

Ministère de l'Éducation Nationale

UNIVERSITE DU MALI

République du Mali

Un Peuple- un But- Une Foi

\*\*\*\*\*

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOSTOMATOLOGIE

Année universitaire 2001-2002

N° 1021

**Efficacité de la Sulfadoxine-Pyriméthamine sur  
*Plasmodium falciparum* et Prévalence des  
mutations ponctuelles des gènes *dhfr* et *dhps* à  
Kollé.**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le.../ 07 / 2002 devant la Faculté de Médecine, de  
Pharmacie et d'Odontostomatologie par

**Monsieur Bakary FOFANA**

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine (Diplôme d'Etat).

**JURY :**

Président : Professeur Dapa DIALLO

Membres : Professeur Ousmane DOUMBIA.

Docteur Amagana DOLO

Directeur de Thèse : Professeur Ogobara K. DOUMBO

Co-directeur de Thèse : Docteur Abdoulaye A DJIMDE

## 5. ASSISTANTS CHEF DE CLINIQUE

Mr Abdoulaye DIALLO  
Mr Mamadou L. DIOMBANA  
Mr Sékou SIDIBE  
Mr Abdoulaye DIALLO  
Mr Filifing SISSOKO  
Mr Tiéman COULIBALY  
Mme TRAORE J. THOMAS  
Mr Nouhoum ONGOIBA  
Mr Zanafon OUATTARA  
Mr Zimogo Zié SANOGO  
Mr Adama SANGARE  
Mr Youssouf COULIBALY  
Mr Samba Karim TIMBO  
Mme TOGOLA Fanta KONIPO  
Mr Sanoussi BAMANI  
Mr Doulaye SACKO  
Mr Issa DIARRA  
Mr Ibrahim ALWATA

Ophthalmologie  
Stomatologie  
Orthopédie. Traumatologie  
Anesthésie - Réanimation  
Chirurgie Générale  
Orthopédie Traumatologie  
Ophthalmologie  
Anatomie & Chirurgie Générale  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Orthopédie - Traumatologie  
Anesthésie - Réanimation  
ORL  
ORL  
Ophthalmologie  
Ophthalmologie  
Gynéco-obstétrique  
Orthopédie - Traumatologie

## D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

### 1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO  
Mr Bréhima KOUMARE  
Mr Siné BAYO  
Mr Gaoussou KANOUTE  
Mr Yéya T. TOURE  
Mr Amadou DIALLO  
Mr Moussa HARAMA  
Mr Ogobara DOUMBO

Chimie Générale & Minérale  
Bactériologie-Virologie  
Anatomie-Pathologie-Histoembryologie  
Chimie analytique  
Biologie  
Biologie **Chef de D.E.R.**  
Chimie Organique  
Parasitologie - Mycologie

### 2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Yénimégué Albert DEMBELE  
Mr Anatole TOUNKARA  
Mr Amadou TOURE

Chimie Organique  
Immunologie  
Histoembryologie

### 3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Bakary M. CISSE  
Mr Abdrahamane S. MAIGA  
Mr Adama DIARRA  
Mr Mamadou KONE

Biochimie  
Parasitologie  
Physiologie  
Physiologie

### 4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mahamadou CISSE  
Mr Sékou F.M. TRAORE  
Mr Abdoulaye DABO  
Mr Abdrahamane TOUNKARA  
Mr Ibrahim I. MAIGA  
Mr Benoît KOUMARE  
Mr Moussa Issa DIARRA  
Mr Amagana DOLO  
Mr Kaourou DOUCOURE

Biologie  
Entomologie médicale  
Malacologie, Biologie Animale  
Biochimie  
Bactériologie - Virologie  
Chimie Analytique  
Biophysique  
Parasitologie  
Biologie

### 5. ASSISTANTS

Mr Mounirou BABY  
Mr Mahamadou A. THERA

Hématologie  
Parasitologie

## D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

### 1. PROFESSEURS

Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAIGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie, <b>Chef de DER</b>
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Mr Hamar A. TRAORE	Médecine Interne

### 2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie
Mr Bah KEITA	Pneumo-Phtisiologie
Mr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie
Mr Somita KEITA	Dermato-Leprologie
Mr Moussa Y. MAIGA	Gastro-entérologie
Mr Abdel Kader TRAORE	Médecine Interne

### 3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne
Mr Mamady KANE	Radiologie
Mme Tatiana KEITA	Pédiatrie
Mr Diankiné KAYENTAO	Pneumo-Phtisiologie
Mme TRAORE Mariam SYLLA	Pédiatrie
Mr Siaka SIDIBE	Radiologie
Mr Adama D. KEITA	Radiologie

### 4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Bou DIAKITE	Psychiatrie
Mr Bougouzié SANOGO	Gastro-entérologie
Mr Saharé FONGORO	Néphrologie
Mr Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
Mr Kassoum SANOGO	Cardiologie
Mr Seydou DIAKITE	Cardiologie
Mme Habibatou DIAWARA	Dermatologie
Mr Mamadou B. CISSE	Pédiatrie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie
Mme SIDIBE Assa TRAORE	Endocrinologie

### 5. ASSISTANT

Mr Cheick Oumar GUINTO	Neurologie
------------------------	------------

## D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

### 1. PROFESSEUR

Mr Boubacar Sidiki CISSE Toxicologie

### 2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Arouna KEITA † Matière Médicale  
Mr Ousmane DOUMBIA Pharmacie Chimique  
Mr Flabou BOUGOUDOGO Bactériologie - Virologie

### 3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Boulkassoum HAIDARA Législation  
Mr Elimane MARIKO Pharmacologie, **Chef de D.E.R.**  
Mr Massa SANOGO Chimie Analytique

### 4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Drissa DIALLO Matières Médicales  
Mr Alou KEITA Galénique  
Mr Ababacar I. MAIGA Toxicologie  
Mr Yaya KANE Galénique

## D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

### 1. PROFESSEUR

Mr Sidi Yaya SIMAGA Santé Publique, **Chef de D.E.R.**

### 2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Moussa A. MAIGA Santé Publique

### 3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Yanick JAFFRE Anthropologie  
Mr Sanoussi KONATE Santé Publique

### 4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE Santé Publique  
Mr Adama DIAWARA Santé Publique  
Mr Hamadoun SANGHO Santé Publique  
Mr Massambou SACKO Santé Publique

## CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N Golo DIARRA	Botanique
Mr Boubou DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Bokary Y. SACKO	Biochimie
Mr Sidiki DIABATE	Bibliographie
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souleymane GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu
Mr Arouna COULIBALY	Mathématiques
Mr Mamadou Bocary DIARRA	Cardiologie
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie Médicale
Mr Yaya COULIBALY	Législation

## ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. A. E. YAPO	BIOCHIMIE
Pr. M. L. SOW	MED. LEGALE
Pr. Doudou BA	BROMATOLOGIE
Pr. M. BADIANE	PHARMACIE CHIMIQUE
Pr. Babacar FAYE	PHARMACODYNAMIE
Pr. Eric PICHARD	PATHOLOGIE INFECTIEUSE
Pr. Mounirou CISS	HYDROLOGIE
Dr. G. FARNARIER	PHYSIOLOGIE
Pr. Amadou Papa DIOP	BIOCHIMIE

# Dédicaces et remerciements

## **Je dédie ce travail:**

A Allah ( Soubahana Wa Taallah) et à son prophète Mohamed ( Sallahou Aleïhim Wassalam).

## **A mon Père Baba FOFANA**

Ce travail est le couronnement de tes multiples efforts et de tes sacrifices.

Tu as cultivé en nous le travail honnête et bien fait, le respect des autres, la modestie et le courage. Qu'Allah vous donne longue et heureuse vie pour récolter le fruit de la graine que vous avez semé AMEN !

## **A mes mères Assa KONTA et Oumou MAIGA**

vous avez pleinement rempli vos rôles de mères. Vous nous avez tout donné et appris à être bon. Chères mères, ce travail est le fruit de l'éducation que nous avons reçu et continuons de recevoir de votre part. Que DIEU le tout puissant vous donne longue et heureuse vie à nos côtés AMEN !

## **A mes frères: Abdoulaye, Hamidou, Souleymane, Mohamed, Mamoutou et Adama Fofana.**

Je vous dis merci et je suis sûr que vos conseils ne manqueront pas *in cha allah*.

Que DIEU renforce nos liens de sang : AMEN !

## **Je remercie :**

- **Toute la population de Diafarabé** de m'avoir élevé et éduqué dans le sens de la réussite.

Retrouves ici toute ma reconnaissance et sois en fière.

### **- Mes tontons**

Feu Mamadou Maiga, feu Oumar Traoré( dormez en paix), Youssouf Maiga, Zoumana Traoré, C'est l'occasion de vous remercier du soutien tant moral que matériel que j'ai reçu de votre part. Ce travail est le vôtre.

### **- Mes tantes**

Lalla Maiga , Fanta Maiga , Feu Fanta SOUKO ( dors en paix), Babintou Traoré, Mariam CAMARA, j'aurai dû vous appeler mères parce que vous aviez été des mères pour moi et à tout moment , merci encore une fois.

### **- Mon tuteur à Bamako, Mamoutou NOUMANZANA**

Merci de m'avoir reçu chez vous, Recevez ici l'assurance de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Moctar DIALLO, Mr Sekou TOURE, Mr Mamadou BAH, Mr Ousmane TOURE. Merci pour le soutien moral et technique. Bonne carrière à tous !

**- Dr Beavogui A. Habib et Mamadou WELE**

Je suis très honoré de tout ce que vous aviez fait pour guider ce travail à bon port.

La générosité est une qualité qui ne vous a pas manqué. Recevez ici l'assurance de ma sincère reconnaissance. Puisse Dieu fasse que je n'oublie jamais votre magnanimité.

Trouvez ici mes remerciements pour votre franche collaboration pour la réalisation de cette thèse.

**- Dr Amed OUATTARA**

J'ai beaucoup apprécié l'ouverture d'esprit, la compétence et la disponibilité dont vous faites preuve envers tous les cadets et stagiaires qui passent dans le service. Sincèrement Amed, les mots me manquent pour vous remercier mais sachez que le bienfait n'est jamais perdu.

Recevez ici toute ma sympathie.

**- Dr Mamadou THERA, Dr Abdoulaye DABO, Dr Amagana DOLO, Dr Mamadou Diakité** c'est l'occasion de vous remercier de votre contribution dans la réalisation de ce travail.

**- Dr Abdoulaye DJIMDE, Co-directeur de la thèse.**

Vous nous avez initié à la biologie moléculaire. Nous avons beaucoup apprécié vos conseils, votre disponibilité, vos qualités humaines et votre modestie, votre rigueur et votre souci d'un travail bien fait.

Votre persévérance et votre amour pour le travail bien fait, font de vous un exemple à suivre. Je vous prie de le croire votre bien dévoué. Recevez ici mes sincères remerciements.

**- La section Entomologie du DEAP** merci de la franche collaboration.

- Les chauffeurs du DEAP

- Toute la population de Kollé pour sa collaboration et sa participation active à cette étude.

**- Mes cousines**

Djèneba Sidibé dite Djébou, Hawa MAIGA, Djèneba Traoré dite GOGO , Fatoumata Traoré née Tataba, Bingui Maiga, Bintou Traoré Inna, vous avez mes remerciements les plus sincères . Merci pour tout ce que vous aviez fait pour nous. Soyez en rassurer ma profonde reconnaissance.

**-Mes amis**

Amadou Ousmane Alatiou Maïga, Ibrahim Ouologuem, Ibrahim.S. Traoré, Mamadou Kementa, Amadou B. Cissé, Hamidou A.Djimdé, Ibrahim A. Traoré, Mouneri Maiga, Nouhoum Ouologuem, Mamadou Lemine, Siaka Sanogo, Drissa Sanogo, Oumar Coulibaly, Moussa Traoré, Alou Sidibé, c'est l'occasion pour moi de vous dire merci encore une fois pour l'amitié.

**- Les membres de l'unité de l'épidémiologie moléculaire et de la chimiorésistance du**

**DEAP** : Dr BEAVOGUI A.H, Mamadou WELE, Mamadou TEKETE, Garba M. NASSIROU, Dinkorma OUOLOGUEM, Oumou KEITA, Demba DEMBELE & Dr A. Djimdé, pour les encouragements, l'assistance et la disponibilité dont vous avez fait preuve, votre apports dans l'élaboration de cette thèse a été continu et constant . Je vous prie de considérer ce travail comme le vôtre: merci infiniment.

**- Mon ami Ibrahim Abdou Nouhoum**

Merci pour l'amitié et crois-moi, cette amitié est réciproque.

**- Mes collègues de classe**, que DIEU nous donne longue vie et plein de succès dans nos carrières professionnelles !

**- Mes cadets**

Garba Mamane Nassirou, Karim Traoré, Mamadou KEITA, Moussa FOFANA, Charles ARAMA , AAO, MOUNKORO, Abdoulaye Katilé. Que Dieu vous donne beaucoup plus de chance dans la réalisation de votre travail et bon courage pour les thèses.

**-Mes promotionnaires du DEAP**

Abdoulaye Traoré, Issa Diarra, Modibo Dao, Assa Diarra, Beh Kamaté, Mamoudou Hammadi Maiga , Modibo Keita. Merci pour vos soutiens.

**-Mes Aînés du DEAP**

Dr Mamoudou KODIO, Dr Ousmane TRAORE, Dr Amadoun GUINDO, Dr Sory DIAWARA, Dr Lala KASSAMBARA, Dr DOUMBO Safiatou NIARE, Dr Awa KONARE, Dr KEITA Awa DEMBELE, Dr Balla KONARE, Dr Moussa SOGOBA, Dr Balla NIAMBELE, Dr Belco POUADIOUGOU, Dr Issaka SAGARA, Dr Kassoum KAYENTAO, Dr Alassane DICKO, Dr

Dédicaces et remerciements

## **Remerciements aux membres du jury**

### **A notre cher maître et président du jury**

#### **Professeur Dapa DIALLO**

Professeur agrégé d'hématologie

Chef du service d'hémato-oncologie de l'Hôpital du Point 'G'

Charge du cours d'hématologie à la Faculté de Médecine de pharmacie et d'Odontostomatologie.

#### **Cher maître**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples préoccupations

Nous avons admirer les qualités scientifiques, humaines et pédagogiques avec lesquelles vous nous avez enseigné l'hématologie.

Veillez retrouver ici, cher Maître, l'expression de mes sentiments respectueux.

### **A notre Maître et juge**

#### **Professeur Ousmane DOUMBIA**

Professeur agrégé en pharmacie chimique

Responsable de l'enseignement de la Pharmacie chimique à la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

Directeur du Laboratoire National de la Santé

#### **Cher Maître,**

Nous vous remercions pour la spontanéité avec laquelle vous acceptez de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations.

Votre rigueur scientifique et votre éloquence dont nous avons pris connaissance même si, malheureusement nous n'avons pas bénéficié de vos cours, font de vous un homme respecté et admiré par vos étudiants que nous sommes.

Recevez ici notre plus grand respect.

## **A notre Maître et juge**

### **Dr Amagana DOLO**

Maître assistant de parasitologie à la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

Cher Maître,

Nous sommes très honorés par votre présence dans ce jury.

Nous avons beaucoup admiré vos qualités scientifiques et humaines.

Votre simplicité, votre humilité, votre disponibilité constante et permanente, votre rigueur, votre dynamisme font de vous un maître apprécié par tous.

Recevez ici l'assurance de nos sentiments respectueux et dévoués.

## **A notre maître et co-directeur de thèse**

### **Docteur Abdoulaye DJIMDE**

PhD en Microbiologie et immunologie

Chercheur au DEAP de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie du Mali.

Officier de l'Ordre National du Mérite.

Permettez-nous de vous remercier cher Maître de la confiance que vous nous avez fait en nous confiant ce travail.

Vos qualités scientifiques ont fait de vous un chercheur admiré par ses collaborateurs.

Vous êtes un homme de science et un brillant chercheur de votre Etat.

Vous aviez cultivé en nous le sens du travail bien fait et la rigueur scientifique.

Sans jamais vous départir de vos qualités sociales et humaines vous avez fait preuve d'une attention extraordinaire que nous saluons.

Nous vous prions, cher Maître, de le croire votre bien dévoué et de notre satisfaction.

Recevez notre sincère remerciement.

**A notre Maître et Directeur de Thèse.**

**Professeur Ogobara K. DOUMBO**

Professeur Titulaire de Parasitologie et de Mycologie

Responsable de l'enseignement de la Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

Médecin chef de du Département d'Epidémiologie des affections Parasitaires.

Directeur du cours d'Epidémiologie pour Cadres Supérieurs de la Santé en Afrique.

**Cher Maître**

Nous sommes très honorés d'être compter parmi vos élèves.

Soyez rassurer cher Maître de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.

Dédicaces et remerciements

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>A220S :</b>	Serine a remplacé Arginine en position 220
<b>A.D.N :</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>A.MA.PRO.S :</b>	Association Malienne pour la Promotion du Sahel
<b>ARN = RNA:</b>	Acide Ribonucléique
<b>ASRA :</b>	Allelic Specific Restriction Analysis
<b>B.S.A :</b>	Bovine Albumine Sérum
<b>CRCP/OCCGE :</b>	Centre de Référence de Chimiosensibilité sur le Paludisme/Organisation pour la Coopération et la Coordination de la lutte contre les Grandes Endémies.
<b>CC :</b>	Centimètre Cube
<b>CG2 :</b>	Candidate Gène 2
<b>CI50 :</b>	Concentration Inhibitrice à 50 pour cent
<b>CI90 :</b>	Concentration Inhibitrice à 90 pour cent
<b>CMI :</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CO2:</b>	Gaz carbonique .
<b>CQ:</b>	Chloroquine
<b>CVD :</b>	Center for Vaccine Development
<b>D.D.T :</b>	Dichloro Diphényle Trichloroéthane
<b>D.E.A.P :</b>	Département D'épidémiologie des Affections Parasitaires.
<b>D.H.F.R :</b>	DiHydroFolate Réductase
<b>D.H.P.S :</b>	DiHydroPtéroate Synthétase
<b>DHFS :</b>	Di Hydro Folate Synthase.
<b>DHOD :</b>	Di Hydro orotate Deshydrogenase
<b>dNTP :</b>	déoxy-Nucléotides Tri Phosphate
<b>dTMP :</b>	desoxy Thymidilate Mono Phosphate
<b>dUTP :</b>	désoxy Uridilate Triphosphate
<b>dUDP :</b>	désoxy Uridilate Diphosphate.
<b>dUMP :</b>	désoxy Uridilate Mono Phosphate
<b>E.D.T.A :</b>	Ethylène Diamine Tétra Acétique
<b>E.T.P :</b>	Echec Thérapeutique Précoce

<b>E.T.T :</b>	Echec Thérapeutique Tardif
<b>F.A.O :</b>	Fonds des Nations Unis pour l'Alimentation
<b>F.M.P.OS :</b>	Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
<b>G.I.S :</b>	Geographic Information System
<b>G.P.S :</b>	Global Position System
<b>G.R.I :</b>	Genotype Resistance Index
<b>GTP :</b>	Guanine Triphosphate
<b>Hb :</b>	Hémoglobine
<b>INAGEF</b>	Institut Africain de Gestion et de Formation
<b>kDa :</b>	Kilo Dalton
<b>K76T :</b>	Lysine (K) à la position 76 de la protéine est remplacée par la Thréonine
<b>Kg/PC :</b>	Kilogramme / Poids Corporel
<b>L.D.H :</b>	Lactate Déshydrogénase
<b>ml :</b>	millilitre
<b>Mgcl2 :</b>	Chlorure de Magnesium
<b>mg :</b>	milligramme
<b>MS-PCR :</b>	Mutation spécifique-Polymerase chaine reaction
<b>ng :</b>	nanogramme
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>O.N.G :</b>	Organisation Non Gouvernementale
<b>PABA :</b>	Acide para amino benzoïque
<b>P.C.R :</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PfCRT :</b>	<i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquino-resistance Transporter
<b>PfMDR :</b>	<i>Plasmodium falciparum</i> Multidrug Résistante
<b>PNLP :</b>	Programme National de Lutte contre le Paludisme
<b>PYR :</b>	Pyriméthamine
<b>RI :</b>	Résistance de type 1
<b>RII :</b>	Résistance de type 2
<b>RIII :</b>	Résistance de type 3
<b>RCS :</b>	Renseignement Clinique Satisfaisante
<b>RPMI :</b>	Rostwell Park Mémorial Institute

<b>S :</b>	Sensible
<b>SDX :</b>	Sulfadoxine
<b>SMZ :</b>	Sulfométhoxazole
<b>SP :</b>	Sulfadoxine-Pyriméthamine
<b>Taq :</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>T.B.E :</b>	Tri Borate'd'EDTA
<b>THF :</b>	Tetra Hydro Folate
<b>TMP :</b>	Triméthoprim
<b>TS :</b>	Tymidilate Synthetase
<b>UDP :</b>	Uridilate Diphosphate
<b>U.V :</b>	Ultra Violet
<b>µg :</b>	microgramme

# SOMMAIRE

I – INTRODUCTION.....	1
OBJECTIFS .....	4
II GENERALITES.....	5
1. Généralité sur les antipaludiques.....	5
1.1. Les antifolates.....	6
1.1.1.Historique.....	6
1.1.2. Mécanisme d'action .....	6
1.1.3. Classification des antifolates .....	9
1.2. Les amino-4-quinoléines.....	13
1.2.1. La chloroquine.....	14
1.2.2. Amodiaquine.....	15
1.3. Les amino-alcools.....	15
1.3.1. LA QUININE.....	15
1.4 . Les dérivés de l'artémisinine ou du qingaosu.....	17
1.5. Les associations.....	17
1.6. Les amino-8-quinoléines.....	18
1.7. les antibiotiques.....	18
2. GENERALITE SUR LA RESISTANCE DU <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> AUX ANTIPALUDIQUES.....	19
2.1. Chimiorésistance de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	19
2.1.1. La résistance aux antimetabolites.....	19
2.1.2. La résistance aux amines alcools.....	21
2.1.3. La résistance aux amino-4-quinoléines.....	22
3. Evaluation de la chimiorésistance.....	23
3.1 Test in vitro:.....	23
3.1.1 . Tests optiques.....	24
3.1.2. Tests isotopiques.....	24
3.1.3. Les nouveaux tests.....	24
3.1.4 . Test moléculaires : Technique de PCR.....	25
3.2. Tests <i>in vivo</i> .....	25

3.2.1. Test standard de l'O.M.S. de 28 jours.....	26
3.2.2. Test standard simplifié de l'O.M.S. de 7 jours.....	26
3.2.3. Test simplifié du C.R.C.P/O.C.C.G.E: .....	26
3.2.4 Test standard de l'O.M.S. de 14 jours: .....	26
<b>IV- METHODOLOGIE.....</b>	<b>28</b>
<b>A . ASPECTS SOCIO-DEMOGRAPHIQUE.....</b>	<b>28</b>
1 / Lieu d'étude.....	28
2. Type d'étude: :.....	31
3. Période d'étude:.....	31
4. Population d'étude .....	31
5- l'échantillonnage: :.....	32
6. Méthode de collecte des données.....	32
6.1. Collecte des données sur le terrain .....	32
6.2. La Collecte des données au laboratoire .....	41
6.2.1. Les amorces et programmes d'amplification .....	45
a/ ASRA.....	46
b/ La MS-PCR.....	50
6/ Aspects éthiques.....	53
<b>IV/ RESULTATS.....</b>	<b>54</b>
1. Resultats Demographiques.....	54
2. Resultats cliniques .....	56
3. resultats parasitologiques .....	54
4. resultats hematologiques .....	62
5. resultats moleculaires .....	63
<b>V/ DISCUSSION .....</b>	<b>71</b>
<b>VI/ CONCLUSION .....</b>	<b>76</b>
<b>VII/ RECOMMENDATION .....</b>	<b>76</b>
<b>VIII/ BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>79</b>

# **INTRODUCTION**

## I / INTRODUCTION :

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à la présence et au développement dans l'organisme, d'abord dans le foie ensuite dans les hématies, d'un protozoaire sanguicole de genre plasmodium. Il est transmis à l'Homme par la piqûre infestante de l'anophèle femelle.[1]

Quatre espèces sont inféodées à l'homme: *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*) et *Plasmodium vivax* (*P. vivax*). Parmi ces espèces, seule *P. falciparum* est responsable des formes graves et des anémies sévères.

Endémie mondiale, le paludisme constitue un problème majeur de santé publique avec plus de 2 milliards de sujets exposés à travers le monde, soit 40% de la population mondiale. On enregistre chaque année entre 300 et 500 millions de cas cliniques. Le nombre annuel de décès est estimé entre 1,5 et 2,7 millions dont 90% en Afrique subsaharienne [OMS, 1998].

Cette hémosporeidiose tue un enfant sur cinq en Afrique subsaharienne et représente 20 à 30% de motifs de consultation [OMS, 1996]. Les enfants de moins de cinq ans sont exposés aux risques de développement des formes graves et compliquées de la maladie [2] et les femmes enceintes en payent un lourd tribut.

Au Mali la mortalité spécifique infanto-juvénile liée au paludisme est estimée entre 25 et 35% [3]. Dans la plupart des pays d'endémie palustre, il existe un programme national de lutte contre le paludisme qui édicte des directives pour le contrôle et la prise en charge des cas. Au Mali, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), créé en 1993 recommande la chloroquine (CQ) en première ligne (prophylaxie chez la femme enceinte et traitement des accès simples), la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) en deuxième ligne (échecs à la CQ) et la quinine en troisième ligne (prise en charge des formes graves, et lorsque la prise orale de médicaments est impossible).

