

République du Mali

Un Coup - Un But - Une Foi

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES
TECHNOLOGIES DE BAMAKO**



U.S.T.T-B

Année universitaire 2022-2023



N° : 121

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

**Nouveau test *ex-vivo* d'évaluation de l'activité
bloquante de candidats antipaludiques sur la
transmission des gamétocytes de *Plasmodium
falciparum***

Présentée et soutenue publiquement le 28 / 11 / 2023

déviant le jury de la Faculté de Pharmacie

Par : **Mme Djénèba DIALLO**

Pour obtenir le grade de docteur en pharmacie (DIPLOME D'ETAT)

JURY

Président : Pr. Boubacar TRAORE

Membre : MC. Souleymane DAMA

Membre : MC. Seidina S.A. DIAKITÉ

Membre : MC. Djénéba Koumba DABITAO

Co-directrice : Dr. Dinkorma T. OUOLOGUEM

Directeur de thèse : Pr. Abdoulaye A. DJIMDÉ

**LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE ANNEE
UNIVERSITAIRE 2022 – 2023**

ADMINISTRATION

Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur

Vice-doyen : Sékou BAH, Maître de Conférences

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable : Ismaël CISSE, Contrôleur des Finances.

PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	CISSE	Biologie
2	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
3	Daouda	SANOGO	Gestion pharmaceutique
4	Mouctar	DIALLO	Parasitologie/mycologie
5	Souleymane	DIALLO	Bactériologie/Virologie
6	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie humaine
7	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
8	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
9	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
10	Alou A.	KEÏTA	Galénique
11	Mamadou	KONE	physiologie
12	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
13	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
14	Saïbou	MAÏGA	Législation
15	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
16	Mahamadou	TRAORE	Génétique
17	Sékou Fantamady	TRAORE	Zoologie
18	Yaya	COULIBALY	Législation

PROFESSEURS DECEDES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	CISSE	Biologie
2	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
3	Moussa	HARAMA	Chimie analytique
4	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
5	Moussa	SANOGO	Gestion pharmaceutique

DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Professeur	Hématologie
2	Mahamadou	DIAKITE	Professeur	Immunologie-Génétique
3	Alassane	DICKO	Professeur	Santé Publique
4	Abdoulaye A	DJIMDE	Professeur	Parasitologie-Mycologie
5	Amagana	DOLO	Professeur	Parasitologie-Mycologie
6	Aldjouma	GUINDO	Professeur	Hématologie. Chef de DER
7	Akory Ag	IKNANE	Professeur	Santé Publique/Nutrition
8	Kassoum	KAYENTAO	Directeur de recherche	Santé Publique/ Bio-statistique
9	Ousmane	KOITA	Professeur	Biologie-Moléculaire
10	Issaka	SAGARA	Directeur de recherche	Bio-statistique
11	Ousmane	TOURE	Maître de Recherche	Santé Publique/Santé Environ.
12	Boubacar	TRAORE	Professeur	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Bourèma	KOURIBA	Maître de Conférences	Immunologie
2	Almoustapha Issiaka	MAÏGA	Maître de Recherche	Bactériologie-Virologie
3	Mahamadou S.	SISSOKO	Maître de Recherche	Bio-statistique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Maître de Conférences	Biochimie clinique
5	Djénéba Koumba	DABITAO	Maître de Conférences	Biologie Moléculaire

6	Antoine	DARA	Maître de Conférences	Biologie Moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Maître de Conférences	Parasitologie - Mycologie
8	Laurent	DEMBELE	Maître de Conférences	Biotechnologie Microbienne
9	Seidina A. S.	DIAKITE	Maître de Conférences	Immunologie
10	Fatou	DIAWARA	Maître de Conférences	Epidémiologie
11	Ibrahima	GUINDO	Maître de Conférences	Bactériologie-Virologie
12	Amadou Birama	NIANGALY	Maître de Conférences	Parasitologie - Mycologie
13	Fanta	SANGHO	Maître de Conférences	Santé Publique/Santé Commun.
14	Yéya dit Dadio	SARRO	Maître de Conférences	Epidémiologie

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Maître-Assistant	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Maître-Assistant	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Maître-Assistant	Biologie Clinique
4	Djénéba	COULIBALY	Assistant	Nutrition/Diététique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
6	Klétigui Casimir	DEMBELE	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
7	Yaya	GOÏTA	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
8	Aminatou	KONE	Maître-Assistant	Biologie Moléculaire
9	Birama Apho	LY	Maître-Assistant	Santé Publique
10	Dinkorma	OUOLOGUEM	Maître-Assistant	Biologie Cellulaire

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Cheick Amadou	COULIBALY	Attaché de Recherche	Entomologie/parasitologie
2	Michel Emmanuel	COULIBALY	Attaché de Recherche	Entomologie/parasitologie
3	Abdallah Amadou	DIALLO	Attaché de Recherche	Entomologie/parasitologie

4	Bakary	FOFANA	Attaché de Recherche	Recherche clinique
5	Merepen dit Agnès	GUINDO	Assistant	Immunologie
6	Falaye	KEÏTA	Attaché de Recherche	Santé Publique / Santé Environnement
7	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Assistant	Nutrition
8	Oumou	NIARE	Attaché de Recherche	Biologie appliquée
9	Lamine	SOUMAORO	Attaché de Recherche	Entomologie/parasitologie
10	Aliou	TRAORE	Attaché de Recherche	Sciences biologiques appliquées
11	Djakaridia	TRAORE	Assistant	Hématologie

DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	GRADE	SPECIALITE
1	Rokia	SANOGO	Professeur	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	GRADE	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Maître de Conférences	Pharmacie hospitalière
2	Mahamane	HAIDARA	Maître de Conférences	Pharmacognosie

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	GRADE	SPECIALITE
1	Bakary Moussa	CISSE	Maître-Assistant	Galénique
2	Issa	COULIBALY	Maître-Assistant	Gestion
3	Balla Fatogoma	COULIBALY	Maître-Assistant	Pharmacie hospitalière
4	Adama	DENOU	Pharmacognosie	Pharmacognosie
5	Hamma Boubacar	MAÏGA	Maître-Assistant	Galénique

6	Adiaratou	TOGOLA	Maître-Assistant	Pharmacognosie
7	Aminata	TRAORE	Assistant	Pharmacie hospitalière

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	GRADE	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Assistant	Gestion Pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Assistant	Pharmacognosie
3	Sékou	DOUMBIA	Assistant	Pharmacognosie
4	Assitan	KALOGA	Assistant	Législation
5	Ahamed	MAÏGA	Assistant	Législation
6	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Assistant	Galénique
7	Aboubacar	SANGHO	Assistant	Législation
8	Bourama	TRAORE	Assistant	Législation
9	Sylvestre	TRAORE	Assistant	Gestion Pharmaceutique
10	Aminata Tièba	TRAORE	Assistant	Pharmacie Hospitalière
11	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Assistant	Pharmacie Hospitalière

DER SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	GRADE	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Professeur	Pharmacologie
2	Benoît	KOUMARE	Professeur	Chimie Analytique
3	Ababacar I.	MAÏGA	Professeur	Toxicologie

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	GRADE	SPECIALITE
1	Tidiane	DIALLO	Maître de Conférences	Toxicologie
2	Hamadoun Abba	TOURE	Maître de Conférences	Bromatologie Chef de DER

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	GRADE	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Maître-Assistant	Pharmacie Chimique
2	Mody	CISSE	Maître-Assistant	Chimie Thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Maître-Assistant	Chimie Thérapeutique
4	Madani	MARIKO	Maître-Assistant	Chimie Analytique
5	Karim	TRAORE	Maître-Assistant	Pharmacologie

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	GRADE	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Assistant	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Assistant	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOOU	Assistant	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Assistant	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARRA	Assistant	Toxicologie

6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Assistant	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Assistant	Chimie Analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Assistant	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Assistant	Chimie Analytique

DER : SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NON	GRADE	SPECIALITE
-	-	-	-	-

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NON	GRADE	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Maître de Conférences	Chimie appliquée
2	Abdoulaye	KANTE	Maître de Conférences	Anatomie
3	Boubacar	YALCOUYE	Maître de Conférences	Chimie Organique

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NON	GRADE	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Maître-Assistant	Botanique-Biologie Végétale Chef de DER
2	Boureima	KELLY	Maître-Assistant	Physiologie Médicale

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NON	GRADE	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Assistant	Chimie Organique
2	Modibo	DIALLO	Assistant	Génétique
3	Moussa	KONE	Assistant	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Assistant	Biologie Entomologie

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NON	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYAKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba M	COULIBALY	Droit Commercial
5	Moussa I	DIARRA	Biophysique
6	Mahamoudou	KONE	Droit et éthique
7	Satigui	SIDIBE	Pharmacie Vétérinaire
8	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
9	Fana	TANGARA	Mathématiques
10	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie Médicale
11	Oumar	SAMASSEKOU	Génétique
12	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

DEDICACES ET REMERCIEMENTS

DEDICACES

Je rends grâce à Dieu le tout Puissant, l'Omniscient, l'Être Suprême, l'Eternel, le Possesseur de tout, de Qui tout provient et vers Qui tout retourne et au prophète Mohamed paix et salut sur lui. Merci de m'avoir accompagné tout au long de ce chemin, en me guidant, en m'accordant la force, le courage, la santé, la patience pour la réalisation de ce modeste travail.

Je dédie ce travail à :

- ❖ **Mon père Souleymane et ma mère Aïssatou DIALLO**, vous m'avez donné la vie, vous m'avez éduqué et toujours soutenu. À vos côtés je n'ai jamais manqué d'attention, d'affection, de conseils et d'encouragement, je suis qui je suis grâce à vous, je vous en remercie. Je ferai tout ce qu'il faut pour que vous soyez toujours fiers de moi, je vous adore. Qu'Allah vous donne santé et longévité. Amen !
- ❖ **Papa Boubacar DIALLO**, vous m'avez montré le bon chemin grâce à vos conseils, votre soutien et vos encouragements depuis que j'étais toute petite. Merci infiniment pour tout. Que le tout puissant vous donne santé et longévité. Amen !

REMERCIEMENTS

- ❖ **A mes frères et sœurs**, Fatoumata, Alpha, Hawa, Souleymane, Thierno Amadou. Avec vous je me suis toujours sentie aimer et soutenue, je vous serai éternellement reconnaissante. Je vous adore ! Puisse Allah renforcer nos liens de fraternité et nous donner santé et longévité dans la piété. Amen !
- ❖ **A mon cher époux**, ta présence dans ma vie n'a été que source de bonheur. Merci pour ton soutien, ton encouragement, l'attention et tout l'amour que tu me portes. Je t'aime infiniment ! Puisse Allah bénir notre union et nous donner santé et longévité. Amen !
- ❖ **A mes enfants : Alpha Oumar et Souleymane**, votre arrivée a changé ma vie de façon positive, vous me donnez le courage et la force de surmonter les obstacles de la vie. Vous me redonnez le sourire même dans les moments les plus difficiles, je vous adore. Qu'Allah vous bénisse et vous donne santé et longévité. Amen !
- ❖ **A ma belle-sœur Sitan Sidibé**, tu m'apportes de l'aide lorsque j'en avais besoin sans rien attendre au retour. Je t'en remercie et je te suis profondément reconnaissante. Qu'Allah bénisse votre union avec mon frère et te donne santé et longévité. Amen !
- ❖ **A mes oncles et tantes**, Tidiane TRAORE, Feu Ousmane DIALLO dit Anthiou, Mohamed DIALLO, Rokia DIARRA, Maridja DIALLO. Merci pour les soins, les conseils et la protection que vous m'avez donné. Trouvez ici ma profonde gratitude. Puisse Dieu vous donner santé et longévité. Amen !
- ❖ **A mes cousins**, Ibrahima BARRY, Amadou DIALLO, Madou COULIBALY, Chiaka COULIBALY, Silamakan Kane DIALLO, Sadio Ibrahim Kane DIALLO. Vous avez toujours répondu présents lorsque j'exprimais un besoin, votre présence dans ma vie a été un grand atout. Qu'Allah vous récompense et vous donne santé et longévité. Amen !
- ❖ **A mes amis**, Dr TRAORE Yacouba, Fatoumata Be DIAKITE, Dr TOURE Abdoul Kader, Dr DIARRA Youssouf, Dr DIA Allaye, Hadiya KONATE. Vous m'avez tenu compagnie dans les moments difficiles et vous me redonnez le sourire chaque fois que vous me voyiez triste. Vous avez aussi été toujours source de bons conseils. Merci pour tout et qu'Allah fortifie ce lien d'amitié. Amen !
- ❖ **Au corps professoral de la Faculté de Pharmacie (FAPH)**, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu.
- ❖ **Au personnel du MRTC/DEAP**, Pour votre disponibilité et votre franche collaboration.

- ❖ **A nos maîtres du MRTC**, Pour votre engagement et votre souci constant pour une formation de qualité.
- ❖ **A toute l'équipe de MEDRU du MRTC/DEAP**, Particulièrement aux Professeurs Abdoulaye DJIMDE, Souleymane DAMA, Amadou NIANGALY, Laurent DEMBELE, Antoine DARA, aux Docteurs Mamadou TEKETE, Dinkorma OUOLOGUEM, Bakary FOFANA, Nouhoum DIALLO, Aminatou KONE, Nianwalou DARA, Amadou BAMADIO, Aly KODIO, Bilaly TRAORE, Fatoumata I Ballo, Sekou SISSOKO, Aliou TRAORE, Fatalmoudou TANDINA, Fatoumata MAIGA, Fanta SOGORE, Mohamed MAIGA, Yacouba Nani BARRE, Amadou DAOU, Hamed KONATE, Fatoumata CISSE, Souleymane Babouya KONE, aux Mrs. Abdoul Karim SAMAKE, Ousmaïla DIAKITE, Mohamed TOURE, Pour le soutien dont vous avez fait preuve tout au long de ce modeste travail. Nous vous serons toujours reconnaissante.

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et président du jury :

Pr. Boubacar Traoré

- **Professeur titulaire en Parasitologie-Mycologie à la FAPH**
- **Directeur scientifique de l'unité Paludisme/grossesse et Immuno-pathologie parasitaire du MRTC/ICER**
- **Doyen de la faculté de Pharmacie**

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Vos admirables qualités scientifiques, sociales, morales font de vous un maître exemplaire.

Cher maître, permettez-nous de vous exprimer notre profonde gratitude.

Qu'Allah vous accorde santé et longévité. Amen !

A notre maître et membre du jury

Mc. Souleymane DAMA

- **Maître de conférences de Parasitologie-mycologie à la FAPH**
- **Spécialiste en Pharmacologie préclinique et clinique**
- **Enseignant-chercheur à la FAPH**

Cher Maître,

Nous avons beaucoup appris de vos valeurs humaines et scientifiques. Votre contribution nous a été d'un grand atout pour la réalisation de ce travail. Nous ne saurions être assez reconnaissant pour toute la considération que vous avez portée à ce travail. Recevez ici nos sincères remerciements.

Puisse Dieu vous donner santé et longévité afin que plusieurs générations d'apprenants puissent bénéficier de la qualité de votre enseignement. Amen !

A notre maître et membre du jury

Mc. Seidina A.S. DIAKITE

- **Maître de conférences en immunologie à la FAPH/ USTTB**
- **Enseignant-Chercheur à la FAPH**

Cher Maître,

Nous avons admiré votre disponibilité constante, votre rigueur scientifique, vos qualités sociales, votre sens du partage, surtout votre modestie qui font de vous un exemple à suivre.

Merci d'avoir contribué à l'amélioration de ce modeste travail.

Que Dieu vous donne une longue vie pleine de sante. Amen !

A notre maître et membre du jury

Mc. Djénéba Koumba DABITAO

- **Docteur en Pharmacie**
- **Spécialiste en Biologie Moléculaire et en Immunologie**
- **Maître de conférences à la faculté de pharmacie**
- **Cheffe du Laboratoire ImmunoCore du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) de l'USTT-B**

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Vos qualités humaines et scientifiques font de vous un maître apprécié et respecté de tous. Trouvez ici cher maître l'expression de nos sincères remerciements.

Que Dieu vous donne santé et longévité. Amen !

A notre maître et codirectrice de thèse

Dr. Dinkorma T. OUOLOGUEM

- **Maître assistant en Biologie cellulaire à la FAPH**
- **Chercheur au MRTC/Parasitologie**

Cher Maître,

Ce travail est avant tout le fruit de vos efforts. Nous avons apprécié vos qualités sociales et scientifiques tout au long de ce travail. Votre patience et votre amour pour le travail bien fait font de vous un maître respecté et admiré. Avec vous, nous avons été confiante, écoutée, soutenue et conseillée de la plus belle manière. Cher maître, sachez que vous êtes une référence pour nous et recevez ici l'expression de notre profond respect et de nos sincères remerciements. Qu'Allah vous accorde santé et longévité. Amen !

A notre maitre et directeur de thèse

Pr. Abdoulaye A. DJIMDE

- **Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FAPH**
- **Directeur du MRTC Parasitologie**
- **Chef de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance**
- **Directeur du Programme DELGEME**
- **Membre de l'Académie Malienne des Sciences**
- **Membre de l'Académie Africaine des Sciences**

Cher Maître,

C'est une grande joie pour nous de vous avoir comme directeur de thèse.

Malgré vos multiples occupations vous avez accepté de diriger ce travail, Soyez-en remercié.

Nous espérons que cet humble travail sera à la hauteur de vos espérances.

Cher maître, veuillez trouver ici, l'expression de notre profond respect.

Qu'Allah vous accorde santé et longévité. Amen !

SIGLES ET ABREVIATIONS

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ACD	: Acid-Citrate-Dextrose
ACM	: Albumax Culture Media (milieu de culture à base d'Albumax)
ADN	: Acide désoxyribo- nucléique
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CI ₅₀	: Concentration inhibitrice médiane
CPM	: Coups par minute
CQ	: Chloroquine
CPS	: Chimio prévention du Paludisme Saisonnier
CTA	: Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
DEAP	: Département d'Épidémiologie des Affections Parasitaires
DHA	: Dihydroartémisinine
DSFA	: Direct skin feeding assay, « <i>test de repas sanguin direct sur la peau</i> » en français
DMFA	: Direct membrane feeding assay « <i>test de repas sanguin direct sur membrane artificielle</i> » en français
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
FM	: Frottis Mince
FAPH	: Faculté de Pharmacie
G6PD	: Glucose-6 Phosphate –Déshydrogénase
GE	: Goutte Épaisse
GTP	: Guanosine triphosphate
LAMP	: Loop-mediated isothermal Amplification
LAV	: Lutte anti-vectorielle
LDH	: Lactate Déshydrogénase
MCA	: Milieu de culture à Albumax
MEDRU	: Molecular Epidemiology and Drug Resistance Unit « Unité d'Épidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance » en français
MRTC	: Malaria Research and Training Center, « <i>Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme</i> » en français
ONG	: Organisation Non Gouvernementale
ORY	: Oryzalin
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCR	: Polymerase Chain Reaction, « <i>Réaction de Polymérisation en Chaîne</i> » en français
PL ₄ K	: Phosphatidylinositol 4-Kinase
PKG	: Protéine kinase G
<i>PfEMP1</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein 1
PfATP4	: <i>Plasmodium falciparum</i> ATPase 4
PRQ	: Primaquine
<i>P. falciparum</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	: <i>Plasmodium malariae</i>

<i>P. ovale</i>	: <i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	: <i>Plasmodium vivax</i>
PNLP	: Programme National de Lutte contre le Paludisme
QBC	: Quantitative Buffy Coat
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medium
RAVEC	: Recensement Administratif à Vocation d'Etat Civil
RBC	: Red Blood Cell
SDRA	: Syndrome de Détresse Respiratoire Aigue
SPAQ	: Sulfadoxine-pyriméthamine + amodiaquine
SMFA	: Standard membrane feeding assay
SCM	: Serum culture media (Milieu de culture au sérum)
SACM	: Serum-Albumax culture media (Milieu de culture au serum + albumax)
SR	: Serum Replacement (<i>Remplacement de Sérum</i> en français)
TBA	: Transmission blocking activity (<i>Activité de blocage de la transmission</i> en français)
TDR	: Test de Diagnostic Rapide
TPI	: Traitement préventif intermittent
WB	: Whole Blood, (<i>Sang Total</i> en français)

Liste des tableaux :

Tableau I : Composition des milieux de culture testés pour la conservation <i>ex vivo</i> d'isolats de gamétocytes de terrain	38
Tableau II: Répartition des donneurs en fonction des milieux de culture	47
Tableau III : Récapitulatif de l'infestation expérimentale pour le maintien <i>ex vivo</i> de 24 heures.....	49
Tableau IV : Récapitulatif de l'infestation expérimentale pour l'évaluation du milieu SCM pendant 48 heures	51
Tableau V: Récapitulatif de l'infestation expérimentale après 48 heures d'exposition aux antipaludiques de référence	53
Tableau VI : Récapitulatif de l'infestation expérimentale après 48 heures d'exposition aux molécules candidates antipaludiques.....	55

Liste des figures :

Figure 1: Distribution des vecteurs du paludisme au Mali	8
Figure 2 : Le cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i>	10
Figure 3: Structure, formule et classification chimique de la choroquine, de l'amodiaquine et de la pipéraqine.....	19
Figure 4: Structure et formule chimique des amino-alcools.....	20
Figure 5: Structure et formule chimique des antifoliniques et des antifoliques	21
Figure 6 : Structure et formule chimique de la primaquine, de la tafénoquine et de la pyronaridine.....	22
Figure 7: Structure et formule chimique de l'artémisinine et ses dérivés	23
Figure 8: Structure, formule et classification chimique de KDU-691.....	24
Figure 9: Structure, formule et classification chimique du GNF-179	25
Figure 10: Structure, formule et classification chimique du KAF-246.....	26
Figure 11: Structure, formule et classification chimique de la cabamiquine	27
Figure 12: Carte du Mali avec le site d'étude.....	32
Figure 13: Les grandes étapes des analyses expérimentales	35
Figure 14: Procédures expérimentales d'utilisation des prélèvement veineux sur héparine lithium pour l'évaluation de l'infectiosité initiale	37
Figure 15: Procédures expérimentales pour évaluer les milieux de culture	40
Figure 16: Profil de l'étude.....	46
Figure 17: Infectiosité des gamétocytes avant (initiale) et 24 heures après maintien dans différents milieux.....	50
Figure 18: Infectiosité des gamétocytes avant (initiale) et 48 heures après maintien dans le milieu SCM	52
Figure 19: Infectiosité des gamétocytes après exposition <i>ex vivo</i> aux antipaludiques de référence	54
Figure 20 : Infectiosité des gamétocytes 48 heures après exposition <i>ex vivo</i> aux molécules candidates antipaludiques	56
Figure 21 : Organigramme du plan d'expérience pour l'évaluation <i>ex vivo</i> de la viabilité et de l'infectiosité des gamétocytes isolés sur le terrain.....	57

