

Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique



U.S.T.T-B

Université des Sciences,
des Techniques et des
Technologies de Bamako
(USTTB)

République du Mali

Un Peuple - Un But - Une Foi



Faculté de Médecine
et d'Odontostomatologie
(FMOS)

Thèse de Docteur en Médecine

Année universitaire 2019-2020

N°.....

TITRE :

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

Thèse

**Présentée et soutenue publiquement le 14/11/2020
devant la faculté de Médecine et d'odontostomatologie**

Par M. Cheick Oumar TRAORE

Pour l'obtention du titre de Docteur en Médecine **(Diplôme d'Etat)**

Jury :

Président : Pr Abdoulaye A. DJIMDE

Membres : Dr Idrissa CISSE

Dr Mohamed AG BARAIKA

Co-Directeur : Dr Seidina A.S DIAKITE

Directeur : Pr Mahamadou DIAKITE

DEDICACES

Je dédie ce travail de thèse à

A mon père Mamadou Konzo TRAORE qui m'a comblé de tout ce qu'un enfant peut souhaiter de son père : éducation, amour, amitié, conseils et tout, tu m'as soutenu et réconforté dans les moments difficiles. Ma réussite a toujours été ta priorité et aujourd'hui grâce à toi j'ai pu relever le défi, je te serais reconnaissant durant toute ma vie ; tu es un père exemplaire que tous enfants rêvent d'avoir. Je prie Dieu de te donner une longue vie afin de continuer à veiller sur moi et mes futures enfants.

A ma mère Koura KONE ; grâce à qui je respire aujourd'hui, je te dois toute ma vie, tu as été là, tu es là et tu seras toujours là pour moi. Merci de me faire croire que je peux, quel que soit la situation ; tu m'as inculqué l'importance du respect, du pardon, de la dignité, de l'honnêteté et de la bravoure. Tu as fait de moi un homme de caractère, chère Mère, la femme battante que j'ai vu en toi depuis l'enfance n'a jamais cessé de fonctionner. Tu demeures une fierté pour moi. Qu'Allah te garde le plus longtemps possible auprès de moi enfin que je profite de cette Maman en Or car tu es très précieuse pour moi.

Chers parents sachez que je me battrais quotidiennement pour être votre plus grande fierté, je vous aime.

REMERCIEMENTS

Au terme de mes études de Médecine dans cette prestigieuse faculté de Médecine et d'odontostomatologie, je tiens à remercier tous ceux qui ont cru en moi, m'ont aidé et soutenu pour que ce jour soit.

Mes remerciements vont à l'endroit de :

Allah Soubhana Wa t'Allah le tout Puissant, le Très clément, le très Miséricordieux,

Louange à Allah, Qui m'a donné la chance de voir ce jour en bonne santé et Qui m'a accordé l'énergie, l'inspiration et surtout la base spirituelle nécessaire. C'est de Toi que nous venons et c'est auprès de Toi que nous implorons l'assistance, sans Toi je n'en serai pas là aujourd'hui, je Te dédie ce travail et Te prie de m'accorder Ta grâce durant toute ma carrière. Guide-moi vers le droit chemin. Amen ! Bénédiction et salut sur le **Prophète Muhammad (Paix et Salut sur Lui)**, Sceau des Prophètes, pour son message clair et précis.

Ma Tante Kadiatou DOUMBIA, qui a occupé une grande place dans ma vie, je suis aujourd'hui le Cheick Oumar que tu as modelé ; tu m'as appris à être un homme battant. Si je dois donner un prix de récompense de Mère, tu seras mon heureuse gagnante ; merci énormément pour ton éducation qui me servira tout au long de mon existence. Je ferais tout pour te rendre fier de moi.

Mes deux frères et amis Dr Siriman SACKO et Dr Yaya DOUMBIA

Il est clair que je crois en la génétique et au lien du sang mais je crois également qu'un ami peut devenir un frère plus qu'un frère biologique. Vous n'avez jamais cessé de me surprendre par vos nombreuses qualités humaines, les mots me manquent aujourd'hui pour exprimer toute ma gratitude à vos égards. Je dirai tout simplement MERCI à la vie de vous avoir mis sur mon chemin. Ce travail est le vôtre.

A toutes mes Tantes

Fanta KONE, Baissa KONE, Adja KONE, Fatoumata KONE, Ramata DOUMBIA, Batoma KONE, Inna KONE, Nènè KANE, merci pour votre amour, votre confiance et soutien que vous m'avez apporté tout au long de mes études.

A mes Tontons et Oncles

Konzo TRAORE, Abdoulaye KONE, Adama KONE, Dramane KONE, Yacouba KONE, Solomane KONE, Lassine DANTE, Fassama TRAORE, Sekou TRAORE, un grand merci pour tous vos encouragements et accompagnements durant mes études, je vous serai reconnaissant, que Dieu vous protège tous.

A mon Tonton Badjigui TRAORE et ma Tante Fata DOUMANGOUROU,

Merci pour tout le soutien sans condition, vous m'avez aidé à apporter ma pierre à l'édifice et jamais je n'oublierais, Qu'Allah vous récompense.

Mes frères, sœurs, cousins et cousines

Modibo TRAORE, Yaya TRAORE, Zoumana TRAORE, Yacouba COULIBALY, Mamadou TOGOLA, Alou DOUMBIA, Feu Oumou TRAORE, M'ban TRAORE, Penda CAMARA, Aicha SIDIBE, Fatoumata TRAORE, Massaran TRAORE, Al-housna RHISSA, Mamadou KONE, Daouda k TRAORE, Fatoumata Siré SANGARE, Maimouna KONE, Lalla COULIBALY, Vous m'avez toujours soutenu avec vos conseils et votre affection. Vous avez été un modèle pour ma réussite, je manque de mot pour votre amour et votre gratuite. Que le Tout Puissant vous assiste en toutes circonstances. Amen

A mes amis

Drissa DIALLO, Salif DEMBELE, Amara OUATTARA, Seydou COULIBALY, Sidy K SANOGO, Sanata CAMARA, Modibo DIARRA, Abdoulaye D MAIGA, Matou N'diaye, Mohamed CISSE, Baba OUATTARA, Salif L MARIKO, Mohamed TRAORE, Toumani KEITA, Lassine KAMISSOKO, Fousseyni KAMISSOKO, Aissata DIA, Awa DIOMBERA, Gaoussou TRAORE, Hamed KONATE, Araba TRAORE, Oumy, Binta DIAKITE, Seydou DOUMBIA, Hamidou SALL, Adama KONATE, Ce travail est le fruit de votre accompagnement durant lequel vos conseils

et soutiens ne m'ont jamais manqué. Qu'Allah vous assiste en tout lieu et en toute circonstance. Amen.

A mon cher ami feu Demba BOCOUM, je te dois ce travail, toute ta vie tu étais si fier de me voir devenir médecin et grâce à toi ma vie beaucoup change, je te serais reconnaissant à vie mon frère ; même si aujourd'hui tu n'es pas là pour me prendre dans tes bras et me féliciter de la graduation je sais que déjà très fier de moi et à jamais tu resteras dans mon cœur mon frère ami, repose-toi en paix

Mes aînés Dr Josseph DAKOUE, Dr Mariam TOURE, Dr Abdoulaye DIARRA (IVO), Dr Dieudonné, Dr Bourama Keita vous êtes pour moi des exemples à suivre, les mots me manquent pour vous qualifier, MERCI pour tous !!

Tout le personnel du Labo Immunogénétique du point g

Pr Mahamadou DIAKITE, Dr Sory I. Diawara, Dr Seidina DIAKITE, Dr Karim TRAORE, Dr Drissa KONATE, Dr Mody DOUMBIA, Dr Bourama KEITA, Dr Fatoumata KASSE, Dr Nouhoum KONE, Dr Zamilou, Dr DOUCOURE, Mme Ami PLEA, Mr Bakaina DIARRA, Mlle Larissa DENOU, Mlle Kadidia KONE, Mr Job KONE, Mr Fayçal MAHAMADOU, Mlle Salimata KANTE, Mlle Assitan DEMBELE, Mr Abdourahmane TRAORE, Mlle Maya, Mr Abdramane CISSE, merci pour votre entière disponibilité, votre collaboration et votre enseignement dont je continue de bénéficier à présent.

Tout le personnel du Csref de kalaban koro

Dr Sirantou SIMPARA, Dr FAMANTA, Dr DIANE, Dr KEITA, Dr KABA, Dr MAIGA, Mr Sekou, Mr Vincent, Mr Gouro, Mr Sidy K SANOGO, merci pour votre enseignement et votre collaboration.

Le groupe BATISSEURS, les associations ADERS, AENSA, AMERS, UNESCO, merci pour ces moments de fraternité et d'amitié partagés, je suis fier d'être un de vous.

A tous mes camarades de la dixième promotion du numerus clausus

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE JURY

Professeur Abdoulaye A. DJIMDE

- ✓ Professeur titulaire en Parasitologie-Mycologie à la FAPH ;
- ✓ Directeur du MRTC Parasitologie
- ✓ Chef de l'unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance (MEDRU/MRTC)
- ✓ Directeur du programme DELGEME
- ✓ Membre de l'académie Africaine des sciences

Cher maître,

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de présider ce jury malgré vos multiples occupations, prouve votre amour pour la science.

Votre rigueur scientifique, votre sens du travail bien fait font de vous un maître admiré et respecté

Quel honneur pour nous de vous avoir comme Président de notre Jury.

Que Dieu vous comble de grâces.

A NOTRE MAITRE ET MEMBRE DE JURY

Docteur Idrissa CISSE

- ✓ Docteur en Médecine
- ✓ Spécialiste en Santé Publique
- ✓ Directeur du Programme National de Lutte contre le Paludisme

Cher maître

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

La qualité de votre contribution fut précieuse et inestimable pour parfaire ce travail.

Trouver ici, cher maître, l'expression de notre profonde reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET MEMBRE DE JURY

Docteur Mohamed AG BARAIKA

- ✓ Pharmacien microbiologiste
- ✓ PhD en science biomédicale spécialité infectiologie tropicale
- ✓ Maître-assistant en Bactério-virologie
- ✓ Enseignant chercheur au CRLD (Centre de Recherche et de la Lutte contre la Drépanocytose)

Cher maître

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Votre désir profond de valoriser la profession fait de vous un homme respectable.

Trouver ici, cher maître, l'expression de notre profonde reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR

Docteur Séidina A.S. DIAKITE

- ✓ Docteur en pharmacie ;
- ✓ PhD en Immunologie USTTB/UMPC Paris 6 ;
- ✓ Maître-assistant d'immunologie a la FAPH ;
- ✓ Chercheurs à l'unité Immunogénétique MRTC.

Tout au long de ce travail, nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques.

Votre disponibilité constante et votre amour pour le travail bien fait font de vous un maître respectable. Permettez-nous cher maître de vous adresser l'expression de notre immense gratitude et de notre sincère remerciement.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

Professeur Mahamadou DIAKITE

- PhD en Immunogénétique à l'Université d'Oxford
- Professeur Titulaire d'Immunologie et de génétique
- Responsable du Laboratoire Immunogénétique et Parasitologie (MRTC)
- Vice-recteur de l'USTTB
- Directeur Scientifique Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique
- Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique de la (FMOS/FAPH)

Cher maître,

Vous nous avez fait un immense honneur en nous acceptant dans votre équipe de recherche médicale. Tout au long de ce travail nous avons apprécié vos grandes qualités scientifiques et humaines, vos enseignements et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail font de vous un exemple à suivre. Cher Maître veuillez recevoir en toute modestie l'expression de notre immense gratitude.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

°C	Degré celcus
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ALM	Artémether-Luméfantrine
AQ	Amodiaquine
ARN	Acide ribonucléique
ART	Artémisinine
AS	Artésunate
ATM	Artemether
ATP	Adénosine Triphosphate
CQ	Chloroquine
CRF	Case report form (formulaire de report des cas)
<i>Crt</i>	<i>Chloroquine résistance transporter</i>
Cscom	Centre de santé communautaire
CSP	Circumsporozoite Surface Protéin
CTA	Combinaison thérapeutique à base d'Artémisinine
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DHA	Dihydroartémisinine
DHA-PQ	Dihydroartémisinine-Piperaquine
DHFR	Dihydrofolate réductase
DHPS	Dihydroptéroate
dl	Décilitre
EDSM	Enquête Démographique et de Santé du Mali
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
FM	Frottis Mince
FMOS	Faculté de médecine et d'odontostomatologie
FNT	Facteur de nécrose Tumorale
g	Gramme
G6PD	Glucose-6-phosphate-dehydrogenase
GE	Goutte Epaisse
GIS	Géographie information système (système d'information géographique)
GR	Globule Rouge
Hb	Hémoglobine

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

HRP2	Histidine rich protein 2
IFN- γ	Interféron-gamma
IgG	Immunoglobine de type G
IgM	Immunoglobine de type M
IL-10	Interleukine-10
Km	Kilomètre
Km ²	Kilomètre carré
LDH	Lactate Déshydrogénase
LMF	Lumefantrine
LSHTM	London School of Hygiene & Tropical Medicine
MALDI-	
TOF	Matrix Assisted Laser Désorption Ionisation Time of Flight
MHC	Système Majeur d'Histocompatibilité
MQ	Méfloquine
MRTC	Malaria Research and training center (centre de recherche et de formation sur le paludisme)
MSP	Protéine de Surface des Mérozoïtes
MVP	Membrane de la Vacuole Parasitophore
Nrf2	Nuclear Respiratory Factor 2 (Facteur respiratoire nucléaire 2)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymérase Chain Réaction
<i>Pfarp10</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Apicoplast Ribosomal protein S10
<i>Pfcrt</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
<i>Pfcyt b</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> cytochrome b
<i>Pfdhfr</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase
<i>Pfdhps</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydropteroase synthetase
<i>Pfemp</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte protéin
<i>Pfexo</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> exonuclease
<i>Pffd</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Ferrédoxin
<i>Pfk13</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> domaine propeller kelch 13
<i>Pfmdr</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Multi-Drug Resistance
<i>Pfnhe</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Na ⁺ /H ⁺ exchanger
<i>Pgh1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> glycoprotéine homologue 1

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

PNLP	Programme Nationale de lutte contre le Paludisme
PQ	Pipéraquline
PYR	Pyriméthamine
RN	Route Nationale
SNP	Single nucléotide polymorphisme
SOP	Standard operating procédures (Procédure standard opératoires)
SP	Sulfadoxine-pyriméthamine
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TPI	Traitement préventif intermittent
UK	United Kingdom (Royaume Uni)
USTTB	Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WACCBIP	West African Center for Cell Biology of Infectious Pathogens
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
μ l	Microlitre

TABLE DES MATIERES

DEDICACES ET REMERCIMENTS	Erreur ! Signet non défini.
DEDICACES	i
REMERCIEMENTS	ii
HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY	Erreur ! Signet non défini.
Liste des tableaux	xvi
Liste des figures	xvi
1. Introduction	1
2. Objectifs	4
2.1. Objectif général	4
2.2. Objectifs spécifiques	4
3. Généralités	5
3.1. Paludisme à <i>P. falciparum</i>	5
3.1.1. Particularités biologiques de <i>P. falciparum</i>	5
3.1.2. Taxonomie et classification	6
3.1.3. Epidémiologie de l'infection palustre	6
3.1.4. Clinique et pathophysiologie de l'infection à <i>P. falciparum</i>	7
3.1.5. Diagnostic de l'infection à <i>P. falciparum</i>	8
3.1.6. Traitement et prévention de l'infection à <i>P. falciparum</i>	11
3.1.7. Résistance aux antipaludiques	21
3.2. Outils disponibles pour l'étude de la sensibilité aux antipaludiques (Tests d'efficacité thérapeutiques)	22
3.2.1. Tests <i>ex-vivo</i> et <i>in-vitro</i>	22
3.2.2. Marqueurs moléculaires de résistance	22
4. Méthodologie	29
4.1. Cadre et lieu d'étude	29
4.1.1. Village de Dangassa	29
4.1.2. Nioro du Sahel	29
4.2. Type et période d'étude	31
4.3. Population d'étude	31
4.4. Echantillonnage	32
4.5. Critères d'inclusion et de non-inclusion	32
4.5.1. Critères d'inclusion	32

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

4.5.2. Critères de non-inclusion.....	32
4.6. Variables mesurées.....	32
4.7. Définitions opérationnelles.....	33
4.8. Techniques de laboratoire utilisées.....	34
4.9. Génotypage des marqueurs moléculaires de résistance.....	34
4.10. Déroulement et procédures d'étude.....	34
4.11. Collecte, gestion et analyse des données.....	35
4.12. Considérations éthiques.....	35
5. Résultats.....	37
5.1. Résultats globaux.....	37
5.2. Données sociodémographiques et cliniques.....	37
5.3. Analyse moléculaire des marqueurs de résistance aux antipaludiques.....	40
5.4. Résultats descriptifs.....	43
6. Commentaires et discussion.....	48
6.1. Choix et caractéristiques des sites d'étude.....	48
6.2. Étude des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques.....	49
6.2.1. Résistance à la chloroquine et autres amino-quinoléines.....	50
6.2.2. Retour de la sensibilité à la chloroquine observé en Afrique.....	51
6.3. Résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine.....	52
6.4. Maintien de la résistance à la SP en Afrique.....	54
6.5. Résistance aux dérivés de l'artémisinine.....	54
6.6. Résistance de <i>P. falciparum</i> aux dérivés de l'artémisinine en Afrique.....	55
6.7. Comparaison de la résistance de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques en Afrique et en Asie.....	56
6.8. Devenir des anciens antipaludiques de première ligne en Afrique.....	58
7. Conclusion et recommandations.....	60
7.1. Conclusion.....	60
7.2. Recommandations.....	61
9. Références bibliographiques.....	62
10. Annexes.....	73

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

10.1. Procédures standard opératoires (SOP) de la goutte épaisse	73
10.2. Procédures standard opératoires (SOP) du frottis mince (FM).....	74
11.2. Procédures Standard Opérateur (SOP) : Confection du confetti (papier filtre).....	77
10.3. Détermination du taux d'hémoglobine	79
10.4. Techniques et outils de collecte des données	81
11. Fiche signalétique	82
12. Summary	84
13. Serment d'Hippocrate.....	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Gènes impliqués dans la chimiorésistance de <i>P. falciparum</i>	26
Tableau 2 : Marqueurs moléculaires de résistance de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques	27
Tableau 3 : Répartition des patients en fonction du site d'étude et selon le sexe.....	37
Tableau 4 : Proportion de la mutation <i>PfExo415G</i> à Dangassa et à Nioro-du-sahel.....	40
Tableau 5 : Proportion des haplotypes du gène <i>Pfcrt76T</i> à Dangassa et à Nioro-du-sahel..	43
Tableau 6 : Proportion des haplotypes du gène <i>Pfdhfr</i> à Dangassa et à Nioro-du-sahel.....	44
Tableau 7 : Proportion des haplotypes du gène <i>Pfdhps</i> à Dangassa et à Nioro-du-sahel	45
Tableau 8 : Proportion des haplotypes du gène <i>Pfmdr</i> à Dangassa et à Nioro-du-sahel	47
Tableau 9 : Proportion des haplotypes dans les gènes du fond génétique de résistance aux dérivés de l'artémisinine à Dangassa et à Nioro-du-sahel.....	Erreur ! Signet non défini.

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de vie biologique de <i>P. falciparum</i>	6
Figure 2 : Principales manifestations cliniques du paludisme	7
Figure 3 : Introduction des antipaludiques et apparition des résistances (R) de <i>P. falciparum</i>	11
Figure 4 : Structures chimiques des principaux antipaludiques	12
Figure 5 : Carte des deux sites d'étude	31
Figure 6 : Répartition des patients en fonction des classes d'âge et selon le site d'étude....	38
Figure 7 : Répartition des patients en fonction du phénotype clinique du paludisme à Dangassa et à Nioro du Sahel.....	38
Figure 8 : Parasitémie moyenne en fonction des sites d'étude.....	39
Figure 9 : Taux moyen d'hémoglobine en fonction des sites d'étude	39
Figure 10 : Proportion des isolats de <i>P. falciparum</i> portant les génotypes <i>Pfcrt_K76</i> , <i>Pfcrt_76T</i> ; <i>Pfmdr1_86Y</i> et <i>Pfmdr1_F184</i> à Dangassa et à Nioro-du-sahel	40
Figure 11 . Proportion du nombre de substitution de codons accumulés dans le gène <i>Pfdhfr</i> aux positions 51, 59, 108 et 164 à Dangassa et à Nioro-du-sahel	41
Figure 12 : Proportion du nombre de substitution de codons accumulés dans le gène <i>Pfdhps</i> aux positions 436, 437A, 540, 581 et 613 à Dangassa et Nioro-du-sahel.....	42
Figure 13 : Proportion des mutations constitutives des marqueurs moléculaires de résistance à la pyriméthamine et à la Sulfadoxine	43
Figure 14 . Technique de la goutte épaisse et frottis minces.....	76
Figure 15 . Analyseur et Microcuvette Hemocue [®] Source : www.hemocue.com	80
Figure 16 . Mécanisme de mesure du taux d'hémoglobine par l'appareil Hemocue201+	81

1. INTRODUCTION

Le paludisme reste un problème écrasant en Afrique, où se produisent environ 90% de la morbidité et de la mortalité liées au paludisme dans le monde [1]. Dans la plus grande partie de l'Afrique subsaharienne, la majorité des cas sont causés par *Plasmodium falciparum*, le parasite le plus virulent du paludisme humain, et le parasite présentant la plus grande probabilité de résistance aux médicaments. Le rôle clé des médicaments antipaludiques en Afrique est le traitement de l'accès palustre simple. Les maladies non compliquées constituent la grande majorité des épisodes de paludisme, et la maladie est principalement observée chez les enfants [1]. Le traitement est axé sur le paludisme à *P. falciparum*, et doit être dirigé contre les organismes potentiellement résistants aux médicaments. Depuis le début du 21^e siècle, les traitements de choix pour le paludisme en Afrique sont les CTA [2]. Presque tous les pays d'Afrique subsaharienne recommandent l'artéméther-lumefantrine, l'artésunate-amodiaquine ou l'un de ces schémas pour le traitement du paludisme non compliqué [[3] [4]]. Les autres CTA pertinents pour l'Afrique et recommandés par l'OMS sont la dihydroartémisinine-piperaquine, l'artésunateméfloquine et l'artésunate-pyronaridine [4]. D'autres schémas thérapeutiques non approuvés par l'OMS pour l'Afrique mais disponibles dans certains contextes sont l'artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine, l'artémisinine-piperaquine, l'artémisinine-naphthoquine et l'artérolane-piperaquine.

Le traitement standard du paludisme grave est l'artésunate intraveineux, qui a montré une meilleure efficacité et une diminution de la mortalité par rapport à la quinine dans deux grands essais randomisés, dont l'un a porté sur plus de 5 000 enfants africains [[5] [6]] L'artésunate rectal [7], l'artéméther intramusculaire [8] et l'artéméther rectal [9] peuvent être administrés dans des contextes où la thérapie intraveineuse n'est pas possible. La quinine intraveineuse reste une thérapie alternative pour le paludisme grave [10]. En plus du traitement des maladies aiguës, des médicaments antipaludéens sont utilisés pour prévenir le paludisme en Afrique. Les stratégies recommandées par l'OMS sont la thérapie préventive intermittente, avec la sulfadoxine-pyriméthamine mensuelle pour prévenir le paludisme pendant la grossesse [[11] [12]] et la chimioprévention du paludisme saisonnier, avec l'amodiaquine-

sulfadoxine-pyriméthamine mensuelle pour diminuer l'incidence du paludisme infantile pendant la saison

des pluies dans certaines parties de la sous-région du Sahel où la transmission du paludisme est très saisonnière [13]. D'autres stratégies, notamment la thérapie préventive intermittente dans d'autres populations [14], le traitement de masse [[15] [16]] et la détection et le traitement curatif des cas [17], sont à l'étude. La chimioprophylaxie pour le paludisme est une pratique de routine pour les voyageurs qui se rendent en Afrique à partir de régions où le paludisme n'est pas endémique, le plus souvent avec de l'atovaquone-proguanil, de la méfloquine ou de la doxycycline [18].

L'utilisation de médicaments pour le traitement ou la prévention du paludisme en Afrique est menacée par la résistance. La résistance aux médicaments plus anciens, notamment la chloroquine et les aminoquinoléines et antifolates apparentés, est répandue depuis des décennies [19]. Les nouvelles CTA semblent rester très efficaces [20], mais une résistance aux CTA est apparue en Asie du Sud-Est [21]. Il convient de noter que la résistance à de nombreux antipaludiques, notamment la chloroquine, la méfloquine, la quinine et les artémisinines, est apparue indépendamment en dehors de l'Afrique. La sélection de la résistance pourrait être moins probable en Afrique que dans d'autres régions en raison du niveau élevé d'immunité des populations africaines, du haut niveau de complexité des infections africaines et d'autres facteurs qui limitent l'émergence de souches résistantes relativement inaptes [22]. La sensibilité aux médicaments en Afrique est surveillée sur la base de critères cliniques, parasitologiques et moléculaires standardisés.