Actuellement, la lutte contre le paludisme se heurte à des obstacles comme :

- la résistance des vecteurs aux insecticides et celle des parasites aux antipaludiques,
- la réapparition du paludisme dans certaines zones où il avait disparu,
- la complexité et le grand polymorphisme antigénique mis en œuvre par le *Plasmodium* pour circonscrire les défenses immunitaires de l'hôte [4],
- les difficultés d'obtention rapide de vaccin.

La résistance à la chloroquine est connue depuis les années 1960. En effet, en 1959 YOUNG et MOORE ont signalé l'échec à la chloroquine dans le traitement d'une infestation de *P. falciparum* en Colombie. Ailleurs, des cas ont été rapportés au Venezuela, au Brésil [5] et le

premier cas a été décrit en Thaïlande en 1961 [6, 7]. La chimiorésistance en général est favorisée par la pression médicamenteuse, les mouvements de populations et des vecteurs.

Depuis les années 1970, la sulfadoxine-pyriméthamine est utilisée comme traitement de première ligne des accès simples de paludisme dans le bassin de l' Amazonie [8].

Le développement de la résistance de *P. falciparum* à ces molécules ces dix dernières années dans la même zone a fait que cette association a perdu son large spectre d'utilisation comme médicament de 1<sup>ère</sup> intention [8].

La résistance à l'association sulfadoxine-pyriméthamine constitue un problème croissant dans certaines parties du continent Africain[9, 10]. En Afrique, des taux élevés de chloroquinorésistance dans certaines régions particulièrement au centre a conduit certains pays comme le Malawi, la Tanzanie, l'Afrique du sud, à l'utilisation de la Sulfadoxine-pyriméthamine comme traitement de 1<sup>ère</sup> ligne [11, 12].

Des travaux de surveillance dynamique de la sensibilité des souches plasmodiales maliennes montrent différents niveaux de chloroquinorésistance en fonction du temps et des faciès de transmission[13, 14].

Des études effectuées dans le village de Kollé par différents auteurs en 1994, 1998 et 1999 ont montré une progression de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine avec des taux respectifs de 22%, 25,8% et 27.7% [13, 14,15].

Au Mali en 1994, l'évaluation de la chimiorésistance de *P. falciparum* à l'association sulfadoxine-pyriméthamine en zone urbaine (l'Hôpital du Point G) et peri-urbaine (Sotuba), a montré que 99% de souches étaient sensibles à cette association de molécules [15].

Etant donné le niveau croissant de la chloroquinorésistance observé à Kollé, de l'application régulière de l'automédication et l'absence d'informations documentées disponibles sur la sulfadoxine-pyriméthamine depuis 1994, il nous a paru important d'évaluer le niveau actuel de la sensibilité de *P. falciparum* à cette association de molécules dans cette localité. Ce travail devra permettre de fournir des données fiables sur l'efficacité de la sulfadoxine-pyriméthamine pour une meilleure utilisation de ce médicament au Mali.

Ainsi nos hypothèses de recherche sont les suivantes :

### Hypothèses de recherche

1. Dans le village de Kollé, il y aurait une baisse de la chimiosensibilité de *P. falciparum* à la Sulfadoxine-Pyriméthamine corrélée à une augmentation de la prévalence des mutations ponctuelles *dhfr* 51, 59 et 108 et *dhps* 437 et 540.
2. Il existerait une corrélation entre la prévalence de ces mutations ponctuelles et la résistance *in vivo*.

Pour tester ces hypothèses, nous nous sommes fixé des objectifs ci-après :

# OBJECTIFS

## A/ OBJECTIF GENERAL:

Evaluer l'efficacité clinique et parasitologique de la sulfadoxine-pyriméthamine dans le traitement des cas de paludisme simple à *P. falciparum* à Kollé.

## B/ OBJECTIFS SPECIFIQUES:

1. Déterminer les cas incidents et les paramètres de morbidité des accès simples de paludisme à *P. falciparum* à Kollé.
2. Déterminer les réponses cliniques (ETP, ETT et RCS ) et parasitologiques( sensible, RI, RII et RIII) de *P. falciparum* à la Sulfadoxine-pyriméthamine chez les paludéens à Kollé.
3. Mesurer les taux de prévalence des mutations ponctuelles sur les gènes *dhfr* (en position 51, 59 et 108) et *dhps* (en position, 437 et 540) dans la population parasitaire à Kollé.
4. Déterminer les niveaux d'association entre la présence de ces différentes mutations et les échecs parasitologiques et cliniques à la Sulfadoxine-Pyriméthamine.

# **GENERALITES**

## II/ GENERALITES

### 1. GENERALITES SUR LES ANTIPALUDIQUES

Il existe un arsenal d'antipaludiques, mais nous nous intéresserons ici aux antifolates en particulier la sulfadoxine- pyriméthamine en association ( commercialisée sous le nom de Fansidar<sup>®</sup> ) qui a fait l'objet de cette étude.

#### **Définition:**

Un antipaludique est un produit naturel ou de synthèse qui, administré par voie orale ou parentérale ou encore rectale, à dose unique ou à doses répétées permet de détruire le parasite du paludisme ou de bloquer sa croissance dans le but de prévenir ou de guérir la maladie palustre.

#### **Classification:**

Les antipaludiques naturels connus aujourd'hui sont la quinine et le qingaosu. Tous les autres sont des antipaludiques de synthèse.

- Les antipaludiques sont divisés en deux groupes selon leur rapidité d'action en :
  - *Groupe 1*: La quinine et les amino-4-quinoléïnes antipaludiques d'action rapide.
  - *Groupe 2*: Les antifoliques (sulfones et sulfamides) et les antifoliniques (biguanides et diaminopyridines), antipaludiques d'action lente
- Selon le point d'impact des médicaments on distingue :
  - des *schizontocides* (Chloroquine, amodiaquine, quinine, méfloquine, arthémisine)
  - des *gamétocytocides* (amino-8-quinoléïne: Primaquine<sup>®</sup> )
- Selon la structure chimique des médicaments on distingue:
  - les *Amino-4-quinoléïne*: (Chloroquine, Hydroxychloroquine, Oxychloroquine, Novaldiamine, Dabequine, Amodiaquine, Amopyroquine, Cycloquine, Tebuquine, Sentoquine).
  - les *Quinoléïne-méthanol*: ( Quinine, Cinchonine, Quinidine, Cinchonidine, Halophantrine, Méfloquine ).
  - les *Amino-8-quinoléïne*: ( Primaquine<sup>®</sup>, Pamaquine, Pentaquine, Plasmocide, Quinocide ).
  - *Antifoliques et antifoliniques*: ( Proguanil, Pyriméthamine, Chorproguanil ).

#### **Médicaments.** ( Chandennier et al. 1998 )

Il existe actuellement un nombre assez limité d'antipaludiques. Compte tenu de la progression de la résistance aux médicaments dans de nombreuses parties du monde, il devient de plus en plus difficile de traiter efficacement le paludisme. Plusieurs classes de produits ont successivement vu le jour, avec chacune leurs avantages et inconvénients. Dans leur grande majorité, ces produits sont uniquement actifs sur les formes sanguines ( intra-érythrocytaires

asexuées) du parasite et n'ont pas d'activité sur les stades initiaux intra-hépatiques, ni sur les gamétocytes sanguins.

## 1.1. LES ANTIFOLATES

### 1.1.1. Historique

Le paludisme a sans doute accompagné l'homme au cours de son expansion à la surface de la terre. Cependant la plupart des antipaludiques utilisés de nos jours l'ont été de façon empirique. Ainsi la date de naissance exacte de ces molécules est difficile à préciser.

Les antifolates ne constituent pas une classe chimique homogène. Ils se caractérisent par un même mode d'action: inhibition de la synthèse de l'acide folique.

La découverte de l'activité antibactérienne des sulfamides en 1936 par G. DOGMAGK et des sulfones par 2 équipes indépendantes en 1937, a été le point de départ des antifolates. En effet, en 1937 Diaz De Léon a été le 1<sup>er</sup> à signaler l'activité des sulfamides dans le traitement du paludisme, mais ils n'ont été reconnus en thérapeutique qu'en 1943 comme inhibiteur compétitif de l'acide para amino benzoïque( PABA) [16].

Certains dérivés, inhibiteurs non spécifiques de la dihydrofolate réductase(DHFR) (aminoptérine, methotrexate) ont vu le jour mais ils n'ont été utilisés qu'exceptionnellement dans le traitement du paludisme. En 1951, FERONE démontre que les 2,4 diaminopyrimidine et le cycloguanil, ont le même site d'action sur l'inhibition de la dihydrofolate reductase ( DHFR). Les sulfonamides agissent en amont de la chaîne de la synthèse de l'acide folique par inhibition de la dihydropteroate-synthetase( DHPS)

### 1.1.2. Mécanisme d'action :

Les érythrocytes sains sont incapables de synthétiser la purine. Ils incorporent les nucléotides ( adénosine ) et les purines (adénines, hypoxantine, guanine) présents dans le plasma de l'hôte. Le *Plasmodium* est incapable d'utiliser l'acide folique de l'hôte. Il doit donc assurer la synthèse de novo des folates à partir de la PABA (acide para amino benzoïque). Ainsi, le parasite pour survivre doit modifier d'une part, la perméabilité membranaire des érythrocytes infectés, ce qui augmente l'influx des purines. D'autre part, il doit fabriquer des enzymes requises pour le cycle de récupération des purines et de synthèse de novo des pyrimidines indispensables pour la synthèse des acides nucléiques ( ARN, ADN).

La spécificité d'action des antimétabolites contre les plasmodies est basée sur la haute affinité de ces antipaludiques pour les enzymes du parasite par rapport à celle de la cellule hôte.

Les sulfamides et les sulfones, plus rencontrés dans les hématies parasitées que les hématies saines, inhibent par compétition avec la PABA l'action de la DHPS. Cette DHPS est une enzyme qui catalyse la synthèse de l'acide dihydrofolique à partir de ce substrat ( PABA).

Les diaminopyrimidines comme les biguanides ont pour cible la dihydrofolate réductase (DHFR) qui, chez les plasmodies, a la particularité d'être bi-fonctionnelle en ce sens qu'elle est couplée dans la même protéine avec une thymidilate synthétase (TS). Cette DHFR est composée de 607 acides aminés avec un poids moléculaire de 71kDa.

La DHFR réduit la dihydrofolate en tétrahydrofolate. L'acide tétrahydrofolique ( THF ) sert de co-enzyme à de nombreuses réactions biochimiques: la synthèse des bases puriques et des bases pyrimidiques. Il intervient également dans le métabolisme de la serine et de la méthionine

Le gène *dhfr*, codant pour l'enzyme DHFR est situé sur le quatrième chromosome.

Pendant les 48h du cycle intâ-érythrocytaire, la synthèse de la DHFR-TS coïncide avec celle de l'ADN et l'activité de l'enzyme commence 18 heures avant l'invasion des hématies par le merozoite puis s'exerce jusqu'à la fin de la schizogonie [17].



dUMP : désoxy Uridilate Mono Phosphate  
TS : Thymidilate synthase  
dTMP : desoxy Thymidilate Mono Phosphate  
THF : Tetra Hydro Folate  
GTP : Guanine Triphosphate  
DHFS : Di Hydro Folate Synthase.  
DHFR : Di Hydro Folate Reductase  
DHPS : Di Hydro Pteroate Synthase  
DNA : Déoxyribo Nucleique Acid  
PABA : Acid Para Amino Benzoïque  
DHOD : Di Hydro orotate Deshydrogenase

### 1.1.3. Classification des antifolates

On peut classer schématiquement les antifolates en deux grands groupes suivant leur cible enzymatique :

- en inhibiteurs de la dihydropteroate synthétase( DHPS qui sont représentés par les sulfamides et les sulfones, et
- en inhibiteurs de la dihydrofolate réductase.

@ Groupe I ou antifoliques:

Se sont les inhibiteurs de la dihydropteroate synthétase( DHPS ). Ils sont représentés essentiellement par les sulfamides et les sulfones. On distingue deux classes thérapeutiques, antibactériens et antimalariques.

@ Groupe II ou antifoliniques:

Ils inhibent la DHFR et sont représentés par les biguanides, les diaminobenzylpyrimidines, les quinazolines et les triazine.

Dans ce groupe on distingue :

- trois classes thérapeutiques: les anticancéreux, les antibactériens, et les antiparasitaires.
- trois classes chimiques: les benzylpyrimidines, les triasinopyrimidines, et les dérivés cycliques( ( pteridine,pyrido[2,3]pyrimidines, quinazoline ). Ces antifoliniques peuvent être spécifiques ou non spécifiques.

Devant l'émergence précoce de résistances aux antifolates classiques, et dans le souci d'avoir des molécules plus actives, des synthèses chimiques plus récentes ont permis la découverte de nouveaux médicaments comme les quinazolines, le WR152122. Les associations

médicamenteuses ont également permis de limiter les résistances à un seul antipaludique, parmi lesquelles on peut noter le Fansidar ( Sulfadoxine + Pyriméthamine).

### 1.1.3.1. les antifoliques

a/ **Les Biguanides**: Nés des chercheurs Britanniques et Indiens, cette molécule chimique est utilisée non seulement en malarialogie mais aussi dans le traitement du diabète non insulino-dépendant. On peut citer le Proguanil, le Chloroproguanil et le Nitroproguanil [15].

PROGUANIL( Paludrine\* ): Le PALUDRINE a été introduit au Mali à partir de 1989 dans le cadre d'une nouvelle stratégie de chimioprophylaxie qui l'associe à la CQ [18].

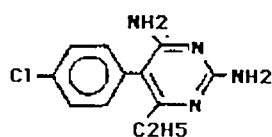
Sa demi-vie d'élimination plasmatique après bio transformation hépatique est de 12-16 heures. L'élimination est essentiellement urinaire sous forme inchangée ( 60% de la dose absorbée), 30% sous forme de dérivés tri azine actif ( cycloguanil) et 10% par les fèces. Il passe dans le lait maternel et la salive, il traverse la barrière placentaire.

Le proguanil est une prodrogue qui agit essentiellement par l'intermédiaire de son métabolite actif ( cycloguanil ).

#### b. Les diaminopyrimidiques

##### b.1 La pyriméthamine

Structure :



**Pyriméthamine**

C'est un schizontocide sanguin avec un mode d'action antimétabolique. La pyriméthamine a une action gaméticide vis à vis de *P. vivax*. Elle s'est montrée la plus intéressante parmi toutes les Diaminopyrimidines utilisées. Elle est la plus efficace des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase utilisable. Un produit voisin, le triméthoprime c'est révélé surtout être un antibactérien et n'est pas retenu comme un antipaludique.

## Eléments pharmacologiques :

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

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

Elle est bien absorbée avec un pic plasmatique obtenu 2 à 3 heures après l'administration, une demi-vie longue de 4 à 5 jours. Son efficacité sur les schizontes érythrocytaires des plasmodies est lente mais bonne. Le taux plasmatique efficace sur les souches sensibles est de 10 ug/ml Cette concentration est présente dans le sérum pendant environ 15 jours. Elle a une cinétique voisine de celle des sulfamides retards il apparaît donc licite de les associer.

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

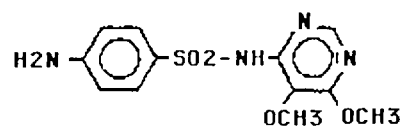
Chez la femme enceinte le risque d'anémie est très important. L'élimination très prolongée se fait par voie urinaire et fécale sous forme métabolisée. La pyriméthamine passe dans le lait maternelle et traverse la barrière placentaire. Les dérivés de les plus intéressantes sont la METOPRIME® et TRIMETHOPRIME®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

**b.2. Autres familles :** Les quinazolines : WR158122, les triazines : cycloguanil

### 1.1.3.2. Les antifoliques

a/ La sulfadoxine : C'est un antifolique de la famille des sulfamides.

Structure :



Sulfadoxine

## **Elément de pharmacologie**

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

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

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

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

### **- Mode d'action:**

La sulfadoxine est un antifolique inhibant la dihydroptéroate synthase "DHPS" par compétition avec son substrat, l'acide para-amino-benzoïque ( PABA). Il est inactif sur les gamétocytes et les formes pré érythrocytaires, peu actif sur les trophozoites, modérément actif sur les schizontes érythrocytaires. Son rôle essentiel est la potentialisation des antifoliques, notamment de la pyriméthamine (qui est un antifolique d'action lente, inhibant la dihydrofolate réductase "DHFR").

**b. autres familles :** les sulfones ( Promine, Dapsone ).

Dans ce groupe on retient également la Sulfalène et la Sulfométhoxazole.

### **1.1.3.3 . Associations antifoliques : La sulfadoxine-pyriméthamine**

(FANSIDAR®)

Elle est constituée par une association de deux molécules :

- un antifolique, Diaminopyrimidine : la pyriméthamine

- un antifolique, sulfamide: la sulfadoxine

Cette association a démontré dans les années 1960 une potentialisation d'effets telle qu'on obtient souvent une guérison lorsque la souche de *Plasmodium falciparum* est modérément résistante à chacun des composants (mécanismes d'action complémentaires de la sulfadoxine découverte en 1960 et du pyriméthamine découverte en 1950) .

#### **- Mode d'utilisation de la sulfadoxine-pyriméthamine**

Il est utilisé en traitement curatif dans les zones de chloroquinorésistance sous forme de comprimé (contenant 500mg de sulfadoxine et 25mg de pyriméthamine) ou en solution injectable par voie intramusculaire (contenant 400mg de sulfadoxine et 20mg de pyriméthamine) à la dose unique de 25mg/kg de sulfadoxine et 1,25mg/kg de pyriméthamine.

#### **- Indication et contre-indication**

Il est indiqué dans le traitement curatif des souches de Plasmodies plus précisément dans le traitement du Paludisme à *P. falciparum* chloroquinorésistant.

Il est contre indiqué dans les antécédents d'hypersensibilité, chez les nouveau-nés (moins de 3 mois), dans les atteintes hépatiques rénales sévères. La tératogénicité n'a jamais été observée chez l'homme. La contre indication est donc relative chez la femme enceinte.

#### **- Avantages et inconvénients:**

L'observance thérapeutique est excellente puisque le traitement s'administre en dose unique (oral ou intramusculaire)

Ces médicaments ont une longue durée d'action et les inconvénients majeurs sont donc la sélection des parasites, le risque d'agranulocytose et les réactions allergiques cutanées gravissimes.

Les autres associations sont entré autre Trimétoprime-Sulfaméthoxazole ( Bactrim®), Dapson + Pyriméthamine : Maloprim®

## **1. 2. Les amino-4-quinoléines**

Ce sont des molécules de synthèse les plus largement distribuées.

La chloroquine représente assurément l'un des produits ayant été le plus utilisé au monde au cours de ces cinquante dernières années.

Des cas d'agranulocytoses et d'hépatites ont été signalées lors d'administration prolongée d'amodiaquine en prophylaxie. Ces molécules restent la référence thérapeutique de l'accès palustre simple pour la majorité des pays notamment le Mali.

Les amino-4-quinoléines sont des schizontocides et leur action est très rapide. Les parasites disparaissent du sang 48 à 72 heures après leur administration.

La Chloroquine et l'Amodiaquine sont les plus utilisées

### 1.2.1. La Chloroquine:

La chloroquine a été découverte d'abord par les Allemands en 1934 (Resorchin®), puis redécouverte et développé en 1944 aux Etats-Unis (Nivaquine®, Aralen®)

- **Activité:** La chloroquine est une base faible lysosomotrophe, elle est capable de traverser la membrane de l'érythrocyte parasité, et s'accumule dans la vacuole digestive du parasite en suivant le gradient de pH. Le mécanisme d'action repose sur sa capacité de concentration dans la vacuole parasitaire Elle interagit avec les produits de dégradation de l'hémoglobine en se fixant sur la ferriprotoporphyrine IX [19] ou hématine, dérivée de l'hème.

La chloroquine empêcherait l'utilisation des acides aminés indispensables aux parasites provoquant donc sa lyse. En tant que base faible, elle agirait en bloquant l'activité des lysosomes La chloroquine inhibe également la DNA-polymérase des hématozoaires, et les protéases acides parasitaires.

#### - **Forme pharmaceutique**

Poudre blanche, amère, elle est utilisée sous forme de sulfate (Nivaquine® Resorchin® Aralen®) ou de diphosphate.

- **Présentation:** comprimé de 0,10g et 0,30g, sirop à 0,5%,

#### - **Pharmacocinétique**

Après administration orale, l'absorption est rapide et quasi complète (80%). Elle apparaît dans le sang après 30 minutes et atteint son pic entre la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> heure un peu plus tardivement chez le paludéen grave.

La chloroquine se fixe aux protéines plasmatiques dans la proportion de 50%, à des protéines tissulaires de nombreux tissus: Foie, rein, rate, myocarde. La pénétration dans les hématies normales est très rapide, aboutissant à une concentration de 3 à 6 fois celle du plasma. Cette dernière s'élève considérablement dans les hématies parasitées par une souche sensible, de l'ordre de 100 fois. Les hématies parasitées par une souche résistante sont en revanche incapables de concentrer la chloroquine qui ressort de l'hématie.

La chloroquine est éliminée lentement. Une partie est éliminée dans les selles (10%), la majorité dans les urines, dont 60% sous forme intacte et 30% sous forme métabolisée. Le principal métabolite est la monodeséthylchloroquine, active également sur les hématozoaires.

La demi-vie de la chloroquine est dose dépendante, de 3 jours après une prise de 150mg, 5 jours après 600mg.

**- Indication:**

La chloroquine est utilisée en chimioprophylaxie, en association avec le proguanil dans les régions où des souches chloroquinorésistantes sont présentes mais minoritaires. Elle est le médicament de choix du traitement présomptif du paludisme en zone d'endémie, du traitement curatif du paludisme à *Plasmodium vivax*, *ovale*, et *malariae* contracté en toutes zones, et de *Plasmodium falciparum* chloroquinosensible.

**- Contre-indication de la chloroquine:**

Elle est contre indiquée chez les personnes présentant une hypersensibilité, un psoriasis, des antécédents d'épilepsie.

**- Avantage:** C'est l'antipaludique le moins cher et très efficace sur les souches chloroquinosensible. Elle a une action rapide et facilement manipulable.

**- Effets secondaires:**

Cet antimalarique est bien toléré en dehors de la survenue de signes cutanés (prurit pigmentation ardoisée des phanères), digestifs (nausées ou vomissements), voire rares troubles de l'humeur ou d'un syndrome cérébelleux. Sa prise au long cours dans le cadre de chimioprophylaxie impose classiquement une surveillance ophtalmologique à la recherche d'un chorio-épithéliome iatrogène.

**1.2.2. Amodiaquine:** Flavoquine®, Camoquin®.

**Présentation :** Comprimés dosés à 200 mg et sirop pédiatrique en flacon de 125mg

C'est un schizontocide détruisant les formes intra-érythrocytaires des quatre espèces de Plasmodium (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovalé* et *P. malariae*). Indiquer dans le traitement des accès simples de paludisme et conserve une activité sur un certain nombre de souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine. Elle garde encore son efficacité dans les zones où les souches de *P. falciparum* sont chloroquinorésistantes. Son administration se fait par voie orale à la dose de 25 – 30 mg / kg repartie en 3 jours.

**1.3. Les amino-alcools (Quinine, Méfloquine, Halofantrine):**

**1.3.1. LA QUININE:**

Alcaloïde naturel du quinquina, la quinine est le plus ancien (découverte depuis le 18ème siècle) et le plus utilisé de ces amino-alcools. Ses propriétés pharmacologiques et en particulier la possibilité de l'administrer par voie intraveineuse ou intrarectale en font le médicament de choix lors du traitement du paludisme grave, d'autant plus qu'il existe peu de résistance à ce produit (elles sont surtout présentes en Asie). Aux doses thérapeutiques (24mg/kg/jour de

quinine base en 3 prises), les effets secondaires sont limités (troubles auditifs avec bourdonnements d'oreilles, vertiges ) mais les surdosages entraînent rapidement des troubles cardiaques graves. La voie intramusculaire doit être le plus possible évitée compte tenu des risques de nécroses locales et de paralysie sciatique qui lui sont rattachés ainsi que de son manque d'efficacité dans des formes déjà trop évoluées. Les essais concluants de l'administration en intrarectale de ce produit devraient pouvoir pallier cet inconvénient majeur dans un futur proche.

Elle agit essentiellement sur les formes érythrocytaires asexuées de toutes les espèces de *Plasmodium*. La quinine se fixe sur l'ADN parasite et inhibe la formation de l'hémozoïne par fixation sur la protoporphyrine IX.

La quinine est rapidement absorbée par la muqueuse gastro-intestinale. La concentration sanguine maximale est obtenue 1 à 2 heures après absorption. Elle s'unit aux protéines plasmatiques et passe la barrière placentaire et de petites quantités passent dans le liquide céphalo-rachidien.

Elle se fixe sur tous les organes mais surtout sur les poumons, sur les reins et sur la rate. Elle est excrétée rapidement dans l'urine sous forme naturelle et sous forme hydroxylée. L'excrétion commence 15 minutes après l'absorption, est maximale 4 heures après et complète en 24 heures. Ce facteur nécessite une répétition de la dose journalière.

La quinine se présente sous forme:

**Injectable:** dichlorhydrate de quinine (génériques ou Paluject®), formiate de quinine (Quinoforme®), gluconique de quinine (quinine+quinidine+cinchonine+cinchonidine: Quinimax®).