Table des matières

1. Introduction.....	2
2. Objectifs.....	5
2.1. Objectif general	5
2.2. Objectifs specifiques	5
3. Generalites	7
3.1. Historique du paludisme.....	7
3.2. Épidemiologie	8
3.2.1. Le vecteur	8
3.2.2. Le parasite.....	9
3.3. Cycle biologique du plasmodium.....	9
3.3.1. Cycle asexue chez l’homme (schizogonie).....	9
3.3.1.1.Phase hepatiche ou exo-erythrocytaire.....	9
3.3.1.2.La phase erythrocytaire et replication asexuee.....	10
3.3.1.3.La phase erythrocytaire et la gametocytogenese	11
3.3.2. Cycle sexue chez le moustique (sporogonie).....	12
3.4. Physiopathologie du paludisme.....	12
3.4.1. Acces palustre non complique	12
3.4.2. Neuropaludisme	12
3.5. Manifestations cliniques.....	13
3.5.1. Paludisme de primo-invasion	13
3.5.2. Acces de reviviscence.....	13
3.5.3. Paludisme visceral evolutif :.....	14
3.5.4. La fievre bilieuse hemoglobinurique :.....	14
3.5.5. Le neuropaludisme et les autres formes graves et compliquees	14
3.6. Diagnostic biologique :	15
3.6.1. Diagnostic biologique indirect.....	15
3.6.2. Diagnostic biologique direct.....	15
3.7. Strategies de lutte contre le paludisme	16
3.7.1. La prise en charge des cas de paludisme simple et grave.....	16
3.7.2. Les mesures preventives	17
3.7.2.1.La prevention du paludisme pendant la grossesse.....	17
3.7.2.2.La chimio prevention du paludisme saisonnier :.....	17
3.7.3. La lutte antivectorielle	17

3.8. Les antipaludiques	17
3.9. Nouvelles molecules antipaludiques :	18
3.9.1. Les imidazopyrazines (kdu691) :	24
3.9.2. Les imidazolopiperazines (gnf-179) :	24
3.9.3. Les spiroindolones (kaf246)	25
3.9.4. Les quinoleines-4-carboxamides (cabamiquine) :	26
3.10. Les methodes d'etudes de l'activite des antipaludiques	27
3.10.1. Test <i>in vivo</i>	27
3.10.2. Tests <i>in vitro</i>	28
3.10.3. Tests <i>ex vivo</i>	29
3.11. Les methodes d'etudes de la transmission palustre	29
4. Methodologie	32
4.1. Lieu d'etude et choix du site d'etude	32
4.2. Type d'etude	33
4.3. Periode d'etude	33
4.4. Population d'etude	33
4.4.1. Criteres d'inclusion	33
4.4.2. Criteres de non-inclusion	33
4.5. Identification des porteurs de gametocytes de <i>p. Falciparum</i>	34
4.6. Prelevement sanguin chez les patients inclus pour les experiences de laboratoire	34
4.7. Determination des conditions optimales pour maintenir viables et infectieux les gametocytes isoles sur le terrain	36
4.7.1. Traitement des echantillons de sang pour l'evaluation de l'infectiosite initiale des gametocytes isoles sur le terrain par dmfa	36
4.7.2. Milieux pour le maintien et la manipulation <i>ex vivo</i> de gametocytes collectes chez les participants	38
4.7.3. Évaluation <i>ex vivo</i> des milieux de culture	39
4.7.4. Test d'infestation directe sur membrane (dmfa)	41
4.8. Évaluation <i>ex vivo</i> de l'activite bloquante des antipaludiques de reference et des molecules candidates sur la transmission des gametocytes	41
4.9. Analyse des donnees	43
prise en charge des participants de l'etude	43
4.10. Considerations ethiques et deontologiques	43
5. Resultats	46

5.1. Profil de l'étude	46
5.2. Détermination des conditions optimales pour maintenir viables et infectieux les gametocytes isolés sur le terrain	49
5.2.1. Évaluation des milieux de culture scm, acm et sacm pendant 24 heures	49
5.2.1.1. Recapitulatif de l'infestation expérimentale pour le maintien <i>ex vivo</i> de 24 heures.....	49
5.2.1.2. Infectiosité des gametocytes avant (initiale) et 24 heures après maintien dans différents milieux.....	50
5.2.2. Évaluation du milieu de culture scm pendant 48 heures	51
5.2.2.1. Recapitulatif de l'infestation expérimentale pour l'évaluation du milieu scm pendant 48 heures.....	51
5.2.2.2. Infectiosité des gametocytes avant (initiale) et 48 heures après maintien dans le milieu scm	52
5.3. Mesure <i>ex vivo</i> de l'activité bloquante des antipaludiques de référence sur la transmission des gametocytes.....	53
5.3.1. Recapitulatif de l'infestation expérimentale après 48 heures d'exposition aux antipaludiques de référence	53
5.3.2. Infectiosité des gametocytes 48 heures après exposition <i>ex vivo</i> aux antipaludiques de référence.....	54
5.4. Mesure <i>ex vivo</i> l'activité bloquante des molécules candidates sur la transmission des gametocytes	55
5.4.1. Recapitulatif de l'infestation expérimentale après 48 heures d'exposition aux molécules candidates antipaludiques.....	55
5.4.1.1. Infectiosité des gametocytes 48 heures après exposition <i>ex vivo</i> aux molécules candidates antipaludiques	56
5.5. Organigramme expérimental du nouveau test <i>ex-vivo</i> d'évaluation de l'activité bloquante de candidats antipaludiques sur la transmission des gametocytes de <i>plasmodium falciparum</i>	57
6. Discussion.....	60
8. Conclusion	64
10. Référence.....	68

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Le paludisme demeure un problème majeur de santé publique et il est endémique dans au moins 84 pays du monde. Selon le rapport de l'organisation mondiale de la santé (OMS) publié en 2022, il y'a eu 247 millions de cas de paludisme dans le monde, dont 95 % survenus en Afrique au Sud du Sahara (1). Les enfants de moins de 5 ans sont les plus vulnérables. Les moyens de lutte contre le paludisme ont considérablement évolué au cours des 15 dernières années, tant au niveau individuel qu'au niveau collectif (communautaire). Les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA), associées à l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide, la chimio-prévention du paludisme saisonnier (CPS), les traitements préventifs intermittents ont contribué à réduire de façon impressionnante la transmission du paludisme dans le monde (2). Cependant, malgré ces progrès considérables, le paludisme reste la principale cause de mortalité et de morbidité dans les pays endémiques (1). L'élimination du paludisme nécessite de nouvelles stratégies telles que l'interruption de la transmission entre l'homme et le vecteur anophèle femelle.

La transmission du parasite de l'homme au vecteur anophèle est assurée par les gamétocytes, les seules formes sexuées du parasite chez l'homme capables d'évoluer chez le moustique après le repas sanguin pour devenir des formes infectantes (les sporozoïtes). Une des approches prometteuses de la lutte contre le paludisme consiste à bloquer la transmission des gamétocytes viables de l'hôte humain aux vecteurs. Ainsi plusieurs molécules antipaludiques, déjà disponibles ou en cours de développement, ont été investiguées pour leur activité gamétocytocide. Les composés dérivés de l'artémisinine sont actifs sur les stades asexués du *Plasmodium* et ont peu ou pas d'action sur les gamétocytes matures. Ainsi, les gamétocytes peuvent persister dans le sang plus de deux semaines après le traitement et peuvent être transmis ultérieurement. D'autres molécules comme la primaquine et la tafénoquine sont reconnues actifs contre les gamétocytes matures. Toutefois, l'utilisation de ces médicaments est limitée par leur toxicité hémolytique observée chez les patients présentant un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), une maladie génétique dont la prévalence est élevée dans les régions où le paludisme est endémique (3–5).

Des recherches sont en cours pour découvrir de nouveaux médicaments capables de cibler efficacement les gamétocytes de *Plasmodium* (6–8). De nouvelles classes de composés, y compris les spiroindolones (KAF246), les imidazolopipérazines (GNF179), les imidazopyrazines (KDU691) et les quinoléines-4-carboxamides (DDD107498) ont montré

de puissantes activités de blocage de la transmission *in vitro* et *in vivo* comme d'autres molécules étroitement apparentées (KAE609 ou cipargamine, KAF156) ont fait l'objet d'essais cliniques (9–15).

La découverte et le développement de thérapies fiables et efficaces bloquant la transmission nécessitent des essais biologiques standard et reproductibles pour mesurer de manière fiable les propriétés de blocage. Plusieurs techniques expérimentales sont actuellement disponibles pour évaluer l'activité gamétocytocide des molécules (16–21). Ces méthodes expérimentales mesurent principalement l'activité de blocage sur la transmission des molécules *in vitro* en utilisant des parasites adaptés au laboratoire qui sont génétiquement identiques. L'utilisation de parasites adaptés au laboratoire est très utile pour les études préliminaires d'évaluation de l'effet antipaludique. Cependant ces méthodes peuvent donner des résultats très éloignés des réalités de terrain à cause de l'induction des mutations génétiques par les conditions d'adaptation des parasites (22). Ainsi nous avons émis l'hypothèse que les gamétocytes présents chez des patients asymptomatiques pourraient être directement utilisés pour évaluer en *ex vivo* l'activité bloquante de nouveaux candidats antipaludiques.

Nous nous proposons de développer un nouveau protocole permettant d'évaluer *ex vivo* l'activité bloquante de molécules sur la transmission des gamétocytes de *P. falciparum* isolés chez des patients asymptomatiques.

La mise en place de ce nouveau protocole pourrait, d'une part, accélérer la découverte de nouveaux antipaludiques à propriétés gamétocytocides bloquant la transmission, d'autre part, cette approche *ex vivo* pourrait aider dans la sélection et l'avancer d'un composé lors de son développement.

.

OBJECTIFS

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif général

Développer un nouveau protocole pour l'évaluation *ex-vivo* de l'activité bloquante de candidats antipaludiques sur la transmission d'isolats cliniques de gamétocytes de *Plasmodium falciparum*.

2.2. Objectifs spécifiques

1. Déterminer la condition optimale pour maintenir viables et infectieux les gamétocytes isolés chez des patients asymptomatiques ;
2. Mesurer *ex vivo* l'activité bloquante des antipaludiques de référence sur la transmission des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* aux anophèles ;
3. Mesurer l'activité bloquante des molécules candidates sur la transmission.

GENERALITES

3. GENERALITES

3.1. Historique du paludisme

L'origine géographique du paludisme est controversée et se perd dans la nuit des temps. Il fait partie des plus vieilles affections de l'humanité et des indices suggèrent que l'homme préhistorique en était atteint (23). On trouve ainsi dans les anciens manuscrits chinois et égyptiens, de même que dans la littérature grecque et romaine, des témoignages relatifs aux fièvres épidémiques dont les signes ressemblent beaucoup à ceux du paludisme. Mais il a fallu attendre 1717 pour que Giovanni Lancisi attribue cette maladie aux émanations nocives des marais, d'où le nom malaria, de l'italien « malaria » ou air vicié ; puis enfin 1880 pour que Docteur Alphonse Laveran, un médecin de l'armée française, soit témoin de l'exflagellation d'un gamétocyte mâle lors de l'observation au microscope d'échantillons de sang de patients impaludés (24). Deux ans plus tard précisément en 1882 l'hypothèse de la transmission du paludisme par le moustique était déjà émise. Cette hypothèse fut confirmée en 1897 par Ronald Ross qui fit la découverte de l'importance du moustique dans le cycle de vie du paludisme aviaire et décrivit des kystes paludéens dans les parois de l'estomac d'*Anopheles*. En 1898, Grassi décrivit le cycle de transmission complet du parasite et prouva que le paludisme observé chez l'homme est transmis par des moustiques du genre *Anopheles*. La nomenclature concernant les différents stades de développement du parasite sera publiée en 1900 par Schaudinn. Successivement, furent mis en évidence les espèces *P. vivax* (Grassi et Leletti, 1890) ; *P. malariae* (Laveran, 1891) et *P. ovale* (Stephens, 1992) et *P. falciparum* (Welch, 1897). Les dégâts causés par le paludisme pendant la première guerre mondiale vont susciter la recherche et la mise à disposition des nouvelles molécules antipaludiques telles que les dérivés des amino-8-quinoléines, des amino-9-acridines et des amino-4-quinoléines dont la plus représentative est la chloroquine (25). La chloroquine sera ensuite largement utilisée aussi bien en traitement curatif qu'en prophylaxie jusqu'à ce que l'OMS ait lancé en 1950 un programme d'éradication du paludisme à l'échelle mondiale : " le monde unit contre le paludisme". C'est ainsi qu'il y a eu le développement de nombreux antipaludiques de synthèses dont les plus connus sont l'amodiaquine, la pyriméthamine, le cycloguanil et le proguanil. L'activité antiplasmodique de l'extrait d'*Artemisia annua L.* dont le principe actif est l'artémisinine a été mis en évidence en 1971 (25). Malgré l'isolement de deux alcaloïdes fondamentaux des écorces de quinquina (quinine et cinchonine) en 1920 par Pelletier et Caventou, l'OMS met fin à son programme mondial d'éradication du paludisme à cause de son échec, car l'enthousiasme thérapeutique était menacé dès le début des années 60 par des

premiers cas de résistance à la chloroquine. La Méfloquine et l'Halofantrine ont été découvertes par l'armée américaine à la suite d'un vaste programme de criblage entrepris après l'échec du programme mondial d'éradication et des nombreux cas de paludisme parmi les troupes américains envoyées au Vietnam. Ces molécules seront plus tard développées par les firmes pharmaceutiques.

3.2. Épidémiologie

3.2.1. Le vecteur

Le paludisme humain est transmis par des moustiques appartenant à l'embranchement des Arthropoda, à la classe des Insecta, à la sous-classe Pterygota, à l'ordre des Diptera, au sous-ordre des Nematocera, à la famille des Culicidae, à la sous-famille des Anophelinae et au genre *Anopheles*. Ce genre regroupe environ 480 espèces de moustiques dont 80 seulement sont capables de transmettre le paludisme ; 15 de celles-ci sont considérées comme vecteurs majeurs du paludisme (26). Au Mali, les espèces de moustique responsable de la transmission du paludisme sont *Anopheles gambiae s.l.*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles coluzzii*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles funestus s.l.* (27,28). Les vecteurs du paludisme sont réparties entre les zones éco-climatiques selon quatre faciès épidémiologiques qui sont la zone désertique, la zone sahélienne, la zone soudanienne et la zone guinéenne (Figure 1) (27).

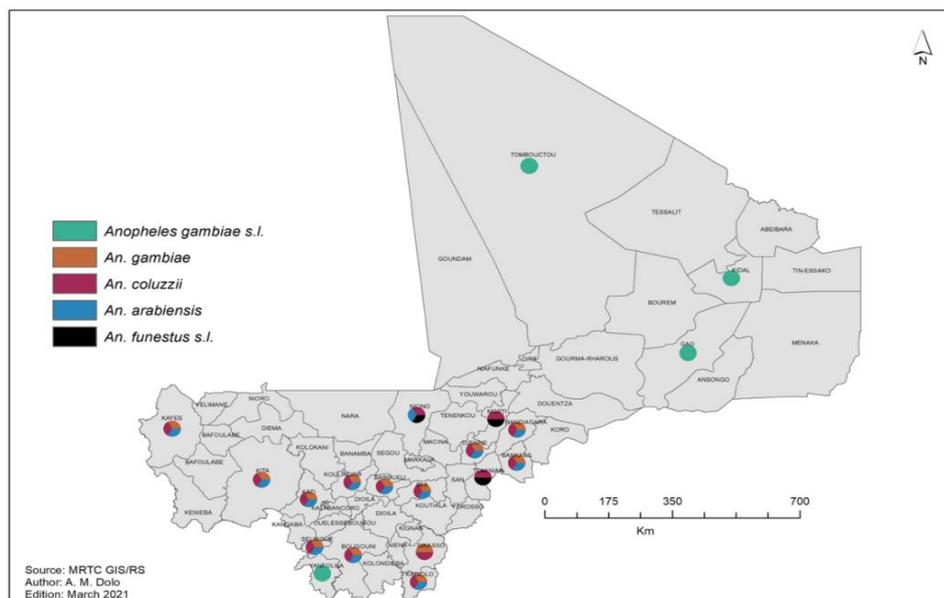


Figure 1: Distribution des vecteurs du paludisme au Mali

Les schémas sectoriels montrent la présence de différentes espèces vectrices au Mali de 2010 à 2019. (Cissoko M. et al.;2022(27))

3.2.2. Le parasite

Le paludisme est dû à un protozoaire appartenant à l'embranchement des Apicomplexa, à la classe des sporozoaires, à l'ordre des eucoccidies, à la famille des plasmodidae et au genre *Plasmodium*. Six espèces plasmodiales sont connues comme agents pathogènes pour l'homme :

–*Plasmodium falciparum* : responsable de la fièvre tierce maligne, très fréquente en Afrique (98% des cas de paludisme en Afrique).

–*Plasmodium vivax* : responsable de la fièvre tierce bénigne.

–*Plasmodium ovale wallikeri* : responsable de la fièvre tierce bénigne.

–*Plasmodium ovale curtisi* : responsable de la fièvre tierce bénigne.

–*Plasmodium malariae* : responsable de la fièvre quarte bénigne.

–*Plasmodium knwolesi* : responsable de la fièvre quarte.

Au Mali, les principales espèces rencontrées sont *P. falciparum* (plus de 85 % des parasites), *P. malariae* (10-15 %), *P. ovale* (1 %) (28), et des cas de *P. vivax* ont été observés et documentés (29,30).

3.3. Cycle biologique du Plasmodium

Le cycle évolutif de *Plasmodium* se déroule chez deux hôtes : un hôte intermédiaire (vertébrés) où a lieu une phase de multiplication asexuée ou schizogonie et l'hôte définitif (Moustique) où a lieu une phase de différenciation sexuée (figure 2).

3.3.1. Cycle asexué chez l'homme (schizogonie)

3.3.1.1. Phase hépatique ou exo-érythrocytaire

Cette phase commence chez l'homme par l'inoculation des sporozoïtes contenus dans la glande salivaire de l'Anophèle femelle infestée lors du repas sanguin. La survie des sporozoïtes dépend de leur capacité à migrer sur des distances considérables et différents tissus de plusieurs micromètres en quelques minutes pour finalement atteindre une cellule hépatique parenchymateuse, la cellule cible appropriée où se transforme et se réplique le parasite (31). Une fois à destination, les sporozoïtes pénètrent l'hépatocyte par invagination et établissent la vacuole parasitophore. La vacuole parasitophore protège le parasite du cytosol de l'érythrocyte (32). Les sporozoïtes se transforment en trophozoïtes qui se divisent pour former des schizontes hépatiques. Après 12 jours environ, le schizonte éclate et libère des mérozoïtes qui migreront via la voie sanguine vers les hématies amorçant ainsi la phase

érythrocytaire. Lors de l'infection par *P. ovale* et *P. vivax*, une partie des sporozoïtes hépatiques reste sous forme quiescente uni nucléée dans les hépatocytes, appelées hypnozoïtes (33). Ces formes sont à l'origine des rechutes observées lors d'infections par ces deux espèces.

3.3.1.2. La phase érythrocytaire et réplication asexuée

Cette phase commence par l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes hépatiques libérés dans le sang (34). Après l'infestation de l'hématie, le parasite, entouré d'une vacuole parasitophore, se développe en anneau, puis en trophozoïte. A l'intérieur de l'hématie, le parasite se multiplie de façon asexuée conduisant à la formation de schizontes érythrocytaires.

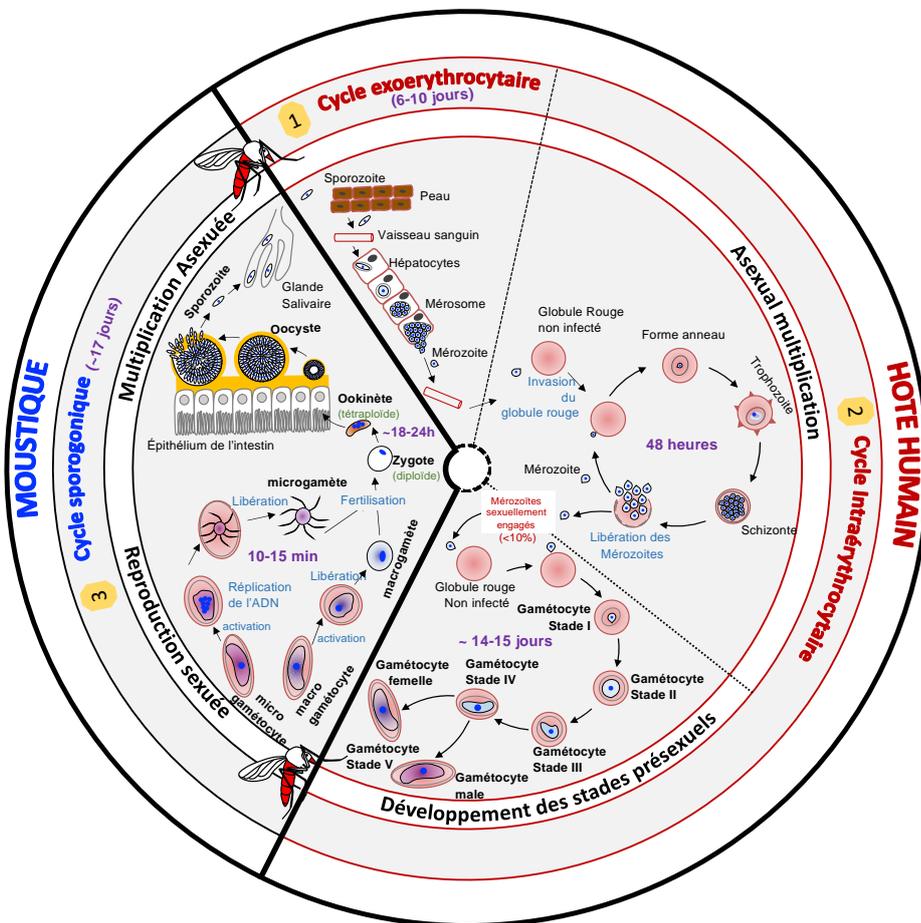


Figure 2 : Le cycle de vie de *Plasmodium falciparum*

(Image adaptée de [Ouologuem et al. 2023](#) (35))

La rupture de la membrane de l'hématie par le schizonte mature (stade en rosette) libère 8 à 32 mérozoïtes dans le sang. Ces mérozoïtes infectent de nouvelles hématies (dans un délai de 15 à 30 mn) réalisant ainsi un nouveau cycle schizogonique érythrocytaire (qui dure 48 heures chez *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax*, et 72 heures chez *P. malariae*). Les signes pathologiques de la maladie sont généralement détectés au cours de la schizogonie érythrocytaire : l'éclatement des globules rouges contenant les schizontes matures libère outre les mérozoïtes, de l'hémozoïne (pigment malarique provenant de la dégradation de l'hémoglobine) et des substances toxiques inductrices des accès fébriles caractéristiques de la maladie. Certains mérozoïtes se développent en trophozoïtes qui se différencient en gamétocytes mâles et femelles (formes sexuées du parasite) qui sont les seules formes infectieuses pour le moustique. Ces gamétocytes n'entraînent aucun symptôme et leur durée de vie dans la circulation sanguine est estimée à 3-4 semaines (36).