L'émergence et la propagation incontrôlée des parasites *Plasmodium falciparum* résistants à l'artémisinine dans la sous-région du Grand Mékong au cours des 13 dernières années représentent une grave menace potentielle pour la lutte contre le paludisme dans le sous-continent Indien et en Afrique. La résistance à l'artémisinine compromet les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA), le traitement de première ligne du paludisme à *P. falciparum* [4]. La résistance à l'artémisinine augmente le risque d'échec du traitement par les CTA et sélectionne donc les médicaments partenaires pharmacorésistants [[23] [24]]. La résistance à l'artésunate-méfloquine dans l'est du Myanmar et à la dihydroartémisinine-pipéraquine au Cam-

bodge, dans le nord-est de la Thaïlande et dans le sud du Vietnam a été rapportée par différentes études [[25] [26] [27]].

Les mutations du gène codant pour une protéine Kelch (p_{fk}elch ; PF3D7_1343700) sur le chromosome 13 de *P. falciparum* sont fortement associées à la résistance à l'artémisinine [28], entraînant une réduction de la sensibilité au stade du cycle et une lente élimination des parasites. L'amplification de la plasmepsine [[23] [24]] (PF3D7_1408000) et les mutations dans le transporteur de résistance à la chloroquine de *P. falciparum* (p_{fc}rt ; PF3D7_0709000) en aval du locus de résistance à la 4-aminoquinoléine (positions 72-76 avec Lys76Thr) ont toutes deux été associées à la résistance à la piperaquine [[26] [29] [30] [31] [32]] ; *pfmdr1* (PF3D7_0523000) est un marqueur bien établi de la résistance à la méfloquine [[25] [33]], qui contribue également à réduire la sensibilité à la luméfántrine en Asie du Sud-Est [34].

Le Mali est actuellement parmi les dix pays les plus touchés par le paludisme en Afrique. Les mesures visant à contrôler le paludisme ne peuvent être efficaces que si elles reposent sur des données globales, fiables et actualisées. L'amélioration des connaissances sur la chimiosensibilité des antipaludiques au Mali permettra d'orienter les interventions de manière tant réfléchie qu'objective. La prévalence du paludisme dans la population, la distribution des espèces plasmodiales, l'efficacité des molécules antipaludiques et des moustiquaires imprégnées d'insecticides et l'apparition de nouvelles souches chimiorésistances, ne sont que quelques indicateurs très utiles parmi d'autres servant de justificatifs visant à réduire la morbi-mortalité liée au paludisme au Mali. Le présent travail a donc été réalisé en vue de mettre à jour les connaissances sur la chimiosensibilité de *P. falciparum* au Mali tout en utilisant des méthodes moléculaires. Nous avons cherché à évaluer les marqueurs de résistance dans des isolats de parasites obtenus dans le cadre d'une étude menée dans deux sites du Mali, le village de Dangassa et la ville de Nioro du Sahel.

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif général

Etudier la fréquence des marqueurs moléculaires de résistance aux principales molécules antipaludéens pouvant être associées à l'artémisinine à Dangassa et à Nioro en 2016.

2.2. Objectifs spécifiques

- Décrire les aspects cliniques et biologiques du paludisme chez les patients reçus au CScom de Dangassa et au Csref de Nioro du Sahel pendant la saison de transmission 2016
- Déterminer la proportion des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel en 2016
- Comparer les proportions de marqueur moléculaire de résistance de *P. falciparum* à Dangassa et à Nioro du Sahel pendant la saison de transmission 2016

3. GENERALITES

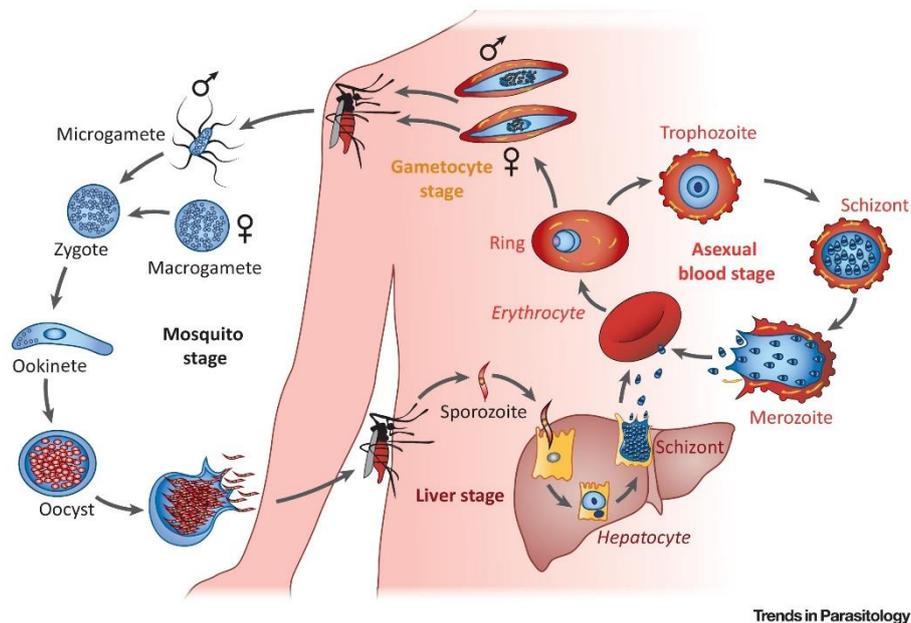
3.1. Paludisme à *P. falciparum*

3.1.1. Particularités biologiques de *P. falciparum*

P. falciparum est actuellement l'espèce la plus répandue dans le monde et occupe la première place en termes de morbidité et de mortalité palustres. Plusieurs caractéristiques biologiques propres à ce parasite expliquent en partie son importance. Il est l'agent étiologique de la malaria tropicale, la principale cause de décès due à une maladie infectieuse à transmission vectorielle, faisant 0,5 million de victimes chaque année [35]. L'eucaryote unicellulaire subit un cycle de vie complexe et est un parasite intracellulaire obligatoire des hépatocytes (cliniquement silencieux) et des érythrocytes (responsables de la maladie, figure 1.). Les *Plasmodium* sont haploïdes une grande partie de leur cycle, et se retrouvent diploïdes uniquement chez leur hôte définitif, entre la fécondation et la formation des sporozoïtes. Une infection peut évoluer vers un large éventail de pathologies, notamment une anémie sévère et un paludisme cérébral, qui peuvent entraîner la mort. *P. falciparum* se reproduit de manière répétée pendant 48 heures à l'intérieur des érythrocytes, ce qui entraîne une croissance exponentielle et une progression rapide de la maladie. En tant que principale maladie infectieuse touchant les enfants, aucun autre agent pathogène n'a exercé une pression de sélection aussi forte sur le génome humain. Plus de 20 polymorphismes, dont le trait drépanocytaire, ont été sélectionnés dans les populations humaines, malgré les coûts d'adaptation élevés, car ils offrent une protection contre les infections mortelles à *P. falciparum* [36]. Il n'existe pas de vaccin efficace, mais plusieurs traitements curatifs sont disponibles.

En 2002, le génome nucléaire du clone de laboratoire 3D7 de *P. falciparum* a pu être séquencé par Gardner et al. [37], via une stratégie de « shotgun sequencing » sur chaque chromosome. Il comporte 23,3 Mb portées par 14 chromosomes, et est particulièrement riche en adénine et thymine (80 %). Environ 5300 gènes codant pour des protéines ont pu être dénombrés. En plus de ce génome nucléaire, *Plasmodium* est aussi doté d'un génome mitochondrial de 6 kb et d'un génome de 35 kb, propre à son apicoplaste [38]. La connaissance de la séquence complète de *P. falciparum* pose les bases de la compréhension de ses diverses voies métaboliques et de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Gardner et al.

ont ainsi pu établir un schéma offrant une vue d'ensemble du métabolisme de *Plasmodium*.



Source: [35]

Figure 1 : Cycle de vie biologique de *P. falciparum*

3.1.2. Taxonomie et classification

P. falciparum est classé comme suit :

PHYLUM : *Apicomplexa*

CLASSE : *Aconoidasida*

ORDRE : *Haemosporida*

FAMILLE : *Plasmodiidae*

GENRE : *Plasmodium*

ESPECE : *falciparum*

3.1.3. Epidémiologie de l'infection palustre

Le paludisme est une maladie provoquée par des hématozoaires appartenant au genre *Plasmodium*. Deux espèces parmi les cinq qui infectent l'homme, *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*, ont un impact majeur en santé publique. *P.*

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Niéro du Sahel au Mali

falciparum provoque une infection aiguë, potentiellement mortelle chez les sujets peu ou non immuns. *P. vivax*, longtemps considéré comme provoquant des infections bénignes, est maintenant reconnu comme un pathogène susceptible de provoquer des complications graves, responsables de décès [1]

3.1.4. Clinique et pathophysiologie de l'infection à *P. falciparum*

P. falciparum est la cause majeure de mortalité infantile, principalement en Afrique subsaharienne. Il est le facteur majeur de pauvreté en Afrique et dans d'autres régions endémiques du monde. La maladie est causée par les stades sanguins asexués. La triade classique d'un accès palustre comprend fièvre, sueurs et frissons, qui surviennent de façon plus ou moins régulière, et qui correspondent à la rupture synchrone des schizontes et à la libération des déchets issus du métabolisme du parasite dont l'hémozoïne. À cette symptomatologie peuvent s'associer à d'autres signes non spécifiques tels que la myalgie, l'asthénie, les céphalées ou les troubles digestifs. Les accès récurrents sont responsables d'anémies potentiellement sévères, et de splénomégalies, quelle que soit l'espèce en cause.

La morbidité et la mortalité sont dues à un large éventail de pathologies, dont l'acidose métabolique, la défaillance d'un organe, l'anémie et le coma (figure 1.) et l'acquisition d'une immunité partielle est lente et de courte durée, même après des années de réinfections continues.

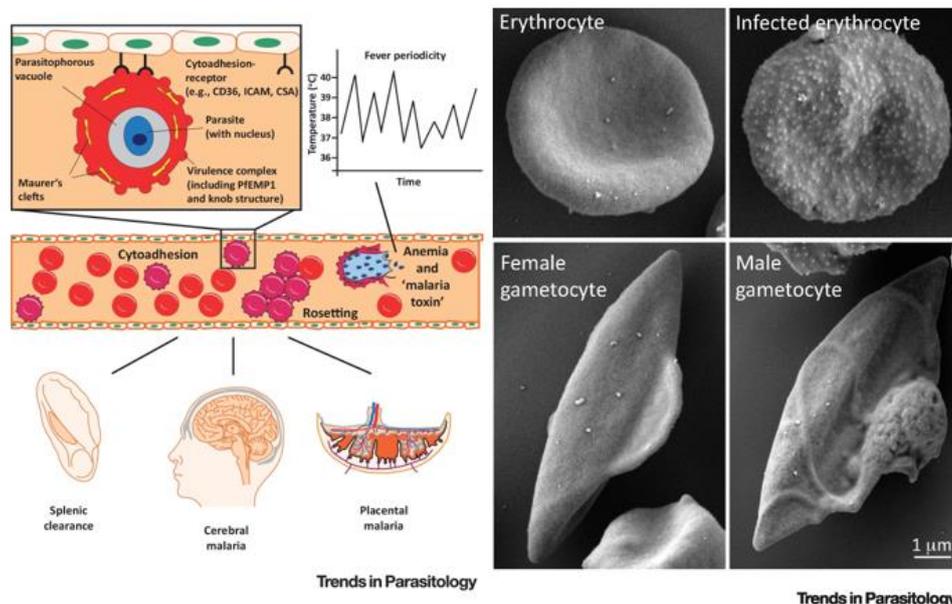


Figure 2 : Principales manifestations cliniques du paludisme

Les formes cérébrales sont presque exclusivement l'apanage de *P. falciparum*, qui entraîne l'expression à la surface des érythrocytes qu'il contamine, de molécules d'adhésion telles que *PfEMP1*. De ce fait, les hématies parasitées par des formes âgées de *P. falciparum* (schizontes) sont séquestrées au niveau des capillaires de différents organes et notamment le cerveau, pouvant entraîner la défaillance de ces organes [39]. La traduction clinique peut consister en des troubles de la conscience, des convulsions, une défaillance respiratoire ou cardiovasculaire, une acidose, ou encore une insuffisance rénale. Il convient d'identifier au plus vite ces formes graves, pour mettre en place en urgence les traitements spécifiques et symptomatiques qui s'imposent alors. L'OMS a établi en 2000 la liste des critères cliniques et biologiques de gravité en zone immune, et plusieurs de ces critères sont retrouvés parmi ceux établis par la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) pour définir le paludisme grave d'importation [40].

Le traitement par une thérapie combinée à base d'artémisinine permet de sauver des vies, mais aucun médicament prophylactique causal n'est utilisé. Une résistance s'est développée sur le terrain à tous les médicaments antipaludiques disponibles. Les moustiquaires imprégnées d'insecticide ont un impact majeur sur la réduction de la transmission ainsi que les traitements preventifs intermittents et la chimioprévention saisonnière palustre (CPS).

3.1.5. Diagnostic de l'infection à *P. falciparum*

Etant donné la sévérité potentielle de cette maladie et sa clinique peu spécifique, l'adage « Toute fièvre chez un enfant en zone d'endémie est un paludisme jusqu'à preuve du contraire » est martelé aux étudiants en santé tout au long de leur cursus. Et pour affirmer le diagnostic, différentes techniques peuvent être utilisées, mais un rendu de résultat est impératif dans les 2 heures. La classique association frottis / goutte épaisse est encore largement utilisée à travers le monde et particulièrement au Mali. Des techniques plus récentes s'incrémentent aussi désormais dans les logigrammes de diagnostic.

3.1.5.1. Frottis mince

L'étalement en monocouche des cellules sanguines et la coloration de celles-ci au Giemsa constitue une technique de diagnostic direct qui permet à la fois d'identifier

l'espèce impliquée dans l'infection en cours par ses caractéristiques morphologiques et d'évaluer la parasitémie en déterminant le pourcentage d'hématies parasitées par des formes asexuées. D'autre part, elle est simple et peu coûteuse, mais nécessite une certaine expertise du microscopiste, et sa sensibilité est de l'ordre de 50 parasites par μl [41].

3.1.5.2. Goutte épaisse

Cette technique de concentration présente une bonne sensibilité de 4 parasites / μl et a l'avantage d'être peu coûteuse, mais elle est assez longue à réaliser et difficile à lire [42]. Elle consiste à déposer en cercle concentrique sur une lame, une goutte d'un volume connu de sang, et à la colorer au Giemsa après une étape d'hémolyse. Une estimation de la parasitémie est possible, mais l'identification de l'espèce est difficile. Elle est donc généralement utilisée en association au frottis mince.

3.1.5.3. Tests de diagnostic rapide

Les tests de diagnostic rapides (TDR) Les TDR sont fondés sur la détection de protéines spécifiques de *Plasmodiums* dans le sang des personnes infectées à l'aide d'une membrane en nitrocellulose contenant des anticorps anti-plasmodiums. Ils détectent les antigènes circulants de *Plasmodium* par immunochromatographie. Ces antigènes sont généralement la lactate déshydrogénase (LDH), l'aldolase ou la protéine 2 riche en histidine (HRP2) qui est spécifique de *P. falciparum*. Ils ne nécessitent ni source électrique, ni équipement de laboratoire particulier et permettent de diagnostiquer assez rapidement une infection plasmodiale. De plus ils se conservent jusqu'à 30°C pour la plupart. Il a été cependant mis en lumière la possibilité d'obtenir des faux négatifs en cas d'utilisation de tests basés sur la détection du HRP-2, certaines souches de *P. falciparum* n'exprimant pas ce gène [[43] [44]].

3.1.5.4. Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire ont longtemps été réservées à quelques centres spécialisés du fait de leur lourdeur, de leur coût, du temps technique qu'elles demandent et de l'impossibilité de les réaliser en urgence [45]. Elles se démocratisent désormais grâce aux avancées technologiques dans ce domaine, qui les rendent accessibles, simples d'utilisation et surtout rapides. Pour exemple, le test

Illumigène® Malaria (Meridian Bioscience Inc., USA) a obtenu en 2016 le marquage et permet en 40 min, d'obtenir un résultat qualitatif quant à la présence d'ADN de *Plasmodium spp.*, et ce avec un seuil de détection de 0,125 à 2 parasites / μ l. Il utilise la technique d'amplification isotherme de l'ADN facilité par boucle (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), et la présence de l'ADN cible est détectée par modification d'absorbance du milieu. En cas de positivité, ce test doit être complété par une technique microscopique classique pour identifier l'espèce en cause et déterminer la parasitémie.

3.1.5.5. Quantitative buffy coat (QBC)

Il s'agit d'une technique de concentration commerciale utilisant un capillaire contenant de l'acridine orange, marqueur de l'ADN (Drucker Diagnostics, Port Matilda, USA). Ce capillaire est partiellement rempli du sang du patient, puis centrifugé, et une lecture au microscope à fluorescence permet ensuite de distinguer les formes parasitaires au sein de la couche érythrocytaire ou leuco-plaquettaire. Le seuil de détection est comparable à celui de la goutte épaisse (de l'ordre de 1 parasite / μ l), et les compétences nécessaires à sa réalisation et sa lecture sont rapidement acquises, ce qui fait de cette technique une bonne alternative à la goutte épaisse [46]. Elle nécessite cependant un équipement particulier, et son coût est supérieur à celui des techniques de microscopie classique. De plus, l'identification de l'espèce est complexe, et la quantification n'est pas réalisable.

3.1.5.6. Sérologie

À la suite d'une infection, les anticorps dirigés contre le *Plasmodium* sont généralement produits dans les 10 à 20 jours après le début de l'accès [47], et ils persistent environ 6 mois [48]. La sérologie n'est de fait, pas adaptée au diagnostic d'urgence, mais peut permettre le dépistage dans le cadre de dons de sang ou d'organe, en prévention de la transmission transfusionnelle du paludisme. Elle est aussi utilisée à visée épidémiologique, ou pour le diagnostic des formes chroniques de l'infection en zone d'endémie [49]. Les techniques utilisées sont l'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ou l'immunofluorescence

3.1.6. Traitement et prévention de l'infection à *P. falciparum*

Si pendant longtemps la chimiothérapie antipaludique a reposé sur l'écorce de quinquina et la quinine qu'elle contient, l'arsenal thérapeutique s'est peu à peu étoffé. Aux quinoléines, dérivés synthétiques de la quinine, sont venues s'ajouter d'autres familles de molécules au mode d'action différent. La combinaison de différents antipaludiques est la méthode aujourd'hui utilisée pour contrer le phénomène de résistance, et les quinoléines restent ainsi au cœur du traitement antipaludique.

3.1.6.1. Principaux antipaludiques et mécanismes d'action

Les données épidémiologiques, le mode d'action, les mécanismes de résistance et les marqueurs moléculaires de résistance sont présentés pour chaque médicament antipaludique utilisé actuellement.

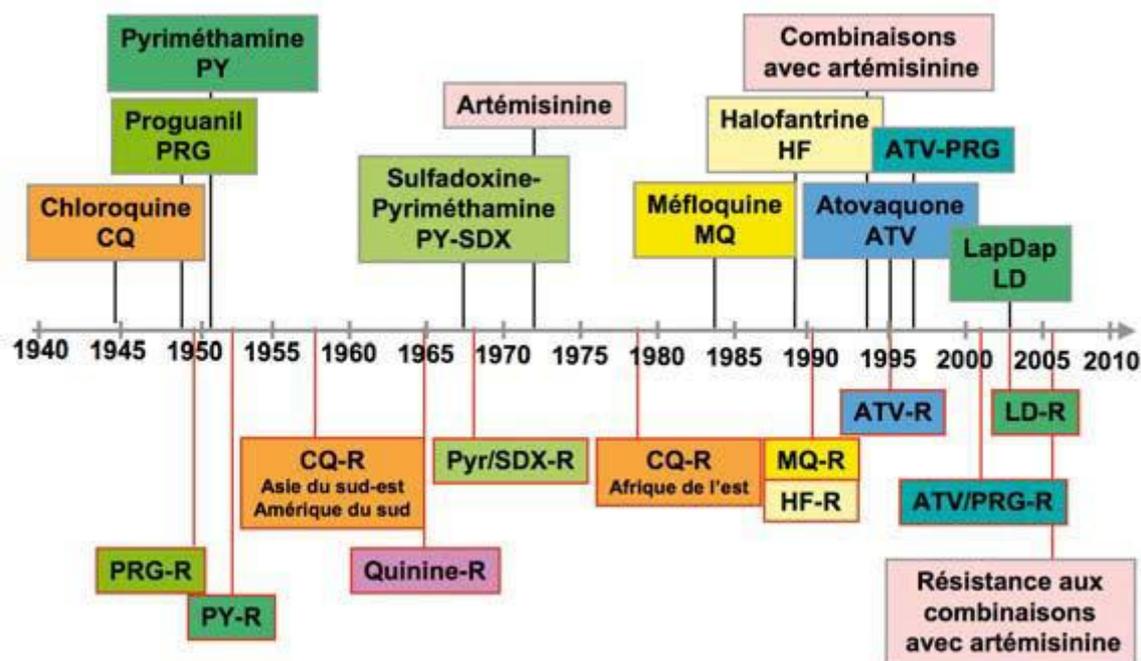


Figure 3 : Introduction des antipaludiques et apparition des résistances (R) de *P. falciparum* [50].

L'essentiel de l'arsenal antipaludique actuel (figure 4) agit sur les formes intraérythrocytaires de *P. falciparum*.

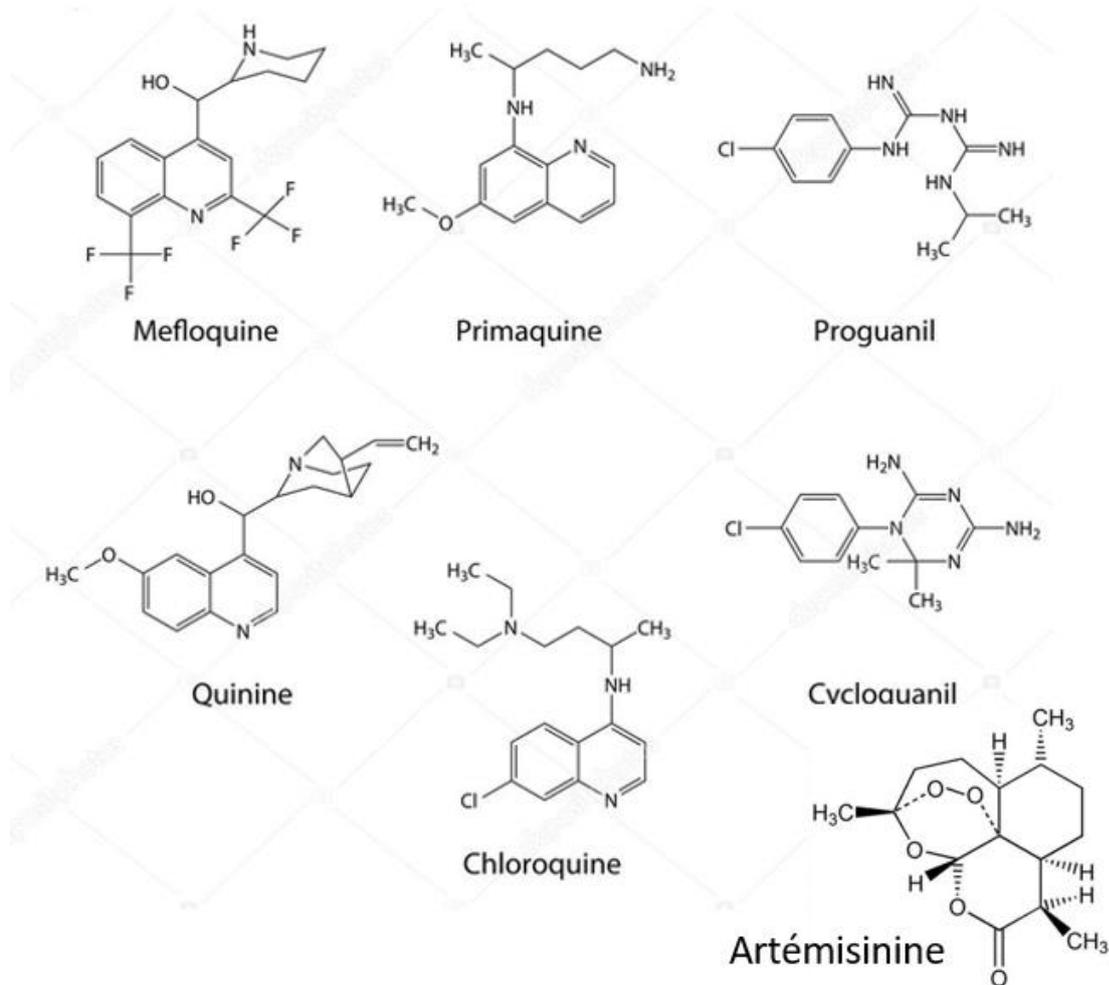


Figure 4 : Structures chimiques des principaux antipaludiques

3.1.6.1.1. Schizonticides érythrocytaires

3.1.6.1.1.1. Dérivés quinoléiques

Les dérivés quinoléiques comprennent la quinine, traitement historique du paludisme, et ses dérivés, plus ou moins récents. Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas entièrement élucidé, il semblerait qu'ils s'accumulent au sein de la vacuole digestive des *Plasmodium*, et en modifient le pH le rendant moins acide. Cette modification s'accompagne d'une incapacité du parasite à détoxifier l'hème libéré lors de la métabolisation de l'hémoglobine [51]. En effet, le parasite utilise l'hémoglobine pour se procurer les acides aminés nécessaires à sa survie, et l'hème ou ferriprotoporphyrine IX (Fe(II)PPIX) alors libéré s'oxyde et devient un composé toxique pour le parasite, la Fe(III)PPIX. Pour détoxifier ce produit de dégradation, les plasmodies le transforment en hémozoïne, le pigment malarique [52].