**Comprimés:** chlorhydrate ou sulfate de quinine (Quinine Lafran®, Quinimax®).

L'utilisation de la méfloquine et de l'halofantrine qui avait suscité, au moment de leur mise sur le marché, de grands espoirs pour le traitement des accès simples à *Plasmodium falciparum* chimiorésistant a dû être nuancée du fait de leur coût et de la documentation d'effets secondaires préoccupants. Troubles dermatologiques (éruptions allergiques), gastro-intestinaux (nausées, vomissements), cardiologiques (bradycardies, allongement de l'espace QT), hématologiques (anémies, agranulocytoses), et neuropsychiques (hallucinations, dépression, convulsions) limitent à présent leur prescription.

L'halofantrine garde l'intérêt d'une assez bonne tolérance et de sa durée de traitement complet qui, en 12 heures (trois prises de 8mg/kg espacées de 6 heures, sans dépasser 2 comprimés à chaque prise), permet une bonne observance bien meilleure que les traitements, sur plusieurs

jours. Un interrogatoire sur d'éventuels antécédents cardiaques, et si possible la vérification de l'intégrité de l'électrocardiogramme (absence d'allongement de QT) doivent précéder ce traitement.

Ces deux médicaments sont encore officiellement contre-indiqués chez la femme enceinte bien que plusieurs études aient montré l'absence d'effet tératogène de la méfloquine chez la femme enceinte (Chandennier, 1998). Chez l'enfant de moins de 10 ou 15 kg, l'halofantrine et la méfloquine sont déconseillées.

Un autre amino-alcool synthétisé en Chine, le benflumétol ou luméfantrine, apparenté à l'halofantrine, est disponible déjà sur le marché en association avec l'artémisinine au nom de coartem<sup>®</sup>.

Méfloquine se présente sur le marché sous les noms de Lariam<sup>®</sup>, Méphaquine<sup>®</sup>, Plasmotrim<sup>®</sup>. L'halofantrine elle est commercialisée sous le nom de Halfan<sup>®</sup>.

**1.4 . Les dérivés de l'artémisinine ou du qinghaosu:** artémisinine (Mekophar<sup>®</sup>) [20], artéméther (Paluther<sup>®</sup>) [21], artééther, artésunate(Arsumax<sup>®</sup>) [22].

Utilisés en médecine traditionnelle en Chine depuis plusieurs centaines d'années, ces extraits de la plante *Artemisia annua* n'ont que récemment rejoint l'arsenal des médicaments antipaludiques commercialisés. Ces produits ont fait l'objet d'études scientifiques assez complètes ayant permis d'identifier une nouvelle classe d'antiparasitaire de type peroxyde, qui n'a pas encore suscité de résistance. Plus rapides qu'aucun autre antipaludique sur la disparition des parasites du sang et ne possédant que peu d'effets secondaires, ils sont d'une grande utilité dans le traitement des paludismes graves où l'artéméther fait jeu égal avec la quinine, surtout dans les zones de multi-résistances de *Plasmodium falciparum*. Mais leur élimination très rapide (demi-vie de quelques heures) impose des traitements répétés ou des associations, sous peine d'observer un taux de rechutes important.

#### **1.5. Les associations:**

Comme dans la prise en charge des affections bactériennes, l'association de plusieurs molécules antipaludiques vise à améliorer l'efficacité du traitement, dans certains cas par synergie potentialisatrice, en rendant de toute façon hautement improbable l'émergence de résistances. En prophylaxie, seule l'association chloroquine-proguanil (Savarine<sup>®</sup>: 100mg/200mg par comprimé) est recommandée chez l'adulte dans les zones de chloroquinorésistance modérées.

En curatif, les associations font surtout appel aux antifoliques et antifoliniques. Si la pyriméthamine-sulfadoxine (Fansidar<sup>®</sup>: 25mg/500mg par comprimé) occupe une place

importante dans les schémas thérapeutiques, d'autres associations jouent un rôle plus discret: pyriméthamine-dapsone ( Maloprim®) en prophylaxie. La pharmacocinétique du trimétoprime-sulfaméthoxazole ( Bactrim®) ne permet pas de l'utiliser dans le traitement du paludisme.

Le Fansimef®: (association triple de Fansidar® et de méfloquine) n'a pas fait la preuve de sa supériorité lors d'une utilisation large en Asie: elle impose un sous-dosage du composant ayant la plus lente élimination, la méfloquine, qui risque de faire émerger les résistances.

Les associations utilisant qinghaosu et amino-alcool (artésunate-méfloquine ou artéméther-luméfántrine, dénommé coartem®) commencent à être utilisées en Asie dans les zones de multi-résistances. Il est un peu tôt pour que l'on puise une idée exacte de leur avenir, qui semble prometteur.

#### 1.6. Les amino-8-quinoléines:

Cette classe de produit est la seule réellement active sur les formes hépatiques et les formes sexuées du parasite. Hélas, la seule molécule actuellement disponible ( la Primaquine ) est trop toxique pour pouvoir être utilisée à large échelle, surtout en Afrique où elle provoque des hémolyses chez les sujets déficitaires en G-6-PD. Un nouveau dérivé dans ce groupe, le WR238605 ou étaquine, mieux toléré et plus efficace, est à l'étude.

La Primaquine agirait par une réduction de l'Ubiquinone, substance impliquée dans la chaîne de transport des électrons au niveau des mitochondries. Selon Peters et *al.* ses métabolites entraîneraient une inhibition compétitive de l'enzyme dihydroorotate déshydrogénase ( DHOD) qui est très important dans la synthèse pyrimidique [23].

#### Autres antipaludiques:

- Malarial® : C'est une poudre de trois plantes de la pharmacopée traditionnelle malienne. La composition est la suivante : *Cassia occidentalis*, *Lippia chevelieria* et *Spilanthes olecraceae*. Utilisé dans le traitement des accès simples de paludisme.

#### 1.7. Les antibiotiques (cyclines, macrolides, clindamycine)

Même si un macrolide, l'azythromycine, semble donner des résultats intéressants aux vues de travaux récents, ce sont surtout les cyclines qui, inhibant la synthèse des protéines, possèdent une réelle, mais lente, activité antiparasitaire. La doxycycline (Viramycine®, Tolexine®) est ainsi utilisé en zone de multi-résistances (Asie principalement): en prophylaxie ou en association au traitement par la quinine.

## 2. GENERALITE SUR LA RESISTANCE DU *PLASMODIUM FALCIPARUM* AUX ANTIPALUDIQUES.

La résistance médicamenteuse est la capacité qu'a un parasite à se multiplier ou à survivre en présence d'une concentration de substance qui normalement, détruit les parasites de la même espèce ou empêche leur multiplication. Cette résistance peut être partielle (amenant à augmenter les doses de médicament tolérées par l'hôte) ou complète (dépassant les doses maximales tolérées par l'hôte)

### 2.1. Chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*:

Actuellement la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques est un phénomène constaté sur tous les continents. Plusieurs études ont été menées pour expliquer le mécanisme de la résistance. Comme chez les bactéries, les principaux mécanismes de la résistance pourraient être soit, par l'inactivation enzymatique ou la dégradation du médicament [24], soit une altération du site de fixation du médicament [24], soit une inhibition de l'entrée du médicament [25] ou soit un reflux actif du médicament.

#### 2.1.1. La résistance aux antimétabolites:

##### Mécanisme de la résistance

La pyriméthamine et le proguanil sont les seuls antipaludiques dont le mode d'action est relativement bien connue [26]. Jusqu'à la fin des années 1980, leur mécanisme de la résistance était soutenu par 3 hypothèses :

- La diminution de l'accumulation de la drogue,
- Une augmentation de la synthèse de l'enzyme DHFR-TS par une amplification génomique ou une transcription stimulée,
- Et la diminution de l'affinité de l'enzyme DHFR-TS pour la pyriméthamine suite à sa modification [27].

L'avènement de la biologie moléculaire a permis de bien élucider ce mécanisme excluant la 1ère hypothèse. Le gène de l'enzyme bi-fonctionnelle DHFR-TS a été cloné, séquencé et comparé d'un isolat à l'autre. Ces isolats ont montré qu'il existe une seule copie du gène, localisé sur le chromosome No 4 et transmis de manière Mendélienne, chez tous les isolats résistants à la pyriméthamine [28, 29, 30, 31, 17, 32, 33, 34, 35]

La résistance croisée entre pyriméthamine et cycloguanil est liée à la mutation ponctuelle entre Ser108Ala et Ile164Cys [36, 37]. En effet une substitution de la serine en position 108 par

l'asparagine ou par la thréonine, isoleucine 164 par la leucine 164 et la cystine -59 par l'asparagine 59 ont été retrouvés chez les souches à la fois résistantes à la pyriméthamine et au cycloguanil. Dans l'ensemble, la résistance à la pyriméthamine est essentiellement due aux mutations ponctuelles du gène codant pour l'enzyme DHFR-TS. Ce qui se traduit essentiellement par une diminution de l'affinité de l'enzyme DHFR-TS. Il n'est cependant pas exclu que d'autres événements génomiques soient impliqués.

**Tableau X:** Récapitulatif des différents points de mutation des gènes *dhps* et *dhfr* plasmodiales étudiés.

Position de la mutation → Phénotype ↓	16	51	59	108	164	437	540
Sensible	Ala	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys
Pyr-R	Ala	<b>Ile</b>	<b>Arg</b>	<b>Asn</b>	Ile	<b>Ala</b>	Lys
Sulf-R	<b>Val</b>	Asn	Cys	<b>Thr</b>	<b>Leu</b>	Gly	<b>Glu</b>

Ala : Alanine  
 Arg : Arginine  
 Asn : Asparagine  
 Cys : Cystéine  
 Glu : Acide-glutamine  
 Gly : Glycine  
 Ile : Isoleucine  
 Lys : Lysine  
 Leu : Leucine  
 Ser : Serine  
 Thr : Thréonine  
 Val : Valine

**NB:** Sulf-R = résistance à la sulfadoxine  
 Pyr-R = résistance à la pyriméthamine

Les gènes de la résistance du *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine seraient situés sur le quatrième et le cinquième chromosome.

Deux gènes actuellement décrits ont été impliqués dans cette résistance:

- le gène *dhfr* sur le chromosome numéro 4
- le gène *dhps* sur le chromosome numéro 5

Une mutation ponctuelle en position 51, 59 et 108 sur le *dhfr* seraient à l'origine des cas de résistances observées *in vitro* [38, 39]. La résistance à la pyriméthamine est due à une substitution de la serine par l'asparagine en position 108. L'addition des mutations cystéine-arginine en position 59, asparagine-isoleucine en position 51 conduiraient à des niveaux de résistance *in vitro* de plus en plus élevés [40]. La résistance *in vitro* au cycloguanil est due à une mutation serine-threonine en position 108 associée à une mutation alanine-valine en position 16 tandis que la mutation isoleucine-leucine en position 164 a été retrouvée chez les souches à la fois résistantes à la pyriméthamine et au cycloguanil [41], [42]. Ces différentes mutations entraîneraient des modifications qui seraient à la base de la diminution de l'affinité de l'enzyme DHFR pour la pyriméthamine suite à sa modification structurale [43], [44].

Les mutations ponctuelles en position 437 et 540 sur le *dhps* ont été associées à la résistance du *P. falciparum* à la sulfadoxine [44].

Les substitutions telles serine-phenylalanine en position 436, alanine-threonine/serine en position 613, alanine-glycine en position 581, alanine-glycine en position 437 et lysine-acide glutamique en position 540 ont été impliquées dans la résistance *in vitro* [44]. Le rôle de la mutation sur DHPS alanine-glycine 437 dans la résistance *in vitro* à la sulfadoxine a été confirmé par la technique de transfection. Le rôle des mutations DHFR et DHPS dans la résistance de *Plasmodium falciparum* à la pyriméthamine et à la sulfadoxine *in vivo* n'est pas encore établi avec certitude malgré les données *in vitro* [45].

Cependant les associations de mutation *dhfr* et *dhps* sont plus déterminantes dans survenue de la résistance du *P. falciparum* à l'association sulfadoxine-pyriméthamine.

### **2.1.2. La résistance aux amines alcools:**

Le gène *pfmdr* (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance) a été décrit comme intervenant dans la résistance de *Plasmodium falciparum* à cette famille de médicament. Le mécanisme est encore peu élucidé. En effet, Wilson *et al* montrèrent une apparente association entre l'augmentation du nombre de copies du gène du *pfmdr* et une augmentation de son expression avec une diminution de la sensibilité du *Plasmodium falciparum* à la méfloquine et à l'halofantrine[46].

Selon Ritchie et *al*, la résistance à l'halofantrine et à la méfloquine peuvent apparaître sans une augmentation l'expression du gène *pfmdr* [47].

### 2.1.3. La résistance aux amino-4-quinoléines

#### ! La résistance à la chloroquine.

La chloroquine est un des médicaments les plus utiles jamais développés. Les souches chloroquinorésistantes de *Plasmodium falciparum* sont fréquentes dans certains sites, entraînant des échecs thérapeutiques. Au cours des dix dernières années, de nombreux génotypes associés à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine ont été identifiés. Actuellement, c'est à partir de deux gènes qu'on tente d'expliquer la chloroquinorésistance: Le *pfmdr* et le *pfcr1* qui est la dernière découverte.

#### **Le gène *pfmdr* (Plasmodium falciparum Multidrug Résistance).**

Des homologues de gène *pfmdr*, responsables de la multi-résistance des cellules cancéreuses aux médicaments anticancéreux ont été découverts chez *Plasmodium falciparum* et nommés *pfmdr1* et *pfmdr2*.

Le *pfmdr2* est un gène localisé sur le chromosome 14. Les études ont montré qu'il n'était pas impliqué dans la résistance à la chloroquine. Ce gène ne présente pratiquement aucune variation entre les parasites sensibles et ceux résistants [48]

Par contre des variations dans le nombre de copies du gène *pfmdr1*, le gène correspondant situé sur le chromosome 5, associées ou non avec des mutations ponctuelles, ont été initialement considérées dans la chloroquinorésistance.

Des mutations ponctuelles du gène *pfmdr1* sont liées à la chloroquinorésistance en Afrique [49, 50]. Ce gène *pfmdr1* code pour une glucoprotéine de perméabilité d'un poids moléculaire de 170kD. Comme ses homologues des cellules cancéreuses, cette protéine serait impliquée dans le transport trans-membranaire de la chloroquine et d'autres molécules médicamenteuses [51]. Une mutation ponctuelle au niveau du *Pfmdr1* asn-tyr en position 86 pourrait contribuer à la chloroquinorésistance [52].

Des études récentes effectuées *in vivo* n'ont pas montré une forte corrélation de ces variations de copies à la résistances[53].

**Le gène *cg2* (Candidate gène 2) :** Ce gène identifié par Wellems *et al* , est situé sur le chromosome 7 et code pour une protéine transmembranaire localisée dans la vacuole parasitophore et dans celle de la membrane digestive [54]. Un polymorphisme de ce gène avait été associé à la chloroquinorésistance dans certaines clones africains et asiatiques de *Plasmodium*

*falciparum* mais des travaux supplémentaires ont démentis le rôle de ce gène dans la chloroquinorésistance.

### **Le *pfert* (Plasmodium falciparum chloroquine résistante transporter):**

C'est le gène le plus récent, il a été identifié par Wellems *et al.* L'équipe de Wellems vient de montrer dans une étude parue dans *Molecular Cell* qu'une mutation ponctuelle au niveau de ce gène codant pour une protéine trans-membranaire (PfCRT) de la vacuole digestive de *Plasmodium falciparum* est responsable de la résistance à la chloroquine [55].

Cette étude a montré que les souches résistantes d'Asie et d'Afrique ont un des deux variants "Pf<sup>ert</sup>" qui diffère du gène sensible à la chloroquine par 7 ou 8 mutations ponctuelles. En Amérique du sud, cette résistance est associée à d'autres variants "PfCRT" porteurs de plusieurs mutations. Toutefois, les variants "PfCRT" de ces trois régions ont en communs deux mutations spécifiques (K76T et A220S).

Les auteurs ont donc trouvé que la mutation d'un unique point de ce gène, présent sur le chromosome 7 de *Plasmodium falciparum*, conférait la résistance à la chloroquine. Ils ont également pu convertir une souche sensible en souche résistante à la chloroquine en lui introduisant le gène muté "*pfert* K76T". Une autre étude réalisée sur terrain et adoptant le protocole de l'OMS 1996 a montré que tous les parasites présents après traitement à la chloroquine présentaient ce gène [53]. Toutefois, on ne connaît pas encore le rôle précis et la fonction jouée par la protéine codée par ce gène, en particulier, le mécanisme par lequel cette protéine confère la résistance à la chloroquine.

## **3. Evaluation de la chimiorésistance:**

L'évaluation de la chimiorésistance a été standardisée par l'OMS pour l'espèce *Plasmodium falciparum*. Il s'agit des épreuves d'évaluation *in vitro* et *in vivo*.

### **Tests standardisés de l'OMS.**

#### **3.1. Test *in vitro*:**

Ils consistent à mesurer l'inhibition de la maturation en schizontes des parasites isolés chez un sujet, en présence de doses croissantes d'un antipaludique donné.

Après le macro-test mis au point par l'OMS et vite abandonné, c'est les micro-tests qui sont actuellement utilisés. On distingue

### 3.1.1.. Tests optiques:

Le micro-test OMS [ ] et le semi-microtest de Le Bras [ ] ont été mis au point à la fin des années 70: Ils sont basés sur la capacité des doses croissantes d'antipaludiques testés à empêcher la maturation des trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* en schizontes, lorsque le prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI et incubé à 37°C, en présence de CO<sub>2</sub> et de O<sub>2</sub>, pendant 24 à 48 heures. Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI), pour le microtest OMS, et en concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) ou 90% (CI<sub>90</sub>), pour le semi-microtest.

### 3.1.2. Tests isotopiques:

Ce sont le microtest isotopique de Desjardins [58 ] et le semi-microtest isotopique de Le Bras et Deloron [59 ]. Ce sont des modifications, respectivement, du microtest OMS et du semi-microtest optique. Après 18 heures d'incubations, on ajoute à chaque cupule un radio-isotope, l'hypoxanthine tritiée. L'incubation des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites. La mesure de la radioactivité se fait dans un compteur à scintillation. Les résultats sont donnés en coups par minute et l'activité du médicament est exprimée en CI<sub>50</sub> ou en CI<sub>90</sub>.

### 3.1.3. Les Nouveaux tests:

Les tests récemment mis au point sont ceux de:

#### - Test rapide de KROGSTAD:[60]

Ce test est fondé sur la capacité d'un inhibiteur calcique, la vérapamil, à bloquer l'excrétion et l'exocytose de la chloroquine de la vacuole parasitophore des souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum*. Les résultats s'obtiennent en deux heures et sont exprimés en résistance de type "RI et RIII" selon la classification de l'auteur.

#### - Microtest de MARKII:<sup>4</sup>

C'est une modification du macrotest par les mêmes auteurs qui se sont inspirés de la technique de la culture continue de TRAGER et JENSEN. Il consiste à mettre en culture pendant 24 à 48 heures à 37°C sur des plaques de titration traitées avec différents antipaludiques à doses croissantes. Les kits sont fournis par l'OMS et donnent des doses critiques de sensibilité pour chaque médicament.

#### - Test de MAKLER: [61]

C'est un test enzymatique fondé sur la capacité de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) de *Plasmodium falciparum* à utiliser rapidement la 3-acétylpyridine adénine dinucléotide dans

la réaction aboutissant à la formation de pyruvate à partir du L-lactate. Le test vise à détecter et à quantifier, par une technique enzymatique, la LDH produite par *Plasmodium falciparum* en présence de l'antipaludique étudié. Il existe une corrélation entre la densité parasitaire et l'activité de la LDH plasmodiale.

### 3.1.4. Test Moléculaire: Technique de PCR

Une nouvelle technique nous permettant d'évaluer le niveau de résistance est la PCR (Polymerase Chain Reaction) ou réaction de polymérisation en chaîne

**Principe:** Elle est fondée sur l'amplification exponentielle *in vitro* de l'ADN plasmodial en présence d'amorces spécifiques, de nucléotides, de Taq polymérase(enzyme) et de milieu tampon. La révélation du produit est faite par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

**Technique:** Cette technique décrite en 1985 par K. Mullis *et al* permet une amplification enzymatique *in vitro* de la quantité de DNA dont on disposait initialement.

Elle impose de connaître la séquence des régions qui délimitent le segment de l'ADN à amplifier. On utilise des amorces complémentaires à ces régions, qui ont entre autre comme fonction la reconnaissance de la région à amplifier et l'initiation de la synthèse de l'ADN néoformé.

Le processus d'amplification comporte des cycles successifs, chacun comprenant:

- une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les 2 brins de ADN.
- une phase d'hybridation de l'ADN avec les deux amorces spécifiques. Elle a lieu grâce à un abaissement de la température, chaque oligonucléotide se fixant sur un brin d'ADN.
- une extension des amorces avec une ADN polymérase à 70-72 °C.

Cette technique a eu de l'ampleur avec la découverte en 1988 d'une ADN polymérase non inactivée par la chaleur. Il s'agit de la Taq polymérase (isolée d'une bactérie thermophile adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude "*Thermus aquaticus*"). Avec la Taq on peut effectuer un nouveau cycle (dissociation, hybridation des amorces, réplication du DNA) sans avoir à ajouter chaque fois de l'enzyme. Il est maintenant possible d'automatiser ces réactions grâce à des appareils programmables en température et en temps.

### 3.2. Tests *in vivo*:

Elle consiste à administrer, à un sujet porteur de *Plasmodium falciparum*, la dose ordinairement recommandée de l'antipaludique à tester, et à contrôler la disparition des parasites du sang au bout d'un temps donné. L'évaluation de l'efficacité des schémas thérapeutiques se fait directement avec ces tests. Le test *in vivo* comporte: le test prolongée de 28 jours, le test

pratique standard de 7 jours, le test standard de 14 jours, et le test simplifié du C.R.C.P/O.C.C.G.E.

### **3.2.1. Test standard de l'O.M.S. de 28 jours:**

Il consiste à administrer une dose de 25 mg de chloroquine base/kg poids corporel répartie en 3 jours chez un patient présentant une infection mono spécifique à *Plasmodium falciparum* avec contrôle de la parasitémie chaque jour durant sept jours, puis à J<sub>14</sub>, à J<sub>21</sub>, et à J<sub>28</sub>. Le suivi se faisait pendant 28 jours.

### **3.2.2. Test standard simplifié de l'O.M.S. de 7 jours:**

C'est le même que celui du test de 28 jours sauf que la période du suivi est de 7 jours avec un contrôle de la parasitémie soit au J<sub>7</sub> seulement, soit au J<sub>3</sub> et J<sub>7</sub>.

### **3.2.3. Test simplifié du C.R.C.P/O.C.C.G.E:**

Il consiste à administrer chez un patient présentant une infection monospécifique à *Plasmodium falciparum*, une dose de 10 mg de chloroquine base/kg de poids corporel en une seule prise avec un seul contrôle parasitologique à J<sub>7</sub>.

### **3.2.4 Test standard de l'O.M.S. de 14 jours:**

C'est le test actuellement admis pour l'évaluation de la chimiosensibilité.

\* **Principe:** Il consiste à administrer chez un patient une dose de 25 mg de chloroquine base par kilogramme de poids corporel répartie en 3 jours, soit 10 mg par kilogramme le premier jour, 10 mg le deuxième jour, et 5 mg le troisième jour avec contrôle de la parasitémie à J<sub>3</sub>, J<sub>7</sub> et J<sub>14</sub>. Le test se réalise pendant une période de 14 jours

Ce test est applicable au Fansidar avec l'administration de 25mg de sulfadoxine et 1,125mg de pyriméthamine en dose unique suivi de contrôle clinique à J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, et de contrôle clinique et parasitologique à J<sub>3</sub>, J<sub>7</sub> et J<sub>14</sub>

#### **\* Avantages et inconvénients des tests in vivo:**

##### **Avantages:**

- adhésion facile de la population car elle y trouve un intérêt médical immédiat.
- réalisation beaucoup plus simple et aisée (même par un agent de santé de base).
- détermination du niveau de la résistance afin d'adopter un schéma thérapeutique adéquat.
- matériel utilisable simple.
- ils peuvent fournir des éléments de pharmacovigilance de l'antipaludique utilisé.

##### **Inconvénients:**

- faux résultats liés aux troubles du métabolisme du médicament, au niveau immunitaire du malade, et aux troubles d'absorption du médicament.

- durée longue pour le diagnostic de la résistance.
- difficultés de mettre les sujets hors d'état de réinfections en zone d'endémie surtout pendant la saison de transmission (épreuve de 28 jours).
  - critères d'inclusion souvent difficiles à mettre en pratique entre autre l'absence de la prise antérieure d'antipaludiques.
  - temps de réalisation assez long (minimum 7 jours)
  - insuffisance liée à la technique microscopique, en particulier la sensibilité, la spécificité, qui sont fonction de la compétence du lecteur.

Difficulté pour le test in vivo de 7 jours de faire la différence entre le niveau de résistance RI et la sensibilité.