3.3.1.3. La phase érythrocytaire et la gamétocytogénèse

Les gamétocytes sont des stades observés dans la circulation sanguine chez l'homme. Les gamètes proprement dits sont observés chez le moustique et résultent de l'activation des gamétocytes ingérés lors du repas sanguin. La morphologie des gamétocytes varie selon les espèces de *Plasmodium*. Alors que les gamétocytes matures de *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* et *P. knowlesi* possèdent une forme ronde à ovale, *P. falciparum* adopte une forme de croissant ou de falciforme à maturité (37,38). Le nom *P. falciparum* fait référence à la forme en croissant ou falciforme des stades matures de ses gamétocytes. Au cours de son développement, le gamétocyte de *P. falciparum* passe par 5 stades morphologiquement distincts (I – V). Les premières observations sur la morphologie des gamétocytes de *P. falciparum* ont été faites dans les années 1950, et ont permis de définir les cinq stades de développement (39). Plus tard, en utilisant des approches de microscopie optique et électronique, les formes et les temps d'apparition des différents stades ont été déterminés (40). Des études ont montré que les stades I-IV sont séquestrés dans la moelle osseuse, tandis que les stades V circulent dans les vaisseaux sanguins périphériques (41). Le gamétocyte de stade I a une forme arrondie, semblable au jeune trophozoïte asexué. Au stade II tardif, le parasite commence à s'allonger en forme de D. Les gamétocytes de stade III adoptent une forme déformant légèrement le globule rouge en raison de l'allongement supplémentaire du parasite. Au stade IV, il est possible de distinguer les gamétocytes mâles et femelles. Les deux sexes ont un format mince et allongé avec des extrémités pointues. Dans les gamétocytes mâles, le pigment a tendance à être dispersé tandis que chez la femelle, il est

plus dense. Le gamétocyte de stade V est le plus distinct de tous les stades en raison de la forme en croissant ou falciforme.

3.3.2. Cycle sexué chez le moustique (sporogonie)

Lors de son repas sanguin chez un sujet infecté, le moustique ingère les gamétocytes mâles et femelles du *Plasmodium* qui sont infectieux pour lui. Une fois dans le tube digestif du moustique, les gamétocytes se différencient rapidement en microgamètes mâles flagellés mobiles et macrogamètes femelles. La fertilisation de la macrogamète par un microgamète, pour donner un zygote, est réalisée dans les minutes suivant l'exflagellation. Ce zygote évolue en ookinète mobile qui traverse la paroi de l'estomac du moustique et forme sur sa face externe un oocyste. Ce dernier se développe en quelques jours et donne des nombreux sporozoïtes. Ces sporozoïtes migrent alors jusqu'à la cavité sécrétoire et, finalement, au conduit salivaire. Ils sont alors prêts à être injectés à l'homme lors d'un nouveau repas sanguin.

3.4. Physiopathologie du paludisme

3.4.1. Accès palustre non compliqué

La schizogonie intra-hépatique entraîne une destruction des cellules hépatiques. Cependant, cette destruction des cellules parenchymateuses du foie est cliniquement asymptomatique. On observe une prolifération des cellules de Küpffer responsables de la phagocytose des débris cellulaires et du pigment malarique. Ultérieurement le dépôt de ces débris entraîne une hépatomégalie.

Lorsque la densité parasitaire atteint un certain seuil, les pigments malariques (hémozoïnes), libérés après la destruction des hématies par les trophozoïtes, agissent sur le centre bulbaire de la thermorégulation.

La synchronisation progressive du cycle intraérythrocytaire entraîne la libération régulière et répétée des pigments malariques, d'où la périodicité de l'accès palustre. La splénomégalie survient à la suite d'une hyperactivité du système phagocytaire mononucléé chargés de débarrasser l'organisme des pigments malariques et des débris érythrocytaires.

3.4.2. Neuropaludisme

La séquestration des formes matures de *P. falciparum* au niveau du cerveau et d'autres organes tels que le cœur, les poumons, les reins, la rate et le placenta (42), explique en partie

la gravité du paludisme. Cette séquestration se fait après interaction entre la protéine 1 de la membrane érythrocytaire appelée PfEMP1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) et les différents récepteurs présents à la surface de l'endothélium vasculaire. Ce phénomène est appelé cytoadhérence des globules rouges parasités. Cependant d'autres hypothèses ont été évoquées pour expliquer la physiopathologie du paludisme grave (43):

- Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : INF- γ et TNF- α
- Augmentation de la perméabilité de la barrière méningée entraînant une fuite du liquide céphalorachidien et un œdème cérébral
- Coagulation intravasculaire disséminée
- Phénomène immuno-pathologique avec dépôt de complexes immuns

Quel que soit le mécanisme, le ralentissement du flux capillaire intracérébral provoque l'anoxie, voire tardivement une ischémie responsable d'une hémorragie périvasculaire et de lésion de la substance blanche qui ne sont pas sans séquelles.

3.5. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques du paludisme sont exclusivement liées à la schizogonie intraérythrocytaire. Les principaux signes, que sont la fièvre, l'anémie et le sub-ictère, sont dus à l'éclatement des hématies et des rosaces avec libération du pigment malarique. L'expression et la gravité de la maladie dépendent du parasite (espèce plasmodiale et densité parasitaire) et de l'état de prémunition de l'individu. Selon le cas, il est possible de distinguer le paludisme de primo-invasion, l'accès de reviviscence, l'accès pernicieux ou neuropaludisme, le paludisme viscéral évolutif et la fièvre bilieuse hémoglobinurique (44).

3.5.1. Paludisme de primo-invasion

Il est caractérisé par une fièvre allant de 39°C à 40°C qui s'accompagne de myalgie et de céphalée brutale. Cette fièvre diminue d'intensité (frisson et sueur) après quelque temps. Ces signes sont souvent associés à de petits troubles digestifs de type « embarras gastrique » (nausée, vomissement et/ou diarrhée) (45). Les signes traduisant l'hémolyse apparaissent souvent de façon différée : pâleur, sub-ictère, hépto-splénomégalie.

3.5.2. Accès de reviviscence

On observe ce type d'accès palustre avec l'acquisition d'un certain degré d'immunité et il correspond aux crises schizogoniques, toutes les 48 heures (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*) ou toutes les 72 heures (*P. malariae*), caractérisées par : un grand frisson inaugural, une

fièvre à 40°C durant quelques heures puis de sueurs profuses (45). La périodicité manque souvent en raison d'un polyparasitisme. Seule la fièvre tierce à *P. falciparum* est susceptible d'évoluer vers un paludisme cérébral (45).

3.5.3. Paludisme viscéral évolutif :

Ce cas de paludisme est rencontré dans des zones d'endémie chez les sujets jeunes insuffisamment ou non prémunis et qui ont été soumis à une chimioprophylaxie incorrecte. La splénomégalie en est le signe majeur associée à une hépatomégalie. Les signes généraux (fièvre intermittente, asthénie, retard staturo-pondéral) et l'anémie (pâleur, ictère) sont très variables, allant d'une forme peu symptomatique à une forme qui pourrait se confondre avec une leucémie.

3.5.4. La fièvre bilieuse hémoglobinurique :

En général elle survient chez des sujets en zone d'endémie avec des antécédents d'accès palustres et observant une prophylaxie et/ ou des traitements intermittents par des aminoalcools (46). Plus récemment, la fièvre bilieuse hémoglobinurique a été rapportée après l'administration de l'halofantrine (47). Le début est brutal avec une hémolyse intravasculaire chez le patient après un traitement aux sels de quinine. Il y a la présence de douleur intense en barre au niveau de la ceinture pelvienne, une oligurie avec des urines particulièrement rouges et foncées. La parasitémie est faible et indétectable par les techniques classiques, goutte épaisse (GE) et frottis mince (FM) (48). Cette forme nécessite une réanimation.

3.5.5. Le neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées

C'est le paludisme des sujets non immun comme nourrisson, femme enceinte, enfant et migrants venant d'une zone non impaludée. Ces formes sont propres au *P. falciparum* et sans traitement ils peuvent conduire à la mort au bout de 72 heures. L'OMS a établi des critères afin de poser le diagnostic du paludisme grave et compliqué permettant ainsi une meilleure prise en charge (49). Il s'agit de la présence des formes asexuées de *P. falciparum* dans le sang, associée à l'un des signes suivants :

- Neuropaludisme
- Troubles de la conscience
- Convulsions répétées
- Prostration : extrême faiblesse (incapacité de se tenir droit)

- Vomissements itératifs
- Syndrome de détresse respiratoire
- Ictère clinique
- Acidose métabolique : bicarbonates plasmatiques < 5g/dl, hémocrite (Ht)< 2,2 mmol/L
- Hémoglobinurie macroscopique
- Insuffisance rénale : diurèse < 400 ml/ 24h ou créatinémie > 265µM chez l'adulte ; diurèse < 12 ml/ kg/ 24h ou créatinémie élevée pour l'âge chez l'enfant
- Collapsus circulatoire : Tension Artérielle Systolique < 50 mmHg avant 5 ans, TAS < 80 mmHg après 5 ans
- Hémorragie anormale
- Œdème pulmonaire (radiologique).

3.6. Diagnostic biologique :

Après un diagnostic clinique, le diagnostic biologique est indispensable dans la confirmation d'un cas de paludisme car il permet de réduire l'utilisation d'antipaludiques dans le traitement injustifié pour des fièvres non palustres (50). En effet la recherche d'un diagnostic précoce et d'un traitement efficace sont des actions mises en œuvre par des programmes de lutte contre le paludisme. Ce diagnostic du paludisme comprend les techniques de diagnostic indirect et direct.

3.6.1. Diagnostic biologique indirect

Le principe est basé sur la recherche d'anticorps dans le sérum du malade. Les techniques sont indicatives d'une infection antérieure (persistance des anticorps même après l'infection) et présente. Ces techniques incluent : les tests de diagnostic rapide (tests immunochromatographiques), l'immunofluorescence indirecte, l'hémagglutination passive et le test Elisa (51,52).

3.6.2. Diagnostic biologique direct

Le diagnostic direct est fiable et a pour but de confirmer ou infirmer le diagnostic clinique. Ces techniques comprennent la goutte épaisse, le frottis mince, le « buffy coat test » quantitatif (QBC ; « quantitative buffy coat »), et la PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) (53).

La goutte épaisse (GE) et le frottis mince (FM) sont une technique de concentration qui consiste à étaler 5-10 µl (GE) et 3-6 µl (FM) de sang sur une lame porte-objet. Après séchage

le frottis mince est fixé au méthanol puis la lame est colorée au GIEMSA préparé à 10 % pendant 15-20 mn. La lecture est faite au microscope à l'objectif 100 en immersion. Ainsi le noyau du *Plasmodium* est coloré au rouge vif et le cytoplasme en bleu. L'association GE/FM est la technique la plus recommandée et demeure la référence pour le diagnostic du paludisme dans les pays en développement (54).

La PCR est une technique de biologie moléculaire permettant d'obtenir *in vitro* un grand nombre de segments d'ADN identiques, à partir d'une séquence initiale. Il s'agit d'amplifier un fragment d'ADN extrait à partir du sang ou tout autre prélèvement biologique infecté par le parasite en utilisant des amorces spécifiques. La détection de l'ADN parasitaire par la technique de PCR est l'une des approches les plus sensibles pour diagnostiquer le paludisme, mais le coût élevé limite leur utilisation. La PCR demande une longue procédure, des équipements et des réactifs spécialisés et coûteux.

Le « Buffy Coat » quantitatif est un autre test direct et rapide pour le diagnostic du paludisme. Il est basé sur la coloration à l'acridine orange d'échantillons de sang périphérique centrifugés dans un tube à microhématocrite (QBC). L'examen du microtube se fait sous source de lumière UV (microscopie à fluorescence). L'orange d'acridine colore toutes les cellules contenant de l'acide nucléique et la fluorescence associée est observable sous une lumière bleu-violet à travers un microscope, permettant ainsi d'identifier les globules rouges infectés.

3.7. Stratégies de lutte contre le paludisme

3.7.1. La prise en charge des cas de paludisme simple et grave

Les cas de paludisme sont pris en charge au niveau des structures sanitaires. L'OMS recommande l'utilisation des CTAs pour le traitement du paludisme simple à chaque fois que la voie orale est possible et l'artésunate par voie intraveineuse pour le traitement des cas de paludisme grave. En l'absence d'artésunate, il est recommandé d'utiliser l'artéméter de préférence à la quinine (55). Le gouvernement du Mali s'est engagé à assurer gratuitement le traitement de l'accès palustre chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes tout en fournissant les formations sanitaires en TDR (Test de Diagnostic Rapide) et en CTA. L'OMS a recommandé de confirmer le diagnostic clinique du paludisme par un examen biologique chaque fois que le plateau technique le permet (Microscopie ou TDR) avant d'instaurer le traitement (50).

3.7.2. Les mesures préventives

Le traitement préventif intermittent (TPI), la chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) et la lutte anti-vectorielle (LAV) constituent les mesures de prévention le paludisme au Mali (56).

3.7.2.1. La prévention du paludisme pendant la grossesse

Le traitement préventif intermittent (TPI) avec la Sulfadoxine-Pyriméthamine est recommandé pour prévenir le paludisme pendant la grossesse. Ce traitement est administré gratuitement à raison d'une cure supervisée par mois entre le 4ème et le 8ème mois de la grossesse (57). Chaque cure est composée d'une prise unique de 3 comprimés de Sulfadoxine (500mg) et Pyriméthamine (25mg) chacun.

3.7.2.2. La chimio prévention du paludisme saisonnier :

La CPS est une nouvelle stratégie pour le contrôle du paludisme chez les enfants impliquant l'administration mensuelle de sulfadoxine-pyriméthamine + amodiaquine (SPAQ) pour la prévention du paludisme (55). Elle est plus adaptée à des zones où le paludisme est saisonnier avec une transmission intense pendant trois ou quatre mois de l'année. Cette CPS concerne les pays (en majorité Africains) qui répondent à ces critères et pour lesquels la SP et l'AQ conservent leur efficacité contre *P. falciparum*. SP+AQ a ainsi une chimioprophylaxie d'environ quatre semaines, la protection diminue ensuite rapidement nécessitant un renouvellement du traitement chaque mois.

3.7.3. La lutte antivectorielle

Le Mali a adopté les méthodes de lutte antivectorielle pouvant être utilisées au niveau individuel et communautaire pour protéger contre les piqûres de moustiques (57). Il s'agit de :

- La promotion des moustiquaires imprégnées d'insecticide
- Le traitement ciblé des gîtes larvaires
- La pulvérisation intra-domiciliaire
- La promotion de l'hygiène et de l'assainissement.

3.8. Les antipaludiques

La classification des antipaludiques est pharmacologique et chimique. C'est ainsi qu'on distingue :

❖ **Les schizonticides** : ils sont actifs sur les schizontes mais inactifs sur les gamètes. Ils sont curatifs des accès palustres, mais n'empêchent pas la transmission de la maladie. Les schizonticides comprennent les amino-4 quinoléines (ex. chloroquine, amodiaquine) (Figure 3), les amino-alcools (ex. quinine, méfloquine) (Figure 4), les antifoliques (proguanil et pyriméthamine) et les antifoliques (sulfadoxine, dapsonne) (Figure 5), la pyronaridine (Figure 6) et les sesquiterpènes lactones (Artémisinine et dérivés) (Figure 7).

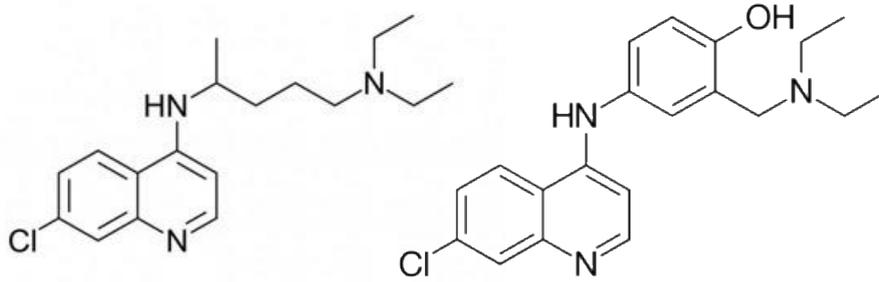
❖ **Les gamétocytocides** : ils n'ont pas d'action sur les schizontes mais ont un intérêt sur le plan collectif car ils peuvent empêcher la transmission. Ils comprennent les amino-8 quinoléines (ex. primaquine, tafénoquine) (Figure 6).

❖ **Certains antibiotiques** appartenant à la famille des tétracyclines (doxycycline) ou des macrolides (érythromycine) utilisés en association avec les schizonticide (en général la quinine) permettent de renforcer l'activité antipaludique.

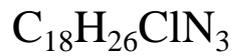
3.9. Nouvelles molécules antipaludiques :

Bien que des combinaisons de médicaments à base d'artémisinine soient disponibles pour traiter le paludisme, les cas d'échecs des traitements rapportés en Asie du Sud-Est soulèvent des inquiétudes quant à la propagation de la résistance aux CTA en Afrique. Au Rwanda, dans une étude publiée en aout 2020 dans le journal Nature Medicine il est rapporté les premiers cas de résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine (58). Heureusement, il y a de l'espoir à l'horizon car plusieurs nouveaux candidats médicaments antipaludiques sont en cours d'essais cliniques ainsi que d'autres cibles médicamenteuses prometteuses sont en cours d'étude.

