine (*Pfdhfr_51I-59R-108N*) et à la luméfantrine (*Pfmdr-1_184Y*) étaient les plus fréquemment rencontrés chez les isolats génotypés avec respectivement 14% et 18,2% à Dangassa contre 19,6% et 25% à Nioro du Sahel.

Le marqueur de résistance à l'amodiaquine (*Pfmdr-1_86Y*) était retrouvé chez 7% des isolats à Dangassa contre 5,4% à Nioro.

Seuls 4 isolats de Dangassa ont présenté le marqueur de résistance à la sulfadoxine (*Pfdhps_437G-540E*) soit 1,9%.

La quintuple mutation (*Pfdhfr_51I-59R-108N-Pfdhps_437G-540E*) associée à la résistance à la SP a été observée chez un isolat à Dangassa soit 0,5% de prévalence.

7. Discussion

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme et l'Institut Sanger du Royaume-Uni sur un projet de recherche sur la génomique des populations de parasite. L'étude nous a permis de surveiller et de suivre l'émergence et la propagation de la résistance des parasites du paludisme à l'artémisinine et aux autres antipaludéens les plus couramment associés à l'artémisinine au Mali. L'étude s'est déroulée dans deux zones éco-climatiques différentes du Mali arborant des paramètres d'endémicité palustre différents : Nioro du Sahel et Dangassa. Ces deux zones peuvent être considérées comme représentatives de l'épidémiologie du paludisme sur tout le territoire Malien. Nioro est une ville située dans une zone de faible transmission dans le sahel avec une courte saison de transmission qui s'étend de juillet à septembre. Le paludisme y est instable. Dangassa est un village situé le long du fleuve Niger dans la savane forestière de type Guinéenne. Le paludisme y est stable et endémique avec des saisons de forte transmission intense et plus longue allant de mai à janvier. Cependant, on y trouve des cas de paludisme toute l'année.

L'étude a consisté d'une part à déterminer les prévalences de six (6) mutations constitutives du fond génétique de résistance à l'artémisinine chez les isolats de *P. falciparum* collectés chez les patients dans les sites de l'étude et d'autre part en la recherche des marqueurs moléculaires de résistance aux molécules associées à l'artémisinine au Mali comme la sulfadoxine-pyriméthamine, l'amodiaquine et luméfantine chez les mêmes isolats.

La présence concomitante des six (6) mutations constitutives du fond génétique de résistance à l'artémisinine chez le parasite a été toujours observée chez les parasites résistants à l'artémisinine présentant des mutations au niveau du gène Kelch13 [56]. Il s'agit de la mutation *Pfprps10_V127M*, la mutation *Pffid_D193Y*, la mutation *Pfmdr-2_T484I*, la mutation *Pfcrt_N326S* et la mutation *Pfcrt_I356T* [60]. L'étude des mutations constitutives de ce fond génétique de résistance constitue un précieux moyen de surveillance de l'émergence de la résistance à l'artémisinine en Afrique, bien qu'aucune résistance à l'artémisinine n'ait été rapportée en Afrique pour le moment. La recherche des résistances aux molécules partenaires à l'artémisinine permettra de procéder de façon judicieuse au choix des molécules à associer aux dérivés de l'artémisinine dans les différentes régions géographiques.

La majorité des patients inclus résidait à Dangassa, soit 79,2%. Le sexe féminin était prédominant à Dangassa avec 56,3%, contrairement à Nioro où le sexe masculin était majoritaire avec 73,2% (tableau I). L'étude a concerné les patients reçus en consultation pour paludisme dans les centres

de santé des deux localités. La grande représentativité des échantillons de Dangassa pourrait s'expliquer par le fait que c'est une zone d'endémie palustre et que la majorité des consultations dans cette zone était due au paludisme surtout au cours de la saison de transmission palustre. Cette même observation a été faite lors de l'enquête démographique et de santé en 2014 au Mali [61].

Nous avons également remarqué que les enfants étaient majoritaires à Dangassa et à Nioro du Sahel. Cette observation confirme la grande vulnérabilité des enfants au paludisme [62]. La moyenne parasitaire était similaire entre les deux villages avec $29342,771 \pm 31265,7184 \text{tf}/\mu\text{l}$ à Dangassa contre $23281,473 \pm 20015,8429 \text{tf}/\mu\text{l}$ à Nioro du Sahel ($p=0,17$, figure 6).

Dans l'ensemble, le taux moyen d'hémoglobine était significativement plus élevé à Nioro qu'à Dangassa ($p=0,03$, figure 7). Dans les zones d'endémie palustre comme Dangassa, le phénotype clinique dominant du paludisme est l'anémie. Les individus développent une certaine immunité qui arrive à maintenir la parasitémie à un seuil sans manifestation mais n'empêche pas l'infection palustre responsable de la destruction progressive du globule rouge provoquant ainsi l'anémie dans ces zones [60].