On distingue parmi les dérivés quinoléiques utilisés en traitement des accès palustre, les amino-4-quinoléines (chloroquine, pyronaridine, amodiaquine, pipéraquline) et les arylamino-alcools (quinine, quinidine, méfloquine, halofantrine et luméfántrine), qui diffèrent par leur solubilité et leur basicité.

La chloroquine (CQ) est une amino-4-quinoléine de synthèse qui a fait son apparition après la seconde guerre mondiale. Efficace, rapide et bon marché, la CQ s'est imposée comme un remarquable antipaludique. Cependant, dès 1957, les premiers cas de résistance à la CQ sont apparus en Asie et en Amérique du Sud. Cette résistance s'est ensuite rapidement répandue sur les deux continents, puis en Afrique et elle touche aujourd'hui la totalité des zones d'endémie palustre. Pendant plus de 30 ans, la CQ a été le médicament de première ligne pour prévenir et traiter le paludisme. La résistance à la CQ s'est accompagnée d'une augmentation importante de la mortalité due au paludisme [53].

Son activité est liée à ses propriétés d'accumulation sélective dans l'hématie parasitée et sa localisation préférentielle dans la vacuole digestive. La CQ, dont le mécanisme d'action est le plus documenté, est active exclusivement sur les formes érythrocytaires du parasite. La CQ, base soluble, traverse les différentes membranes de l'érythrocyte et du parasite et s'accumule dans la vacuole digestive acide, suivant le gradient de pH. À l'intérieur de la vacuole, la CQ est protonée et ne peut plus traverser librement la membrane vacuolaire. Prise au piège dans la vacuole, elle y exerce son action létale pour le parasite. Selon ce mécanisme, l'entrée de CQ dans la vacuole est directement dépendante du pH. D'autres hypothèses s'accordent sur l'existence d'un transporteur permettant l'entrée de la CQ dans la vacuole digestive. Des études ont mis en évidence le lien entre l'altération du pH et l'accumulation de CQ. Par exemple, l'inhibition de pompes à protons telles que l'échangeur Na^+/H^+ (*P. falciparum* Na^+/H^+ exchanger : PfNHE) localisé dans la membrane plasmique inhiberait l'accumulation de CQ [54], cependant d'autres études n'ont pas confirmé l'implication de cette pompe dans l'action de la CQ [55]. Le mécanisme d'action de la CQ n'est toujours pas déterminé avec précision mais serait en relation avec l'inhibition de la cristallisation de l'hème en hémozoïne, processus qui permet au parasite de se protéger de la toxicité de l'hème qu'il libère en digérant l'hémoglobine pour en récupérer les acides aminés. C'est aussi la molécule qui a été la plus étudiée

au niveau des marqueurs moléculaires de résistance. De nombreux travaux suggèrent que différents gènes, codant des protéines de transport, sont impliqués dans la résistance à la CQ [[56] [57] [58] [59] [60] [61]]. La biologie moléculaire a permis d'affiner la compréhension de la résistance à la CQ.

La quinine (QN) était utilisée par les médecins avant même que le paludisme soit une maladie parasitaire reconnue. La QN reste le principal antipaludique recommandé dans le traitement du paludisme grave et chez la femme enceinte en Europe et en Afrique. Elle est un antipaludique efficace cliniquement contre des souches résistantes à la CQ ou à la méfloquine (MQ). Les premiers cas documentés de résistance à la QN ont été rapportés dans les années 1960 au Brésil et en Asie du Sud-Est [[62] [63]] puis deviennent moins rares depuis les années 1980 en Asie, en Amérique du Sud et en Afrique [[64] [65] [66] [67]]. En Asie du Sud-Est, la QN est utilisée en association avec la tétracycline [[68] [69]] ou la clindamycine [70]. Elle est associée maintenant dans le traitement du paludisme en Guyane. La QN se lie aussi à l'hème [71] et inhibe la cristallisation de l'hème [72]. Le complexe quinine-hème est capable d'endommager les membranes parasitaires par peroxydation lipidique [73] et par libération d'hème en présence de glutathion [74]. La sensibilité des isolats à la QN est généralement indépendante de celle à la CQ ou à la MQ. Cela suggère que les mécanismes de résistance à la QN sont différents de ceux de la résistance à la CQ ou à la MQ. Le phénotype de réponse à la QN semble affecté par les gènes *pfcr1* [75] et *pfmdr1* [76]. L'introduction expérimentale de mutations sur *pfmdr1* a été associée in vitro à une résistance à la QN [77]. Alors que la surexpression in vitro du gène *pfmdr1* entraîne une résistance à la fois à la QN et à la MQ [[78] [79]], les isolats résistants à la MQ sont le plus souvent sensibles à la QN et vice versa [80]. Cependant, la QN reste efficace contre des souches résistantes à la CQ, indiquant que les phénotypes de réponse à la QN sont sans doute affectés par d'autres gènes. Cette hypothèse est étayée par l'identification de 5 gènes supplémentaires associés significativement à la réponse à la QN d'isolats de *P. falciparum* provenant de trois continents différents [77]. Le polymorphisme du gène *pfhe-1* semble associé à la résistance à la QN [[81] [82]].

L'amodiaquine (AQ) a récemment connu un regain d'intérêt, dans le traitement de l'accès simple, en association avec les dérivés de l'artémisinine (ACT) et plus

particulièrement en association avec l'artésunate, leur combinaison ayant un pouvoir synergique puissant. Le mode d'action de l'AQ semble être le même que celui de la CQ. L'accumulation de l'AQ est corrélée à celle de la CQ et est aussi diminuée chez les isolats chloroquinorésistants [83]. Des résistances croisées à CQ et AQ ont été observées *in vivo* et *in vitro* [84], cependant il existe des souches qui ne présentent pas de résistance croisée *in vitro* [85]. Les taux d'échecs parasitologiques et cliniques à l'AQ sont plus faibles que ceux à la CQ, dans le traitement d'enfants en Gambie [86] et au Sénégal, au Cameroun, au Gabon et au Congo [[87] [88]]. L'AQ semble plus efficace que la CQ même dans des zones où la résistance à la CQ est élevée [89]. Il semblerait que l'utilisation de l'AQ dans les CTA sélectionnerait des parasites de sensibilité diminuée à la monodéséthylamodiaquine, le métabolite actif de l'AQ, suggérant une perte d'efficacité rapide de cette association en Afrique [90]. Du fait de sa toxicité pour le foie et la moelle osseuse dans les traitements de longue durée, elle n'est pas recommandée en prophylaxie.

Peu d'études ont exploré les bases moléculaires de la résistance à l'AQ, les études réalisées font l'hypothèse de certains points communs entre l'AQ et la CQ. La résistance à l'AQ semble être liée aux gènes *pfcr1* [71] et *pfmdr1* [[91] [92] [93]]. La présence de la mutation Asn86Tyr sur *pfmdr1* multiplie le risque de résistance *in-vivo* à l'amodiaquine par 5,4 (OR; IC95 % : 2,6-11,2, méta analyse de 6 études) [94] et par 7,9 (p < 0.01) le risque d'échec thérapeutique par la combinaison amodiaquine plus sulfadoxine-pyriméthamine [95].

La méfloquine (MQ) Autre molécule de synthèse, la méfloquine est un arylaminoalcool. Elle a fait son apparition à la fin des années 1970. Elle reste une des molécules recommandées pour la prophylaxie en zone de poly-résistance. La MQ a été utilisée avec efficacité sur des souches poly-résistantes de *P. falciparum* [96] et notamment comme traitement de première ligne d'accès simples de paludisme en Thaïlande après la QN. Depuis, il a été observé une diminution de son efficacité dans certaines régions [97], et notamment l'apparition et la propagation de souches résistantes en Asie [98]. Elle reste très largement utilisée en Asie associée à l'artésunate. Cependant, même des résistances à l'association artésunate-MQ se sont développées sur le continent asiatique [[99] [100] [101]].

La primaquine, une amino-8-quinoléine, occupe quant à elle une place à part parmi ces molécules, du fait de son mécanisme d'action sur la chaîne respiratoire mitochondriale, et de son activité sur les hypnozoïtes [102]. Elle est de fait utilisée en cure radicale pendant 14 jours pour prévenir les reviviscences après le traitement des accès palustres à *P. ovale* ou *P. vivax* [40].

Au cours des dernières années, de nouvelles quinoléines ont fait leur apparition sur le marché des antipaludiques, essentiellement utilisées en association avec les dérivés de l'artémisinine (luméfantrine, pyronaridine, pipéraquline). L'augmentation du nombre de copies du gène *pfmdr1* (de 1 à 2 copies ou plus) a été associée à la résistance à la luméfantrine [103]. Les résistances à l'AQ (associée à la mutation Asn86Tyr et à une copie unique du gène *pfmdr1* dans le génome du parasite) d'une part et à la MQ ou la luméfantrine (associées à une augmentation du nombre de copie du gène *pfmdr1*, sans mutation) d'autre part semblent sélectionnées de façon opposées [[93] [103]].

3.1.6.1.1.2. Dérivés de l'artémisinine

En 1967, en plein contexte de révolution culturelle en Chine, Mao Tsé-Toung lance le programme de recherche secret nommé 523, qui vise à identifier de nouvelles molécules antipaludiques. C'est au cours de ce programme que l'intérêt du Qinghao (*Artemisia annua*) dans le traitement de la fièvre est redécouvert, et que l'artémisinine, molécule active et bientôt chef de file d'une nouvelle famille d'antipaludique, est extraite de cette plante. Cette découverte a conduit l'une de ses auteurs, Youyou Tu, au prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2015 [104]. Parmi les dérivés de l'artémisinine, on retrouve l'artésunate, l'artémether, et la dihydroartémisinine (DHA) aussi nommée arténimol. Leur mode d'action n'est pas complètement élucidé, mais il tient au pont endoperoxyde de ces composés, et à la formation de radicaux libres au sein du parasite [105]. Ces molécules sont efficaces et agissent rapidement, mais sont aussi caractérisées par une demi-vie courte, qui explique leur association fréquente à des molécules dont la demi-vie est plus prolongée (amodiaquine, méfloquine, luméfantrine, sulfadoxine-pyriméthamine ou pipéraquline). Ces ACT administrées per os sont désormais au cœur du traitement du paludisme. Elles sont prônées par l'OMS dans le traitement des accès simples, ou en relais de l'artésunate IV dans les accès graves à *P. falciparum* [106].

3.1.6.1.2. Inhibiteurs des acides nucléiques

3.1.6.1.2.1. Antifolates

Ces molécules agissent sur les voies de synthèse des folates, cofacteur de la synthèse des bases de l'ADN, en inhibant la dihydroptéroate synthase (DHPS) pour les antifolates de type 1 (sulfadoxine) ou la dihydrofolate réductase (DHFR) pour les antifolates de type 2 (proguanil, pyriméthamine). Du fait de l'émergence rapide de résistances, les antifolates sont toujours utilisés en association fixe : la sulfadoxine est utilisée avec la pyriméthamine, et le proguanil avec l'atovaquone.

Les antifoliniques (pyriméthamine et proguanil) ont été développés à la suite de l'invasion de l'Indonésie par les Japonais pendant la seconde guerre mondiale qui a privé les armées alliées de leur unique source d'antipaludique, la quinine. Ceci a conduit à une recherche intensive et au développement du proguanil. Le succès du proguanil [107] a stimulé la recherche sur les dérivés des pyrimidines et la synthèse de la pyriméthamine [108]. Cependant, leur efficacité a rapidement diminué en raison du développement rapide d'une résistance du parasite contre cette famille de molécules.

Les antifoliques (sulfones (dapsonne) et sulfonamides (sulfadoxine)) ont été très utilisés pendant la seconde guerre mondiale puis nettement moins avec l'utilisation de la chloroquine et de la pyriméthamine. Le plus utilisé des sulfonamides en Afrique est la sulfadoxine en association avec la pyriméthamine. Les sulfones et les sulfonamides inhibent la dihydroptéroate synthase (DHPS) de *P. falciparum* [[109] [110]]. La DHPS est une autre enzyme de la voie des folates qui est inhibée par la SFX et la dapsonne dont elle est la cible moléculaire [[111] [112]]. Ces composés sont des analogues du PABA et agissent comme inhibiteurs compétitifs de la DHPS [110]. Les antifoliniques et les sulfamides agissant à deux niveaux de la même voie métabolique. Cela explique l'effet synergique qu'ils ont en association [[113] [114]].

3.1.6.1.2.2. Hydroxynaphtoquinones (Atovaquone)

Les premières évaluations de l'atovaquone (ATV) dans les accès simples de *P. falciparum* ont montré une bonne réponse, mais associée à un taux de recrudescence élevé [115] pouvant atteindre 30 % [98]. Afin d'éviter l'apparition rapide de résistances à l'atovaquone, sa combinaison avec le proguanil a été

développée. Cette association est synergique in vitro [[116] [117]] et l'efficacité clinique de cette association a largement été démontrée [[118] [119]]. Cette association atovaquone-proguanil (ratio 2,5-1) est désormais commercialisée sous le nom de Malarone®. Elle est recommandée en prophylaxie dans les zones de résistance à la chloroquine et de multirésistance et dans le traitement de l'accès simple à *P. falciparum* en Europe.

L'atovaquone est une naphthoquinone analogue du coenzyme Q qui tue le parasite en inhibant indirectement la dihydroorotate réductase, quatrième enzyme de la synthèse des bases pyrimidines [[120] [121]]. L'atovaquone se lie au complexe bc1 (complexe III), responsable de l'oxydation de l'ubiquinone générée par différentes déshydrogénases et de la réduction du cytochrome c, qui est ensuite lui-même oxydé par la cytochrome c oxydase [122]. L'analyse de la séquence d'acides aminés constituant le cytochrome b plasmodial montre qu'il diffère de celui des autres organismes [123]. Le proguanil, qui seul n'a aucune action sur le potentiel membranaire de la mitochondrie, augmente la capacité de l'atovaquone à collapser ce potentiel lors de l'association [117]. Ceci explique l'efficacité de cette association dans des régions où de nombreux échecs au proguanil sont observés [124]. Pfcytb (génome mitochondrial) code le cytochrome b qui est la cible moléculaire de l'atovaquone. Ses mutations Tyr268Asn et Tyr268Ser induisent une diminution très importante de la sensibilité du cytochrome b à l'atovaquone et sont associées à la résistance du parasite à cette molécule [[125] [126]]. Ces mutations sont très rares dans les populations générales de *P. falciparum* et elles ne sont généralement détectées qu'à l'occasion des échecs thérapeutiques ou prophylactiques de l'association atovaquone-proguanil [[127] [128] [129]].

L'atovaquone est la seule naphthoquinone utilisée contre le paludisme. Elle agit sur le cytochrome bc1, enzyme clé de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons, et n'est utilisée qu'en association avec le proguanil. Cette association limite l'émergence de résistances, et se révèle être synergique, le proguanil interférant avec le potentiel de membrane mitochondrial [52]. L'atovaquone-proguanil est utilisée à la fois à visée prophylactique et curative.

3.1.6.1.3. Antibiotiques

Les plasmodies, comme tous les apicomplexes, possèdent un apicoplaste. Cet organe correspond à un chloroplaste résiduel et est indispensable à la survie du parasite pour des raisons encore inconnues. Il possède des voies de réplication et de synthèse similaires à celles des bactéries [130]. Ces éléments font de l'apicoplaste une cible privilégiée, sur laquelle des molécules déjà identifiées pour leur activité antibactérienne, peuvent agir. Parmi ces molécules se trouvent les tétracyclines. Cette famille d'antibiotiques agit en inhibant la synthèse protéique bactérienne par liaison à la sous-unité 30S des ribosomes. De la même manière, les tétracyclines inhibent la synthèse protéique de l'apicoplaste plasmodial [131], et entraînent un effet toxique immédiat et retardé sur le parasite.

S'il s'agit bien d'une propriété commune à cette famille de molécules, seule la doxycycline est utilisée dans cette indication, en chimioprophylaxie du paludisme [68]. La doxycycline, un antibiotique de la famille des cyclines, est recommandée en prophylaxie dans les zones de multirésistances ou en association à la méfloquine ou la quinine dans le traitement de l'accès simple ou de l'accès grave à *P. falciparum* [[132] [133]].

3.1.6.1.4. Piperaquine, antipaludique remis au goût du jour

Connue et synthétisée depuis les années 60, la piperaquine a été largement utilisée pendant une vingtaine d'années en Chine, en tant que prophylaxie ou traitement curatif contre les souches résistantes à la chloroquine [134]. Son usage a par la suite décliné du fait de l'émergence de résistance vis-à-vis de cette molécule alors utilisée en monothérapie. Elle a ensuite connu un regain d'intérêt avec le développement des combinaisons fixes d'antipaludiques, et est utilisée ainsi depuis les années 90 en Asie. Avec la popularisation de l'usage des CTA par l'OMS, l'utilisation de la piperaquine comme molécule associée s'est généralisée, et une spécialité associant 320 mg de piperaquine et 40 mg de DHA est commercialisée en France depuis 2012 sous l'appellation commerciale Eurartesim[®]. Ce CTA est indiqué dans le traitement du paludisme non compliqué causé par *P. falciparum* chez les adultes et enfants à partir de 6 mois et pesant au minimum 5 kg. Les dernières recommandations de l'OMS préconisent l'usage des CTA, et donc de l'Eurartesim[®], Coartem[®] ou du

Riamet[®] (artémether + luméfantrine), un des CTA disponibles au Mali, en première ligne dans le traitement des accès simple à *P. falciparum*, ainsi qu'en relais de l'artésunate IV dès amélioration dans les formes graves. Ils sont aussi en première ligne au même titre que la chloroquine lors des accès à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ou *P. knowlesi*. La posologie simplifiée (2 comprimés par jour en 2 prises pendant 3 jours) du Coartem[®] en fait une spécialité de choix.

3.1.6.1.5. Avenir des antipaludiques

Les récents progrès dans l'identification et le développement de nouvelles molécules devraient permettre d'avoir un choix plus important d'antipaludiques. Ceci devrait partiellement résoudre le dilemme auquel font face la plupart des agences de contrôle du paludisme : distribuer à grande échelle les antipaludiques les plus efficaces et minimiser le développement et l'extension des résistances. D'autre part, il est nécessaire de surveiller efficacement l'apparition et la diffusion des résistances aux antipaludiques en associant tests *in-vivo*, tests *in-vitro*, identification des marqueurs moléculaires et pharmacocinétiques, à l'échelle d'un pays, d'un continent ou du monde comme le préconise le réseau WWARN (WorldWide Antimalarial Resistance Network) qui associe cliniciens, biologistes, chercheurs, épidémiologistes, biostatisticiens [[135] [136] [137]]. Il est nécessaire d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires pour les antipaludiques actuellement utilisés en traitement de première ligne et de les valider par rapport à l'efficacité thérapeutique parasito-clinique des antipaludiques (i.e. par tests *in-vivo*). Le développement des méthodes de biologie moléculaire haut débit, la disponibilité des séquences nucléotidiques de génomes de *P. falciparum* et la collaboration étroite entre chercheurs fondamentaux, cliniciens et responsables des programmes nationaux de lutte contre le paludisme sont les principaux atouts pour le développement de marqueurs moléculaires de résistances de *P. falciparum* aux antipaludiques. Cela devrait faciliter l'identification et la validation de marqueurs moléculaires de la résistance à l'artésunate et aux autres dérivés de l'artémisinine. Il faut renforcer les équipes qui réalisent les tests *in-vitro* qui sont les seuls à permettre actuellement d'évaluer la sensibilité des isolats de *P. falciparum* à tous les antipaludiques et aux associations.

3.1.7. Résistance aux antipaludiques

La résistance aux antipaludiques est définie par l'OMS comme l'aptitude d'une souche parasitaire à survivre ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un médicament donné à des doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées, mais dans les limites de tolérance du sujet. La forme active du médicament doit pouvoir accéder au parasite ou à l'érythrocyte infecté pendant la durée nécessaire à son action normale [138]. Bien que la résistance de *P. vivax* à la chloroquine soit désormais reconnue dans diverses régions du globe et ne puisse être ignorée, c'est aujourd'hui la résistance de *P. falciparum* qui inquiète le plus les acteurs de santé publique. Cette espèce a en effet développé des résistances à tous les antipaludiques successivement utilisés contre elle. Ce phénomène a déjà pu par le passé mettre à mal les programmes de lutte contre le paludisme, et c'est un des points clés à maîtriser pour espérer pouvoir contrôler cette maladie.

Au cours de leur évolution, les micro-organismes ont déjoué les pièges posés par l'environnement, y compris ceux conçus par l'homme (immunité et utilisation de médicaments anti-infectieux). L'émergence et la propagation de la résistance aux médicaments antipaludiques constituent une menace grave et croissante pour la santé publique. Le parasite *Plasmodium falciparum* est désormais résistant à tous les médicaments antipaludiques utilisés, même aux derniers traitements combinés à base d'artémisinine. Les échecs de la prophylaxie ou des traitements provoquent la réapparition de la morbidité et de la mortalité liées au parasite. La connaissance des mécanismes de résistance impliqués peut permettre le développement de nouveaux médicaments qui minimisent ou contournent la résistance aux médicaments, peut permettre l'identification de nouvelles cibles pour le développement de médicaments et d'identifier des marqueurs moléculaires pour la surveillance de la résistance au paludisme. La résistance est souvent associée à 1) l'inhibition de l'altération des enzymes clés qui sont des cibles pour les médicaments antipaludiques ou 2) l'altération de l'accumulation de médicaments dans le parasite qui résulte d'une diminution de l'absorption du médicament, d'une augmentation de l'écoulement ou d'une combinaison des deux processus.

3.2. Outils disponibles pour l'étude de la sensibilité aux antipaludiques (Tests d'efficacité thérapeutiques)

Méthodes de référence standardisées par l'OMS [139], ces tests permettent d'évaluer l'efficacité clinique des schémas thérapeutiques recommandés pour traiter les accès palustres non compliqués. L'efficacité du principe actif est déduite de la disparition de la parasitémie et de l'amélioration du tableau clinique du patient. Le suivi biologique et parasitologique, pendant 28 ou 42 jours, des patients traités permet de distinguer quatre types de réponse au traitement : (i) l'échec thérapeutique précoce (ETP), (ii) l'échec parasitologique tardif (EPT), (iii) l'échec clinique tardif (ECT), et (iv) une réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) qui caractérise un parasite sensible. Ces études cliniques sont généralement coordonnées avec des tests *in-vitro* et moléculaires.

3.2.1. Tests *ex-vivo* et *in-vitro*

Ils consistent à mettre en culture, soit directement (test *ex-vivo*), soit après adaptation en culture continue (test *in-vitro*), un isolat sauvage de *P. falciparum* en présence d'une concentration croissante d'un antipaludique [140]. La mesure de la croissance des parasites (microscopique, isotopique, ELISA ou fluorimétrique) en fonction de la concentration d'un antipaludique permet de définir son niveau de sensibilité. Le résultat est objectivé par la concentration inhibitrice 50 % (IC₅₀), valeur correspondante à la concentration d'antipaludique permettant d'inhiber la croissance de 50 % des parasites (par rapport au témoin sans drogue). Même si cette technique nécessite une logistique et un plateau technique de qualité, elle permet de tester plusieurs antipaludiques en parallèle et de s'affranchir des facteurs liés à l'hôte (immunité, variation individuelle de la concentration sérique en antipaludique).