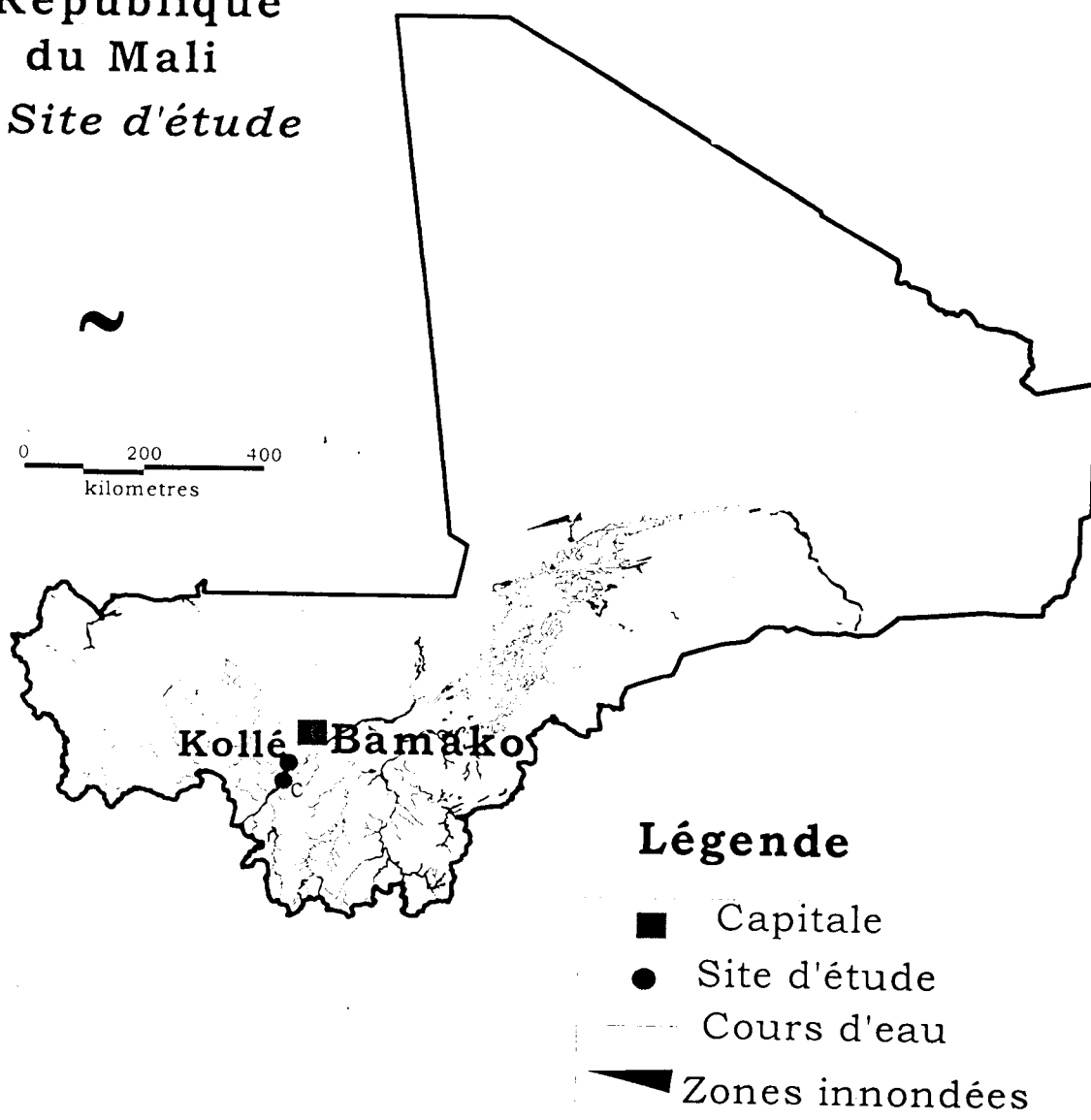
# **METHODOLOGIE**

### III- METHODOLOGIE

#### A /. ASPECTS SOCIO-DEMOGRAPHIQUE

##### 1 / Lieu d'étude

République  
du Mali  
*Site d'étude*



Le lieu de notre étude a été le village Kollé se trouvant dans une zone de la savane Nord-soudanienne où la transmission du paludisme est hyper-endémique.

### **1.1. Le choix du lieu d'étude**

L'accessibilité géographique du village de Kollé est plus ou moins facile pendant toute l'année.

Il existe depuis un certain nombre d'années, des données de base sur la résistance aux antipaludiques (chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine) et les comportements et attitudes de la population.

Nous avons obtenu au cours des études antérieures effectuées par le DEAP l'adhésion des autorités locales et de la population.

Ces différents aspects justifient le choix du village de Kollé.

### **1.2. Historique du village.**

Kollé a été fondé par Wantaraba Camara au début du XIX<sup>ème</sup> siècle. Il était venu de Siby (chef lieu d'arrondissement) à la recherche de terres fertiles pour la riziculture. Depuis, 15 chefs de villages se sont succédés et l'actuel s'appelle Moriba Camara.

### **1.3. Situation géographique:**

Le village de Kollé est situé dans la commune de Siby, Cercle de Kati, région de Koulikoro. Il se trouve sur la route reliant Bamako à Kangaba-Kankan (Guinée), à 17 km au sud du chef lieu d'arrondissement (siby). Délimité au sud par le fleuve Niger à 9 km, à l'ouest par Samako à 6 km, au sud-ouest Bancoumana distant de 3 km, au nord par Ténéya, nord-est par Koursalé distant de 7 km, et à 57 km au sud-ouest de Bamako.

On note à l'ouest une colline avec une superficie de 160 hectares par contre le nord est limité par un plateau qui couvre une superficie de 1510 hectares. Le relief est suffisamment plat et constitué de plaine qui couvre la majeure partie (environ 5020 hectares) avec une zone inondable et une zone exondée constituant de larges gîtes larvaires d'anophèles en saison de pluies.

### **1.4. Climat et végétation:**

Kollé a un climat de type soudanien.

On distingue deux saisons:

- l'une, pluvieuse qui va de mai en octobre avec le maximum de pluie en août et septembre.

- l'autre, sèche qui est fraîche de novembre en janvier et chaude de février en avril.

La végétation est une savane arborée composée de:

- Plantes herbacées: *Penisetum pedicellatum*, *Cymbopogon giganteus*, *Hyperhenia dissolita*, *Boudetia togolensis*, *Andropogon sp.*

- Plantes ligneuses: *Combretum sp.*, *Acacia sp.*, *khaya senegalensis*, *Parkia biglobosa*, *Adansonia digitata*, *Bautina sp.*, *Tamarindus indica*, *Vitellaria paradoxa*, *Guiera senegalensis*

Plantes lianexentes: *Saba senegalensis*.

### **1.5. Populations**

Le village de Kollé est essentiellement constituée de Malinkés avec environ 3000 habitants[INAGEF, 1999]. On y retrouve d'autres ethnies.

La religion musulmane est la dominante.

### **1.6. Infrastructures socio-sanitaires:**

Le village dispose de:

-Une école fondamentale de 6 classes dont les 5 premières sont fonctionnelles avec quatre enseignants. L'école a été construite avec l'aide de l'ONG Plan international et la participation de la communauté villageoise.

- Une medersa construite avec l'aide des gouvernements de l'Arabie Saoudite et du Koweït.

- Un magasin de stockage de céréales construit avec l'aide de la FAO

- Un dispensaire sous la direction d'un aide-soignant, construit avec l'aide de l'ONG AMAPROS.

- Un centre d'alphabétisation fonctionnelle.

- Trois forages équipés de pompe hydraulique avec l'appui de la coopération Mali-Italie dont actuellement un seul est fonctionnel.

Les maisons du village sont des cases rondes avec des toits en paille et des maisons rectangulaires avec des toits en tôle ou en paille ou en banco

### **1.7. Activités économiques:**

L'économie est essentiellement agropastorale avec:

-des cultures vivrières comme le riz, le mil, le sorgho, le maïs, et des tubercules.

- des cultures industrielles comme le coton, l'arachide et la banane.

Le cheptel comporte entre autre des bovins, des ovins, des caprins, de la volaille et quelques équidés. Le petit commerce y est également effectué.

## 2. Type d'étude:

Nous avons effectué une étude longitudinale au cours de laquelle chaque sujet inclus était suivi pendant 28 jours. Ceci nous a permis d'avoir toutes les informations sur le cours évolutif de la maladie.

## 3. Période d'étude:

L'étude s'est déroulée de septembre à décembre 2000. Ce moment correspond à une période où la de transmission est maximale dans la localité.

## 4. Population d'étude :

L'étude a concerné toute la population du village avec un âge supérieur ou égal à 6 mois.

### 4-1 Critères d'inclusion:

Pour l'inclusion dans l'étude, le malade devrait satisfaire les critères suivants :

- présenter une forme clinique de paludisme simple avec notamment une possibilité d'administration du médicament par voie orale, une parasitémie supérieure à un trophozoite de *P. falciparum*, par mm<sup>3</sup> de sang.
- Avoir un âge supérieur ou égal à 6 mois.
- Etre résident de Kollé depuis 6 mois au moins.
- Avoir une infection mono spécifique à *Plasmodium falciparum*.
- donner son consentement ou assentiment pour les parents.
- Avoir une parasitémie supérieure à 2500 trophozoites par mm<sup>3</sup> de sang en l'absence de fièvre.

### 4-2 Critères de non-inclusion

Dans les cas suivants le malade n'était pas inclus dans l'étude :

- Paludisme grave, définie comme suit:
  - \* paludisme cérébral (coma)
  - \*anémie normocytaire grave (Hb<5g/dl )
  - \*oedème pulmonaire
  - \*état obnubilation( atteinte de la conscience moins profonde qu'un coma )
- Le malade est incapable de boire ou de prendre le sein si c'est un enfant
- Le malade vomit tout ce qu'il prend
- Le malade a récemment eu des convulsions
- Le malade est incapable de se tenir debout ou assis.
- Les autres critères de non-inclusion qui n'ont pas été évalués faute de moyens techniques étaient :

- \* insuffisance rénale (créatinine sérique > 3,0 mg/dl)
- \* hypoglycémie (< 40 mg/dl)
- \* hémorragies spontanées ou coagulation intravasculaire disséminée
- \* acidémie ou acidose
- \* hémoglobinurie macroscopique

### 5- l'échantillonnage:

Notre approche d'échantillonnage était de type exhaustif sur les paludéens de Kollé qui se sont présentés à l'infirmerie.

La taille minimum de l'échantillon a été calculée à l'aide de la formule ci-après :

$$n = \frac{z^2 pq}{i^2}$$

- .  $\sum \alpha =$  l'écart réduit, sa valeur est de 1,96
- . le risque d'erreur alpha ( $\alpha$ ) = 5%
- . p = la proportion p estimée à 10% [Sanogo, 2000]
- . q = 1-p
- . i = la précision souhaitée à 5%
- . n = taille de l'échantillon

## 6. Méthode de collecte des données

Les données ont été collectées sur le terrain et au laboratoire.

### 6.1. Collecte des données sur le terrain

Elles ont été collectées à l'aide d'un dossier individuel standardisé préalablement testé, élaboré conformément aux objectifs de l'étude.

Ce dossier comportait des renseignements sur le numéro d'enregistrement du malade, sa résidence, son âge; des renseignements sur les médicaments déjà consommés par le malade dans les deux semaines précédents son inclusion dans notre étude, sur les antécédents de prurit après prise de sulfadoxine-pyriméthamine. Il comportait aussi des renseignements sur l'état clinique du malade à savoir la température, le poids, la rate, les doses de sulfadoxine-pyriméthamine à administrer et autre traitement concomitant ainsi que des renseignements biologiques à savoir la parasitémie l'hématocrite et enfin l'état d'évolution de la maladie ( Cf annexe 1 )

Ce dossier était complété par le registre du clinicien, le registre pour la parasitologie et le cahier pour la lecture des gouttes épaisses et de mesure de l'hématocrite.

### **6.1.1. Les renseignements généraux**

Ils ont été recueillis par interview directe et consistaient à identifier le malade, à se renseigner sur les signes et symptômes qui l'ont conduit en consultation, la famille de provenance etc.

Les renseignements ainsi obtenus étaient enregistrés sur une carte qui accompagne le malade au poste du clinicien.

### **6.1.2. Données Cliniques**

#### **6.1.2.1. Matériel et technique de collecte:**

Les données étaient collectées par suite d'un examen physique qui consistait à la mesure de la température, du poids, de la fréquence respiratoire et de la palpation de la rate.

**Matériel :** Il était constitué de:

thermomètres électroniques,

stéthoscope médical,

tensiomètre,

alcool à 90°,

coton hydrophile,

seringues stériles à usage unique (3cc, 6cc, 10cc, 12cc, 250cc),

cuillères à café,

bols en plastiques et des bonbons.

**Médicaments:**

Les antipaludiques (chloroquine, Fansidar® (sulfadoxine-pyriméthamine), dichlorhydrate de quinine). Les autres médicaments étaient représentés entre autre par des antibiotiques, des antipyrétiques, des benzodiazépines, des antihistaminiques, des anti-inflammatoires, des antitussifs et d'autres médicaments d'urgence.

**L'examen clinique:**

L'examen clinique complet était fait chez tous les patients et les fiches de suivi étaient régulièrement mises à jour.

La dose de Sulfadoxine-pyriméthamine était administrée par le clinicien en fonction du poids à raison de 25mg/kg de sulfadoxine et 1,25mg/kg de pyriméthamine en prise unique. Etait associé à cela le traitement d'éventuelles affections ou signes ( antitussif en cas de toux, paracétamol en cas de fièvre).

**Mesure de la température axillaire:** La température était prise à l'aide d'un thermomètre électronique placé dans le creux axillaire. L'audition d'un signal sonore en provenance du

thermomètre indique la fin de la prise de température. La fièvre était définie par une température axillaire non corrigée supérieure ou égale à 37,5°C.

. **Palpation de la rate:** la palpation était effectuée sur le sujet arrêté et mesurée selon la méthode de Hackett:

Rate 0 - rate non palpable.

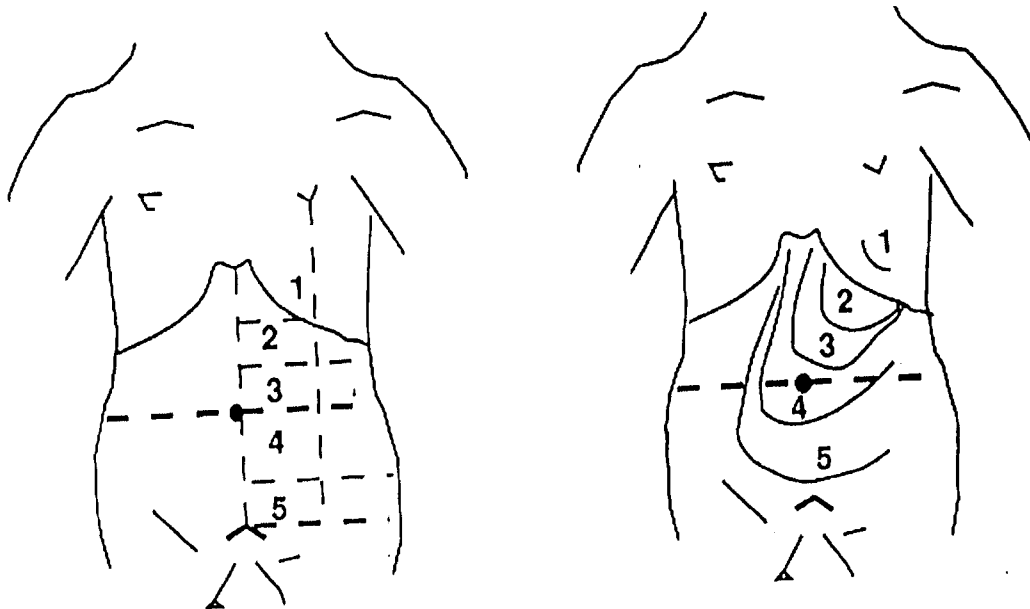
Rate 1 - rate palpable en inspiration profonde.

Rate 2 - rate s'étendant du rebord costal jusqu'à mi-distance du nombril.

Rate 3 - rate pouvant atteindre le niveau du nombril.

Rate 4 - rate dépassant le nombril.

Rate 5 - rate descendant entre l'ombilic et la symphyse pubienne.



*Classification de Hackett [ 62]*

. **Traitement des cas de maladies:** Tous les cas de paludisme simple étaient traités à la sulfadoxine-pyriméthamine en raison de 25mg/kg de sulfadoxine et 1,25 mg/kg de pyriméthamine en prise unique ( soit ½ comprimé pour 10 kg de PC ) associé à un traitement symptomatique selon le cas.

Les cas graves étaient exclus de l'étude mais traités par les sels de quinine en perfusion dans du sérum glucosé 5% (Quinimax®).

Le suivi était effectué aux jours J1, J2, J3, J7, J14, J21, J28. .

Les critères de jugement de l'efficacité du traitement consistaient à la disparition de la fièvre et de la parasitémie, en bref, en une amélioration clinique et parasitologie du sujet.

Les renseignements cliniques de chaque malade inclus étaient notés dans un dossier individuel de suivi qui comportait dans ses grandes lignes le numéro d'identification du sujet, les renseignements généraux, cliniques, biologiques et thérapeutiques du malade. (Cf. annexe 1)

#### **Méthode de gestion des données :**

Les fiches de suivis étaient régulièrement contrôlées et contenues dans des chemises individuelles. Après le suivi complet, elles étaient gardées dans une cantine métallique à l'abri des insectes rongeurs.

### **6.1.3. Les Données Biologiques**

Elles ont été recueillies au poste de biologie, il s'agissait de faire une goutte épaisse et de la lire au microscope électrique, de faire l'hématocrite et les confettis.

#### **6.1.3.1. La goutte épaisse:**

##### **. Matériels:**

Lame porte-objet,  
vaccinostyles,  
tampon d'alcool, alcool 90°,  
coton hydrophile,  
Giemsa pur,  
eau tamponnée,  
comprimés tampon,  
des bacs de coloration,  
une éprouvette graduée,  
des râteliers,  
une boîte OMS,  
un séchoir,  
d'eau distillée.

**. Principe:** Elle consiste à rechercher le parasite, à identifier l'espèce plasmodiale, et à déterminer le nombre de parasites par millimètre cube de sang.

**. Mode opératoire:** L'index ou le majeur de la main gauche était désinfecté par l'alcool, puis essuyé par un morceau de coton sec afin d'enlever le reste d'alcool. Une ponction capillaire était faite au niveau de ce doigt, la première goutte était essuyée avec du coton sec, on récupérait la seconde sur une lame porte-objet. A l'aide du bord d'une seconde lame, on faisait la goutte épaisse selon la technique standard de l'OMS. Les lames étaient marquées par un crayon indélébile, et séchées au séchoir électrique.

Les lames étaient séchées d'abord dans une boîte OMS à l'abri de mouches et, après lecture, elles étaient rangées et gardées dans des boîtes à lames pour la conservation.

. **Coloration** : Après séchage, les gouttes étaient colorées avec du Giemsa à 10% dans de l'eau tamponnée à un pH = 7,4 pendant 15 minutes. Ensuite elles étaient rincées et séchées à l'aide du séchoir.

. **Examen microscopique**: La lecture des gouttes se faisait sur place par un membre de l'équipe de recherche à l'aide d'un microscope optique binoculaire à l'objectif 100 sous immersion. La densité parasitaire était déterminée en comptant le nombre de parasites sur 300 leucocytes et le tout rapporté à 7500 leucocytes par  $\text{mm}^3$  de sang.

#### 6.1.3.2. Etude hématologique:

. **Principe**: Elle consistait à déterminer le taux d'hématocrite.

. **Matériels**:

Tubes capillaires héparinés,

centrifugeuse à hématocrite,

plaque de cire,

l'abaque de lecture

. **Mode opératoire**: A partir du sang de la ponction capillaire ou du sang veineux on remplissait les tubes capillaires héparinés aux trois quarts de leur volume. Le taux d'hématocrite était déterminé après centrifugation des prélèvements pendant 5 minutes

. **Lecture**: La lecture se faisait sur place avec l'abaque de lecture gradué de 0 à 100. L'hématocrite était exprimée en pourcentage.

#### 6.1.3.3. La confection de confettis :

L'ADN parasitaire était collecté sur du papier filtre dénommé confettis à partir de quelques gouttes de sang du patient. elle était effectuée au poste d'hématologie

-- **Principe** : elle consistait à immobiliser les parasites sur du papier buvard

La méthode était plus pratique puisqu'elle ne nécessite pas de chaîne de froid et la moins invasive parce que la même ponction digitale qui a servi à faire la goutte épaisse permettait aussi de confectionner les confettis.

Elle nécessitait un matériel minimal et un personnel moins qualifié.

– **Matériel**

Papier buvard (papier confettis)

Gants stériles

Vaccinostyles stériles

Coton hydrophile  
Alcool 70%  
Ciseaux  
Poubelles pour vaccinostyles  
Registres  
Crayons  
Enveloppes  
Agrafeuses  
Agrafes  
Scotch type OMS  
Insecticides (Timor)  
Cantine + cadenas

**- Technique**

Découper du papier buvard à l'aide d'une paire de ciseaux environ 4 cm de long sur 2 cm.

Diviser un des bouts du confettis en quatre langues (1/2 cm de largeur sur 1 cm de hauteur).

Inscrire le numéro d'identification du patient sur le buvard à l'aide du crayon

- Imbiber les 4 langues du papier buvard de sang.

Après le prélèvement, appliquer du coton sec sur la partie piquée du doigt pour faire hémostase, puis laisser sécher le confettis.

**Gestion du confettis**

Les confettis étaient séchés rattachés à du scotch dans les cantines à l'abri de mouches et de la poussière, puis conservés et transportés dans des enveloppes individuelles à la température ambiante pour être après garder dans un carton conservation.

Ces confettis ont été utilisés pour faire l'extraction de l'ADN plasmodial.

**6.1.4. Déroulements de l'enquête**

**6.1.4.1. Pré-enquête:** Des études similaires ont déjà été faites dans la localité et par conséquent ont servi de repère pour mieux structurer la présente étude.

**6.1.4. 2 Enquête proprement dite**

**- Organisation du travail:**

Pour le bon fonctionnement du travail nous avons mis sur place 3 postes de travail.

**Poste 1:** Ce poste qui était le premier niveau de trie à savoir sélection des malades, prise des renseignements généraux et. Il était occupé par un infirmier et trois guides locaux.

**Poste 2:** Il était tenu par deux cliniciens (un interne et un Docteur en médecine du DEAP) et servait de lieu de consultation et de traitement des malades.

Les cas de paludisme simple confirmés par une goutte épaisse bénéficiaient d'un dossier de suivi et étaient traités à base de sulfadoxine-pyriméthamine.

Les cas de paludisme grave quant à eux étaient traités à la quinine en injection intramusculaire ou en perfusion dans du sérum glucosé à 5%. Les autres pathologies étaient aussi prises en charge.

**Poste 3:** A ce niveau, étaient réalisées par un interne en pharmacie, la goutte épaisse, l'hématocrite et la confection des confettis pour les cas de paludisme simple mono-spécifique à *Plasmodium falciparum*

#### **6.1.4.3. Calendrier des activités de base**

Jour O: Après inclusion, le malade recevait sur place la dose de 25mg/Kg de poids corporelle (PC) de sulfadoxine et 1,25 mg de pyriméthamine par voie orale en prise unique. Et puisque les comprimés étaient dosés à 500mg /25 cela correspondait à un demi comprimé pour 10kg de poids corporel soit un comprimé pour 20 kg . Comme antipyrétique, il recevait une dose de 40 mg/kg de PC qui sera poursuivi pendant 3 jours. Après l'administration de médicament, le malade était observé pendant 45mn à 1 heure de temps pour d'éventuel vomissement avant de partir à la maison. En cas de vomissement les 15 mn suivant l'administration de médicament la dose complète était répétée, mais lorsqu'il survient les 30 mn à 1 heure la demi- dose était administrée.

**Les jours J1 et J2:** correspondant au deuxième et troisième jour, une évaluation de l'état clinique était réalisée ainsi que la recherche de signes d'aggravation et d'effets secondaires.

Les jours J3, J7, J14, J21 et J28 : en plus du bilan clinique complet avec mesure de fréquence respiratoire et cardiaque, la palpation de la rate , étaient également réalisée une goutte épaisse de contrôle, la confection d'un confettis ainsi que la mesure du taux d'hématocrite .

En cas d'échec thérapeutique précoce (ETP), le malade recevait la chloroquine à la dose de 25mg/kg de PC répartie en 3 jours par voie orale.

**Les jours de visite imprévue :** étaient systématiquement réalisés l'interrogatoire, la prise de la température axillaire non corrigée, la mesure de la fréquence respiratoire, la palpation de la rate, donc le bilan clinique associé à la biologie (goutte épaisse, hématocrite, confettis ).

Et en cas d'échec thérapeutique tardif (ETT) un traitement substitutif par la quinine était institué.

Les cas de prurit étaient déclarés et enregistrés dans le dossier du malade. Le prurit était objectivé dans certains cas par des rashes cutanés ou des grattages sur la peau. Ces prurit ont été traités par la prométhazine en sirop.

Plan d'analyse et de traitement des données( cf annexe 2).

Les données ont été codées et saisies dans un micro-ordinateur à l'aide du logiciel EPI-INFO version 6.0. Les résultats ont ensuite été résumés dans des tableaux. Le test statistique de Khi2 a été utilisé pour la recherche de lien entre certaines variables. Le seuil de signification a été fixé à 5%.

### **6.1.5. Définitions opératoires**

Nous avons classé les résultats en catégories de réponse au traitement :

#### **Résultats cliniques :**

L'échec thérapeutique précoce (ETP)

L'échec thérapeutique tardif (ETT)

La réponse clinique satisfaisante (RCS)

**Résultats parasitologiques :** c'est le comportement des parasites vis à vis de l'antipaludique utilisé à J3, J7 et J14. Ils ont été classés en :

- Sensible

- Résistance type I : RI

- Résistance type II : RII

Résistance type III : RIII

#### **Définition :**

**ETP :** la réponse au traitement est classée comme échec thérapeutique précoce si le malade présente l'un des signes suivants au cours des trois premiers jours du suivi :

Apparition de signe de danger ou d'un paludisme grave les jours 1, 2 ou 3 en présence d'une goutte épaisse positive.

Température axillaire non corrigée  $\geq 37,5$  °C le jour 2 avec une parasitémie supérieure à celle du jour 0.