Au total, 270 patients ont été recrutés (214 à Dangassa et 56 à Nioro), dont 149 (113 à Dangassa et 36 à Nioro) ont été génotypés. Les mutations du fond génétique de résistance à l'artémisinine les plus répandues étaient le *Pfcrt_I356T* (46,4%) et le *Pfdd_D193Y* (4,3%) à Dangassa contre 51% et 9,4% à Nioro (Tableau II). Aucune mutation *Pfmdr-2_484I* et *Pfarp10_128Y* n'a été détectée à Nioro du Sahel. Toutes les mutations constitutives du fond génétiques ont été détectées à Dangassa ce qui peut paraître alarmant. En effet la forte intensité de la transmission du paludisme dans cette localité favorise l'accumulation de ces mutations chez les isolats. La présence concomitante des mutations suscitées a été décrite chez les parasites résistants à l'artémisinine en Asie [63]. Elle est désignée sous le nom de fond génétique de résistance à l'artémisinine. Ce fond ne procure pas la résistance en elle-même au parasite mais a été retrouvé chez les parasites résistants quel que soit leur origine géographique. Au cours de notre étude, nous n'avons pas retrouvé ce fond génétique chez les isolats de parasite même si toutes les mutations constitutives du fond sont présentes. La plus forte accumulation de mutations a été retrouvée chez un isolat de Dangassa et elle était de trois mutations sur les six (figure 8). L'intensité de la transmission du paludisme à Dangassa semble favoriser cette accumulation et augmenterait donc le risque d'émergence de la résistance dans cette zone.

Les marqueurs de résistance les plus répandus étaient ceux de la pyriméthamine (*Pfdhfr*_51I-59R-108N), de la luméfantrine (*Pfmdr-1*_184Y) et de l'amodiaquine (*Pfmdr-1*_86Y) avec respectivement 14%, 18,2% et 7% à Dangassa contre 19,6%, 25% et 5,4 à Nioro. Nos résultats paraissent inquiétants dans la mesure où la luméfantrine est la molécule la plus fréquemment associée au dérivé de l'artémisinine au Mali pour le traitement de l'accès palustre simple selon la recommandation du programme national de lutte contre le paludisme. Cette observation nécessite des investigations plus approfondies par rapport à l'efficacité de cette molécule sur les isolats de parasites dans nos zones d'étude. Aucun marqueur de résistance à la sulfadoxine (*Pfdhps*_437G,-540E) et à l'association sulfadoxine-pyriméthamine (*Pfdhps*_437G,-540E/ *Pfdhfr*_51I-59R-108N) n'a été détectée à Nioro du Sahel. Par contre, des proportions très faibles de ces marqueurs ont été retrouvées à Dangassa avec respectivement 1,9% et 0,5%. Nos résultats confirment les observations rapportées par Tékété et al en 2003 à Kollé [64] une localité située dans la même zone géographique que Dangassa sur l'autre rive du fleuve. Cela confirme l'efficacité de la SP dans les différentes zones au Mali. La SP est actuellement utilisée en traitement préventif intermittent chez les femmes enceintes et en chimio prévention saisonnière chez les enfants de moins de cinq ans. Cette stratégie maintient une forte pression sur ce médicament augmentant le risque de propagation de la résistance. Elle doit donc s'accompagner d'une surveillance accrue des parasites résistants à la SP. Une étude menée plus au sud du Mali dans la région de Sikasso avait l'état d'une augmentation de la prévalence des marqueurs de résistance à la pyriméthamine et à la sulfadoxine [65].

8. Limites de notre étude

Notre étude s'est intéressée particulièrement à déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine et aux molécules partenaires utilisées en CTA au Mali dans deux localités d'endémicité différente. Nous n'avons pas étudié les mécanismes pouvant expliquer la résistance mais aussi nous n'avons pas recherché d'autres facteurs associés à ces mutations en dehors des zones d'endémicité du paludisme. Nous avons été limités par la taille de l'échantillon à Nioro du Sahel malgré le caractère exhaustif de notre échantillonnage.

Il serait intéressant aussi d'étudier les facteurs pouvant être associés à cette mutation pour pouvoir prédire dans combien de temps la résistance va apparaître.

Une étude sur les mutations, au niveau du gène *PfKelch13* directement associées à la résistance à l'artémisinine pourra donner une plus grande visibilité sur ce phénomène au Mali.

9. Conclusion

Au terme de notre étude, nous avons constaté que les mutations *Pffd_D193Y* et *Pfcrt_I356T* sont les plus fréquemment rencontrées. La plus forte accumulation de mutations constitutives du fond génétique de résistance à l'artémisinine était de 3 mutations sur 6 retrouvées chez un isolat de parasite à Dangassa. Nous n'avons retrouvé aucun isolat de parasite arborant le fond génétique de résistance à l'artémisinine dans cette étude. Cependant, toutes les mutations constitutives du fond ont été retrouvées de façon séparée à Dangassa, ce qui représente un risque d'émergence de la résistance à l'artémisinine dans cette localité.