Les amino-4-quinoléines



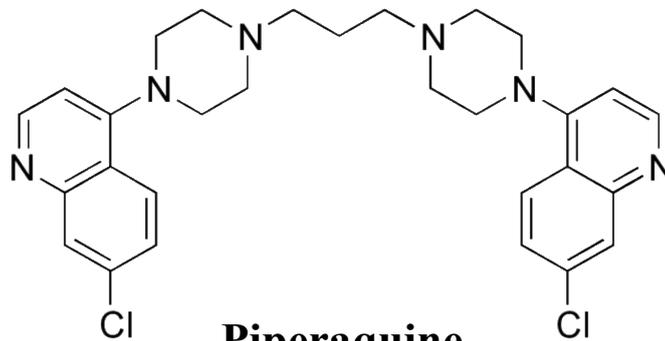
Chloroquine



Amodiaquine



Bis 4 amino quinoléines

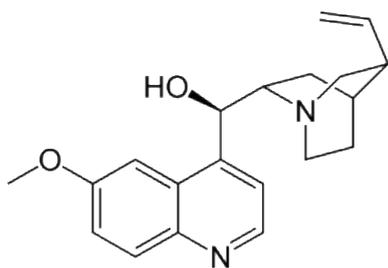


Piperaquine

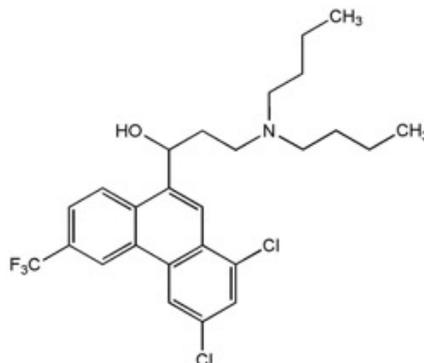


Figure 3: Structure, formule et classification chimique de la chloroquine, de l'amodiaquine et de la pipéraquine

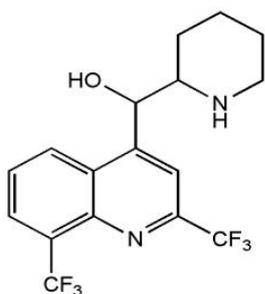
Les amino-alcools



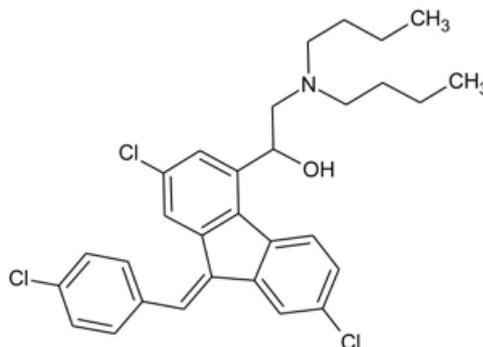
Quinine
 $C_{20}H_{24}N_2O_2$



Halofantrine
 $C_{26}H_{30}Cl_2F_3NO$



Mefloquine
 $C_{17}H_{16}F_6N_2O$

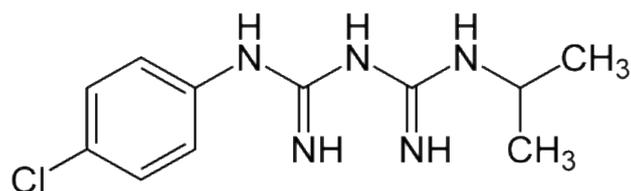
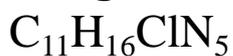


Lumefantrine
 $C_{30}H_{32}Cl_3NO$

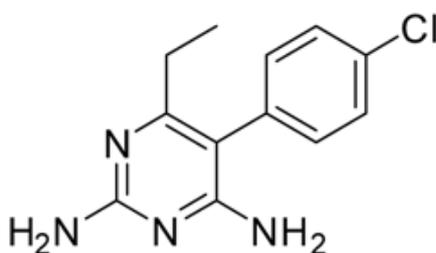
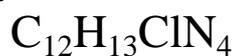
Figure 4: Structure et formule chimique des amino-alcools

Les antifoliniques

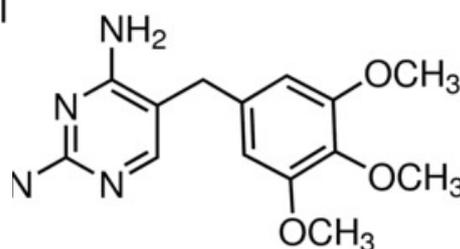
Proguanil



Pyriméthamine

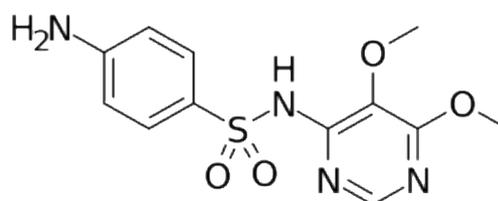


Triméthoprime

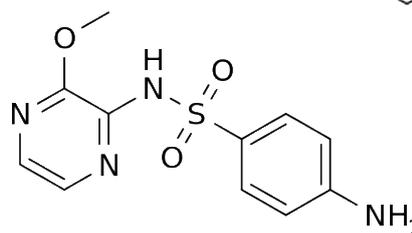


Les antifoliques

Sulfadoxine



Sulfalène



Dapsoné

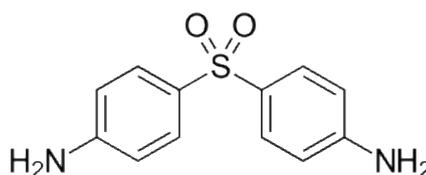
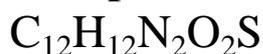
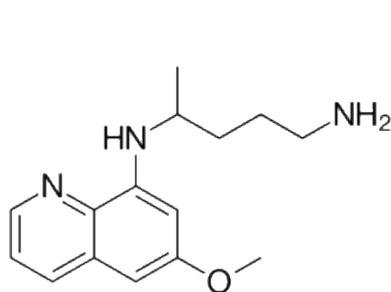
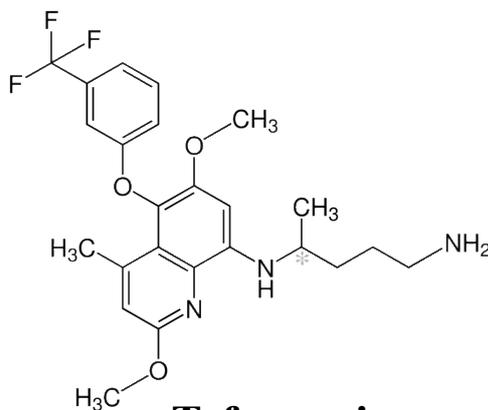


Figure 5: Structure et formule chimique des antifoliniques et des antifoliques

Les amino-8-quinoléines

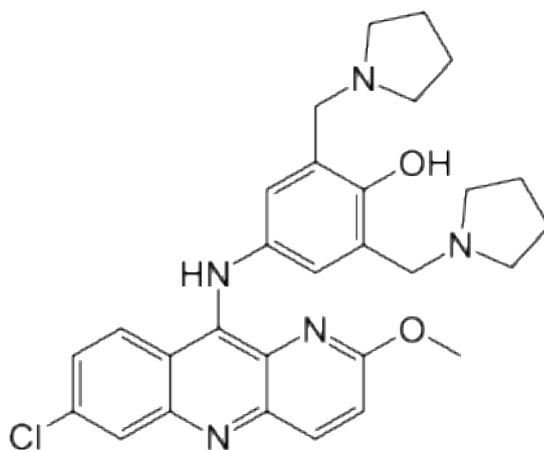


Primaquine
 $C_{15}H_{21}N_3O$



Tafenoquine
 $C_{24}H_{28}F_3N_3O_3$

Autres

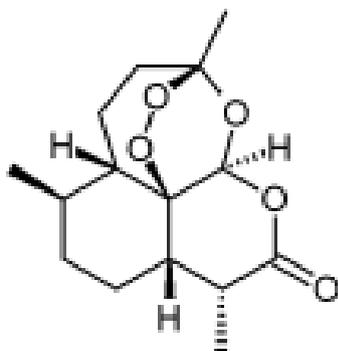


Pyronaridine
 $C_{29}H_{32}ClN_5O_2$

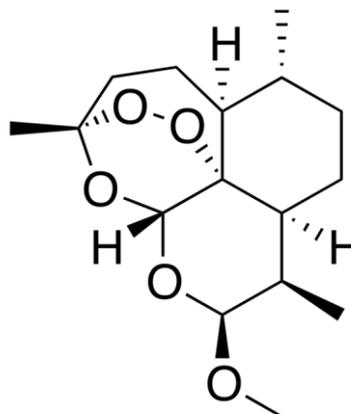
Figure 6 : Structure et formule chimique de la primaquine, de la tafénoquine et de la pyronaridine

Artémisinines et dérivés

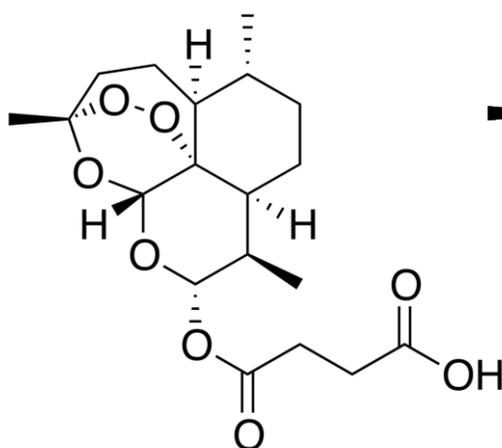
Artemisinin



Artemether



Artesunate



Dihydroartemisinin

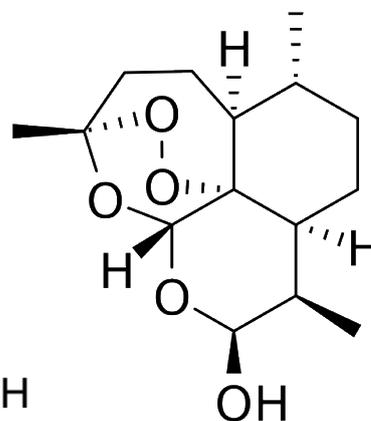


Figure 7: Structure et formule chimique de l'artémisinine et ses dérivés

3.9.1. Les imidazopyrazines (KDU691) :

KDU691 une nouvelle classe de composés antipaludiques. C'est une imidazopyrazine dotée d'une puissante activité antiparasitaire contre les schizontes au stade sanguin, les gamétocytes et les stades hépatiques. Le KDU691 est un inhibiteur spécifique de *Plasmodium* PI4K, bloquant ainsi le développement intracellulaire de plusieurs stades d'infection chez l'hôte vertébré et invertébré de *P. falciparum* et de *P. vivax* (12). KDU691 est aussi actif contre les parasites résistants à l'artémisinine et ayant les mutations K13 (59).

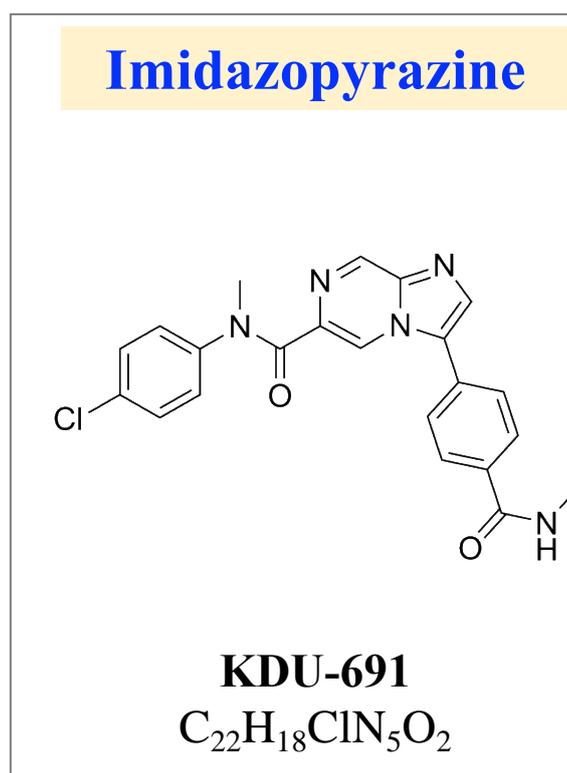


Figure 8: Structure, formule et classification chimique de KDU-691

3.9.2. Les imidazolopipérazines (GNF-179) :

Les imidazolopipérazines dont GNF179, sont aussi de nouvelles classes de médicaments. GNF179 est un analogue proche du candidat clinique KAF156 qui a démontré une puissante activité thérapeutique en combinaison avec une nouvelle formulation améliorée de la luméfántrine lors d'essais cliniques de phase IIb chez des patients avec un paludisme à *P. falciparum* et de *P. vivax* (15). Le KAF156 est le premier composé d'une nouvelle classe d'antipaludique, les imidazolopipérazines, et a le potentiel dans l'élimination du paludisme, en guérissant rapidement les infections paludéennes, y compris les souches résistantes et en

bloquant la transmission du parasite. KAF156 et son analogue proche GNF179 ont aussi le potentiel de prévenir le paludisme par leur propriété contre les stades hépatiques. KAF156 et GNF179 sont très actifs sur les parasites résistants à l'artémisinine (60).

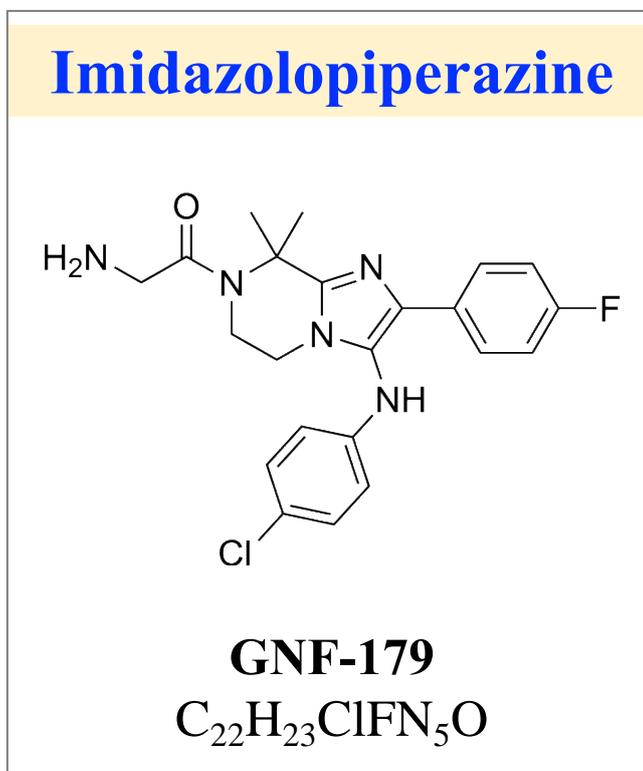


Figure 9: Structure, formule et classification chimique du GNF-179

3.9.3. Les spiroindolones (KAF246)

Les spiroindolones présentent une activité schizonticide sanguine rapide et puissante contre le *Plasmodium* résistant aux médicaments (61). Les spiroindolones inhibent le *PfATP4*, empêchant ainsi les ions sodium d'être pompés hors du parasite et entraînant une perturbation fatale de l'homéostasie du sodium du parasite. L'inhibition de *PfATP4* par les spiroindolones entraîne une augmentation du sodium intracellulaire et une augmentation du pH intracellulaire. Il a été démontré que la spiroindolone KAF246 (NITD246) réduit l'activité ATPase associée à la membrane dans les préparations membranaires d'érythrocytes infectés en suspension dans une concentration élevée de Na^+ . Il a également été montré que les mutations *PfATP4* correspondant à la résistance aux spiroindolones réduisaient la sensibilité à la perturbation du Na^+ et à l'activité ATPase par les spiroindolones.

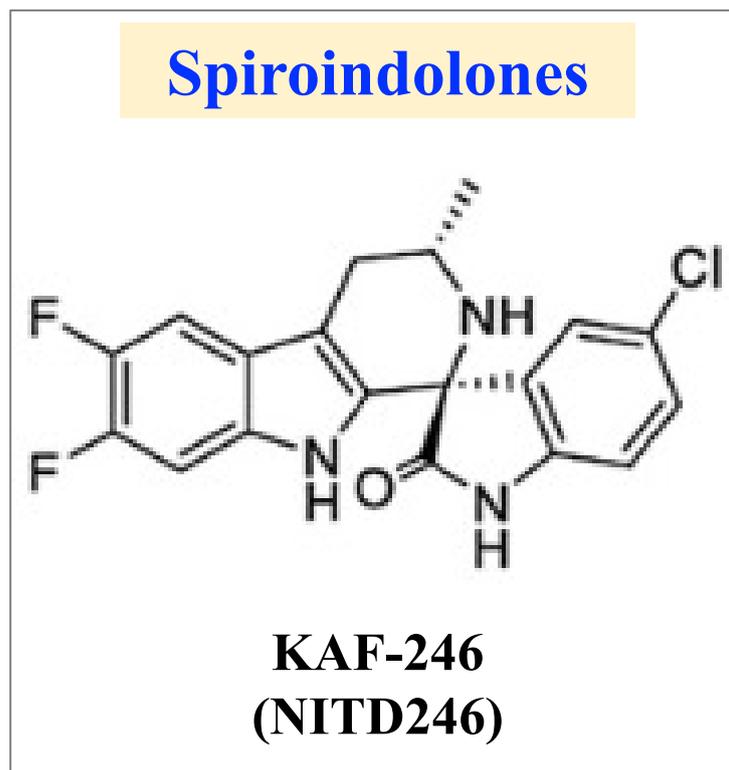


Figure 10: Structure, formule et classification chimique du KAF-246

3.9.4. Les quinoléines-4-carboxamides (cabamiquine) :

La cabamiquine (DDD107498, ou M5717) est un puissant et nouvel agent antipaludique agissant à plusieurs étapes du cycle de vie du parasite *Plasmodium* (13). La cabamiquine a un profil de sécurité acceptable et de bonnes propriétés pharmacocinétiques. Il a comme cible moléculaire le facteur d'élongation de la traduction 2 (eEF2). Le facteur eEF2 est responsable de la translocation du GTP du ribosome le long de l'ARN messenger et est essentiel à la synthèse des protéines. Cette molécule a montré une excellente activité contre les parasites *P. falciparum* 3D7. De plus, il était plus puissant que l'artésunate dans des essais *ex vivo* contre une gamme d'isolats cliniques de *P. falciparum* et de *P. vivax* recueillies auprès de patients atteints de paludisme au sud de la Papouasie.

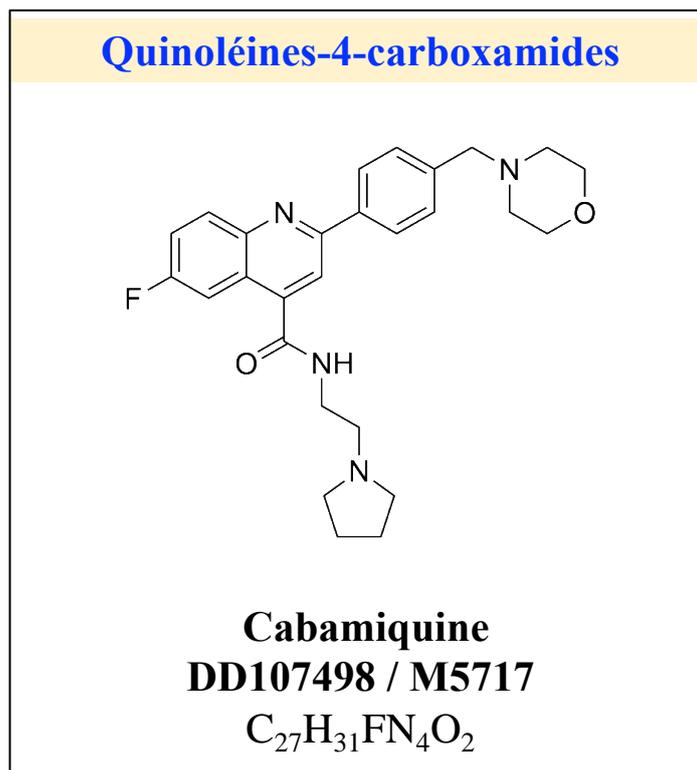


Figure 11: Structure, formule et classification chimique de la cabamiquine

3.10. Les méthodes d'études de l'activité des antipaludiques

L'efficacité des antipaludiques est évaluée par la méthode standardisée de l'OMS pour l'espèce *P. falciparum*. Il s'agit des épreuves d'évaluation *in vitro* et *in vivo*.

3.10.1. Test *in vivo*

Ce type de test consiste à contrôler la parasitémie au bout d'un temps donné, chez un sujet atteint de paludisme à qui l'on a administré la dose recommandée de l'antipaludique à tester. L'efficacité des schémas thérapeutiques est directement évaluée avec les tests de l'OMS. Ces tests proposent des suivis de 28 jours pour la chloroquine et l'amodiaquine, 42 jours pour la sulfadoxine-pyriméthamine, la luméfántrine-artéméther (Coartem®) et le test de 63 jours pour la méfloquine et la dihydroartémisine-piperaquine (62). Le test standard de l'OMS de 28 jours (62) recommande de réévaluer les paramètres clinique et parasitologique aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28 après inclusion.

Avantages du test *in vivo* :

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

Inconvénients du test *in vivo* :

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

3.10.2. Tests *in vitro*

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

On distingue :

➤ Tests optiques :

Le micro-test OMS et le semi-micro-test de Le Bras (63) ont été mis au point à la fin des années 70 afin d'évaluer la sensibilité de *P. falciparum* à certains médicaments. 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 (Roosevelt Park Memorial Institute) et incubé à 37°C, en présence du CO₂ et de l'O₂, pendant 24 à 48 heures. Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI), pour le micro-test OMS, et en concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) OU 90% (CI₉₀) pour le semi-micro-test.

➤ Tests isotopiques :

Ce sont des modifications, respectivement, du micro-test OMS et du semi-micro-test optique par l'adjonction dans chaque cupule d'un radio-isotope, l'Hypoxantine tritiée. La maturation des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites. La mesure de la radioactivité se fait après 42 à 48 heures d'incubation, à l'aide d'un compteur à scintillation. Les résultats sont donnés en coups par minute (CPM) et l'activité du médicament est exprimée en CI₅₀ ou en CI₉₀.

➤ **Le Microtest de MarkIII et le test de Makler** sont basés respectivement sur la quantification microscopique des schizontes et sur la mesure de l'activité enzymatique de la

lactate déshydrogénase (LDH). Pour les deux approches, les parasites sont cultivés en présence des antipaludiques à étudier.

➤ **Le test du Ring Stage Survival Assay (RSA)** développé pour l'évaluation de la résistance des parasites à l'artémisinine et ses dérivés.

Avantages des tests *in vitro* :

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

Inconvénients des tests *in vitro* :

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

3.10.3. Tests *ex vivo*

Ils consistent à mesurer l'effet d'un antipaludique sur des souches de parasites prélevés chez des sujets infectés. La source du parasite diffère le test *ex vivo* du test *in vitro* (utilisant des parasites de laboratoire). Souvent, certains isolats sont d'abord adaptés en culture continue au laboratoire avant de passer au test proprement dit. Ainsi, après la collecte des parasites, ce sont les mêmes tests *in vitro* cités ci-dessus qui sont adaptés aux différentes expériences lors des essais *ex vivo*.

3.11. Les méthodes d'études de la transmission palustre

Le réservoir infectieux humain est défini comme la proportion d'une population de sujets asymptomatiques porteurs de gamétocytes capables d'infecter avec succès les moustiques (64). Des essais d'alimentation des moustiques sont systématiquement utilisés pour évaluer la transmission du paludisme. On mesure l'infectiosité des gamétocytes dans ces tests en quantifiant le nombre d'oocystes présents dans l'estomac du moustique (soit en densité moyenne d'oocystes, soit en prévalence oocystiques chez les moustiques) après une période

de maturation de 7 à 8 jours. Il existe 3 différentes manières de procéder au test d'infestation des moustiques :

- **Le test de repas sanguin direct sur la peau** (DSFA, « *direct skin feeding assay* » en Anglais) qui autorise les femelles du moustique *Anopheles* à s'alimenter du sang par contact direct avec la peau d'une personne infectée (65);
- **Le test de repas sanguin direct sur membrane artificielle** ou *Direct Membrane Feeding Assay* en Anglais (DMFA) permet l'alimentation par membrane artificielle (Parafilm) des moustiques *Anopheles* non infectés avec un échantillon de sang prélevé chez une personne infectée ;
- **Le test de repas sanguin standard sur membrane artificielle** (SMFA, *Standard Membrane Feeding Assay* en Anglais) implique l'alimentation des moustiques avec du sang contenant des gamétocytes cultivés *in vitro* (65).

Bien que les tests directs de l'alimentation cutanée puissent donner une estimation plus précise du potentiel de transmission de l'homme, les tests à membrane sont appropriés pour comparer l'infectiosité entre les personnes et pour évaluer les interventions de réduction de la transmission (65,66).

METHODOLOGIE

4. METHODOLOGIE

4.1. Lieu d'étude et choix du site d'étude

Pour cette étude les données ont été collectées à Faladjè et les expériences pour l'essai *ex vivo* ont été effectuées dans les laboratoires du MRTC.