Température axillaire  $\geq 37,5$  °C le jour 3 avec une parasitémie, parasitémie à J3 supérieure d'au moins 25% de la parasitémie à J0

**ETT :** la réponse au traitement est classée comme échec thérapeutique tardif si le malade présente un des signes suivants pendant les jours 4 à 14 de la période de suivi :

- Apparition de signes de danger ou d'un paludisme grave en présence d'une parasitémie n'importe quel jour entre J4 et J14, sans que le malade ait auparavant répondu aux critères d'échec thérapeutique précoce.

Température axillaire  $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$  en présence d'une parasitémie n'importe quel jour entre J4 et J14 sans que le malade n'ait auparavant répondu aux critères d'échec thérapeutique précoce ou tardif.

**RCS** : la réponse clinique est classée comme réponse clinique satisfaisante si le malade présente un des signes suivants au cours de la période de suivi de 14 jours :

- Absence de parasitémie le jour 14 quelle que soit la température axillaire, sans que le malade ait auparavant répondu aux critères d'échec thérapeutique précoce et tardif,

- Température axillaire non corrigée  $\leq 37.5^{\circ}\text{C}$  avec ou sans parasitémie, sans que le malade ait auparavant répondu aux critères d'échec thérapeutique précoce ou tardif.

**RI** : le niveau de la résistance parasitologique RI a été défini comme suit :

absence de parasites à J3 mais présents à J7 ou J14

présence de parasites à J3  $<$  25% de celle de J0, et sa disparition à J7 mais réapparition à J14

**RII** : le niveau de résistance parasitologique RII a été défini par l'existence d'une parasitémie à J3 inférieur à 25% de la parasitémie initiale et une parasitémie à J7 et J14

**RIII** : le niveau RIII a été défini par une parasitémie à J3 supérieure 75% de la parasitémie initiale.

**Sensible** : la réponse parasitologique a été classée comme sensible s'il y avait :

Absence de parasites à j3, j7 et j14 ou la parasitémie à j3 est inférieure à 75% de la parasitémie à j0 et que les parasitémies à j7 et j14 sont nulles, ou les parasitémies à j3 et j7 sont inférieures à 75 % de la parasitémie à j0 et la Parasitémie à j14 est nulle.

**La visite imprévue** : c'est une visite qu'un malade peut faire en cas de rechute de la maladie entre J3 et J7, J7 et J14, J14 et J21, J21 et J28.

**L'anémie** : ont été considérés comme anémiques les sujets dont le taux d'hématocrite était inférieur à 30%.

## 6.2. La Collecte des données au laboratoire : Etude de Biologie Moléculaire

Etude moléculaire a été effectuée dans le laboratoire de l'Unité de Biologie Moléculaire, Physiopathologie et Mécanisme de la Résistance aux Antiparasitaire du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Médecine Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS).

Nous avons procédé à l'extraction, à l'amplification et à la migration de l'ADN plasmodial. L'amplification de l'ADN a été effectuée par la technique de PCR ( Réaction de polymérisation en chaîne). Les mutations ponctuelles sur le gène *dhfr* (codons 51, 59, et 108) et sur le gène *dhps* ( codons 437 et 540 ) ont été recherchées. Ces cinq mutations ponctuelles sont les plus incriminées dans la résistance de *P. falciparum* à la SP. Cependant il existe d'autres points de mutation sur le gène *dhfr* en position 16, 50 et 164 et sur le gène *dhps* en position 346, 581 et 613 qui n'ont pas une importance moléculaire de la résistance en Afrique.

Les Types de PCR que nous avons utilisés pour l'analyse moléculaire de nos échantillons étaient **ASRA** (allelic specific restriction analysis) et **MS-PCR** (mutation spécifique- PCR) La recherche des codons 51, 59 et 108 de *dhfr* a été faite par la MS-PCR et celle des codons 437 et 540 de *dhps* par la méthode ASRA.

### Extraction de l'ADN plasmodial

L'ADN plasmodial a été extrait par la méthode du méthanol. Cette extraction a consisté à découper approximativement 3mm<sup>2</sup> de confettis imprégnés de sang, le transférer dans un micro-tube, puis ajouter 50-100µl de méthanol dans le tube, s'assurer que le méthanol a totalement immergé le papier confettis. Laisser incuber à la température ambiante pendant 15mn.

Après; jeter le méthanol, sécher le confettis sous vide ou à l'air libre.

Après séchage, ajouter dans chaque tube 50-75µl d'eau distillée, puis chauffer pendant 15mn entre 95-100°C. Agiter toutes les 5mn au cours du chauffage pour faciliter l'extraction de l'ADN plasmodial. Le produit obtenu était utilisé directement pour la PCR ou gardé à -20 °C.

### Amplification de l'ADN : PCR

@ Réactifs de PCR et leurs préparations:

- **dNTP**( deoxy Nucleotide Tri-Phosphate) : La concentration finale était de 200µM par réaction. Une solution de travail équimolaire des 4 dNTP de 2mM ( soit 10 X de la solution finale) était préparée à partir d'un stock de 100mM.

- **PCR buffer:** Les tampons concentrés à 10X étaient fournis par les compagnies commerciales avec ou sans le  $Mg^{2+}$  (magnésium). Dans ce dernier cas au lieu de les garder à 10X, le  $Mg^{2+}$  y était ajouté et gardé à 5X.

- **Amorces:** Les amorces viennent sous forme de poudre lyophilisée. A partir de cette poudre le stock de travail de  $100\mu M$  était préparé; la concentration finale dans le tube de réaction était de  $1\mu M$ .

- **TBE( Tri Borate EDTA):** C'était des sachets de poudre à dissoudre dans de l'eau déionisée ou stérile. Nous dissolvions 5 sachets de TBE dans un litre d'eau distillée comme solution de travail( stock de travail). Cette solution était 5 fois concentrée soit 5X. La solution finale utilisée était 0,5 fois concentrée soit 0,5X.

- **Solution de migration:**

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

- **Colorant de migration:** Ce sont le bleu de bromophenol (BB) et xylène cyanol ( XC ). Le BB est constitué de glycérol (35ml) d'eau dé ionisée (15ml) et du bromophenol bleu ( 0.125g). Le XC est constitué de glycérol (35ml) de d'eau déionisée (15ml) et de xylène cyanol (0.125g). Ce sont des colorants qui permettent de suivre la migration sur gel et de maintenir le produit de migration assez longtemps dans les puits.

- **Marqueur de poids moléculaire:**

Ce marqueur de poids moléculaire constituait la solution de référence et sa dilution était faite dans un colorant et de l'eau dé-ionisée. A un volume de marqueur était ajouté un volume de colorant puis 9 volumes d'eau dé-ionisée et la solution était prête pour l'usage.

Il sert de référence pour ce qui concerne le niveau des bandes observées.

- **Gel de Migration :** était fait à partir de 2 grammes d'agarose dissout dans 100ml de TBE à 0.5X. La solution est ensuite chauffée dans un four micro-onde pendant 3mn permettant la dissolution complète de l'agarose, après chauffage on y ajoute de Bromure d'Ethidium à la concentration de  $0,3\mu g/ml$  et on verse le tout dans un bac contenant des peignes ; 30 mn à 1 heure après, le gel ainsi durcit était prêt à être utiliser pour la migration.

L'Agarose utilisé était de type « Agarose ultra pure GIBCOBRL »

- **le Bromure d'Ethidium** est un produit qui va s'intercaler entre les bases nucléotidiques et devient fluorescent sous UV.

@ **Le Matériel**

Gants stériles

Tubes de 0.5 ml, 1.5ml, 15ml et de 50 ml

Ciseaux  
Pipettes de 2µl, 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl  
Embouts de 2µl, 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl  
Agitateur  
Chronomètre  
Congélateur  
Box de conservation  
Marqueur indélébile  
Cuve pour migration  
Cuve pour gel  
Peignes pour gel  
Hôte  
Cahier de paillasse  
Bics  
Balance analytique (peser des produits)  
Erlenmeyer  
Racks pour les tubes.  
Appareil d'amplification  
Appareil photo  
Appareil UV  
Film Polaroid®  
Centrifugeuse  
Laboratory film (Parafilm)

### **Description des méthodes utilisées :**

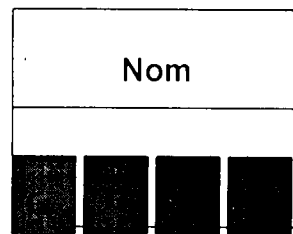
Deux méthodes de la "Nested PCR" ou double PCR ont été utilisées : **ASRA et MS-PCR**

La Nested PCR est une double PCR au cours de laquelle une deuxième PCR se fait sur le produit de la première. Cette technique est d'une plus grande sensibilité, elle utilise deux couples d'amorces :

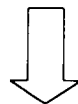
- un couple externe: qui permet d'obtenir un fragment d'ADN amplifié comme en PCR classique.

Les amorces sont donc spécifiques aux deux séquences bornant l'ADN à amplifier. Les fragments d'ADN obtenus (par exemple 649 pb pour *dhfrI*) servent alors de matrice pour une seconde PCR.

- un couple d'amorces internes: qui borne une région située à l'intérieur du fragment nucléotidique obtenu avec le premier couple d'amorces (exemple 522 pdb pour le codon *dhfr II* ). D'où le terme de "nested PCR", car ces amorces sont nichées et emboîtées dans les premières.



*Papier filtre avec du sang*



**Extraction de l'ADN**



**1ère PCR  
(649 bases paires)**



**2è étape de PCR  
( produit de 522 bp )**



**Enzyme de digestion (AluI)**



**Souche Mutante  
(522bp)**

**Souche Sauvage  
(196+ 326bp)**

## **Avantages et inconvénients:**

### **Avantages:**

Les avantages

- La possibilité de rechercher plusieurs points de mutations de la résistance à différents antipaludiques sur les mêmes souches plasmodiales à la fois.
- La possibilité de faire un diagnostic beaucoup plus précoce de la résistance.
- Pas de problème de disponibilité des patients.

### **Inconvénients:**

- Coût très élevé.
- Nécessité d'un matériel lourd et d'un personnel qualifié.
- Incapacité de déterminer les échecs thérapeutiques.

Plusieurs méthodes ont été décrites parmi lesquelles la méthode ASRA et celle dite MS-PCR. La méthode ASRA. ( Allelic Specific Restriction Analysis) a pour avantage d'analyser plusieurs points de mutation à la fois. C'est une méthode utilisant des enzymes de restriction, c'est à dire qu'après chaque deuxième amplification, on procédait a une phase de digestion enzymatique qui nous permettait d'interpréter les résultats.

La méthode MS-PCR. ( Mutation Specific- PCR) : C'est une méthode permettant d'interpréter les résultats dès la deuxième amplification, elle utilise des amorces spécifiques aux souches mutantes et sensibles dès la deuxième amplification, ainsi on ne passe plus à la phase de digestion.

## **6.2.1. Les amorces et programmes d'amplification**

### a/ Méthode ASRA

Les amorces de la première amplification pour les codons du gène *dhps* étaient les suivants:

#### **- pour le codon 437**

PS400-A : GGGGTATTAAATGTTAATTATGATTCT

PS400-B : GGGGTCACATTTAACAATTTTATT

#### **- pour le codon 540**

PS500-A : GGGCCCAAACAAATTCTATAGTG

PS500-B : GGCCGGTGGATACTCATCATATA

Les amorces de la deuxième amplification pour les différents codons du gène *dhps* étaient les suivants :

- **pour le codon 437**

PS400-D1 : TGTTCAAAGAATGTTTGAAATGA

PS400-D2 : CCATTCTTTTTGAAATAATTGTAAT

- **Codon 540**

PS500-D1 : GCGCGCGTTCTAATGCATAAAAGAGG

PS500-D2 : CCCGGGTAAGAGTTTAATAGATTGATCAGCTTTCTTC

. **Les réactifs**

les réactifs utilisés étaient les suivants :

- Milieu tampon ( PCR 10x Buffer )
  - dNTP'S: Deoxy Nucléotide Tri phosphates
  - 10X PCR - Buffer
  - Chlorure de Magnésium ( 50 mM )
  - Taq polymerase
  - Eau dé-ionisée
  - Eau stérile
  - TBE: Tris Borate d'EDTA
  - BSA (Bovine Serum Albumine)
  - NEB Buffer de digestion
  - Enzymes de digestion
  - Colorant de migration (Xylène cyanol, Bleu de Bromophenol)
- RNnase
- Huile minérale

. **Mode opératoire**

**Première amplification**

Le volume du milieu réactionnel est fonction du nombre d'échantillons à traiter (maximum 55 échantillons+2 témoins positifs et 1 négatif).

Le volume réactionnel est de 20  $\mu$ l par échantillon et sa préparation doit respecter les normes ci-après :

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction en $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		12,125 $\mu$ l
5X PCR Buffer 3,5	1X	5 $\mu$ l
10XdNTP'S	1X	2,5 $\mu$ l
100X Amorces	0,1X	0,25 $\mu$ l
Taq polymerase	0,05U	0,125 $\mu$ l
Total		20 $\mu$ l

A ce volume final de 20  $\mu$ l était ajouté 5  $\mu$ l d'ADN pour chaque échantillon et dans un tube qui lui est spécifique.

L'amplification est faite dans un appareil « Thermocycler »

**Le programme de la première amplification ASRA1 est le suivant :**

- Dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes
- . dénaturation à 92°C pendant 30 secondes
- . hybridation à 45°C pendant 30 secondes
- . extension à 65°C pendant 45 secondes

44 cycles

- Extension finale à 72°C pendant 15 minutes.
- 4°C pendant une durée illimitée

Le produit ainsi amplifié est utilisé immédiatement ou gardé à +4 °C dans le réfrigérateur avant son utilisation pour la deuxième amplification.

#### **Deuxième amplification**

Le volume final du milieu réactionnel de la deuxième amplification pour une réaction est de 24 $\mu$ l. Sa préparation doit respecter les normes suivantes :

Composants	Concentration finale	Volume par réaction en $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O		16,125 $\mu\text{l}$
5X PCR Buffer 3,5	1X	5 $\mu\text{l}$
10XdNTP	1X	2,5 $\mu\text{l}$
100X Amorces(A+B)	0,1X	0,25 $\mu\text{l}$
Taq polymerase	0,05 U	0,125 $\mu\text{l}$
Total		24 $\mu\text{l}$

Repartir dans chaque tube 24  $\mu\text{l}$  de mixte ainsi préparé, ajouter 1  $\mu\text{l}$  du produit de la 1<sup>ère</sup> amplification dans chaque tube correspondant. Placer les tubes dans l'appareil d'amplification.

L'amplification a lieu selon le programme ci-après :

#### **Programme de la deuxième amplification (ASRA2)**

- Dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes
  - dénaturation à 92°C pendant 30 secondes
  - hybridation à 45°C pendant 30 secondes
  - extension à 65°C pendant 45 secondes

24 cycles

- Extension finale à 72°C pendant 15 minutes.
  - 4°C pendant durée illimitée

Garder le produit amplifié à +4 °C dans le réfrigérateur

**La migration des produits de la deuxième amplification** : elle est effectuée dans le but de rechercher de bandes du produit amplifié, et la taille des bandes était comparée à celle des témoins positifs. Ainsi, ces bandes du produit amplifié et des témoins positifs doivent avoir la même taille, l'absence de bandes dans les témoins négatifs exclue toute contamination.

Le témoin positif sensible était le PS-Mali et le mutant PS-Peru.

#### **La digestion du produit de la deuxième amplification**

La composition du mixte de la digestion pour un volume de 15  $\mu\text{l}$  par réaction était la suivante :

REACTIFS	VOLUME PAR REACTION
NE BUFFER N°3	2ul
BSA(Bovine Serum Albumine)	0.2ul
ENZYME	0.25ul
H2O	12,55
TOTAL	15

*Les enzymes de digestion utilisées*

Codon 437: AVAII

Codon 540: FokI

Codon 51 : Eco-R-1

Codon 59: Bsr-G-1

Codon 108: Alu-1

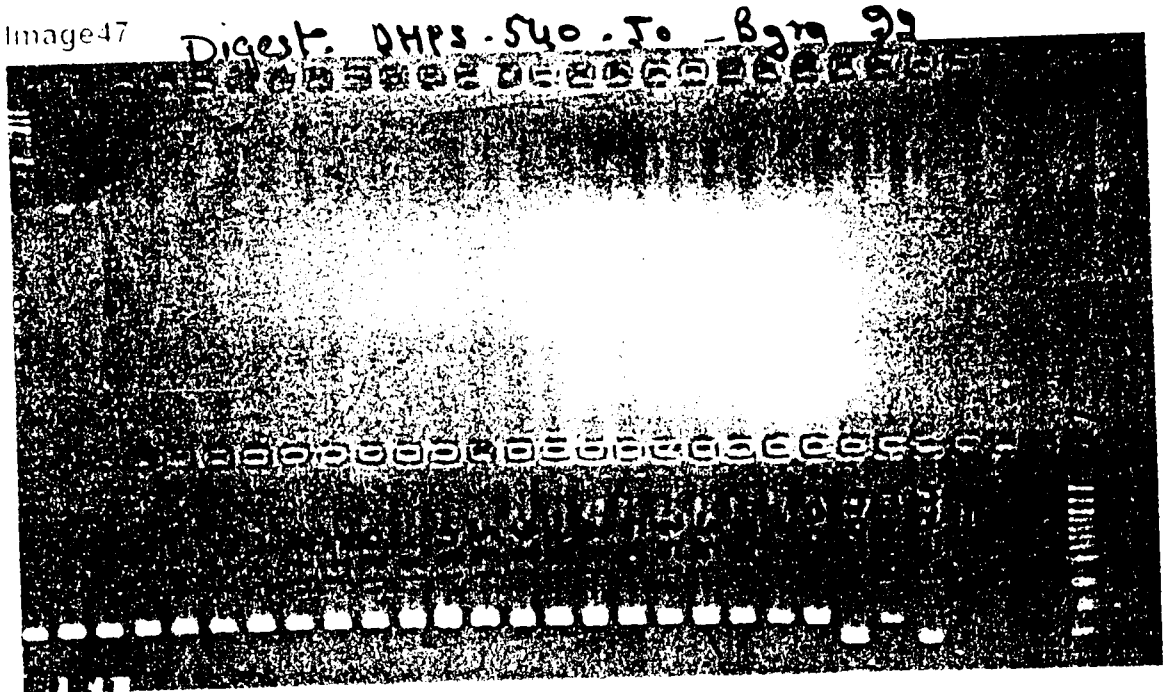
**L'interprétation de la photographie du produit de la digestion.**

Les échantillons dont la taille des bandes était au même niveau que celle du témoin sensible (PS-Mali) étaient considérés comme porteurs des souches avec allèle sensible. Par contre ceux dont les bandes auront la même taille que celle du témoin résistant (PS-Peru) étaient considérés comme porteur de souches à allèle résistant.

Par ailleurs, les échantillons qui avaient deux bandes l'une au niveau du témoin sensible et l'autre au niveau du témoin résistant, ont été considérés comme mixtes c'est à dire porteur de souches avec allèle sensible et des souches avec allèle résistant.

**Photo 1 : Photo de digestion ASRA**

Image47



98277437 - 002 Jane 02/21/2001 11:21:12 AM B=-0.05 C=1.19 G=1.00

**Photo 1:** Photographie du produit de digestion ASRA dhps 540

A l'angle droit nous avons le Marquer de poids moléculaire ( Marquer 100 bases paires : M )

170- 200 sont des échantillons.

Pco4 et PERU sont des témoins résistants

MALI est un témoin sensible

WE, W1 et W2 sont des témoins négatifs.

## **b/ La MS-PCR**

Le mixte est constitué des même composantes que ceux de ASRA à la différence des amorces et du Buffer 1.5 MgCl<sub>2</sub> alors qu'on utilise du Buffer à 3.5 MgCl<sub>2</sub> pour ASRA.

Les volumes réactionnels étaient également les mêmes que ceux de ASRA

### **La première amplification de la MS-PCR**

**Les amorces de la 1<sup>ère</sup> amplification étaient représentées par :**

- AMP1 (allée): TTTATATTTTCTCCTTTTA

- AMP2 ( retour): CATTTTATTATTCGTTTTCT

Poids: 720 paires de bases (pb)

Le Buffer utilisé était de type : PCR Buffer1X Gibco 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

### **Le programme suivant était utilisé pour la première amplification de MS-PCR**

Première dénaturation : 95°C pendant 3mn

Dénaturation : 92°C pendant 30secondes

Hybridation : 45° C pendant 45secondes45sec

Extension : 72°C pendant 45 secondes45sec

Cycles : 44

Extension finale : 72° C pendant 3mn

Le produit de la 1<sup>ère</sup> amplification était utilisé pour l'analyse des trois codons sur le gène *dhfr* (51,59 et 108) pour la 2<sup>e</sup> amplification.

### **la deuxième amplification de la MS-PCR**

Les programmes d'amplification et les amorces variaient en fonction de chaque codon du gène *dhfr* :

#### **1. Pour le codon *dhfr* 108**

\* Les type d'amorces

Type de codon sensible: ACC(Ser)      DIA-3      GAATGCTTTCCCAGC

Codon mutant:            AAC (Asn)      DIA-12      GGAATGCTTTCCCAGT

Amorce complémentaire:    SP1                    ATGATGGAACAAGTCTGCGAC

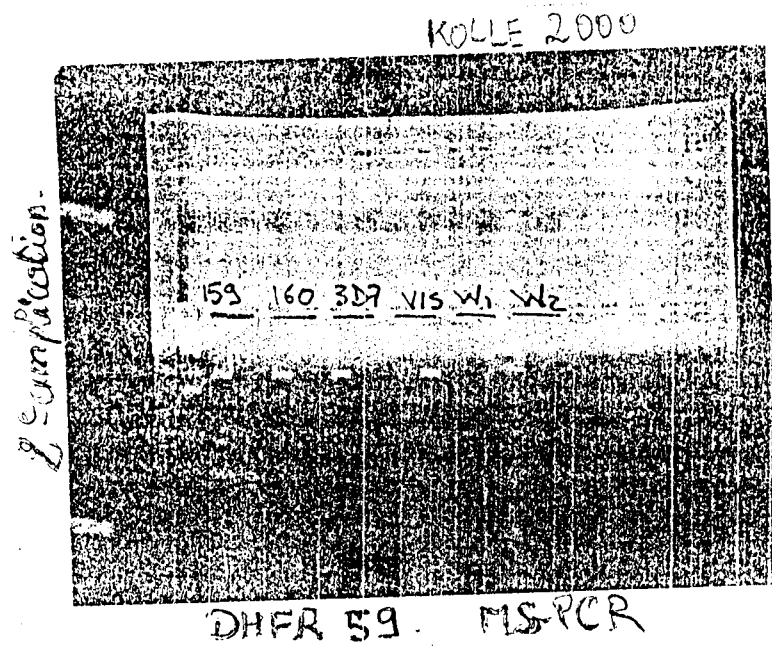
Poids du produit: 337 pb

**\* le programme d'amplification se compose des phases suivantes :**

-Dénaturation initiale à 95°C pendant 3 minutes

-Dénaturation à 92°C pendant 30 secondes





**Photo 2:** Photographie du produit de la 2<sup>e</sup> amplification MS-PCR.

A l'angle gauche nous avons le Marquer de poids moléculaire ( Marquer 100 bases paires)

159 et 160 sont des échantillons.

VIS est un témoin résistant

3D7 est un témoin sensible

W1 et W2 sont des témoins négatifs.

**7. Aspects éthiques :** le protocole avait au préalable été soumis et approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

Il comportait les points suivants :

- L'inclusion se faisait sur consentement éclairé après explication des objectifs de l'étude.
- Exclusion et traitement adéquat si paludisme grave.
- Arrêt du traitement à la SP si prurit rapporté.
- Prise en charge gratuite aussi pour autres pathologies.
- Assistance gratuite à la population en cas d'urgence médicale.
- Respect du malade et de la confidentialité.
- Les résultats obtenus seront mis à la disposition des scientifiques et du PNLP.

# **RESULTATS**

## IV/ RESULTATS

### 1. RESULTATS DEMOGRAPHIQUES

Tableau 1: Distribution de l'échantillon d'étude par sexe

Sexe	n	%
Masculin	187	54,5
Féminin	156	45,5
Total	343	100

Au total 343 sujets ont été inclus dans notre étude.

Le sex ratio a été de 1,2 en faveur du sexe masculin.

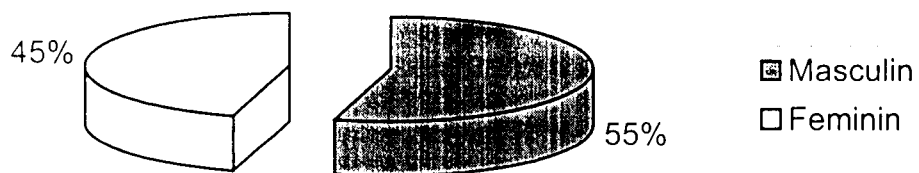


Figure 1 : Distribution de l'échantillon d'étude par sexe.

Tableau 2: Distribution de l'échantillon en fonction des classes âges

Classes d'âge	n	%
6mois-1an	73	21,3
2ans - 4ans	117	34,1
5ans - 9ans	102	29,7
10ans – 14ans	35	10,2
>=15ans	16	4,7
<b>Total</b>	<b>343</b>	<b>100</b>

La majorité de l'échantillon avait un âge inférieur à 10 ans (85,1 %), avec une prédominance de la classe de 2 à 4 ans(34,1%).