10. Recommandations

Au terme de notre étude et au vu de nos résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

Aux autorités sanitaires et administratives

- Encourager et financer d'avantage la recherche médicale afin d'adapter nos stratégies de lutte contre le paludisme aux réalités basées sur des évidences scientifiques

Aux chercheurs

- Continuer la surveillance de la résistance aux dérivés de l'artémisinine dans les zones d'endémie palustre afin de fournir des résultats fiables au PNLP pour une meilleure prise en charge des cas de paludisme au Mali
- Mener la recherche sur les facteurs associés à l'apparition de ces mutations afin de retarder leur émergence ;
- Approfondir les investigations sur les marqueurs moléculaires de résistance à la luméfántrine et son efficacité au Mali

A la population

- Accepter de participer aux protocoles de recherche afin de permettre aux chercheurs de tester les hypothèses de recherche pour trouver des solutions aux problèmes posés

11. Perspectives

Même si aucun cas de résistance aux dérivés de l'artémisinine n'a été observé au Mali, il serait intéressant de continuer à surveiller la résistance de ces dérivés de l'artémisinine et des autres médicaments antipaludiques pour un meilleur traitement du paludisme au Mali.

12. Références

1. Antony, H.A. and S.C. Parija, *Antimalarial drug resistance: An overview*. Trop Parasitol, 2016. **6**(1): p. 30-41.
2. OMS, *Rapport sur le paludisme dans le monde*. 2018.
3. Mali, *Enquête Démographique et de Santé*. 2012-2013.
4. Mali, *Enquête sur les Indicateurs du Paludisme*. 2015.
5. Ojurongbe, O., et al., *Rapid detection of Pfcrt and Pfmdr1 mutations in Plasmodium falciparum isolates by FRET and in vivo response to chloroquine among children from Osogbo, Nigeria*. Malar J, 2007. **6**: p. 41.
6. Wongsrichanalai, C., et al., *Epidemiology of drug-resistant malaria*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(4): p. 209-18.
7. Chou, E.S., et al., *A high parasite density environment induces transcriptional changes and cell death in Plasmodium falciparum blood stages*. FEBS J, 2018. **285**(5): p. 848-870.
8. White, N.J., *Qinghaosu (artemisinin): the price of success*. Science, 2008. **320**(5874): p. 330-4.
9. MALI, *Politique nationale de lutte contre le paludisme* 2004. 19.
10. Ariey, F., et al., *A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2014. **505**(7481): p. 50-5.
11. Denis, M.B., et al., *Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Cambodia*. Trop Med Int Health, 2006. **11**(9): p. 1360-6.
12. Ouji, M., et al., *Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies: A sword of Damocles in the path toward malaria elimination*. Parasite, 2018. **25**: p. 24.
13. White, N.J., et al., *Averting a malaria disaster*. Lancet, 1999. **353**(9168): p. 1965-7.
14. Clyde, D.F., N. Hlaing, and F. Tin, *Resistance to chloroquine of Plasmodium falciparum from Burma*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1972. **66**(2): p. 369-70.
15. Payne, D., *Spread of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum*. Parasitol Today, 1987. **3**(8): p. 241-6.
16. Wootton, J.C., et al., *Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in Plasmodium falciparum*. Nature, 2002. **418**(6895): p. 320-3.
17. Fogh, S., S. Jepsen, and P. Effersoe, *Chloroquine-resistant Plasmodium falciparum malaria in Kenya*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1979. **73**(2): p. 228-9.
18. S., M. *Plasmodium falciparum et résistance aux antipaludiques : Aperçu et conséquences des facteurs impliqués dans la sélection et la diffusion des parasites résistants*. 2017. 2017; Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01919157/document> (consulté le 01/08/2019).
19. Kremsner, P.G., et al., *In vitro drug sensitivity of Plasmodium falciparum in Acre, Brazil*. Bull World Health Organ, 1989. **67**(3): p. 289-93.
20. Lang, G., et al., *Antiplasmodial activities of sesquiterpene lactones from Eupatorium semialatum*. Z Naturforsch C, 2002. **57**(3-4): p. 282-6.
21. Maguire, J.D., et al., *Chloroquine or sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated, Plasmodium falciparum malaria during an epidemic in Central Java, Indonesia*. Ann Trop Med Parasitol, 2002. **96**(7): p. 655-68.