Faladjè est un village rural qui relève de la commune de N'djiba, cercle de Kati, région de Koulikoro. Avec une population estimée à 23000 habitants selon le registre de la mairie, la commune de N'djiba comprend 23 villages. Les Bambara, qui constituent l'ethnie majoritaire de ces différents villages, cohabitent avec les peuhls, Soninkés, Maures et les Dogons.... Sur cette aire géographique multilingue et multiethnique, le mariage interethnique est bien favorisé. Le village de Faladjè est le chef-lieu de la commune de N'djiba. Ce village est situé à 75 Km de notre laboratoire principal du MRTC au Point-G à Bamako avec une population de 3500 habitants (RAVEC 2009). Le paludisme y est hyper-endémique avec une transmission saisonnière qui se déroule généralement entre les mois de juillet et janvier. Le choix de ce site repose sur le fait que Faladjè a fait l'objet de nombreuses études menées par le MRTC depuis 1993 avec présence permanente de l'équipe de recherche et un centre équipé pour répondre aux besoins des études entomologiques et la conservation des échantillons pour des expérimentations *in vitro*.

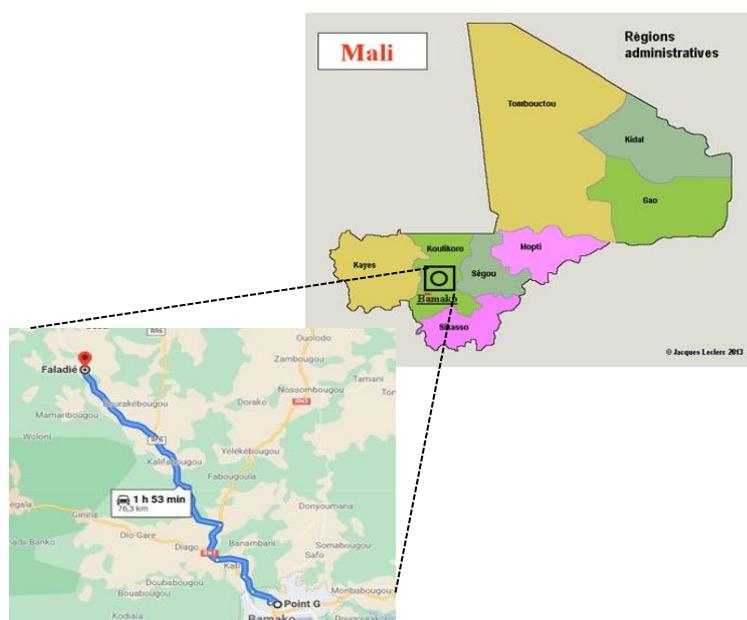


Figure 12: Carte du Mali avec le site d'étude

Source : Google Map

4.2. Type d'étude

Nous avons mené une étude clinique d'observation afin de mettre au point un nouveau test *ex vivo* pour évaluer l'activité bloquante des molécules sur la transmission des gamétocytes de *P. falciparum* isolés sur le terrain.

4.3. Période d'étude

L'étude s'est déroulée d'octobre 2019 à décembre 2019 et de septembre 2020 à janvier 2021. La durée de suivi de chaque participant était de 28 jours. Une équipe médicale était basée sur le site d'étude pendant les périodes couvertes de cette étude.

4.4. Population d'étude

Nous avons travaillé en *ex vivo* sur les gamétocytes de *P. falciparum* collectés chez des volontaires de 6 ans ou plus résidant à Faladjè porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* confirmé par la microscopie.

4.4.1. Critères d'inclusion

Étaient inclus dans cette étude pour la collecte de sang :

- ✓ Les volontaires ayant accepté de participer à l'étude.
- ✓ Les volontaires pouvant aller à Bamako accompagnés du guide local et de l'équipe pour le prélèvement sanguin.
- ✓ Les volontaires et/ou parent/tuteur ayant donné leur consentement ou assentiment éclairé écrit conformément à la pratique locale.
- ✓ Les volontaires présentant une densité gamétocytaire supérieure ou égale à 16 gamétocytes/ μ l.
- ✓ Les volontaires pouvant prendre un médicament par voie orale.

4.4.2. Critères de non-inclusion

N'ont pas été inclus dans l'étude :

- ✓ Les patients présentant des vomissements sévères ou l'impossibilité de traitement par voie orale, ou de diarrhées sévères.
- ✓ Les volontaires présentant une anémie avec un taux d'hémoglobine < 7 g/dl.
- ✓ Les volontaires présentant des signes et symptômes de paludisme grave/complicé selon les critères de l'OMS.
- ✓ Patients présentant une fièvre causée par d'autres maladies autre que le paludisme.

✓ Patients ayant utilisé un antipaludique dans les deux (2) semaines avant le début de l'étude.

4.5. Identification des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*

Les porteurs de gamétocytes ont été identifiés en soumettant les volontaires asymptomatiques à un prélèvement sanguin capillaire au bout du doigt qui a servi à la réalisation de la goutte épaisse et du frottis mince. Les enfants asymptomatiques ayant une densité de gamétocytes de *P. falciparum* ≥ 16 gamétocytes/ μ l ont été sélectionnés comme donneurs de sang pour les tests de laboratoire prévus le lendemain au laboratoire du Malaria Research and Training Center (MRTC) à Bamako.

La densité parasitaire était déterminée en comptant le nombre de parasites asexués sur 200 leucocytes et le tout apporté à 8000 leucocytes par millimètre cube de sang. La gamétocytémie était déterminée sur 1000 leucocytes. Le frottis mince était utilisé pour le diagnostic d'espèce. Après la lecture, les lames étaient conservées dans des boîtes de l'OMS. Pour le contrôle de qualité, les 10% des lames ont été relues par un microscopiste agréé qui n'a pas participé à l'étude.

Les participants inclus dans l'étude ont été soumis à un prélèvement veineux sanguin pour les expériences de laboratoire (figure 13).

4.6. Prélèvement sanguin chez les patients inclus pour les expériences de laboratoire

Deux types d'anticoagulants ont été utilisés pour prélever le sang veineux des patients asymptomatiques : le citrate acide dextrose (ACD) et l'héparine de lithium. Leur choix a été guidé par l'impact de l'anticoagulant sur les expériences à mener. Le citrate acide dextrose (ACD) n'interfère pas avec l'activité de l'ADN polymérase et n'affecte pas la croissance des parasites *Plasmodium* lorsque les isolats sont cultivés immédiatement après le prélèvement de sang ce qui explique son choix pour les échantillons qui seront utilisés pour la culture des parasites (67). L'héparine inhibe l'activité de l'ADN polymérase. Cependant les expériences de repas sanguin des moustiques fonctionnent mieux lorsque le sang est prélevé dans un tube d'héparine de lithium (68). Ainsi, les prélèvements de sang sur tubes héparine de lithium ont été utilisés pour les tests d'infestation directe des moustiques.

Les deux tubes d'anticoagulants ont été préchauffés à 37°C avant le prélèvement de sang. Pour l'infectiosité de base des gamétocytes collectés, 3-4 ml de sang ont été prélevés sur des

tubes d'héparine (VWR cat# BD367884) et utilisés pour la DMFA 45 à 90 minutes après le prélèvement de sang veineux (68).

Pour l'exposition *ex vivo* aux conditions de culture et à la DMFA, 5 à 10 ml ont été prélevés sur des tubes ACD (VWR cat# BD 364606) (67). Les prélèvements sanguins ont été immédiatement conservés dans un incubateur à 37°C jusqu'à leur utilisation afin d'éviter l'activation des gamétocytes. Pour minimiser les manipulations d'échantillons à température ambiante nous avons utilisé autant que possible des blocs chauffants secs.

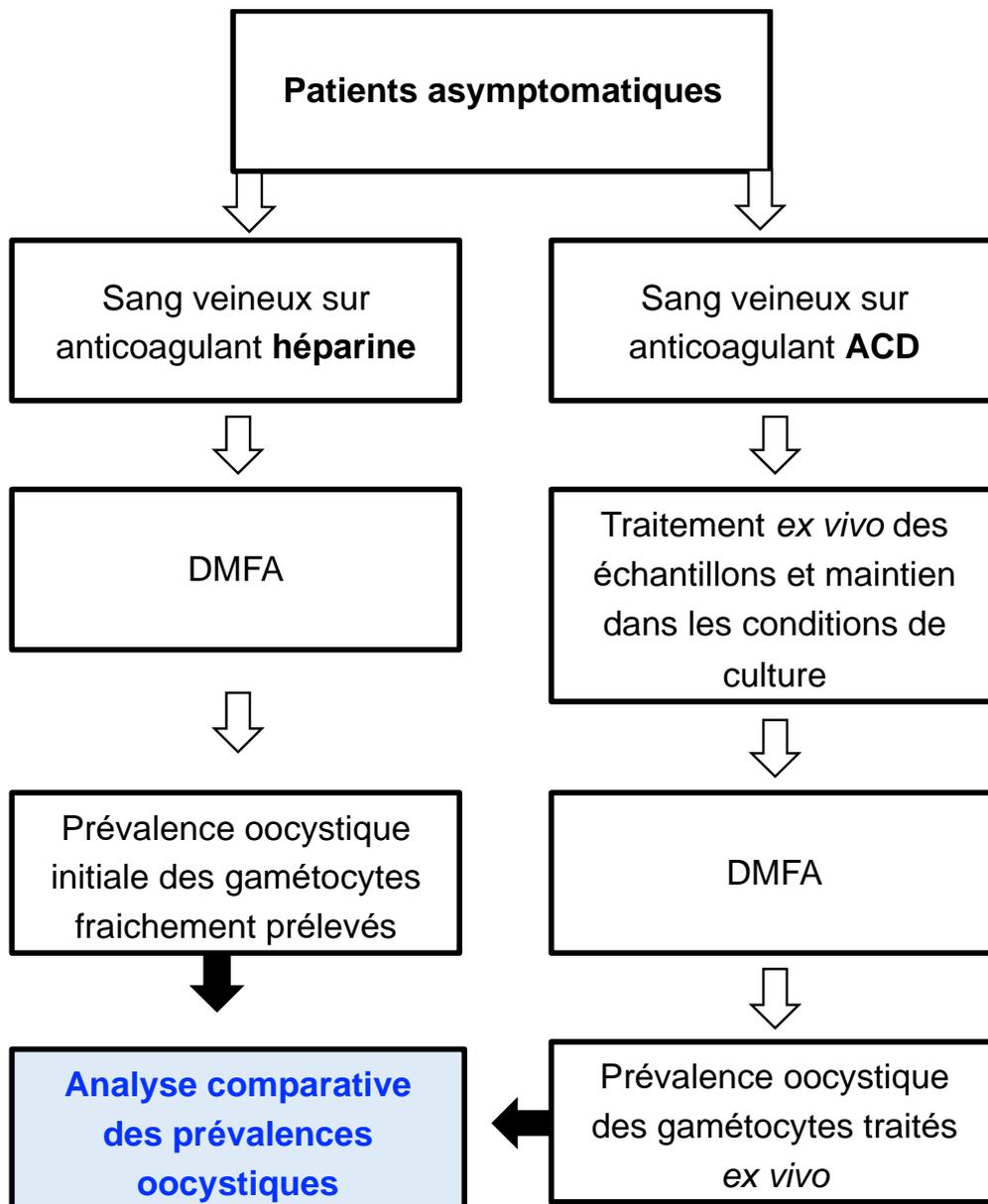


Figure 13: Les grandes étapes des analyses expérimentales

4.7. Détermination des conditions optimales pour maintenir viables et infectieux les gamétocytes isolés sur le terrain

Les deux types de prélèvements étaient traités au laboratoire pour déterminer d'une part l'infectiosité initiale des gamétocytes isolés sur le terrain par DMFA et d'autre part évaluer différentes conditions de culture (milieu, hématocrite, procédures expérimentales). Les échantillons soumis aux différentes conditions de culture ont ensuite été utilisés pour les tests d'infestation (DMFA) afin de déterminer l'impact des traitements sur l'infectiosité et la viabilité des gamétocytes.

4.7.1. Traitement des échantillons de sang pour l'évaluation de l'infectiosité initiale des gamétocytes isolés sur le terrain par DMFA

L'infectiosité de base des gamétocytes fraîchement collectés a été déterminée en utilisant des échantillons de sang hépariné (Figure 13). Tout d'abord, 1 ml de sang a été aliquoté dans un tube Eppendorf à microcentrifugation préchauffé et maintenu à 37°C jusqu'à l'expérience d'infestation (DMFA sur sang total, WB-DMFA) qui a eu lieu 45 à 90 minutes plus tard. Le reste du sang (~ 1,5 ml) a été utilisé pour le remplacement du sérum (SR-DMFA). Pour le SR-DMFA, le sang a été centrifugé à 500 g pendant 5 minutes à 37°C pour collecter le plasma. Le culot de GR a ensuite été remis en suspension dans un volume égal de sérum de cheval préchauffé (n° de cat. MERCK H1270-500ml). Les échantillons WB et SR ont été immédiatement et concomitamment utilisés pour la DMFA (Figure 14).

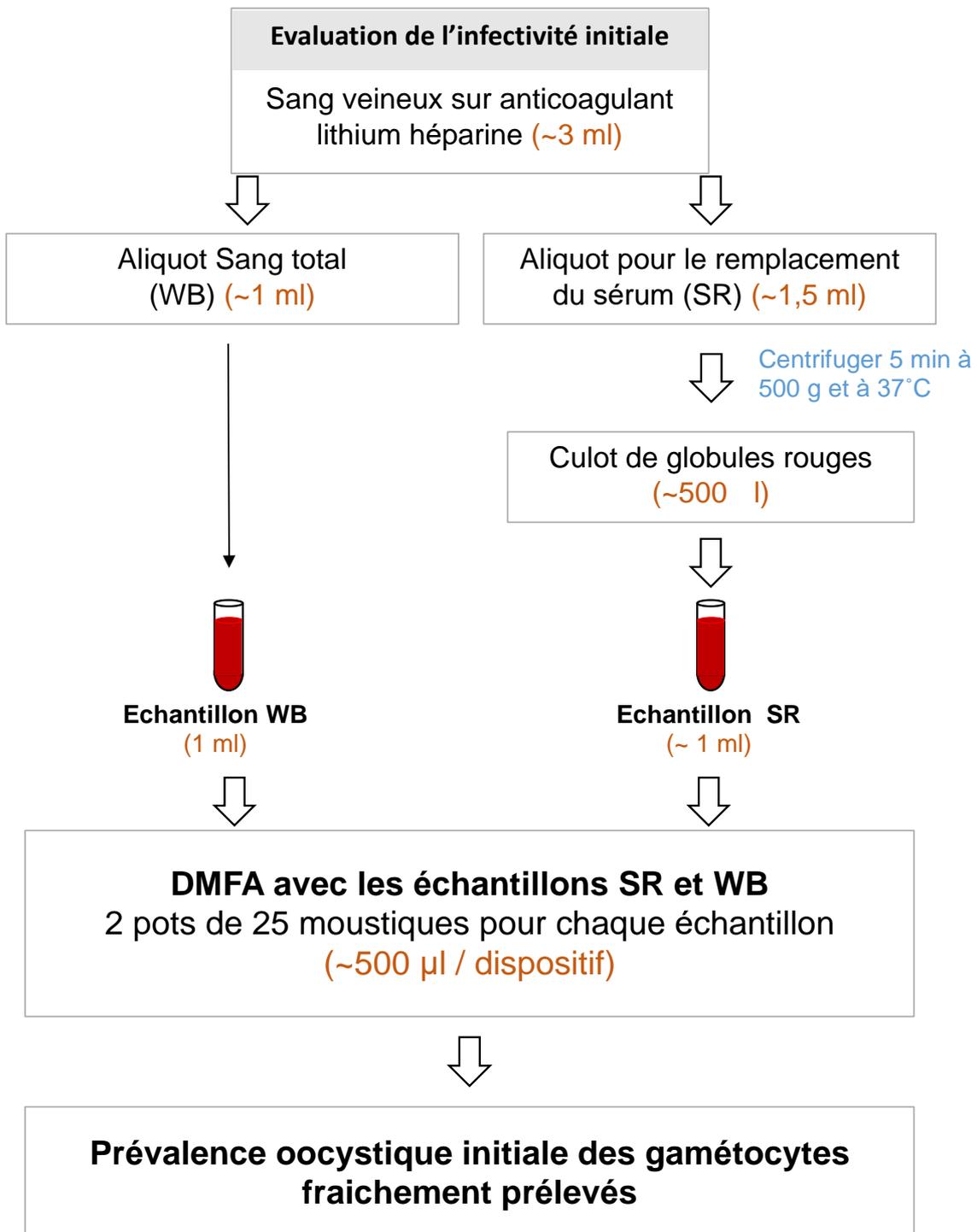


Figure 14: Procédures expérimentales d'utilisation des prélèvements veineux sur héparine lithium pour l'évaluation de l'infectiosité initiale

4.7.2. Milieux pour le maintien et la manipulation *ex vivo* de gamétocytes collectés chez les participants

Sur la base des protocoles publiés pour la production *in vitro* de gamétocytes, nous avons testé trois milieux de culture afin de déterminer les conditions optimales de culture pour la viabilité et l'infectiosité des gamétocytes isolés sur le terrain (69–78) (tableau I). Les trois milieux contiennent tous du RPMI 1640 (Gibco, cat# 31800) supplémenté avec 25 mM HEPES (SIGMA, cat# H3375), et 25 mM bicarbonate de sodium (SIGMA, cat # S5761) et stérilisé par filtration à 0,22µm sans ajouter d'antibiotique. Ceux-ci ont été complétés avec 10% de sérum de cheval inactivé (MERCK, cat # H1270-500ml) pour le milieu de culture au sérum (SCM, *Serum Culture Media* en anglais) et 10% d'AlbuMax® I (Gibco, cat # 11020) pour le milieu de culture à l'AlbuMax (ACM, *AlbuMax Culture Media* en anglais), respectivement. Pour le milieu de culture sérum-AlbuMax (SACM, *Serum AlbuMax Culture Media* en anglais), le milieu filtré a été supplémenté avec du sérum de cheval (5%) et de l'AlbuMax® I (5%).

Tableau I : Composition des milieux de culture testés pour la conservation *ex vivo* d'isolats de gamétocytes de terrain

Composant	Numéro de Catalogue	Milieu de Culture au Sérum (SCM)	Milieu de Culture à Albumax (ACM)	Milieu de Culture au Sérum+Albumax (SACM)
RPMI 1640	Gibco, cat# 31800	qsp	qsp	qsp
HEPES	SIGMA, cat# H3375	25 mM	25 mM	25 mM
Bicarbonate de Sodium	SIGMA, cat# S5761	25 mM	25 mM	25 mM
Sérum de Cheval (inactivé par la chaleur)	MERCK, cat# H1270-500ml	10%	0%	5%
Albumax	Gibco, cat# 11020	0	10%	5%

4.7.3. Évaluation *ex vivo* des milieux de culture

La première étape consistait à tester les trois milieux de culture (SCM, ACM et SACM) pendant 24 heures en condition de culture (Figure 15). Pour chaque isolat, le culot de sang parasité a été resuspendu dans le SCM, le SACM et l'ACM. Les différents flasques de culture sont maintenus en condition de culture pendant 24 heures (Figure 15).

Les échantillons sont ensuite utilisés pour les tests d'infestation. L'impact des conditions de culture *ex vivo* a été évalué en comparant la prévalence et la densité des oocystes entre les conditions DMFA (infectiosité initiale versus infectiosité du milieu de culture).

Le meilleur milieu de culture est ensuite utilisé pour une culture de 48 heures et pour l'établissement du test *ex vivo* d'exposition aux médicaments.

Les échantillons de sang sur anticoagulants ACD ont été transférés dans des tubes de centrifugation coniques de 15 ml préchauffés (FalconTM ; cat# 352099). Les tubes ont ensuite été centrifugés à 500 g pendant 5 min à 37°C pour collecter le plasma. Les culots de GR ont été immédiatement remis en suspension dans 15 ml de milieu de culture préchauffé à 4 % d'hématocrite. Le mélange a été transféré dans des flacons de culture de 75 cm² (MERCK, corning cat # CLS430641) qui ont été incubés à 37° C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ pendant 24 ou 48 heures. Pour l'expérience d'incubation de 48 heures, le milieu a été remplacé 24 heures après l'ensemencement avec la même composition de milieu.

Pour préparer les échantillons pour la DMFA, les échantillons incubés dans des conditions de culture ont été transférés dans des tubes coniques préchauffés de 15 ml et centrifugés à 500 g pendant 5 minutes à 37°C pour éliminer le milieu de culture. Le culot de GR a ensuite été remis en suspension dans un volume égal de sérum de cheval préchauffé (n° de cat. MERCK H1270- 500ml) et utilisé pour la DMFA.