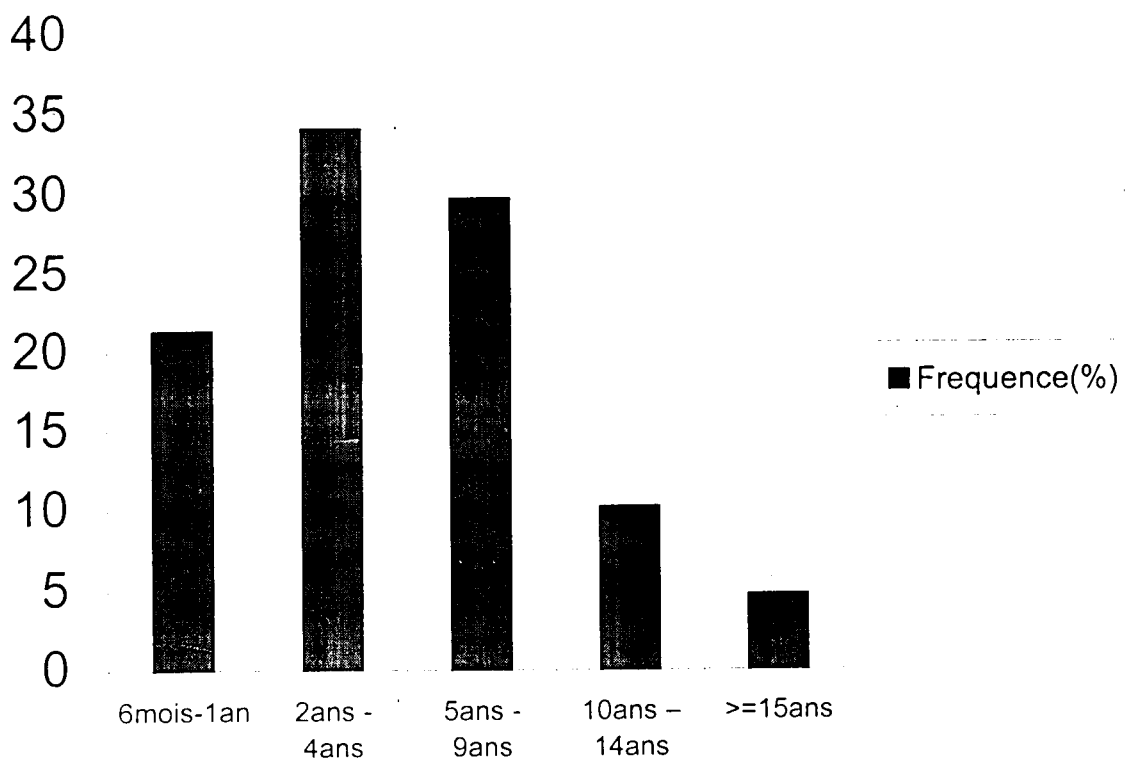


Figure 2 : Répartition de l'échantillon en fonction des classes âges.

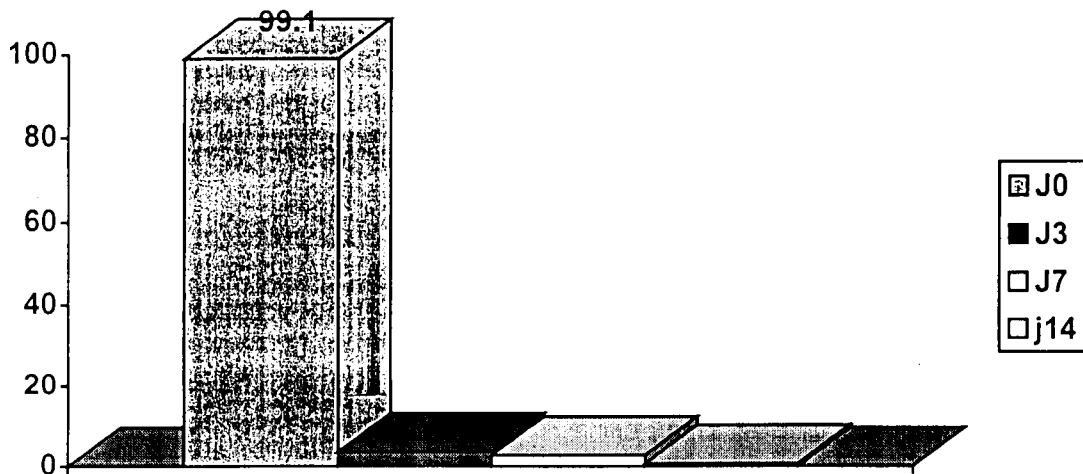
## 2. RESULTATS CLINIQUES

**Tableau 3:** Evolution de la fièvre au cours du suivi.

Température	n	%	Total
J0	340	99,1	343
J3	12	3,5	343
J7	9	2,7	336
J14	2	0,6	335

(  $X^2 = 1222,88$  ddl= 3  $p < 10^{-6}$  )

La réduction des cas de fièvre a remarquable sous traitement (Sulfadoxine-pyriméthamine) passant de 99,1 % à J0 à 0,6% à J14. Cette réduction était significative(  $Kh^2 = 658,15$  et  $p < 10^{-6}$ .)



**Figure 3 :** Evolution de la fièvre au cours du suivi

**Tableau 4:** Evolution de la splénomégalie au cours du suivi.

IS	n	(%)	Total
J0	233	67,9	343
J3	213	62,1	343
J7	179	53,4	335
J14	139	41,6	334

$$(X^2 = 53,95 \text{ ddl}=3 \text{ p} < 10^{-6})$$

On note une baisse régulière de la splénomégalie au cours du suivi allant de 67,9 à J0 à 41,6 % à J14. Le pourcentage de réduction a été de 26,3%.

**Tableau 5 :** la répartition de la réponse clinique

Réponse clinique	n	%	Total
ETP	2	0,6	343
RCS	341	99,4	343

$$(X^2 = 670,09 \text{ ddl}=1 \text{ p} < 10^{-6})$$

Le taux global d'échec thérapeutique était de 0,6%( ETP= 0,6% et ETT= 0%)

Aucun cas d'ETT n'a été observé.

La réponse clinique satisfaisante( RCS) a été de l'ordre de 99.4% sous traitement à la Sulfadoxine-pyriméthamine.

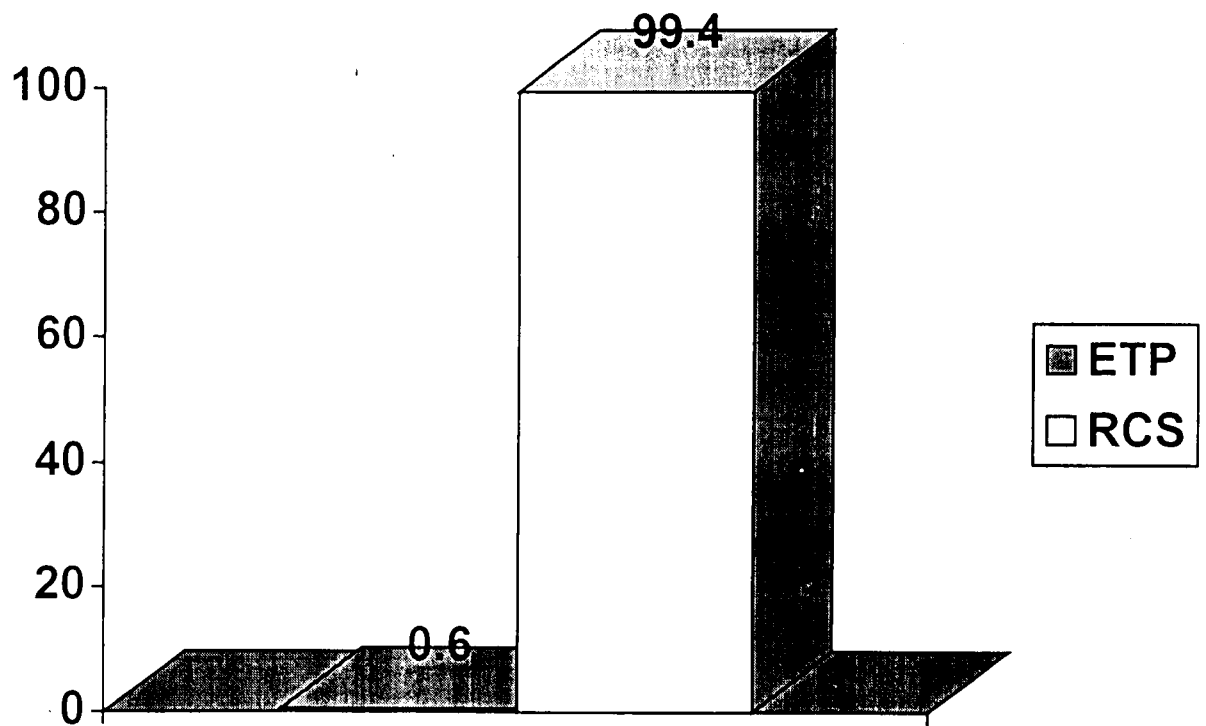


Figure 4 : Répartition de la réponse clinique

### 3. Résultats Parasitologiques

**Tableau 6:** Evolution de la parasitémie par tranche d'âge et au cours du suivi

Classes d'âge	J3		J7		J14	
	n(%)	Total	n (%)	Total	n(%)	Total
<b>6mois – 1an</b>	4(5,5)	73	1(1,4)	72	1(1,4)	71
<b>2ans – 4ans</b>	8(6,8)	117	1(0,9)	113	0(0)	114
<b>5ans - 9ans</b>	2(2)	102	1(1,0)	101	0(0)	100
<b>10ans – 14ans</b>	0(0)	35	0 (0)	34	0(0)	34
<b>&gt;=15ans</b>	0(0)	16	0 (0)	16	0(0)	16
<b>Total</b>	<b>14(4,1)</b>	<b>334(100%)</b>	<b>3(0.9)</b>	<b>336(100%)</b>	<b>1(0.3)</b>	<b>335(100%)</b>

Ce tableau montre une baisse importante du nombre de sujets porteurs de parasites au cours du suivi, allant de 4,1% à J3, 0,9 % à J7 et 0,3 % à J14.

Pour un total de 14 cas de goutte épaisse positive à J3, les enfants de moins de 10 ans ont été concernés par cette positivité.

Entre J3 et J7 ce nombre a diminué allant de 4,1% à 0,9% toujours dans les même classes d'ages (< 10ans ), le seul cas de goutte épaisse positive à J14 était de la classe de 6mois- 1an.

**Tableau 7:** Distribution de la réponse parasitologique

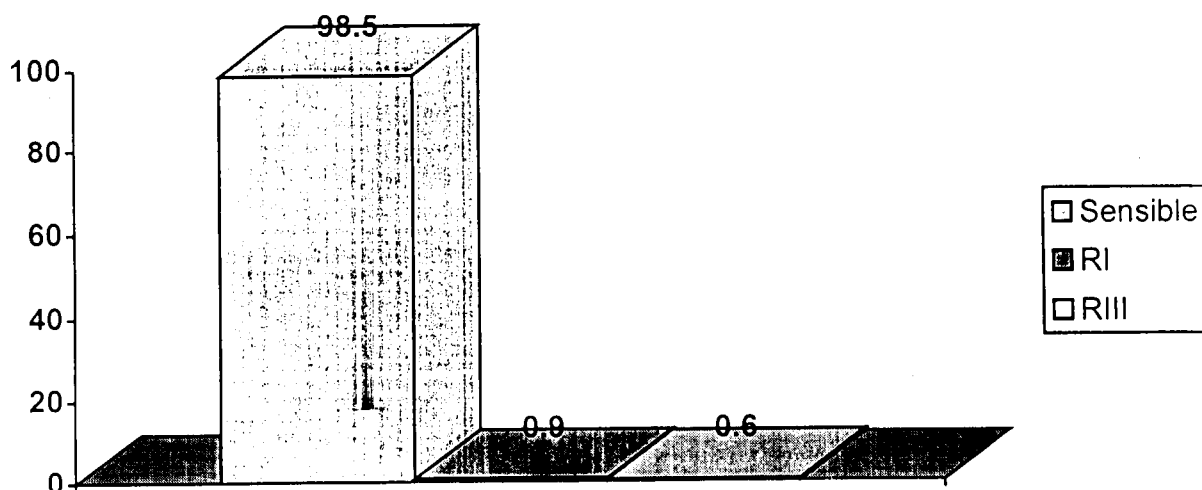
Réponse parasitologique	n	%	Total
Sensible	338	98,5	343
RI	3	0,9	343
RIII	2	0,6	343

$(X^2 = 984 \quad p < ^{-6})$

Il ressort de ce tableau que 98,5% des souches rencontrées étaient sensibles à la sulfadoxine-pyriméthamine.

Le taux global de résistance parasitologique était de 1,5% avec 0,9% de RI et 0,6% de RIII.

Nous n'avons pas noté de cas de résistance parasitologique de type RII.



**Figure 5 :** Distribution de la réponse parasitologique

**Tableau 8 : Répartition de la réponse parasitologique par classes d'âge**

<b>Classes d'âge</b>	<b>Sensibles</b>	<b>RI</b>	<b>RIII</b>	<b>Total</b>
<b>6mois-1an</b>	71	2	0	73
<b>2ans-4ans</b>	116	0	1	117
<b>5ans-9ans</b>	100	1	1	102
<b>10ans-14ans</b>	35	0	0	35
<b>&gt;=15ans</b>	16	0	0	16
<b>Total</b>	338	3	2	343

Ce tableau montre que tous les cas de résistance parasitologique ont été observés chez les moins de 10ans quel que soit le type de résistance.

**Tableau 9: Relation entre la réponse parasitologique et la réponse clinique**

	<b>RCS</b>	<b>ETP</b>	<b>Total</b>
<b>RI</b>	3	0	3
<b>RIII</b>	0	2	2
<b>Sensible</b>	338	0	338
<b>Total</b>	341	2	343

Il ressort de ce tableau que les cas de résistance parasitologique de type RI étaient des réponses cliniques satisfaisantes.

En revanche, les deux cas d'ETP observés étaient des cas de résistance parasitologique de type RIII.

#### 4. RESULTATS HEMATOLOGIQUES

Tableau 10: la distribution des cas d'anémie dans l'échantillon à J0

Anémie	n	%
Anémie +	125	39,4
Anémie -	192	60,6
Total	317	100

Le taux global d'anémie était de 39,4% sur les 317 sujets chez lesquels la mesure de l'hématocrite a été effectuée.

Tableau 11a : Répartition de l'anémie en fonction des classes d'age

Classes d'age	Anémie+	
	n	%
6mois – 1an	45	36
2ans – 4ans	55	44
5ans – 9ans	23	18,4
10ans – 14ans	1	0,8
>=15ans	1	0,8
Total	125	100

Les cas d'anémie était plus élevé chez les moins de 5 ans (80 %) avec le plus fort taux entre 2-4 ans( 44%).

Tableau 11b : Evolution de l'anémie au cours du suivi

Anémie	J0		J3		J7		J14	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Anémie +</b>	125	39,4	154	49,5	84	30,3	47	17
<b>Anémie -</b>	192	60,6	157	50,5	197	69,7	229	83
<b>Total</b>	317	100	311	100	277	100	276	100

On note une diminution progressive de l'anémie au cours du suivi allant de 49,5 % à J3 à 30,3% à J7 et à 17% à J14.

## 5. RESULTATS MOLECULAIRES

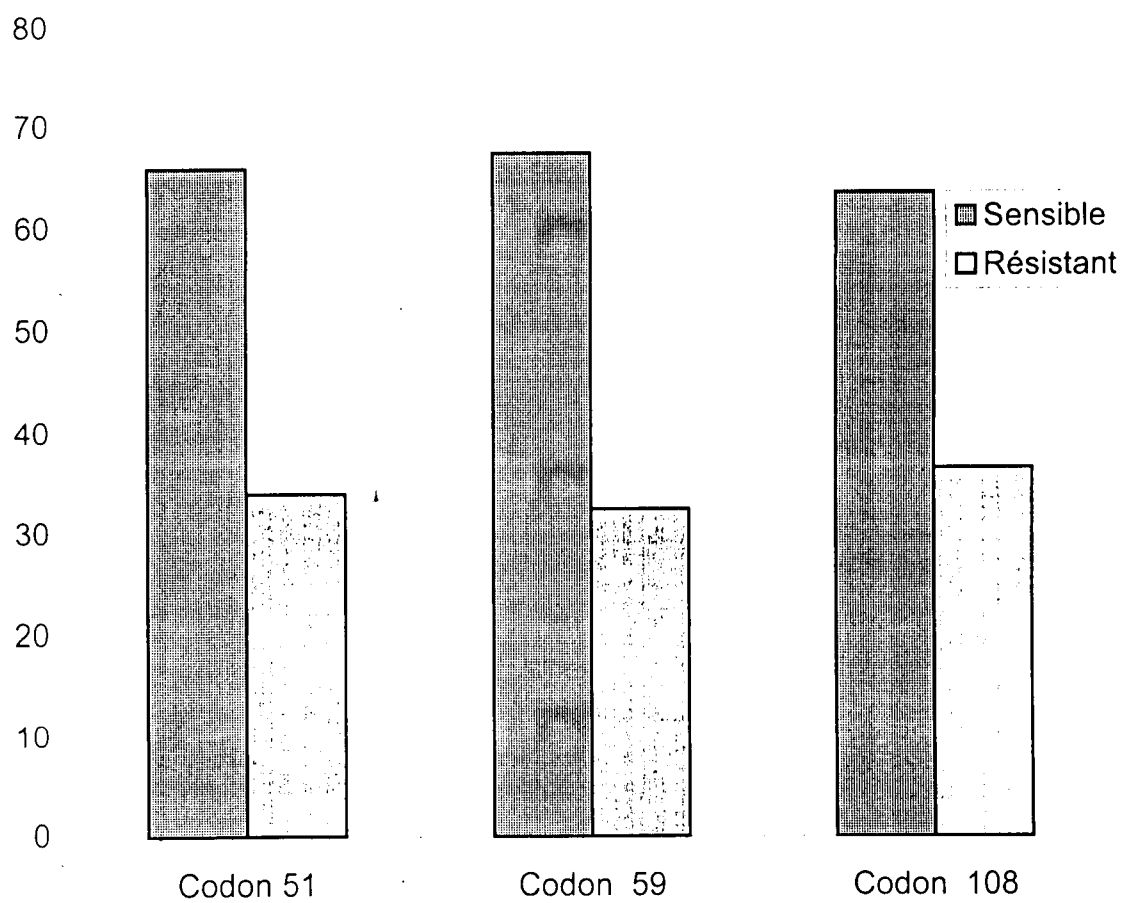
Tableau12: Prévalence des mutations ponctuelles *dhfr* ( 51, 59 et 108) chez les parasites à J0.

La recherche des mutations ponctuelles sur les gènes *dhfr* (codons 51, 59 et 108) et *dhps* (codon 437 et 540) a été effectuée chez 318 des 343 sujets inclus.

Génotype	Codon 51		Codon 59		Codon 108	
	n	%	n	%	n	%
<b>Sensible</b>	210	66	214	67,5	202	63,5
<b>Résistant</b>	17	5,3	20	6,3	23	7,2
<b>Mixte</b>	91	28,7	83	26,2	93	29,3
<b>Total</b>	318	100	317	100	318	100

$$(X^2 = 1,14 \text{ ddl} = 2 \text{ p} = 0,56)$$

Ce tableau révèle que 34% des souches de *P. falciparum* rencontrées à Kollé portaient le génotype résistant du gène *dhfr* au niveau du codon 51, 32,5% au niveau du codon 59 et 36,5% au niveau du codon 108.



**Figure 6 :** Prévalence des mutations ponctuelles *dhfr*

**Tableau 13** : Taux de prévalence des mutations ponctuelles *dhps* 437 et 540 chez les parasites rencontrés à J0.

Génotypes	J0			
	437		540	
	n	%	n	%
<b>Sensible (S)</b>	288	87,5	335	100
<b>Résistant (R)</b>	29	8,8	0	0,0
<b>R+S</b>	12	3,7	0	0,0
<b>Total</b>	329	100	335	100

(  $X^2 = 44,50$   $p < 10^{-9}$  )

Ce tableau montre que 12% des souches parasitaires avaient l'allèle résistant du gène *dhps* au niveau du codon 437. Cependant 100% portaient l'allèle sensible du même gène au niveau du codon 540.

Tableau 14 : Les différents allotypes du gène *dhfr* au cours du suivi.

	J0		J3		J14	
Allotypes	n	%	n	%	n	%
<b>Codon 51</b>						
<b>Sensible</b>	210	66,0	0	0	0	0
<b>Résistant</b>	108	34,0	5	100	1	100
<b>Codon 59</b>						
<b>Sensible</b>	214	67,5	0	0	0	0
<b>Résistant</b>	103	32,5	5	100	1	100
<b>Codon 108</b>						
<b>Sensible</b>	202	63,5	0	0	0	0
<b>Résistant</b>	116	36,5	5	100	1	100

Il ressort de ce tableau que toutes les souches parasitaires retrouvées au cours du suivi portaient des mutations ponctuelles au niveau des codons 51, 59 et 108 du gène *dhfr*.

**Tableau 15 :** Prévalence des mutations ponctuelles 437 et 540 du gène *dhps* au cours du suivi.

Allotypes	J0		J3		J14	
	437 n	540 n	437 n	540 n	437 n	540 n
<b>Sensible</b>	288	335	0	5	0	1
<b>Résistant</b>	41	0	5	0	1	0
<b>Total</b>	329	335	5	5	1	1

Ce tableau ressort que les parasites retrouvés au cours du suivi portaient l'allotype résistant du gène *dhps* au codon 437, et sensible au codon 540.

**Tableau 16 :** Prévalence des associations de mutations ponctuelles *dhfr* et *dhps*

	n	%
<b>Simple</b>	51	14,8
<b>Double</b>	54	15,7
<b>Triple</b>	58	16,9
<b>Quadruple</b>	8	2,3
<b>Quintuple</b>	0	0,0

Il ressort de l'analyse de ce tableau qu'aucun parasite présentant les cinq mutations (quintuple mutation) à J0 n'a été retrouvé.

NB : la quintuple mutation est associée habituellement à un haut niveau de résistance *in vivo* à la SP.

**Tableau 17** : Distribution des types de codons 51, 59 et 108 du gène *dhfr* à J0 en fonction de la réponse clinique

Allotypes	ETP		RCS		Total
	n	%	n	%	
<b>Codon 51</b>					
<b>Sensible</b>	1	50	206	66,5	207
<b>Résistant</b>	1	50	104	33,5	105
<b>Codon 59</b>					
<b>Sensible</b>	1	50	209	67,6	210
<b>Résistant</b>	1	50	100	32,4	101
<b>Codon 108</b>					
<b>Sensible</b>	1	50	196	63,2	197
<b>Résistant</b>	1	50	114	36,8	115

- La distribution des allotypes n'est pas corrélée avec les cas échecs thérapeutiques observés, puisque 50% des cas ETP avaient l'allèle sensible et 50% avec allèle résistant du gène *dhfr* au niveau des différents codons.

Dans la catégorie des RCS nous avons observé 66,5% des souches de *P. falciparum* portant l'allèle sensible contre 33,5% avec allèle résistant du *dhfr* au niveau du codon 51.

Pour le codon *dhfr* 59, ces proportions étaient respectivement de 67,6% contre 32,4% tandis qu'elle était de 63,2% contre 36,8% au niveau du codon 108.

**Tableau 18** : Distribution des allotypes du gène *dhps* au niveau des codons 437 et 540 à J0 en fonction de la réponse clinique

Allotypes ↓	ETP		RCS		Total
	n	%	n	%	
<b>Codon 437</b>					
Sensible	2	100	282	87,9	284
Résistant	0	0	39	12,1	39
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>100</b>	<b>321</b>	<b>100</b>	<b>323</b>
<b>Codon 540</b>					
Sensible	2	100	327	100	329
Résistant	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>100</b>	<b>327</b>	<b>100</b>	<b>329</b>

Il ressort de ce tableau que tous les sujets d'ETP avaient des parasites portant l'allèle sensible du *dhps* au niveau des codons 437 et 540 à J0.

Certains sujets porteurs des souches avec mutations ponctuelles sont devenus RCS.

**Tableau 19** : Distribution des allotypes du *dhfr* en fonction de la réponse parasitologique

Allotype	RI		RIII		Sensible	
	n	%	n	%	n	%
<b>Codon 51</b>						
Sensible	2	75	1	50	203	66,3
Résistant	1	25	1	50	103	33,7
<b>Codon 59</b>						
Sensible	2	75	1	50	206	67,5
Résistant	1	25	1	50	99	32,5
<b>Codon 108</b>						
Sensible	2	75	1	50	193	63,1
Résistant	1	25	1	50	113	36,9

Ce tableau montre que sur les 3 cas de RI, 2 avaient l'allèle sensible du gène *dhfr* au niveau des codons 51, 59 et 108, contre 1 cas avec allèle résistant.

En revanche, on observe une répartition équitable d'allèles sensible et résistant du même gène par rapport la réponse parasitologique de type RIII.

**Tableau 20** : Distribution des allèles du gène *dhps* en fonction de la réponse parasitologique.

Type d'allèles ↓	RI		RIII		Sensible	
	n	%	n	%	n	%
<b>Codon 540</b>						
<b>Sensible</b>	3	100	2	100	323	100
<b>Résistant</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	3	100	2	100	323	100
<b>Codon 437</b>						
<b>Sensible</b>	3	100	2	100	278	88
<b>Résistant</b>	0	0	0	0	39	12
<b>Total</b>	3	100	2	100	317	100

Il ressort de l'analyse de ce tableau que tous les cas de résistance parasitologique ( RI et RIII ) avaient l'allèle sensible du gène *dhps* par rapport aux deux codons 437 et 540.