22. Seaton, D.R. and E.M. Lourie, *Acquired resistance to proguanil in Plasmodium vivax*. Lancet, 1949. **1**(6549): p. 394.
23. Covell, G., *Malaria Strains Resistant to 4-Amino-Quinoline Drugs*. Br Med J, 1965. **2**(5459): p. 478.
24. Davey, D.G. and G.I. Robertson, *Experiments with antimalarial drugs in man. VII. The suppressive effect of 50 MG. of chloroquine base daily in British troops exposed to infection with Plasmodium falciparum*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1957. **51**(6): p. 502-4.
25. Walker, A.J. and F.J. Lopez-Antunano, *Response to drugs of South American strains of Plasmodium falciparum*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1968. **62**(5): p. 654-67.
26. Bjorkman, A. and P.A. Phillips-Howard, *Drug-resistant malaria: mechanisms of development and inferences for malaria control*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1990. **84**(3): p. 323-4.
27. WHO. *Paludisme*. 2019; Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (consulté 01/08/2019).
28. White, N.J., T.T. Hien, and F.H. Nosten, *A Brief History of Qinghaosu*. Trends Parasitol, 2015. **31**(12): p. 607-610.
29. Noedl, H., et al., *Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia*. N Engl J Med, 2008. **359**(24): p. 2619-20.
30. Group, W.K.G.-P.S., *Association of mutations in the Plasmodium falciparum Kelch13 gene (Pf3D7_1343700) with parasite clearance rates after artemisinin-based treatments—a WWARN individual patient data meta-analysis*. BMC Med, 2019. **17**(1): p. 1.
31. Ashley, E.A., et al., *Spread of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria*. N Engl J Med, 2014. **371**(5): p. 411-23.
32. Das, D., et al., *Effect of high-dose or split-dose artesunate on parasite clearance in artemisinin-resistant falciparum malaria*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(5): p. e48-58.
33. Wang, X., et al., *Decreased prevalence of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter 76T marker associated with cessation of chloroquine use against P. falciparum malaria in Hainan, People's Republic of China*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **72**(4): p. 410-4.
34. Fidock, D.A., et al., *Allelic modifications of the cg2 and cg1 genes do not alter the chloroquine response of drug-resistant Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol, 2000. **110**(1): p. 1-10.
35. Grobusch, M.P., *Early rectal artesunate administration: a life-saver in remote areas?* Future Microbiol, 2009. **4**(4): p. 397-400.
36. van Es, H.H., et al., *Expression of the plasmodial pfmdr1 gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2419-28.
37. Sanchez, C.P., et al., *Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol, 2008. **70**(4): p. 786-98.
38. Ritchie, G.Y., et al., *In vitro selection of halofantrine resistance in Plasmodium falciparum is not associated with increased expression of Pgh1*. Mol Biochem Parasitol, 1996. **83**(1): p. 35-46.
39. Djimde, A.A., et al., *Efficacy, safety, and selection of molecular markers of drug resistance by two ACTs in Mali*. Am J Trop Med Hyg, 2008. **78**(3): p. 455-61.
40. Reed, M.B., et al., *Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in Plasmodium falciparum*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 906-9.

41. Lim, P., et al., *Pfmdr1* copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia. *Malar J*, 2009. **8**: p. 11.
42. Koenderink, J.B., et al., *The ABCs of multidrug resistance in malaria*. *Trends Parasitol*, 2010. **26**(9): p. 440-6.
43. Otienoburu, S.D., et al., *Selection of Plasmodium falciparum pfert and pfmdr1 polymorphisms after treatment with artesunate-amodiaquine fixed dose combination or artemether-lumefantrine in Liberia*. *Malar J*, 2016. **15**: p. 452.
44. Raj, D.K., et al., *Disruption of a Plasmodium falciparum multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(12): p. 7687-96.
45. Ndiaye, M., et al., *Selection of antimalarial drug resistance after intermittent preventive treatment of infants and children (IPTi/c) in Senegal*. *C R Biol*, 2013. **336**(5-6): p. 295-300.
46. Mishra, S., et al., *Clinical and molecular monitoring of Plasmodium falciparum resistance to antimalarial drug (artesunate+sulphadoxine-pyrimethamine) in two highly malarious district of Madhya Pradesh, Central India from 2012-2014*. *Pathog Glob Health*, 2017. **111**(4): p. 186-194.
47. Plowe, C.V., et al., *Mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance*. *J Infect Dis*, 1997. **176**(6): p. 1590-6.
48. Suarez, I., et al., *Low prevalence of DHFR and DHPS mutations in Pneumocystis jirovecii strains obtained from a German cohort*. *Infection*, 2017. **45**(3): p. 341-347.
49. Ma, Q., *Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013. **53**: p. 401-26.
50. Klonis, N., et al., *Altered temporal response of malaria parasites determines differential sensitivity to artemisinin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(13): p. 5157-62.
51. Tucker, M.S., et al., *Phenotypic and genotypic analysis of in vitro-selected artemisinin-resistant progeny of Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(1): p. 302-14.
52. Mok, S., et al., *Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum is associated with an altered temporal pattern of transcription*. *BMC Genomics*, 2011. **12**: p. 391.
53. Fairhurst, R.M., *Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes*. *Curr Opin Infect Dis*, 2015. **28**(5): p. 417-25.
54. Talundzic, E., et al., *Selection and spread of artemisinin-resistant alleles in Thailand prior to the global artemisinin resistance containment campaign*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(4): p. e1004789.
55. Straimer, J., et al., *Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in Plasmodium falciparum clinical isolates*. *Science*, 2015. **347**(6220): p. 428-31.
56. Miotto, O., et al., *Genetic architecture of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*, 2015. **47**(3): p. 226-34.
57. Zhang, L., et al., *Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(13): p. 5847-51.
58. Oyola, S.O., et al., *Whole genome sequencing of Plasmodium falciparum from dried blood spots using selective whole genome amplification*. *Malar J*, 2016. **15**(1): p. 597.
59. Manske, M., et al., *Analysis of Plasmodium falciparum diversity in natural infections by deep sequencing*. *Nature*, 2012. **487**(7407): p. 375-9.