3.2.2. Marqueurs moléculaires de résistance

Il s'agit d'un ensemble de marqueurs impliqués dans les mécanismes moléculaires de résistance. Pertinents et spécifiques pour prédire le niveau de résistance d'une population parasitaire aux antipaludiques, ils ont une place de choix dans la surveillance de l'activité de tel ou tel antipaludique. Certains marqueurs sont associés à un défaut d'accumulation des pharmacophores au niveau de la cible parasitaire, d'autres à une modification de la cible parasitaire. Ils présentent l'énorme

avantage de pouvoir être étudiés sur une large échelle (à partir d'échantillons sanguins prélevés au bout du doigt et déposés sur papier filtre) et sont potentiellement automatisables. Il n'en existe que pour un nombre restreint d'antipaludiques (Tableau 1). Aucun marqueur n'est actuellement disponible pour évaluer la sensibilité aux dérivés de l'artémisinine. Les principaux marqueurs moléculaires utilisés dans la surveillance de l'efficacité aux antipaludiques sont les suivants (Tableau 2) :

3.2.2.1. *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (Pfcr1)

Ce gène situé sur le chromosome 7 code pour un transporteur membranaire de la vacuole digestive. La mutation sur le codon 76 (K→T), associée à sept autres mutations ponctuelles [[75] [141]], permet au parasite de limiter l'accumulation de chloroquine dans sa vacuole digestive, où elle exerce son action inhibitrice [142]. Pfcr1 est également impliqué dans la baisse de sensibilité du parasite à l'amodiaquine et à la quinine [[143] [144]]. Dans les zones où les allèles de résistance ne sont pas fixés, on observe une augmentation de la fréquence de l'allèle sauvage après abandon de la chloroquine [[145] [146]]. L'analyse de ce locus renseigne sur la pression médicamenteuse exercée au sein des populations.

3.2.2.2. *P. falciparum* multi-drug resistance 1 (Pfmdr-1)

Situé sur le chromosome 5, ce gène code pour un transporteur de type ABC (ATP binding cassette). La protéine PfMDR-1 est impliquée dans la modulation de la sensibilité à de multiples antipaludiques et, plus particulièrement, dans l'efflux des antipaludiques hydrophobes [147]. Les mécanismes de résistance sont liés : (i) soit à des phénomènes de duplication, entraînant une augmentation de l'expression de la protéine [148] et la résistance aux aryl-amino-alcool (comme la méfloquine ou la luméfantine) et une baisse de sensibilité aux dérivés de l'artémisinine (mais sans lien statistiquement établi avec l'efficacité clinique des CTA [[33] [149] [79]]) ; (ii) soit à l'apparition de mutations au niveau des codons 86 (N→Y), 184 (Y→F), 1034 (S→C), 1042 (N→D) et 1246 (D→Y), entraînant une altération de sensibilité des parasites à certains antipaludiques comme les amino-4-quinoléines [147]. Il existe un effet antagoniste entre la sensibilité à la chloroquine et à la méfloquine : la mutation 86Y diminue la sensibilité des parasites à la chloroquine, mais augmente celle de la

méfloquine. De même, l'augmentation du nombre de copies du gène (86N) augmente la résistance à la méfloquine et à l'inverse accroît la sensibilité à la chloroquine.

3.2.2.3. *P. falciparum* dihydrofolate reductase (Pfdhfr)

Ce gène, situé sur le chromosome 4, code pour une enzyme intervenant dans la voie de synthèse des folates [150]. Elle est la cible des médicaments antifolates (pyriméthamine, par exemple) qui, en inhibant son activité enzymatique, entraînent le blocage de la synthèse des pyrimidines et la réplication de l'ADN parasite [111]. L'accumulation de plusieurs mutations spécifiques au sein de cette protéine (codons 59N→R, 51C→I, 108S→N et 164I→L) entraînent la résistance clinique des parasites à l'action des antifolates.

3.2.2.4. *P. falciparum* dihydroptéroate synthase (Pfdhps)

La dihydroptéroate synthase (DHPS) est une autre enzyme intervenant dans la synthèse des folates (le gène correspondant est situé sur le chromosome 8). Elle est inhibée par les sulfamides. Les mutations se situant au niveau des codons 436 (S→A/F), 437 (K→G), 540 (K→E), 581 (A→G), 613 (A→S/T) confèrent une résistance à la sulfadoxine [151]. L'analyse groupée des mutations au niveau des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* permet de prévoir l'efficacité clinique de l'association sulfadoxine-pyriméthamine, largement utilisée en Afrique chez la femme enceinte en traitement préventif intermittent (TPI) ou en association avec l'artésunate en traitement curatif.

3.2.2.5. *P. falciparum* cytochrome b (Pfcytb)

Porté par le génome mitochondrial, le gène *cytb* code pour le complexe cytochrome bc1 intervenant dans le transport des électrons et la synthèse de l'ATP, et cible de l'atovaquone. Les mutations au niveau du codon 268 (Y→N/S/C) diminuent l'efficacité théorique de l'association atovaquone/proguanil actuellement largement utilisée en chimioprophylaxie par les voyageurs [152]. Aucune mutation n'a pu être mise en évidence sur des isolats sauvages. Les mutants retrouvés ont tous été identifiés chez des patients au décours d'un traitement par l'atovaquone (sélection

intra-hôte), et entraînent une diminution importante de la sensibilité du parasite à l'atovaquone.

3.2.2.6. *P. falciparum* sodium/hydrogen exchanger gene (Pfnhe-1).

Le gène Pfnhe-1 (chromosome 13) code pour une protéine impliquée dans les mécanismes d'homéostasie parasitaire comme la régulation du pH, le volume et la composition ionique du cytoplasme [153]. Il a été en particulier montré que le niveau d'expression de la protéine PfNHE influençait la sensibilité des parasites à la quinine en liaison avec d'autres facteurs, et que certains allèles du microsatellite intragénique ms4760 étaient associés à des diminutions de sensibilité *in-vitro* d'isolats ou de clones de *P. falciparum* adaptés en culture [81].

Tableau 1 : Gènes impliqués dans la chimiorésistance de *P. falciparum*

Antipaludiques	Gènes impliqués*
Amodiaquine	<i>Pfcr1, pfmdr1</i>
Artémisinine	<i>pfATPase6, K13</i>
Atovaquone	<i>pfcyt b</i>
Chloroquine	<i>Pfcr1, pfmdr1</i>
Méfloquine	<i>pfmdr1</i>
Luméfantine	<i>pfmdr1</i>
Pipéraqune	<i>Pfcr1, pfmdr1</i>
Pyriméthamine	<i>Pfdhfr, plasmepsine 2,3</i> <i>Pf exonuclease</i>
Sulfadoxine	<i>Pfdhps</i>
Quinine	<i>Pfcr1, pfmdr1, pfnhe</i>

*Gènes mentionnés dans la littérature pour lesquels un lien quelconque a pu être établi (*in-vivo* ou *in-vitro*)

Tableau 2 : Marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques [50].

Médicament	Marqueur de résistance		Niveau de validation
	Gène ou locus	Allèle associé à la résistance ou à la diminution de sensibilité	
Chloroquine	<i>pfcr1</i>	Lys76Thr	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Amodiaquine	<i>pfmdr1</i>	Asn86Tyr	Association <i>in vitro</i>
	<i>pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Méfloquine	<i>pfmdr1</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vivo</i>
Sulfadoxine-Pyriméthamine	<i>pfdhfr</i>	Ser108Asn	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhfr</i>	Triple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile + Cys59Arg	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhps</i>	Ala437Gly	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhps</i>	Double mutation : Ala437Gly + Lys540Glu	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhfr</i> + <i>pfdhps</i>	Quintuple mutation : Ser108Asn (<i>dhfr</i>) + Asn51Ile (<i>dhfr</i>) + Cys59Arg (<i>dhfr</i>) + Ala437Gly (<i>dhps</i>) + Lys540Glu (<i>dhps</i>)	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfmrp</i>	Lys1466Arg	Association <i>in vivo</i>
Proguanil (cycloguanil)	<i>pfdhfr</i>	Ser108Thr + Ala16Val	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhfr</i>	Double/triple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile et/ou + Cys59Arg	Association <i>in vivo</i>
Atovaquone	<i>pfcytb</i>	Tyr268Asn ou Tyr268Ser	Association <i>in vivo</i>
Luméfantine	<i>pfmdr1</i>	Asn86 & Nombre de copie > 1	Sélection d'allèle en cas d'échec thérapeutique
Quinine	<i>pfmhe-1</i> (ms4760)	Nombre de motifs : DNNND > 2 ou NHNDNHNNDDD < 3	Association <i>in vitro</i>
	<i>pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Doxycycline	<i>pftetQ</i>	Nombre de motif KYNNNN < 3	Association <i>in vitro</i>
	<i>pftetQ</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
	<i>pfmdt</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
Artéméthér	<i>pfserca</i>	Ser769Asn	Association <i>in vitro</i> en Guyane

La sélection et la dissémination des données de nombreux groupes, dont ceux du RIIP-Palu, ont montré que l'émergence des résistances diffère selon les régions et la molécule utilisée. La résistance à la chloroquine est apparue dans quelques foyers à partir desquels elle a disséminé. Notre étude multicentrique a confirmé qu'un seul allèle de résistance provenant d'Asie du Sud-Est a disséminé à travers l'Afrique, et que cet allèle est distinct de celui qui a disséminé en Amérique du Sud [154].

L'analyse des variations temporelles des fréquences alléliques dans une zone d'endémie permet de reconstituer les flux géniques et, dans le cas d'une île comme Madagascar, d'identifier la porte d'entrée des résistances [[155] [156]] et donc de proposer des mesures de surveillance appropriées. Les facteurs qui contribuent à la sélection puis à la dissémination des résistances au sein des zones d'endémie sont encore incomplètement compris. Des travaux de modélisation réalisés sur la structure des populations et l'influence de l'endémicité, de la taille du réservoir et de la pression médicamenteuse, ont apporté un éclairage original sur les conditions dans lesquelles la résistance émerge, puis dissémine [[157] [158]]. Une étude réalisée dans un village sénégalais, dans lequel nous avons contrôlé de façon très stricte l'utilisation des médicaments, a fourni également des résultats surprenants éclairant d'un jour nouveau cette question [146].

3.2.2.7. Conclusion sur les méthodes de détection de la résistance aux antipaludiques

La dissémination des résistances de *P. falciparum* et *P. vivax* à des médicaments bon marché et faciles d'accès est un défi important pour les programmes de lutte contre le paludisme. Les travaux de recherche fondamentale effectués dans les pays développés qui disposent de technologies de pointe sont souvent réalisés sur les souches de référence, récoltées puis entretenues en laboratoire depuis plusieurs décennies. Sur le terrain, les parasites ont depuis été soumis à de nombreuses pressions médicamenteuses et ont évolué pendant plus d'une centaine de générations. Il est donc indispensable que l'efficacité des médicaments en développement soit étudiée sur des souches contemporaines et provenant de différentes régions du monde. Les laboratoires situés en zone d'endémie ont une position stratégique pour participer au développement de nouveaux médicaments ou de nouvelles combinaisons médicamenteuses. De nouveaux problèmes, comme l'émergence de la résistance aux artémisinines, nécessitent une approche multidisciplinaire pour explorer de nouvelles hypothèses sur les mécanismes de résistance et faire avancer les connaissances fondamentales. L'accélération des développements technologiques et la masse de données générées doivent pouvoir bénéficier le plus rapidement possible aux équipes sur le terrain. Ceci nécessite une bonne structuration des réseaux de collaborations locales et internationales.

4. METHODOLOGIE

4.1. Cadre et lieu d'étude

Cette étude entre dans le cadre d'un projet de recherche sur la diversité génomique du *Plasmodium* au Mali. L'étude s'est déroulée dans deux faciès épidémiologiques différents au Mali : le village de Dangassa dans la région de Koulikoro et la ville de Nioro du Sahel dans la région de Kayes

4.1.1. Village de Dangassa

Le village de Dangassa et ses hameaux de culture (Kansamana, Somonoso et Sonkoroni) sont situés à ~82 km au Sud-ouest de Bamako sur la route nationale 7 (RN7), dans le district sanitaire de Ouelessebougou, Cercle de Kati dans la région de Koulikoro. Autrefois Dangassa, s'appelait Tintinibilé (plateau rouge), selon Ladjji Camara, le vaccinateur de l'Association de Sante Communautaire (ASACO). Le village aurait été fondé vers le 13^e siècle par Mansa Dan Camara venu de Kong. 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.

La population du village est estimée à onze milles (11 000 ; recensement MRTC 2019) habitants et est composé essentiellement de malinké. On dénombre quelques familles Peuhls, Somono, Dogon, Mossi et Bambara. Les femmes représentent plus de la moitié du village. etc.

Il est limité à l'Est par le village de Balla, 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 (figure 5).

4.1.2. Nioro du Sahel

L'étude s'est déroulée au centre de santé de référence de Nioro du Sahel. La ville de Nioro du Sahel est située 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 la latitude 14°30 et 16°30 nord et la longitude 11°00 et 9°00-Ouest. Nioro du Sahel est le chef-

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

lieu de la commune et du Cercle du même nom. Il compte 16 communes et couvre une superficie de 11 060 km² (figure 5). La population de Nioro du Sahel est cosmopolite et composée des Soninkés, Peuls, Maures, Kagoro et Bambara. Elle est estimée à 260 000 habitants (sources DNCT, 2019). 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.

Le climat est nord sahélien avec deux saisons bien marquées : l'hivernage va de juillet à septembre avec une précipitation moyenne annuelle de 300 mm de pluies. Une saison chaude allant d'avril en juin où la température moyenne peut aller jusqu'à 45°C. 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 senegal* au nord du cercle). L'agriculture et l'élevage restent les deux occupations majeures des ruraux. Le commerce et l'artisanat sont assez bien développés dans la ville de Nioro. La commune urbaine de Troungoumbé abrite le plus grand marché à bétail de la région.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

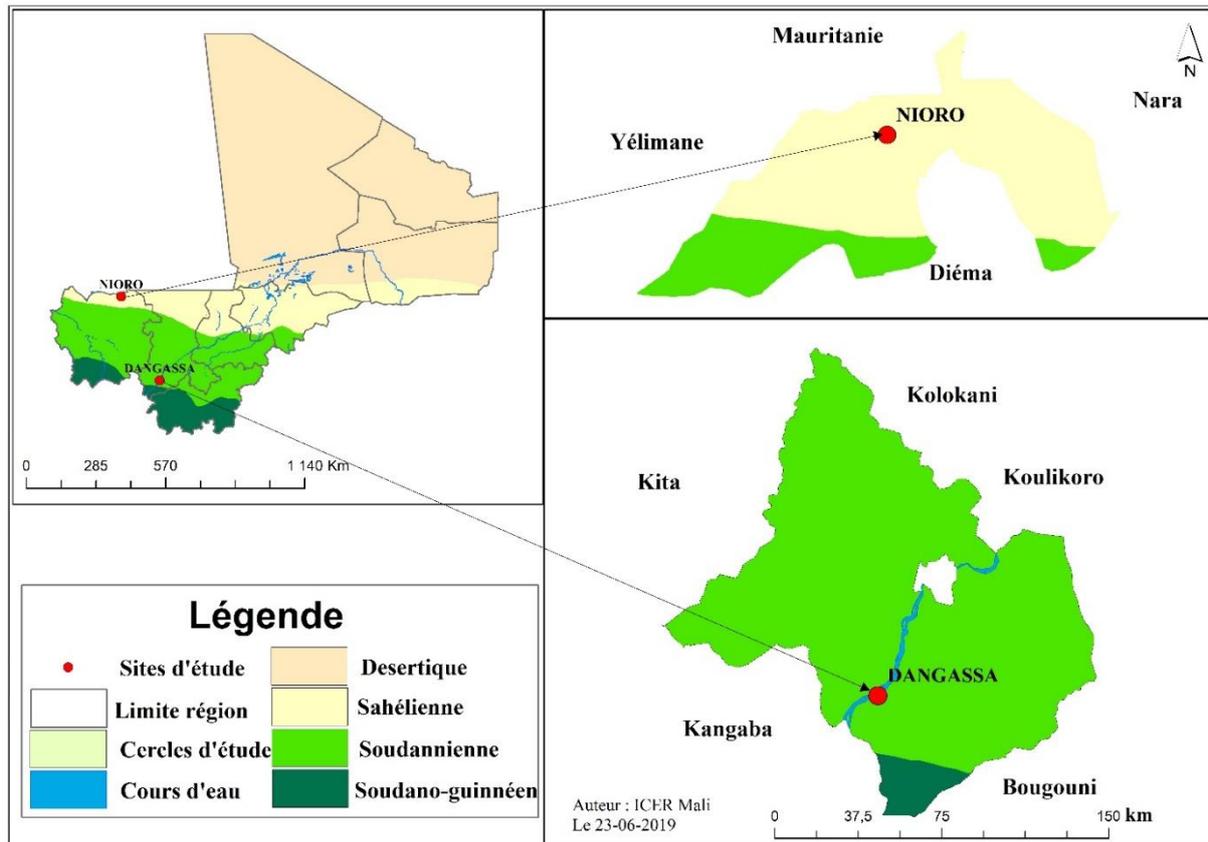


Figure 5 : Carte des deux sites d'étude

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

4.2. Type et période d'étude

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

4.3. Population d'étude

La population d'étude était constituée des patients âgés de 6 mois et plus se présentant aux centres de santé des deux sites avec des symptômes évoquant le paludisme (fièvre, céphalée etc...).

4.4. Echantillonnage

Au cours de la période d'étude, nous avons fait un échantillonnage exhaustif de tous les patients reçus en consultation dans les centres de santé des deux sites (CSRéf et CSCom) par prélèvement de sang ; les papiers buvard étaient imbibés de sang parasité ultérieurement utilisés pour extraire l'ADN.

4.5. Critères d'inclusion et de non-inclusion

4.5.1. Critères d'inclusion

Nous avons inclus tout patient remplissant les conditions suivantes :

- accepter de participer en donnant son consentement volontaire, libre et éclairé ;
- être âgé d'au moins 6 mois ;
- être vus en consultation dans les centres de santé des deux sites ;
- avoir un taux d'hémoglobine $\geq 8,5$ g/dl ;
- avoir une goutte épaisse (GE) positive au *P. falciparum* ;
- avoir une parasitémie ≥ 5000 trophozoïtes / μ l de sang.

4.5.2. Critères de non-inclusion

Nous n'avons pas inclus les patients suivants :

- les cas de refus de participation ;
- patients présentant une parasitémie inférieure à 5000 trophozoïtes par microlitre de sang total ;
- patients ayant un taux d'hémoglobine $< 8,5$ g/dl ont été exclus de l'analyse.

4.6. Variables mesurées

Au cours de notre étude, nous avons étudiés les variables suivantes l'âge, le sexe, la résidence du patient, la densité parasitaire, le taux d'hémoglobine.

En outre, l'analyse moléculaire a porté sur les codons connus impliqués dans la résistance aux antipaludiques :

- Codons du gène *Pfdhfr* 51, 59, 108 (Pyriméthamine) ;

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

- Codons du gène *Pfdhps* 437, 540 (Sulfadoxine) ;
- Codons du gène *Pfmdr-1* 86, 184, (Amodiaquine; Lumefantrine) ;
- Codon du gène *Pfexo* 415 (Pipéraquline) ; et
- Codon du gène *Pfcr1* 76 (Chloroquine)

4.7. Définitions opérationnelles

- **L'accès palustre** a été défini comme la présence d'au moins un signe (fièvre, frisson, sueur, céphalée) évoquant le paludisme et la présence de *P. falciparum* dans le sang.
- **L'accès palustre grave** a été défini comme présence de l'un des signes (fièvre intense, vomissement, convulsion, trouble de la conscience, prostration, détresse respiratoire, anémie sévère, ictère etc...) évoquant le paludisme grave selon l'OMS.
- **Un antipaludique** est tout composé naturel ou de synthèse qui, administré par voie orale, parentérale ou rectale, à dose unique ou répétée, permet d'éliminer les parasites du paludisme ou de bloquer leur croissance dans le but de prévenir ou de guérir la maladie.
- **L'Echec thérapeutique** se définit comme une incapacité à éliminer les parasites du sang du patient ou à prévenir leur recrudescence après l'administration d'un antipaludique
- **La chimiorésistance** est la capacité d'une souche parasitaire à survivre et/ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un médicament donné en doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées mais qui restent dans les limites de tolérance du sujet ;
- **Un marqueur moléculaire de résistance** est un allèle ou un groupe d'allèles d'un gène associés à une réduction significative de la sensibilité du parasite à une molécule donnée. L'étude a concerné les marqueurs de résistance à la chloroquine, à la sulfadoxine, à la pyriméthamine, à la luméfandrine, à l'amodiaquine et la pipéraquline.

4.8. Techniques de laboratoire utilisées

Les techniques de laboratoire (détails en annexe) suivantes ont été réalisées au cours de notre étude :

- **la goutte épaisse** : Technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites sur le frottis sanguin épais.
- **le frottis mince** : Technique permettant une identification rapide des parasites sur le frottis sanguin mince et la détermination de l'espèce plasmodiale.
- **le taux d'hémoglobine a été déterminé en utilisant un appareil de type Hemocue[®] Hb201⁺** et des microcuvette pour l'hémoglobine.
- **l'Extraction d'ADN** a été faite à partir des papiers buvards imbibés de sang des patients positifs pour *P. falciparum* en utilisant le kit d'extraction Qiagen Kit (No. 56504, Qiagen, Crawley, UK)

4.9. Génotypage des marqueurs moléculaires de résistance

L'amplification et le génotypage de l'ADN parasitaire ont été effectués par nos partenaires de l'Institut Wellcome Trust Sanger de Cambridge au Royaume-Uni. Brevement, une amplification complète [159] ou partielle [160] du génome du parasite était réalisée à partir de l'ADN ainsi obtenu en utilisant des amorces spécifiques 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 [161].

4.10. Déroulement et procédures d'étude

Avant le démarrage de l'étude, une autorisation communautaire a été obtenue auprès du chef du village, des chefs de familles et des autorités communautaires et administratives.

D'Aout à décembre 2016, nous avons procédé à l'inclusion des participants dans l'étude. Chaque participant a été vu au niveau des trois postes suivants :

- **poste d'identification**, après l'obtention du consentement individuel libre, éclairé et volontaire, chaque participant a été identifié en lui affectant un numéro d'identification unique (ID) qui a été porté sur son dossier médical et sur ses échantillons biologiques.

- **poste d'examen clinique**, un interrogatoire suivi d'un examen clinique a été réalisé chez chaque participant. Cela nous a permis de recueillir les données cliniques sur un formulaire de report de cas.

- **poste biologique**, un prélèvement sanguin était fait au niveau du doigt pour réaliser les tests de laboratoire (GE, frottis mince, taux Hb). Le prélèvement sanguin veineux était centrifugé pour séparer le plasma du culot. Le plasma était utilisé pour rechercher des facteurs pouvant influencer les manifestations cliniques du paludisme. Et le culot contenant les globules rouge parasités était utilisé pour imbiber des papiers filtres ultérieurement utilisés pour extraire l'ADN parasite.

Après la lecture des frottis sanguins au microscope optique, les cas confirmés d'infection palustre étaient traités en utilisant la combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (Coartem[®]) dans le cas des accès palustres non-complicés. Les accès palustres graves et compliqués ont été traités en utilisant les sels de quinine en perfusion ou l'artéméther injectable en intramusculaire. En cas de complication nécessitant des actions thérapeutiques particulières, les patients étaient transférés à Bamako pour une meilleure prise en charge.

4.11. Collecte, gestion et analyse des données

Les informations ont été collectées sur les formulaires de report de cas (CRF). Les données ont été saisies sur Microsoft Excel 2007 et analysées avec le logiciel Stata 14. Les résultats ont été présentés sous forme de tableaux et de figures. Le test de Khi2 de Pearson a été utilisé pour comparer les groupes et le seuil de signification statistique a été fixé à 5%.

4.12. Considérations éthiques

Le protocole de recherche a été soumis à l'approbation du comité d'éthique de la faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie. Le consentement libre et éclairé a été obtenu de chaque participant avant son inclusion dans l'étude. Nous

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

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 bien formés sur ces bonnes pratiques. La confidentialité et la sécurité des données ont été assurées par les investigateurs sur le terrain. L'équipe de recherche clinique a utilisé du matériel à usage unique chez tous les participants.