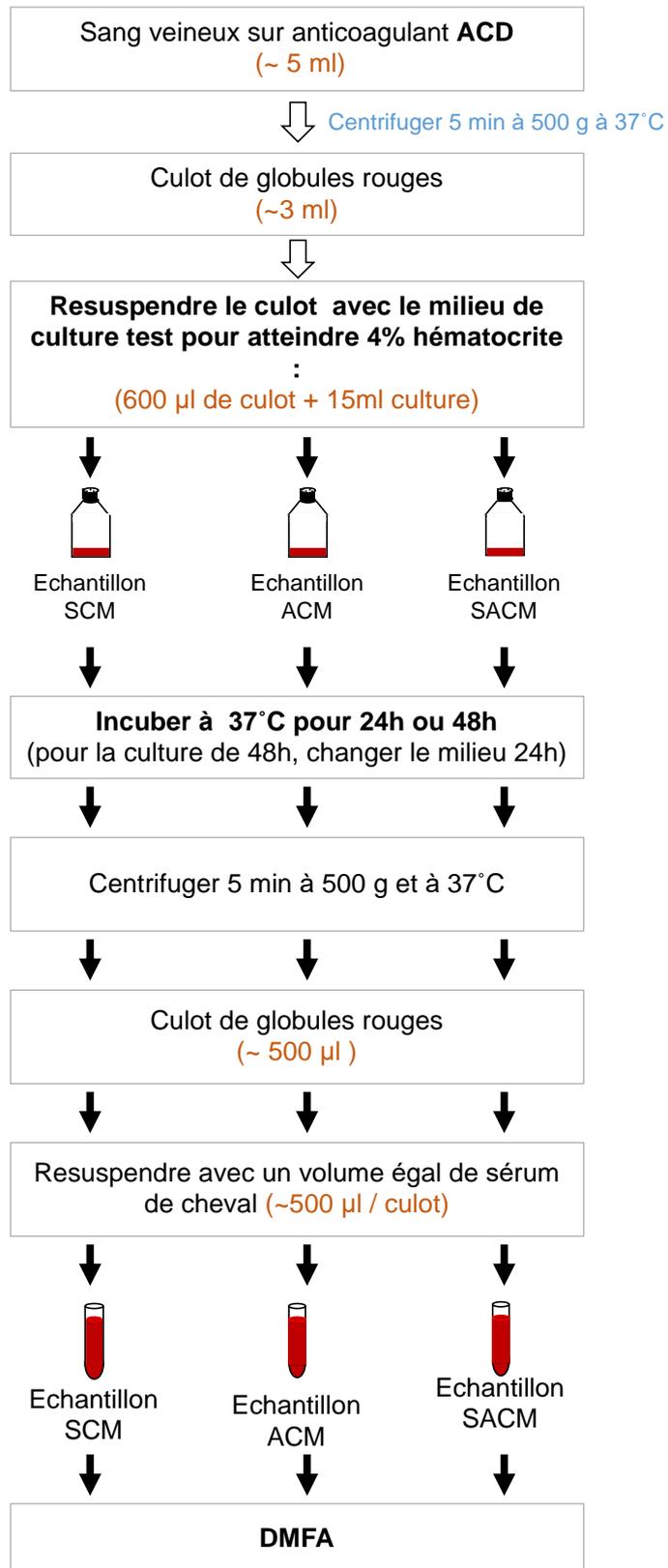


Figure 15: Procédures expérimentales pour évaluer les milieux de culture

4.7.4. Test d'infestation directe sur membrane (DMFA)

Les tests d'infestation directe sur membrane ont été réalisés avec des colonies d'*Anopheles coluzzii* provenant de moustiques capturés à l'état sauvage et élevés dans notre institution de recherche depuis plusieurs générations (79). Les moustiques ont été élevés à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ avec une humidité relative de $70 \pm 10\%$ (79). Les larves ont été nourries avec de la nourriture pour poissons et les adultes ont été nourris avec une solution sucrée à 10 % ou avec du sang humain provenant de la banque de sang du Mali pour maintenir la colonie.

Pour chaque échantillon de sang à tester, 50 moustiques placés dans deux pots (25 moustiques par pot) ont été utilisés. Les femelles âgées de quatre à six jours ont été affamées pendant environ 12 heures avant l'expérience d'infestation. Elles ont été nourries avec 500 μl de sang par pot de moustiques à travers la membrane jusqu'à ce qu'elles soient rassasiées (~10-15 mn).

Après le repas sanguin, les femelles ont été conservées dans l'insectarium. La température et l'humidité ont été contrôlées comme indiqué précédemment (79).

Le huitième jour après DMFA, les moustiques survivants ont été disséqués dans du mercurochrome à 0,5 % sous un microscope optique (objectifs 10 et 40) pour la détection et la quantification des oocystes. Les résultats ont été exprimés en prévalence d'oocystes (la proportion de moustiques infectés) et en densité d'oocystes (le nombre moyen d'oocystes par moustique, y compris les moustiques négatifs).

4.8. Évaluation *ex vivo* de l'activité bloquante des antipaludiques de référence et des molécules candidates sur la transmission des gamétocytes

Pour établir le test *ex vivo* nous avons évalué l'activité bloquante de trois antipaludiques sur la transmission. Il s'agissait de :

- ❖ la chloroquine, une 4- aminoquinoléine, qui n'a pas d'activité gamétocytocide contre les stades gamétocytaires matures (80)
- ❖ la dihydroartémisinine, un endopéroxyde, dont l'activité gamétocytocide a été démontrée dans le cadre de l'étude SMFA (17,80,81)
- ❖ la primaquine, médicament antipaludique connu pour bloquer la transmission sur le terrain (82–84).

La deuxième étape consistait à évaluer l'activité de deux molécules candidates :

- ❖ KDU691, un inhibiteur spécifique de la phosphatidylinositol-4-OH kinase (PI4K) de *Plasmodium* (12).
- ❖ l'imidazolopipérazine GNF179 (11).

Pour le test des médicaments, les gamétocytes isolés sur le terrain ont été pré-exposés *ex vivo* pendant 48 heures à différentes concentrations des médicaments sélectionnés avant l'infestation des moustiques. Pour chaque médicament, cinq concentrations ont été testées. Le meilleur milieu de culture a été complété avec du DMSO (concentration finale de 0,02%, control négatif) ou avec le médicament.

Préparation des médicaments

Les médicaments ont été préparés sous forme de solution mère de 1M soit dans H₂O (chloroquine, oryzalin) soit dans DMSO (dihydroartémisinine, primaquine, KDU691, GNF179) et conservés à - 20°C. Chaque médicament a été testé à cinq concentrations, y compris le contrôle DMSO (non traité ou sans médicament).

Les concentrations de médicaments à tester ont été sélectionnées sur la base des données publiées sur la CI₅₀ (17,80–84). La chloroquine a été ajoutée au SCM à des concentrations finales de 500 nM, 1µM, 2µM et 10µM. La dihydroartémisinine a été ajoutée au SCM à des concentrations finales de 50nM, 100nM, 200nM et 1µM. La primaquine a été ajoutée au SCM à des concentrations finales de 1µM, 2,5µM, 7,5µM et 10µM. KDU691 a été ajouté à des concentrations finales de 10nM, 100nM, 1µM et 2µM. L'imidazolopipérazine GNF179 a été ajoutée à des concentrations finales de 5nM, 10nM, 15nM et 100nM.

L'impact de l'exposition *ex vivo* des gamétocytes aux différents médicaments a été réalisé comme décrite dans la section 4.7.3 et 4.7.4.

4.9. Analyse des données

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism (version 9) et du studio R. Pour déterminer les paramètres de culture optimaux, la prévalence et la densité des oocystes ont été analysées en comparant ces paramètres d'infectivité entre les conditions de traitement des échantillons à l'aide du Wilcoxon test avec un niveau de signification de 5 % ($p < 0,05$). L'activité bloquante sur la transmission correspondant au pourcentage d'inhibition a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 * \left[1 - \frac{\text{(Proportion de moustiques positifs dans le groupe de test)}}{\text{(Proportion de moustiques positifs dans le groupe contrôle)}} \right]$$

Prise en charge des participants de l'étude

Les patients ont été traités au centre de santé par voie orale avec la pyronaridine-artésunate (Pyramax®) selon leur poids corporel :

- Pyramax 60/20 mg en granules pour suspension pour les enfants de 5 à 19 kg.
- Pyramax 180/60 mg en comprimés pour adultes et enfants dont le poids est supérieur ou égal à 20 kg.

Le nombre de prise était une fois par jour pendant trois jours consécutifs (85,86).

Tous les enfants dépistés porteurs de stades asexués de *Plasmodium* ont été traités tout de suite. Les participants sélectionnés comme donneurs de gamétocytes pour l'étude DMFA et positifs pour les stades asexués de *Plasmodium* ont été traités le jour suivant le prélèvement de sang veineux. Tous les participants enrôlés ont été suivis activement pendant 28 jours (J0, J1, J2, J3, J7, J14, J21 et J28).

4.10. Considérations éthiques et déontologiques

Le protocole de recherche de l'étude a été approuvé par le Comité d'Éthique Institutionnel de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Avant de commencer l'étude, les autorités administratives, sanitaires, civiles et coutumières de Faladjè ont été rencontrées pour leur expliquer notre protocole d'étude en vue d'obtenir la permission

communautaire. La participation à l'étude était entièrement volontaire et le consentement ou l'assentiment éclairé du patient ou des parents ou personnes en charge des enfants était obtenu avant toute inclusion. Pour une meilleure compréhension, une traduction dans la langue locale du contenu de la fiche de consentement/assentiment était faite par un interprète aux volontaires ne comprenant pas le français. Le volontaire ou les parents avaient à tout moment la permission de se retirer ou retirer leurs enfants de l'étude.

RESULTATS

5. RESULTATS

Au total, 87 patients ont été inclus dans cette étude.

5.1. Profil de l'étude

Au cours de cette étude 1586 individus âgés de 6 ans et plus ont été invités au centre de santé de Faladjè pour identifier les porteurs asymptomatiques de gamétocytes de *P. falciparum* (**Figure 16**). 1208 individus (76,2%) avaient une goutte épaisse négative. Sur les 378 individus qui avaient une goutte épaisse positives, 76.9 % ne répondaient pas aux critères d'inclusion. Au total 87 participants ont pu être enrôlé dans l'étude.

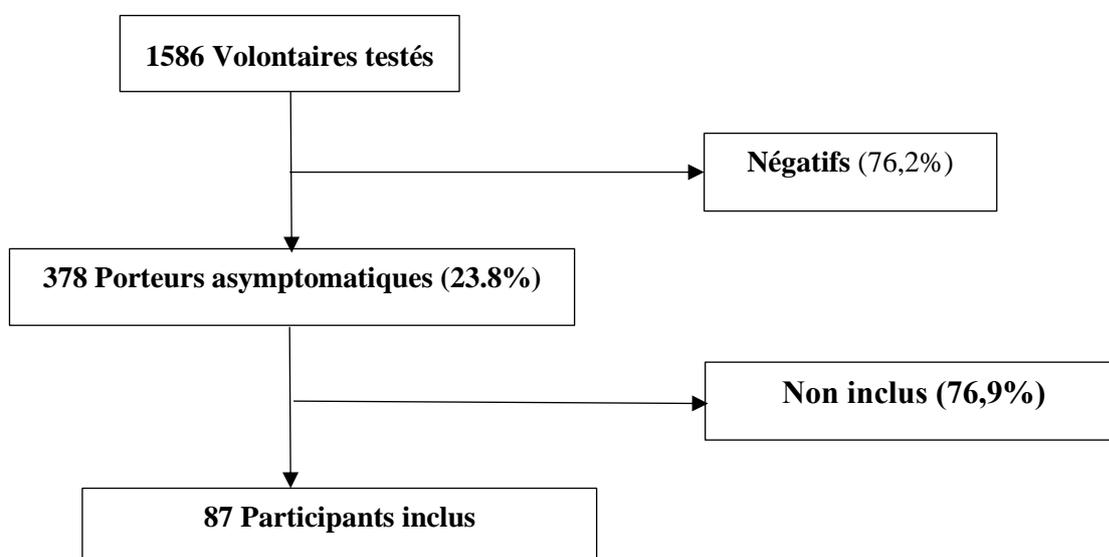


Figure 16: Profil de l'étude

Paramètres socio-démographiques, hématologiques et parasitologiques des donneurs en fonction des milieux de culture.

Tableau II: Répartition des donneurs en fonction des milieux de culture

Numéro de l'échantillon	Conditions expérimentales	Age du donneur	Genre	Hémoglobine (g/dl)	<i>P.f.</i> formes asexuées (Tf/ μ l)	<i>P.f.</i> gamétoocytes (Gams/ μ l)
S01	Ht 4%, 24h culture & testing 3 Media (SCM, ACM & SACM)	9	F	11.4	1960	24
S02		8	M	9.9	1040	32
S03		9	M	8.5	600	160
S04		8	M	10.9	600	384
S05		14	F	11.7	32	360
S06		8	M	9.9	0	96
S07		9	M	8.5	0	96
S08	Ht 4%, 48h culture, SCM	7	M	10.9	0	32
S09		11	F	12.7	960	48
S10		11	F	10.9	28480	64
S11		13	F	12.9	0	16
S12		8	F	11.3	3600	24
S13		13	M	13.1	0	32
S14		11	M	14	0	72
S15		12	M	13	0	16
S16		12	F	12.4	0	24
S17		11	F	12.7	720	32
S18	8	F	11.3	0	40	
S19	CQ	6	F	9.3	47564	1220
S20		13	M	12.1	32	56
S21		11	M	10.9	107	63
S22		15	F	12.9	32	48
S23		15	F	12.9	16	253
S24		6	F	9.3	0	143
S25		11	M	10.9	2641	88
S26	DHA	11	F	12.3	16159	1198
S27		9	M	10.7	3208	24
S28		11	M	11.7	538	279
S29		6	F	10.2	0	258

S30	PRQ	7	F	11.2	0	127
S31		7	F	12.1	1419	47
S32		7	F	12.1	0	56
S33		11	F	12.3	16159	1198
S34	KDU691	8	M	8.1	4593	777
S35		6	F	10	0	3888
S36		7	M	10.6	27429	64
S37		8	M	8.1	0	64
S38		6	F	10	0	904
S39		7	M	10.6	0	568
S40	GNF179	9	F	11.6	111	376
S41		10	M	13	686	380
S42		9	M	12.4	29373	2845
S43		10	M	13	0	356
S44		9	M	12.4	0	954
S45		6	M	8.5	26819	151
S46		7	F	11.2	4627	72
Moyenne		9.3	-	11.2	4771.8	391.5
min		6	-	8.1	0	16
Max		15	-	14	47564	3888

5.2. Détermination des conditions optimales pour maintenir viables et infectieux les gamétocytes isolés sur le terrain

5.2.1. Évaluation des milieux de culture SCM, ACM et SACM pendant 24 heures

5.2.1.1. Récapitulatif de l'infestation expérimentale pour le maintien *ex vivo* de 24 heures

Pour déterminer le meilleur milieu de culture pour le maintien *ex vivo* des gamétocytes provenant des patients, nous avons utilisé le sang provenant de 7 donneurs (isolats) *et nous avons réalisé 35 DMFA* (Tableau III). Les densités gamétocytiques variaient de 24 à 384 gamétocytes par microlitre de sang selon les échantillons (Tableau II, Tableau III).

Tableau III : Récapitulatif de l'infestation expérimentale pour le maintien *ex vivo* de 24 heures

Nombre d'isolats cliniques	7
Nombre de DMFA	35
Densité gamétocytaire (gams / μl)	24-384
Nombre de moustiques disséqués	
WB-DMFA	335
SR-DMFA	322
SCM-DMFA	269
ACM-DMFA	301
SACM-DMFA	282

5.2.1.2. Infectiosité des gamétocytes avant (initiale) et 24 heures après maintien dans différents milieux

La prévalence oocystique était de 30,6 % et de 38,2 % pour les échantillons WB-DMFA et SR-DMFA, respectivement (Figure 17A). La densité moyenne des oocystes était significativement plus élevée pour les échantillons SR-DMFA que ceux de WB-DMFA (5,02 vs 2,5 oocystes/moustique, $p=0,02$) (Figure 17B).

Par rapport au SR-DMFA, la prévalence des oocystes a augmenté de manière significative pour atteindre 52,4 % lorsque les gamétocytes collectés ont été maintenus dans le SCM ($p=0,03$) pendant 24 heures (Figure 17A).

Les conditions *ex vivo* utilisant le SCM n'ont pas affecté le nombre d'oocystes par moustique (5,02 vs 4 oocystes/estomac pour SR et SCM, respectivement) (Figure 17B).

Les données montrent que des trois milieux de culture testés, le SCM était le mieux adapté pour préserver la viabilité et l'infectiosité des gamétocytes en *ex vivo* à 24 heures ($p=0,02$ et $p=0,001$ pour la prévalence des oocystes et la densité des oocystes, respectivement).

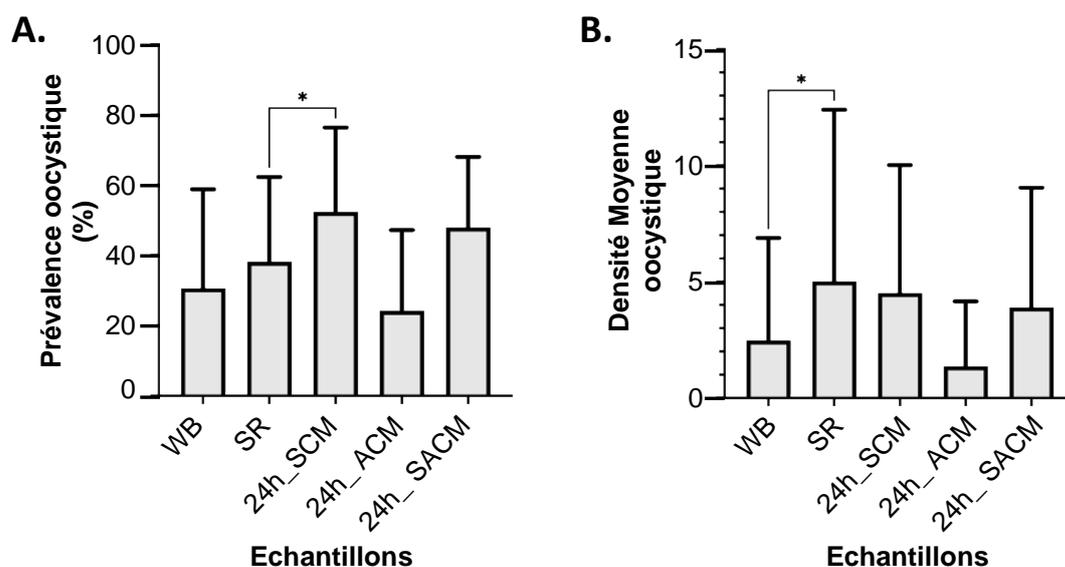


Figure 17: Infectiosité des gamétocytes avant (initiale) et 24 heures après maintien dans différents milieux

A) Prévalence oocystique initiale (WB et SR) et après 24 heures de maintien ex vivo dans les milieux SCM, ACM et SACM ; B) Densité oocystique initiale et après 24 heures de maintien ex vivo dans les milieux SCM, ACM et SACM

5.2.2. Évaluation du milieu de culture SCM pendant 48 heures

5.2.2.1. Récapitulatif de l'infestation expérimentale pour l'évaluation du milieu SCM pendant 48 heures

Pour déterminer l'infectiosité des gamétocytes après 48 heures de maintien dans les conditions de culture *ex vivo*, nous avons utilisé le sang provenant de 11 donneurs (isolats) et nous avons réalisé 33 DMFA (Tableau IV). Les densités gamétocytiques variaient de 16 à 64 gamétocytes par microlitre de sang selon les échantillons (Tableau II, Tableau IV).

Tableau IVV : Récapitulatif de l'infestation expérimentale pour l'évaluation du milieu SCM pendant 48 heures

Nombre d'isolats cliniques	11
Nombre de DMFA	33
Densité gamétocytaire (gams / μ l)	16-64
Nombre de moustiques disséqués	
WB-DMFA	546
SR-DMFA	580
SCM-DMFA	416

5.2.2.2. Infectiosité des gamétocytes avant (initiale) et 48 heures après maintien dans le milieu SCM

En utilisant le SCM comme milieu de culture de base, nous avons évalué l'infectiosité des gamétocytes après 48 heures d'exposition en *ex vivo* aux conditions de culture, ce qui correspond à la durée d'exposition utilisée pour la plupart des tests de dépistage des médicaments contre *P. falciparum* (Figure 18). Les données de la figure 18 montrent que l'infectiosité des gamétocytes cultivés *ex vivo* est comparable à celle des échantillons SR (prévalence des oocystes : 23,9 contre 15,5 p=0,1, intensité des oocystes : 1,5 contre 0,6 oocyste par moustique p=0,06).

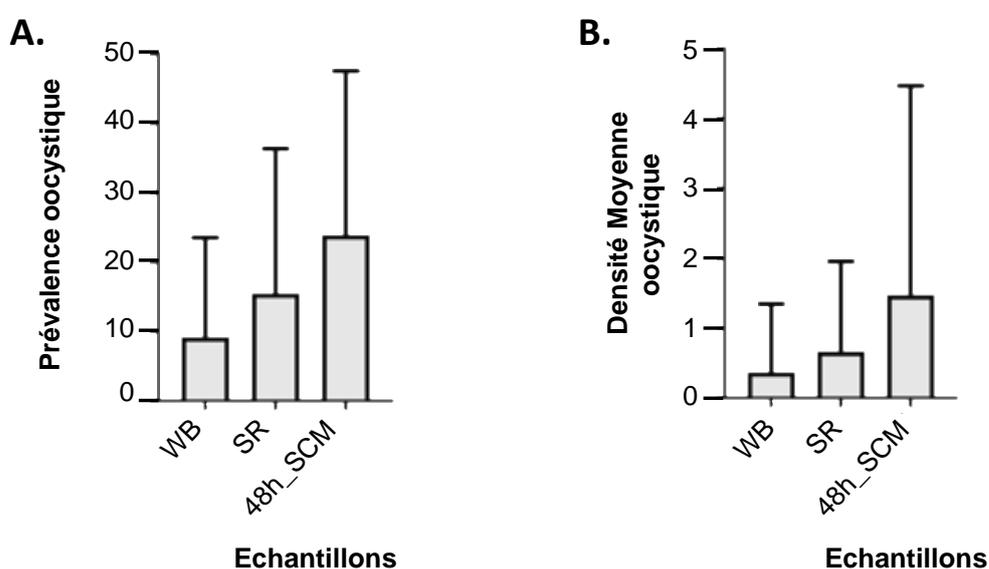


Figure 18: Infectiosité des gamétocytes avant (initiale) et 48 heures après maintien dans le milieu SCM

A) Prévalence oocystique initiale et après 48 heures de maintien *ex vivo* dans le milieu SCM ; B) densité oocystique initiale et après 48 heures de maintien *ex vivo* dans le milieu SCM

5.3. Mesure *ex vivo* de l'activité bloquante des antipaludiques de référence sur la transmission des gamétocytes

5.3.1. Récapitulatif de l'infestation expérimentale après 48 heures d'exposition aux antipaludiques de référence

Pour déterminer l'infectiosité des gamétocytes après 48 heures de traitement *ex vivo* avec les antipaludiques de référence (CQ, DHA, PRQ) nous avons utilisé le sang provenant de 15 donneurs (isolats) et nous avons réalisé 105 DMFA (Tableau V). Les densités gamétocytiques variaient de 24 à 1220 gamétocytes par microlitre de sang selon les échantillons (Tableau II, Tableau V).