# **DISCUSSION**

## V/ DISCUSSION

### Méthodologie

Le cadre de notre étude a été le village de Kollé et son choix se justifie par :

- Son accessibilité géographique facile en toute saison,
- L'existence des données épidémiologiques antérieures sur la chloroquine et la sulfadoxine - pyriméthamine
- L'adhésion de la population aux études antérieures.

Au cours de cette étude nous avons évalué chez les sujets souffrant d'accès palustre simple inclus dans cette étude, l'efficacité clinique et parasitologique de la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) sur *P. falciparum* et ensuite, mesuré la prévalence des mutations ponctuelles sur les gènes *dhps* et *dhfr* codant pour la résistance de *P. falciparum* à ce médicament.

Le protocole standardisé de 14 jours de l'OMS [OMS, 1996] a été appliqué sur un échantillon de 343 sujets pour évaluer les différents aspects des échecs thérapeutiques et de la résistance parasitologique. A fin de permettre une comparaison des résultats, l'analyse a porté sur les données de 14 jours. Des confettis confectionnés conformément à ce protocole ont servi de support de données pour l'analyse moléculaire.

Cette analyse moléculaire des données à la recherche des mutations ponctuelles a été réalisée en utilisant deux méthodes différentes de double – réaction de polymérisation en chaîne (nested PCR), l'une utilisant des enzymes de restriction (ASRA) et l'autre n'utilisant pas d'enzymes de restriction. Le premier a permis la détection des types allèles du gène *dhps* au niveau des codons 437 et 540 et le second ceux du gène *dhfr* au niveau des codons 51, 59 et 108.

Les données collectées à J0 ont servi à évaluer la situation de départ tandis que celles recueillies à J3, J7 et J14 ont été utilisées pour définir les réponses cliniques, parasitologiques et moléculaires.

Le choix de la sulfadoxine-pyriméthamine se justifiait d'une part par le niveau croissant, ces dernières années dans la localité, de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine qui est l'antipaludique de première ligne au Mali et d'autre part, parce qu'elle est le traitement de seconde ligne recommandé par PNLP. Ainsi, cela nous a permis d'évaluer le niveau de sensibilité du parasite à cet antipaludique.

Notre période d'étude, de septembre à décembre a été choisie sur la base des données relatives à la dynamique saisonnière de transmission du paludisme au Mali [63].

## Caractéristiques socio -démographiques

Notre échantillon était majoritairement constitué de sujets de sexe masculin ( 54,5 %) avec un ratio de 1,2. Parmi eux 85,1% avaient un âge inférieur à 10 ans (*Tableau 1*) et les moins de 5 ans, constituant un des groupes à risque [64], représentaient 55,4% (*Tableau 2*).

## Caractéristiques cliniques

Les caractéristiques cliniques étudiées portaient sur l'évolution de la fièvre, l'indice splénique, l'ETP, l'ETT et la RCS.

La fièvre qui constituait le principal motif de consultation a été observée chez 99,1% de sujets à l'inclusion pour décroître ensuite à 0,6% à J14 (n = 2/335, *Tableau 3*). Statistiquement, la différence était significative ( $X^2 = 1227,88, p < 10^{-6}$ ) ce qui témoigne de l'efficacité du traitement administré (sulfadoxine – pyriméthamine associée au paracétamol).

Aucun effet secondaire (prurits ou autres formes d'allergie cutanée...) lié au traitement n'a été cliniquement observé, ce qui révèle la tolérance de la SP par notre échantillon. Ce résultat est comparable à celui de Diourté *et col.* en 1996 qui n'a observé aucun cas sur 218 inclusions à Sotuba [14].

Le taux portage de la splénomégalie à J0 (67,9%) est passé sous traitement spécifique à 41,6% à J14 (*Tableau 4*) soit un taux de réduction de 26,3%. Cette différence était statistiquement significative ( $X^2 = 47,33, p < 10^{-6}$ ) démontrant ainsi, une liaison entre le traitement à la SP et la réduction du taux de portage de splénomégalie à J14. L'élévation de ces taux s'expliquerait d'une part, par le niveau de transmission hyper-endémique de la zone et d'autre part, par le fait que 85,1% de l'échantillon avaient un âge inférieur à 10ans. La différence entre notre résultat ( 67,9% à J0) et ceux des études effectuées à Sotuba et Bamako (5,5% ) par Diourté *et al.* en 1995 et à Donéguébougou (6,41%) par Sogoba en 1999 [65] s'expliquerait entre autres par les raisons sus – citées, car la transmission du paludisme est meso– endémique à dans ces deux premiers sites. En revanche, quand à Donéguébougou qui est situé dans le même faciès épidémiologique que le village de Kollé, elle s'expliquerait par la différence de la tranche d'âge de l'échantillon qui était de 7 à 20 ans dans ce site.

Sur le plan efficacité clinique, le taux global d'échec thérapeutique uniquement constitué de type précoce (ETP) était de 0,6% (*Tableau 5*) contre 99,4 % de Résultats cliniques satisfaisantes (RCS).

Ce résultat démontre l'efficacité de la SP dans le traitement du paludisme simple à *P.falciparum* à Kollé.

Ce taux global d'échec thérapeutique est très inférieur comparé à celui d'autres travaux menés au Mali par Sanogo (11,3%) à Sotuba et ( 4% ) à Donéguébougou en 2000 [66] et d'ailleurs par Ringwald *et col.*(12.1%) en 2000 à Yaoundé au Cameroun[67].

La comparaison en fonction de l'échec thérapeutique précoce suit la même tendance que l'échec thérapeutique global 10,7% à Sotuba et 3,6% à Donéguébougou [66].

Dans notre étude, nous n'avons pas enregistré de cas d'ETT. Ce résultat corrèle avec ceux de Diourté et de Sogoba qui n'ont pas enregistré non plus de cas d'échec thérapeutique tardif [44, 65]. Par contre, Sanogo *et col.* ont enregistré 0,6% et 0,4% d'ETT respectivement à Sotuba et à Donéguébougou en 2000 [66].

## Caractéristiques Parasitologiques

Nous avons évalué l'évolution de la réponse parasitologique (RI, RII, RIII et Sensibles) au cours du suivi.

Le suivi parasitologique après traitement spécifique nous a permis de constater une grande sensibilité de *P. falciparum* à la sulfadoxine– pyriméthamine (98,5%). Le taux de portage du parasite est passé de 100% à J0 à 4,1% à J3, 0,9% à J7 et 0,3% à J14 (*Tableau 6*).

Au cours du suivi parasitologique, 18 cas (dont 14 à J3, 3 à J7 et 1 à J14 ) de goutte épaisse ont été enregistrés chez les enfants de moins de 10 ans. Cette positivité de ces gouttes épaisses surtout à J3 pourrait s'expliquer principalement d'une part par l'action lente de la SP et d'autre d'autres part, par une résistance parasitologique. L'observation de tous ces cas chez les moins de 10 ans plaiderait en faveur d'une prémunition faible dans ce groupe d'âge.

Le taux global de résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine – pyriméthamine était de 1,5% ( n = 5/343) dont RI = 0,9 %, RII= 0 % et RIII = 0,6% soit une sensibilité parasitologique de 98,5% (*Tableau 7*).

Ce taux de 1,5% est comparable à aux chiffres de Diourté *et col.*(1%) à Sotuba et au point G en 1995 et de Sogoba (2%) à Sotuba en 1999. Par contre, il est assez faible par rapport aux résultats de Sanogo *et col.* à Sotuba (11,7%) et à Donéguébougou (47,2%) en 2000. Un des facteurs explicatifs de cette différence pourrait être lié à la durée de l'étude qui était de 6 mois dans l'étude Sanogo à Donéguébougou et Sotuba.

Ailleurs, ce taux est comparable à celui de Ndyomugenyi R. *et col.* à Hoima, District de l'Ouganda (2%) [68] mais nettement inférieur à ceux de Deloron P. *et col.* en 2000 au Gabon (30,3%).[69], de Verhoeff *et col.* en Malawi (9,5%), de Lege – Oguntoye *et col.* au nord du Nigeria (18%) [70] et de Kamugisha *et col.* à l'Ouest de l'Ouganda (12%) [71].

Par rapport aux types de résistance, notre taux de RI (0,9%) est comparable à celui de Sogoba à Donéguébougou (1,1%) en 1999 [13] et mais plus faible que ceux de Sanogo à Sotuba (15,9%) et à Donéguébougou (2,6%) en 2000 [66].

La résistance parasitologique de type RIII (0,6%) est elle aussi inférieure à ceux de Sanogo (10,7%) à Sotuba et (2,4%) à Donéguébougou à la même année.

La résistance RI observée par Deloron et *col.* en 2000 au Gabon est aussi supérieure à la notre [69].

La répartition du type de résistance selon les classes d'âge (tableau 8) montre que se sont uniquement les enfants de moins de 10 ans qui sont touchés. Ceci corrobore les résultats de l'évolution de la parasitémie (Tableau 6) renforçant le facteur immunitaire via l'âge.

## Résultats hématologiques

La prévalence de l'anémie à l'inclusion était de 39,4% (Tableau 10). Ce taux était élevé comparé à celui de Tékété en 1999 dans la même localité (10,3%) mais plus faible que celui de Traoré en 1998 toujours dans le même site (75,2%) [12, 14].

Ces différences pourraient s'expliquer entre autres par la différence de la durée de mesure de l'hématocrite.

Ces chiffres représentent respectivement l'évaluation de l'anémie pour un mois [12] et trois mois [14]. Dans notre étude, nous avons enregistré une panne technique de l'appareil de mesure pendant 20 jours au cours de la phase de collecte des données.

La distribution de l'anémie par rapport aux classes d'âges (Tableau 11a) montre que 80% des cas ont été observés chez les moins de 5ans. Cela pourrait s'expliquer par le faible degré d'immunité antipalustre chez ces enfants favorisant une infestation massive des hématies d'où l'anémie. Cette anémie a significativement baissé au cours du suivi allant de 41,7% à J0 à 17 % à J14 (tableau 11b).

## RESULTATS MOLECULAIRES

L'amplification génique à l'aide de la technique de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) a permis d'obtenir les résultats moléculaires.

Ainsi, la recherche des allèles de la résistance sur les gènes *dhfr* et *dhps* a permis d'obtenir des taux moyens respectivement de l'ordre de 34% (34,0% codon 51, 32,5% codon 59 et 36,5% codon 108 ; Tableau 12) et de 12,5 % (uniquement pour le codon 437 ; Tableau 13). Aucune mutation ponctuelle sur le *dhps* au codon 540 n'a été observée dans notre étude de J0 à J14 (tableau 12). Statistiquement, nous n'avons pas observé de différence significative entre les taux

de mutation des différents codons *dhfr* ( $X^2 = 1,14$ ,  $p = 0,56$ , Tableau 12). En revanche, au niveau du gène *dhps* (codons 437 et 540) il est remarquable aucune mutation ponctuelle au codon 540 n'a été mise en évidence aussi bien à JO qu'au cours des suivis dans nos échantillons analysés (Tableau 15).

Ces résultats témoignent d'une part, que les mutations ponctuelles du gène *dhfr* et du *dhps* 437 sont naturellement présentes à chez les souches de *P. falciparum* circulantes à Kollé et d'autre part, que cette situation était nouvelle comparée aux résultats d'autres études antérieures à la notre dans la même localité. En effet, sur 58 échantillons collecté en 1993 à Kollé aucune mutation *dhfr* 108 n'avait été enregistrée [ Plowe 1995 ].

Nos chiffres sont supérieurs à ceux de Plowe *et col.* (22,6 %) à Bougoula, (13,5%) à Bandiagara et (23,4%) à Mopti en 1994 [Plowe,1996].

Nous avons noté une diminution remarquable du nombre de cas de mutations ponctuelles au cours du suivi et ceci pour les cinq codons analysés. (Tableaux 14 et 15).

La répartition du type d'allèles du gène *dhfr* en fonction de la réponse clinique (Tableau 17) montre une distribution égale d'allèles sensible et résistant du gène *dhfr* par rapport aux codons 51, 59 et 108. Cette distribution d'allotypes en fonction du gène *dhps* montre que les deux cas d'ETP portaient tous l'allèle sensible (Tableau 18). Logiquement, nous nous attendions à observer des allotypes résistants chez les cas d'ETP et ce contraste reste toujours un problème posé. Est-ce une malabsorption intestinale ?

La répartition des allotypes des gènes *dhfr et dhps* par rapport à la réponse parasitologique (Tableaux 19 et 20) n'a pas révélé de lien statistiquement significatif ( $p$  de Fisher = 1,00). Dans la littérature, on rapporte que plus le nombre de mutations ponctuelles sur les deux gènes est élevé (mutation quadruple ou quintuple) plus le risque de résistance parasitologique est élevé [40, 67, 68, 69]. Donc, une ou deux mutations sur les gènes *dhfr et dhps* ne suffisent pas pour engendrer un échec thérapeutique.

# **CONCLUSION/ RECOMMENDATIONS**

## VI/ CONCLUSION

Au terme de cette étude nous avons dénombré 343 cas incidents d'accès palustre simple à *P. falciparum* majoritairement constitués d'enfants de moins de 5 ans. Les paramètres de morbidité palustre y étaient relativement élevés par rapport aux années précédentes.

L'étude de la sensibilité *in vivo* de *P. falciparum* à l'association sulfadoxine- pyriméthamine a révélé un taux global thérapeutique de 0,6% et 1,5% de résistance parasitologique. Donc, ce médicament conserve toujours son efficacité clinique et parasitologique sur les souches de *P. falciparum* circulantes à Kollé malgré la positivité des taux de la présente étude.

Sur le plan moléculaire, le taux moyen des mutations des codons 51, 59 et 108 du gène *dhfr* était de 34% alors que celui du codon 437 du gène *dhps* était de 12,5%.

Dans ce travail, nous n'avons pas pu mettre en évidence une relation directe entre mutations moléculaires et efficacité clinique et parasitologique à cause du faible pourcentage des cas d'échec thérapeutique et de résistance parasitologique.

## VII/ RECOMMANDATIONS

Au regard de ces résultats nous formulons les recommandations suivantes :

- Assurer la retro -- information des résultats de cette étude auprès de tous les partenaires (communauté de Kollé, ministère de la santé du Mali, bailleur du fond )
- L'utilisation effective de cet antipaludéen comme traitement de deuxième intention dans le traitement des accès palustres simples. C'est à dire réservé aux cas d'échec à la chloroquine.
- Présence permanente d'une équipe médicale avec les moyens de prise en charge précoce et correcte des cas de paludisme dans le village de Kollé.
- Poursuivre l'étude pour rechercher une corrélation entre mutations ponctuelles et échec thérapeutique et résistance parasitologique aussi bien à Kollé que dans d'autres sites du Mali.

# **RESUMES**

**Prénom et Nom :** Bakary FOFANA

**Nationalité :** Malienne

**Ville de soutenance :** Bamako

**Année de soutenance :** Juillet 2002

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de pharmacie et d'Odontostomatologie du Mali, Bamako.

**Secteur d'intérêt :** Parasitologie (Paludisme), Epidémiologie de la chimiorésistance et Biologie moléculaire.

**Titre de la thèse :** Efficacité de la sulfadoxine-pyriméthamine sur *Plasmodium falciparum* et prévalence des mutations ponctuelles des gènes *dhfr* et *dhps* à Kollé.

**Résumé :**

Des taux de chloroquino-résistance de plus en plus élevés sont observés à Kollé, un village de savane soudanaise au sud du Mali.

Le but de ce travail était de mesurer la prévalence des marqueurs moléculaires de chimiorésistance et d'évaluer l'efficacité clinique et parasitologique de la sulfadoxine - pyriméthamine sur les souches de *P. falciparum* à Kollé.

De septembre à décembre 2000, nous avons fait un suivi longitudinal (J0 à J28) chez les paludéens âgés de 6 mois et plus une modification du protocole de l'OMS. La sulfadoxine - pyriméthamine a été administrée en dose unique orale (25 mg/kg de sulfadoxine). Au total 343 sujets ont été inclus dans l'étude. Cliniquement, le taux d'échec thérapeutique, constitué uniquement de type précoce était de 0,6% (n = 2/335). Le taux global de la résistance parasitologique a été de 1,5% (n = 5/330) dont 0,9% de RI, 0,0% de RII et 0,6% de RIII. Les deux cas d'échec thérapeutique étaient des cas de résistance parasitologique RIII. La recherche des mutations ponctuelles à J0 sur les gènes dihydro folate reductase (*dhfr*) et dihydro pterate syntase (*dhps*) a révélé : 34% de *dhfr* 51 (n = 108/318), 32,5% de *dhfr* 59 (n = 103/307), 36,5% de *dhfr* 108 (n = 116/318), 12,5% de *dhps* 437 (n = 41/329) et de 0,0% de *dhps* 540 (n = 0/335). L'analyse moléculaire sur les confettis de J0 a mis en évidence dans 14,8% (n= 51/344) une seule mutation, deux mutations dans 15,7% (n= 54/344), trois mutations associées dans 16,9% (n = 58/344) et quatre mutations associées dans 2,3% des cas (n = 8/344). Cependant aucun cas de quintuple mutation n'a été observé. Ces résultats montrent que la sulfadoxine - pyriméthamine est encore cliniquement et parasitologiquement efficace sur les souches de *P. falciparum* de Kollé. Cependant, l'augmentation de la prévalence des mutations de la DHFR et de la DHPS par rapport aux années précédentes incite à une vigilance accrue.

**Mot clés :** *P. falciparum*, Résistance, Sulfadoxine-Pyriméthamine, Mutation ponctuelle, *dhfr*, *dhps*, PCR, Réponse clinique, Réponse parasitologique.

**Name:** Bakary FOFANA

**Nationality:** Malian

**Town of defense:** Bamako

**Year of defense:** July 2002

**Sector of interest:** Parasitology (malaria), Epidemiology of drug resistance, Molecular biology.

**Thesis Title :** Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine on *Plasmodium falciparum* and prevalence of the point mutations of the genes *dhfr* and *dhps* in Kollé.

Increasing level of chloroquino-resistance are observed in Kollé, a village of the south-east savanna of Mali.

The goal of this work was to measure the prevalence of the molecular markers of drug-resistance and to evaluate the efficacy of sulfadoxine - pyrimethamine on the stocks of *P. falciparum* in Kollé.

From September through December 2000, we made a longitudinal follow-up (from day 0 to day 28) of subjects 6 months and older ( one modification of WHO protocol ). The sulfadoxine - pyrimethamine was given insingle oral doses (25 mg/kg). A total of 343 subjects were included in the study. Clinically, the rate of therapeutic failure, in early type was 0.6% (n = 2/335). The total rate of the parasitologic resistance (R) was 1.5% (n = 5/330) including 0.9% of RI, 0.0% of RII and 0.6% of RIII. The two cases of therapeutic failure were seen in the parasitologic resistance RIII.

Datafrom the specific changes at day 0 on the genes dihydro folate reductase (*dhfr*) and dihydro pterooate synthase (*dhps*) revealed: 34% of *dhfr* 51 (n = 108/318), 32.5% of *dhfr* 59 (n = 103/307), 36.5% of *dhfr* 108 (n = 116/318), 12.5% of *dhps* 437 (N = 41/329) and of 0,0% of *dhps* 540 (n = 0/335).

The molecular analysis on the confettis of day 0 revealed in 14.8% (n = 51/344) only one mutation, two changes in 15.7% (n = 54/344), three mutation in 16,9% (n = 58/344), four mutation in 2,3% of the cases (n = 8/344) and no quintuple mutations (0/344). These results indicate that the sulfadoxine-pyrimethamine is still clinically and parasitically efficient to use on the stocks of *P. falciparum* in Kollé. However, the increasing prevalence of the point mutations in the genes *dhfr* and *dhps* compared to preceding years has incited an increased vigilance.

**Key word:** *P. falciparum*, resistance, Sulfadoxine-Pyrimethamine, Mutation, *dhfr*, *dhps*, clinical and parasitical efficacy.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## VIII/ BIBLIOGRAPHIE

1. **In RIPERT C, PAJOT FX, VINCENDEAU P, ESQUERDO GOMEZ F.**  
Chap II. Paludisme. *Epidémiologie des maladies parasitaires* 1996 ; 1 :69-79.
2. **EDINTON G. M., LAIG W. N.**, Relationship between haemoglobin C and malaria in Ghana.  
*B. Med. J.* 1967; 2:143-145
3. **DOUMBIA O.**, Paludisme: passé, présent, avenir. These, Medecine, Bamako, 1977
4. **KEMP D. J., COWMAN A. F., WALIKER D.** Genetic Diversity in *P. falciparum*. *Adv. Parasitol.* 1990 ; 29 : 75-149.
5. **PETTER W.**, Chemotherapy and drug resistance in malaria. *Londre, Academic Press éd. 1970*
6. **OMS 1992** Vector control for malaria and mosquito borne diseases, report of a WHO study group, WHO Geneva, 1995.
7. **KAIN K.**, et al. In vivo response of *Plasmodium falciparum* malaria to chloroquin in northern Thailand; *J. Inf. Dis.* 170 1994.
8. **Vasconcelos KF, Plowe CV, Fontes CJ, Kyle D, Wirth DF, Pereira da Silva LH, Zalis MG.** Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil.  
*Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000 Sep-Oct;95(5):721-8
9. **STAHEL E., DEGREMONT A., LANGLER U.** Pyrimethamine-sulfadoxine resistant *falciparum* malaria acquired at Dar-es-Salam, Tanzania. *Lancet*, 1982 ; 1 : 1118-1119.
10. **TIMMERMANN P.H., HESS U., JONES H.E.** Pyrimethamine-sulfadoxine resistant *falciparum* malaria in East Africa. *Lancet*, 1982; 1 : 1181.
11. **Verhoeff FH, Brabin BJ, Masache P, Masache B, Kazembe P, Van der Kaay HJ.** Parasitological and hematological responses to treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria with sulfadoxine-pyrimethmine in southern Malawi. *Ann Trop Med Parasitol* 1997 Mar ;91(2) : 133-40.
12. **Torimo DS, Minjas NJ, Bygbjerg IC**  
Perception of chloroquine efficacy and alternative treatment of uncomplicated Malaria in children in holoendemic area of Tanzania : implication for change of treatment policy. *Trop Int Health* 2001 Dec ; 6(12) :992-7
13. **Mamadou Modibo TEKETE**  
SENSIBILITE DE *Plasmodium falciparum* A LA CHLOROQUINE DANS DEUX VILLAGES DE LA SAVANE MALIENNE : KOLLE & BANCOUMANA.  
Thèse de Pharmacie, Décembre 2001 .

**14. Ousmane Mohamed TRAORE**

EVALUATION DU NIVEAU DE LA REPONSE CLINIQUE, PARASITOLOGIQUE *IN VIVO* ET DES MUTATIONS DU PFCRT DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* A KOLLE( MALI)

Thèse de pharmacie, 1998, N° 239.

**15. Yacouba B. DIOURTE**

Epidémiologie moléculaire de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antifolates au Mali : Intérêt de la technique de " Polymerase chain Reaction" (P.C.R.).

Thèse de Pharmacie, 1996, No...

**16. BRYSKIER A., LABRO M.T .,** Paludisme et médicaments. Arnette, Paris, Ed Sept. 1988; N°3742

**17. INSELBURG J.,BZIK D., LI W.B.** *P. falciparum*: three amino acid changes in the dihydrofolate reductase of a pyrimethamine-resistance mutant. *Exp. Parasitol* 1988;67:361-363.

**18. DOUMBO O.** : Epidémiologie du paludisme au Mali. Etude de la chloroquinorésistance. Essai d stratégie de contrôle basée sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associée au traitement systématique des accès fébriles. Thèse de Doctorat Sciences Biologiques ( Parasitologie, Pathologie, Ecologie), Montpellier, 1992.

**19. Yayon , A., Cabantchick, ZI., and Ginsberg H.** (1984) *EMBRO J.* 3, 2695-2700.

**20. WITE. N.-J et al.** Artemisinin : curent status. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994 ; 88 suppl. 1 :1-65.

**21. BOUGNOUX. M.-E, ANCELLE, T.** Place de l'artéméther parmi les dérivés du quinghaosou. *Cahier Santé* 1993 ; 3 : 308-313.

**22. BUI XUAN VINH, LE TRUNG HIEU, TRAN THI VIET & NGUYEN THI PHIEN.** L'artésunate dans le traitement du paludisme grave de l'enfant à Ho Chi Minh- ville. *Med.Trop.* 1995 ; 55 suppl. n° 3, AP06 : 37.

**23. PETER W ., ELLIS D., BOULARD Y., LANDAU I.,** 1984 The chemotherapiy of rodent malaria. XXXVI. Causal prophylaxis. Part 4. The activity of a new 8-aminoquinolone, WR225,448 against exo-erythrocytic schizonts of *Plasmodium yoelii*. *Annals of trop. Med. and Parasitol.* 78 :467-478.

**24. SPRATT B. G.,** 1994 Resistance to antibiotics mediated by target alterations. . *Science* 264. 388-393.

**25. NIKIADO H., et al.** 1994 Prevention of drug resistance acces to bacterial target: permeability barriers and active efflux. *Science* 264, 382-388.

**25. BASCO L.K., RUGGERI C., LE BRAS J.** Molécules antipaludiques : Mécanisme d'action , mecanisme de résistance et relation structure-activité des schizonticides sanguins. Masson , Paris. Barcelone, 1994.