5. RESULTATS

5.1. Résultats globaux

Au total, nous avons inclus au cours de notre étude, 269 participants dans les deux sites dont 79,2% provenaient de Dangassa. Le sexe ratio était de 1,3 en faveur du sexe féminin à Dangassa et de 2,7 en faveur du sexe masculin à Nioro du Sahel

5.2. Données sociodémographiques et cliniques

Tableau 3 : Répartition des patients en fonction du site d'étude et selon le sexe

Site d'étude/Sexe	Masculin N (%)	Féminin N (%)	Total N (%)
Dangassa	93 (43,7)	120 (56,3)	213 (100)
Nioro	41 (73,2)	15 (26,8)	56 (100)
Total	134 (49,8)	135 (50,2)	269 (100)

La majorité des participants ont été enrôlé à Dangassa (79,2%, 213/269). Le sexe-ratio était de 1,3 en faveur du sexe féminin à Dangassa et de 2,7 en faveur du sexe masculin à Nioro.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

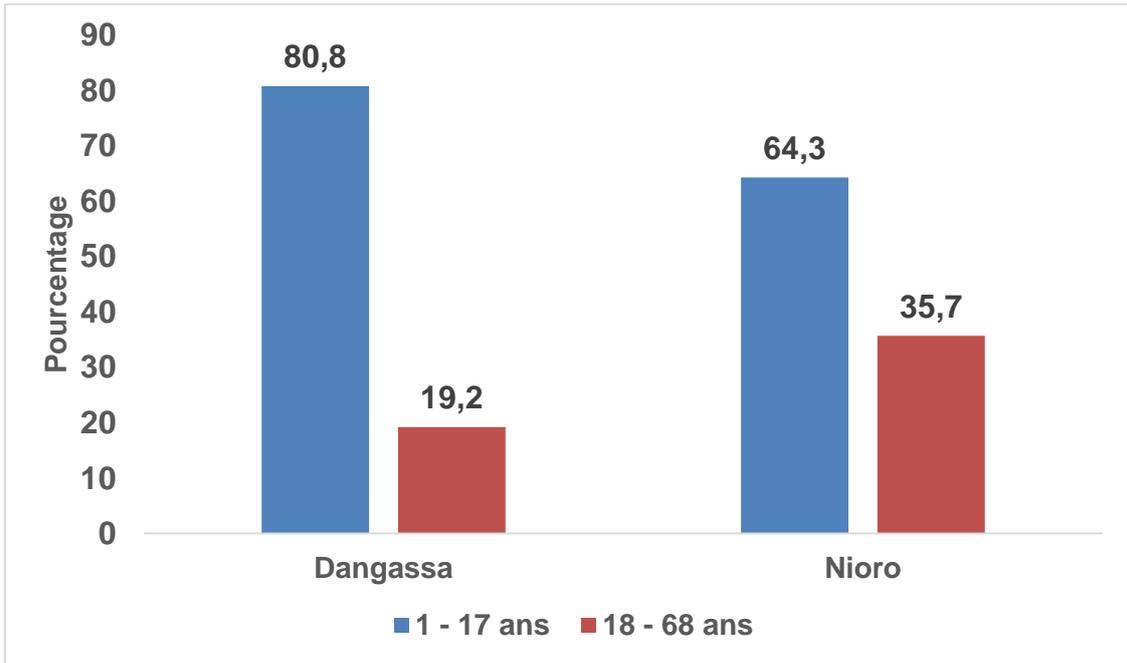


Figure 6 : Répartition des patients en fonction des classes d'âge et selon le site d'étude

Les patients âgés de 1 à 17 ans étaient majoritaires dans les deux sites avec 80.8% à Dangassa et 64,3% à Nioro du Sahel.

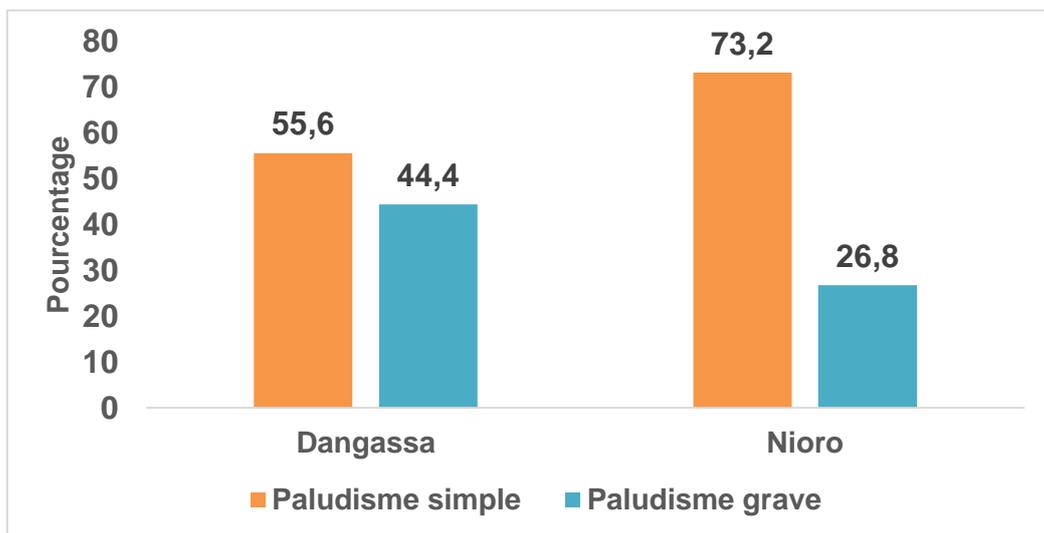


Figure 7 : Répartition des patients en fonction du phénotype clinique du paludisme à Dangassa et à Nioro du Sahel

La proportion du paludisme grave était plus élevée à Dangassa (44,4%) qu'à Nioro du Sahel (26,8% ; $p = 0,02$).

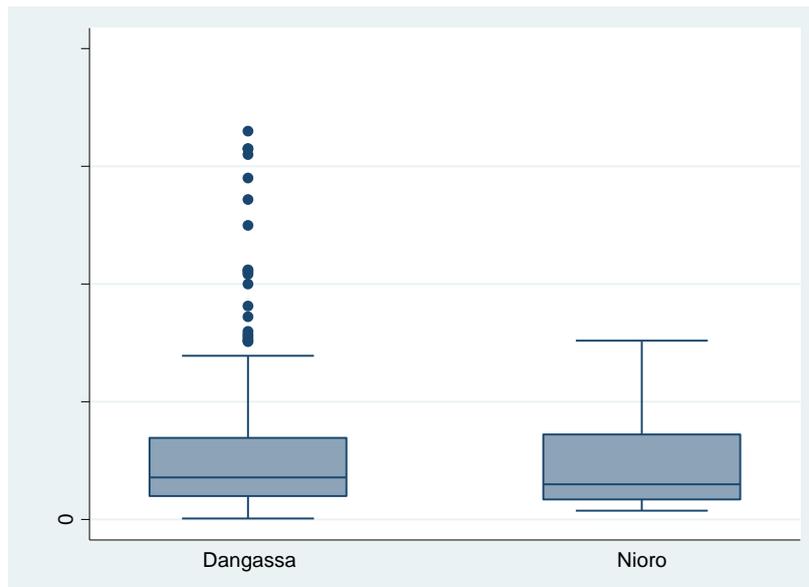


Figure 8 : Parasitémie moyenne en fonction des sites d'étude

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre Dangassa et Nioro du Sahel selon la moyenne géométrique de la densité parasitaire ($p = 0,17$).

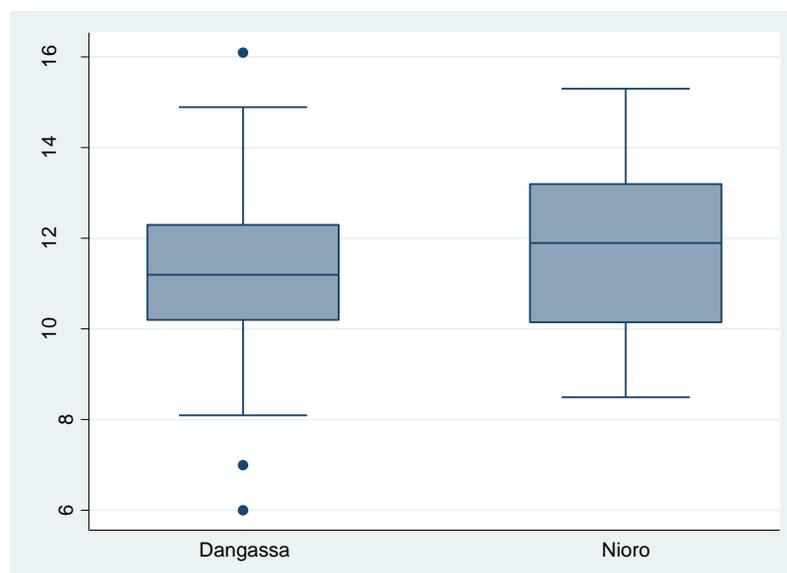


Figure 9 : Taux moyen d'hémoglobine en fonction des sites d'étude

Le taux moyen d'hémoglobine était statistiquement plus élevé à Nioro du Sahel qu'à Dangassa. ($P = 0,03$)

5.3. Analyse moléculaire des marqueurs de résistance aux antipaludiques

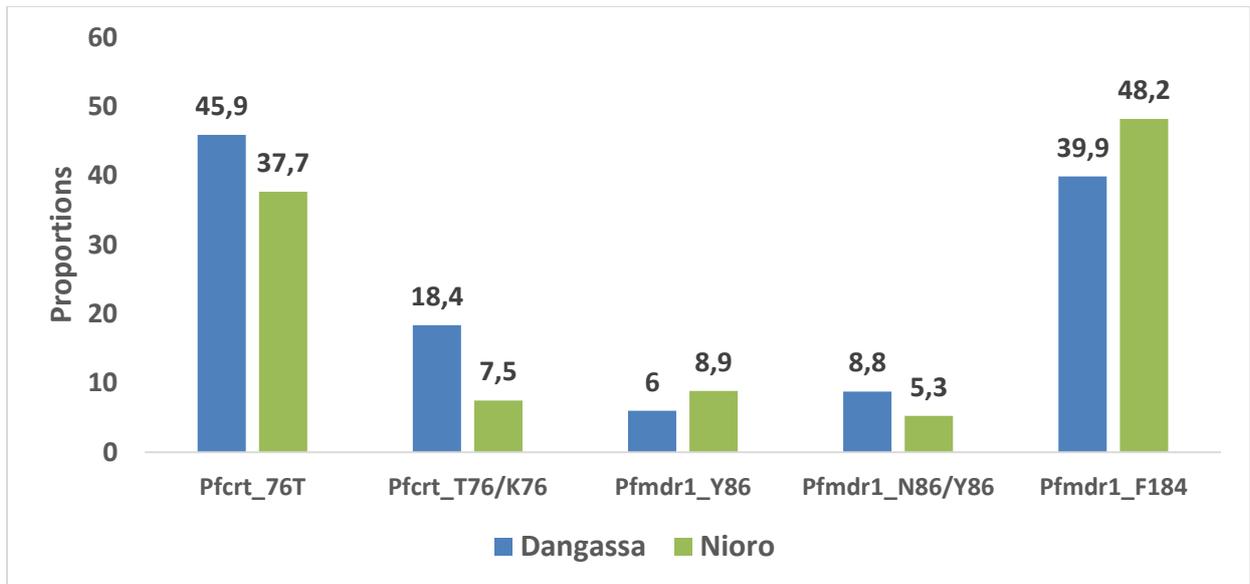


Figure 10 : Proportion des isolats de *P. falciparum* portant les génotypes *Pfcrt_K76*, *Pfcrt_76T* ; *Pfmdr1_86Y* et *Pfmdr1_F184* à Dangassa et à Nioro-du-sahel

Le génotype *Pfcrt-76T* était significativement plus prévalent à Dangassa [64,3% (45,9% 76T + 18,4% 76K/76T)] qu'à Nioro-du-Sahel [45,2% (37,7% 76T + 7,5% 76K/76T)] ($p = 0,025$). Une forte prévalence du génotype *Pfmdr_F184* a été observé dans les deux localités avec 39,9% et 48,2% à Dangassa et Nioro par contre le génotype *Pfmdr_Y86* a été retrouvé à une prévalence relativement faible avec respectivement 14,8% à Dangassa et 14,2% à Nioro du Sahel

Tableau 4 : Proportion de la mutation *PfExo415G* à Dangassa et à Nioro-du-sahel

EXO 415	Dangassa		Nioro-du-sahel		P
	N	%	N	%	
E	206	99.5	53	100	0.566
G	1	0.5	0	0.0	
Total	207	100	53	100	

Seuls 1 isolats de Dangassa présentait la mutation *Exo-E415G* de résistance à la piperaquine avec 0,5%. Une telle mutation n'a pas été trouvée à Nioro du Sahel

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

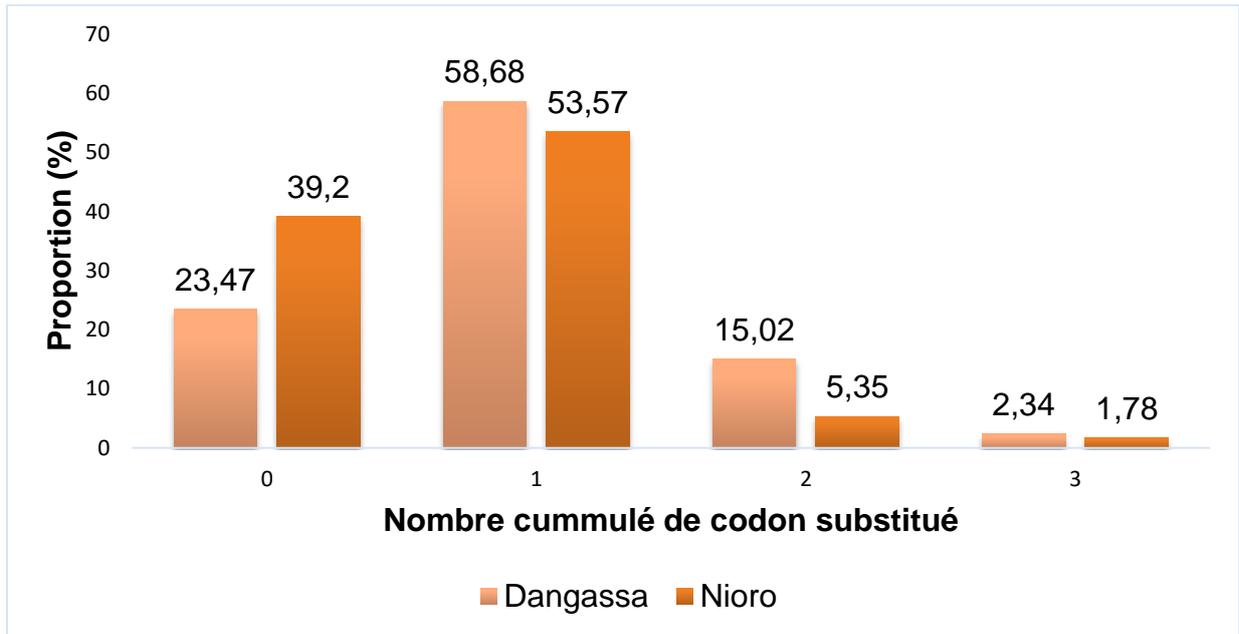


Figure 11. Proportion du nombre de substitution de codons accumulés dans le gène *Pfdhfr* aux positions 51, 59, 108 et 164 à Dangassa et à Nioro-du-sahel

Au cours de notre étude, nous avons observé un taux très élevé mais similaire de substitution dans les codons du gène *Pfdhfr* de résistance à la pyriméthamine aux positions 51, 59, 108 et 164 tant à Dangassa qu'à Nioro-du-Sahel ($p = 0,2$). Respectivement, 83,9% et 73% des isolats de Dangassa et de Nioro du Sahel ont montré au moins une substitution au niveau de ces codons. Cependant, la prévalence du génotype particulier de résistance à la pyriméthamine *Pfdhfr*_{51I-59R-108N} a atteint 14,1 % et 19,6 % à Dangassa et à Nioro-du-Sahel, respectivement.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

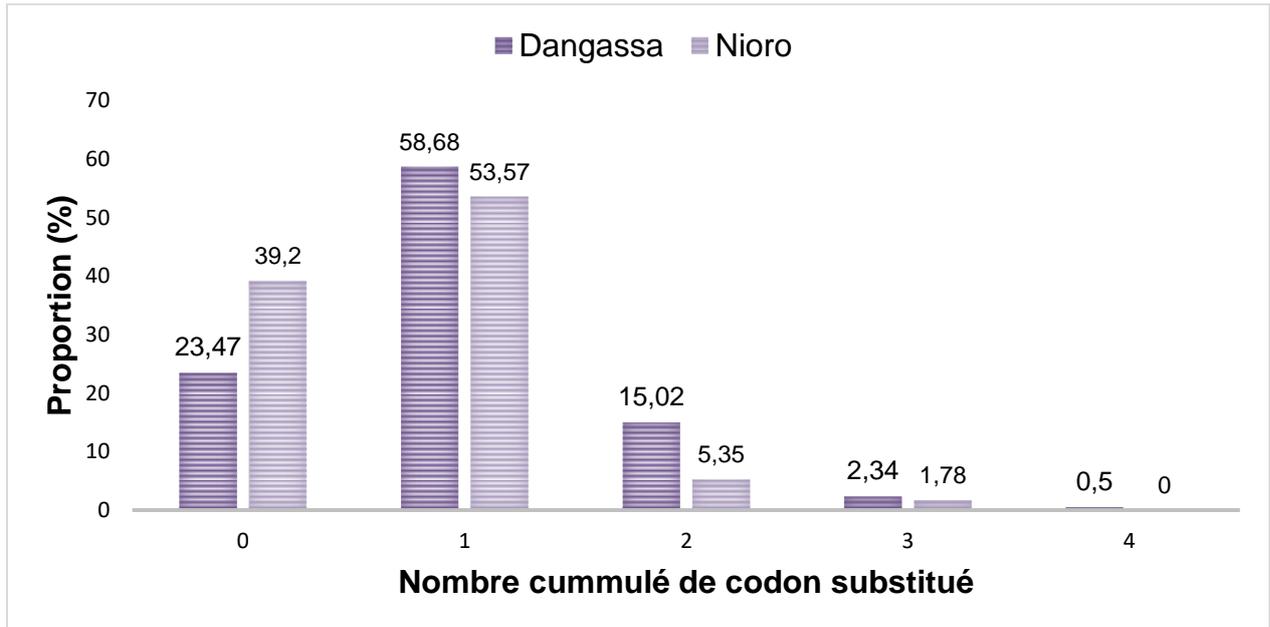


Figure 12 : Proportion du nombre de substitution de codons accumulés dans le gène *Pfdhps* aux positions 436, 437A, 540, 581 et 613 à Dangassa et Nioro-du-sahel

Un taux plus élevé de substitution de codons a été observé dans le gène *Pfdhps* résistant à la sulfadoxine aux positions 436, 437, 540, 581 et 613. Ces substitutions étaient plus fréquentes à Dangassa qu'à Nioro-du-Sahel ($p = 0,035$). Jusqu'à 17,86% des isolats de Dangassa contre 7,13% pour les isolats de Nioro-du-Sahel accumulant au moins deux (2) substitutions de codons ont été détectées au niveau de ces codons.

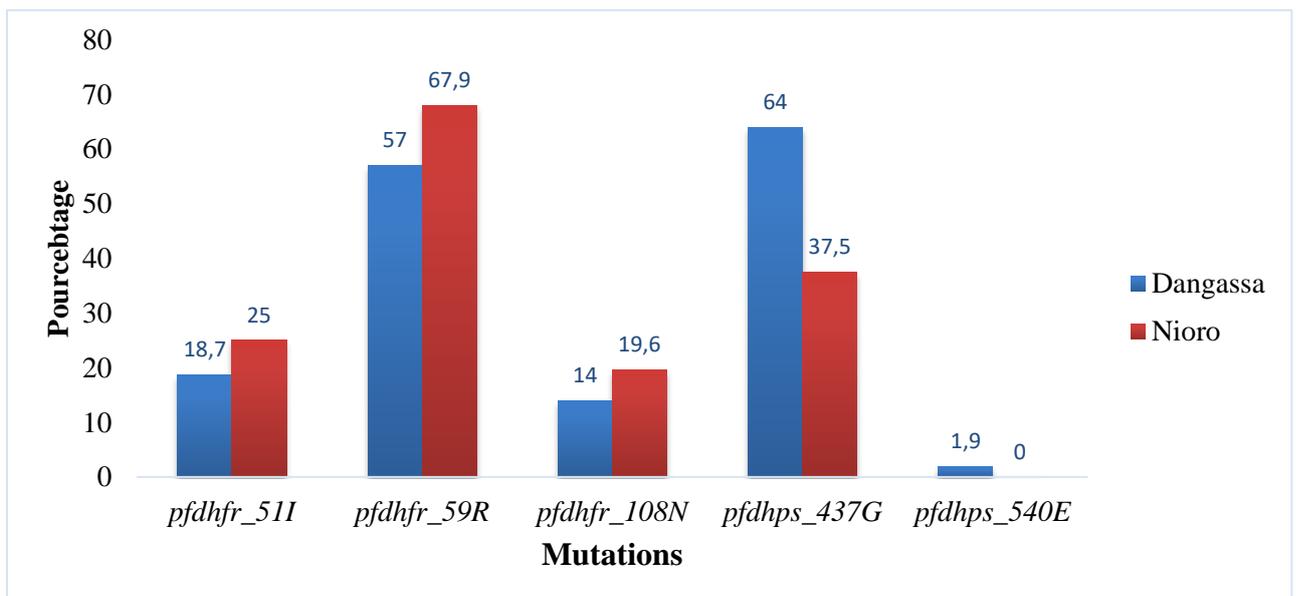


Figure 13 : Proportion des mutations constitutives des marqueurs moléculaires de résistance à la pyriméthamine et à la Sulfadoxine

L'haplotype particulier de résistance aux sulfadoxines *Pfdhps_437G-540E* a été trouvé dans quatre isolats de Dangassa, dont un seul présentait le génotype de résistance à la pyriméthamine (*Pfdhfr_51I-19R-108N*, la quintuple substitution *Pfdhps_437G-540E/Pfdhfr_51I-19R-108N*).

De toutes les mutations constitutives du marqueur moléculaire de résistance à la pyriméthamine (*Pfdhfr_51I-59R-108N*), la mutation *Pfdhfr_59R* était la plus prévalente avec 57% et 67,9%, respectivement à Dangassa et à Nioro du Sahel. Ces proportions étaient de 18,7% et 25% pour la mutation *Pfdhfr_51I* et de 14% et 19,6% pour la mutation *Pfdhfr_108N*. La mutation *Pfdhps_437G* du marqueur moléculaire de résistance à la sulfadoxine (*Pfdhps_437G, -540E*) était présente chez 64% des échantillons à Dangassa contre 37,5% à Nioro alors la mutation *Pfdhps_540E* n'a été détectée que chez 1,9% des échantillons de Dangassa. Aucun échantillon de Nioro n'a présenté cette mutation.