Tableau V: Récapitulatif de l'infestation expérimentale après 48 heures d'exposition aux antipaludiques de référence

	ANTIPALUDIQUES TESTÉS		
	CQ	DHA	PRQ
Nombre d'isolats cliniques	7	4	4
Nombre de DMFA	49	28	28
Densité gamétocytaire (gams / μl)	48-1220	24-1198	47-1198
Nombre de moustiques disséqués			
WB-DMFA	205	88	90
SR-DMFA	203	93	93
SCM-DMSO	231	128	57
SCM-Conc 1	224	120	68
SCM-Conc 2	226	117	78
SCM-Conc 3	236	118	73
SCM-Conc 4	218	122	82

Concentration croissante


5.3.2. Infectiosité des gamétocytes 48 heures après exposition *ex vivo* aux antipaludiques de référence

La chloroquine n'a pas réussi à éliminer la formation d'oocystes à 10 μ M (Figure 19A). Les données de la figure 19B indiquent que la dihydroartémisinine n'élimine pas la formation d'oocystes à 1 μ M mais qu'elle a une activité de blocage de la transmission d'environ 78,5 % à cette concentration. La primaquine inhibe la formation d'oocystes de 19 % à 1 μ M et (Figure 19C) et abolit la formation d'oocystes à 7,5 μ M.

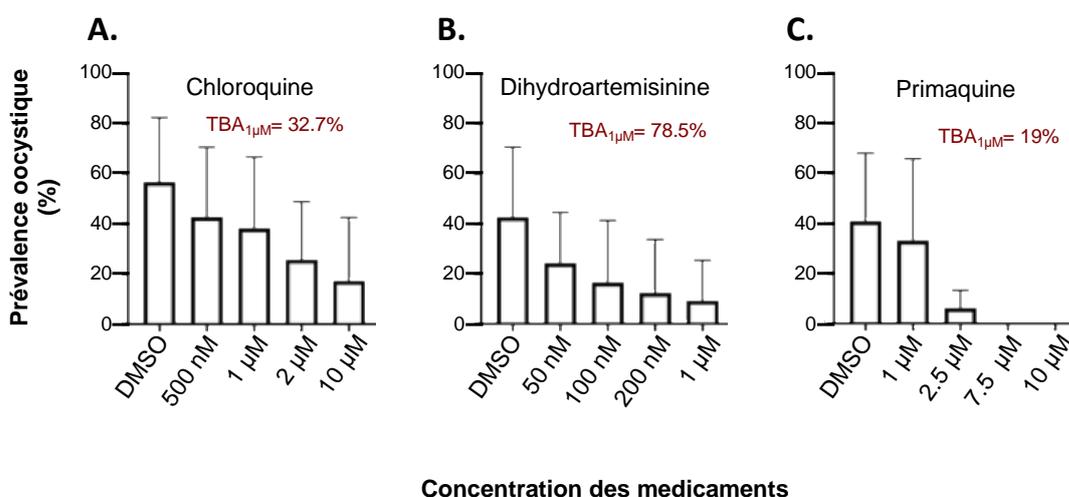


Figure 19: Infectiosité des gamétocytes après exposition *ex vivo* aux antipaludiques de référence

A) Prévalence oocystique après 48 heures d'exposition à la chloroquine à différentes concentrations ; B) Prévalence oocystique après 48 heures d'exposition à la dihydroartémisinine à différentes concentrations ; C) Prévalence oocystique après 48 heures d'exposition à la primaquine à différentes concentrations

5.4. Mesure *ex vivo* l'activité bloquante des molécules candidates sur la transmission des gamétocytes

5.4.1. Récapitulatif de l'infestation expérimentale après 48 heures d'exposition aux molécules candidates antipaludiques

L'activité du KDU691 et du GNF179 a été testée sur six et sept isolats, respectivement (Tableau VI). Nous avons réalisé 91 DMFA (Tableau VI). Les densités gamétoctiques variaient de 64 à 3888 gamétocytes par microlitre de sang selon les échantillons (Tableau II, Tableau VI).

Tableau VII : Récapitulatif de l'infestation expérimentale après 48 heures d'exposition aux molécules candidates antipaludiques

	Molécules candidates	
	KDU-691	GNF-179
Nombre d'isolats cliniques	6	7
Nombre de DMFA	42	49
Densité gamétoctique (gams / μl)	64-3888	72-2845
Nombre de moustiques disséqués		
WB-DMFA	161	155
SR-DMFA	144	181
SCM-DMSO	173	161
SCM-Conc 1	158	148
SCM-Conc 2	192	146
SCM-Conc 3	166	132
SCM-Conc 4	163	156

Concentration croissante ↓

5.4.1.1. Infectiosité des gamétoocytes 48 heures après exposition *ex vivo* aux molécules candidates antipaludiques

Comme le montre la figure 20A, le KDU691 a empêché la formation d'oocystes à 1 μ M. L'imidazolopipérazine GNF179 a montré une forte activité gamétocytocide puisqu'elle a aboli la formation d'oocystes à 5nM (Figure 20B).

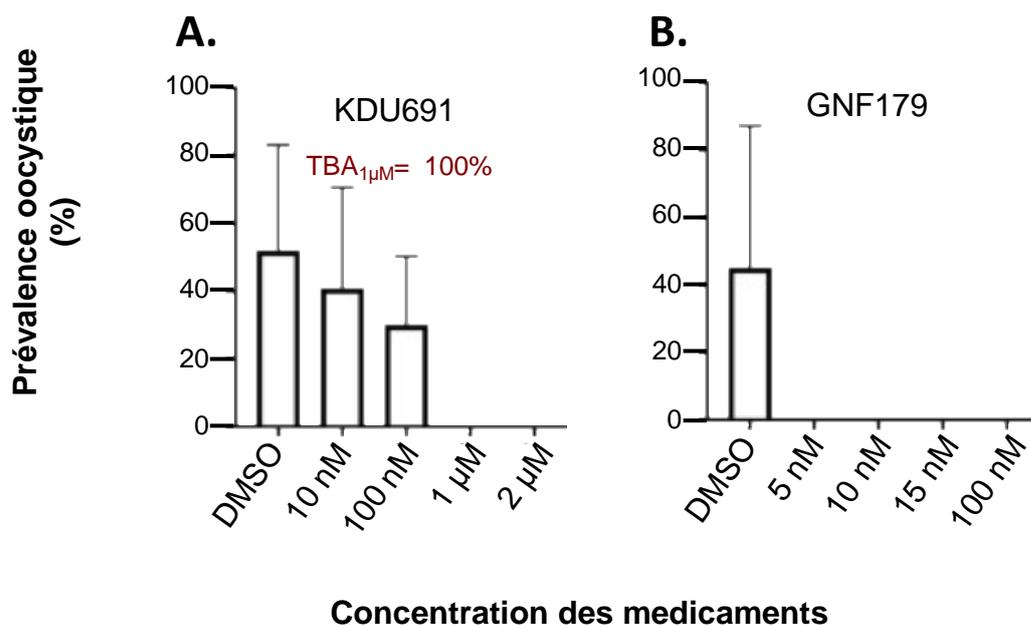


Figure 20 : Infectiosité des gamétoocytes 48 heures après exposition *ex vivo* aux molécules candidates antipaludiques

A) Prévalence oocystique après 48 heures d'exposition au KDU691 à différentes concentrations ; **B)** Prévalence oocystique après 48 heures d'exposition GNF179 à différentes concentrations

5.5. Organigramme expérimental du nouveau test *ex-vivo* d'évaluation de l'activité bloquante de candidats antipaludiques sur la transmission des gamétocytes de *Plasmodium falciparum*

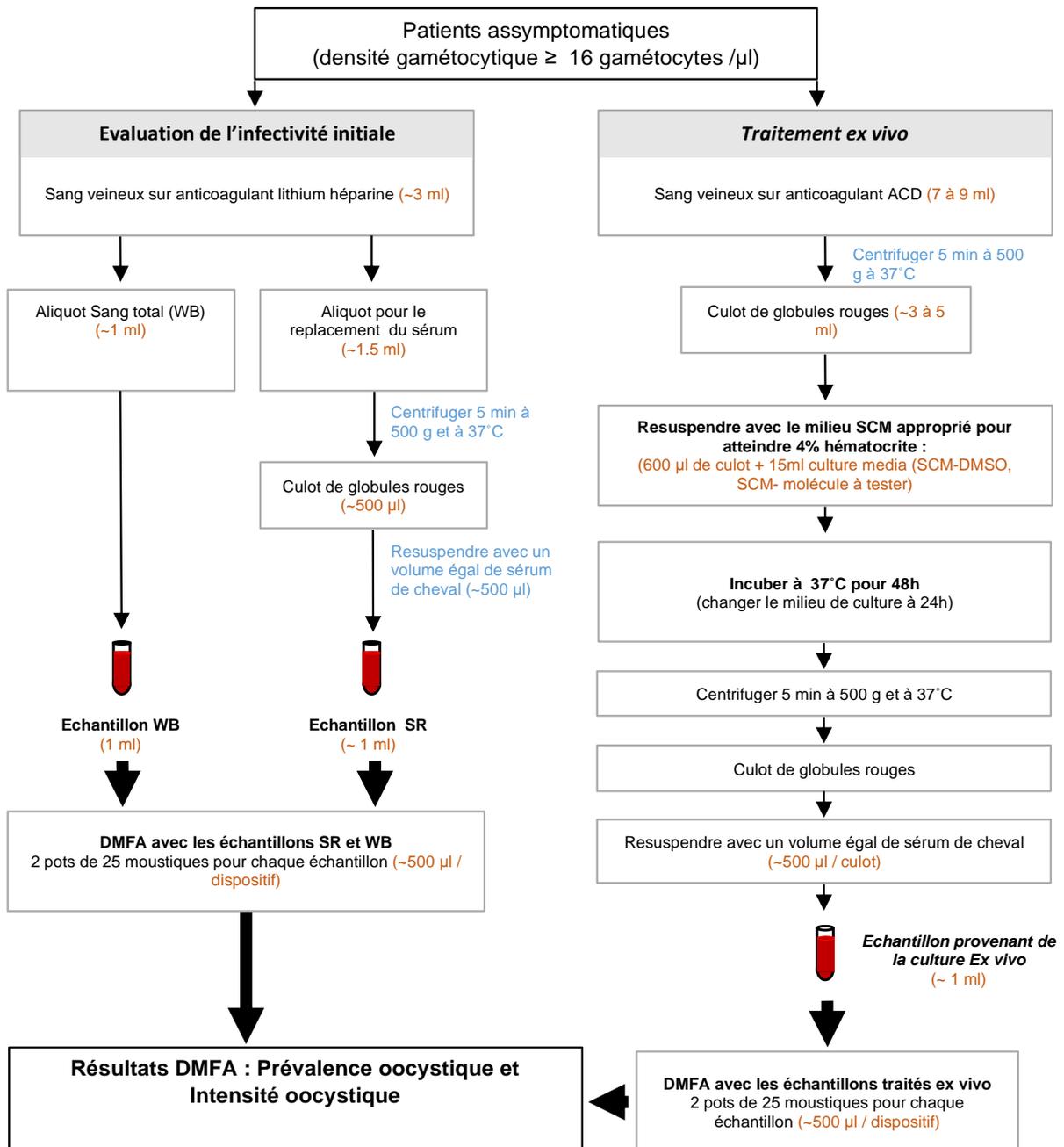


Figure 21 : Organigramme du plan d'expérience pour l'évaluation *ex vivo* de la viabilité et de l'infectiosité des gamétocytes isolés sur le terrain

Tout d'abord, l'infectiosité initiale des gamétocytes isolés sur le terrain a été déterminée à l'aide des échantillons de sang héparinés. Les échantillons ont été traités et donnés aux moustiques 45 à 90 minutes après le prélèvement sanguin. Les échantillons de sang prélevés dans des tubes sur anticoagulant (ACD) ont été dilués dans le milieu de culture au sérum (SCM) auquel des médicaments ont été ajoutés. Chaque médicament a été testé dans une série de 5 concentrations. Les échantillons ainsi obtenus ont été incubés à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂ pendant 48 heures. Les échantillons ont ensuite été préparés pour des tests d'infestation directe sur membrane (DMFA). La prévalence oocystique et la densité oocystique ont été évaluées 8 jours après le repas de sang.

DISCUSSION

6. DISCUSSION

Le développement et la validation d'un essai *ex vivo* évaluant l'activité gamétocytocide des médicaments directement sur les gamétocytes provenant des patients est d'une valeur inestimable pour la lutte contre le paludisme. Cet essai permettra d'évaluer l'activité des médicaments dans les conditions réelles des régions où le paludisme est endémique en prenant en compte la diversité génétique des parasites et des différents hôtes ainsi que les facteurs environnementaux.

Notre essai décrit pour la première fois un protocole optimisé pour maintenir des isolats de terrain de gamétocytes de *P. falciparum* infectieux pour le moustique *Anophèles* après une exposition *ex vivo* à des conditions de culture pendant 48 heures. Sur la base de ce nouveau protocole, nous avons ensuite établi un test de chimiosensibilité pour évaluer l'activité bloquante des molécules sur l'infectivité des moustiques. Les gamétocytes provenant de patients sont pré-exposés à des différentes doses de médicaments pendant 48 heures. L'échantillon ainsi obtenu est utilisé pour l'infestation expérimentale des moustiques. Les résultats obtenus à partir de notre essai *ex vivo* corrobore l'activité bloquante des antipaludiques de référence sur la transmission, notamment la chloroquine, la dihydroartémisinine et la primaquine. En outre, nous démontrons que les membres de deux nouvelles classes de composés, l'imidazopyrazine KDU691 et l'imidazolopipérazine GNF179, inhibent fortement la transmission des isolats cliniques de gamétocytes.

De nombreux essais ont été conçus pour évaluer l'activité de blocage de la transmission des composés sur les parasites *Plasmodium*, en mettant l'accent sur les gamétocytes de stade cinq qui assurent la transmission aux moustiques anophèles (16–21). Cependant, la plupart de ces tests utilisent des isolats adaptés au laboratoire et ne parviennent pas à capturer la diversité de la population de *Plasmodium* ni à fournir un aperçu de la sensibilité des isolats cliniques aux composés candidats. L'infestation expérimentale des moustiques reste l'outil de référence pour mesurer la capacité d'une molécule à inhiber le développement du parasite chez le moustique (87,88). Cependant, à ce jour, l'absence de paramètres optimisés pour garantir la transmissibilité des gamétocytes quelques jours après les prélèvements de sang sur les personnes infectées limite l'utilisation des gamétocytes isolés sur le terrain dans les essais standard de chimiosensibilité (89,90).

Sur la base des protocoles disponibles pour l'adaptation des isolats cliniques de *Plasmodium* et la production *in vitro* de gamétocytes, nous avons testé plusieurs variables : le sérum

commercial versus AlbuMax, le sang total (WB) versus le sérum remplacé (SR), et différents temps d'incubation (24 et 48 heures). Ces expériences nous ont permis de déterminer les conditions optimales de culture qui assurent l'infectiosité des gamétocytes au moins deux jours après le prélèvement de l'échantillon veineux (69–78).

Pour chaque isolat, nous avons déterminé l'infectivité initiale (échantillon WB et SR) et l'infectivité après 24 heures d'exposition des isolats de terrain à différents milieux de culture (SCM, ACM, SACM). En comparant les variables d'infectivité mesurées (prévalence oocystiques et densité oocystiques), nous avons constaté qu'en établissant la culture à 4 % hémocrite dans un milieu de culture complété par 10 % de sérum de cheval inactivé (SCM), suivi d'une incubation dans une atmosphère humidifiée contenant (5 % de CO₂) pendant 24 ou 48 heures, nous améliorons l'infectiosité des gamétocytes. Comme démontrés par d'autres études, nous montrons que le sérum de cheval est approprié pour le maintien *ex vivo* des gamétocytes de *P. falciparum* provenant de patient (72,77–79,91,92). Nos expériences démontrent que les gamétocytes de *P. falciparum*, fraîchement prélevés sur des individus naturellement infectés, peuvent être maintenus *ex vivo* jusqu'à 48 h dans des conditions spécifiques.

Le test de chimiosensibilité a été établi et validé en pré-exposant, *ex vivo* pendant 48 heures, les gamétocytes collectés à des médicaments avant le DMFA. Les activités bloquantes sur la transmission de la chloroquine (TBA_{1μM} 32,7%), de la dihydroartémisinine (TBA_{1μM} 78,5), de la primaquine (TBA_{1μM} 19%), du KDU691 (TBA_{1μM} 100%), et du GNF179 (TBA_{5nM} =100%) ont été évaluées. Dans l'ensemble, nos résultats corroborent l'activité bloquante rapportée pour tous les composés de référence testés dans notre essai *ex vivo* (13,14). *Delves et al.*, ont montré que la chloroquine avait une activité bloquante sur la transmission entre 25%-49% à 10 μM (93). *Bolscher et al.* ont trouvé une inhibition d'oocystes d'environ 90% à 1 μM avec la DHA (17). Les données montrent que la prévalence des oocystes diminue avec l'augmentation de la concentration de chloroquine et de dihydroartémisinine (17,80,81).

Dans notre essai, la primaquine, un antipaludique doté d'une activité bloquante *in vivo*, a empêché la formation d'oocystes à forte concentration (82–84,94). *Plouffe et al.* ont trouvé *in vitro* une EC₅₀ de 6,5 μM de la primaquine (14). La concentration élevée de primaquine, également rapportée par d'autres auteurs, était attendue car les amino-8-quinolines doivent être métabolisées pour être actives (95,96).

Comme indiqué précédemment, KDU691 et l'imidazolopipérazine GNF179 inhibent tous deux fortement la transmission à des concentrations nanomolaires (11,12). En 2013, *McNamara et al.* ont montré une inhibition complète de la transmission avec le KDU691 à 1 μM (12). Enfin, avec le GNF179, *Plouffe et al.* obtient une activité de blocage de la transmission de 100% à 15 nM (14).

7. LIMITES

- ❖ Pour ce type d'étude, il est essentiel de procéder aux différentes expériences pendant la saison de transmission et plus précisément vers la fin de la saison de transmission car c'est à cette période que les gamétocytes sont plus infectieux.
- ❖ Cet essai de blocage de la transmission demande un grand budget car le cout pour tester une seule molécule avoisine les 12000 \$ USD.

CONCLUSION

8. CONCLUSION

Nous avons développé et validé un nouvel essai *ex vivo* qui permet d'évaluer l'activité bloquante des médicaments sur la transmission des gamétocytes. Nos résultats des tests de médicaments corroborent l'activité des médicaments de référence et des molécules en cours de développement clinique. Cette approche accélérera la conduite du développement de nouveaux médicaments candidats et soutiendra le programme mondial d'éradication du paludisme.

RECOMMANDATIONS

9. RECOMMANDATIONS

Au terme de ce travail, nous recommandons :

❖ **Aux chercheurs :**

De vulgariser ce test pour qu'il soit implémenté dans d'autres laboratoires de la sous-région.

❖ **Aux firmes pharmaceutiques :**

D'inclure ce nouveau test au processus des essais pré-cliniques des futurs antipaludiques

REFERENCES

10. REFERENCE

1. Organization WH. World malaria report 2022. World Health Organization; 2022. 372 p.
2. OMS. Rapport 2021 sur le paludisme dans le monde Dossier d ' information Principaux messages. 2021;
3. Chu CS, Freedman DO. Tafenoquine and G6PD: a primer for clinicians. *J Travel Med.* 1 juin 2019;26(4):taz023.
4. Luzzatto L, Bienzle U. The malaria/G.-6-P.D. hypothesis. *Lancet Lond Engl.* 2 juin 1979;1(8127):1183-4.
5. Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. G6PD deficiency: global distribution, genetic variants and primaquine therapy. *Adv Parasitol.* 2013;81:133-201.
6. Wadi I, Singh P, Nath M, Anvikar AR, Sinha A. Malaria transmission-blocking drugs: implications and future perspectives. *Future Med Chem.* juin 2020;12(11):1071-101.
7. Vos MW, Stone WJR, Koolen KM, van Gemert GJ, van Schaijk B, Leroy D, et al. A semi-automated luminescence based standard membrane feeding assay identifies novel small molecules that inhibit transmission of malaria parasites by mosquitoes. *Sci Rep.* 21 déc 2015;5:18704.
8. Wadi I, Nath M, Anvikar AR, Singh P, Sinha A. Recent advances in transmission-blocking drugs for malaria elimination. *Future Med Chem.* déc 2019;11(23):3047-88.
9. Rottmann M, McNamara C, Yeung BKS, Lee MCS, Zou B, Russell B, et al. Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. *Science.* 3 sept 2010;329(5996):1175-80.
10. Kuhen KL, Chatterjee AK, Rottmann M, Gagaring K, Borboa R, Buenviaje J, et al. KAF156 is an antimalarial clinical candidate with potential for use in prophylaxis, treatment, and prevention of disease transmission. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2014;58(9):5060-7.
11. Meister S, Plouffe DM, Kuhen KL, Bonamy GMC, Wu T, Barnes SW, et al. Imaging of Plasmodium liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science.* 9 déc 2011;334(6061):1372-7.
12. McNamara CW, Lee MC, Lim CS, Lim SH, Roland J, Simon O, et al. Targeting Plasmodium PI(4)K to eliminate malaria. *Nature.* 12 déc 2013;504(7479):248-53.
13. Baragaña B, Hallyburton I, Lee MCS, Norcross NR, Grimaldi R, Otto TD, et al. A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. *Nature.* 18 juin 2015;522(7556):315-20.
14. Plouffe DM, Wree M, Du AY, Meister S, Li F, Patra K, et al. High-Throughput Assay and Discovery of Small Molecules that Interrupt Malaria Transmission. *Cell Host Microbe.* 13 janv 2016;19(1):114-26.

15. White NJ, Duong TT, Uthaisin C, Nosten F, Phyo AP, Hanboonkunupakarn B, et al. Antimalarial Activity of KAF156 in Falciparum and Vivax Malaria. *N Engl J Med.* 22 sept 2016;375(12):1152-60.
16. Wadi I, Anvikar AR, Nath M, Pillai CR, Sinha A, Valecha N. Critical examination of approaches exploited to assess the effectiveness of transmission-blocking drugs for malaria. *Future Med Chem.* nov 2018;10(22):2619-39.
17. Bolscher JM, Koolen KMJ, van Gemert GJ, van de Vegte-Bolmer MG, Bousema T, Leroy D, et al. A combination of new screening assays for prioritization of transmission-blocking antimalarials reveals distinct dynamics of marketed and experimental drugs. *J Antimicrob Chemother.* mai 2015;70(5):1357-66.
18. Reader J, Botha M, Theron A, Lauterbach SB, Rossouw C, Engelbrecht D, et al. Nowhere to hide: interrogating different metabolic parameters of Plasmodium falciparum gametocytes in a transmission blocking drug discovery pipeline towards malaria elimination. *Malar J.* 22 mai 2015;14:213.
19. Ruecker A, Mathias DK, Straschil U, Churcher TS, Dinglasan RR, Leroy D, et al. A male and female gametocyte functional viability assay to identify biologically relevant malaria transmission-blocking drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2014;58(12):7292-302.
20. Birkholtz LM, Alano P, Leroy D. Transmission-blocking drugs for malaria elimination. *Trends Parasitol.* mai 2022;38(5):390-403.
21. D'Alessandro S, Camarda G, Corbett Y, Siciliano G, Parapini S, Cevenini L, et al. A chemical susceptibility profile of the Plasmodium falciparum transmission stages by complementary cell-based gametocyte assays. *J Antimicrob Chemother.* mai 2016;71(5):1148-58.
22. Ngotho P, Soares AB, Hentzschel F, Achcar F, Bertuccini L, Marti M. Revisiting gametocyte biology in malaria parasites. *FEMS Microbiol Rev.* 1 juill 2019;43(4):401-14.
23. R. Migliani, J.-B. Meynard, J.-M. Milleliri, C. Verret CRappH de la lutte contre le paludisme dans l'armée française : de l'Algérie à l'Armée d'Orient pendant la PG mondiale. *M et STropicales* 2014;24(4):349 361. No Title.
24. Mathieu Gissot. Etude de la régulation transcriptionnelle des gènes lors du cycle érythrocytaire de Plasmodium falciparum To cite this version : HAL Id : tel-00008492. 2005;211.
25. BRUCE-CHWATT LJ, SANTE OMDELA. Chimiothérapie du paludisme. 2 éd. Vol. n°27, Série de monographie. 1984. p. 273 p.: tabl.; ill.graph.; réf.
26. Carnevale P, Manguin S, Corbel V, Fontenille D. *Les anophèles.* 2009.
27. Cissoko M, Magassa M, Sanogo V, Ouologuem A, Sangaré L, Diarra M, et al. Stratification at the health district level for targeting malaria control interventions in Mali. *Sci Rep.* 2022;12(1):1-17.

28. Tandina F, Doumbo O, Yaro AS, Traoré SF, Parola P, Robert V. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and mosquito-borne diseases in Mali, West Africa. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):1-12.
29. Niangaly A, Gunalan K, Ouattara A, Coulibaly D, Sá JM, Adams M, et al. Plasmodium vivax Infections over 3 Years in Duffy Blood Group Negative Malians in Bandiagara, Mali. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(3):744-52.
30. Bernabeu M, Gomez-Perez GP, Sissoko S, Niambélé MB, Haibala AA, Sanz A, et al. Plasmodium vivax malaria in Mali: A study from three different regions. *Malar J*. 2012;11:1-6.
31. Pradel G, Garapaty S, Frevert U. Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. 2002;45:637-51.
32. Frevert U, Usynin I, Baer K, Klotz C. Plasmodium sporozoite passage across the sinusoidal cell layer. *Subcell Biochem*. 2008;47:182-97.
33. Mota MM, Hafalla JCR, Rodriguez A. Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection. *Nat Med*. nov 2002;8(11):1318-22.
34. Robert V. PARASITOLOGIE Biologie de la transmission homme-moustique du. *Bull Soc Pathol Exot*. 2002;96(1):6-20.
35. Ouologuem DT, Dara A, Kone A, Ouattara A, Djimde AA. Plasmodium falciparum Development from Gametocyte to Oocyst: Insight from Functional Studies. *Microorganisms* [Internet]. 31 juill 2023 [cité 28 août 2023];11(8):1966. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/8/1966>
36. Sinden RE. .1993.1010. *Parasitology*. 1977;74(1):1-8.
37. Smalley ME, Brown J, Bassett NM. The rate of production of plasmodium falciparum gametocytes during natural infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75(2):318-9.
38. Daniels HE. The Royal Society is collaborating with JSTOR to digitize, preserve, and extend access to Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences. ® www.jstor.org. *Proc R Soc Lond*. 1945;313:509-29.
39. Manson-bahr P p II. Section of Cromptal Miteazes atit lparazitoloop Malaria in Nyasaland. 1934;1:11-24.
40. Drakeley CJ, Bousema JT, Akim NIJ, Teelen K, Roeffen W, Lensen AH, et al. Transmission-reducing immunity is inversely related to age in Plasmodium falciparum gametocyte carriers. *Parasite Immunol*. mai 2006;28(5):185-90.
41. Tadesse FG, Van Den Hoogen L, Lanke K, Schildkraut J, Tetteh K, Aseffa A, et al. The shape of the iceberg: Quantification of submicroscopic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax parasitaemia and gametocytaemia in five low endemic settings in Ethiopia. *Malar J*. 2017;16(1):1-11.

42. MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol.* 1985;119(3):385-401.
43. Laurent V, Bruneel F. Neuropaludisme : Cerebral malaria : from pathophysiology to clinics. 2017;158-64.
44. Legros F. Paludisme d'importation en France: modalités de surveillance et principales caractéristiques épidémiologiques. *Lett Infect.* 2008;23(3):100-7.
45. Française A, Parasitologie D. Paludisme. 2014;
46. ASSI LE, BROUH Y, SISSOKO J, AMONKOU AA, VILASCO B, GNIONSAHE A, et al. La fièvre bileuse hémoglobinurique. *Médecine Afr Noire.* 1999;46(10):1-4.
47. Vachon F, Fajac I, Gachot B, Coulaud JP, Charmot G. Halofantrine and acute intravascular haemolysis. *The Lancet.* 1992;340(8824):909-10.
48. Warrell DA, Hospital JR. Pathophysiology of severe falciparum malaria in man. 1987;53-76.
49. Maugueret TMJ, Walker SL. Rapid detection of *Obesumbacterium proteus* from yeast and wort using polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol.* 2002;35(4):281-4.
50. Assessment of the safety of artemisinin compounds. *World Health.* 2003;2002.
51. Mason DP, Kawamoto F, Lin K, Laoboonchai A, Wongsrichanalai C. A comparison of two rapid field immunochromatographic tests to expert microscopy in the diagnosis of malaria. *Acta Trop.* avr 2002;82(1):51-9.
52. BOBOSSI-SERENGBE, YANZA M.C, NDOYO J., DIEMER H., MBONGO-ZINDAMOYEN A.N. Apport du parasight-F dans la prise en charge des accès fébriles chez l'enfant à Bangui (Centrafrique). 2002;4(1).
53. Organisation Mondiale de la Santé. Stratégies d'utilisation des antipaludiques: Besoins de données, traitement du paludisme non compliqué et prise en charge du paludisme pendant la grossesse. 1994.
54. Thellier M, Datry A, Cissé OA, San C, Biligui S, Silvie O, et al. Diagnosis of malaria using thick bloodsmears: Definition and evaluation of a faster protocol with improved readability. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002;96(2):115-24.
55. World Health Organisation. Lignes directrices de l'OMS sur le paludisme, 16 février 2021 [WHO Guidelines for malaria, 16 February 2021]. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2021 (WHO/UCN/GMP/2021.01). Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Catalogue. 2021;
56. Diarra NH. Amélioration de la qualité de la mise en œuvre de la chimio prévention du paludisme saisonnier : Recherche formative à Koulikoro au Mali en 2020. *Mali Santé Publique.* 4 août 2021;11(1):85-93.

57. Programme National de Lutte contre le Paludisme. Plan stratégique de lutte contre le paludisme 2013-2017. 2013;1-115.
58. Uwimana A, Legrand E, Stokes BH, Ndikumana JLM, Warsame M, Umulisa N, et al. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat Med.* oct 2020;26(10):1602-8.
59. Dembele L, Ang X, Chavchich M, Bonamy GMC, Selva JJ, Lim MYX, et al. The *Plasmodium* PI(4)K inhibitor KDU691 selectively inhibits dihydroartemisinin-pretreated *Plasmodium falciparum* ring-stage parasites. *Sci Rep.* 24 mai 2017;7(1):2325.
60. Dembele L, Gupta DK, Lim MYX, Ang X, Selva JJ, Chotivanich K, et al. Imidazolopiperazines Kill both Rings and Dormant Rings in Wild-Type and K13 Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2018;62(5):e02235-17.
61. Spillman NJ, Allen RJW, McNamara CW, Yeung BKS, Winzeler EA, Diagana TT, et al. Na⁺ Regulation in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Involves the Cation ATPase PfATP4 and Is a Target of the Spiroindolone Antimalarials. *Cell Host Microbe* [Internet]. févr 2013 [cité 10 juill 2023];13(2):227-37. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312813000358>
62. OMS. Surveillance de la résistance aux antipaludiques. *Oms.* 2002;3-5.
63. Le Bras J, Deloron P. In vitro study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-micro test. *Am J Trop Med Hyg.* mai 1983;32(3):447-51.
64. Drakeley CJ, Flobbe K, Greenwood BM, Targett GAT. *Plasmodium falciparum* gametocytes in Gambian adults. *Ann Trop Med Parasitol.* 2000;94(4):399-401.
65. Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, Gouagna LC, van Warmerdam T, Awono-Ambene PH, et al. Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS ONE.* 2012;7(8).
66. Miura K, Takashima E, Deng B, Tullo G, Diouf A, Moretz SE, et al. Functional comparison of *plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay. *Infect Immun.* 2013;81(12):4377-82.
67. Basco LK, Heseltine E, World Health Organization. Field application of in vitro assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs / Leonardo K. Basco. 2007 [cité 28 mai 2023];191. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43610>
68. Graumans W, Lanke K, van Gemert GJ, Alkema M, van de Vegte-Bolmer M, Bousema T, et al. The effect of anticoagulants in blood collection tubes on *Plasmodium falciparum* transmission in direct membrane feeding assays. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 févr 2022;116(2):187-9.

69. Delves MJ, Straschil U, Ruecker A, Miguel-Blanco C, Marques S, Dufour AC, et al. Routine in vitro culture of *P. falciparum* gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions. *Nat Protoc.* sept 2016;11(9):1668-80.
70. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 20 août 1976;193(4254):673-5.
71. Trager W. Chapter 2: Cultivation of Malaria Parasites. In: Russell DG, éditeur. *Methods in Cell Biology* [Internet]. Academic Press; 1995 [cité 28 mai 2023]. p. 7-26. (Microbes as Tools for Cell Biology; vol. 45). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X08618440>
72. Ribacke U, Moll K, Albrecht L, Ismail HA, Normark J, Flaberg E, et al. Improved In Vitro Culture of *Plasmodium falciparum* Permits Establishment of Clinical Isolates with Preserved Multiplication, Invasion and Rosetting Phenotypes. *PLOS ONE* [Internet]. 22 juill 2013 [cité 28 mai 2023];8(7):e69781. Disponible sur: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069781>
73. White J, Mascarenhas A, Pereira L, Dash R, Walke J, Gawas P, et al. In vitro adaptation of *Plasmodium falciparum* reveal variations in cultivability. *Malar J.* 22 janv 2016;15.
74. Ramos MI, Hermosura ME, Nakabayashi T. Cultivation of *Plasmodium falciparum* using animal serum (horse, calf and bovine) as human serum substitute. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A].* nov 1986;262(4):551-8.
75. Butcher GA. Factors affecting the in vitro culture of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*. *Bull World Health Organ.* 1979;57 Suppl 1(Suppl):17-26.
76. Schuster FL. Cultivation of *Plasmodium* spp. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. juill 2002 [cité 28 mai 2023];15(3):355-64. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC118084/>
77. Roncalés M, Vidal-Mas J, Leroy D, Herreros E. Comparison and Optimization of Different Methods for the In Vitro Production of *Plasmodium falciparum* Gametocytes. *J Parasitol Res.* 2012;2012:927148.
78. Fivelman QL, McRobert L, Sharp S, Taylor CJ, Saeed M, Swales CA, et al. Improved synchronous production of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* juill 2007;154(1):119-23.
79. Coulibaly MB, Gabriel EE, Sinaba Y, Sylla D, Sacko A, Sylla L, et al. Optimizing Direct Membrane and Direct Skin Feeding Assays for *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine Trials in Bancoumana, Mali. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1 sept 2017 [cité 28 mai 2023];97(3):719-25. Disponible sur: <https://europepmc.org/articles/PMC5590592>
80. D'Alessandro S, Silvestrini F, Dechering K, Corbett Y, Parapini S, Timmerman M, et al. A *Plasmodium falciparum* screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. *J Antimicrob Chemother.* sept 2013;68(9):2048-58.

81. Delves MJ, Ruecker A, Straschil U, Lelièvre J, Marques S, López-Barragán MJ, et al. Male and female *Plasmodium falciparum* mature gametocytes show different responses to antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2013;57(7):3268-74.
82. Eziefula AC, Bousema T, Yeung S, Kanya M, Owaraganise A, Gabagaya G, Bradley J, Grignard L, Lanke KH, Wanzira H, Mpimbaza A, Nsohya S, White NJ, Webb EL, Staedke SG, Drakeley C. Single dose primaquine for clearance of *Plasmodium falciparum* gametocytes in children with uncomplicated malaria in Uganda: a randomised, controlled, double-blind, dose-ranging trial | Cochrane Library [Internet]. [cité 28 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.cochranelibrary.com/central/doi/10.1002/central/CN-00958965/full>
83. Graves PM, Choi L, Gelband H, Garner P. Primaquine or other 8-aminoquinolines for reducing *Plasmodium falciparum* transmission. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2 févr 2018 [cité 28 mai 2023];2018(2):CD008152. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5815493/>
84. Dicko A, Roh ME, Diawara H, Mahamar A, Soumare HM, Lanke K, et al. Efficacy and safety of primaquine and methylene blue for prevention of *Plasmodium falciparum* transmission in Mali: a phase 2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* juin 2018;18(6):627-39.
85. undefined. Pyronaridine-artesunate or dihydroartemisinin-piperaquine versus current first-line therapies for repeated treatment of uncomplicated malaria: a randomised, multicentre, open-label, longitudinal, controlled, phase 3b/4 trial. *Lancet Lond Engl* [Internet]. 29 mars 2018 [cité 27 mai 2023];391(10128):1378-90. Disponible sur: <https://europepmc.org/article/med/29606364>
86. West African Network for Clinical Trials of Antimalarial Drugs (WANECAM). Pyronaridine-artesunate or dihydroartemisinin-piperaquine versus current first-line therapies for repeated treatment of uncomplicated malaria: a randomised, multicentre, open-label, longitudinal, controlled, phase 3b/4 trial. *Lancet Lond Engl.* 7 avr 2018;391(10128):1378-90.
87. Raz A, Sani JJ, Yousefi H. Standard Membrane Feeding Assay for Malaria Transmission Studies. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2022;2410:597-606.
88. Miura K, Swihart BJ, Deng B, Zhou L, Pham TP, Diouf A, et al. Transmission-blocking activity is determined by transmission-reducing activity and number of control oocysts in *Plasmodium falciparum* standard membrane-feeding assay. *Vaccine* [Internet]. 29 juill 2016 [cité 29 mai 2023];34(35):4145-51. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4958521/>
89. Gouagna LC, Yao F, Yameogo B, Dabiré RK, Ouédraogo JB. Comparison of field-based xenodiagnosis and direct membrane feeding assays for evaluating host infectiousness to malaria vector *Anopheles gambiae*. *Acta Trop* [Internet]. févr 2014 [cité 29 mai 2023];130:131-9. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X13003239>
90. Miura K, Swihart BJ, Fay MP, Kumpitak C, Kiattibutr K, Sattabongkot J, et al. Evaluation and modeling of direct membrane-feeding assay with *Plasmodium vivax* to

- support development of transmission blocking vaccines. *Sci Rep* [Internet]. 28 juill 2020 [cité 29 mai 2023];10:12569. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7387523/>
91. Ifediba T, Vanderberg JP. Complete in vitro maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Nature*. 26 nov 1981;294(5839):364-6.
 92. Ghanchi NK, Khan MH, Arain MA, Zubairi MBA, Raheem A, Khan MA, et al. Hematological Profile and Gametocyte Carriage in Malaria Patients from Southern Pakistan. *Cureus*. 15 mars 2019;11(3):e4256.
 93. Delves M, Plouffe D, Scheurer C, Meister S, Wittlin S, Winzeler EA, et al. The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of *Plasmodium*: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. Beeson JG, éditeur. *PLoS Med* [Internet]. 21 févr 2012 [cité 31 août 2023];9(2):e1001169. Disponible sur: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1001169>
 94. Pybus BS, Sousa JC, Jin X, Ferguson JA, Christian RE, Barnhart R, et al. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. *Malar J* [Internet]. 2 août 2012 [cité 29 mai 2023];11:259. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3438098/>
 95. Pybus BS, Marcsisin SR, Jin X, Deye G, Sousa JC, Li Q, et al. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malar J*. 20 juin 2013;12:212.
 96. Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem*. mars 2009;44(3):937-53.

FICHE SIGNALETIQUE

Nom : DIALLO

Prénom : Djénèba

Pays d'origine : MALI

Email : diallodjeneba007@gmail.com

Faculté de Pharmacie de Bamako/MALI

Tel : 00223 78 46 20 19

Année universitaire : 2022-2023

Ville de soutenance : Bamako

Dépôt légal : Bibliothèque de la FMOS/FAPH de Bamako

Secteur d'intérêt : Parasitologie, Biologie moléculaire

Titre : Développement d'un nouveau test *ex-vivo* d'évaluation de l'activité bloquante de candidats antipaludiques sur la transmission des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* isolés chez des patients.

Résumé

Introduction : La découverte et le développement de thérapies bloquant la transmission constituent un défi pour l'élimination du paludisme et nécessitent des essais biologiques standard et reproductibles pour mesurer les propriétés de blocage des médicaments antipaludiques et des composés candidats. La plupart des essais biologiques actuels évaluant l'activité de blocage de la transmission des composés reposent sur des souches de *Plasmodium* adaptées au laboratoire. Les données sur le blocage de la transmission d'isolats de gamétocytes cliniques pourraient aider à sélectionner de nouveaux candidats bloquant la transmission en vue d'un développement ultérieur.

Méthode : En utilisant des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* fraîchement collectés chez des individus asymptomatiques, nous avons d'abord optimisé les conditions de culture *ex vivo* pour améliorer la viabilité et l'infectiosité des gamétocytes en testant plusieurs paramètres de culture. Nous avons ensuite pré-exposé *ex vivo* les gamétocytes isolés sur le terrain à la chloroquine, à la dihydroartémisinine, à la primaquine, au KDU691 et au GNF179 pendant 48 heures avant le test d'infestation sur membrane puis leur activité bloquante sur le développement des oocystes a été mesurée.

Résultats : En utilisant 87 échantillons de sang prélevés sur des volontaires maliens âgés de 6 à 15 ans, nous démontrons que l'infectiosité des gamétocytes de terrain fraîchement prélevés peut être préservée et améliorée *ex vivo* dans un milieu de culture supplémenté avec

10% de sérum de cheval à 4% d'hématocrite pendant 48 heures. En outre, notre test optimisé montre la faible activité de blocage de la transmission de la chloroquine et de la dihydroartémisinine, tandis que la primaquine présente une activité de blocage de la transmission d'environ 50 % à 1 μ M. Le KDU691 et le GNF179 ont tous les deux interrompu la transmission du *Plasmodium* à 1 μ M et 5nM, respectivement.

Conclusion : Cette nouvelle approche, si elle est mise en œuvre, a le potentiel d'accélérer le criblage de composés ayant une activité de blocage de la transmission.

MOTS-CLÉS : gamétocytes isolés sur le terrain, *ex vivo*, culture, test de médicaments, activité de blocage de la transmission, essai d'alimentation directe sur membrane.

Last Name: DIALLO

First Name: Djeneba

Country of origin: Mali

Mail: diallodjeneba007@gmail.com

Faculty of Pharmacy of Bamako/MALI

Tel: 00223 78 46 20 19

Year: 2022-2023

City of the defense: Bamako

Place of thesis deposit: Library of the Faculty of Pharmacy

Area of interest: Parasitologie, Biologie moléculaire

Title: Development of a new *ex-vivo* test for evaluating the blocking activity of antimalarial candidates on the transmission of *Plasmodium falciparum* gametocytes isolated from patients.

Abstract

Background: The discovery and development of transmission-blocking therapies challenge malaria elimination and necessitates standard and reproducible bioassays to measure the blocking properties of antimalarial drugs and candidate compounds. Most of the current bioassays evaluating the transmission-blocking activity of compounds rely on laboratory-adapted *Plasmodium* strains. Transmission-blocking data from clinical gametocyte isolates could help select novel transmission-blocking candidates for further development.

Method: Using freshly collected *Plasmodium falciparum* gametocytes from asymptomatic individuals, we first optimized an *ex vivo* culture conditions to improve gametocyte viability and infectiousness by testing several culture parameters. We next pre-exposed *ex vivo* field-isolated gametocytes to chloroquine, dihydroartemisinin, primaquine, KDU691, and GNF179 for 48 hours prior to direct membrane feeding and measure their blocking activity on oocyst development.

Results: Using 87 blood samples collected from Malian volunteers aged 6 to 15 years we demonstrate that the infectivity of freshly collected field-gametocytes can be preserved and improved *ex vivo* in a culture media supplemented with 10% horse serum at 4% hematocrit for 48 hours. Moreover, our optimized drug assay displays the weak transmission-blocking activity of chloroquine and dihydroartemisinin while primaquine and oryzalin exhibited a transmission-blocking activity of ~50% at 1 μ M. KDU691 and GNF179 both interrupted *Plasmodium* transmission at 1 μ M and 5nM, respectively.

Conclusion: This new approach, if implemented, has a potential to accelerate the screening of compounds with transmission blocking activity.

KEYWORDS: Field-isolated gametocytes, *ex vivo*, culture, drug assay, transmission-blocking activity, direct membrane feeding assay

Serment de Galien:

Je jure, en présence des maîtres de la

Faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans

Les préceptes de mon art et de leur

Témoigner ma reconnaissance en

Restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé

Publique, ma profession avec

Conscience et de respecter non

Seulement la législation en

Vigueur, mais aussi les règles de

L'honneur, de la probité et du

Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité

Et mes devoirs envers le malade

Et sa dignité humaine ; en aucun

Cas, je ne consentirai à utiliser

Mes connaissances et mon état pour

Corrompre les mœurs et favoriser

Des actes criminels.

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.