60. Amaratunga, C., et al., *Plasmodium falciparum* founder populations in western Cambodia have reduced artemisinin sensitivity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**(8): p. 4935-7.
61. *Republique du Mali Enquete demographique et de Sante 2018.* 2018. **61**: p. 41.
62. S.Dioufa, et al., *Prévalence et déterminants de l'anémie chez le jeune enfant en Afrique francophone – Implication de la carence en fer.* 2015: p. 1188-1197.
63. He, Y., et al., *Artemisinin resistance-associated markers in Plasmodium falciparum parasites from the China-Myanmar border: predicted structural stability of K13 propeller variants detected in a low-prevalence area.* *PLoS One.* **14**(3): p. e0213686.
64. Tekete, M., et al., *Efficacy of chloroquine, amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria: revisiting molecular markers in an area of emerging AQ and SP resistance in Mali.* *Malar J,* 2009. **8**: p. 34.
65. Maiga, H., et al., *Seasonal Malaria Chemoprevention with Sulphadoxine-Pyrimethamine and Amodiaquine Selects Pfdhfr-dhps Quintuple Mutant Genotype in Mali.* *PLoS One,* 2016. **11**(9): p. e0162718.

13. Annexes

13.1. Fiche de consentement libre et volontaire pour la participation à une étude de recherche clinique

Nom du patient _____ Age (ans) _____ Numéro d'Identification dans l'étude (ID)

INFORMATIONS GÉNÉRALES

Nous vous invitons enfant à participer votre à une étude de recherche sur la santé intitulée « **Epidémiologie de la Génomique du Paludisme au Mali en vue du Développement de vaccine anti-palustre.** » Il est parrainé par l'Université des sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB). Cette étude a été expliquée aux autorités coutumières et sanitaires du village. Nous voudrions vous demander si vous voulez participer à cette étude. La participation à cette étude est entièrement volontaire et libre. Avant de vous décider de la participation d votre enfant à cette étude, s'il vous plaît prenez le temps nécessaire que vous avez besoin pour poser des questions, et discuter de cette étude avec quelqu'un au centre de santé ou de votre famille ou de vos amis.

BUT DE L'ETUDE

Le paludisme est une maladie causée par un très petit parasite qui peut entrer dans votre corps quand un moustique vous pique. Il peut causer de la fièvre et d'autres symptômes tels que des maux de tête et des courbatures, et s'il n'est pas traité, il peut rendre certains enfants très malades. Lorsque le paludisme est traité par un médicament efficace, il peut être guéri. Il n'existe pas pour le moment un vaccin efficace contre le paludisme et le parasite du paludisme développe des résistances aux médicaments efficaces contre cette maladie. Une meilleure connaissance des différentes populations génétiques du parasite responsable de la maladie peut aider à mieux comprendre les problèmes liés au développement du vaccin et à la résistance des parasites aux médicaments. Des variations génétiques chez les personnes infectées traitées pourraient aussi conditionner l'efficacité de certains médicaments chez certaines personnes. Le but de ce travail de recherche est de mener des investigations chez des personnes sur la diversité des substances produites par l'organisme et qui interviennent dans le mécanisme d'action des médicaments et

d'effectuer une analyse de génétique populationnelle des séquences de génome pour étudier la diversité de *P. falciparum*

IDENTIFICATION DE POPULATION

Nous mènerons cette étude dans le centre de santé de Nioro du sahel et de Kéniéroba, Mali. Nous prévoyons d'inclure un total de 1,400 personnes (enfants, adulte masculins et féminins) au cours des 3 ans que durera l'étude.

EXPLICATION DES PROCÉDURES

Nous demandons la participation de votre enfant à cette étude parce que le test rapide de diagnostic du paludisme fait chez s'est révélé positif. Si vous êtes d'accord pour permettre à votre enfant de participer à cette étude, nous prélèverons un échantillon de sang dont nous aurons besoin pour cette étude.

INCLUSION

Le médecin l'examinera et évaluera son poids, sa taille, sa fréquence cardiaque, sa pression artérielle et sa température. Le médecin demandera également à votre enfant des questions sur la façon dont il/elle se sent actuellement et sur ses antécédents médicaux, la prise d'antipaludiques ces dernières jours, et les allergies aux médicaments.

PRELEVEMENT DE SANG

Nous allons prendre environ 1 cuillère à café de sang de bras de votre enfant et quelques gouttes de sang de leur doigt. La goutte de sang prélevé au niveau des du doigt nous permettra de confirmer le diagnostic du paludisme par la technique microscopique de goutte épaisse. Et le prélèvement sanguin veineux sera centrifugé pour séparer le plasma du culot. Le plasma sera utilisé pour rechercher des facteurs pouvant influencer les manifestations cliniques du paludisme. Et le culot contenant les globules rouge parasités sera utilisé pour extraire l'ADN de ses parasites dont l'étude nous permettra de les classer en population parasitaire. Nous utiliserons aussi les globules blancs contenu dans le culot pour extraire l'ADN humain qui nous sera utile pour étudier les facteurs génétiques pouvant influencer les manifestations de la maladie ainsi que l'action des médicaments sur les parasites.

TRAITEMENT ANTIPALUDIQUE

Le traitement sera décidé par le médecin en fonction des informations récoltées au cours de la consultation. Nous prendrons en charge les médicaments destinés à tuer le parasite du paludisme et les autres médicaments nécessaires au traitement de votre enfant dans la mesure de notre possibilité.