5.4 Resultats descriptifs

Tableau 5 : Proportion des haplotypes du gène *Pfcrt76T* à Dangassa et à Nioro-du-sahel

<i>PfCrt 76</i>	Dangassa		Nioro-du-sahel		P
	N	%	N	%	
T	85	45.9	20	37.7	0.025
T/K	34	18.4	4	7.5	
K	66	35.7	29	54.7	

Tableau 6 : Proportion des haplotypes du gène *Pfdhfr* à Dangassa et à Nioro-du-sahel

<i>Pfdhfr</i> 51, 59, 108, 164,	Dangassa		Nioro-du-sahel		P
	N	%	N	%	
-RNI	67	31.5	21	37.5	
--NI	43	20.2	4	7.1	
IRNI	30	14.1	11	19.6	
NCSI	17	8.0	10	17.9	
N**I	10	4.7	3	5.4	
I-NI	8	3.8	1	1.8	
N-SI	7	3.3	1	1.8	
NRNI	4	1.9	1	1.8	
-R*I	4	1.9	0	0.0	
N-*I	4	1.9	0	0.0	
N-NI	4	1.9	0	0.0	
-**I	2	0.9	1	1.8	
-HNI	3	1.4	0	0.0	
-*NI	2	0.9	0	0.0	
--*-	1	0.5	0	0.0	
--*I	1	0.5	0	0.0	
--N-	0	0.0	1	1.8	
--SI	1	0.5	0	0.0	
-CNI	1	0.5	0	0.0	
-R-I	1	0.5	0	0.0	
***I	0	0.0	1	1.8	
I-*I	0	0.0	1	1.8	
I*NI	1	0.5	0	0.0	
ICNI	1	0.5	0	0.0	
N*SI	1	0.5	0	0.0	0.213

Tableau 7 : Proportion des haplotypes du gène *Pfdhps* à Dangassa et à Nioro-du-sahel

<i>Pfdhps</i> 436, 437, 540, 581, 613	Dangassa		Nioro-du-sahel		P
	N	%	N	%	
-GKAA	49	23.0	2	3.6	
-AKAA	32	15.0	10	17.9	
SGKAA	28	13.1	10	17.9	
SG-AA	11	5.2	6	10.7	
AAKAA	7	3.3	6	10.7	
SAKAA	9	4.2	4	7.1	
-A-AA	4	1.9	5	8.9	
-*KAA	7	3.3	0	0.0	
-G-AA	7	3.3	0	0.0	
-GKAS	7	3.3	0	0.0	
*AKAA	4	1.9	1	1.8	
*GKAA	5	2.3	0	0.0	
AA-AA	2	0.9	3	5.4	
AGKAA	2	0.9	2	3.6	
SA-AA	3	1.4	1	1.8	
*A-AA	3	1.4	0	0.0	
-G-A*	2	0.9	0	0.0	
-GEAA	2	0.9	0	0.0	
-GKA*	2	0.9	0	0.0	
*-KAA	2	0.9	0	0.0	
AG-AA	2	0.9	0	0.0	
AGKAS	1	0.5	1	1.8	
---AS	1	0.5	0	0.0	
--KAA	1	0.5	0	0.0	
-*KA*	1	0.5	0	0.0	
-*KAS	1	0.5	0	0.0	
-A-A*	0	0.0	1	1.8	

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

-AKG-	1	0.5	0	0.0	
-GK-A	0	0.0	1	1.8	
*-K--	1	0.5	0	0.0	
AKA	1	0.5	0	0.0	
G-A	1	0.5	0	0.0	
*G-AA	1	0.5	0	0.0	
GEA	1	0.5	0	0.0	
AAKA*	0	0.0	1	1.8	
AAKG-	1	0.5	0	0.0	
AG-A*	1	0.5	0	0.0	
AG-AS	1	0.5	0	0.0	
AGKA-	1	0.5	0	0.0	
FA-AS	1	0.5	0	0.0	
S----	1	0.5	0	0.0	
S—AA	0	0.0	1	1.8	
S-K--	1	0.5	0	0.0	
S-KAA	0	0.0	1	1.8	
SA-A*	1	0.5	0	0.0	
SGEAA	1	0.5	0	0.0	
SGKA*	1	0.5	0	0.0	
SGKAS	1	0.5	0	0.0	
SGKG-	1	0.5	0	0.0	0.035

Tableau 8 : Proportion des haplotypes du gène *Pfmdr* à Dangassa et à Nioro-du-sahel

	Dangassa		Nioro-du-sahel		P
	N	%	N	%	
<i>Pfmdr</i> 186, 184, 1246					
NFD	85	39.9	27	48.2	
NYD	42	19.7	11	19.6	
N*D	26	12.2	2	3.6	
N-D'	19	8.9	4	7.1	
YFD	11	5.2	4	7.1	
*FD	8	3.8	2	3.6	
**D	4	1.9	1	1.8	
*-D	4	1.9	0	0.0	
*YD	3	1.4	0	0.0	
NF-	2	0.9	1	1.8	
N--	0	0.0	2	3.6	
N*-	2	0.9	0	0.0	
--D	1	0.5	0	0.0	
-*D	1	0.5	0	0.0	
-Y-	1	0.5	0	0.0	
-YD	0	0.0	1	1.8	
NY-	1	0.5	0	0.0	
NYY	1	0.5	0	0.0	
YFY	1	0.5	0	0.0	
YYD	1	0.5	0	0.0	
YYY	0	0.0	1	1.8	

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

La résistance des agents pathogènes aux antimicrobiens, menace la vie des gens dans le monde entier. Le paludisme touche des centaines de millions de personnes chaque année, dont la quasi-totalité sont des enfants dans les pays où l'accès aux soins de santé est le plus limité. Dans ce contexte, la résistance aux antimicrobiens a des conséquences désastreuses. Le traitement du paludisme est basé sur des directives qui peuvent être lentes à changer en réponse aux schémas de résistance et ne sont pas adaptées à l'infection spécifique de chaque patient. Lorsqu'un médicament antipaludique est défaillant, les résultats cliniques ne sont pas immédiatement évidents. Même lorsque l'efficacité est compromise, les patients réagissent d'abord au traitement, mais en quelques semaines, les parasites réapparaissent et l'infection réapparaît. Lorsque l'accès aux soins de santé est limité, un deuxième épisode d'infection peut ne pas être pris en charge par un médecin. Ainsi, même avec une efficacité clinique légère et réduite, une résistance aux médicaments peut apparaître et se propager rapidement, ce qui se traduit par une augmentation de la gravité du paludisme et de la mortalité en Afrique subsaharienne. La propagation de la résistance à la chloroquine a été l'un des principaux facteurs de l'échec de la première campagne d'éradication du paludisme au milieu du XXe siècle. Aujourd'hui, l'émergence d'une résistance aux antipaludiques actuellement utilisés menace les derniers efforts visant à éliminer et, à terme, à éradiquer le paludisme.

6.1. Choix et caractéristiques des sites d'étude

L'étude s'est déroulée dans deux zones éco-climatique différentes du Mali arborant des paramètres d'endémicité palustre différents. Nioro du Sahel est une ville située dans une zone de faible transmission palustre avec une courte saison de pluies de juillet à septembre. Il est représentatif de l'ensemble du septentrion Malien avec un paludisme instable. En revanche, Dangassa est un village situé le long du fleuve Niger dans la zone guinéenne avec une longue saison des pluies de juin à octobre/novembre. Le paludisme est stable avec une longue saison de transmission palustre. Dangassa est représentatif de l'ensemble des régions situées au sud du Mali.

La majorité des participants résidait à Dangassa, soit 79,2%. Le sex-ratio était de 1,3 en faveur du sexe féminin à Dangassa et de 2,7 en faveur du sexe masculin à Nioro. La grande représentativité des échantillons de Dangassa pourrait s'expliquer par la différence d'endémie palustre entre les deux localités. La transmission du paludisme est plus longue et plus intense à Dangassa comparée à Nioro du Sahel. La proportion des accès palustres graves et compliqués était plus élevée à Dangassa (44,4%) comparée à Nioro du Sahel (26,8% ; $p = 0,02$; figure 7). En revanche, à l'inverse du taux moyen d'hémoglobine ($p = 0,03$; figure 9) Dans les zones d'endémies palustres comme Dangassa, le phénotype clinique dominant du paludisme est l'anémie. Cette observation pourrait être liée à la forte endémicité du paludisme à Dangassa. En effet, dans les zones d'endémie palustre, la prémunition contre le paludisme, une immunité non stérilisante qui s'installe avec l'âge, maintient chez les sujets une parasitémie subclinique responsable d'inflammation chronique elle-même induisant une anémie [162],

La moyenne géométrique de la parasitémie était comparable entre les deux sites avec $29342,771 \pm 31265,7184$ Tf/ μ l à Dangassa contre $23281,473 \pm 20015,8429$ Tf/ μ l à Nioro du Sahel ($p = 0,17$; figure 8). Dans les zones d'endémie palustre, le portage des parasites est fréquent sans manifestation clinique à cause de l'immunité naturellement acquise ce qui explique des parasitémies plus élevées dans ces zones que dans les zones instables.

Nous avons également remarqué que les enfants étaient prédominants à Dangassa qu'à Nioro du sahel, confirmant la grande vulnérabilité des enfants au paludisme.

6.2. Étude des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques

La pression exercée par les médicaments est l'une des pressions sélectives les plus fortes sur le génome du paludisme, fournissant certains des exemples les plus illustratifs de balayage sélectif dans la littérature scientifique. Au cours d'un balayage sélectif, les loci neutres liés augmentent en fréquence avec des allèles avantageux. Ces "cicatrices" génomiques peuvent être utilisées pour identifier les loci responsables de la résistance aux médicaments, comme cela a été fait récemment pour la résistance aux artémisinines et à d'autres médicaments [[163] [164] [165] [166]].

Dans cette étude, nous avons exploré la dynamique de l'émergence et de la propagation de la résistance aux médicaments antipaludiques, ainsi que le sort de la résistance aux médicaments à mesure que les politiques de traitement évoluent. Notre objectif est d'identifier les marqueurs moléculaires de résistance aux médicaments au Mali et de décrire comment la compréhension actuelle de la résistance aux nouveaux médicaments antipaludiques peut aider à prédire leur utilité future.

6.2.1. Résistance à la chloroquine et autres amino-quinoléines

La chloroquine agit en empêchant la détoxification de l'hématine dans la vacuole digestive du parasite [[167] [114]]. La résistance est causée par des mutations dans le transporteur de résistance à la chloroquine de *Plasmodium falciparum* (*PfCRT*), la mutation en position 76 (*K76T*) étant particulièrement critique pour le phénotype de résistance [168]. Si la mutation du *pfcr*t conduisant à la substitution *K76T* est nécessaire pour la résistance à la chloroquine, elle n'est pas isolée et fait partie d'une série complexe de neuf substitutions d'acides aminés, qui peuvent être de nature compensatoire. L'examen des loci microsatellites flanquant le *pfcr*t a indiqué que la résistance à la chloroquine est apparue au moins quatre fois : une fois en Asie du Sud-Est (s'étendant à l'Afrique), une fois en Papouasie-Nouvelle-Guinée et deux fois en Amérique du Sud [169]. La propagation de la résistance à la chloroquine a nécessité l'émergence d'une souche résistante de *Plasmodium* ayant une aptitude suffisante pour survivre et se propager à travers les continents dans le contexte d'une utilisation généralisée de la chloroquine. Si le schéma de propagation de la résistance à la chloroquine et la présence de l'utilisation de la chloroquine sont clairs, la suppression de la pression exercée par la drogue en Asie du Sud-Est, dans le Pacifique Sud et en Amérique du Sud n'a pas modifié la forte prévalence des parasites résistants à la chloroquine.

Au cours de notre étude, la proportion du marqueur de résistance à la chloroquine (*Pfcr*t76T) était plus élevée à Dangassa (64,3%) comparée à Nioro du Sahel (45,2% ; $p = 0,025$; tableau 4). Dans le village de Kollé situé dans la même zone éco-climatique que Dangassa, la prévalence de ce marqueur était de 85% en 2002 et 64,5% en 2003 [170]. La présence de parasites résistants à la chloroquine en Asie du Sud-Est reste fixée à 100% ou presque, même dans les études publiées

récemment [[171] [172]]. En Amérique du Sud, des résultats similaires ont été observés dans divers pays. Au Venezuela et en Amazonie péruvienne, les parasites chloroquinorésistants sont restés fixes dans la population après que l'utilisation de la chloroquine a été remplacée par une thérapie combinée à base d'artémisinine (CTA) [[173] [174]].

La mutation de résistante *Pfmdr1-N86Y* à l'amodiaquine a été identifiée dans 14,8% (6% *Pfmdr1-Y86* + 8,8% *Pfmdr1-N86/Y86*) et 14,2% (8,9% *Pfmdr1-Y86* + 5,3% *Pfmdr1-N86/Y86*) des échantillons de Dangassa et de Nioro-du-Sahel, respectivement (figure 10). Comparée à la chloroquine, l'amodiaquine a été très peu utilisée au Mali et a donc eu une faible sur *P. falciparum* dans la zone. Seuls deux (2) isolats de Dangassa présentaient la mutation *Exo-E415G* de résistance à la piperazine avec 1%. Une telle mutation n'a pas été trouvée à Nioro du Sahel.

Plus important encore, la mutation *Pfmdr1_184F* de sensibilité réduite à la luméfantine a été trouvée dans 39,9% et 48,2% des échantillons de Dangassa et de Nioro-du-Sahel, respectivement. Les prévalences élevées du marqueur de résistance à la luméfantine, observés au cours de notre étude, paraissent inquiétantes dans la mesure où cette molécule est la plus fréquemment associée aux dérivés de l'artémisinine au Mali pour le traitement de l'accès palustre simple selon la recommandation du programme nationale de lutte contre le paludisme. Cette observation demande des investigations plus approfondies par rapport à l'efficacité de cette molécule sur les isolats de parasites dans nos zones d'études.

6.2.2. Retour de la sensibilité à la chloroquine observé en Afrique

Malgré la reconnaissance de la résistance généralisée à la chloroquine en Afrique, les pays africains étaient réticents à changer de politique de traitement. En 1993, le Malawi a été le premier pays africain à modifier la thérapie de première ligne de la chloroquine à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) en raison des taux élevés d'échec du traitement à la chloroquine. Un an seulement après l'élimination de la chloroquine, la proportion des infections dues à des parasites présentant la mutation critique *Pfcr1 K76T* a commencé à diminuer [175], était indétectable à Blantyre en 2001, et s'est révélée plus tard indétectable 12 ans après l'élimination de la chloroquine, l'efficacité de la chloroquine étant estimée à 99 %15, et la sensibilité à la chloroquine a été maintenue lorsqu'elle a été utilisée pour des épisodes répétés de paludisme au

Malawi [145]. Le retour spectaculaire de l'efficacité de la chloroquine en 2005 peut être dû à plusieurs mécanismes différents : la propagation d'un génotype sensible très bien adapté, tout comme la résistance à la chloroquine s'est répandue ; une rétomutation en position 76 du *Pfcr*t pour rétablir la sensibilité à la chloroquine dans le même contexte génétique ; ou la réexpansion de divers parasites sensibles à la chloroquine qui ont survécu à une période de pression médicamenteuse de la chloroquine et dont la fréquence a augmenté après l'élimination du médicament. Dans une étude publiée en 2010, des microsatellites ont été utilisés pour examiner les régions génomiques flanquant le *pfcr*t chez les parasites avant et après le changement de politique en matière de médicaments au Malawi et les auteurs ont constaté que le retour de la sensibilité à la chloroquine était dû à la résurgence de divers parasites sensibles à la chloroquine qui avaient survécu à la pression des médicaments, peut-être chez des hôtes cliniquement immunisés [176]. Ces résultats suggèrent qu'il y a un coût d'adaptation pour le parasite associé aux mutations du *pfcr*t en l'absence de pression de la chloroquine.

6.3. Résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine

La sulfadoxine-pyriméthamine (SP) est une thérapie combinée qui cible la dihydrofolate réductase (*PfDHFR*) et la dihydropteroate synthase (*PfDHPS*) dans la voie de biosynthèse du folate. La résistance est associée à l'accumulation progressive de mutations dans les gènes codant pour ces enzymes, y compris au niveau des codons 51, 59, 108 et 164 de la *PfDHFR* et des codons 437, 540 et 581 de la *PfDHPS* [[177] [178]]. Plus les mutations s'accumulent dans ces gènes, plus la résistance conférée au parasite est importante. Par exemple, la mutation S108N confère au parasite une certaine tolérance à la pyriméthamine, tandis que le triple mutant N51I/ C59R/S108N est très résistant à la pyriméthamine. Au cours de notre étude, nous avons observé un taux élevé de substitution du gène *Pfdhfr* impliquées dans la résistance à la pyriméthamine aux positions 51, 59, 108, 164 tant à Dangassa qu'à Nioro du Sahel (figure 11 ; p = 0,02). Cependant, la prévalence du génotype particulier de résistance à la pyriméthamine *Pfdhfr_51I-59R-108N* a atteint 14,1 % et 19,6 % à Dangassa et à Nioro-du-Sahel, respectivement.

D'après l'examen des microsatellites flanquant le *pfdhfr*, la mutation ponctuelle entraînant la mutation *DHFR S108N* se produit localement et relativement

fréquemment, tandis que l'haplotype triple mutant *N51I/C59R/S108N* hautement résistant à la pyriméthamine semble avoir émergé une fois en Asie du Sud-Est, s'étendant en Afrique [179]. Un schéma similaire a été observé avec le *DHPS*, avec des lignées hautement résistantes qui ont émergé en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud, puis se sont propagées de l'Asie du Sud-Est vers l'Afrique [180]. Comme le schéma de la persistance du paludisme chloroquinorésistant observé en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud, une forte prévalence des mutations *DHFR* et *DHPS* est restée dans certaines populations de parasites dans ces régions, même après la suppression de l'utilisation courante de la SP. Par exemple, on a constaté que les mutants *DHFR* et *DHPS* résistants à la SP étaient fixés au Venezuela 8 ans après la suppression de la SP. Il a été démontré que ces parasites avaient une origine unique différente de celle des parasites d'Asie et d'Afrique [181].

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. En revanche, des proportions très faibles de ces marqueurs ont été retrouvés à Dangassa avec respectivement 1,9% et 0,5%. Nos résultats confirment les observations rapportées par Tékété et al en 2003 à Kollé [182] une localité située dans la même zone géographique que Dangassa sur l'autre rive du fleuve ; ce qui confirme l'efficacité du SP dans les différentes zones du Mali. La SP est actuellement utilisée en traitement préventif intermittent chez les femmes enceinte et en chimio prévention saisonnière chez les enfants de moins de 5 ans. Cette stratégie maintient une forte pression sur la SP, augmentant le risque de propagation de la résistance. Elle doit s'accompagner d'une surveillance accrue de parasites résistants à la SP.

Au Mali, il y a eu des rapports sur le *Pfdhps 581G*, l'un provenant d'une enquête menée à Bandiagara en 2000 [183] et un autre effectué avant 1997 [184]. Les implications de cette mutation sur l'efficacité de la SP-IPTi sont inconnues et malheureusement, les enquêtes récentes n'ont pas testé le *581G*, de sorte que la situation actuelle en ce qui concerne cette mutation au Mali est inconnue. Cependant, la rareté du *540E* au Mali a été confirmée par des enquêtes récentes à grande échelle [[170] [185] [186]]. Une étude qui a eu lieu au sud du Mali dans la région de Sikasso avait montré une augmentation de la prévalence des marqueurs de résistance à la pyriméthamine et à la sulfadoxine [187].

6.4. Maintien de la résistance à la SP en Afrique

L'utilité de la SP a également été gravement compromise en Afrique en raison d'une résistance généralisée. Alors que l'efficacité de la chloroquine était estimée à 99 % 15 dans l'essai clinique mené à Blantyre en 2005, l'efficacité de la SP n'était plus que de 21 % [145]. Au moment où la thérapie de première ligne est passée de la SP aux CTA en 2007, la prévalence du triple mutant *DHFR N51I/C59R/S108N* et du double mutant *DHPS A437G/K540E* hautement résistant était >95 %. Cette prévalence est restée élevée en 2012, 5 ans après le passage de la SP aux CTA, et était élevée à Blantyre, ainsi que dans deux autres sites ruraux où la transmission du paludisme est plus élevée. En outre, la prévalence du triple mutant *DHPS 437G/540E/581G*, qui est associée à l'échec du traitement préventif intermittent chez les femmes enceintes [188], est passée de 0% en 1999 à 4% en 2012 [189]. L'examen des balayages sélectifs avant, pendant et après le passage de la SP aux CTA a montré que les caractéristiques des balayages n'ont guère changé avec le temps. Contrairement à la chloroquine, ces résultats suggèrent un coût d'adaptation faible ou nul des mutations de résistance à la SP en l'absence de pression médicamenteuse dans ce contexte épidémiologique. Par ailleurs, l'utilisation continue de la SP pour une thérapie préventive intermittente chez les femmes enceintes et/ou l'utilisation du triméthoprime/sulfaméthoxazole chez les personnes séropositives pourraient avoir entraîné un certain maintien de la pression médicamenteuse, même après le changement de politique en matière de médicaments. Cependant, à ce jour, il n'existe aucune preuve que le triméthoprime/sulfaméthoxazole ait un impact sur la prévalence des allèles SP résistants, ou que la résistance à la SP affecte l'efficacité du triméthoprime/sulfaméthoxazole [[183] [190]]. De plus, Iriemenam et al. ont trouvé que l'impact de la SP-IPTp (traitement préventif intermittent pendant la grossesse) sur l'augmentation des parasites résistants à la SP chez les femmes enceintes était mineur comparé à l'utilisation de la SP pour la gestion des cas dans la population générale [191]. Ainsi, ce ne sont probablement pas les seuls facteurs responsables de la prévalence élevée et soutenue des mutants résistants à la SP au Malawi.

6.5. Résistance aux dérivés de l'artémisinine

Les dérivés de l'artémisinine sont des médicaments à action rapide et bien tolérés qui sont souvent associés à des médicaments partenaires à action prolongée sous

forme de CTA, qui constituent aujourd'hui le traitement de première ligne contre *P. falciparum* dans le monde endémique palustre. Une résistance à l'artémisinine est apparue en Asie du Sud-Est, se manifestant par une clairance retardée de la parasitémie après un traitement aux dérivés de l'artémisinine [[23] [192] [193] [194]]. Il a récemment été démontré que cette résistance était associée à des mutations au sein d'une protéine kelch située sur le chromosome 13 (hélice K13) de *P. falciparum* [[28] [195]], et des loci secondaires peuvent également être impliqués [165]. Les mutations de l'hélice K13 ont été associées à un retard dans l'élimination des parasites dans plusieurs pays d'Asie du Sud-Est, notamment au Cambodge, au Vietnam et au Myanmar, et il a été démontré qu'elles se sont propagées entre les pays et qu'elles ont émergé indépendamment dans différents pays [[165] [24]].

Aucune PGB résistante aux artémisinine n'a été détectée dans nos isolats génotypés. Cependant, des substitutions isolées constitutives dans les codons de la PGB de résistance à l'artémisinine ont été trouvées.

6.6. Résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine en Afrique

L'émergence de la résistance aux artémisinines en Asie du Sud-Est offre une occasion sans précédent d'éviter de manière proactive la propagation en Afrique, où le paludisme est endémique, et le Plan mondial pour le confinement de la résistance à l'artémisinine [196], établi par l'Organisation mondiale de la santé, est mis en œuvre à cette fin. Cependant, la capacité du marqueur candidat de la résistance à l'artémisinine à émerger sur une variété de milieux peut signifier que la résistance à l'artémisinine émergera en Afrique indépendamment des efforts de confinement en Asie.

Le suivi des taux d'élimination des parasites après traitement par les CTA a été effectué sur différents sites en Afrique [[197] [198] [199]]. Dans l'ensemble, les parasites de *P. falciparum* semblent disparaître rapidement dans la plupart des pays africains échantillonnés à ce jour [[200] [198] [199]]. En revanche, une seule étude de Borrmann et al. a fait état d'une augmentation des taux de parasitémie au jour 1 et d'un risque accru de recrudescence parasitaire après un traitement par ACT de 2005 à 2008. Si les indices de retard de clairance observés dans l'étude de Borrmann pourraient suggérer une diminution de la sensibilité aux CTA, ils pourraient également refléter une diminution de l'immunité clinique au sein de la population

étudiée [201]. Malgré une clairance rapide des parasites dans toutes les études africaines menées jusqu'à présent, des mutations de l'hélice K13 ont été observées à de faibles niveaux chez les parasites des sites d'étude africains [[20] [198] [199]]. Beaucoup de ces mutations se trouvent dans la région de l'hélice K13, mais sont différentes des mutations observées en Asie du Sud-Est, et se produisent à de faibles fréquences, souvent au sein d'un seul site d'étude. La présence de mutations de l'hélice K13 en Afrique, où l'élimination du parasite est généralement rapide, suggère que toutes les mutations de l'hélice K13 ne sont pas associées à une résistance, que des loci secondaires sont impliqués dans la résistance et se trouvent en Asie mais pas en Afrique jusqu'à présent, ou que le phénotype de résistance est masqué par des niveaux élevés d'immunité antipaludique. Les implications pour la propagation ou l'émergence de la résistance à l'artémisinine en Afrique sont complexes. L'émergence indépendante de la résistance au Myanmar (par opposition à la propagation à partir du Cambodge) et la présence de mutations existantes de l'hélice K13 dans les pays africains mettent en évidence la possibilité d'une émergence indépendante de la résistance en Afrique. Cependant, si des mutations secondaires et/ou de fond sont nécessaires pour augmenter la résistance et que celles-ci ne sont pas trouvées chez les parasites africains, alors le niveau de résistance conféré par les mutations de l'hélice K13 peut être inférieur à celui observé chez les parasites ayant un fond génétique asiatique. Si les mutations K13 sur un fond génétique asiatique devaient se propager en Afrique, toute association avec des loci secondaires sur différents chromosomes pourrait être rapidement dissociée car les parasites se reproduisent avec divers parasites africains. Il est donc possible qu'il soit plus difficile pour la résistance à l'artémisinine de s'établir en Afrique qu'en Asie, bien que cela reste à voir. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre le rôle des mutations de l'hélice K13 africaine dans la résistance à l'artémisinine.

6.7. Comparaison de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques en Afrique et en Asie

Alors que le paludisme résistant à la chloroquine a rapidement été dépassé après l'élimination de la chloroquine comme traitement de première ligne au Malawi, un retour similaire des infections sensibles à la chloroquine n'a pas été observé en Asie.

Le caractère unique de ce phénomène en Afrique, mais pas en Asie, est probablement multifactoriel. L'utilisation de la chloroquine n'a jamais pu être éliminée en Asie ou en Amérique du Sud parce qu'elle continuait à être administrée pour le traitement de l'infection à *Plasmodium vivax*. Ainsi, elle reste disponible dans les secteurs formel et informel de la santé et continue à être une source de pression médicamenteuse sur *P. falciparum*. En revanche, des années d'enquêtes démographiques et sanitaires indiquent que les enfants du Malawi ne reçoivent pas de chloroquine. La faible transmission du paludisme dans des régions telles que l'Asie et l'Amérique du Sud se traduit par des caractéristiques uniques de la population parasitaire, notamment une petite taille de population efficace et une faible diversité. Chaque personne affectée reçoit une piqûre infectieuse d'un seul génotype de paludisme qui est ensuite reprise au cours d'un repas de sang d'un autre moustique *Anopholes*.