27. **ASH C.** Point mutations may account for pyrimethamine resistance. *Trends Pharmacological Sciences* 1989; **10(8)**:303-304
28. **INSELBURG J., BZIK D., LI W.B., HORII T.** Molecular cloning and sequence analysis of the *P. falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; **84**: 8360-8364
29. **COWMAN A. F., MORY M. J., BIGGS B., CROSS G. A. M., FOOTE S.J.** Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; **85**: 9109-9113.
30. **HYDE J. E.** Point mutations and pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today* 1989; **5**:252-255.
31. **HYDE J. E.** the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene in the drug resistance of malaria parasites. *Pharmac. Ther.* 1990; **48**: 45-49.
32. **PETERSON D. S., WALLIKER D., WELLENS T.E.** Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *P. falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; **85**:9114-9118.
33. **SNEWIN V. A., ENGLAND S. M., SIMS P.F.G., HYDE E.** Characterization of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from human malaria parasites highly resistant to pyrimethamine. *Gene* 1989; **76**:41-52
34. **ZOIG J. W., PLITT J. R., CHEN G.X.** Detection of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* by mutation-specific polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990; **39(2)**: 257-266.
35. **ZOLG J. W., PLITT J. R., CHEN G.X., PALMER S.** Point mutations in the dihydrofolate reductase thymidylate synthetase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *P. falciparum*
36. **GYANG F. N., PETERSON D. S., WELLEMS T.E.** *Plasmodium falciparum* Rapid detection of dihydrofolate reductase mutations that confer resistance to cycloguanil and pyrimethamine. *Exp. Parasitol.* 1992; **74**: 470-472.
37. **PETERSON D. S., DI SANTI S.M., PAVOA M., CALVOSA V. S., DO ROSARIA V.E., WELLEMS T.E.** Prevalence of the dihydrofolate reductase ANS-108 mutation as the basis for pyrimethamine-resistance *P. falciparum* malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; **45(4)**: 492-497.
38. **BZIK D. J., LI W. B., HORII T., INSELBERG J.,** Molecular cloning and sequence analysis of *P. falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; **84**: 8360-8364

39. ZOLG J. W., PLITT J. R., CHEN G. X., PALMERS. S., Mutations point in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *P. falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989; 36: 253-262.
40. CORTESE J. F., PLOWE C. V., Antifolate resistance due to new and know *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutants expressed in yeast . *Mol. Biochem. Parasitol.* 1998; 94: 205-214).
41. GYANG F. N., PETERSON D. S., WELLEMS T. E., *P. falciparum* rapid detection of dihydrofolate reductase mutations that confer resistance to cycloguanil and pyrimethamine. *Exp. Parasitol.* 1992; 74:470-472.
42. PETERSON D. S., DI SANTA S.M., PAVOA M., CALVOSA V. S., ROSARIO V. E., WELLEMS T. E., Prevalence of the dihydrofolate Asn-108 mutations as a basis for pyrimethamine resistance of *P. falciparum* malaria in brazilian amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 45:(4): 492-497.
43. ASH C., Mutations point may account for pyrimethamine resistance. *Trends Pharmacological Sciences* 1989 10 (8): 303-304
44. HYDES J. E., The dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene in malaria the drug malaria resistance of malaria parasites. *Pharma. The* 1990; 48: 45-49
45. DIOURTE Y, DJIMDE A, DOUMBO OK, SAGARA I, COULIBALY Y, DICKO A, DIALLO M, DIAKITE M , CORTESE JF, PLOWE CV. Pyrimethamine-sulfadoxine efficacy and selection for mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 1999 . Mar; 60(3) : 47
46. WILSON CM, VOLKMAN SK, THAITHONG S, MARTIN RK, KYLE DE, MUHOUS WK, WIRTH DF., Amplification of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistant in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol* 1993 jan ; 57(1) :151-60.
47. RITCHIE GY, MUNGTHIN M, GREEN JE, BRAY PG, HAWLEY SR, WARD SA., In vitro selection of halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* is not associated with increased expression of *Pgh1*. *Mol biochem Parasitol* 1996 Dec 2 ; 83(1) : 35-46
48. COWMAN A. F., KARZ S. R., The *pfmdr* gene homologues of *Plasmodium falciparum*. *Acta leiden* 1991 ; 60(1) 121-9.
49. BASCO LK, LE BRAS J, RHOADES Z & WILSON MC- Analysis of *pfmdr1* and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from subsaharan Africa. *Mol Biochem Parasitol*, 1995 ; 74 : 157-166.
50. BRAY PG & WARD SA. A comparison of the phenomenology and genetics resistance in cancer cells and quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* 1998 ;77 :1-28.

- 51 HENK B., HENBRIK W., VAN V., BERT P., ARNOLD J. M., DRIESSEN W., N. K.,** Mecanism of MDR transporters ; FEMS Microbiology Rewiews 21, 1997 55-84
- 52. DURAISHINGH MT, DRAKRLEY CJ, MULLER O, BAYLEY R, SNOUNOU G et al.** Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the pfmdr1 gene of *plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology*,1997 ;177 : 1429-1433.
- 53. DJIMDE A, DOUMBO OK, CORTESE JE, KAYANTAO K, BOUMBO S, DIOURTE Y, DICKO A, SU XZ, NORUMA T, FIDOCK DA, WELLENS TE AND PLOWE CV.** A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med* 2001 ;344 :257-63
- 54. SU XZ, KIRKMAN LA, FUZIOKA H ET WELLEMS TE.** Complex polymorphism's in a 330-kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P.falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell* 1997;91 :593-603.
- 55. FIDOCK DA, NOMURA T, TALLEY AK, et al.** Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembranaire protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine résistance. *Mol cell.* 2000 ;6 :861-71.
- 56. PAYNE D.** Aspects pratiques de l'utilisation des systèmes standard OMS d'épreuve *in vitro* ( macro et microtest ) pour la détermination de la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine, la méfloquine, l'amodiaquine et la quinine. *WHO/MAL* 1984 ;84 :2-21.
- 57. LE BRAS J, DELORON P.** *In vivo* study of drug sensitivity of *P. falciparum* : evaluation of a new semi-microtest . *Am J Trop Med Hyg* 1983 ;32 :447-53.
- 58. DESJARDIN RE, CANFIELD CJ, HAYNES JP, CHNULAY JD.** Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979 ;16 : 710-8.
- 59. LE BRAS J, ANDRIEU B, HATIN I, SAVEL J COULAUD JP.** *Plasmodium falciparum* interprétation du semi-microtest de chimiosensibilité *in vitro* par incorporation de 3-hypoxanthine. *Path Bio* 1984 ;32 :463-6.
- 60. KROGSTAD DJ, SCHLESINGER PH.** The basis of antimalaria action : non-weak base effects of chloroquine on acid vasicle pH. *Am J Trop Med Hyg* 1987 ;32 :213-20.
- 61. MAKLER MT, HINRICHS DJ.** Measurement of the lactate deshydrogenase : stage-specific lactate production in synchronized culture. *Exp Parasitol* 1993 ;54 :391-6.
- 62. L. W. Hacket** Spleen measurements in malaria. *J. Natl. Malar. Soc.* 1994. 3 : 121-134

- 63. DOUMBO O., TOURE A., COULIBALY B., KOITA O., TRAORE B., DOLO A., DIALLO AN, QUILICI M.** Incidence du paludisme et HBS en milieu hospitalier Pédiatrique se Bamako au Mali. *Med. Trop* 1992 ; 52 : 169-174.
- 64. VILLADARY I., PAQUET C., HEMELSDAEL E, BLANCHARD G and SAKI ZM.** Chimiosensibilité *in vivo* de *Plasmodium falciparum* dans la région de Tabou en Côte d'Ivoire. *Bull. Soc. Path. Ex.* 1997 ; 90(1) : 10-3.
- 65. Moussa SOGOBA**  
Paludisme : Epidémiologie, Chlôroquino-résistance et Etude de la réinfection après traitement au Fansidar® dans deux zones d'endemicité différente au Mali.  
**These de Medecine, 1999 N°**
- 66. Sanogo Dramane Koutan**  
Incidence du paludisme et sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine chez les enfants et adolescent au Mali dans deux zones à différents niveaux de transmissions.  
**These de Pharmacie. Année universitaire 1999-2000**
- 67. P. Ringwald, A. Keundjian, A. Same Ekobo and L. K. Basco** Chimiorésistance de *P. falciparum* en milieu urbain à Yaoundé, Cameroun. Part 2: Evaluation de l'efficacité de l'amodiaquine et de l'association sulfadoxine-pyriméthamine pour le traitement de l'accès palustre simple à *Plasmodium falciparum* à Yaoundé, Cameroun.  
**Tropical Medicine & International Health**  
Volume 5 Issue 9 Page 620 - September 2000
- 68. NDYOMUGYENYI R, MAGNUSEEN P.**  
In vivo sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and sulfadoxinene-pyrimethamine in School children in Hoïma district, western Uganda.  
*Acta Trop* 1997 Sep 10 ; 66(3) : 137-43.
- 69. Deloron P, Mayombo J, Le Cardinal A, Mezui-Me-Ndong J, Bruzi-Baert C, Lekoulou F, Elissa N.**  
Sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children.  
*Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000 Mar-Apr;94(2):188-90
- 70. I.EGE-UGUNTOYE L, ADAGU SI., WERBLINSKI B, OGALA WN, SLOTBOOM AB.** Resistance of *plasmodium falciparum* to sulfadoxine-pyrimethamine combinaison in semi-immune children in Zaria , northern Nigeria.  
*Trans R Sco Med Hyg* 1990; 84(4 )505-6.
- 71. KAMUGISHA J, KIPP W, BURNHAM G.**  
In vivo sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, Amodiaquene and sulfadoxine-pyrimethamine in western Uganda.  
*Trop geogr Med* 1994 ; 46(3) :365-5.

# ANNEXES

**ETUDE *IN VIVO IN VITRO* DE LA RESISTANCE AU Fansidar:  
KOLLE 2000**

Jour 0

Date \_\_ / \_\_ / \_\_

**Critères d'inclusion:**

- Age  $\geq$  6 mois, GE ou FM positif et Fièvre, Frissons , signes de paludisme simple
- ou Parasitémie  $\geq$  2+

**Critères d'exclusion:**

- Avoir des antécédants d'oedeme de quincq ou d'autres manifestations cutanées graves.
- Coma, obnubilation, convulsions, prostration , détresse respiratoire, insuffisance rénale, état de choc, vomissements sévères, hémorragie diffuse, allergie à la SP.
- Parasitémie  $\geq$  10% ( $\geq$  3+), Hct  $<$  15%, glycémie  $<$  40 mg/dl

ID no.SP \_\_\_\_\_ Age \_\_\_ Sexe \_\_\_

Nom \_\_\_\_\_ Prénom \_\_\_\_\_

Nom de la mere \_\_\_\_\_

Ethnie \_\_\_\_\_

Residence/adresse \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Symptômes**

Fièvre \_\_ Céphalées \_\_ Dx abdominales \_\_ Vomissements \_\_ Diarrhées \_\_ Courbatures \_\_

Citez les médicaments consommés durant les deux dernières semaines.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Avez-vous consommé un des médicaments ci-dessous durant les deux dernières semaines?

Fansidar \_\_ pyriméthamine \_\_ tétracycline \_\_ méfloquine \_\_ cotrimoxazole \_\_  
quinine \_\_ Chloroquine \_\_ halofantrine \_\_ Fansimcf \_\_ proguanil \_\_ Paluther \_\_ Malarial \_\_

Faites- vous des prurits après prise de SP? Yes \_\_ No \_\_

La SP vous provoque-t-elle des rash cutanés? Yes \_\_ No \_\_

La SP vous provoque-t-elle des oedemes? Yes \_\_ No \_\_

**Examen Physique**

Temperature \_\_ . \_\_ °C Rash cutané Yes \_\_ No \_\_

Decrire: \_\_\_\_\_

Fréquence respiratoire \_\_ / min Score splénique de Hackett \_\_ Oedème Yes \_\_ No \_\_ Poids \_\_ .  
\_\_ kg Taille \_\_ . \_\_ cm

Fansidar dose \_\_\_\_\_ mg J0

Autres antipaludiques: \_\_\_\_\_ Autres Traitements: \_\_\_\_\_

**Tests de laboratoire**

FM \_\_\_\_\_ GE \_\_\_\_\_ Sang Veineux \_\_ Confettis \_\_

Hematocrit \_\_ . \_\_ %

**J1**

Date / / / / ID no.SP \_\_\_\_\_

**Symptômes**

Fièvre\_\_ Céphalées\_\_ Dx abdominales \_\_ Vomissements \_\_ Diarrhées\_\_ Courbatures\_\_

Citez les médicaments consommés depuis votre dernière visite.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Avez-vous consommé un des médicaments ci-dessous ?

chloroquine\_\_ pyriméthamine\_\_ tétracycline\_\_ méfloquine\_\_ cotrimoxazole\_\_  
quinine\_\_ Fansidar\_\_ halofantrine\_\_ Fansimef\_\_ proguanil\_\_ Paluther\_\_ Malaria!\_\_

Faites- vous des prurits après prise de SP? Yes\_\_ No\_\_

**Examen Physique**

Temperature \_\_\_\_ . \_\_\_\_ °C Rash cutané Yes\_\_ No\_\_

Decrire: \_\_\_\_\_

Fréquence respiratoire \_\_\_\_ / min Score splénique de Hackett \_\_ Oedème Yes \_\_ No\_\_

Poids \_\_\_\_ . \_\_\_\_ kg

Autres antipaludiques: \_\_\_\_\_ Autres Traitements: \_\_\_\_\_

**Evaluation Générale J1:** Bonne /--/ Resistance R/--/ Exclusion /--/ Abandon /--/

Raison d'abandon ou d'exclusion \_\_\_\_\_

**J2**

Date \_\_/\_\_/\_\_ ID no.SP \_\_\_\_\_

**Symptômes**

Fièvre \_\_ Céphalées \_\_ Dx abdominales \_\_ Vomissements \_\_ Diarrhées \_\_ Courbatures \_\_

Citez les médicaments consommés depuis votre dernière visite.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Avez-vous consommé un des médicaments ci-dessous ?

chloroquine \_\_ pyriméthamine \_\_ tétracycline \_\_ méfloquine \_\_ cotrimoxazole \_\_  
quinine \_\_ Fansidar \_\_ halofantrine \_\_ Fansimef \_\_ proguanil \_\_ Paluther \_\_ Malarial \_\_

Faites- vous des prurits après prise de SP? Yes \_\_ No \_\_

**Examen Physique**

Température \_\_ \_\_ . \_\_ °C Rash cutané Yes \_\_ No \_\_

Decrire: \_\_\_\_\_

Fréquence respiratoire \_\_ <sup>l</sup> / min Score splénique de Hackett \_\_ Oedème Yes \_\_ No \_\_

Poids \_\_ \_\_ . \_\_ kg

Autres antipaludiques: \_\_\_\_\_ Autres Traitements: \_\_\_\_\_

**Evaluation Générale J2:** Bonne /--/ Resistance R /--/ Exclusion /--/ Abandon /--/Raison d'abandon ou d'exclusion \_\_\_\_\_  

---

**J3**

Date \_\_/\_\_/\_\_/ ID no.SP \_\_\_\_\_

**Symptômes**

Fièvre \_\_ Céphalées \_\_ Dx abdominales \_\_ Vomissements \_\_ Diarrhées \_\_ Courbatures \_\_

Citez les médicaments consommés depuis votre dernière visite.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Avez-vous consommé un des médicaments ci-dessous ?

chloroquine \_\_ pyriméthamine \_\_ tétracycline \_\_ méfloquine \_\_ cotrimoxazole \_\_  
quinine \_\_ Fansidar \_\_ halofantrine \_\_ Fansimef \_\_ proguanil \_\_ Paluther \_\_ Malarial \_\_

Faites- vous des prurits après prise de SP? Yes \_\_ No \_\_

**Examen Physique**

Température \_\_ \_\_ . \_\_ °C Rash cutané Yes \_\_ No \_\_

Decrire: \_\_\_\_\_

Fréquence respiratoire \_\_ / min Score splénique de Hackett \_\_ Oedème Yes \_\_ No \_\_ Poids \_\_ \_\_ .  
\_\_ kg

Autres antipaludiques: \_\_\_\_\_ Autres Traitements: \_\_\_\_\_

**Tests de laboratoire**

FM \_\_\_\_\_ GE \_\_\_\_\_ Sang Veineux \_\_ Confettis \_\_

Hématocrit \_\_ \_\_ . \_\_ %

**Evaluation Générale J3:** Bonne /--/ Résistance R/--/ Exclusion /--/ Abandon /--/

Raison d'abandon ou d'exclusion \_\_\_\_\_

---

**NB:** Si P% sans fièvre à J3 < 25 % de P% J0 = Observation jusqu'à J7.

Si P% J3 &gt; 25% P J0 = Traitement avec Chloroquine =&gt; RIII pour Fansidar

Continuer le suivi pour le traitement Chloroquine.

Si Paludisme grave = hospitalisation

---

**J7**

Date \_\_/\_\_/\_\_ ID no.SP \_\_\_\_\_

**Symptômes**

Fièvre\_\_Céphalées\_\_Dx abdominales\_\_Vomissements\_\_Diarrhées\_\_Courbatures\_\_

Citez les médicaments consommés depuis votre dernière visite.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Avez-vous consommé un des médicaments ci-dessous ?

chloroquine\_\_pyriméthamine\_\_tétracycline\_\_méfloquine\_\_cotrimoxazole\_\_  
quinine\_\_Fansidar\_\_halofantrine\_\_Fansimef\_\_proguanil\_\_Paluther\_\_Malarial\_\_

Faites-vous des prurits après prise de SP? Yes\_\_No\_\_

**Examen Physique**

Température \_\_\_\_ . \_\_\_\_ ° Rash cutané Yes\_\_No\_\_ Decrire: \_\_\_\_\_

Fréquence respiratoire \_\_\_\_ / min Score splénique de Hackett \_\_ Oedème Yes\_\_No\_\_ Poids \_\_\_\_ .  
\_\_\_\_ kg

Autres antipaludiques: \_\_\_\_\_ Autres Traitements: \_\_\_\_\_

**Tests de laboratoire**FM \_\_\_\_\_ GE \_\_\_\_\_ Sang Veineux\_\_ Confettis\_\_ Hématocrit \_\_\_\_ . \_\_\_\_ % Hemoglobine\_\_  
\_\_\_\_g/dl**Evaluation Générale J7:** Bonne /--/ Resistance R/--/ Exclusion /--/ Abandon /--/

Raison d'abandon ou d'exclusion \_\_\_\_\_

**NB: Si P% < ¼ P J0 sans fièvre observation jusqu'a j14****Si P% < ¼ P J0 avec fièvre CAT selon jugement du clinicien****Si P% > ¼ P J0 => Traitement a la chloroquine**

Continuer le suivi pour le traitement Chloroquine.

**Si Palu grave => Hospitalisation****J14**

Date \_\_ / \_\_ / \_\_ / ID no.SP \_\_\_\_\_

**Symptômes**

Fièvre \_\_ Céphalées \_\_ Dx abdominales \_\_ Vomissements \_\_ Diarrhées \_\_ Courbatures \_\_

Citez les médicaments consommés depuis votre dernière visite.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Avez-vous consommé un des médicaments ci-dessous ?

chloroquine \_\_ pyriméthamine \_\_ tétracycline \_\_ méfloquine \_\_ cotrimoxazole \_\_  
quinine \_\_ Fansidar \_\_ halofantrine \_\_ Fansimcf \_\_ proguanil \_\_ Paluther \_\_ Malarial \_\_

Faites- vous des prurits après prise de SP? Yes \_\_ No \_\_

**Examen Physique**

Temperature \_\_\_\_\_ °C Rash cutané Yes \_\_ No \_\_

Decrire: \_\_\_\_\_

Fréquence respiratoire \_\_\_\_ / min Score splénique de Hackett \_\_ Oedème Yes \_\_ No \_\_ Poids \_\_\_\_  
\_\_ kg

Autres antipaludiques: \_\_\_\_\_ Autres Traitements: \_\_\_\_\_

**Tests de laboratoire**

FM \_\_\_\_\_ GE \_\_\_\_\_ Sang Veineux \_\_ Confettis \_\_

Hématocrit \_\_\_\_ . \_\_\_\_ % Hemoglobine \_\_\_\_ . \_\_\_\_ g/dl

Evaluation Générale J14 : Resistance R1/--/ Exclusion /--/ Abandon /--/

---

**NB: Si P% < ¼ P J0 sans fièvre observation jusqu'a J21****Si P% < ¼ P J0 avec fièvre CAT selon jugement du clinicien****Si P% > ¼ PJ0 => Traitement a la chloroquine**

Continuer le suivi pour le traitement Chloroquine.

Si Palu grave =&gt; Hospitalisation

**J21**

Date \_\_/\_\_/\_\_/ ID no.SP \_\_\_\_\_

**Symptômes**

Fièvre \_\_ Céphalées \_\_ Dx abdominales \_\_ Vomissements \_\_ Diarrhées \_\_ Courbatures \_\_

Citez les médicaments consommés depuis votre dernière visite.

\_\_\_\_\_

Avez-vous consommé un des médicaments ci-dessous ?

chloroquine \_\_ pyriméthamine \_\_ tétracycline \_\_ méfloquine \_\_ cotrimoxazole \_\_  
quinine \_\_ Fansidar \_\_ halofantrine \_\_ Fansimef \_\_ proguanil \_\_ Paluther \_\_ Malarial \_\_

Faites- vous des prurits après prise de SP? Yes \_\_ No \_\_

**Examen Physique**

Temperature \_\_ \_\_ °C Rash cutané Yes \_\_ No \_\_

Decrire: \_\_\_\_\_

Fréquence respiratoire \_\_ \_\_ / min Score splénique de Hackett \_\_ Oedème Yes \_\_ No \_\_ Poids \_\_ \_\_ .  
\_\_ kg

Autres antipaludiques: \_\_\_\_\_ Autres Traitements: \_\_\_\_\_

**Tests de laboratoire**

FM \_\_\_\_\_ GE \_\_\_\_\_ Sang Veineux \_\_ Confettis \_\_

Hematoecrit \_\_ \_\_ . \_\_ % Hemoglobine \_\_ \_\_ . \_\_ g/dl

Evaluation Générale J21 : Resistance R1/--/ Exclusion /--/ Abandon /--/

---

**NB: Si P% < ¼ P J0 sans fièvre observation jusqu'a J28****Si P% < ¼ P J0 avec fièvre CAT selon jugement du clinicien****Si P% > ¼ PJ0 => Traitement a la chloroquine**

Continuer le suivi pour le traitement Chloroquine.

**Si Palu grave => Hospitalisation****J28**

ID no.SP \_\_\_\_\_

Date \_\_/\_\_/\_\_

**Symptômes**

Fièvre\_\_Céphalées\_\_Dx abdominales\_\_Vomissements\_\_Diarrhées\_\_Courbatures\_\_

Citez les médicaments consommés depuis votre dernière visite.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Avez-vous consommé un des médicaments ci-dessous ?

chloroquine\_\_pyriméthamine\_\_tétracycline\_\_méfloquine\_\_cotrimoxazole\_\_  
quinine\_\_Fansidar\_\_halofantrine\_\_Fansimef\_\_proguanil\_\_Paluther\_\_Malarial\_\_

Faites- vous des prurits après prise de SP? Yes\_\_ No\_\_

**Examen Physique**

Temperature \_\_\_\_ . \_\_\_\_ °C Rash cutané Yes\_\_ No\_\_

Decrire: \_\_\_\_\_

Fréquence respiratoire \_\_\_\_ / min Score splénique de Hackett \_\_ Oedème Yes \_\_ No\_\_ Poids \_\_\_\_ .  
\_\_\_\_ kg

Autres antipaludiques: \_\_\_\_\_ Autres Traitements: \_\_\_\_\_

**Tests de laboratoire**

FM \_\_\_\_\_ GE \_\_\_\_\_ Sang Veineux\_\_ Confettis\_\_

Hématocrit \_\_\_\_ . \_\_\_\_ % Hemoglobine \_\_\_\_ g/dl

(Résultats FM 0-1 / hpf = 1+ 2-5 / hpf = 2+ &gt;5 / hpf = 3+)

**Evaluation Générale J...:** Bonne /--/ Resistance R1/--/ Exclusion /--/ Abandon /--/

Raison d'abandon ou d'exclusion \_\_\_\_\_

Visite imprévue 2:

ID no.SP \_\_\_\_\_

Date \_\_/\_\_/\_\_

**Symptômes**

fièvre\_\_Céphalées\_\_Dx abdominales\_\_Vomissements\_\_Diarrhées\_\_Courbatures\_\_

Citez les médicaments consommés depuis votre dernière visite.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Avez-vous consommé un des médicaments ci-dessous ?

chloroquine\_\_pyriméthamine\_\_tétracycline\_\_méfloquine\_\_cotrimoxazole\_\_  
quinine\_\_Fansidar\_\_halofantrine\_\_Fansimef\_\_proguanil\_\_Paluther\_\_Malarial\_\_

Faites- vous des prurits après prise de SP? Yes\_\_ No\_\_

**Examen Physique**

Température \_\_\_\_\_ °C Rash cutané Yes\_\_ No\_\_

Denture:\_\_\_\_\_

Fréquence respiratoire \_\_\_\_ / min Score splénique de Hackett \_\_ Oedème Yes\_\_ No\_\_ Poids \_\_\_\_ .  
\_\_ kg

Autres antipaludiques:\_\_\_\_\_ Autres Traitements:\_\_\_\_\_

**Laboratory tests**

FM \_\_\_\_\_ GE \_\_\_\_\_ Sang Veineux\_\_ Confettis\_\_

Hématocrit \_\_\_\_ . \_\_\_\_ % Hemoglobine \_\_\_\_ . \_\_\_\_ g/dl

Evaluation Générale J... Bonne /--/ Resistance R1/--/ Exclusion /--/ Abandon /--/

Raison d'abandon ou d'exclusion\_\_\_\_\_

Visite imprévue 3:

## 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 dans 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 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 leur père.

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

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