ALTERNATIVE À LA PARTICIPATION

L'alternative à la participation à cette étude est de ne pas participer. Si votre enfant a le paludisme, nous prendrons en charge son traitement de la même façon que vous décideriez oui ou non qu'il participe à l'étude

UTILISATION DU SANG CONSERVE

Nous stockerons une partie du sang que nous recueillons au cas où il existe des tests supplémentaires que nous souhaiterons réaliser dans l'avenir. Ces échantillons stockés ne seront utilisés que pour les études liées au paludisme, seront envoyés à l'étranger au Royaume Uni pour l'étude et seront partagés avec les chercheurs collaborateurs. Les résultats de ces tests de recherche ne seront pas mis dans votre dossier médical, car ils ne sont pas comme les tests médicaux de routine. Les échantillons seront étiquetés avec un code et ne seront accessibles que par le personnel de l'étude. En participant à cette étude, vous convenez que le sang de votre enfant soit stocké. A tout moment dans le futur, vous pouvez communiquer avec le personnel de l'étude ou le Dr Seidina Diakité (téléphone 79 09 63 96) à l'USTTB pour demande le retrait et la destruction des échantillons de votre enfant.

EXPLICATIONS DES RISQUES/DÉSAGRÉMENTS

Les risques associés à cette étude sont minimes, même s'il peut y avoir des risques imprévisibles. Le prélèvement sanguin ou la piqûre au bout du doigt peut causer de l'inconfort, des saignements ou des ecchymoses occasionnels sur le site; rarement, un évanouissement ou une infection peut se produire. Nous nettoierons votre bras ou votre doigt avant de prendre le sang et utiliserons du matériel stérile à usage unique. Le cathéter peut causer de l'inconfort lors de l'insertion et peut causer une ecchymose ou d'infection de faible gravité.

Cette étude n'apportera pas de risque supplémentaire par rapport au traitement car nous n'influons pas sur choix des molécules prescrite.

EXPLICATION DES AVANTAGES POTENTIELS

Votre enfant peut ne recevoir aucun avantage individuel en participant à cette étude, mais nous acquerrions des connaissances qui peuvent aider les autres. Il n'y aura absolument aucun frais pour vous à permettre à votre enfant de participer à cette étude.

DESCRIPTION DE LA COMPENSATION

Nous vous donnerons 1.000 FCFA pour le désagrément (temps perdu) de venir à la clinique pour être traité pour votre paludisme. Pour la compensation du prélèvement sanguin veineux, nous donnerons un kilo de sucre soit 500 FCFA.

DÉCLARATION QUE NOUVEAUX RESULTATS SERONT DISCUTES

Les résultats de cette étude peuvent être présentés lors de réunions ou dans des revues médicales, mais le nom de votre enfant ne sera pas utilisé dans le rapport. Les informations spécifiques que nous apprenons au sujet de votre enfant ne seront pas partagées qu'avec les investigateurs de l'étude.

CONFLIT D'INTÉRÊT

Les investigateurs de ce protocole de recherche sont tenus de respecter les principes du Guide d'examen du Protocole, mais ne sont pas tenus de déclarer leurs avoirs financiers personnels.

LISTE DES CONTACTS

Si vous avez des questions ou des inquiétudes concernant votre participation à cette étude, maintenant ou à une date ultérieure, n'hésitez pas à vous adresser à notre personnel de votre centre de santé ou de transmettre un message au Dr Seidina A. S DIAKITE (téléphone : 79 09 63 96) ou au Professeur Mahamadou DIAKITE (téléphone. 76 23 11 91) tous deux à l'université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako. Vous pouvez également contacter le président du comité d'éthique de la FMPOS, à savoir le Professeur Mamadou Marouf KEITA à la Faculté de Médecine et d'odontostomatologie (téléphone 66 72 20 22).

Merci d'envisager que votre enfant participe à cette étude. S'il vous plaît répondez à la question ci-dessous et apposez votre signature ou empreinte digitale sur la fiche de consentement.

Êtes-vous d'accord pour que votre enfant participe à cette étude (Etude de la génomique du paludisme au Mali)?

Oui

Non

Empreinte - ou - Signature Date
digitale

Nom complet Lien de parenté Âge

Signature de l'investigateur Date

Témoin Date

13.2. Fiche d'assentiment libre et volontaire pour la participation à une étude de recherche clinique

Nom du patient _____ Age (ans) _____ Numéro d'Identification dans l'étude (ID)

INFORMATIONS GÉNÉRALES

Nous vous invitons à participer à une étude de recherche sur la santé intitulée «**Epidémiologie de la Génomique du Paludisme au Mali en vue du Développement de vaccine anti-palustre.**» Il est parrainé par l'Université des sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB). Cette étude a été expliquée aux autorités coutumières et sanitaires du village. Nous voudrions vous demander si vous voulez participer à cette étude. La participation à cette étude est entièrement volontaire et libre. Avant de vous décider à participer à cette étude, s'il vous plaît prenez le temps nécessaire que vous avez besoin pour poser des questions, et discuter de cette étude avec quelqu'un au centre de santé ou de votre famille ou de vos amis.

BUT DE L'ETUDE

Le paludisme est une maladie causée par un très petit parasite qui peut entrer dans votre corps quand un moustique vous pique. Il peut causer de la fièvre et d'autres symptômes tels que des maux de tête et des courbatures, et s'il n'est pas traité, il peut rendre certains enfants très malades. Lorsque le paludisme est traité par un médicament efficace, il peut être guéri. Il n'existe pas pour le moment un vaccin efficace contre le paludisme et le parasite du paludisme développe des résistances aux médicaments efficaces contre cette maladie. Une meilleure connaissance des différentes populations génétiques du parasite responsable de la maladie peut aider à mieux comprendre les problèmes liés au développement du vaccin et à la résistance des parasites aux médicaments. Des variations génétiques chez les personnes infectées traitées pourraient aussi conditionner l'efficacité de certains médicaments chez certaines personnes. Le but de ce travail de recherche est de mener des investigations chez des personnes sur la diversité des substances produites par l'organisme et qui interviennent dans le mécanisme d'action des médicaments et d'effectuer une analyse de génétique populationnelle des séquences de génome pour étudier la diversité de *P. falciparum*

IDENTIFICATION DE POPULATION

Nous mènerons cette étude dans le centre de santé de Nioro du sahel et de Dangassa, Mali. Nous prévoyons d'inclure un total de 1.400 personnes (enfants, adulte masculins et féminins) au cours des 3 ans que durera l'étude.

EXPLICATION DES PROCÉDURES

Nous vous demandons de participer à cette étude soit parce que votre test rapide de diagnostic du paludisme s'est révélé positif, soit parce que vous répondez au critère d'inclusion dans notre étude. Si vous êtes d'accord pour participer à cette étude, nous vous prélèverons un échantillon de sang dont nous aurons besoin pour cette étude.

INCLUSION

Le médecin vous examinera et évaluera votre poids, votre taille, votre fréquence cardiaque, votre pression artérielle et votre température. Le médecin vous demandera également des questions sur état de santé actuel et sur ses antécédents médicaux, la prise d'antipaludiques ces dernières jours, et les allergies aux médicaments.

PRELEVEMENT DE SANG

Nous allons prendre environ 1 à 2 cuillère à café de sang de votre bras et quelques gouttes de sang du bout de votre doigt. La goutte de sang prélevé au niveau des du doigt nous permettra de confirmer le diagnostic du paludisme par la technique microscopique de goutte épaisse. Et le prélèvement sanguin veineux sera centrifugé pour séparer le plasma du culot. Le plasma sera utilisé pour rechercher des facteurs pouvant influencer les manifestations cliniques du paludisme. Et le culot contenant les globules rouge parasités sera utilisé pour extraire l'ADN de ses parasites dont l'étude nous permettra de les classer en population parasitaire. Nous utiliserons aussi les globules blancs contenu dans le culot pour extraire l'ADN humain qui nous sera utile pour étudier les facteurs génétique pouvant influencer les manifestations de la maladie ainsi que l'action des médicaments sur les parasites.

TRAITEMENT ANTIPALUDIQUE

Si vous avez le paludisme, le traitement sera décidé par le médecin en fonction des informations récoltées au cours de la consultation. Nous prendrons en charge les médicaments destinés à tuer le parasite du paludisme et les autres médicaments nécessaire à votre traitement dans la mesure de notre possibilité.

ALTERNATIVE À LA PARTICIPATION

L'alternative à la participation à cette étude est de ne pas participer. Dans ce cas Si vous avez le paludisme, nous prendrons en charge votre traitement de la même façon que vous décidiez oui ou non de participer à l'étude

UTILISATION DU SANG CONSERVE

Nous garderons une partie du sang que nous recueillons au cas où il existe des tests supplémentaires que nous souhaiterons réaliser dans l'avenir. Ces échantillons gardés ne seront utilisés que pour les études liées au paludisme. Ils pourront être envoyés à l'étranger au Royaume Uni pour l'étude et seront partagés avec les chercheurs collaborateurs. Les résultats de ces tests de recherche ne seront pas mis dans votre dossier médical, car ils ne sont pas comme les tests médicaux de routine. Les échantillons seront étiquetés avec un code et ne seront accessibles que par le personnel de l'étude. En participant à cette étude, vous convenez que votre sang soit stocké. A tout moment dans le futur, vous pouvez communiquer avec le personnel de l'étude ou le Dr Seidina Diakité (téléphone 79 09 63 96) à l'USTTB pour demande le retrait et la destruction des échantillons de votre enfant.

EXPLICATIONS DES RISQUES/DÉSAGRÉMENTS

Les risques associés à cette étude sont minimes, même si il peut y avoir des risques imprévisibles. Le prélèvement sanguin ou la piqûre au bout du doigt peut causer de l'inconfort, des saignements ou des ecchymoses occasionnels sur le site; rarement, un évanouissement ou une infection peut se produire. Nous nettoierons votre bras ou votre doigt avant de prendre le sang et utiliserons du matériel stérile à usage unique. Le cathéter peut causer de l'inconfort lors de l'insertion et peut causer une ecchymose ou d'infection de faible gravité.

Cette étude n'apportera pas de risque supplémentaire par rapport au traitement car nous n''influérons pas sur choix des molécules prescrite.

EXPLICATION DES AVANTAGES POTENTIELS

Votre enfant peut ne recevoir aucun avantage individuel en participant à cette étude, mais nous acquerriens des connaissances qui peuvent aider les autres. Il n'y aura absolument aucun frais pour vous à permettre à votre enfant de participer à cette étude.

DESCRIPTION DE LA COMPENSATION

Nous vous donnerons 1.000 FCFA pour le désagrément (temps perdu) de venir à la clinique pour être traité pour votre paludisme. Pour la compensation du prélèvement sanguin veineux, nous donnerons un kilo de sucre soit 500 FCFA.

DÉCLARATION QUE NOUVEAUX RESULTATS SERONT DISCUTES

Les résultats de cette étude peuvent être présentés lors de réunions ou dans des revues médicales, mais le nom de votre enfant ne sera pas utilisé dans le rapport. Les informations spécifiques que nous apprenons au sujet de votre enfant ne seront pas partagées qu'avec les investigateurs de l'étude.

CONFLIT D'INTÉRÊT

Les investigateurs de ce protocole de recherche sont tenus de respecter les principes du Guide d'examen du Protocole, mais ne sont pas tenus de déclarer leurs avoirs financiers personnels.

LISTE DES CONTACTS

Si vous avez des questions ou des inquiétudes concernant votre participation à cette étude, maintenant ou à une date ultérieure, n'hésitez pas à vous adresser à notre personnel de votre centre de santé ou de transmettre un message au Dr Seidina A. S DIAKITE (téléphone : 79 09 63 96) ou au Professeur Mahamadou DIAKITE (téléphone. 76 23 11 91) tous deux à l'université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako. Vous pouvez également contacter le président du comité d'éthique de la FMPOS, à savoir le Professeur Mamadou Marouf KEITA à la Faculté de Médecine et d'odontostomatologie (téléphone 66 72 20 22).

Merci d'envisager de participer à cette étude. S'il vous plaît répondez à la question ci-dessous et apposez votre signature ou empreinte digitale sur la fiche de assentiment.

Êtes-vous d'accord pour participer à cette étude (Etude de la génomique du paludisme au Mali)?

Oui

Non

Empreinte - ou - Signature Date
digitale

Nom complet

Âge

Signature de l'investigateur

Date

Signature du Témoin

Date

INFORMATION GENERALE

A.1. Date : |_|_|-|_|_|-|_|_|

A.2. Site d'étude : |_| 1= Nioro du Sahel, 2= Dangassa

A.3. Numéro d'identification à l'étude |M|L|_|-|_|_|_|_|

DONNEES DEMOGRAPHIQUES

B.1. Age : |_|_| ans

B.2. Sexe : |_| 1= M, 2=F

B.3. Ethnie : 1-Malinké 2-Bambara 3-Peulh 4-Maure 5-Sarakolé
6-Bozo/Somono 7-Dogon 8-Inconnue 9-Autre à préciser : _____**EXAMEN CLINIQUE**

C.1. Fièvre dans les dernières 24 heures?

1-Oui, 2-Non

C.2. Utilisation de MII la nuit dernière?

1-Oui, 2-Non

C.3. Traitement antipaludique dans les 15 derniers jours ?

1-Oui, 2-NonC.3.1. Si Oui, médicament antipaludique utilisé : _____

C.4. CPS effectué dans les 30 derniers jours ?

1-Oui, 2-Non, 3-NA

C.5. Pâleur conjonctivale ?

1-Oui, 2-NonC.6. Température axillaire :
|_|_|.|_| °C

C.7. Poids |_|_|_|_|.|_| kg

C.8. Rate |_||Stade de Hackett

C.9. Paludisme simple C.10. Paludisme grave

Si Paludisme grave, critère(s) de gravité : _____

COLLECTE DES ECHANTILLONS

D.1. TDR réalisé? 1- <input type="checkbox"/> Oui, 2- <input type="checkbox"/> Non	D.1.1. Si oui résultat : 1- <input type="checkbox"/> Positif, 2- <input type="checkbox"/> Négatif
D.2. GE réalisée? 1- <input type="checkbox"/> Oui, 2- <input type="checkbox"/> Non	D.2.1. Si oui Parasitémie : _ _ _ _ _ _ _ _ Pf. / μ l D.2.2. Si présence de Gamétocytes, nombre : _ _ _ _ _
D.3. Confetti réalisé ? 1- <input type="checkbox"/> Oui, 2- <input type="checkbox"/> Non	
D.4. Taux d'Hb mesuré ? 1- <input type="checkbox"/> Oui, 2- <input type="checkbox"/> Non	D.4.1. Si oui la valeur : _ _ _ _ _ _ _ _ g/d
D.5. Prélèvement veineux effectué ? 1- <input type="checkbox"/> Oui, 2- <input type="checkbox"/> Non	
D.6. Groupage sanguin effectué 1- <input type="checkbox"/> Oui, 2- <input type="checkbox"/> Non	D.6.1. Groupe sanguin: _ _ _ _ _ D.6.2. Rhésus : _ _ _ _ _