Avec un seul génotype de parasite dans l'intestin moyen du moustique, il n'y a pas de possibilité de recombinaison génétique pour augmenter la diversité des parasites. Dans ces conditions, y compris avec des populations parasitaires plus petites, des allèles spécifiques peuvent se fixer plus rapidement dans les zones à faible transmission, ne laissant aucun parasite sensible aux médicaments, qui peut potentiellement survivre, se développer avec la suppression de la pression des médicaments. Les allèles de résistance à la chloroquine sont fixés dans de nombreux pays d'Asie du Sud-Est, ainsi que dans certains pays d'Amérique du Sud, ce qui rend peu probable un retour à la sensibilité. En revanche, dans les zones de transmission plus élevée telle qu'au Mali, il y a plus d'infections polyclonales et donc plus de possibilités de recombinaison et de compétition directe entre les différentes souches de parasites. L'immunité de l'hôte peut également jouer un rôle important. L'immunité au paludisme s'acquiert par des expositions répétées. Les personnes vivant dans des zones à forte transmission auront également tendance à avoir un degré d'immunité plus élevé, ce qui permet d'avoir un réservoir plus important de parasites sensibles chez les personnes cliniquement immunisées et non traitées. Tous ces facteurs font de l'Afrique un environnement plus favorable au retour de la sensibilité à des médicaments tels que la chloroquine.

6.8. Devenir des anciens antipaludiques de première ligne en Afrique

Les données actuelles du Malawi indiquent que les mutations de résistance à la SP ont un coût d'adaptation au parasite faible ou nul, ce qui suggère que la sensibilité à la SP ne devrait pas revenir dans des régions géographiques épidémiologiquement similaires dans un avenir proche, en particulier avec l'utilisation continue de la SP pour une thérapie préventive intermittente. L'efficacité de la thérapie préventive intermittente chez les femmes enceintes est également menacée par l'émergence du triple mutant *DHPS 437G/540E/581G* au Malawi et dans d'autres régions. Par conséquent, dans des régions comme le Malawi, où la résistance à la SP est élevée, ce médicament pourrait ne plus être utilisé à l'avenir. En revanche, la sensibilité à la chloroquine risque de revenir en Afrique subsaharienne, car les CTA suppriment la pression sélective de la chloroquine. Ceci est maintenant observé dans toute la région [[202] [203] [204] [205] [206]]. En plus de la réduction de la pression de la chloroquine, le composant luméfantine de l'artéméter/luméfantine, l'un des CTA les plus utilisés au Mali par exemple, peut sélectionner les allèles sensibles à la chloroquine, augmentant ainsi la probabilité du retour de la sensibilité à la chloroquine dans les zones où ces CTA sont utilisés et où les parasites sensibles existent encore [207]. Si le paludisme sensible à la chloroquine réapparaît dans toute l'Afrique subsaharienne, il pourrait jouer un rôle important dans la prévention et le traitement du paludisme à l'avenir. Comme la chloroquine a un profil pharmacocinétique connu, un marqueur moléculaire validé pour la résistance et un excellent profil de sécurité, ces informations peuvent être utilisées pour développer des thérapies rationnelles combinant plusieurs médicaments afin de prévenir l'émergence ou la réémergence de la résistance à la chloroquine. Si une association de chloroquine peut être utilisée à l'avenir pour le traitement du paludisme, elle est encore plus attrayante comme option de prévention dans les populations vulnérables telles que les femmes enceintes ou les jeunes enfants car elle est sûre à tous les trimestres, a des schémas posologiques pour tous les groupes d'âge, a une longue demi-vie d'élimination et offre une protection pendant 4 à 6 semaines après l'administration de la dose.

Cette étude confirme la tendance à la baisse de la proportion de parasites résistants dans cette zone. Cependant, cette baisse semble moins lente qu'entre 2002 et 2003.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

Depuis la recommandation de l’OMS de retirer la chloroquine de l’arsenal thérapeutique du paludisme dans les années 2000, plusieurs études ont rapporté une baisse substantielle de la prévalence du marqueur de résistance à la chloroquine dans différents pays suggérant une possible réintroduction de la molécules dans les années à venir [175, 208-210].

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1. CONCLUSION

Cette étude a révélé une forte prévalence du marqueur de résistance à la luméfántrine (génotype *Pfmdr1_Y184F*), la molécule associée à l'artémisinine la plus utilisée au Mali, a été détectée. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour explorer la résistance à la luméfántrine au Mali. Nous avons également observé une prévalence élevée de marqueur de résistance à la Chloroquine chez les isolats de *P. falciparum* circulant à Dangassa et Nioro. Par contre les marqueurs de résistance aux molécules comme la sulfadoxine, l'amodiaquine, la pyriméthamine et la pipéraquline restent très peu fréquents dans nos sites d'étude. De façon générale, les marqueurs de résistance aux antipaludéens étudiés sont plus fréquents à Dangassa qu'à Nioro du sahel.

7.2. RECOMMANDATIONS

Au terme de la présente étude et au vu de nos résultats, nous pouvons formuler les recommandations suivantes :

Aux autorités sanitaires et administratives

- ❖ encourager la formation du personnel sanitaire sur les tests de détection de la sensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques au Mali,
- ❖ financer la recherche antipalustre enfin d'adapter nos stratégies de lutte contre le paludisme aux réalités basées sur des évidences scientifiques.

Aux chercheurs

- ❖ continuer à surveiller la résistance aux molécules antipaludiques dans les zones d'endémie palustre afin de fournir des résultats fiables au PNLN pour une meilleure implémentation des interventions contre le paludisme au Mali ;
- ❖ investiguer les facteurs susceptibles d'influencer le développement de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques utilisés au Mali.

A la population

- ❖ adhérer aux recommandations sur l'utilisation des antipaludiques faites par les professionnels de santé afin de retarder la survenue de la résistance ;
- ❖ participer massivement aux activités de recherche sur le paludisme en collaborations avec les chercheurs.

8. Limites de notre étude

Notre étude s'est intéressée particulièrement à déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux antipaludéens au Mali dans deux localités d'endémicité différente. La connaissance des mécanismes de résistance permet le développement de nouvelles molécules qui diminueront la résistance, d'identifier les cibles de nouveaux antipaludiques et enfin d'identifier des marqueurs moléculaires pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques. Une surveillance des mutations, au niveau du gène *PfKelch13* directement associées à la résistance à l'artémisinine pourra permettre une détection précoce des cas de résistance à ces médicaments au Mali.

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS. *Rapport sur le paludisme*. 2019; Available from: <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2019/fr/>.
2. Nosten, F. and N.J. White, *Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria*. *Am J Trop Med Hyg*, 2007. **77**(6 Suppl): p. 181-92.
3. WHO. *World malaria report 2019*. Geneva: World Health Organization, . 2019 Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/world-malaria-report-2019>.
4. WHO. *Guidelines for the treatment of malaria*. Geneva: World Health Organization, . 2015; Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/documents/publications/gmp/guidelines-for-the-treatment-of-malaria-eng.pdf>.
5. Dondorp, A., et al., *Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial*. *Lancet*, 2005. **366**(9487): p. 717-25.
6. Dondorp, A.M., et al., *Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial*. *Lancet*, 2010. **376**(9753): p. 1647-57.
7. Gomes, M.F., et al., *Pre-referral rectal artesunate to prevent death and disability in severe malaria: a placebo-controlled trial*. *Lancet*, 2009. **373**(9663): p. 557-66.
8. Kremsner PG, Adegnika AA, and e.a. Hounkpatin AB, *Intramuscular artesunate for severe malaria in African children: a multicenter randomized controlled trial*. *PLoS Med* 2016; **13**: e1001938.
9. Esu, E., et al., *Artemether for severe malaria*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014(9): p. CD010678.
10. Achan, J., et al., *Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria*. *Malar J*, 2011. **10**: p. 144.
11. Kayentao, K., et al., *Intermittent preventive therapy for malaria during pregnancy using 2 vs 3 or more doses of sulfadoxine-pyrimethamine and risk of low birth weight in Africa: systematic review and meta-analysis*. *JAMA*, 2013. **309**(6): p. 594-604.
12. Desai, M., et al., *Prevention of malaria in pregnancy*. *Lancet Infect Dis*, 2018. **18**(4): p. e119-e132.
13. Cisse B, Ba EH, and e.a. Sokhna C, *Effectiveness of seasonal malaria chemoprevention in children under ten years of age in Senegal: a stepped-wedge cluster-randomised trial*. *PLoS Med* 2016; **13**: e1002175.
14. Nankabirwa, J.I., et al., *Impact of intermittent preventive treatment with dihydroartemisinin-piperaquine on malaria in Ugandan schoolchildren: a randomized, placebo-controlled trial*. *Clin Infect Dis*, 2014. **58**(10): p. 1404-12.
15. Poirot, E., et al., *Mass drug administration for malaria*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(12): p. CD008846.
16. Newby, G., et al., *Review of mass drug administration for malaria and its operational challenges*. *Am J Trop Med Hyg*, 2015. **93**(1): p. 125-134.
17. Searle KM, Hamapumbu H, and e.a. Lubinda J, *Evaluation of the operational challenges in implementing reactive screen-and-treat and implications of reactive case detection strategies for malaria elimination in a region of low transmission in southern Zambia*. *Malar J* 2016; **15**: 412.
18. Shellvarajah, M., C. Hatz, and P. Schlagenhauf, *Malaria prevention recommendations for risk groups visiting sub-Saharan Africa: A survey of European expert opinion and international recommendations*. *Travel Med Infect Dis*, 2017. **19**: p. 49-55.
19. Traore, K., et al., *Ex-vivo Sensitivity of Plasmodium falciparum to Common Anti-malarial Drugs: The Case of Kenieroba, a Malaria Endemic Village in Mali*. *Drugs R D*, 2020. **20**(3): p. 249-255.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

20. Diakite, S.A.S., et al., *A comprehensive analysis of drug resistance molecular markers and Plasmodium falciparum genetic diversity in two malaria endemic sites in Mali*. Malar J, 2019. **18**(1): p. 361.
21. Fairhurst, R.M. and A.M. Dondorp, *Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum Malaria*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(3).
22. Rosenthal, P.J., *The interplay between drug resistance and fitness in malaria parasites*. Mol Microbiol, 2013. **89**(6): p. 1025-38.
23. Dondorp, A.M., et al., *Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria*. N Engl J Med, 2009. **361**(5): p. 455-67.
24. Ashley, E.A., et al., *Spread of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria*. N Engl J Med, 2014. **371**(5): p. 411-23.
25. Phyto, A.P., et al., *Declining Efficacy of Artemisinin Combination Therapy Against P. Falciparum Malaria on the Thai-Myanmar Border (2003-2013): The Role of Parasite Genetic Factors*. Clin Infect Dis, 2016. **63**(6): p. 784-791.
26. Amaratunga, C., et al., *Dihydroartemisinin-piperaquine resistance in Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(3): p. 357-65.
27. Thanh, N.V., et al., *Rapid decline in the susceptibility of Plasmodium falciparum to dihydroartemisinin-piperaquine in the south of Vietnam*. Malar J, 2017. **16**(1): p. 27.
28. Ariey, F., et al., *A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2014. **505**(7481): p. 50-5.
29. Amato, R., et al., *Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperaquine failure in Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study*. Lancet Infect Dis, 2017. **17**(2): p. 164-173.
30. Bopp, S., et al., *Plasmepsin II-III copy number accounts for bimodal piperaquine resistance among Cambodian Plasmodium falciparum*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1769.
31. Ross, L.S., et al., *Emerging Southeast Asian PfCRT mutations confer Plasmodium falciparum resistance to the first-line antimalarial piperaquine*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3314.
32. van der Pluijm, R.W., et al., *Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in Plasmodium falciparum malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study*. Lancet Infect Dis, 2019. **19**(9): p. 952-961.
33. Price, R.N., et al., *Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number*. Lancet, 2004. **364**(9432): p. 438-447.
34. Price, R.N., et al., *Molecular and pharmacological determinants of the therapeutic response to artemether-lumefantrine in multidrug-resistant Plasmodium falciparum malaria*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(11): p. 1570-7.
35. Maier, A.G., et al., *Plasmodium falciparum*. 2019. **35**(6): p. P481-482.
36. Kwiatkowski, D.P., *How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(2): p. 171-92.
37. Gardner, M.J., et al., *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Nature, 2002. **419**(6906): p. 498-511.
38. Kooij, T.W., C.J. Janse, and A.P. Waters, *Plasmodium post-genomics: better the bug you know?* Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(5): p. 344-57.
39. White, N.J., et al., *Malaria*. Lancet, 2014. **383**(9918): p. 723-35.
40. Française., G.r.d.l.S.d.P.l.d.L., *Prise en charge et prévention du paludisme d'importation - Mise à jour 2017 des RPC 2007*. 2017.
41. Desoubeaux G and C. J., *Diagnostic biologique du paludisme d'importation*. Rev Francoph Lab. . 2017(497): p. 34 43.
42. Ambroise-Thomas P, et al., *Le diagnostic du paludisme : actualités et perspectives*. Cah Détudes Rech Francoph Santé. 1993(4): p. 280 4.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

43. McMorrow, M.L., M. Aidoo, and S.P. Kachur, *Malaria rapid diagnostic tests in elimination settings--can they find the last parasite?* Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(11): p. 1624-31.
44. Koita, O.A., et al., *False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the hrp2 gene.* Am J Trop Med Hyg, 2012. **86**(2): p. 194-8.
45. Zheng, Z. and Z. Cheng, *Advances in Molecular Diagnosis of Malaria.* Adv Clin Chem, 2017. **80**: p. 155-192.
46. Ahmed, N.H. and J.C. Samantaray, *Quantitative buffy coat analysis-an effective tool for diagnosing blood parasites.* J Clin Diagn Res, 2014. **8**(4): p. DH01.
47. Goran-Kouacou, A.P.V., et al., *[Malaria serology test: what contribution does it make in an endemic country such as Ivory Coast?]*. Pan Afr Med J, 2017. **26**: p. 221.
48. Tangpukdee, N., et al., *Malaria diagnosis: a brief review.* Korean J Parasitol, 2009. **47**(2): p. 93-102.
49. Greenhouse, B., et al., *Taking Sharper Pictures of Malaria with CAMERAs: Combined Antibodies to Measure Exposure Recency Assays.* Am J Trop Med Hyg, 2018. **99**(5): p. 1120-1127.
50. Pradines B, et al., *La résistance aux antipaludiques.* Rev Fr Lab. 2010(422): p. 51-62.
51. Touze JE, et al., *Les modes d'action des antipaludiques Intérêt de l'association Atovaquone-Proguanil.* .
52. Olliaro, P., *Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs.* Pharmacol Ther, 2001. **89**(2): p. 207-19.
53. Trape, J.F., et al., *Impact of chloroquine resistance on malaria mortality.* C R Acad Sci III, 1998. **321**(8): p. 689-97.
54. Wunsch, S., et al., *Differential stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger determines chloroquine uptake in Plasmodium falciparum.* J Cell Biol, 1998. **140**(2): p. 335-45.
55. Bray, P.G., S.A. Ward, and H. Ginsburg, *Na⁺/H⁺ antiporter, chloroquine uptake and drug resistance: inconsistencies in a newly proposed model.* Parasitol Today, 1999. **15**(9): p. 360-3.
56. Pradines, B., J.M. Pages, and J. Barbe, *Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance.* Curr Drug Targets Infect Disord, 2005. **5**(4): p. 411-31.
57. Henry, M., et al., *Chloroquine resistance reversal agents as promising antimalarial drugs.* Curr Drug Targets, 2006. **7**(8): p. 935-48.
58. Henry, M., et al., *Inhibition of efflux of quinolines as new therapeutic strategy in malaria.* Curr Top Med Chem, 2008. **8**(7): p. 563-78.
59. Alibert-Franco S, Pradines B, and e.a. Mahamoud A, *Efflux mechanism, a new target to combat multidrug resistant pathogen.* Current Med Chem 2009;16:301-17
60. Pradines B, Parquet V, and O.-P. E., *ABC transporters in Plasmodium and their involvement in resistance to antimalarial drugs.* In ABC Transporters in Microorganisms, Ponte-Sucre A. (ed), Caister Academic Press, Wymondham, UK, . 2009,: p. 113-28
61. B., P., *ABC proteins involved in protozoan parasite resistance.* In ABC Transporters and Multidrug Resistance, Boumendjel A., Boutonnat J., Robert J. (eds), J Wiley & Sons Inc.,. 2009: p. 195-238.
62. Bjorkman, A. and P.A. Phillips-Howard, *The epidemiology of drug-resistant malaria.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1990. **84**(2): p. 177-80.
63. Giboda, M. and M.B. Denis, *Response of Kampuchean strains of Plasmodium falciparum to antimalarials: in-vivo assessment of quinine and quinine plus tetracycline; multiple drug resistance in vitro.* J Trop Med Hyg, 1988. **91**(4): p. 205-11.
64. Harinasuta, T., D. Bunnag, and R. Lasserre, *Quinine resistant falciparum malaria treated with mefloquine.* Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1990. **21**(4): p. 552-7.
65. Jelinek T, Schelbert P, and e.a. Löscher T, *Quinine resistant falciparum acquired in east Africa.* . Trop Med Parasitol 1995. **46**: p. 38-40.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

66. Tish, K.N. and P.I. Pillans, *Recrudescence of Plasmodium falciparum malaria contracted in Lombok, Indonesia after quinine/doxycycline and mefloquine: case report*. N Z Med J, 1997. **110**(1047): p. 255-6.
67. Pradines, B., et al., *Quinine-resistant malaria in traveler returning from Senegal, 2007*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(3): p. 546-8.
68. Gaillard, T., M. Madamet, and B. Pradines, *Tetracyclines in malaria*. Malar J, 2015. **14**: p. 445.
69. Looareesuwan S, Wilairatana P, and e.a. Vanijanonta S, *Efficacy of quinine-tetracycline for acute uncomplicated falciparum malaria in Thailand*. . Lancet 1992: p. 339:369.
70. Lell, B. and P.G. Kremsner, *Clindamycin as an antimalarial drug: review of clinical trials*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(8): p. 2315-20.
71. Gushimana Y, Doepner B, and e.a. Martinez-Hackert E, *Kinetics of quinine-deuterohemin binding*. . Biophys Chem 1993. **47**: p. 153-62.
72. Dorn, A., et al., *An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials*. Biochem Pharmacol, 1998. **55**(6): p. 727-36.
73. Sugioka, Y. and M. Suzuki, *The chemical basis for the ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex induced lipid peroxidation*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1074**(1): p. 19-24.
74. Atamna, H. and H. Ginsburg, *Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 24876-83.
75. Sidhu, A.B., D. Verdier-Pinard, and D.A. Fidock, *Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum malaria parasites conferred by pfcr1 mutations*. Science, 2002. **298**(5591): p. 210-3.
76. Reed, M.B., et al., *Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in Plasmodium falciparum*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 906-9.
77. Mu, J., et al., *Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine*. Mol Microbiol, 2003. **49**(4): p. 977-89.
78. Peel, S.A., et al., *A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glycoprotein gene homolog (pfmdr) of Plasmodium falciparum in vitro*. Am J Trop Med Hyg, 1994. **51**(5): p. 648-58.
79. Cowman, A.F., D. Galatis, and J.K. Thompson, *Selection for mefloquine resistance in Plasmodium falciparum is linked to amplification of the pfmdr1 gene and cross-resistance to halofantrine and quinine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(3): p. 1143-7.
80. Ang, H.H., K.L. Chan, and J.W. Mak, *Variability in schizonticidal drug susceptibility amongst clones and isolates of Plasmodium falciparum*. Chemotherapy, 1997. **43**(2): p. 142-7.
81. Ferdig, M.T., et al., *Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites*. Mol Microbiol, 2004. **52**(4): p. 985-97.
82. Henry, M., et al., *Plasmodium falciparum Na⁺/H⁺ exchanger 1 transporter is involved in reduced susceptibility to quinine*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(5): p. 1926-30.
83. Bray, P.G., S.R. Hawley, and S.A. Ward, *4-Aminoquinoline resistance of Plasmodium falciparum: insights from the study of amodiaquine uptake*. Mol Pharmacol, 1996. **50**(6): p. 1551-8.
84. 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.
85. Ridley, R.G., et al., *4-aminoquinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(8): p. 1846-54.
86. Muller, O., et al., *A randomized trial of chloroquine, amodiaquine and pyrimethamine-sulphadoxine in Gambian children with uncomplicated malaria*. Trop Med Int Health, 1996. **1**(1): p. 124-32.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

87. Brasseur P, Agnamey P, and e.a. Ekobo AS, *Sensitivity of Plasmodium falciparum to amodiaquine and chloroquine in central Africa : a comparative study in vivo and in vitro.* . Trans R Soc Trop Med Hyg 1995. **89**: p. 528-30
88. Brasseur, P., et al., *Amodiaquine remains effective for treating uncomplicated malaria in west and central Africa.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1999. **93**(6): p. 645-50.
89. Olliaro, P., et al., *Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria.* Lancet, 1996. **348**(9036): p. 1196-201.
90. Nawaz, F., et al., *Selection of parasites with diminished drug susceptibility by amodiaquine-containing antimalarial regimens in Uganda.* J Infect Dis, 2009. **200**(11): p. 1650-7.
91. Happi, C.T., et al., *Association between mutations in Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter and P. falciparum multidrug resistance 1 genes and in vivo amodiaquine resistance in P. falciparum malaria-infected children in Nigeria.* Am J Trop Med Hyg, 2006. **75**(1): p. 155-61.
92. Holmgren, G., et al., *Amodiaquine resistant Plasmodium falciparum malaria in vivo is associated with selection of pfprt 76T and pfmdr1 86Y.* Infect Genet Evol, 2006. **6**(4): p. 309-14.
93. Humphreys, G.S., et al., *Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the Plasmodium falciparum mdr1 gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria.* Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(3): p. 991-7.
94. Picot, S., et al., *A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria.* Malar J, 2009. **8**: p. 89.
95. Marfurt, J., et al., *The usefulness of twenty-four molecular markers in predicting treatment outcome with combination therapy of amodiaquine plus sulphadoxine-pyrimethamine against falciparum malaria in Papua New Guinea.* Malar J, 2008. **7**: p. 61.
96. Palmer, K.J., S.M. Holliday, and R.N. Brogden, *Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy.* Drugs, 1993. **45**(3): p. 430-75.
97. Fontanet AL, Johnston DB, and e.a. Walker AM, *High prevalence of mefloquine-resistant falciparum malaria in eastern Thailand.* . Bull World Health Organ 1993. **71**: p. 377-83.
98. Uhlemann, A.C. and S. Krishna, *Antimalarial multi-drug resistance in Asia: mechanisms and assessment.* Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **295**: p. 39-53.
99. Shah, N.K., et al., *Molecular surveillance for multidrug-resistant Plasmodium falciparum, Cambodia.* Emerg Infect Dis, 2008. **14**(10): p. 1637-40.
100. Carrara, V.I., et al., *Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment.* PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4551.
101. Rogers WO, S.R., Tero T, et al. , *Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in southern Cambodia.* Malar J 2009: p. 8:10.
102. Briolant S, Pradines B, and B. LK., *Place de la primaquine dans la lutte contre le paludisme en Afrique francophone.* . Bull Société Pathol Exot. , août 2017;. **110**(3): p. 198 206.
103. Duraisingh, M.T., et al., *The tyrosine-86 allele of the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin.* Mol Biochem Parasitol, 2000. **108**(1): p. 13-23.
104. Su, X.Z. and L.H. Miller, *The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine.* Sci China Life Sci, 2015. **58**(11): p. 1175-9.
105. O'Neill, P.M., V.E. Barton, and S.A. Ward, *The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues.* Molecules, 2010. **15**(3): p. 1705-21.
106. Organisation., W.H. *Antimalarial drug combination therapy. Report of a WHO Technical Consultation.* Geneva: World Health Organization. 2001 avr; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66952>.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

107. Curd, F.H., D.G. Davey, and F.L. Rose, *Studies on synthetic antimalarial drugs; some biguanide derivatives as new types of antimalarial substances with both therapeutic and causal prophylactic activity*. Ann Trop Med Parasitol, 1945. **39**: p. 208-16.
108. Falco, E.A., et al., *2:4-diaminopyrimidines- a new series of antimalarials*. Br J Pharmacol Chemother, 1951. **6**(2): p. 185-200.
109. Zhang, Y. and S.R. Meshnick, *Inhibition of Plasmodium falciparum dihydropteroate synthetase and growth in vitro by sulfa drugs*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(2): p. 267-71.
110. Triglia, T., et al., *Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13944-9.
111. Sibley, C.H., et al., *Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in Plasmodium falciparum: what next?* Trends Parasitol, 2001. **17**(12): p. 582-8.
112. Hyde, J.E., *Exploring the folate pathway in Plasmodium falciparum*. Acta Trop, 2005. **94**(3): p. 191-206.
113. Klokouzas, A., et al., *ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa*. Int J Antimicrob Agents, 2003. **22**(3): p. 301-17.
114. Fidock, D.A., et al., *Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance*. Mol Cell, 2000. **6**(4): p. 861-71.
115. Chiodini, P.L., et al., *Evaluation of atovaquone in the treatment of patients with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*. J Antimicrob Chemother, 1995. **36**(6): p. 1073-8.
116. Canfield, C.J., M. Pudney, and W.E. Gutteridge, *Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against Plasmodium falciparum in vitro*. Exp Parasitol, 1995. **80**(3): p. 373-81.
117. Srivastava, I.K. and A.B. Vaidya, *A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(6): p. 1334-9.
118. Looareesuwan, S., et al., *Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria*. Malarone Clinical Trials Study Group. Am J Trop Med Hyg, 1999. **60**(4): p. 533-41.
119. Hogh, B., et al., *Atovaquone-proguanil versus chloroquine-proguanil for malaria prophylaxis in non-immune travellers: a randomised, double-blind study*. Malarone International Study Team. Lancet, 2000. **356**(9245): p. 1888-94.
120. Meshnick, S.R., T.E. Taylor, and S. Kamchonwongpaisan, *Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy*. Microbiol Rev, 1996. **60**(2): p. 301-15.
121. Ittarat I, Asawamasakda W, and e.a. Bartlett M, *Effects of atovaquone and other inhibitors on Pneumocystis carinii dihydroorotate dehydrogenase*. . Antimicrob Agents Chemother 1995. **39**: p. 325-8.
122. Fry, M. and M. Pudney, *Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80)*. Biochem Pharmacol, 1992. **43**(7): p. 1545-53.
123. Vaidya, A.B., et al., *Structural features of Plasmodium cytochrome b that may underlie susceptibility to 8-aminoquinolines and hydroxynaphthoquinones*. Mol Biochem Parasitol, 1993. **58**(1): p. 33-42.
124. Looareesuwan, S., et al., *Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand*. Am J Trop Med Hyg, 1996. **54**(1): p. 62-6.
125. Ekala, M.T., et al., *Sequence analysis of Plasmodium falciparum cytochrome b in multiple geographic sites*. Malar J, 2007. **6**: p. 164.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

126. Musset L, Pradines B, and e.a. Parzy D, *Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 Plasmodium falciparum isolates from untreated French travellers.* . J Antimicrob Chemother 2006. **57**: p. 110-5.
127. Fivelman, Q.L., et al., *Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of Plasmodium falciparum isolate from Lagos, Nigeria.* Malar J, 2002. **1**: p. 1.
128. Musset, L., et al., *Clinical atovaquone-proguanil resistance of Plasmodium falciparum associated with cytochrome b codon 268 mutations.* Microbes Infect, 2006. **8**(11): p. 2599-604.
129. Savini H, Bogreau H, and e.a. Bertaux L, *First case of emergence of atovaquone-proguanil resistance in Plasmodium falciparum during treatment in a traveller in Comoros.* . Antimicrob Agents Chemother 2008. **52**: p. 2283-4.
130. McFadden, G.I. and E. Yeh, *The apicoplast: now you see it, now you don't.* Int J Parasitol, 2017. **47**(2-3): p. 137-144.
131. Dahl, E.L., et al., *Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite Plasmodium falciparum.* Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(9): p. 3124-31.
132. Briolant, S., et al., *[Cyclines and malaria].* Med Trop (Mars), 2007. **67**(1): p. 86-96.
133. Briolant S, Fusai T, and e.a. Rogier C, *Tetracycline antibiotics in malaria.* . Open Trop Med J 2008. **1**: p. 31-46.
134. Davis, T.M., et al., *Piperaquine: a resurgent antimalarial drug.* Drugs, 2005. **65**(1): p. 75-87.
135. Sibley, C.H., K.I. Barnes, and C.V. Plowe, *The rationale and plan for creating a World Antimalarial Resistance Network (WARN).* Malar J, 2007. **6**: p. 118.
136. Sibley, C.H., et al., *A network to monitor antimalarial drug resistance: a plan for moving forward.* Trends Parasitol, 2008. **24**(1): p. 43-8.
137. Plowe CV, Roper C, and e.a. Barnwell JW, *World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: molecular markers for drug resistant malaria.* . Malar J 2007. **6**: p. 121.
138. Bruce-Chwatt LJ, et al., *Chemotherapy of malaria. Rev 2nd Ed Geneva World Health Organ [Internet]. 1986 [cité 18 juill 2018]; .*
139. Organization., W.H. *Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy.* . Geneva : WHO Press 2009; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44048>.
140. LK., B., *Field application of in vitro assays sensitivity of human malaria parasites antimalarial drugs.* Geneva : WHO Press, 2007.
141. Warhurst, D.C., *A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria.* N Engl J Med, 2001. **344**(4): p. 299-302.
142. Sanchez, C.P., W.D. Stein, and M. Lanzer, *Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in Plasmodium falciparum.* Trends Parasitol, 2007. **23**(7): p. 332-9.
143. Cooper, R.A., et al., *Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine.* Mol Microbiol, 2007. **63**(1): p. 270-82.
144. Tinto, H., et al., *Chloroquine-resistance molecular markers (PfCRT T76 and Pfmdr-1 Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso.* Trop Med Int Health, 2008. **13**(2): p. 238-40.
145. Laufer, M.K., et al., *Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi.* N Engl J Med, 2006. **355**(19): p. 1959-66.
146. Noranate, N., et al., *Rapid dissemination of Plasmodium falciparum drug resistance despite strictly controlled antimalarial use.* PLoS One, 2007. **2**(1): p. e139.
147. Duraisingh, M.T. and A.F. Cowman, *Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance.* Acta Trop, 2005. **94**(3): p. 181-90.
148. Nishiyama, Y., et al., *Genetic analysis of mefloquine-resistant mechanism of Plasmodium falciparum.* Nucleic Acids Symp Ser (Oxf), 2004(48): p. 163-4.
149. Pickard, A.L., et al., *Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in pfmdr1.* Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(8): p. 2418-23.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

150. Foote, S.J. and A.F. Cowman, *The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs*. Acta Trop, 1994. **56**(2-3): p. 157-71.
151. Gregson, A. and C.V. Plowe, *Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(1): p. 117-45.
152. Srivastava, I.K., et al., *Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites*. Mol Microbiol, 1999. **33**(4): p. 704-11.
153. Nkrumah, L.J., et al., *Probing the multifactorial basis of Plasmodium falciparum quinine resistance: evidence for a strain-specific contribution of the sodium-proton exchanger PfNHE*. Mol Biochem Parasitol, 2009. **165**(2): p. 122-31.
154. Ariey, F., et al., *Invasion of Africa by a single pfprt allele of South East Asian type*. Malar J, 2006. **5**: p. 34.
155. Andriantsoanirina, V., et al., *Origins of the recent emergence of Plasmodium falciparum pyrimethamine resistance alleles in Madagascar*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(6): p. 2323-9.
156. Menard, D., et al., *Drug-resistant malaria parasites introduced into Madagascar from Comoros Islands*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(11): p. 1759-62.
157. Ariey, F., J.B. Duchemin, and V. Robert, *Metapopulation concepts applied to falciparum malaria and their impacts on the emergence and spread of chloroquine resistance*. Infect Genet Evol, 2003. **2**(3): p. 185-92.
158. Ariey F and R. V., *The puzzling links between malaria transmission and drug resistance*. . Trends Parasitol 2003 **19** p. 158-61.
159. 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.
160. Berglund, F., *Toxicity of quinine*. Toxicology, 1989. **58**(3): p. 237-8.
161. Manske, M., et al., *Analysis of Plasmodium falciparum diversity in natural infections by deep sequencing*. Nature, 2012. **487**(7407): p. 375-9.
162. Douglas, N.M., et al., *Major burden of severe anemia from non-falciparum malaria species in Southern Papua: a hospital-based surveillance study*. PLoS Med, 2013. **10**(12): p. e1001575; discussion e1001575.
163. Mu, J., et al., *Plasmodium falciparum genome-wide scans for positive selection, recombination hot spots and resistance to antimalarial drugs*. Nat Genet, 2010. **42**(3): p. 268-71.
164. Takala-Harrison, S., et al., *Genetic loci associated with delayed clearance of Plasmodium falciparum following artemisinin treatment in Southeast Asia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(1): p. 240-5.
165. Takala-Harrison, S., et al., *Independent emergence of artemisinin resistance mutations among Plasmodium falciparum in Southeast Asia*. J Infect Dis, 2015. **211**(5): p. 670-9.
166. Cheeseman, I.H., et al., *A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria*. Science, 2012. **336**(6077): p. 79-82.
167. Sullivan, D.J., Jr., et al., *On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11865-70.
168. Djimde, A., et al., *A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria*. N Engl J Med, 2001. **344**(4): p. 257-63.
169. Wootton, J.C., et al., *Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in Plasmodium falciparum*. Nature, 2002. **418**(6895): p. 320-3.
170. 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.
171. Muhamad, P., et al., *Polymorphisms of molecular markers of antimalarial drug resistance and relationship with artesunate-mefloquine combination therapy in patients with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Thailand*. Am J Trop Med Hyg, 2011. **85**(3): p. 568-72.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

172. Phompradit, P., et al., *Four years' monitoring of in vitro sensitivity and candidate molecular markers of resistance of Plasmodium falciparum to artesunate-mefloquine combination in the Thai-Myanmar border*. Malar J, 2014. **13**: p. 23.
173. Griffing, S., et al., *pfmdr1 amplification and fixation of pfcr1 chloroquine resistance alleles in Plasmodium falciparum in Venezuela*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(4): p. 1572-9.
174. Bacon, D.J., et al., *Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(5): p. 2042-51.
175. Kublin, J.G., et al., *Reemergence of chloroquine-sensitive Plasmodium falciparum malaria after cessation of chloroquine use in Malawi*. J Infect Dis, 2003. **187**(12): p. 1870-5.
176. Laufer, M.K., et al., *Return of chloroquine-susceptible falciparum malaria in Malawi was a reexpansion of diverse susceptible parasites*. J Infect Dis, 2010. **202**(5): p. 801-8.
177. Basco, L.K., et al., *Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol, 1995. **69**(1): p. 135-8.
178. Plowe, C.V., et al., *Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa*. Am J Trop Med Hyg, 1995. **52**(6): p. 565-8.
179. Roper, C., et al., *Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis*. Lancet, 2003. **361**(9364): p. 1174-81.
180. Mita, T., et al., *Limited geographical origin and global spread of sulfadoxine-resistant dhps alleles in Plasmodium falciparum populations*. J Infect Dis, 2011. **204**(12): p. 1980-8.
181. McCollum, A.M., et al., *Common origin and fixation of Plasmodium falciparum dhfr and dhps mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in a low-transmission area in South America*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(6): p. 2085-91.
182. Tekete, M., et al., *Efficacy of chloroquine, amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of un-complicated falciparum malaria: revisiting molecular markers in an area of emerging AQ and SP resistance in Mali*. Malar J, 2009. **8**: p. 34. 2009.
183. Thera, M.A., et al., *Impact of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on falciparum malaria infection and disease*. J Infect Dis, 2005. **192**(10): p. 1823-9.
184. Wang, P., et al., *Resistance to antifolates in Plasmodium falciparum monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins*. Mol Biochem Parasitol, 1997. **89**(2): p. 161-77.
185. 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.
186. Dicko, A., et al., *Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine one year after implementation of intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali*. Malar J, 2010. **9**: p. 9.
187. 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.
188. Gesase, S., et al., *High resistance of Plasmodium falciparum to sulphadoxine/pyrimethamine in northern Tanzania and the emergence of dhps resistance mutation at Codon 581*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4569.
189. Artimovich, E., et al., *Persistence of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance Despite Reduction of Drug Pressure in Malawi*. J Infect Dis, 2015. **212**(5): p. 694-701.
190. Gasasira, A.F., et al., *Effect of trimethoprim-sulphamethoxazole on the risk of malaria in HIV-infected Ugandan children living in an area of widespread antifolate resistance*. Malar J, 2010. **9**: p. 177.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

191. Iriemenam, N.C., et al., *Temporal trends of sulphadoxine-pyrimethamine (SP) drug-resistance molecular markers in Plasmodium falciparum parasites from pregnant women in western Kenya*. Malar J, 2012. **11**: p. 134.
192. Noedl, H., et al., *Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia*. N Engl J Med, 2008. **359**(24): p. 2619-20.
193. Kyaw, M.P., et al., *Reduced susceptibility of Plasmodium falciparum to artesunate in southern Myanmar*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e57689.
194. Phyto, A.P., et al., *Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study*. Lancet, 2012. **379**(9830): p. 1960-6.
195. Straimer, J., et al., *Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in Plasmodium falciparum clinical isolates*. Science, 2015. **347**(6220): p. 428-31.
196. WHO. *Global plan for artemisinin resistance containment – GPARC (archived) January 2011*. 2011; Available from: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241500838/en/>.
197. Maiga, A.W., et al., *No evidence of delayed parasite clearance after oral artesunate treatment of uncomplicated falciparum malaria in Mali*. Am J Trop Med Hyg, 2012. **87**(1): p. 23-8.
198. Taylor, S.M., et al., *Absence of putative artemisinin resistance mutations among Plasmodium falciparum in Sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study*. J Infect Dis, 2015. **211**(5): p. 680-8.
199. Kamau, E., et al., *K13-propeller polymorphisms in Plasmodium falciparum parasites from sub-Saharan Africa*. J Infect Dis, 2015. **211**(8): p. 1352-5.
200. Lopera-Mesa, T.M., et al., *Plasmodium falciparum clearance rates in response to artesunate in Malian children with malaria: effect of acquired immunity*. J Infect Dis, 2013. **207**(11): p. 1655-63.
201. Borrmann, S., et al., *Declining responsiveness of Plasmodium falciparum infections to artemisinin-based combination treatments on the Kenyan coast*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e26005.
202. Frosch, A.E., M. Venkatesan, and M.K. Laufer, *Patterns of chloroquine use and resistance in sub-Saharan Africa: a systematic review of household survey and molecular data*. Malar J, 2011. **10**: p. 116.
203. Salissou, A., et al., *Low Prevalence of Pfcrt Resistance Alleles among Patients with Uncomplicated Falciparum Malaria in Niger Six Years after Chloroquine Withdrawal*. Malar Res Treat, 2014. **2014**: p. 614190.
204. Mbogo, G.W., et al., *Temporal changes in prevalence of molecular markers mediating antimalarial drug resistance in a high malaria transmission setting in Uganda*. Am J Trop Med Hyg, 2014. **91**(1): p. 54-61.
205. Wurtz, N., et al., *Prevalence of molecular markers of Plasmodium falciparum drug resistance in Dakar, Senegal*. Malar J, 2012. **11**: p. 197.
206. Antonia, A.L., et al., *A cross-sectional survey of Plasmodium falciparum pfcrt mutant haplotypes in the Democratic Republic of Congo*. Am J Trop Med Hyg, 2014. **90**(6): p. 1094-7.
207. Venkatesan, M., et al., *Polymorphisms in Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter and multidrug resistance 1 genes: parasite risk factors that affect treatment outcomes for P. falciparum malaria after artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine*. Am J Trop Med Hyg, 2014. **91**(4): p. 833-843.
208. Ndam, N.T., et al., *Reemergence of chloroquine-sensitive pfcrt K76 Plasmodium falciparum genotype in southeastern Cameroon*. Malar J, 2017. **16**(1): p. 130.
209. Thomsen, T.T., et al., *Rapid selection of Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter gene and multidrug resistance gene-1 haplotypes associated with past chloroquine and present artemether-lumefantrine use in Inhambane District, southern Mozambique*. Am J Trop Med Hyg, 2013. **88**(3): p. 536-41.

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

210. Laufer, M.K., et al., *A longitudinal trial comparing chloroquine as monotherapy or in combination with artesunate, azithromycin or atovaquone-proguanil to treat malaria*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42284.

10. ANNEXES

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

Principe

C'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang.

Matériel

- Lames et vaccinostyles
- Des gants de protection en latex à usage unique
- Lames de microscopie à usage unique
- Des lancettes stériles à usage unique
- De l'éthanol à 70°
- Du coton hydrophile
- Boite 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

Mode opératoire

Prélever une grosse goutte de sang capillaire (environ 5-10 μ l) en la déposant directement à l'extrémité supérieur 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).

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.

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 afin d'identifier les parties de la GE où la répartition des leucocytes est distribuée de façon homogène.

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 comptées par 300 leucocytes multiplié par 7500 (nombre moyen de leucocytes par μl de sang).

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 faible (5 parasites/ μl) soit une parasitémie de 0.0001%.
- **Inconvénients** : le temps de coloration de la GE est clairement long (45 minutes) et la lecture nécessite des expérimentés. En outre, le diagnostic des espèces plasmodiale est difficile à la GE.

10.2. Procédures standard opératoires (SOP) du frottis mince (FM)

Principe

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

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.

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

Prélèvement

- Pique au niveau du 3^{ème} ou 4^{ème} doigt de la main gauche
- Chez les nourrissons de moins de 6 mois, la pique 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 mince, sur une surface dure et plane
- Déposer 2,5µl de sang sur la lame.

Confection frottis mince (FM)

- Glisser le bord du frottis jusqu'à ce qu'elle touche la goutte de sang (laisser fuser)

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

- Etaler 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.

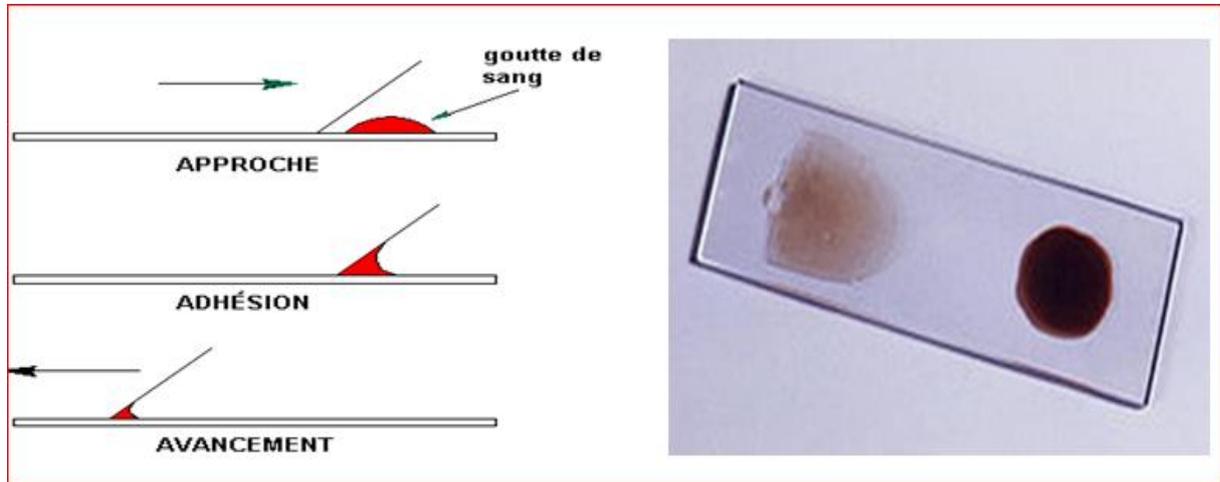


Figure 14. Technique de la goutte épaisse et frottis minces

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

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.

Lecture

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

- Ajouter une goutte de l'huile d'immersion sur le frottis mince (vers la queue) puis lire avec l'objectif×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 infecté
 - ✓ Le nombre de mérozoïte par schizonte
 - ✓ La forme du gamétocyte
 - ✓ Et autre parasite 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. 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 ».

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.

Inconvénients

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

11.2. Procédures Standard Opératoire (SOP) : Confection du confetti (papier filtre)

Matériel

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

- Papier buvard
- Gants stériles
- Vaccinostyle stérile
- Coton hydrophile
- Alcool 70%
- Ciseaux
- Poubelle pour vaccinostyles
- Registre
- Crayon
- Enveloppes
- Agrafeuse
- Agrafe
- Scotch type OMS
- Insecticides (Timor[®])
- Cantine + cadenas

Lieu de prélèvement

Face latérale de l'annuaire gauche indemne de toute pathologie

Mode opératoire

- Découper du papier buvard à l'aide d'une paire de ciseaux environs 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 papier
- Inscrire le numéro d'identification du patient sur le buvard à l'aide du crayon

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

- 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.

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.

10.3. 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 15. Analyseur et Microcuvette Hemocue[®] Source : www.hemocue.com

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 l'azoture de méthémoglobine dont l'absorbance est mesurée dans l'analyseur. Cette absorbance est directement proportionnelle à la concentration de l'hémoglobine.

Matériel et réactifs

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

Mode opératoire

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

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

- 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 16. Mécanisme de mesure du taux d'hémoglobine par l'appareil Hemocue201+

Source : www.hemocue.com

10.4. 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, parasitologique et hématologique 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 Laser Désorption 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 (TDR) et le taux d'Hb.

11. Fiche signalétique

Nom : TRAORE

Prénom : Cheick Oumar

Pays d'origine : MALI

Email : traorecheickoumar097@gmail.com

Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie de Bamako/MALI

Tel : 00223 78 88 70 53 / 00223 66 18 18 02

Année universitaire : 2019-2020

Ville de soutenance : Bamako

Dépôt légal : Bibliothèque de la FMOS/FAPH de Bamako

Source d'intérêt : Immunologie, parasitologie santé publique, génétique.

Titre de la thèse : Epidémiologie moléculaire de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

Résumé

Des progrès majeurs ont été accomplis dans la lutte contre le paludisme en Afrique ces deux dernières décennies grâce à l'essor et surtout à la vulgarisation des techniques de biologie moléculaire dans le monde. Dans la présente thèse, nous avons voulu explorer l'épidémiologie ainsi que l'évaluation de la chimiosensibilité de *P. falciparum*, agent responsable majeur de cette pathologie au Mali. Pour ce faire, nous avons mené une étude réalisée dans deux villages d'endémicité différente au Mali (Dangassa et Nioro du Sahel). Nous avons analysé les polymorphismes connus au niveau des gènes *Pfcr1*, *Pfdhps*, *Pfdhfr*, *pfmdr1* et *PfK13* en utilisant l'ADN parasite extrait à partir des isolats cliniques collectés à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali. Le génotypage des polymorphismes a été fait au *Wellcome Trust Genome Campus* de Sanger, Cambridge, Royaume-Uni, et en utilisant la plateforme robotique Agena MassARRAY® iPLEX (Agena Bioscience, Hamburg, Germany).

Au total, nous avons collecté 269 échantillons de sang auprès de patients positifs à *P. falciparum* en 2016 (213 à Dangassa et 56 à Nioro-du-sahel). Cette étude n'a révélé aucun fond génétique de résistance à l'artémisinine, mais une forte prévalence des marqueurs de résistance à la luméfantrine (génotype *Pfmdr1_Y184F*), la molécule associée à l'artémisinine la plus utilisée au Mali, a été détectée. Notre étude a aussi révélé que les marqueurs de résistance à la

Epidémiologie Moléculaire de la Résistance de *P. falciparum* aux Antipaludiques à Dangassa et à Nioro du Sahel au Mali

sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine sont très fréquents à Dangassa et à Nioro du Sahel et pourrait compromettre leur utilisation dans la traitement intermittent chez la femme enceinte et dans la Chimio-prévention du paludisme saisonnier chez les enfants au Mali.

Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour explorer la résistance à la luméfántrine, les mécanismes et les facteurs impliqués dans le développement de la résistance au Mali.

Mots clés. *Plasmodium falciparum* – Résistance aux antipaludiques – Marqueurs moléculaires, Mali

12. Summary

Major progress has been made in the fight against malaria in Africa over the last two decades thanks to the development and especially the popularization of molecular biology techniques throughout the world. In this thesis, we wanted to explore the epidemiology and the evaluation of the chemosensitivity of *P. falciparum*, the major agent responsible for this pathology in Mali. To do so, we conducted a study in two villages of different endemicity in Mali (Dangassa and Nioro du Sahel). We analyzed known polymorphisms in the *Pfcr1*, *Pfdhps*, *Pfdhfr*, *pfmdr1* and *PfK13* genes using parasite DNA extracted from clinical isolates collected in Dangassa and Nioro du Sahel in Mali. The genotyping of the polymorphisms was done at the Wellcome Trust Genome Campus in Sanger, Cambridge, UK, and using the Agena MassARRAY® iPLEX robotic platform (Agena Bioscience, Hamburg, Germany).

In total, we collected 269 blood samples from *P. falciparum* positive patients in 2016 (213 in Dangassa and 56 in Nioro du Sahel). This study revealed no genetic background for artemisinin resistance, but a high prevalence of markers of resistance to lumefantrine (genotype *Pfmdr1_Y184F*), the most widely used artemisinin-associated molecule in Mali, was detected. Our study also revealed that sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine resistance markers are very common in Dangassa and Nioro du Sahel and could compromise their use in intermittent treatment in pregnant women and in the chemoprevention of seasonal malaria in children in Mali.

Further research is needed to explore lumefantrine resistance and the mechanisms and factors involved in the development of resistance in Mali.

Keywords: *Plasmodium falciparum* – Antimalarial drug resistant - Molecular markers, Mali

13. SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui se passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti politique ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

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

Que je sois couverte d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !