

Ministère de l'Enseignement,
Recherche Scientifique

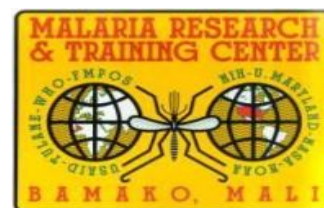
République du Mali

Supérieur et de la

UN PEUPLE-UN BUT-UNE FOI

* * * * *

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO (USTTB)



Faculté de Médecine et d'Odonto-stomatologie

Thèse de Médecine

Année universitaire : 2011- 2012

N° :.....

**Efficacité *in vivo* de l'Artéméther-Luméfantrine
sur les souches de *Plasmodium falciparum* et son
impact sur les marqueurs moléculaires de
résistances parasitaires
aux antipaludiques, au Mali**

Présentée et soutenue publiquement le 07/03/2012 devant le jury de la Faculté
de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Mali

Par **M^r Amadou BAMADIO**

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine (DIPLOME D'ETAT)

JURY

Président du jury: Professeur Ogobara K. DOUMBO

Membre du jury: Docteur Issaka SAGARA

Co- directeur de thèse: Docteur Abdoulaye DJIMDE

Directeur de thèse: Professeur Mahamadou A THERA

Je rends grâce

A Dieu

Le tout puissant, sans qui je ne serai arrivé au bout de ce cycle. Merci DIEU de m'avoir donné la force et la santé de mener à bien ce travail.

Tu as su me consoler dans mes moments de détresse et désespoir et m'as jamais laissé seul, que toute la gloire, l'honneur te reviennent à jamais.

Comme disait l'autre, << l'homme propose DIEU dispose >>

Je dédie ce travail

A mon père Aly dit Adiguine BAMADIO

En ce moment solennel de ma vie, il me manque des mots pour t'exprimer ma reconnaissance, ma fierté et mon attachement à toi. Ta gentillesse, ta disponibilité et ton esprit de sacrifice m'ont beaucoup marqué. Ton soutien matériel que moral ne nous a jamais fait défaut. Que Dieu le tout puissant t'accorde une longue vie, te préserve à nos côtés et te fasse bénéficier le fruit de ta patience. Amen !

A la mémoire de ma mère feu Aminata DAMA

Vous avez été arrachée très tôt à notre affection. Malgré ce petit temps que nous avons vécu ensemble vous avez été une mère exemplaire. Vous n'avez ménagé aucun effort pour que nous soyons ce que nous sommes aujourd'hui. Malgré ces énormes efforts que vous avez consentis pour notre réussite, vous n'avez pas pu récolter les fruits de la graine que vous avez semée. Nous continuerons à prier pour vous. Dors en paix maman.

A ma maman :

Vous avez été sans faute pour notre éducation, nous n'avons jamais senti l'absence de notre mère. Nous ne saurions vous remercier pour l'amour que vous portiez à vos enfants que nous sommes. Que Dieu vous donne longue vie.

A mes frères et soeurs

Sources perpétuelles d'émotion, d'affection, d'inspiration et d'espoir. Que DIEU puisse raffermir chaque jour nos liens. Considérez ce modeste travail comme une esquisse de chemin que je voudrais vous montrer afin de susciter chez vous beaucoup de courage.

A mes oncles et tantes

Merci de vos efforts constants pour le renforcement des liens entre nos familles. Trouvez ici l'expression de mon profond attachement aux valeurs que vous cultivez. Ce travail est le vôtre.

A mes cousins et cousines

Considérez ce modeste travail comme une esquisse de chemin que je voudrais vous montrer afin de susciter chez vous beaucoup de courage.

A la grande famille BAMADIO à SEVARE et à KORO (Gourou Son won)

Pour m'avoir assisté avec patience et altruisme. Recevez ici toute notre gratitude et soyez rassurés de mon fidèle attachement.

A la famille NIANGALY à DOUMENTZA :

Merci pour la confiance que vous avez porté en nous, en m'accordant la main de votre fille. Nous vous en sommes très reconnaissants.

Au Dr Abdoulaye A DJIMDE:

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

Votre persévérance et votre amour pour le travail bien fait font de vous un maître exemplaire à suivre. Nous vous prions de le croire votre bien dévoué. Recevez ici nos sincères remerciements.

A ma fiancée Adama NIANGALY dite Ada

Nous avons partagé tellement de choses ! Tu as été à mes côtés pendant les moments difficiles. Ce travail est le votre. Que DIEU bénisse notre union et nous accorde une longue vie, de santé et de bonheur. Amen!

A la famille Guindo en commune IV de Bamako

Merci pour tous ce que vous avez fait pour nous. Ce travail est le votre.

A mes amis, camarades, parents et connaissances: Dr Idrissa BAMADIO, Dr Tora FOFANA, Dr Jean Paul DABOU, Dr Ibrahim TRAORE, Dr Sidi DOUMBIA, Dr Philippe DARA, Dr Tiekoura BOCOUM, Mr Ousmane OUOLOGUEM, Mr Laya NIANGALY, Mr Bassirou SISSOKO, Mr Atie GUINDO, Mr seydou DIAWARA.

En souvenir des moments passés ensemble, ce travail est le fruit d'un effort collectif auquel vous avez contribué de loin ou de près. Recevez l'expression de mon attachement amical.

A tous mes encadreurs, mes remerciements.

Aux personnels de l'ASACODJIP à Djicoroni para flabougou.

Mes sincères remerciements pour votre franche collaboration et votre hospitalité.

A tous mes aînés du DEAP/MRTC

Merci pour votre encadrement, la bonne collaboration et votre esprit d'équipe. Vos conseils m'ont beaucoup inspiré au cours de mon séjour dans le service.

A tous les travailleurs du DEAP/ MRTC

Merci pour la franche collaboration.

Aux chauffeurs, gestionnaires, secrétaires et manœuvres du DEAP

A la population de Bandiagara, de Faladjè, de Kollé, de Pongonon, merci pour votre collaboration à L'étude.

Hommage aux membres du jury

A notre maître et président du jury

Professeur Ogobara K. DOUMBO

Professeur titulaire de parasitologie-Mycologie à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Médecin chef du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires, (DEAP).

Directeur du Pôle d'Excellence de Recherche sur le paludisme, Malaria Research and Training Center (MRTC).

Membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine de France.

Membre honoraire « Alpha Oméga Alpha Honor Medical Society » des États Unis d'Amérique.

Honorable maître

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré un calendrier très chargé.

Votre sollicitude, votre courtoisie et votre compétence font de vous un grand maître de cette faculté.

Nous vous sommes reconnaissants pour votre disponibilité à notre égard et nous vous prions d'accepter nos sincères remerciements.

Sachez que votre présence nous honore et nous en sommes fiers. Puisse ALLAH réaliser vos ambitions.

A notre maître et juge

Docteur Sagara Issaka

Médecin chercheur au MRTC

Master en sante publique, spécialité biostatistique

Cher maître, tout au long de ce travail, nous avons été touchés par votre simplicité et votre disponibilité pour la formation des étudiants. Votre amabilité pour le travail simple et bien fait impose respect et considération scientifique. Puisse Dieu vous assister dans toutes vos entreprises.

A notre maître et co-directeur de thèse

Docteur DJIMDE Abdoulaye

Maître Assistant en Microbiologie-Immunologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

Responsable de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance du MRTC

Cher maître, c'est un grand honneur et un réel plaisir que vous nous faites en acceptant de corriger ce travail.

Nous avons admiré vos qualités scientifiques et sociales ont fait de vous un chercheur admiré par vos étudiants et vos collaborateurs. Vous êtes un homme de science et un brillant chercheur de votre état. Vous avez cultivé en nous, le sens du travail bien fait et la rigueur scientifique. Puisse le tout puissant vous assister à la réalisation de vos projets.

A notre maître et directeur de thèse

Professeur Mahamadou A THERA

*Maître de conférences agrégé de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Médecine,
de Pharmacie et d'Odontostomatologie ;*

Chercheur au MRTC/DEAP/FMPOS.

Cher maître

Nous avons très vite apprécié vos qualités humaines et scientifiques.

Votre sens du travail bien fait, votre constance, votre disponibilité, votre sympathie et votre générosité font de vous un Maître admiré et envié de tous. Puisse le tout puissant nous accorder la chance de profiter encore longtemps de vos enseignements et de vos conseils.

Liste des abréviations :

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AR-L : Artéméther - Luméfantrine

AS/AQ : Artésunate + Amodiaquine

BB : Bleu de Bromophénol

CA1 : Microsatellite CA1

CTA : Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine

°C : Degré Celsius

DEAP : Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires

DHFR : DiHydroFolate Réductase

DHPS : DiHydroPtéroate Synthétase

dl : décilitre

dNTPs : désoxy Nucléotide Triphosphate

ECT : Echec Clinique Tardif

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

EPT : Echec Parasitologique Tardif

ETP : Echec Thérapeutique Précoce

FMPOS : Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

g : gramme

Hg : Hémoglobine

Ht : Hématocrite

INF-gamma : Interféron-gamma

J : Jour

Kg : kilogramme

Km : Kilomètre

K76T : Lysine K à la position 76 de la protéine est remplacée par la thréonine T

l : litre

MEDRU : Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

Mg²⁺ : ion Magnésium

mg : milligramme

ml : millilitre

mmol : millimole

mmHg : millimètre de mercure

MRTC : Malaria Research and Training Center

MSP1&2 : Mérozoïte Surface Protein 1 & 2

MS-PCR : Mutation Spécifique-Polymerase Chain Reaction

N86Y : Asparagine N à la position 86 de la protéine est remplacée par la Tyrosine Y

RCPA : Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate

SP : Sulfadoxine Pyrimethamine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONG : Organisation Non Gouvernementale

Pb : Paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

PM : marqueur de Poids Moléculaire

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

***Pfprt** : Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*

***Pfmdr-1** : Plasmodium falciparum multidrug resistance-1*

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

TA : Tension Artérielle

Taq : Thermus aquaticus

TBE : Tris Borate EDTA

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

UI : Unité Internationale

UV : ultra violet

μ l : microlitre

μ mol : micromole

TABLE DES MATIERES :

I.INTRODUCTION :	17
II.OBJECTIFS :	20
I.1. OBJECTIF GENERAL :	20
I.2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES :	21
III.GENERALITES SUR LE PALUDISME :	21
I.3. HISTORIQUE :	21
I.4. CYCLE BIOLOGIQUE (FIGURE 1) :	23
<i>Chez l'homme (phase asexuée) :</i>	23
<i>Chez le moustique:</i>	24
I.5. PHYSIOPATHOLOGIE :	26
<i>Accès palustre simple[55]:</i>	26
<i>Neuropaludisme :</i>	27
<i>Les stades asexués de P. falciparum sont séquestrés dans les microcapillaires des organes nobles (cerveau, poumon, cœur). Cette séquestration se fait après interaction entre la protéine 1 de la membrane érythrocytaire du Plasmodium falciparum appelée Pfemp1(Plasmodium falciparum érythrocyte membrane Protein1) et les différents récepteurs présents à la surface de l'endothélium vasculaire. Ce phénomène est appelé cythoadhérence. Cependant d'autres hypothèses ont été évoquées pour expliquer la physiopathologie du paludisme grave :</i>	27
<i>Manifestations cliniques[55] :</i>	27
<i>Primo-infection :</i>	28
<i>Accès de reviviscence :</i>	28
<i>Paludisme viscéral évolutif :</i>	28
<i>La fièvre bilieuse hémoglobinurique :</i>	28
<i>Le neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées :</i>	29
I.6. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE :	30
I.7. LES STRATÉGIES DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME AU MALI[57] :	30
<i>La prise en charge des cas de paludisme :</i>	30
<i>Les Mesures préventives :</i>	31
<i>La prévention du paludisme pendant la grossesse :</i>	31
<i>La Lutte anti-vectorielle :</i>	31
I.8. LES ANTIPALUDIQUES :	32
<i>Définition :</i>	32
<i>Classification :</i>	32
<i>Combinaisons à base d'artémisinine :</i>	35
<i>Combinaisons sans artémisinine :</i>	35
<i>Produit de l'étude :</i>	36
<i>Présentation :</i>	36
<i>Composition :</i>	36
<i>Posologie et mode d'administration :</i>	36
<i>Les effets indésirables :</i>	37
<i>Contres indications :</i>	37
<i>Mise en garde et précaution d'emploi :</i>	37
I.9. LA CHIMIORÉSISTANCE:	37
<i>Définition :</i>	37
<i>Mécanisme de chimiorésistance :</i>	37
<i>La résistance aux antimétabolites :</i>	38
<i>La résistance aux méthanol-quinoléines :</i>	38
<i>Résistance à la luméfantrine :</i>	39
<i>Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance :</i>	39
<i>Il consiste à traiter les patients présentant une infection mono spécifique à Plasmodium falciparum avec contrôle de la parasitémie aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28.</i>	40
<i>Avantages :</i>	40
<i>Adhésion facile de la population au protocole d'étude car elle y trouve un intérêt médical immédiat.</i>	40
<i>Réalisation plus simple et aisée (même par un agent de santé de base).</i>	40

Détermination du niveau de la résistance afin d'adopter un schéma thérapeutique adéquate..	40
Inconvénients :	40
Interprétation difficile des résultats liée aux troubles du métabolisme du médicament, au niveau immunitaire du malade, et aux troubles d'absorption du médicament.....	40
Longue durée pour le diagnostic de la résistance.....	40
Tests isotopiques :	41
Microtest de Markii :	41
Test de Makler[53]:.....	42
Principe :	42
Technique:.....	42
PCR nichée :	43
Avantages:.....	43
Inconvénients:.....	43

IV.METHODOLOGIE:.....44

I.10. LIEUX D'ÉTUDE:.....	44
I.11. TYPE ET PÉRIODE D'ÉTUDE :	46
I.12. LE CHOIX DES LIEUX D'ÉTUDE :	46
I.13. POPULATION D'ÉTUDE :	46
I.14. CONSIDÉRATIONS ÉTHIQUES ET DÉONTOLOGIQUES :	46
I.15. CRITÈRES D'INCLUSION ET NON INCLUSION :	47
Critères d'inclusion:.....	47
Critères de non inclusion :	47
I.16. ECHANTILLONNAGE :	47
I.17. MÉTHODES DE COLLECTE DES DONNÉES :	48
Les données ont été collectées aux postes clinique et biologique.....	48
Collecte des données cliniques :	48
L'examen clinique était fait chez tous les patients et les fiches de suivi étaient régulièrement mises à jour.....	48
Médicaments :.....	49
Les antipaludiques utilisés étaient le sulfate de quinine , l'Artésunate-Amodiaquine et l'Artéméther-Luméfantrine (produit de l'étude). Les autres médicaments étaient représentés entre autre par les antibiotiques, des antipyrétiques, des benzodiazépines, et d'autres médicaments d'urgence.....	49
Les médicaments étaient administrés par le clinicien en fonction du poids corporel du malade et associé à un traitement symptomatique si nécessaire (par exemple paracétamol en cas de fièvre).....	49
Mesure de la température axillaire :	49
Traitement des cas de maladie :	50
En cas de vomissement dans les 30 minutes qui suivaient l'ingestion ou de rejet du médicament, une seconde dose était administrée ; et 30 minutes après une demi-dose était administrée.	50
Les cas graves étaient exclus de l'étude mais traités par les sels de quinine en perfusion dans du sérum glucosé 5% ou 10% ; et le relais était pris par un antipaludique (ASAQ) par voie orale dès qu'ils ne vomissaient plus et était capable d'avaler. Ceux qui ont une charge parasitaire inférieure à 2000 étaient traités par un antipaludique (ASAQ) par voie orale.	50
Méthode de conservation des dossiers de l'étude :	51
Les fiches de suivis étaient régulièrement contrôlées et contenues dans des chemises individuelles. Après le suivi, elles étaient gardées dans une cantine métallique à l'abri des insectes rongeurs.	51
Données Biologiques :	51
Principe :	51
Elle permet d'obtenir un grand nombre de globules rouges déshémoglobinisés, pour faciliter la détection des parasites et la quantification de leur densité.....	51
Matériel :.....	51
Blouse, gants stériles, lames porte-objet, vaccinostyles stériles à usage unique, alcool à 70°C, coton hydrophile, Poubelle, Giemsa à 10%, bacs de coloration, éprouvette graduée, râteliers, boîte OMS, eau déionisée, crayon à papier, chronomètre, huile d'immersion, compteur manuel, papier hygiénique, microscope optique binoculaire ,une table de lecture et une chaise.....	51
Mode opératoire :	51

Les lames étaient marquées par un crayon indélébile. L'index ou le majeur de la main gauche était désinfecté par un tampon d'alcool, puis essuyé avec un morceau de coton sec afin d'enlever le reste d'alcool. Une ponction capillaire était faite au niveau de ce doigt et la première goutte était essuyée avec du coton sec. La seconde goutte était récupérée sur une lame porte-objet. Avec l'extrémité d'une 2ème lame la goutte était étalée par des mouvements circulaires en spirale (pour la défibrination) pendant une à deux minutes sur un centimètre de diamètre environ. La goutte était laissée à sécher à plat sur un support à température ambiante soit pendant quelque minute, la préparation était gardée à l'abri de la poussière, et des mouches. Pour la coloration, la préparation est gardée dans du Giemsa à 10% pendant 15 minutes. Puis, elle est rincée avec de l'eau propre, en faisant couler le liquide très délicatement sur la lame. Enfin la lame colorée est placée sur le râtelier pour sécher. 51

Examen microscopique : 52

La lecture des gouttes se faisait sur place par un biologiste à l'aide d'un microscope optique binoculaire à l'objectif 100 avec huile à immersion. La densité parasitaire était déterminée en comptant le nombre de parasites sur 300 leucocytes et le tout rapporté à 7500 leucocytes par millimètre cube de sang. La gamétocytémie était déterminée sur 1000 leucocytes. 52

Le frottis mince était utilisé pour le diagnostic d'espèce. 52

Après la lecture, les lames étaient conservées dans des boîtes de l'OMS..... 52

Pour le contrôle de qualité 10% des lames ont été relues par un microscopiste expérimenté du DEAP qui n'a pas participé à l'étude..... 52

Principe : 52

Consiste à collecter du sang parasité sur un papier buvard..... 52

Matériel : 52

Elle nécessitait un matériel minimal et un personnel qualifié..... 52

Papier buvard, gants stériles, vaccinostyles stériles, coton hydrophile, alcool à 70°C, paire de ciseaux, crayon etc..... 52

Technique : 52

Découper du papier buvard à l'aide d'une paire de ciseaux environ 4cm de long sur 2cm. Diviser un des bouts du confetti en quatre languettes (½ cm de largeur sur 1cm de hauteur). Inscrire le numéro d'identification du papier buvard à l'aide du crayon. 53

Imbiber les 4 languettes de sang puis laisser sécher à la température ambiante..... 53

Gestion des confettis : 53

Principe : 53

Matériels : 53

Mode opératoire : 53

I.18. DÉROULEMENT DE L'ENQUÊTE : 53

Organisation du travail:..... 53

Poste 1 ou poste d'identification : 53

Il était composé d'un guide muni d'un cahier de recensement. Il avait comme tâches :..... 53

Identifier chaque patients par son nom, prénom, son âge, son sexe, sur une carte. 54

Orienter les patients au poste clinique. Les participants susceptibles de répondre à notre critère d'inclusion étaient envoyés au poste biologique. 54

Il était en plus chargé de rechercher les enfants s'ils ne venaient pas aux rendez-vous programmés au quotidien ou hebdomadaire. 54

Poste 2 ou poste clinique et de traitement : 54

Poste 3 ou poste biologique:..... 54

PROGRAMME D'ACTIVITÉ DE BASE : 56

J0..... 56

I.19. CRITÈRES DE JUGEMENT DE L'EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE : 57

Echec thérapeutique précoce (ETP) : 57

Echec clinique tardif : 57

Echec parasitologique tardif : 57

Réponses clinique et parasitologique adéquates : 57

Critères de jugement secondaires : 58

I.20. LA COLLECTE DES DONNÉES AU LABORATOIRE : ÉTUDE DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE : 58

Principe : 59

Extraction de l'ADN plasmodial : 59

Mode opératoire : 59

Amplification de l'ADN plasmodial : 59

Matériels : 59

Préparation des réactifs de PCR :	59
Les techniques :.....	60
Nous avons procédé à l'amplification des gènes <i>Pfcr</i> , <i>Pfmdr-1</i> , <i>MSP1</i> , <i>MSP2</i> et <i>Ca1</i>	60
Amplification du gène <i>Pfcr</i> :.....	60
Première amplification :.....	60
Première amplification:.....	65
MSP1 :.....	71
Couples d'amorces de la deuxième amplification :.....	73
Différents programmes d'amplification :.....	75
ETAPES.....	75
ETAPES.....	76
ETAPES.....	76
Première amplification:.....	76
Couple d'amorces :.....	76
Deuxième amplification :.....	77
Couple d'amorces :.....	77
Révélation de l'ADN à la photographie :.....	79
Matériels :.....	79
Réactifs et leur préparation pour la révélation de l'ADN :.....	79
TBE (Tris Borate EDTA) :.....	79
Solution de migration :.....	79
Les colorants de migration :.....	79
Le bleu de bromophénol (BB) :.....	79
Le xylène : Est constitué du glycérol 35 ml, d'eau dé ionisée 15 ml et du xylène 0,125g.....	79
Marqueur de poids moléculaire (PM) :.....	79
Gel de migration :.....	80
Le bromure d'éthidium :.....	80
Interprétation des résultats <i>MSP1</i> , <i>MSP2</i> et <i>CA 1</i> :.....	80
I.20.1. Report des résultats :.....	81
I.20.2. Limites de la procédure :.....	81
I.21. ANALYSE ET GESTION DES DONNÉES :.....	81
Nos données ont été systématiquement portées sur des registres et des fiches techniques. Ces fiches étaient régulièrement contrôlées et placées dans des chemises individuelles.....	81
V.RESULTATS :.....	82
I.22. CARACTÉRISTIQUES SOCIODÉMOGRAPHIQUES :.....	83
I.23. CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES :.....	86
Clairance thermique :.....	86
Evolution de la splénomégalie :.....	87
I.24. CARACTÉRISTIQUES PARASITOLOGIQUES :.....	88
Clairance de la parasitémie :.....	88
Evolution de la gamétoctémie :.....	90
Efficacité thérapeutique à 28 jours de suivi:.....	92
I.25. CARACTÉRISTIQUE HÉMATOLOGIQUE :.....	97
I.26. ETUDE MOLÉCULAIRE :.....	98
VI.DISCUSSION:	99
Notre étude a été réalisée dans quatre sites d'étude dont le choix se justifiait par :.....	99
Leur accessibilité géographique facile pendant toutes les saisons de l'année,.....	99
Au Mali nos résultats sont similaires à ceux observés par Issaka Sagara et al. à Kambila[44] et à ceux observés par Togo A. à Bougoula [77], ainsi que ceux observés par Ashenafi Assefa et al. en Ethiopie[6]. Le taux de RCPA était comparable entre les sites ($p > 0,05$).....	101
L'amplification génétique à l'aide de la technique de la Réaction de Polymérisation en chaîne (PCR) a permis d'obtenir les résultats moléculaires.	101
Une sélection statistiquement significative de l'allèle <i>pfmdr-1</i> N86 a été observée après l'administration de l'AR-L ($p < 0,05$).	101
VII.CONCLUSION :.....	102
VIII.RECOMMANDATIONS :.....	103

IX.BIBLIOGRAPHIE :	104
---------------------------------	------------

LISTE DES TABLEAUX :

TABLEAU I: CALENDRIER DES ACTIVITÉS DE BASE AU COURS DU SUIVI. .	56
TABLEAU II: COMPOSITION DU MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR LA PREMIÈRE AMPLIFICATION DU GÈNE PFCRT.....	61
TABLEAU III: PROGRAMME DE LA PREMIÈRE AMPLIFICATION DU GÈNE PFCRT.	62
TABLEAU IV : COMPOSITION DU MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR LA DEUXIÈME AMPLIFICATION DU GÈNE PFCRT.....	63
TABLEAU V : PROGRAMME DE LA DEUXIÈME AMPLIFICATION DU GÈNE PFCRT.....	63
TABLEAU VI: COMPOSITION DU MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR LA DIGESTION DU GÈNE PFCRT.	64
TABLEAU VII: COMPOSITION DU MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR LA PREMIÈRE AMPLIFICATION DU GÈNE PFMDR-1.	66
TABLEAU VIII: PROGRAMME DE LA PREMIÈRE AMPLIFICATION DU GÈNE PFMDR-1.	66
TABLEAU IX: COMPOSITION DU MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR LA DEUXIÈME AMPLIFICATION DU GÈNE PFMDR-1.	68
TABLEAU X : PROGRAMME DE LA DEUXIÈME AMPLIFICATION DU GÈNE PFMDR-1.	68
TABLEAU XI: COMPOSITION DU MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR LA DIGESTION DU GÈNE PFMDR-1.	69
TABLEAU XII: MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR UN VOLUME FINAL DE 25 UL (MSP1) PREMIÈRE AMPLIFICATION.	71
TABLEAU XIII: MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR UN VOLUME FINAL DE 25 UL (MSP2) PREMIÈRE AMPLIFICATION.....	73
TABLEAU XIV: MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR VOLUME FINAL DE 25 UL (MSP1) DEUXIÈME AMPLIFICATION.....	74
TABLEAU XV: MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR UN VOLUME FINAL DE 25 UL (MSP2) DEUXIÈME AMPLIFICATION.....	74
TABLEAU XVI: PROGRAMME DE LA PREMIÈRE ET DEUXIÈME AMPLIFICATION MSP1.	75
TABLEAU XVII: PROGRAMME DE LA PREMIÈRE AMPLIFICATION MSP2....	76
TABLEAU XVIII: PROGRAMME DE LA DEUXIÈME AMPLIFICATION MSP2. .	76

TABLEAU XIX: MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR UN VOLUME FINAL DE 25 UL (CA1) PREMIÈRE AMPLIFICATION.....	77
TABLEAU XX: MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR UN VOLUME FINAL DE 25 UL (CA1) DEUXIÈME AMPLIFICATION.	78
TABLEAU XXI: PROGRAMME MICROSATELLITE CA1 PREMIERE AMPLIFICATION.	78
TABLEAU XXII: PROGRAMME MICROSATELLITE CA1 DEUXIÈME AMPLIFICATION.	78
TABLEAU XXIII: DISTRIBUTION DE L'ÉCHANTILLON PAR SEXE DANS LES DIFFÉRENTS SITES D'ÉTUDE.....	83
TABLEAU XXIV: DISTRIBUTION DE LA POPULATION D'ÉTUDE PAR CLASSE D'ÂGE DANS LES DIFFÉRENTS SITES.	84
TABLEAU XXV : EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE AVANT LA CORRECTION MOLÉCULAIRE DANS LES DIFFÉRENTS SITES D'ÉTUDE.	92
TABLEAU XXVI: EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE AVANT LA CORRECTION MOLÉCULAIRE PAR CLASSE D'ÂGE DANS L'ENSEMBLE DES SITES D'ÉTUDE.	93
TABLEAU XXVII : EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE APRÈS LA CORRECTION MOLÉCULAIRE DANS LES DIFFÉRENTS SITES D'ÉTUDE.	94
TABLEAU XXVIII: EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE APRÈS LA CORRECTION MOLÉCULAIRE PAR CLASSE D'ÂGE DANS L'ENSEMBLE DES SITES D'ÉTUDE.	95
TABLEAU XXIX: LE TEMPS DE RÉINFECTION APRÈS LE TRAITEMENT À L'AR-L DANS LES DIFFÉRENTS SITES D'ÉTUDE.....	96
TABLEAU XXX: LA PRÉVALENCE DES MUTATIONS DES GÈNES PFCRT K76T ET PFMDR-1 N86Y AVANT ET APRÈS LE TRAITEMENT DANS L'ENSEMBLE DES SITES.....	98

LISTE DES FIGURES :

FIGURE1:CYCLE DU DEVELOPPEMENT DE PLASMODIUM FALCIPARUM (SOURCE: HTTP://WWW.PHAC-ASPC.GC.CA/PUBLICAT/CCDRMTC/04VOL130/30S1/PAGE9_F.HTML).....	26
FIGURE 2: CARTE DU MALI MONTRANT LA POSITION DES DIFFÉRENTS SITES D'ÉTUDE.	44
FIGURE 3:CLASSIFICATION DE HACKETT	50
FIGURE 4: PHOTO DU GEL (PRODUIT DE LA DIGESTION DE PFCRT)	65
FIGURE 5: PHOTO DU GEL (PRODUIT DE LA DIGESTION DE PFMDR1).	70
FIGURE 6: PHOTO D'UN GEL DE CORRECTION MOLÉCULAIRE (MSP2) DEUXIÈME AMPLIFICATION.	81
FIGURE 7: PROFIL DE L'ÉTUDE.....	85
FIGURE 8 : CLAIRANCE DE LA FIÈVRE AU COURS DU SUIVI DE J0 À J3.....	86

FIGURE 9: LA PROPORTION DES PORTEURS DE SPLÉNOMÉGALIE AU COURS DU SUIVI.	88
FIGURE 10: CLAIRANCE PARASITAIRE AU COURS DU SUIVI DE J0 À J3.	90
FIGURE 11: LA PROPORTION DES PORTEURS DE GAMÉTOCYTE AU COURS DU SUIVI.	92
FIGURE 12 : EVOLUTION DE L'ANÉMIE AU COURS DU SUIVI DANS L'ENSEMBLE DES SITES.....	97

I. INTRODUCTION :

Le paludisme ou malaria est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium*. Cette affection est essentiellement transmise à l'homme par la piqûre d'un moustique culicidé du genre *Anopheles* au moment de son repas sanguin. Seule la femelle, hématophage, transmet la maladie. Elle ne pique qu'à partir du coucher du soleil avec un maximum d'activité entre 23 heures et 6 heures du matin. Cependant il

existe d'autres voies d'infestation plus rares telles que la voie sanguine (transfusion sanguine) et fœto-maternelle [14,21].

Cinq espèces de *Plasmodium* sont impliquées en pathologie humaine : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium knowlesi* [67]. *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) est le plus largement répandu à travers le monde. Il développe des résistances aux antipaludiques et est responsable des formes cliniques potentiellement mortelles. Les quatre autres espèces provoquent des formes cliniques de paludisme moins mortelles.

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. Le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2011 fait état du nombre de décès de 655 000 personnes en 2010, dont 91% en Afrique [87]. Ce même rapport montre que la mortalité palustre a diminué par rapport aux années précédentes dans toutes les régions du monde mais surtout en Afrique. En plus de ses effets nocifs sur la santé humaine, le paludisme cause d'énormes pertes économiques dans le monde particulièrement en Afrique. Ce qui fait de cette maladie un véritable fléau qui freine le développement socio-économique du continent.

Au Mali, selon le rapport du système local d'information de la santé 37,5% des motifs de consultations dans les services de santé étaient liés au paludisme[58]. Le paludisme est l'une des principales causes de mortalité au Mali avec un taux de mortalité de 13% dans la population générale[30].

Jusqu'en 2004 la chloroquine était l'antipaludique le plus utilisé et le moins coûteux pour le traitement du paludisme simple.

Elle était aussi utilisée en chimio-prévention chez la femme enceinte et les enfants de moins de cinq ans[36].

Ce médicament avait permis de lutter efficacement contre le paludisme donnant l'espoir à l'éradication de cette affection. L'avenir s'est assombri avec l'apparition des cas de résistance des parasites à la chloroquine et des vecteurs aux insecticides dans les années 1960. Cette résistance à la chloroquine a augmenté le taux de mortalité liée au paludisme. En 1959, YOUNG et MOORE ont signalé l'échec à la chloroquine dans le traitement d'une infestation de *P. falciparum* en Colombie. Le premier cas de résistance à la chloroquine a été décrit en Thaïlande en 1961[46,80]. Cette

chloroquino-résistance a été décrite dans les autres régions du monde notamment en Afrique subsaharienne[84].

Au Mali, le premier cas de chloroquino-résistance a été signalé en 1987 chez un expatrié français et deux ans plus tard chez les autochtones à Safo[13]. Face à cette chloroquino-résistance, la Sulfadoxine-Pyriméthamine(SP) avait été recommandée comme médicament de seconde ligne dans le traitement du paludisme simple au Mali. La SP est actuellement utilisée dans le traitement préventif intermittent chez la femme enceinte. Des études ont trouvé une baisse de sensibilité des parasites à la SP[73]. Ailleurs d'autres résistances antipaludiques ont été décrites telles que l'amodiaquine et la méfloquine[78,89]. Ces résistances ont entraîné un changement global dans la politique d'utilisation de ces médicaments antipaludiques dans le traitement du paludisme simple. C'est ainsi que l'OMS a recommandé aux pays qui observent une résistance aux monothérapies classiques, telles que la chloroquine, l'amodiaquine, ou la sulfadoxine-pyriméthamine, d'utiliser des combinaisons thérapeutiques, de préférence celles qui contiennent des dérivés de l'artémisinine, contre le paludisme à *P. falciparum*[82,83].

Le choix de l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) a été adopté au Mali après des études préliminaires initiées pour identifier les meilleures combinaisons [26,35,43]. C'est ainsi que les combinaisons Artéméter plus Luméfántrine (AR-L) et Artésunate plus Amodiaquine (ASAQ) ont été retenues par la politique nationale de lutte contre le paludisme (PNLP) au Mali en 2005.

L'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) s'est accompagnée d'une diminution drastique de la transmission, de la morbidité et de la mortalité liées au paludisme dans de nombreuses zones endémiques[66,85].

L'association Artéméter-Luméfántrine (AR-L) est la première combinaison fixe à avoir été pré-qualifiée par l'OMS[86], avec un taux de guérison supérieure à 95% dans les études contrôlées, randomisées, effectuées dans des zones où le paludisme est endémique[2,52].

Au Mali, une étude réalisée en 2004-2005 à Kambila sur les CTAs, a trouvé un taux d'efficacité de 96,93% de l'AR-L[44].

Les premiers cas de baisse de sensibilité à l'artémisine ont été décrites en Asie du Sud-est [29,63].

Nous ne disposons pas de marqueur moléculaire de résistance fiable à l'artémisinine mais le polymorphisme de certains gènes nous permettrait d'évaluer le niveau de résistance de ses molécules partenaires. Le gène *pfmdr-1* qui code pour un transporteur localisé sur la membrane de la vacuole digestive du stade érythrocytaire du parasite influence la susceptibilité à la Luméfantrine[17].

En plus la mutation sur le gène *pfprt*, semble jouer un rôle important sur la résistance des arylaminoalcools (Méfloquine, Halofantrine) [18,45,72].

L'utilisation de l'Artéméther-Luméfantrine comme l'un des traitements de première ligne au Mali nécessite une évaluation continue de son efficacité clinique ainsi que recommandé par l'OMS. Cela contribuera à la recherche des marqueurs moléculaires, qui seront un outil important pour la détection et la surveillance de la résistance à la Luméfantrine.

C'est dans ce contexte, que nous avons évalué l'efficacité *in vivo* de l'AR-L sur *P. falciparum* et son impact sur les marqueurs moléculaires de résistance parasitaires (*pfprt* K76T, *pfmdr-1* N86Y) aux antipaludiques, au Mali.

II. OBJECTIFS :

I.1. OBJECTIF GENERAL :

Evaluer l'efficacité *in vivo* d'AR-L sur *P. falciparum* et son impact sur les marqueurs moléculaires de résistances parasitaires (*pfprt* K76T, *pfmdr-1* N86Y) aux antipaludiques, au Mali.

I.2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES :

- Déterminer les taux de réponses thérapeutiques *in vivo*;
- Comparer l'efficacité d'AR-L entre les sites d'étude;
- Mesurer l'impact thérapeutique d'AR-L sur l'anémie et la gamétoctémie;
- Déterminer le temps de réinfection après le traitement avec AR-L;
- Comparer la prévalence des mutations des gènes *pfprt* K76T et *pfmdr-1* N86Y avant et après le traitement par l'AR-L.

III. GENERALITES SUR LE PALUDISME :

I.3. Historique :

L'origine géographique de cette maladie est controversée et se perd dans la nuit des temps. Si pour certains auteurs, l'Afrique tropicale serait le berceau de cette affection, déjà, au deuxième siècle avant Jésus-Christ, les grecs et les romains montraient qu'il existait une relation entre les fièvres et la proximité de terrain marécageux. Hippocrate et Galien seront les premiers à décrire les symptômes de fièvre tierce bénigne et de fièvre quarte[4,8].

L'agent pathogène de cette maladie est un hématozoaire polymorphe qui ne fut découvert que vers la fin du XIXe siècle (1880) par un médecin français du nom d'Alphonse Laveran.

Il a été nommé *Oscillare malariae* puis *Heamamoeba malaria* [64]. Successivement, furent mis en évidence les espèces *P. falciparum* (Welch, 1897) qui n'a qu'une seule génération de schizontes éoérythrocytaires et dont les gamétocytes sont falciformes ; *P. vivax* (Grassi et Leletti, 1890), *P. malariae* (Laveran, 1881) et *P. ovale* (Stephens, 1922). De 1895 à 1897 la transmission de cette affection par un moustique du genre *Anopheles* est montrée par Ross et confirmée par Grassi en 1898[37]. La nomenclature concernant les différents stades de développement du parasite sera publiée en 1900 par Schaudinn[28].

Les ravages dus au paludisme pendant la première guerre mondiale vont susciter la recherche et la mise à disposition de nouvelles molécules antipaludiques telles que les dérivés des amino-8-quinoléines, des amino-9-acridines et des amino-4-quinoléines dont la plus connue était la chloroquine[10,11].

Cette molécule était largement utilisée aussi bien en prophylaxie qu'en traitement curatif. En 1950 l'OMS lance un programme d'éradication du paludisme à l'échelle mondiale : "le monde uni contre le paludisme". Ce cri de guerre va permettre le développement de nombreux antipaludiques de synthèse dont les plus connus sont l'amodiaquine, la pyriméthamine, le cycloguanil et le proguanil[25].

En 1971 l'activité antiplasmodiale d'un extrait d'*Artémisia annua* dont le principe actif est l'artémisinine sera mise en évidence[10].

Malheureusement, malgré le nombre relativement considérable d'antipaludiques disponibles depuis l'identification et l'isolement des deux alcaloïdes fondamentaux des écorces de quinquina (quinine et cinchonine) en 1820 par Pelletier et Caventou, l'OMS met fin au programme mondial d'éradication du paludisme à cause de l'enthousiasme thérapeutique, qui était menacé par l'apparition dès le début des années 60 ou les premiers cas de résistance à la chloroquine ont été apparus. Suite à l'échec de ce programme, ainsi qu'à de nombreux cas de paludisme parmi les troupes américaines envoyées au Vietnam, un vaste programme de criblage a été entrepris par

l'armée américaine et permet de découvrir la Mefloquine et l'Halofantrine qui seront plus tard développées par les firmes pharmaceutiques.

I.4. Cycle biologique (figure 1) :

Bien que le rôle clé du moustique anophèle dans la transmission du paludisme ait été reconnu par le passé, ce n'est qu'à partir de 1948 que toutes les phases du cycle de développement du parasite ont été élucidées. Ce cycle comprend une multiplication asexuée ou schizogonie (comportant une phase hépatique ou exo érythrocytaire et une phase érythrocytaire) qui se déroule chez l'homme (hôte intermédiaire) et une multiplication sexée ou sporogonie chez le moustique anophèle (hôte définitif).

Chez l'homme (phase asexuée) :

I.4.1.1. Phase hépatique exo érythrocytaire :

Au cours de son repas sanguin (1) nécessaire à la maturation de ses œufs, l'anophèle femelle infesté en piquant l'homme, lui injecte les sporozoïtes contenus, dans sa glande salivaire avant d'ingérer le sang. Ces sporozoïtes restent dans le sang pendant une courte durée (30 mn) puis migrent dans le foie (parenchyme hépatocytaire) (2). Ils se multiplient pour devenir des trophozoïtes, puis des cryptozoïtes qui forment à leur tour des schizontes hépatiques (3). Après 12 jours environ, le schizonte éclate (4) et libère des mérozoïtes. La lyse de l'hépatocyte libère plusieurs milliers de mérozoïtes (10000 pour *P. vivax*, 40000 à 50000 pour *P. falciparum*, plus de 15000 pour *P. ovale* et 7500 pour *P. malariae*) qui migreront *via* la voie sanguine vers les hématies amorçant ainsi la phase érythrocytaire. Dans les cas de *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, le cycle se répète alors que *P. falciparum* n'a pas un cycle continu dans le foie.

I.4.1.2. Phase érythrocytaire:

Les mérozoïtes hépatiques libérés dans le sang pénètrent les hématies (5) par un mécanisme complexe où ils évoluent en stade de jeune trophozoïte (anneau ou ring) et se transforment en trophozoïtes matures. A l'intérieur de l'hématie, le parasite se multiplie de façon asexuée conduisant à la formation de schizontes érythrocytaires (6). La rupture de la membrane du globule rouge 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 du paludisme 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 caractéristique de la maladie. Certains mérozoïtes subissent une différenciation pour donner des gamétocytes femelles et males (7).

Chez le moustique:

La sporogonie ou multiplication sexuée :

Lors de son repas sanguin chez un sujet parasité, l'anophèle femelle absorbe les gamètes mâles et femelles du plasmodium (8). Ces derniers se libèrent rapidement de leur enveloppe érythrocytaire pour se transformer en 8 microgamètes flagellés mobiles pour le gamétocyte male, et en macrogamètes immobiles pour le gamétocyte femelle (9). Dans l'estomac du moustique les microgamètes et les macrogamètes fusionnent pour former un zygote (10) qui évolue en ookinète mobile qui traverse la paroi de l'estomac et forme sur sa face externe un oocyste (11). Ce dernier se développe en quelques jours et donne de nombreux sporozoïtes (12) qui gagnent les glandes salivaires et sont alors prêts à être injectés à l'homme au prochain repas sanguin.

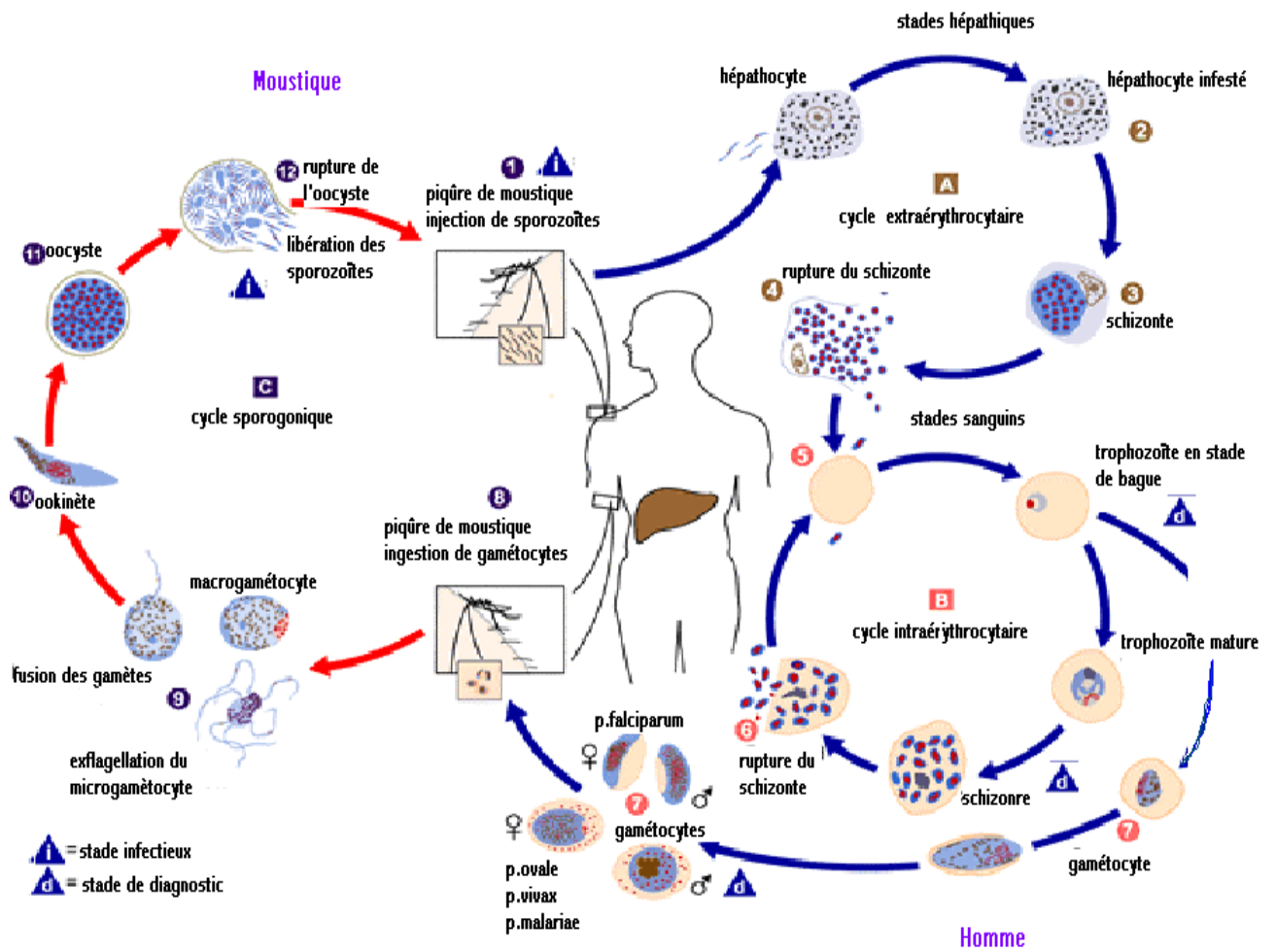


Figure1: Cycle du développement de *Plasmodium falciparum* (Source: http://www.phac-aspc.gc.ca/pubcat/ccdrmtc/04vol130/30s1/page9_f.html)

I.5. Physiopathologie :
Accès palustre simple[55]:

Lors de l'éclatement des hématies parasitées, les pigments malariques appelés hémozoïnes sont libérés, ils agissent sur le centre bulbaire de la thermorégulation provoquant ainsi la fièvre quand la parasitémie atteint un certain seuil. Lorsque chez le malade les cycles endoérythrocytaires de *plasmodium* se synchronisent progressivement, la libération des pigments malariques est régulièrement répétée, ce phénomène confère ainsi à l'accès palustre sa périodicité. L'hépatomégalie et la splénomégalie surviennent suite à une hyperactivité du système monocyte, macrophage chargé de débarrasser l'organisme aussi bien des pigments malariques que des débris érythrocytaires. L'hémolyse de ces érythrocytes parasités est l'une des causes de l'anémie palustre.

Neuropaludisme :

Les stades asexués de *P. falciparum* sont séquestrés dans les microcapillaires des organes nobles (cerveau, poumon, cœur). Cette séquestration se fait après interaction entre la protéine 1 de la membrane érythrocytaire du *plasmodium falciparum* appelée Pfemp1 (*Plasmodium falciparum* érythrocyte membrane Protein1) et les différents récepteurs présents à la surface de l'endothélium vasculaire. Ce phénomène est appelé cytoadhérence. Cependant d'autres hypothèses ont été évoquées pour expliquer la physiopathologie du paludisme grave :

- sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : INF- γ et TNF- α .
- une augmentation de la perméabilité de la barrière méningée entraînant une fuite du liquide céphalorachidien et un œdème cérébral.
- la coagulation intra-vasculaire disséminée.
- phénomène immuno-pathologique avec dépôt de complexes immuns.

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

Manifestations cliniques[55] :

Les manifestations cliniques du paludisme sont exclusivement liées à la schizogonie endoérythrocytaire. Les principaux signes 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, densité parasitaire) et de l'état de l'individu (prémunition). Ainsi ces manifestations vont de l'accès palustre non compliqué à l'accès palustre grave. Selon les cas, il est possible de distinguer **cinq formes cliniques** :

Primo-infection :

La symptomatologie correspond à une fièvre d'allure isolée. La fièvre débute brutalement, souvent élevée mais de degré variable, avec frissons, sueurs, céphalées et courbatures, associés souvent à de petits troubles digestifs à type « d'embarras gastrique » (nausée, vomissement et/ou de diarrhée). Les signes traduisant l'hémolyse apparaissent souvent de façon différée : pâleur, sub-ictère, hépato-splénomégalie.

Accès de reviviscence :

Il s'observe avec l'acquisition d'un certain degré d'immunité et correspond aux crises schizogoniques toutes les 48 heures (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*) 72 heures (*P. malariae*). Caractérisées par un grand frisson inaugural, une fièvre à 40°C durant quelques heures puis de sueurs profuses ; les crises se succèdent toutes les 48 heures (fièvre tierce) ou 72 heures (fièvre quarte) selon l'espèce en cause. La périodicité manque souvent en raison d'un poly-parasitisme. Seule la fièvre tierce à *Plasmodium falciparum* est susceptible d'évoluer vers un paludisme cérébral.

Paludisme viscéral évolutif :

Ce paludisme concerne plutôt les enfants qui peinent, au cours des années, à acquérir leur prémunition. La splénomégalie en est le signe majeur associée à une hépatomégalie. Les signes généraux (fébricule intermittente, asthénie, amaigrissement) et d'hémolyse (pâleur, ictère) sont très variables, allant d'une forme paucisymptomatique à une forme qui pourrait se confondre avec une leucémie.

La fièvre bilieuse hémoglobinurique :

Le début est brutal avec une hémolyse intra-vasculaire chez le patient précédemment soumis à une chimioprophylaxie aux sels de quinine. La symptomatologie est essentiellement rénale et algique. La douleur est très intense en barre autour de la ceinture pelvienne. Les rares urines émises sont particulièrement rouges et foncées. Cette forme nécessite une réanimation.

Le neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées :

C'est le paludisme des sujets non immuns (nourrisson, femme enceinte, enfant, les migrants venant d'une zone non impaludée). Ces formes sont l'apanage de *Plasmodium falciparum* et sans traitement ils peuvent conduire à la mort dans 72 heures.

L'OMS a établi des critères qui, isolés ou associés, font poser le diagnostic du paludisme sévère et permettent une meilleure prise en charge[81].

Il s'agit de la présence des formes asexuées de *P. falciparum* dans le sang associées à l'un des signes suivants :

- Blantyre Coma Scale (BCS) ≤ 2 score de Glasgow ≤ 9
- Troubles de la conscience : BCS < 5 et > 2 ou score de Glasgow < 15 et > 9
- Convulsions répétées > 2 /24 heures
- Prostration : extrême faiblesse
- Vomissements itératifs
- Syndrome de détresse respiratoire
- Ictère clinique
- Acidose métabolique : bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/L
- Lactatémie ≥ 5 mmol/L
- Anémie grave (Hb < 5 g/dl, Ht $< 15\%$)
- Hyperparasitémie $\geq 4\%$ chez le sujet non immun, ou $\geq 20\%$ chez le sujet immun
- Hypoglycémie (glycémie $< 2,2$ mmol/L)
- Hémoglobinurie macroscopique
- Insuffisance rénale : diurèse < 400 ml/ 24h ou créatinémie $> 265\mu\text{M}$ 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)

I.6. Diagnostic biologique :

Le diagnostic biologique de première intention est posé par la réalisation d'une goutte épaisse et/ou d'un frottis mince. Il s'agit d'un diagnostic d'urgence qui repose sur la mise en évidence du parasite dans le sang du malade. D'autres techniques sont proposées en seconde intention : Le parasight F, QBC, l'optimal IT, la PCR etc....

I.7. Les stratégies de lutte contre le paludisme au Mali[57] :

La prise en charge des cas de paludisme :

La prise en charge des cas de paludisme se fait au niveau des formations sanitaires. Un certain nombre de projets partenaires du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) assure la prise en charge des cas de paludisme simple à domicile sous forme de projet d'implémentation. Ces activités ne couvrent qu'une petite portion de la population (Exemple : Expérience de l'ONG Médecin Sans Frontière dans 11 aires de santé du district de Kangaba dans la région de Koulikoro). La quinine, l'Artéméther et l'artésunate sont les molécules de choix pour le traitement des cas de paludisme grave.

Les combinaisons thérapeutiques à base de dérivés d'artémisinine sont recommandées pour le traitement du paludisme simple (Artésunate-Amodiaquine et Artéméther-Luméfántrine) chaque fois que la voie orale reste possible.

L'Artéméther, l'Artésunate suppositoire et la quinine sont recommandés pour le traitement pré-transfert des cas de paludisme grave et compliqué. Le Gouvernement du Mali s'est engagé à assurer gratuitement le traitement du paludisme simple et grave (CTA et TDR) chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. Le diagnostic du paludisme doit être confirmé biologiquement chaque fois que le plateau technique permet (Microscopie ou TDR) avant de traiter conformément à la recommandation de l'OMS.

Les Mesures préventives :

Les mesures préventives, utilisées dans le cadre de la lutte contre le paludisme au Mali, sont focalisées sur quelques axes que sont : la prévention du paludisme pendant la grossesse et la lutte anti-vectorielle (LAV) dans le but de réduire voire supprimer la transmission du paludisme.

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 donné gratuitement à raison de 2 cures de 3 comprimés de Sulfadoxine 500mg et Pyriméthamine 25mg en deux prises supervisées et espacées d'au moins un mois entre le 4ème et le 8ème mois de la grossesse.

La Lutte anti-vectorielle :

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

- La promotion des moustiquaires imprégnées d'insecticide par la distribution gratuite à travers :
 - la consultation prénatale pour la protection des femmes enceintes (CPN+).
 - le programme élargi de vaccination pour la protection des enfants de moins d'un an (PEV+).
- La promotion des moustiquaires imprégnées d'insecticide à travers le circuit commercial pour la population générale.
- Le traitement ciblé des gîtes larvaires est réalisé dans la ville de Bamako.
- La pulvérisation intra-domiciliaire avec son objectif de réduire la population vectrice.
- La promotion de l'hygiène et de l'assainissement.

I.8. Les Antipaludiques :

Définition :

Un antipaludique est un produit naturel ou de synthèse pouvant être administré par voie orale, parentérale ou rectale, à dose unique ou répétée, et qui permet de détruire le *plasmodium* ou de bloquer sa croissance afin de prévenir ou de guérir le paludisme.

Classification :

Les seuls antipaludiques naturels sont la quinine et les dérivés du Quinghaosu: artémisinine, tous les autres sont des antipaludiques de synthèse.

Ces antipaludiques ont été divisés en deux groupes selon leur rapidité d'action:

- Groupe 1: La quinine et les amino-4-quinoléines comme antipaludiques d'action rapide, les dérivés d'artémisinine.

-Groupe 2: Les antifoliques (sulfones et sulfamides) et les antifoliniques (biguanides et diaminopyridines) comme antipaludiques d'action lente.

Selon le point d'action des médicaments, on distingue des schizontocides (chloroquine, amodiaquine, quinine, méfloquine, halofantrine, proguanil, pyriméthamine, artémisinine) et des gamétocytocides (amino-8-quinoléine: Primaquine).

I.8.1.1. Les amino-4-quinoléïnes:

Les molécules principales sont la chloroquine et l'amodiaquine.

La large diffusion de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine est devenue un facteur limitant leur emploi. Elles sont toutes des schizontocides.

• Chloroquine :

La chloroquine est une base faible lysosomotrope, elle est capable de traverser la membrane de l'érythrocyte parasité ; s'accumule dans la vacuole digestive du parasite suivant le gradient de pH[91]. A l'intérieur de cette vacuole, l'hémoglobine est dégradée par les protéases et fournit les acides aminés nécessaires au parasite ; mais aussi produit des groupements d'hème toxiques comme dérivés (hématine). Le parasite normalement déttoxifie l'hématine en polymérisant le dérivé en hémazoïne[34]. La chloroquine exerce son activité antimalarique en formant un complexe avec l'hématine toxique pour le parasite, lequel inhibe sa séquestration en hémazoïne. L'hème libre est lytique pour la cellule.

La chloroquine empêcherait l'utilisation des acides aminés indispensables au parasite provoquant ainsi sa lyse.

En tant que base faible, elle agirait en bloquant l'activité des lysosomes. La chloroquine inhibe également l'ADN polymérase des hématozoaires, et les protéases acides parasitaires.

- **Amodiaquine :**

Elle a une structure et une action antipaludique semblable à celle de la chloroquine. Elle possède des propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires.

Elle est absorbée dans le tractus gastro-intestinal, transformée en un métabolite actif la deséthylamodiaquine. Des effets secondaires hépatiques et une grande incidence d'agranulocytose ont été rapportés[40,60].

I.8.1.2. Les amino-alcools :

Nous avons la quinine, la méfloquine, l'halofantrine, la luméfantrine ; ces molécules interfèrent avec l'utilisation de l'hémoglobine dans la vacuole digestive en inhibant la formation de l'hémozoïne.

- **Quinine :**

Elle agit essentiellement sur les formes asexuées de toutes les espèces de Plasmodium.

La quinine se fixe sur l'ADN parasite et inhibe la formation de l'hémozoïne par fixation sur la protoporphyrine IX.

I.8.1.3. Les antimétabolites:

Tous ces produits agissent sur la synthèse des acides nucléiques des plasmodies. Ce groupe comprend les antifolates, les naphtoquinones, et les antibiotiques.

I.8.1.4. Les antifolates:

Ce sont des inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique. On distingue les antifoliques et les antifoliniques.

- **Les antifoliques:**

Les sulfamides, sulfones, tous inhibent la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui est une enzyme intervenant dans la synthèse d'acide folique.

- **Les antifoliques:**

Il s'agit essentiellement du proguanil et de la pyriméthamine, inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (DHFR). Une enzyme réduisant la dihydrofolate en tetrahydrofolate.

I.8.1.5. Les antibiotiques:

Il s'agit essentiellement des cyclines (doxycycline), de la clindamycine.

I.8.1.6. Les dérivés de l'artémisinine :

Cette nouvelle classe d'antipaludiques de type endopéroxyde interfère aussi avec l'utilisation de l'hémoglobine, par libération de radicaux libres, toxiques pour le parasite.

L'artémisinine a été originellement isolé en 1972 en Chine à partir de la plante *Artemisia annua* ou « armoise de Chine ». L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique comportant un groupement peroxyde et, à la différence de la plupart des autres antipaludiques, il manque à cette molécule un hétérocycle contenant un groupement nitrogène (formule empirique C₁₅H₂₂O₅).

Les chimistes chinois ont isolé la substance responsable de son action antipaludique à partir des feuilles de la plante *Artemisia annua* en 1972[15]. Ils ont nommé ce composé « Qinghaosu ». En occident, ce composé a été appelé « artémisinine »[48]. La plante existe à l'état sauvage en Chine, mais a aussi été rencontrée dans d'autres parties du monde, bien que les espèces puissent différer.

Les dérivés de l'artémisinine sont : la dihydroartémisinine, l'artéméther, l'artééther, l'artésunate et l'arténilate, dérivés obtenus par modification chimique du carbone situé en dixième position de la molécule d'artémisinine. Leur élimination très rapide impose cependant des traitements répétés[22,59] ou des associations[41], sous peine d'observer un taux de rechute important. Le mécanisme d'action de l'artémisinine et de ses dérivés n'est pas bien connu actuellement[20]. Le pont endopéroxyde paraît essentiel pour l'activité de l'artémisinine et de ses dérivés, les analogues n'en possédant pas étant inactifs[9,56]. Les endopéroxydes peuvent se décomposer en radicaux libres en présence de fer augmentant ainsi l'activité antipaludique[49] alors que les piègeurs des radicaux l'inhibent.

I.8.1.6.1. Combinaisons thérapeutiques antipaludiques[83] :

@ Définition :

Selon l’OMS une combinaison thérapeutique d’antipaludiques est l’usage simultané de deux ou plusieurs schizontocides sanguins ayant des modes d’actions et des cibles biochimiques différents au niveau du parasite.

Il y a deux sortes de combinaisons:

La combinaison libre, c’est la co-administration de deux médicaments distincts.

La combinaison fixe, c’est la co-formulation de deux principes actifs sous une même forme galénique.

@ Combinaisons à base d’artémisinine :

Au Mali les principales combinaisons à base d’artémisinine ayant fait l’objet de test sont:

- **Artesunate + chloroquine**
- **Artesunate + amodiaquine**
- **Artesunate + sulfadoxine-pyriméthamine**
- **Artesunate + méfloquine**
- **Artesunate + sulfaméthoxy-pyrazine-pyriméthamine**
- **Artéméther + luméfántrine**

@ Combinaisons sans artémisinine :

✓ Chloroquine+ Sulfadoxine-Pyriméthamine :

Cette association n’est guère plus utile que la monothérapie par la Sulfadoxine-Pyriméthamine dû à la chloroqino-résistance.

✓ Amodiaquine + sulfadoxine-pyriméthamine :

Cette association est très efficace et s’avère être une alternative aux CTA. Une étude menée par le MRTC a démontré son efficacité[47].

✓ **Sulfadoxine-Pyriméthamine + Méfloquine :**

Suite aux risques de réactions indésirables graves de cette association, elle n'est plus recommandée depuis 1990 pour un usage général dans le cadre de programmes de lutte antipaludique, ni à titre prophylactique, ni à titre thérapeutique.

✓ **Atovaquone + proguanil :**

Son efficacité a été prouvée par des études menées en Asie du Sud Est. Cependant, son coût élevé et sa disponibilité limitent son accessibilité. Elle est utilisée en prophylaxie et en traitement curatif pour les sujets non immuns[54,74].

Produit de l'étude :

@ Artéméther-Luméfantrine (Coartem®) :

@ Présentation :

Comprimé contenant 20 mg d'Artéméther et 120 mg de Luméfantrine pour adulte et enfant.

@ Composition :

C'est une association fixe contenant deux principes actifs appelés Artéméther et Luméfantrine. Les autres composants nécessaires à la fabrication des comprimés sont : le polysorbate 80, l'hydroxypropylcellulose, la cellulose microcristalline, le cilice colloïdale anhydre, la croscarmellose sodique et le stéarate de magnésium.

@ Posologie et mode d'administration :

Les comprimés doivent être pris avec un aliment gras. Une cure de 3 jours est recommandée.

✓ **La posologie chez l'adulte :**

La posologie est de quatre comprimés en une prise unique au moment du diagnostic initial, répétée 8 heures plus tard. Les deux jours suivants 4 comprimés deux fois par jour (la cure totale comprend 24 comprimés).

✓ **Posologie chez l'enfant :**

Elle est de 1, 2 ou 3 comprimés (en fonction du poids corporel) en une prise au moment du diagnostic, répétée 8 heures après ; puis deux fois par jour pendant les deux jours suivants.

La posologie est déterminée en fonction du poids en kilogramme :

- De 5 à 14 kg de poids corporel : un comprimé de 20/120 mg.
- De 15 à 24 kg de poids corporel : deux comprimés de 20/120 mg.
- De 25 à 34 kg de poids corporel : trois comprimés de 20/120 mg.

@ Les effets indésirables :

Comme tout médicament, AR-L peut entraîner des effets indésirables comme une éruption cutanée, une céphalée, les troubles de sommeil, les palpitations, une perte d'appétit, les nausées, les vomissements, les diarrhées, les douleurs abdominales, une fatigue ou une faiblesse générale, les douleurs articulaires et musculaires, les démangeaisons cutanées, une toux.

@ Contres indications :

La contre-indication repose sur les cas d'allergie connue à l'Artéméther, à la Luméfantrine, ou à un des excipients mais également les cas de neuropaludisme ou de toute autre complication sévère du paludisme y compris les problèmes pulmonaires ou rénaux ; femme enceinte (premier trimestre) ou allaitante.

@ Mise en garde et précaution d'emploi :

L'AR-L doit être conservé à une température en dessous de 30°C. Le traitement doit être arrêté immédiatement et définitivement en cas d'effets indésirables sus cités. En cas de surdosage, contacter immédiatement son médecin ou le service des urgences de l'hôpital le plus proche.

L'AR-L n'est pas indiqué en traitement préventif.

I.9. La chimiorésistance:

Définition :

La chimiorésistance a été définie selon l'OMS, comme l'aptitude d'une souche d'hématozoaire à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament efficace employé à des doses égales ou supérieures aux doses recommandées mais dans les limites de la tolérance du sujet.

Mécanisme de chimiorésistance :

La chimiorésistance de *P. falciparum* aux antipaludiques est un phénomène constant sur tous les continents.

Plusieurs études ont été menées pour expliquer le mécanisme de résistance. Comme chez les bactéries, les principaux mécanismes de la résistance pourraient être dus soit à l'inactivation enzymatique ou à la dégradation du médicament[75], soit une altération du site de fixation du médicament[75], soit une inhibition de l'entrée du médicament[62], ou un efflux actif du médicament.

La résistance aux antimétabolites :

Le gène de la résistance (*pfdhfr*) est situé sur le chromosome 4. Des mutations en position 59 et 108 sur ce gène, seraient à l'origine des cas de résistance observés *in vitro*[12,92]. La résistance à la pyriméthamine est due à une substitution de la sérine par l'asparagine en position 108. L'addition des mutations cystéine-arginine en position 59, asparagine-isoleucine en position 51 conduisait à des niveaux de résistance *in vitro* de plus en plus élevés[19].

La résistance *in vitro* au cycloguanil est due à une mutation serine-thréonine en position 108 associée à une mutation alanine-valine en position 16 tandis que la mutation isoleucine - leucine en position 164 a été retrouvée chez les souches à la fois résistantes à la pyriméthamine et au cycloguanil[39,69]. Ces différentes mutations entraînaient des modifications structurales qui sont à la base de la diminution de l'affinité de l'enzyme DHFR pour la pyriméthamine[5,42]. Les mutations ponctuelles au niveau de la DHPS, sont les bases moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine[79]. Les substitutions telles serine-phénylalanine en position 436, alanine-thréonine/serine en position 613, alanine-glycine en position 581, alanine-glycine en position 437 et lysine-acide glutamique en position 540 ont été impliquées dans la résistance *in vitro*[79]. Le rôle de la mutation alanine-glycine 437 sur DHPS dans la résistance *in vitro* à la sulfadoxine a été confirmé par la technique de transfection.

La résistance aux antipaludiques augmente régulièrement, elle est plus importante pour la chloroquine 84,5%, que la Sulfadoxine-Pyriméthamine 8,1% au Mali[1,3].

La résistance aux méthanol-quinoléines :

Le gène *pfmdr-1* a été décrit comme intervenant dans la résistance de *Plasmodium falciparum* à cette famille de médicament.

Il est situé sur le chromosome 5 et son mécanisme est encore peu élucidé. En effet, les études ont montré une apparente association entre l'augmentation du nombre de copies du gène de *Pfmdr-1* et une augmentation de son expression avec une diminution de la sensibilité du *Plasmodium falciparum* à la Méfloquine et à l'Halofantrine[88].

Selon certains auteurs la résistance à l'Halofantrine et celle à la Méfloquine peuvent apparaître sans une augmentation de l'expression du gène *pfmdr-1*[71].

Ils ont montré qu'une mutation du gène *pfert* codant pour une protéine transmembranaire, de la vacuole digestive de *Plasmodium falciparum* est responsable de la résistance à la chloroquine[33].

Cette étude a montré que les souches mutantes d'Asie et d'Afrique ont un des deux variants « *Pfert* » qui diffère du gène sensible à la chloroquine par 7 ou 8 mutations ponctuelles. En Amérique du sud, cette résistance est associée à d'autres variants porteurs de plusieurs mutations. Toutefois, les variants de ces trois régions ont en commun deux mutations spécifiques (*Pfert* 76T et *Pfert* 220S). Les auteurs ont donc trouvé que la mutation d'un gène unique présent sur le chromosome 7 de *Plasmodium falciparum* conférait la résistance à la chloroquine. Une étude réalisée sur terrain et adoptant le protocole de l'OMS 1996 a montré que tous les patients présentant une infection palustre après traitement à la chloroquine présentaient ce gène[27].

Résistance à la luméfántrine :

Les polymorphismes de l'allele sauvage du gène *Pfmdr-1* N86 et *Pfert* K76 ont été associées à une réduction de la sensibilité à la Luméfántrine *in vitro*[17,31,32]. Cependant, il a été suggéré que la sélection de l'allele *Pfmdr-1* N86 peut représenter le marqueur de tolérance à la luméfántrine[40].

Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance :

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

I.9.1.1. Test *in vivo* :

Il consiste à administrer, à un sujet porteur de *Plasmodium falciparum*, la dose ordinairement recommandée de l'antipaludique à tester, et à contrôler la parasitémie au bout d'un temps donné. L'évaluation de l'efficacité des schémas thérapeutiques se fait directement avec les tests de l'OMS.

Ces tests de l'OMS proposent des suivis de 28 jours pour la chloroquine et l'amodiaquine, 42 jours pour la sulfadoxine-pyriméthamine, la luméfántrine-artémether (Coartem®), et le test de 63 jours pour la méfloquine[84].

I.9.1.1.1. Test standard de l'OMS de 28 jours [84]:

Il consiste à traiter les patients présentant une infection mono spécifique à *Plasmodium falciparum* avec contrôle de la parasitémie aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28.

I.9.1.1.1. Avantages et inconvénients du test *in vivo* :

▪ Avantages :

- 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 adéquate.

▪ Inconvénients :

- 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.

I.9.1.2. Tests *in vitro* :

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

Après le macrotest mis au point par l’OMS et vite abandonné, ce sont les microtests qui sont actuellement utilisés. On distingue :

I.9.1.2.1. Tests optiques :

Le microtest OMS[68] et le semi-microtest de Le Bras[51] ont été mis au point à la fin des années 70: Ils sont basés sur la capacité des doses croissantes d’antipaludiques testés à empêcher la maturation des trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* en schizontes, lorsque le prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI (Rostwell Park Memorial Institute) et incubé à 37°C, en présence de CO₂ et de O₂, pendant 24 à 48 heures.

Les résultats s’expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI), pour le microtest OMS, et en concentration inhibitrice 50% (CI50) ou 90% (CI90), pour le semi-microtest.

@ Tests isotopiques :

Ce sont le microtest isotopique de Desjardins[24] et le semi-microtest isotopique de Le Bras et Deloron[50]. Ce sont des modifications, respectivement, du microtest OMS et du semi- microtest optique. Après 18 heures d’incubations, on ajoute à chaque cupule un radio-isotope, l’hypoxanthine tritiée. L’incubation des parasites est révélée par l’incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites. La mesure de la radioactivité se fait dans un compteur à scintillation. Les résultats sont donnés en coups par minute et l’activité du médicament est exprimée en CI50 ou en CI90.

I.9.1.2.2. Nouveaux tests :

Les tests récemment mis au point sont ceux de :

@ Microtest de Markii :

C’est une modification du macrotest par les mêmes auteurs qui se sont inspirés de la technique de la culture continue de TRAGER et JENSEN.

Il consiste à mettre en culture pendant 24 à 48 heures à 37°C sur des plaques de titration traitées avec différents antipaludiques à doses croissantes. Les kits sont fournis par l’OMS et donnent des doses critiques de sensibilité pour chaque médicament.

@ Test de Makler[53]:

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

Le test vise à détecter et à quantifier, par une technique enzymatique, la LDH produite par *Plasmodium falciparum* en présence de l'antipaludique étudié. Il existe une corrélation entre la densité parasitaire et l'activité de la LDH plasmodiale.

I.9.1.2.3. Test moléculaire : PCR

Il s'agit de mettre en évidence un polymorphisme au niveau de la séquence de l'ADN parasitaire qui est lié avec le phénotype de résistance au médicament par la technique de la PCR.

@ Principe :

Elle est fondée sur l'amplification exponentielle *in vitro* de l'ADN plasmodial en présence d'amorces spécifiques, des nucléotides, d'ADN polymérase et d'un milieu tampon. La révélation se fait sous UV.

@ Technique:

Cette technique décrite en 1985 par K. Mullis[70] ; permet une amplification enzymatique *in vitro* de la quantité d'ADN dont on disposait initialement. Elle impose de connaître la séquence des régions qui délimitent le segment de l'ADN à amplifier. On utilise des amorces complémentaires à ces régions, qui ont entre autre comme fonction la reconnaissance de la région à amplifier et l'initiation de la synthèse de l'ADN néoformé.

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

- Une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN.

- Une phase d'hybridation de l'ADN avec les deux amorces spécifiques. Elle a lieu grâce à un abaissement de la température, chaque oligonucléotide se fixant sur un brin d'ADN.

- Une extension des amorces avec une ADN polymérase à 70 ou à 72°C.

Cette technique a eu de l'ampleur avec la découverte en 1988 d'une ADN polymérase non inactivée par la chaleur. Il s'agit de la Taq polymérase, isolée d'une bactérie thermophile « *Thermus aquaticus* »). Elle est adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude. Il est maintenant possible d'automatiser ces réactions grâce à des appareils programmables en température et en temps (Termocycleur).

@ PCR nichée :

C'est une double PCR. Une deuxième PCR se fait sur le produit de la première PCR. Cette technique permet d'obtenir une plus grande sensibilité en PCR. Dans ce cas deux couples d'amorces sont utilisés.

Un couple externe : ce couple d'amorces permet tout d'abord d'obtenir un fragment de l'ADN amplifié, comme en PCR classique. Les amorces sont donc spécifiques des deux séquences bornant l'ADN à amplifier. Les fragments de l'ADN obtenus, servent alors de matrice pour une seconde PCR.

Couple d'amorces internes : ce couple d'amorces borne une région située à l'intérieur du fragment nucléotidique obtenu avec le premier couple d'amorces. D'où le terme de la PCR nichée, car ces amorces sont nichées, emboîtées, dans les premières.

I.9.1.2.4. Avantages et inconvénients des tests *in vitro*:

@ Avantages:

- 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:

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

IV. METHODOLOGIE:

I.10. Lieux d'étude:

Notre étude s'est déroulée dans trois villages et une ville (Faladjè, Kollé, Pongono et Bandiagara).

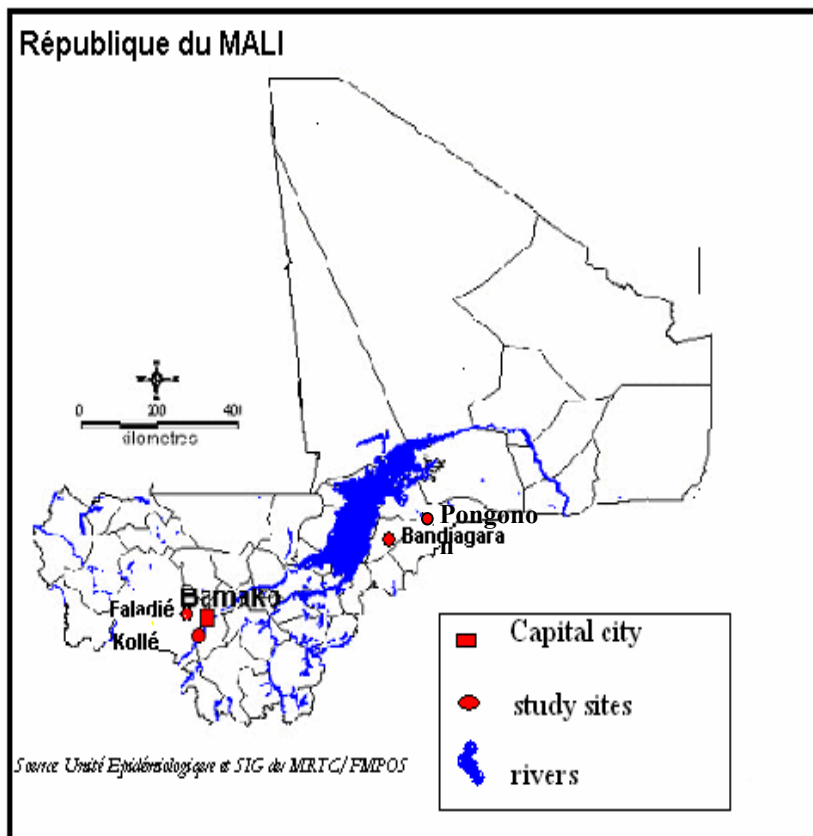


Figure 2: Carte du Mali montrant la position des différents sites d'étude.

Faladjè est un village situé en zone rurale, à 60 Km de Kati et à 80 km au nord-ouest de Bamako, peuplé de 3.000 habitants. Il est limité au Nord par Bouala, au Sud par Konkou-Zambougou, à l'Ouest par Sognèbougou et à l'Est par N'téguédo.

Le paludisme est saisonnier (Juillet-Octobre) avec un pic en octobre ; c'est une zone hyperendémique. Il a été l'objet de plusieurs de nos études.

Kollé est un village de 3.000 Habitants, situé à 57 km au Sud ouest de Bamako. Limité au sud par le fleuve Niger distant de 9 km, à l'ouest par Samako, au sud-ouest Bancoumana dont il est distant de 3 km, au nord par Ténéya, au nord-est par Coursalé
La transmission du paludisme y est saisonnière avec une allure hyperendémique sur une courte saison de 3 à 4 mois avec un indice plasmodique (IP) situé entre 40 et 50 % en saison sèche et entre 70 et 85 % en saison pluvieuse.

Le taux d'inoculation entomologique durant la période de forte transmission est de 5,2 piqûres infectantes par personne et par mois.

Kollé a été l'objet de plusieurs de nos études par le passé.

Pongonon village situé à 20 Km de la commune rurale de Koro chef lieu de cercle ; à 195 Km de la capitale régionale Mopti (5^{ème} région du Mali) et à 785 Km de Bamako au Nord-est du Mali. Limité au Nord par le village de Kiri, au Sud par celui de Segué, à l'Est par Bargou et à l'Ouest par le village de Sinsanhin. Pongonon comptait 1388 habitants au recensement du Malaria Research and Training Center(MRTC) du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Ondo-Stomatologie(FMPOS) en 2007.

Le paludisme y est endémique avec une période de transmission allant de Juillet à Octobre. Le taux d'inoculation entomologique était de 1 piqûre infestante par personne et par mois en Octobre 2005. L'IP moyen était de 52,1%, et l'IS était de 11,2%[61].

Bandiagara est une ville rurale située à 700 Km au Nord-Est de Bamako, capitale du Mali. Bandiagara comptait 13.364 habitants au recensement du MRTC 2002.

Le cercle est limité par les cercles de Douentza au Nord, Koro à l'Est, Bankass au Sud-Est, Djenné à l'Ouest et Mopti au Nord-Ouest.

Le paludisme y est endémique (méso-endémique) avec une période de transmission courte. La ville de Bandiagara a été l'objet de plusieurs de nos études.

I.11. Type et Période d'étude :

Nous avons mené une étude prospective multicentrique ouverte au cours de la quelle chaque participant inclus était suivi pendant 28 jours selon le protocole. L'étude s'est déroulée entre Octobre 2009 et Janvier 2010. Pour la collecte des données sur le terrain, l'équipe parasito-clinique était basée sur les sites pendant toute la durée de l'étude.

I.12. Le choix des lieux d'étude :

Les sites ont été choisis à cause de leurs accessibilités géographiques, leurs différents faciès épidémiologiques d'une part, mais aussi de l'adhérence des populations de ces sites aux études antérieures du MRTC/DEAP d'autre part.

I.13. Population d'étude :

L'étude a porté sur les adultes ou enfants de tout âge avec un poids corporel $\geq 5\text{Kg}$ souffrant d'accès palustre simple résidant à l'un des quatre sites et répondant aux critères d'inclusion du protocole.

I.14. Considérations éthiques et déontologiques :

Le protocole de recherche de l'étude a été soumis et approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS).

Sur le terrain, la communauté (autorités coutumières, les parents ou personnes responsables des enfants malades) a été informée de tous les aspects de l'étude envisagée.

Chaque participant signait ou apposait son empreinte digitale sur une fiche de consentement volontaire qui lui était présentée par l'équipe de recherche (voir annexe). Pour les enfants mineurs (14-17 ans), les parents ou les tuteurs signaient à leur place.

Pour les participants incapables de lire la langue française, une traduction du contenu de la fiche de consentement était faite dans la langue locale.

Les cas de paludisme non traitables par la voie orale ont été traités par la quinine injectable en perfusion dans du sérum glucosé à 5% ou 10%. Ceux atteints du paludisme grave et ou compliqué dépassant les compétences de prise en charge de l'équipe ont été référés au Centre de référence ou à l'hôpital le plus proche du site d'étude.

I.15. Critères d'inclusion et non inclusion :

Critères d'inclusion:

- adultes ou enfants de tout âge avec un poids corporel $\geq 5\text{Kg}$ atteint du paludisme simple;
- résider dans les sites pendant toute la durée de l'étude ;
- être capable de recevoir un traitement par voie orale ;
- avoir une température axillaire $\geq 37,5$ °C ou notion de fièvre ;
- avoir une infection mono-spécifique à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 2000 à 200 000 formes asexuées /mm³ de sang ;
- obtenir le consentement éclairé de chaque participant et ou l'assentiment pour les enfants ;

Critères de non inclusion :

- présence de paludisme grave et compliqué ;
- pathologies sévères concomitantes;
- femmes enceintes;
- troubles digestifs graves : Vomissements répétés, diarrhées ;
- refus du patient ;

I.16. Echantillonnage :

La taille de l'échantillon a été déterminée sur la base de 96,93% de sensibilité de *P. falciparum* à l'AR-L au Mali déterminée lors de nos études antérieures [44]. En fixant le risque d'erreur de première espèce (Alpha) à 5% et la précision à 5%, la taille minimale retenue était de 307 participants avec goutte épaisse positive. Si l'on tient compte de 10% de données non analysables (pour différentes raisons) la taille revient à

337 participants avec goutte positive. **Pour des raisons pratiques, nous avons réalisé l'étude sur un échantillonnage exhaustif pendant la saison de transmission.**

I.17. Méthodes de collecte des données :

Les données ont été collectées aux postes clinique et biologique.

Collecte des données cliniques :

Elles ont été collectées à l'aide d'un dossier individuel élaboré conformément aux objectifs de l'étude (questionnaire).

Ce dossier comportait le numéro d'enregistrement du malade, sa résidence, son âge ; des renseignements sur les médicaments déjà consommés par le malade dans les jours précédant son inclusion dans notre étude.

Il comportait aussi des renseignements sur l'état clinique du malade à savoir la température, le poids, la rate, et la dose du médicament administré (produit de l'étude) et autres traitements concomitants ainsi que des renseignements biologiques à savoir la parasitémie, le taux d'hémoglobine et en fin l'état d'évolution de la maladie.

I.17.1.1. Les renseignements généraux :

Ils ont été recueillis par interview directe et consistaient à identifier le malade, la prise de température axillaire, la mesure du poids corporel, la mesure de la taille, la résidence. Les renseignements ainsi obtenus étaient enregistrés sur une carte qui accompagne le malade au poste du clinicien.

I.17.1.2. Examen clinique :

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

Les données étaient collectées par suite d'un examen physique qui consistait à la recherche de la détresse respiratoire, de la splénomégalie, de la déshydratation et de la malnutrition etc.

I.17.1.3. Matériel :

Il était constitué de : Blouse, thermomètre électronique, de stéthoscope médical, un tensiomètre, les seringues stériles à usage unique, une balance, une table de

consultation, de stylo, une cantine métallique, les bols en plastique et le registre clinique.

I.17.1.4. Technique de collecte :

@ Médicaments :

Les antipaludiques utilisés étaient le sulfate de quinine , l'Artésunate-Amodiaquine et l'Artéméther-Luméfántrine (produit de l'étude). Les autres médicaments étaient représentés entre autre par les antibiotiques, des antipyrétiques, des benzodiazépines, et d'autres médicaments d'urgence.

Les médicaments étaient administrés par le clinicien en fonction du poids corporel du malade et associé à un traitement symptomatique si nécessaire (par exemple paracétamol en cas de fièvre).

@ Mesure de la température axillaire :

La température était prise à l'aide d'un thermomètre électronique placé dans le creux axillaire. L'audition d'un signal sonore indique la fin de la prise de température.

La fièvre était définie par une température axillaire non corrigée supérieure ou égale à 37,5 °C.

@ Palpation de la rate :

La palpation était effectuée sur le sujet debout et selon la classification de Hackett [38]:

Rate 0 : rate normale non palpable même en inspiration profonde.

Rate 1 : rate palpable sur la ligne mammelonnaire gauche en inspiration profonde.

Rate 2 : rate palpable sur la ligne mammelonnaire gauche mais ne dépassant pas une ligne horizontale passant à égale distance entre le rebord costal et l'ombilic.

Rate 3 : rate dépassant cette ligne sans atteindre l'ombilic.

Rate 4: rate dépassant l'ombilic sans franchir l'horizontale passant à égale distance entre l'ombilic et la symphyse pubienne.

Rate 5 : rate dépassant cette ligne.

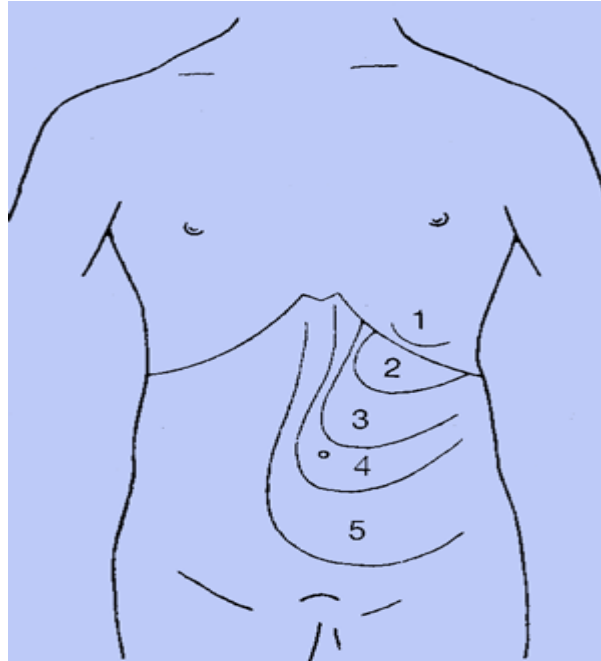


Figure 3:Classification de Hackett

(Source : www.impact-malaria.com/iml/cx/fr/layout.jsp...)

@ Traitement des cas de maladie :

Tous les cas de paludisme simple, remplissant les critères d'inclusion du protocole étaient traités avec le produit de l'étude (l'Artéméther-Luméfantrine (Coartem®) en fonction du poids corporel du malade et associé à un traitement symptomatique.

En cas de vomissement dans les 30 minutes qui suivaient l'ingestion ou de rejet du médicament, une seconde dose était administrée ; et 30 minutes après une demi-dose était administrée.

Les cas graves étaient exclus de l'étude mais traités par les sels de quinine en perfusion dans du sérum glucosé 5% ou 10% ; et le relais était pris par un antipaludique (ASAQ) par voie orale dès qu'ils ne vomissaient plus et était capable d'avaler. Ceux qui ont une charge parasitaire inférieure à 2000 étaient traités par un antipaludique (ASAQ) par voie orale.

@ Méthode de conservation des dossiers de l'étude :

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

Données Biologiques :

Elles ont été collectées au poste de biologie et consistaient à faire une goutte épaisse, de la lire au microscope électrique binoculaire, de faire les confettis et d'évaluer le taux d'hémoglobine.

I.17.1.5. Goutte épaisse :

@ Principe :

Elle permet d'obtenir un grand nombre de globules rouges déshémoglobinisés, pour faciliter la détection des parasites et la quantification de leur densité.

@ Matériel :

Blouse, gants stériles, lames porte-objet, vaccinostyles stériles à usage unique, alcool à 70°C, coton hydrophile, Poubelle, Giemsa à 10%, bacs de coloration, éprouvette graduée, râteliers, boîte OMS, eau déionisée, crayon à papier, chronomètre, huile d'immersion, compteur manuel, papier hygiénique, microscope optique binoculaire, une table de lecture et une chaise.

@ Mode opératoire :

Les lames étaient marquées par un crayon indélébile. L'index ou le majeur de la main gauche était désinfecté par un tampon d'alcool, puis essuyé avec un morceau de coton sec afin d'enlever le reste d'alcool. Une ponction capillaire était faite au niveau de ce doigt et la première goutte

était essuyée avec du coton sec. La seconde goutte était récupérée sur une lame porte-objet. Avec l'extrémité d'une 2^{ème} lame la goutte était étalée par des mouvements circulaires en spirale (pour la défibrination) pendant une à

deux minutes sur un centimètre de diamètre environ. La goutte était **laissée à sécher à plat sur un support** à température ambiante soit pendant quelque minute, la préparation était gardée à l'abri de la poussière, et des mouches. Pour la coloration, la préparation est gardée dans du Giemsa à 10% pendant 15 minutes. Puis, elle est rincée avec de l'eau propre, en faisant couler le liquide très délicatement sur la lame. Enfin la lame colorée est placée sur le râtelier pour sécher.

@ Examen microscopique :

La lecture des gouttes se faisait sur place par un biologiste à l'aide d'un microscope optique binoculaire à l'objectif 100 avec huile à immersion. La densité parasitaire était déterminée en comptant le nombre de parasites sur 300 leucocytes et le tout rapporté à 7500 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 10% des lames ont été relues par un microscopiste expérimenté du DEAP qui n'a pas participé à l'étude.

I.17.1.6. La confection des confettis :

Il s'agissait de déposer quelques gouttes de sang sur un papier buvard appelé confetti. Elle était effectuée au poste de biologie.

@ Principe :

Consiste à collecter du sang parasité sur un papier buvard.

@ Matériel :

Elle nécessitait un matériel minimal et un personnel qualifié.

Papier buvard, gants stériles, vaccinstyles stériles, coton hydrophile, alcool à 70°C, paire de ciseaux, crayon etc.

@ Technique :

Découper du papier buvard à l'aide d'une paire de ciseaux environ 4cm de long sur 2cm. Diviser un des bouts du confetti en quatre languettes ($\frac{1}{2}$ cm de largeur sur 1cm de hauteur). Inscrire le numéro d'identification du papier buvard à l'aide du crayon.

Imbiber les 4 languettes de sang puis laisser sécher à la température ambiante.

@ Gestion des confettis :

Les confettis étaient séchés, accrochés à du scotch, à l'abri des mouches et de la poussière, puis conservés et transportés dans des enveloppes individuelles à température ambiante. Ces confettis ont été utilisés pour l'analyse moléculaire.

I.17.1.7. Étude hématologique:

✓ Principe :

Elle consistait à déterminer le taux d'hémoglobine à l'aide d'un Hémocue®.

✓ Matériels :

Alcool à 70°C, coton hydrophile, gants stériles, blouse, vaccinostyle stérile, microcuvette, Hémocue® etc.

✓ Mode opératoire :

Nous avons utilisé l'appareil Hémocue®.

A partir d'une ponction capillaire, à l'aide d'un vaccinostyle stérile, nous remplissons la microcuvette de sang que l'on introduit ensuite dans l'appareil Hémocue®. La valeur du taux d'hémoglobine est exprimée en g/dl. Un contrôle de qualité est réalisé systématiquement tous les jours. Le taux d'hémoglobine a été évalué au J0, au 14^e jour, au 28^e jour pour chaque patient et pendant les visites imprévues.

I.18. Déroulement de l'enquête :

@ Organisation du travail:

Trois postes étaient mises en place pour le bon déroulement du travail.

• Poste 1 ou poste d'identification :

Il était composé d'un guide muni d'un cahier de recensement. Il avait comme tâches :

- Identifier chaque patients par son nom, prénom, son âge, son sexe, sur une carte.
- Orienter les patients au poste clinique. Les participants susceptibles de répondre à notre critère d'inclusion étaient envoyés au poste biologique.
- Il était en plus chargé de rechercher les enfants s'ils ne venaient pas aux rendez-vous programmés au quotidien ou hebdomadaire.

- **Poste 2 ou poste clinique et de traitement :**

Il était tenu par un médecin. Chaque patient a bénéficié d'un examen clinique général. Tous les patients présentant les symptômes du paludisme étaient orientés au poste biologique. Les patients présentant d'autres affections étaient orientés au poste de soins (tenus par un infirmier et ou un étudiant en médecine) munis de leurs ordonnances délivrées par le médecin.

Les volontaires inclus dans l'étude étaient traités au niveau de ce poste. Chaque participant avait un numéro unique qui est délivré selon l'ordre d'arriver.

- **Poste 3 ou poste biologique:**

Il était composé d'un biologiste ou d'un pharmacien selon le site. C'est au niveau de ce poste qu'avait lieu le diagnostic parasitologique du paludisme, la détermination du taux d'hémoglobine et la confection des confettis.

@ Programme d'activité de base :

Tableau I: Calendrier des activités de base au cours du suivi.

Paramètre de l'étude	Artéméther-Luméfantrine			Jours de référence					
	J0	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28	Visites imprévues
Consentement									
Assentiment	✓								
Antécédents médicaux	✓								
Caractéristiques de bases	✓								
Identification									
Renseignements cliniques	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Goutte épaisse									
Frotti mince	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hémoglobine	✓					✓		✓	✓
Confetti PCR	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Au premier jour ou jour d'inclusion (J0), un examen clinique, une goutte épaisse, une détermination du taux d'hémoglobine et une confection de confettis étaient faits chez chaque participant.

Les jours J1 et J2 correspondant au deuxième et troisième jour de suivi, une évaluation clinique et biologique (goutte épaisse, frottis mince, confection de confettis), était réalisée.

Aux jours J3, J7, J14, J21 et J28 les mêmes évaluations des jours J1 et J2 étaient réalisées. En plus à J14 et à J28 les taux d'hémoglobine étaient analysés.

Aux jours de visite imprévue, l'examen général du malade était réalisé et associé aux examens biologiques (goutte épaisse, confettis et taux d'hémoglobine).

I.19. Critères de jugement de l'efficacité thérapeutique :

Le jugement se faisait selon le protocole de l'OMS 2003[90] : Il regroupe

- Echec thérapeutique précoce (ETP),
- Echec thérapeutique tardif (ETT) constitué de : Echec Clinique Tardif (ECT) et Echec Parasitologique Tardif (EPT),
- Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (RCPA),

Echec thérapeutique précoce (ETP) :

- Apparition de signes de danger ou de paludisme grave aux jours 1, 2 ou 3, en présence de parasite.
- La densité parasitaire au jour 2 supérieure à celle du jour 0, quelque soit la température axillaire.
- Présence de parasite au jour 3 et une température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C.
- La densité parasitaire au jour 3 dépassant d'au moins 25% celle du jour 0.

Echec clinique tardif :

- Apparition de signes de danger ou de paludisme grave après le J3, en présence de parasite, en l'absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique précoce.
- Présence de parasite et une température axillaire supérieure ou égale à 37,5° C ou antécédent de fièvre un jour quelconque entre le jour 4 et le jour 28, en l'absence de tout critère d'échec thérapeutique précoce.

Echec parasitologique tardif :

Présence de parasite un jour quelconque entre le jour 7 et le jour 28 et une température axillaire inférieure à 37,5°C, en l'absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique précoce ou d'échec clinique tardif.

Réponses clinique et parasitologique adéquates :

Absence de parasite au jour 28, quelle que soit la température axillaire, en l'absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique précoce, d'échec clinique tardif ou parasitologique tardif.

Critères de jugement secondaires :

- ✓ Temps de clairance parasitaire,
- ✓ Temps de clairance de la fièvre,
- ✓ Taux de porteur de gamétocytes,
- ✓ Evaluation du taux d'anémie,

I.20. La collecte des données au laboratoire : Etude de biologie moléculaire :

L'étude moléculaire a été effectuée dans le laboratoire de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance (MEDRU) du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS), Université de Bamako.

Nous avons procédé à l'extraction, à l'amplification, à la migration, à la révélation par photographie à la lumière ultraviolette de l'ADN plasmodial et à l'interprétation des résultats obtenus. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est la technique que nous avons utilisée pour l'analyse de l'ADN.

Les types de PCR que nous avons utilisé pour l'analyse moléculaire des échantillons étaient la méthode RFLP et MS-PCR. Il s'agissait d'identifier les gènes de résistance à la chloroquine (*Pfcr*t K76T et *Pfmdr*1N86Y) et les gènes polymorphes (MSP1, MSP2 et le microsatellite CA1) chez les parasites.

Le matériel biologique qui a servi à faire l'analyse moléculaire est l'ADN plasmodial extrait à partir des confettis de J0 et ceux des jours d'échec. Pour distinguer la réinfection de la recrudescence, nous avons analysé le polymorphisme génétique du MSP1, MSP2 et CA1 à J0 et au jour d'échec du même participant.

Après l'extraction, nous avons procédé à l'amplification, à la digestion avec les enzymes de restriction. Ensuite on a interprété les photographies des différents gels.

Principe :

Elle est basée sur l'amplification exponentielle *in vitro* de l'ADN en présence d'amorces spécifiques, de nucléotides, de Taq polymérase et d'un milieu tampon.

Extraction de l'ADN plasmodial :

❖ **Matériel et réactif :**

Blouse, paire de gants, paire de ciseaux, papier hygiénique, confettis, marqueur indélébile, racks, tubes eppendorfs, Becher, poubelle, pipette (100, 200, 1000), embout (100, 200, 1000), méthanol, hotte, eau deionisée, plaque chauffante, thermomètre, agitateur, congélateur.

❖ **Mode opératoire :**

L'extraction de l'ADN plasmodial a été faite à l'aide du méthanol et de l'eau distillée. Cette extraction a consisté à découper approximativement 3 mm² de confettis imprégnés de sang, le transférer dans un microtube, puis ajouter 50-100 µl de méthanol dans le tube. Laisser incuber à la température ambiante pendant 15 mn. Le papier est complètement immergé dans le méthanol. Jeter le méthanol, sécher les morceaux de confettis sous vide ou à l'air libre.

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

Amplification de l'ADN plasmodial :

❖ **Matériels :**

Blouses, gans, marqueur indélébile, tubes de 200 ou de 500 µl, tubes de 1500 µl, pipettes (2,10,20, 100, 200, et 1000 µl), embout (2, 10, 20, 100, 200 et 1000 µl), racks, portoirs pour pipette, thermocycleur, poubelle.

❖ **Préparation des réactifs de PCR :**

- **DNTPs :** une solution de travail équimolaire des quatre dNTPs de 2mM était préparée à partir d'un stock de 100mM.

- **Solution tampon (PCR Buffer)** : concentrées à 10X, elles étaient fournies par les compagnies commerciales avec le Mg^{2+} . Pour le stock de travail, on préparait les aligots de 5X avec une teneur de 7,5mM $MgCl_2$; 12,5mM $MgCl_2$ et 17,5mM $MgCl_2$.
- **Amorces (Primers)** : elles venaient sous forme de poudre (lyophilisée), à partir de la poudre, le stock de travail 100 μ M (ou 100x) était préparé ; la concentration finale dans le tube réactionnel était de 1 μ M.
- **TBE** : pour constituer une solution de stock de travail d'un litre avec une concentration de 5 fois ou 5X et avec un pH = 8. On prenait 54g de Tris base (89mM) ; 27,5g d'acide Borique (89mM) ; et 0,37g d'EDTA Na (2mM), à dissoudre dans un litre d'eau déionisée. La solution finale était 0,5 fois concentrée soit 0,5X.
- **Colorants de migration** : il s'agit du bleu de bromophénol (BB) et xylène cyanol (XC). Pour préparer chacun des colorants, on prenait 35ml de glycérol, 15ml d'eau déionisée et 0,125g soit du bleu de bromophénol ; soit du xylène cyanol.
- ✓ **Marqueur de poids moléculaire** : ce marqueur de poids moléculaires constituait la solution de référence. Pour la résuspension, on dilue 100 μ l de paires de bases de l'ADN dans 400 μ l d'eau stérile. Puis on associe 100 μ l du colorant bleu six fois concentré, pour former un mélange de 600 μ l.

❖ Les techniques :

Nous avons procédé à l'amplification des gènes *Pfprt*, *Pfmdr-1*, MSP1, MSP2 et Ca1.

➤ Amplification du gène *Pfprt* :

✓ Première amplification :

CRT-P1 : CCGTTAATAATAAATACACGCAG

CRT-P2 : CGGATGTTACAAAACACTATAGTTACC

Nous avons identifié les tubes de 200 ou 500 μ l conformément aux numéros des confettis à traiter. Puis nous avons préparé le mélange des réactifs dans un tube de 1,5ml, en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau III.

Ensuite nous avons reparti dans chaque tube identifié 20 μ l du mélange. Puis nous avons ajouté 5 μ l d'ADN extrait dans le tube correspondant.

Ensuite nous l'avons centrifugé brièvement les tubes. Puis nous avons placé les tubes bien fermés dans la machine pour l'amplification avec le programme approprié (tableau IV).

Tableau II: Composition du mélange réactionnel pour la première amplification du gène *pfcr1*.

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction en μl
H ₂ O	-	12,125
5X Tampon 12,5mM Mg ²⁺	1X (2,5mM Mg ²⁺)	5
10X dNTPs	1X (200 μ M)	2,5
100X Amorces CRT-P1+CRT-P2	1X (1 μ M)	0,25
Taq Polymérase (5U/ μ l)	0,625 U	0,125
TOTAL		20

NB : Pour les contrôles positifs, on ajoute 1 μ l d'ADN à 24 μ l du mélange.

Tableau III: Programme de la première amplification du gène *pfert*.

	Etape	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	94°C	3 min
2	Dénaturation	94°C	30 sec
3	Hybridation	56°C	30 sec
4	Extension	60°C	1 min
5	Retourner à l'étape 2, 44 fois		
6	Extension finale	60°C	3 min
7	Fin du programme	4°C	Infini

✓ **Deuxième amplification:**

CRT-D1: TGTGCTCATGTGTTTAAACTT

CRT-D2: CAAAACCTATAGTTACCAATTTTG

Comme pour la première amplification, nous avons identifié les tubes de 200 ou 500µl conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter.

Puis nous avons préparé le mélange dans un tube 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau V.

Après nous avons reparti dans chaque tube identifié 24µl de la solution du mélange. Puis nous avons ajouté 1µl du produit de la 1^{ère} amplification dans le tube correspondant. Ensuite nous avons centrifugé brièvement les tubes. Les tubes bien fermés sont à la fin placés dans la machine pour l'amplification selon le programme approprié (tableau VI).

Tableau IV : Composition du mélange réactionnel pour la deuxième amplification du gène *pfcr*.

Réactifs	Concentrations finale	Volume par réaction en μl
H ₂ O	-	16,125
5X Tampon 12,5mM Mg ²⁺	1X (2,5mM Mg ²⁺)	5
10X dNTPs	1X (100 μM)	2,5
100X Amorces CRT-D1+CRT-D2	1X (1 μM)	0,25
Taq Polymérase (5U/ μl)	0,625 U	0,125
TOTAL		24

Tableau V : Programme de la deuxième amplification du gène *pfcr*.

	Etape	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	5 min
2	Dénaturation	92°C	30 sec
3	Hybridation	48°C	30 sec
4	Extension	65°C	1 min
5	Retourner à l'étape 2, 25 fois		
6	Extension finale	65°C	3 min
7	Fin du programme	4°C	Infini

✓ La digestion du produit de la deuxième amplification :

Nous avons d'abord trié les échantillons qui ont des bandes correctes plus les quatre témoins. Puis nous avons numéroté des nouveaux tubes de 200 ou 500 μl conformément aux numéros du produit de la deuxième amplification à traiter. Ensuite nous avons préparé le mélange des réactifs dans un tube 1,5 ml en fonction du nombre

d'échantillons à traiter (tableau VII). Après nous avons reparti dans chaque tube identifié 15µl du mélange.

Ensuite nous avons ajouté 5µl du produit de la deuxième amplification dans le tube correspondant. Puis nous avons brièvement centrifugé. En fin nous avons placé les tubes dans l'incubateur, ou le bain marie, ou les plaques chauffantes.

La digestion se fait à une température de 50°C pendant 6heures au minimum. Puis nous avons procédé à l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pendant au moins 30mn à 100V (volte). Finalement nous avons fait la révélation sous UV. Puis nous avons pris la photo du gel, et nous l'avons interprété.

Tableau VI: Composition du mélange réactionnel pour la digestion du gène *pfert*.

Réactifs	Concentration finales	Volume par réaction en µl
5X Tampon N°3	1X	2
100xBSA	1X	0,2
Enzyme (Apo 1) 10000U /ml	2,5U	0,25
H2O	-	12,55
ADN	-	5
TOTAL		20

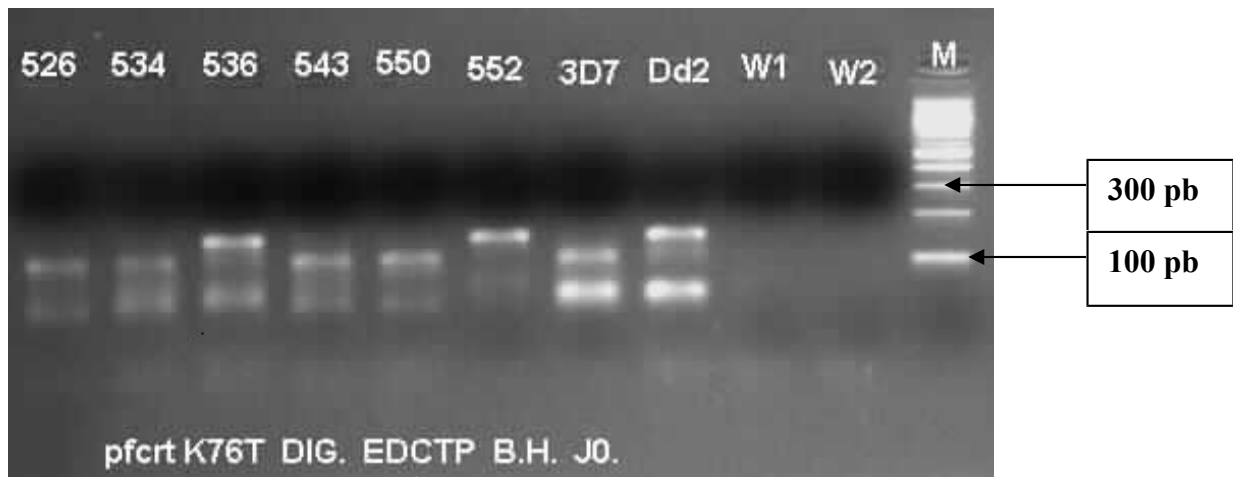


Figure 4: Photo du gel (produit de la digestion de *pfcr1*)

3D7 : est un témoin sauvage,

Dd2 : est un témoin mutant,

W1 et W2 sont des témoins négatifs,

526 : est sauvage,

536 : est mutant,

✓ **Interprétation de la photo :**

Nous avons annoté la photo et reporté les résultats dans un registre.

Une bonne réaction se traduit par la présence de bandes conformes à celles attendues. Nous avons observé la conformité de la taille du produit attendu ainsi que celle des témoins positifs. Nous n'avons pas eu de bande au niveau des témoins négatifs.

La taille attendue pour les produits d'amplification est de 537pb pour la 1^{ère} amplification et de 134 pb pour la 2^e amplification.

L'enzyme ne coupe que les souches de génotypes sauvages. Les bandes de la même taille que le témoin sauvage (100pb) correspondent aux souches sauvages. Par contre celles qui ont la même taille que le témoin mutant (134pb) correspondent aux souches mutantes. Les échantillons ayant à la fois les deux bandes (sauvage et mutante) correspondent aux souches mixtes.

➤ **Amplification du gène *Pfmdr-1* :**

✓ **Première amplification:**

MDR-1: ATGGGGTAAAGAGCAGAAAGA

MDR-2: AACGCAAGTAATACATAAAGTCA

Nous avons identifié les tubes de 200 ou 500µl conformément aux numéros des confettis à traiter. Ensuite nous avons préparé le mélange des réactifs dans un tube de 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau VIII. Puis nous avons reparti dans chaque tube identifié 20µl du mélange. Ensuite nous avons ajoutée 5µl d'ADN extrait dans le tube correspondant. Puis nous avons brièvement centrifugé les tubes. Ensuite nous avons placé les tubes bien fermés dans la machine, pour l'amplification avec le programme approprié (tableau IX).

Tableau VII: Composition du mélange réactionnel pour la première amplification du gène *pfmdr-1*.

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction en µl
H2O	-	12,125
5X Tampon 12,5mM Mg ²⁺	1X (2,5mM Mg ²⁺)	5
10X dNTPs	1X (200µM)	2,5
100X Amorces MDR1+2 (100uM)	1X (1µM)	0,25
Taq Polymérase (5U/µl)	0,625 U	0,125
TOTAL		20

Tableau VIII: Programme de la première amplification du gène *pfmdr-1*.

	Etape	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	3 min
2	Dénaturation	92°C	30 sec
3	Hybridation	48°C	45 sec
4	Extension	65°C	1 min
5	Aller à l'étape 2, 44 fois		

6	Extension finale	65°C	5 min
7	Fin du programme	4°C	Infini

✓ **Deuxième amplification du gène *Pfmdr-1*:**

MDR-3: TGGTAACCTCAGTATCAAAGAA

MDR-4: ATAAACCTAAAAAGGAACTGG

Nous avons identifié les tubes de 200 ou 500µl conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter. Ensuite nous avons préparé le mélange dans un tube 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau X.

Puis nous avons reparti dans chaque tube identifié 24µl de la solution du mélange. Ensuite nous avons ajouté 1µl du produit de la 1^{ère} amplification dans le tube correspondant. Puis nous avons brièvement centrifugé les tubes, fermer et placer les dans la machine pour l'amplification selon le programme approprié (tableau XI).

Tableau IX: Composition du mélange réactionnel pour la deuxième amplification du gène *pfmdr-1*.

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction en μl
H ₂ O	-	16,125
5X Tampon 12,5mM Mg ²⁺	1X (2,5mM Mg ²⁺)	5
10X dNTPs	1X (100 μM)	2,5
100X Amorces MDR3+4	1X (1 μM)	0,25
Taq Polymérase (5U/ μl)	0,625 U	0,125
TOTAL		24

Tableau X : Programme de la deuxième amplification du gène *pfmdr-1*.

	Etape	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	3 min
2	Dénaturation	92°C	30 sec
3	Hybridation	48°C	45 sec
4	Extension	65°C	1 min
5	Aller à l'étape 2, 25 fois		
6	Extension finale	65°C	5 min
7	Fin du programme	4°C	Infini

✓ La digestion du produit de la deuxième amplification :

Nous avons trié d'abord les échantillons qui ont donné de bandes correctes plus les quatre témoins. Puis nous avons identifié les tubes de 200 ou 500 μl conformément aux numéros du produit de la deuxième amplification à traiter. Ensuite nous avons préparé le mélange des réactifs dans un tube 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter (tableau XII). Puis nous avons reparti dans chaque tube identifié 15 μl du mélange.

Ensuite nous avons ensuite ajoutée 5µl du produit de la deuxième amplification dans le tube correspondant.

La digestion se fait à une température de 37 °c pendant 6 heures au minimum. Puis nous avons procédé à l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pendant au moins 30mn à 100V (volte). Ensuite nous avons fait la révélation sous UV. Puis nous avons pris la photo du gel, et l'avons interprétée.

Tableau XI: Composition du mélange réactionnel pour la digestion du gène *pfmdr-1*.

Réactifs	Concentrations finales	Volume par réaction en µl
10X Tampon N°3	1X	2
100XBSA	1X	0,2
Enzyme(AflIII) 5000U/ml	1,25 U	0,25
H2O	-	12,55
ADN	-	5
TOTAL		20

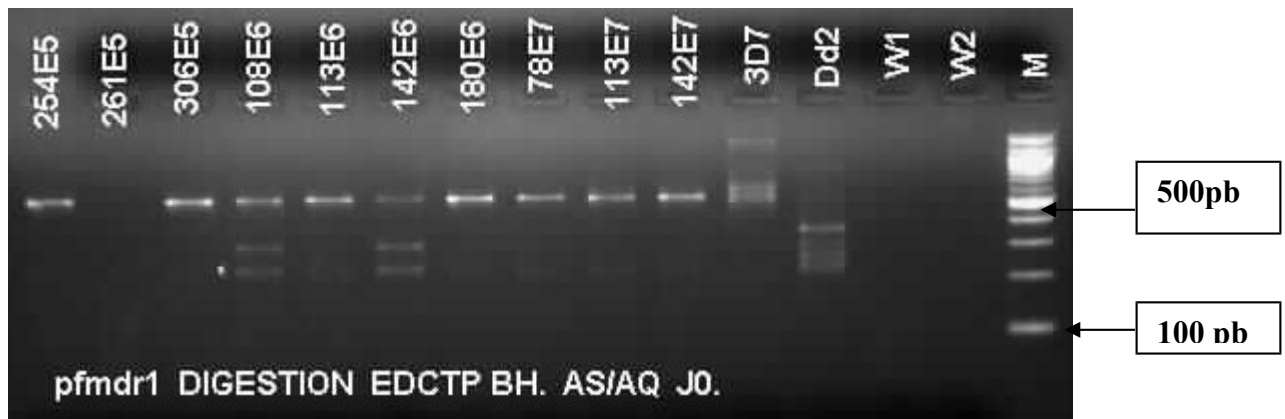


Figure 5: Photo du gel (produit de la digestion de *pfmdr1*).

3D7 : est un témoin sauvage,

Dd2 : est un témoin mutant,

W1 et W2 sont des témoins négatifs,

254E5 et 306E5 : sont sauvages,

108E6 est mixte (sauvage et mutant).

✓ **Interprétation de la photo :**

La taille de bandes de produits migrés était comparée à celle du marqueur de poids moléculaire de référence. Pour la première et la deuxième amplification, la taille des bandes des échantillons et celle des témoins positifs étaient au même niveau.

Pour la digestion :

- Les échantillons dont les bandes étaient au même niveau que la bande du témoin positif sauvage (3D7 : 521bp), étaient considérés comme souches sauvages.
- Les échantillons dont les bandes étaient au même niveau que la bande du témoin positif mutant (Dd2 : 326bp) étaient considérés comme souches mutantes.
- En revanche, les échantillons qui avaient trois bandes l'une au niveau du témoin positif sauvage et deux autres au niveau du témoin positif mutant étaient considérés comme mixtes ; c'est-à-dire présentent à la fois des souches avec allèle sauvage et des souches avec allèle mutant.

➤ **Détermination des polymorphismes de MSP1 et MSP2 :**

✓ **Première amplification pour MSP1 et MSP2 :**

- Identifier les tubes de 200 ou 500 µl conformément aux numéros des confettis à traiter,
- Préparer le Master MIX dans un tube de 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon les tableaux I, II et III,
- Repartir dans chaque tube identifié 24µl de Master MIX,
- Ajouter 1 µl d'ADN extrait au méthanol dans chaque tube correspondant,
- Centrifuger brièvement les tubes,
- Placer les tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié (Tableaux IV, V et VI),
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose (1,5% pour msp1 et 1,8% pour msp2) avant de passer à la deuxième amplification (cf. MON gel d'agarose),
- Faire la photo du gel,
- Interpréter la photo (présence d'une ou de plusieurs bandes).

▪ **Couples d'amorces de la première amplification :**

MSP1 :

O1 : CACATGAAAGTTATCAAGAACTTGTC

O2 : GTACGTCTAATTCATTTGCACG

MSP2 :

S2 : GAAGGTAATTAACATTGTC

S3 : GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG

Tableau XII: Mélange réactionnel pour un volume final de 25 ul (MSP1) première amplification.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL)
Buffer/MgCl ₂	5X/7,5 mM	1X/1,5 mM	5
dNTP	10X/2 mM	1X/200µM	2.5
Amorces (O1etO2)	100X/10 µM	1X/100 nM	0.25

Taq Polymérase	5U/ μ L	0.025U	0.125
Eau pour PCR	-	-	16.125
Total			24

On ajoute dans chaque tube 1 μ L de l'ADN extrait au méthanol

Tableau XIII: Mélange réactionnel pour un volume final de 25 μ l (MSP2) première amplification.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (μ L)
Buffer/MgCl ₂	5X/7,5 mM	1X/1,5 mM	5
dNTP	10X/2 mM	1X/200 μ M	2.5
Amorces (S2 et S3)	100X/10 μ M	1X/100 nM	0.25
Taq Polymérase	5U/ μ L	0.025U	0.125
Eau pour PCR	-	-	16.125
Total			24

On ajoute dans chaque tube 1 μ L de l'ADN extrait au méthanol

✓ **Deuxième amplification :**

- Identifier les tubes de 200 ou 500 μ l conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter,
- Préparer le Master MIX dans un tube 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon les tableaux ci-dessous,
- Repartir dans chaque tube identifié 24 μ l de Master MIX,
- Ajouter un volume du produit de la 1^{ère} amplification dans chaque tube correspondant en fonction de la présence de bande (0,5 μ l) ou des traînées (0,1 μ l),
- Centrifuger brièvement les tubes, fermer et placer les dans le thermocycleur pour l'amplification selon le programme approprié,
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose : 1,5% pour msp1 et 1,8% pour msp2 (cf. MON gel d'agarose),
- Faire la photo du gel,
- Interpréter la photo.

▪ **Couples d'amorces de la deuxième amplification :**

MSP1 : [500 Pb]

N1 : GCAGTATTGACAGGTTATGG

N2 : GATTGAAAGGTATTTGAC

MSP2 : [500 Pb]

S1 : GAGTATAAGGAGAAGTATG

S4 : CTAGAACCATGCATATGTCC

Tableau XIV: Mélange réactionnel pour volume final de 25 ul (MSP1) deuxième amplification.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL)
Buffer/MgCl ₂	5X/17,5 mM	1X/3,5 mM	5
dNTP	2 mM	200 µM	2.5
Couple d'amorces N1N2	10 µM	100 nM	0.25
Taq Polymérase	5U/µL	0.05U	0.125
Eau pour PCR			16.625
Total			24.5

On ajoute 0.5 µL du produit PCR de la 1^{ère} amplification

Tableau XV: Mélange réactionnel pour un volume final de 25 ul (MSP2) deuxième amplification.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL)
Buffer/MgCl ₂	5X/17,5 mM	1X/3,5 mM	5

dNTP	2 mM	200 μ M	2.5
Couple d'amorces S1S4	10 μ M	100 nM	0.25
Taq Polymérase	5U/ μ L	0.05U	0.125
Eau pour PCR			16.625
Total			24.5

On ajouter 0.5 μ l du produit PCR de la première amplification.

Différents programmes d'amplification :

Tableau XVI: Programme de la première et deuxième amplification MSP1.

	Et a pe s	Température	Temps
Dénaturation initiale		94 °c	3 min
Dénaturation		94 °c	25s
Hybridation		50 °c	35 s
Elongation		68 °c	2 min 30 s
30 cycles à partir de la 2ème étape			
Elongation finale		72 °c	3 min
Conservation		4 °c	∞

Tableau XVII: Programme de la première amplification MSP2.

Eta pes	Température	Temps
Dénaturation initiale	94 °C	3 min
Dénaturation	94 °C	25 s
Hybridation	42 °C	60 s
Elongation	65 °C	2 min
30 cycles à partir de la 2ème étape		
Elongation finale	72 °C	3 min
Conservation	4 °C	∞

Tableau XVIII: Programme de la deuxième amplification MSP2.

Eta pes	Température	Temps
Dénaturation initiale	94 °C	3 min
Dénaturation	94 °C	25 s
Hybridation	50 °C	60 s
Elongation	70 °C	2 min
30 cycles à partir de la 2ème étape		
Elongation finale	72 °C	3 min
Conservation	4 °C	∞

➤ **Détermination du polymorphisme du microsatellite Ca1 :**

✓ **Première amplification:**

▪ **Couple d'amorces :**

- CA1-1L : GCTGTAAAACGTGAACAACAAA
- CA1-1R : CAATTCTGCTTCAGTTGGATT

Tableau XIX: Mélange réactionnel pour un volume final de 25 ul (CA1) première amplification.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL)
Buffer/MgCl ₂	5X/17,5 mM	1X/3,5 mM	5
dNTP	2 mM	200µM	2.5
Couple d'amorces Ca1-1R Ca1-1L	10 µM	100 nM	0.25
Taq Polymérase	5U/µL	0.05U	0.125
Eau pour PCR			16.625
Total			24

On ajoute 1 µL de l'extrait d'ADN par tube.

✓ **Deuxième amplification :**

▪ **Couple d'amorces :**

-CA1- L : ATTATGAACAATTCAGAC

-CA1- R : GTTGTTATAGCTAATGAG

Tableau XX: Mélange réactionnel pour un volume final de 25 μ L (CA1) deuxième amplification.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (μ L)
Buffer/MgCl ₂	5X/17,5 mM	1X/3,5 mM	5
dNTP	2 mM	200 μ M	2.5
Couple d'amorces Ca1- R Ca1-L	10 μ M	100 nM	0.25
Taq Polymérase	5U/ μ L	0.05U	0.125
Eau pour PCR			16.625
Total			24.5

On ajoute 0.5 μ L de l'extrait d'ADN par tube.

Tableau XXI: Programme microsatellite CA1 première amplification.

Étapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	95°C	5 min
Dénaturation	92°C	30 S
Hybridation	45°C	30 S
Elongation	65°C	30 S
45 cycles à partir de la 2ème étape		
Elongation finale	65°C	5 min
Conservation	4°C	∞

Tableau XXII: Programme microsatellite CA1 deuxième amplification.

Étapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	95°C	5 min
Dénaturation	92°C	30 S
Hybridation	45°C	30 S

Elongation	65°C	30 S
20 cycles à partir de la 2ème étape		5 min ∞
Elongation finale	65°C	
Conservation	4°C	

Révélation de l'ADN à la photographie :

@ Matériels :

Blouse, paire de gant, balance analytique (peser des produits), herlmeilleir, la spatule, le four à micro-onde, pipette 20 µl, embout 20 µl, le moule, le scotch, le peigne, le back de migration, le générateur, laboratory film (para film® M), la chambre à UV (ultra violet), l'ordinateur, l'imprimante.

@ Réactifs et leur préparation pour la révélation de l'ADN :

- **TBE (Tris Borate EDTA) :**

Ce sont des poudres à dissoudre dans de l'eau dé ionisée. Nous dissolvons le TBE (Tris ase (89 mM) = 108 g, Acide borique (89 Mm) = 55 g, EDTA (2 mM) = 0,74 g) dans 1l d'eau dé ionisée pour obtenir un stock de travail. Cette solution est à 10 X. La solution finale utilisée est de 0,5X.

- **Solution de migration :**

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

- **Les colorants de migration :**

Appelés 'dye', le bleu de bromophénol (BB) et le xylène (xc) sont des colorants qui permettent de suivre la migration sur le gel et de maintenir le produit de migration, assez longtemps dans les puits en augmentant les poids.

- **Le bleu de bromophénol (BB) :**

Constitué du glycérol 35 ml, d'eau dé ionisée 15 ml et du bleu de bromophénol 0,125 g.

- **Le xylène :** Est constitué du glycérol 35 ml, d'eau dé ionisée 15 ml et du xylène 0,125g.

- **Marqueur de poids moléculaire (PM) :**

Il constitue la solution de référence et sa dilution était faite dans du dye et de l'eau déionisée. A un volume de marqueur étaient ajouté un volume de dye et 9 volumes d'eau déionisée et la solution prête pour l'usage. Il joue essentiellement deux rôles ; celui de chromophore et celui de témoin. En effet, le dye augmente d'une part le poids de l'ADN (dérivatisation) et d'autre part permet de suivre l'évolution l'électrophorèse.

- **Gel de migration :**

Il est fait à partir de 2 grammes de poudre d'agarose dissoute dans 100 ml de TBE à 0,5X. La solution est ensuite chauffée dans un four à micro-onde pendant 3 mn, permettant ainsi la dissolution complète de l'agarose. Après le chauffage, on y ajoute du bromure d'éthidium 3µl, puis le gel est coulé dans le moule de migration contenant les peignes. Au bout de 30 à 60 mn, le gel est prêt à être utilisé pour la migration.

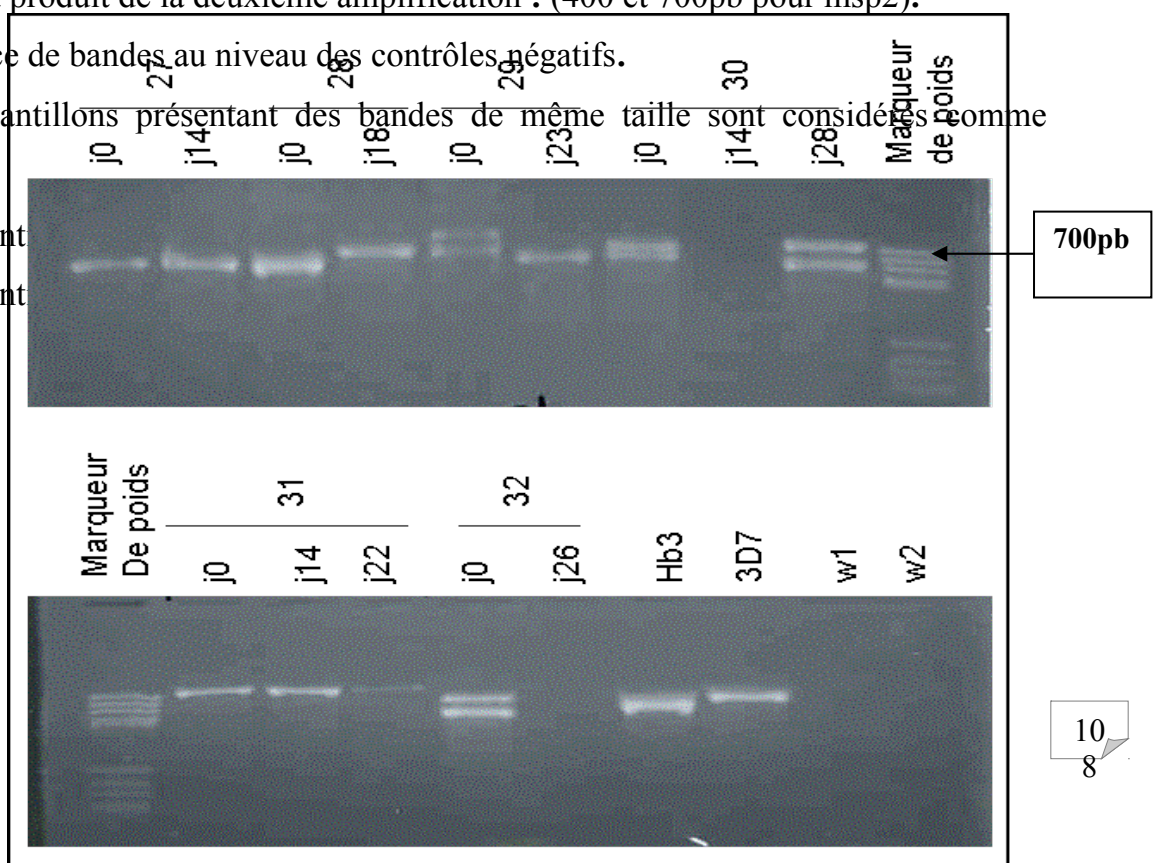
- **Le bromure d'éthidium :**

C'est un produit qui va s'intercaler entre les brins d'ADN et les rend fluorescent à la lumière ultra violette.

➤ **Interprétation des résultats MSP1, MSP2 et CA 1:**

L'interprétation de la photographie du gel tient compte des conditions suivantes :

- 1- Conformité de la taille du produit de la deuxième amplification par rapport à celle attendue.
- 2- Taille du produit de la deuxième amplification : (400 et 600pb pour msp1).
- 3- Taille du produit de la deuxième amplification : (400 et 700pb pour msp2).
- 5- L'absence de bandes au niveau des contrôles négatifs.
- 6- Les échantillons présentant des bandes de même taille sont considérés comme identiques.
- 7- Les échant
- 8- Les échant



600pb

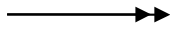


Figure 6: Photo d'un gel de correction moléculaire (MSP2) deuxième amplification.

27, 28, 29, 30,31 et 32 : correspondent aux échantillons

Hb3 et **3D7** sont des témoins positifs

W1 : Témoins négatifs de la première amplification

W2 : Témoins négatifs de la deuxième amplification

I.20.1. Report des résultats :

Identifier et reporter scrupuleusement les résultats dans un registre.

I.20.2. Limites de la procédure :

Cette technique ne permet pas de faire la distinction entre deux bandes ayant quelques paires de bases de différence.

I.21. Analyse et gestion des données :

Nos données ont été systématiquement portées sur des registres et des fiches techniques. Ces fiches étaient régulièrement contrôlées et placées dans des chemises individuelles.

Après le suivi complet, les registres et les fiches techniques étaient gardés dans une cantine métallique à l'abri des insectes et des rongeurs.

Les registres d'observation, les lames porte-objets et les confettis portaient le même numéro d'étude pour chaque participant en concordance aux bonnes pratiques cliniques.

Les lames étaient rangées dans des boîtes de l'OMS et les confettis étaient placés dans des enveloppes portant également le même numéro que les lames et gardés dans une cantine métallique.

Un registre spécifique servait de support de collecte de données pour les cas se présentant au centre de santé qu'ils soient ou non inclus dans l'étude.

Nos données ont été saisies et analysées respectivement à l'aide des logiciels Access 2003 et Stata 9.1. Nous avons utilisé le test de Chi2 pour la comparaison des proportions et le test de chi 2 de Kruskal-Wallis pour comparer le temps moyen de réinfection entre les sites. Notre seuil de signification statistique a été fixé à 0,05.

V. RESULTATS :

Dans le cadre de cette étude nous avons inclus au total 337 volontaires répartis respectivement 100, 88, 77, 72 à Bandiagara, Faladjè, Kollé et Pongonon. Nous avons étudié et comparé les caractéristiques suivants : sociodémographiques, cliniques, parasitologiques, hématologiques et moléculaires dans les différents sites d'étude.

I.22. Caractéristiques sociodémographiques :

Tableau XXIII: Distribution de l'échantillon par sexe dans les différents sites d'étude.

	BANDIAGARA	FALADJE	KOLLE	PONGONON	Total
Sexe	n(%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Masculin	51 (51,0)	47 (53,4)	35 (45,4)	31 (43,1)	164 (48,7)
Féminin	49 (49,0)	41 (46,6)	42 (54,6)	41 (56,9)	173 (51,3)
Total	100 (100,0)	88 (100,0)	77 (100,0)	72 (100,0)	337 (100,0)

La proportion des cas de sexe féminin était comparable entre les quatre sites ($p > 0,05$).

Tableau XXIV: Distribution de la population d'étude par classe d'âge dans les différents sites.

	BANDIAGAR	FALADJE	KOLLE	PONGONON	Total
Age	A	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
	n (%)				
age<5ans	20 (20,0)	31 (35,2)	32 (41,6)	26 (36,1)	109 (32,3)
age>=5ans	80 (80,0)	57 (64,8)	45 (58,4)	46 (63,9)	228 (67,7)
Total	100 (100,0)	88 (100,0)	77 (100,0)	72 (100,0)	337 (100,0)

La proportion des participants de moins de 5 ans était plus faible à Bandiagara (20%) comparativement à Faladjè (35,2%), à Kollé (41,6%) et à Pongonon (36,1%) ($p < 0,05$). Pour la même classe d'âge Faladjè, Kollé, et Pongonon étaient comparables ($p > 0,05$).

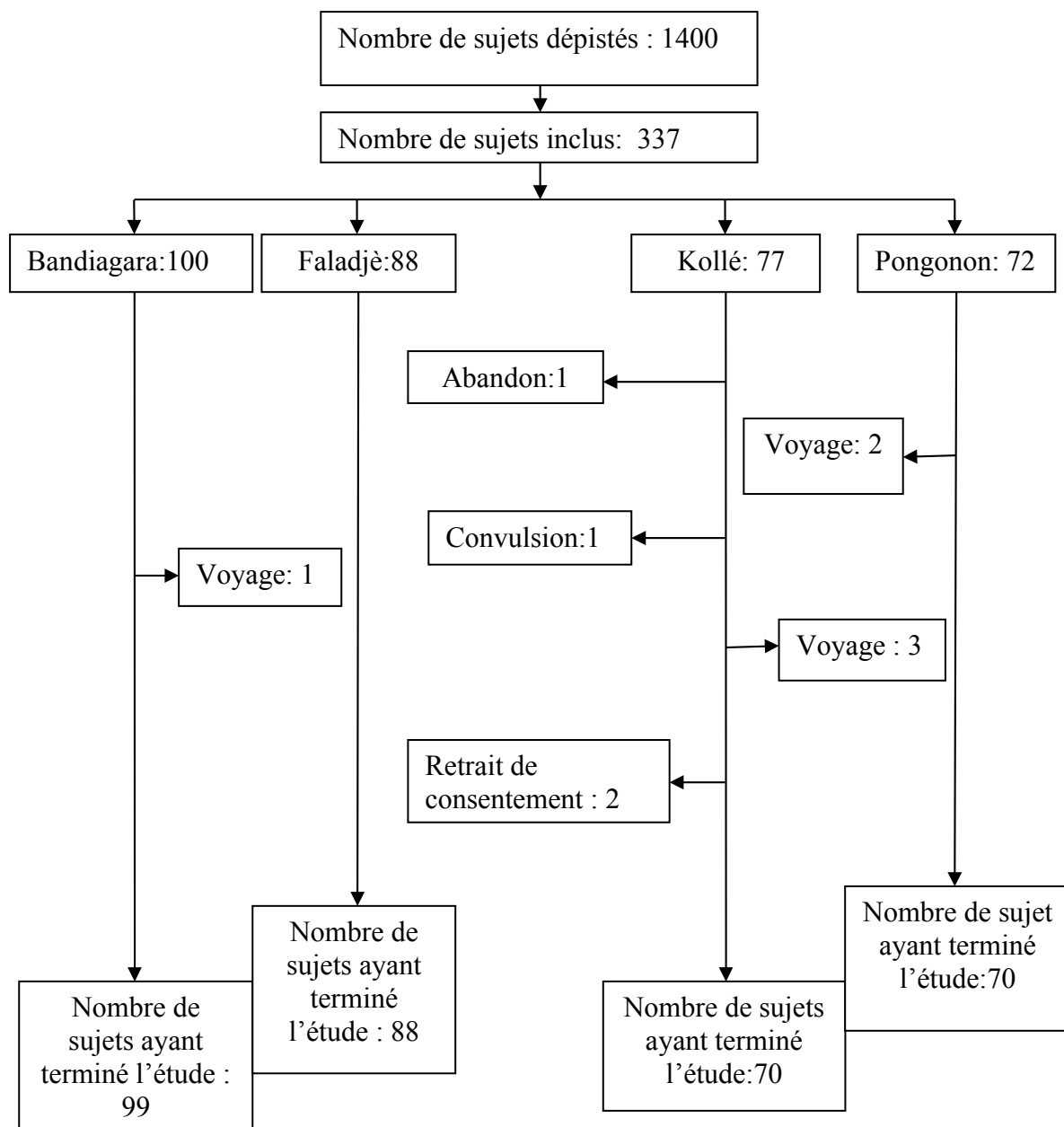


Figure 7: Profil de l'étude

I.23. Caractéristiques cliniques :

Clairance thermique :

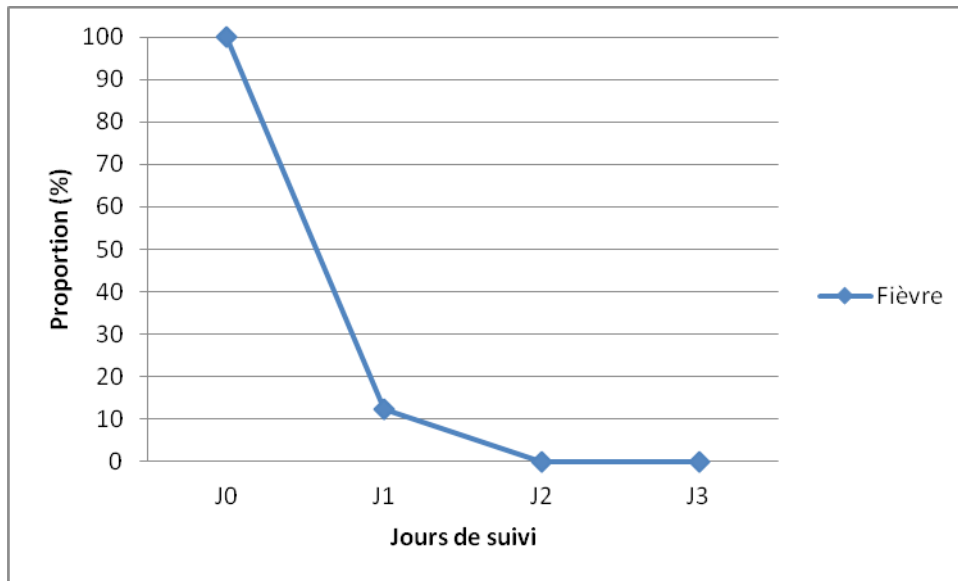


Figure 8 : Clairance de la fièvre au cours du suivi de J0 à J3.

Nous constatons que tous les participants étaient devenus apyrétiques 48 heures après l'administration de l'AR-L.

Evolution de la splénomégalie :

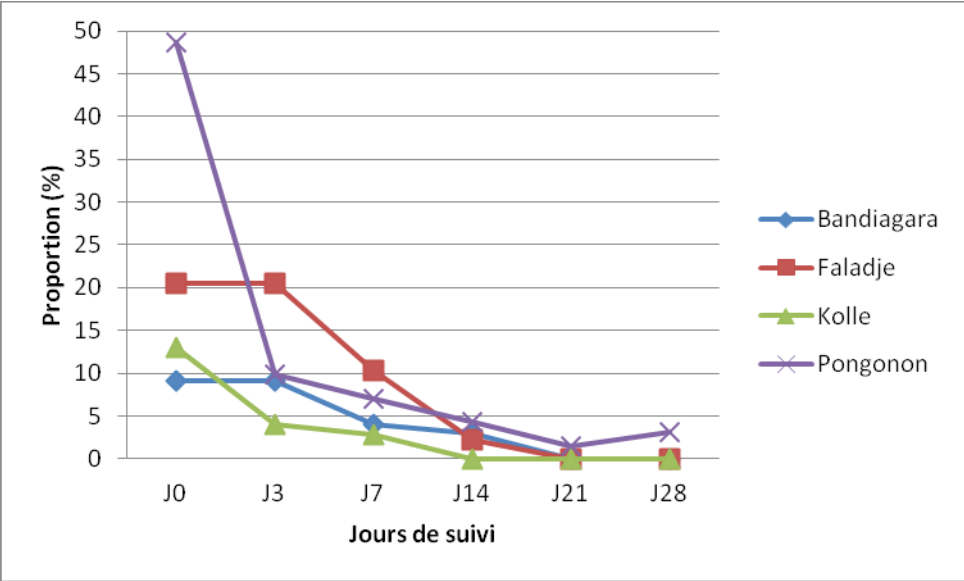


Figure 9: La proportion des porteurs de splénomégalie au cours du suivi.

A J0 le taux de splénomégalie était plus élevé à Pongonon (48,6%) qu'à Faladjè (20,5%), qu'à Kollé (13%) et qu'à Bandiagara (9,1%) ($p < 0,05$). Par contre il n'y avait pas de différence significative du taux de splénomégalie entre Bandiagara et Kollé d'une part et entre Faladjè et Kollé d'autre part ($p > 0,05$). Nous avons observé une diminution significative des taux de splénomégalie à J21 dans l'ensemble de sites. Cependant à Pongonon 3,1% des participants avaient une splénomégalie à J28.

I.24. Caractéristiques Parasitologiques :

Clairance de la parasitémie :

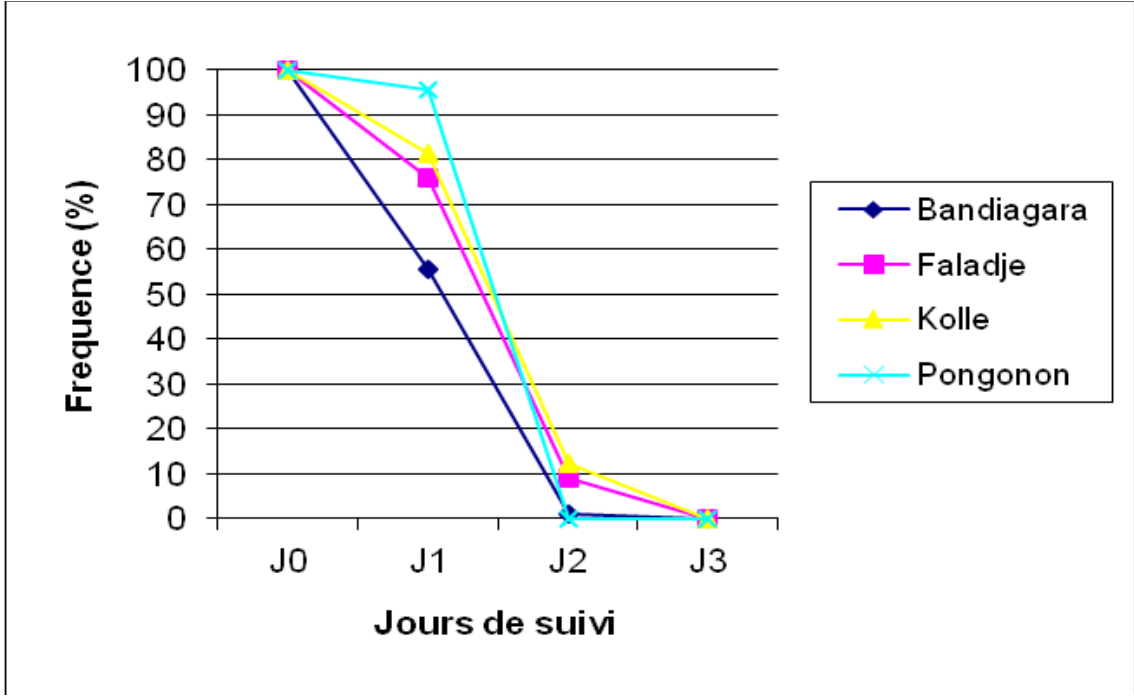


Figure 10: Clairance parasitaire au cours du suivi de J0 à J3.

A J1 les taux de porteur de *P. falciparum* étaient de 55,6%, 76,1%, 81,6%, 95,8% respectivement à Bandiagara, à Faladjè, à Kollé et à Pongonon.

A J2 les taux de porteur de *P. falciparum* étaient de 1%, 9,1%, 12,3%, 0% dans l'ordre à Bandiagara, à Faladjè, à Kollé et à Pongonon.

A J3 le taux de porteur de *P. falciparum* était de 0% dans les 4 sites.

En comparant les sites deux à deux, la clairance parasitaire était statistiquement différente à J1 et à J2 entre les sites ($p < 0,05$) sauf entre Faladjè et Kollé.

Evolution de la gamétoctémie :

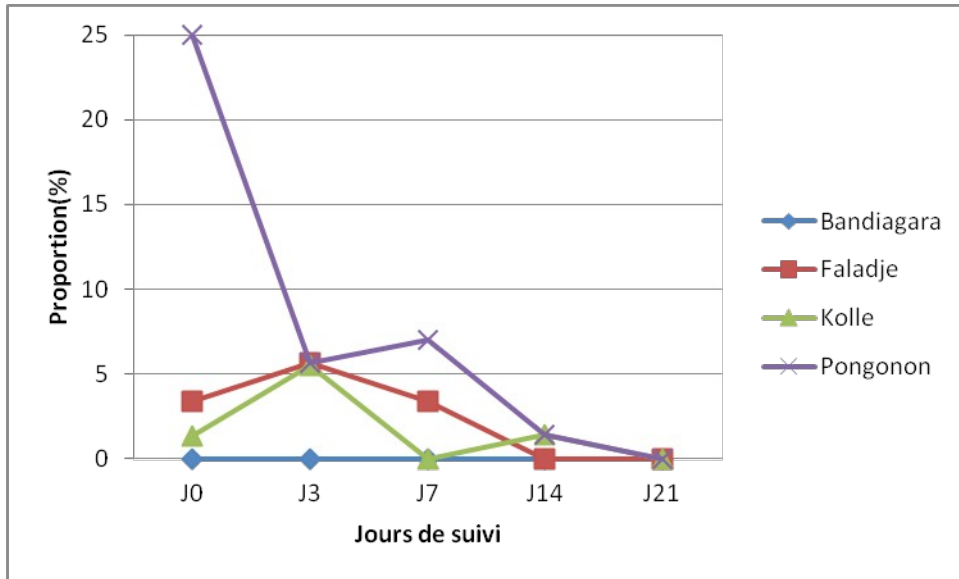


Figure 11: La proportion des porteurs de gamétocyte au cours du suivi.

A J0 le taux de portage de gamétocytes était plus élevé à Pongonon (25%), qu'à Faladjè (3,4%) et qu'à Kollé (1,30%) ($p < 0,05$). Par contre la différence du taux de portage de gamétocytes n'était pas statistiquement significative entre Faladjè et Kollé ($p > 0,05$).

A J28 le taux de portage de gamétocyte était de 0 % dans l'ensemble des sites.

A Bandiagara le taux de portage de gamétocyte était de 0% de J0 à J28.

Efficacité thérapeutique à 28 jours de suivi:

Tableau XXV : Efficacité thérapeutique avant la correction moléculaire dans les différents sites d'étude.

	BANDIAGARA	FALADJE	KOLLE	PONGONON	p
Efficacité	N = 99	N = 88	N = 70	N = 70	
ETP n(%)	0	0	1 (1,4)	0	0,298
ECT n(%)	15 (15,2)	5 (5,7)	9 (12,9)	3 (4,3)	0,045
EPT n(%)	12 (12,1)	22 (25,0)	17 (24,3)	2 (2,9)	0,000
RCPA n(%)	72 (72,7)	61 (69,3)	43 (61,4)	65 (92,9)	0,000

C'est seulement à Kollé qu'un cas d'ETP a été observé.

Sans correction moléculaire les taux d'ECT étaient respectivement de 15,1%, 12,9%, 5,7% et 4,3% à Bandiagara, à Kollé, à Faladjè et à Pongonon. Statistiquement le taux d'ECT était plus élevé à Bandiagara qu'à Faladjè et à Pongonon ($p < 0,05$). Les autres sites étaient comparables ($p > 0,05$).

Les taux d'EPT étaient de 25,0%, 24,3%, 12,1% et 2,9% respectivement à Faladjè, à Kollé, à Bandiagara et à Pongonon. Statistiquement il y avait une différence significative du taux d'EPT entre les sites ($p < 0,05$) sauf entre Faladjè et Kollé.

Les taux de RCPA étaient respectivement de 92,9%, 72,7%, 69,3%, 61,3%, à Pongonon, à Bandiagara, à Faladjè et à Kollé. Statistiquement le taux de RCPA était plus élevé à Pongonon ($p < 0,05$).

Tableau XXVI: Efficacité thérapeutique avant la correction moléculaire par classe d'âge dans l'ensemble des sites d'étude.

	âge<5 ans	âge>=5 ans	p
Efficacité	N = 105	N = 222	
ETP n (%)	1 (1)	0	0,145
ECT n (%)	14 (13,3)	18 (8,1)	0,138
EPT n (%)	16 (15,2)	37 (16,6)	0,743
RCPA n (%)	74 (70,5)	167 (75,2)	0,362

Statistiquement les taux des échecs thérapeutiques et de RCPA étaient comparables entre les classes d'âge ($p > 0,05$).

Tableau XXVII : Efficacité thérapeutique après la correction moléculaire dans les différents sites d'étude.

	BANDIAGARA	FALADJE	KOLLE	PONGONON	p
Efficacité	N = 98	N = 88	N = 69	N = 70	
ECT n (%)	1 (1)	1 (1,1)	1 (1,5)	0	0,666
EPT n (%)	2 (2)	2 (2,3)	0	1 (1,4)	0,600
RCPA n (%)	95 (97)	85 (96,6)	68 (98,5)	69 (98,6)	0,888
<hr/>					
Taux de					
Réinfection n (%)	24 (24,5)	25 (28,4)	24 (34,8)	4 (5,7)	0,003

* Le taux de réinfection était plus faible à Pongonon ($p < 0,01$).

Les taux de RCPA étaient de 97%, 96,6%, 98,5%, 98,6% respectivement à Bandiagara, à Faladjè, à Kollé et à Pongonon. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative du taux de RCPA entre les quatre sites ($p > 0,05$).

Les taux de réinfection étaient de 24,5% à Bandiagara, 28,4% à Faladjè, 34,8% à Kollé et 5,7% à Pongonon. Le taux de réinfection était plus faible à Pongonon ($p < 0,01$). Cependant les autres sites étaient comparables entre eux ($p > 0,05$).

Tableau XXVIII: Efficacité thérapeutique après la correction moléculaire par classe d'âge dans l'ensemble des sites d'étude.

	Age < 5 ans	Age >= 5 ans	p
Efficacité	N=104	N=221	
ETP n (%)	1(1)	0	0,144
ECT n (%)	2 (1,9)	1 (0,5)	0,196
EPT n (%)	3 (2,9)	2 (0,9)	0,176
RCPA n (%)	98 (94,2)	218 (98,6)	0,024

Les taux d'échecs thérapeutiques n'étaient pas statistiquement différents entre les classes d'âges ($p > 0,05$).

Le taux de RCPA était plus élevé chez les participants de 5 ans et plus ($p = 0,024$).

Tableau XXIX: Le temps de réinfection après le traitement à l'AR-L dans les différents sites d'étude.

Site	N	Moyenne (jour)	Médiane	S.D
Bandiagara	24	27	28	2,7
Faladjè	25	24	22	5,1
Kollé	22	23	21	3,7
		*p = 0,006		
Pongonon	4	25	26	2,9

N = effectif total ; S.D = déviation standard

* Kruskal-Wallis $\chi^2 = 10,10$ $p = 0,006$

Le temps moyen de réinfection était plus élevé à Bandiagara (27 jours) qu'à Faladjè (24 jours) et qu'à Kollé (23 jours) ($p = 0,006$).

I.25. Caractéristique hématologique :

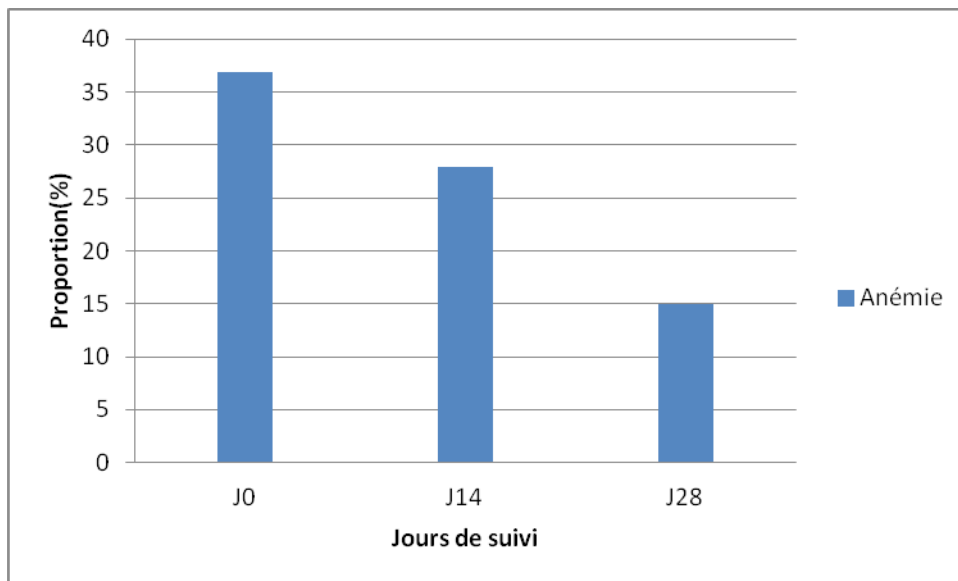


Figure 12 : Evolution de l'anémie au cours du suivi dans l'ensemble des sites.

Le taux d'anémie chez les participants a diminué progressivement au cours du suivi de 36,9% à J0 à 14,9% à J28.

I.26. Etude moléculaire :

La recherche de la mutation a porté sur 337 de nos participants avant le traitement et 85 après le traitement.

Tableau XXX: La prévalence des mutations des gènes *pfcr* K76T et *pfmdr-1* N86Y avant et après le traitement dans l'ensemble des sites.

Allèle	J0 (N=337)	Jour d'échec (N=85)	p
<i>Pfcr</i> K76 n (%)	171 (50,7)	52 (61,2)	0,085
<i>Pfmdr-1</i> N 86 n (%)	300 (89)	85 (100,0)	0,001

Il y a une tendance vers une sélection de l'allèle sauvage mais pas significative. Le taux de prévalence de l'allèle mutant et celle de l'allèle sauvage du gène *pfcr* K76T étaient comparables avant et après traitement ($p = 0,085$).

La prévalence de l'allèle sauvage du gène *pfmdr-1* N 86 était de 89 % à J0 et de 100% au jour d'échec ($p = 0,001$).

VI. DISCUSSION:

Notre étude a été réalisée dans quatre sites d'étude dont le choix se justifiait par :

- Leur accessibilité géographique facile pendant toutes les saisons de l'année,
- L'adhésion des populations de ces sites aux études antérieures du DEAP/MRTC,
- Surtout à cause de leurs caractéristiques épidémiologiques différentes,

Nous avons mené une étude prospective multicentrique ouverte qui s'est déroulée entre Octobre 2009 et Janvier 2010, dans le but d'évaluer l'efficacité *in vivo* de l'AR-L sur *P. falciparum* et son impact sur les marqueurs moléculaires de résistance parasitaire (*pfprt* K76T, *pfmdr-1* N86Y) aux antipaludiques.

Le protocole standard de l'OMS de 28 jours a été appliqué pour évaluer l'efficacité thérapeutique. Les confettis confectionnés conformément à ce protocole ont servi de support de données pour l'analyse moléculaire. L'Artéméther-Luméfantrine (Coartem[®]) a été administré au centre de santé et observé pendant 30 minutes dans le but d'assurer une meilleure observance au traitement.

Le choix de l'Artéméther-Luméfantrine (Coartem[®]) se justifiait d'une part par le fait qu'il est l'un des antipaludiques de première intention pour le traitement du paludisme non compliqué au Mali et d'autre part, l'absence de marqueur moléculaire spécifique pour sa surveillance. Cela nous a permis d'évaluer son efficacité *in vivo* mais aussi de comparer la prévalence des mutations sur les gènes *pfprt* K76T et *pfmdr-1* N86Y avant et après le traitement avec l'AR-L. Des études ont démontré que la Luméfantrine sélectionne l'allèle sauvage du gène *pfmdr-1* à Tanzanie[17] et à Zanzibar[16].

La clairance de la fièvre a été rapide dans les 72 heures suivant l'administration du produit. Cette élimination de la fièvre pourrait être liée à l'action antipyrétique de l'AR-L comme précédemment décrite par d'autres auteurs[7], mais aussi à l'administration concomitante du paracétamol à tous les participants. Nos résultats sont similaires à ceux observés par Issaka Sagara et al., au Mali [44] et de ceux observés par Ashenafi Assefa et al., en Ethiopie[6].

Le taux de participants avec splénomégalie était significativement plus élevé à Pongonon (48,6%). Cette différence pourrait s'expliquer par la variabilité de la sensibilité de la détection considérable de la splénomégalie d'un examinateur à un autre, car dans le même site en 2007-2008 Niangaly H et al., avait trouvé 11,2% d'indice splénique [61]. Cette splénomégalie pourrait être expliquée par d'autre parasitose non explorée.

Nous avons observé une diminution significative des taux de splénomégalie dans l'ensemble de sites. Ceci témoigne l'existence d'un lien entre la splénomégalie et le paludisme et justifierait à priori l'efficacité de l'AR-L sur les plasmodies dans les zones d'études.

Le suivi parasitologique après traitement nous a permis de constater une forte élimination de *P. falciparum* par l'Artéméther-Luméfantine au cours du suivi. Au premier jour du suivi le taux de porteur de parasites était plus élevé à Pongonon (95,8%), qu'à Kollé (81,58%), qu'à Faladjè (76,1%), et qu'à Bandiagara (55,6%)

($p < 0,05$). Au deuxième jour du traitement le taux de porteur de parasites était plus faible à Bandiagara (1 %) qu'à Faladjè (9,1%), qu'à Kollé (12,3%), et 0% qu'à Pongonon ($p < 0,05$). Au troisième jour de suivi cette parasitémie était de 0% dans l'ensemble des sites. L'élimination rapide des parasites pourrait s'expliquer par la rapidité d'action d'AR-L.

Nos résultats sont similaires à ceux observés par Issaka Sagara et al. au Mali [44] et à ceux observés par Ashenafi Assefa et al. en Ethiopie[6].

Le taux de portage de gamétocytes à J0 était significativement plus élevé à Pongonon ($p < 0,05$). Cette différence pourrait être expliquée par une pression médicamenteuse due à la SP car à Pongonon la population était traitée par cette molécule. Les études menées au Mali (Abdoul H. Beavogui et al., en 2010) et ailleurs (Putu C et al., en 1997 ; Sokhna CS et al. en 2001) ont démontré que la SP entraîne une augmentation du taux de portage de gamétocytes. A J21 le taux de portage de gamétocytes était de 0% dans l'ensemble des sites. A Bandiagara le taux de portage de gamétocytes était de 0% de J0 à J28. Cela pourrait être expliqué par l'introduction rapide des CTAs à Bandiagara. Les études ont démontré que les dérivés de l'artémisinine diminuent le

taux de portage de gamétocytes [65,76]. En effet l'Artéméther-Luméfantrine pourrait contribuer à la diminution de la transmission du paludisme.

Après la correction moléculaire le taux de RCPA était $\geq 96\%$ dans les différents sites.

Au Mali nos résultats sont similaires à ceux observés par Issaka Sagara et al. à Kambila[44] et à ceux observés par Togo A. à Bougoula [77], ainsi que ceux observés par Ashenafi Assefa et al. en Ethiopie[6]. Le taux de RCPA était comparable entre les sites ($p > 0,05$).

Le taux de réinfection était plus faible à Pongonon (5,7%) qu'à Bandiagara (24,5%), Faladjè (28,4 %), et qu'à Kollé (34,8%) ($p < 0,05$). Cette différence pourrait être expliquée par leur intensité de transmission.

Bien que l'intensité de la transmission du paludisme étant plus élevée à Kollé et à Faladjè, nous avons trouvé que le temps de réinfection était plus élevé à Bandiagara. Le nombre de cas de réinfection étant seulement de 4 cas à Pongonon, nous ne l'avons pas comparé aux autres sites.

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

Une sélection statistiquement significative de l'allèle *pfmdr-1* N86 a été observée après l'administration de l'AR-L ($p < 0,05$).

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par Dembélé D et al., à Bougoula [23], ainsi qu'à ceux de Christin S et al., à Zanzibar[16] et en Tanzanie[17].

La fréquence de l'allèle *pfprt* K76 était respectivement 50,7% ; 61,2% avant et après le traitement ($p > 0,05$). Nos résultats vont dans le même sens que ceux observés par Christin S, et al. en Tanzanie[16]. La prévalence de l'allèle mutant *pfprt* 76T était de 49,3% à l'inclusion et de 38,8% au jour d'échec et cette sélection est similaire aux résultats observés par Dembélé D. à Bougoula[23].

VII. CONCLUSION :

Les résultats de cette étude ont trouvé que l'AR-L est efficace dans nos différents sites d'étude avec un taux de RCPA $\geq 96\%$. La sélection de l'allèle sauvage du gène *pfmdr-1* N86Y décrite dans les études antérieures et confirmée dans cette étude permet d'affirmer qu'il pourrait être utilisé comme un outil de surveillance moléculaire de la résistance à la Luméfantrine dans les zones d'endémie palustre.

VIII. RECOMMANDATIONS :

Au terme de cette étude, nous formulons les recommandations suivantes :

- Effectuer des études répétées afin de valider le gène *pfmdr-1* N86Y comme outil moléculaire de surveillance épidémiologique de la résistance à l'AR-L.
- Faire la surveillance de la résistance aux dérivés de l'artémisinine.

IX. BIBLIOGRAPHIE :

- [1] Abdoulaye A. Djimde, Breanna Barger, Aminatou Kone, et al. A molecular map of chloroquine resistance in Mali. *Immunol Med Microbiol* 58 (2010) pp. 113-18.
- [2] Abdulla S, Sagara I, Borrmann S, et al. Efficacy and safety of artemether lumefantrine dispersible tablets compared with crushed commercial tablets in African infants and children with uncomplicated malaria: a randomised, single blind, multicentre trial. *Lancet* 372 (2008) pp. 1819-27.
- [3] Alassane Dicko, Issaka Sagara, Abdoulaye A Djimdé, et al. Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine one year after implementation of intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali. *Malaria Journal* 9 (2010) p.9.
- [4] Ambroise Thomas P, Pinel C, Pelloux H, et al. *Le Diagnostic Du Paludisme :Actualités et Perspectives*, 1992, pp. 280-84.
- [5] Ash C, Mutations point may account for pyrimethamine resistance. *Trends Pharmacological Sciences* 10 (1998) pp. 303-4.
- [6] Assefa A and et al. Therapeutic efficacy of Artemether-Lumefantrine (Coartem ®) against *Plasmodium* in Kersa , South West Ethiopia. *Parasites & Vectors* 3 (2010) pp. 1-9.
- [7] Aweek FT and German PI, Clinical Pharmacology of artemisinin-based combination therapies. *Clin Pharmacolkinet* 47 (2008) pp. 91-102.
- [8] Brasseur P, Druilhe P, Pathe-Diallo M, Low sensitivity to chloroquine and quinine of *Plasmodium falciparum* isolates from Guinea in March. *Am J Trop Med Hyg* 37 (1986) pp. 452-54.
- [9] Brossi A and et al. Artémether, a new antimalarial drug: Synthesis and antimalarial properties. *J Med Chem* 31 (1998) pp. 645-50.
- [10] Bruce-Chwatt L.J, Canfield D.F, Clyde D.F, et al. *Chimiothérapie du paludisme : Genève : 2ème éd / OMS. Série Monographie* (1984) pp. 1-274.
- [11] Bryskier A and Labro M T, *Paludisme Et Médicaments*, in: Arnette (Ed.), *Biodiversity of malaria in the world*, Paris, 1998, pp. 1-276.

- [12] Bzik DJ and et al. Molecular cloning and sequence analysis of *P. falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) pp. 8360-64.
- [13] Camara F, Evolution De La Chimiorésistance Des Souches Maliennes De *P. Falciparum* Aux Amino-4-Quinoleines De 1985 à 99, vol. Thèse Médecine ; ENMP, 1999.
- [14] Carme B and al. Indices plasmodiques et charges parasitaireschez des donneurs de sang à Brazaville CONGO. Ann. Soc. Belge Med Trop 73 (1993) pp. 179-87.
- [15] China cooperative research group On Qinghaosu and its derivatives as antimalarials, Chemical studies on Qinghaosu (Artemisinin). J Traditional Chin Med. 2 (1982) pp. 3-8.
- [16] Christin Sisowath, Johan Stromberg , et al. *In vivo* Selection of *Plasmodium falciparum* *pfmdr-1* 86N Codoing Alleles by Artemether-Lumefantrine (Coartem). JID 191 (2005) pp. 1014-17.
- [17] Chritin Sisowath, Ines Petersen, et al. *In vivo* Selection of *Plasmodium falciparum* Parasites Carrying the Chloroquine-Susceptible *pfcr*t K76T Alle after Treatment with Artemether-Lumefantrine in Africa. J I D 199 (2009) pp. 750-57.
- [18] Cooper RA and et al. Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein *PfCRT* are associatedwith chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. Mol Pharmacol 61 (2002) pp. 35-42.
- [19] Cortese JF and Plowe CV, Antifolate resistance due to new and known *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutants expressed in yeast. Mol. Biochem. Parasitol 94 (1998) pp. 205-14.
- [20] Cumming J N, Ploypradith P, Posner Gh, Antimalarial activity of artemisinin (Qinghaosu) and related trioxanes: Mechanisms of action, Adv .Pharmacol 37 (1997) pp. 235-97.
- [21] Darie H and Haba M, Paludisme congénital. Med Trop 52 (1992) pp. 175-178.
- [22] De Vriez P J and Dien T k, clinical pharmacology and therapeutic potential of Artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria. Drugs 52 (1996) pp. 818-36.

- [23] Dembele Det al. Impact Du Traitement Répété Avec L'Artésunate + Amodiaquine (AS/AQ) Et L'Artémether-Luméfantrine (AR-L) Sur La Prévalence Des Marqueurs Moléculaires (*Pfcr*t Et *Pfmdr*-1 De La Chimiorésistance De *Plasmodium Falciparum*, vol. Mem:Biolog:Bamako: FAST, 2010.
- [24] Desjardin RE, Anfields CJ, Haynes JP, et al. Quantitative assessment of antimalaria activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 16 (1979) pp. 710-18.
- [25] Djaman Allico Joseph, Evaluation De La Chimioresistance De *Plasmodium Falciparum* à Aux Différents Antipaludiques (Chloroquine, Sulfadoxine-Pyrimétamine, Quinine) Et Profil Génétique Des Isolats Correspondants, Thèse de Med, 2003.
- [26] Djimde A, Fofana B, Issaka Sagara, et al. Efficacy, Safety And Selection Of Molecular Markers of Drug resistance by Two ACTs in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 78 (2008) pp. 455-61.
- [27] Djimde A et al. A molecular marker for chloroquine resistant *falciparum malaria*. *N Engl Med* 344 (2001) pp. 257-63.
- [28] Dobson M J, Malariology centenary, *Parassitologia* 41 (1999) pp. 21-32.
- [29] Dondorp A, Nosten F Yi P, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361 (2009) pp. 455-67.
- [30] Doumbo O K et al. Le paludisme dans le sahel, l'exemple du Mali, *Actualité Scientifique*. *Aupelf* 3 (1989) pp. 11-32.
- [31] Duraisingh M T et al. Increased sensitivity of the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr*-1 gene of *plasmodium falciparum*. *Mol Microbial* 36 (2000) pp. 955-61.
- [32] Duraisingh M T et al. The tyrosine-86 allele of the the *pfmdr*-1 gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasito* 108 (2000) pp. 13-23.
- [33] Fidock DA, Nomura T, Talley AK , et al. Mutations in the *p. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *PfCRT* and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* (2000) pp. 593-603.
- [34] CD.P. Fitch, *Helminth. Soc, Washintgton* 39 (1972) pp. 265-27.

- [35] Fofana M, Efficacité Compare De La Chloroquine Et Des Combinaisons Thérapeutiques Artesunate + Chloroquine, Amodiaquine + Artesunate, Et Artesunate + Sulfadoxine-Pyriméthamine Dans Le Traitement Du Paludisme En Zone D'Endémie Au Mali, vol. Thèse, Pharm, Bamako, 2003.
- [36] Foster S.D, Pricing, distribution and use of anti-malarials drugs, Bull. World Health Organ 69 (1991) pp. 349-63.
- [37] Gentililin M et al. Médecine Tropicale . Flammarion 928 (1993) pp. 92-97.
- [38] Greenwood Bm and et al. Ethnic differences in the prevalence of splenomegaly and malaria in the Gambia. Ann Tromped Parasitol 81 (1987) pp. 345-54.
- [39] Gyang FN, Peterson DS, Wellems TE, *falciparum* rapid detection of dihydrofolate reductase mutations that confer resistance to cycloguanil and pyrimethamine. Exp. Parasitol 74 (1992) pp. 470-72.
- [40] Hatton C S R, Peto T E A, Bunch C, Pasvol G, Frequency of severe neutropenia associated with amodiaquine prophylaxis against malaria. Lancet 1 (1986) pp. 411-13.
- [41] Hien TT and White N J, Qinghaosu. Lancet 341 (1993) pp. 603-08.
- [42] Hydes JE, The dihydrofolate reductase-thymidilate synthetase gene in the drug resistance of malaria parasites. Pharma. Ther 48 (1990) pp. 1-45.
- [43] Issaka Sagara, Abdoulaye Djimde, Alassane Dicko, et al. A randomized trial of Artésunate-Sulfamethoxypyrazine/Pyrimethamine versus Artésunate Luméfántrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mali. Am J Trop Med Hyg 75 (2006) pp. 630-36.
- [44] Issaka Sagara, Abdoulbaki Diallo, et al. A Randomized Trial of Artesunate-Mefloquine versus Artemether-Lumefantrine for Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Mali. Am. J. Trop. Med. Hyg 79 (2008) pp. 655-61.
- [45] Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, et al. Evidence for a central role for *PfCRT* in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. Mol Cell 15 (2004) pp. 867-77.
- [46] Kain KC and et al. *In vivo* response of *Plasmodium falciparum* malaria to chloroquin in northern Thailand. J. Info. Dis 170 (1994) pp. 258-9.
- [47] Kassoum Kayentao et al. Artemisinin-based combinations versus amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated malaria in Faladiè, Mali. Malaria Journal 5 (2009) pp. 1-8.

- [48] Klayman DL, Qinghaosu (Artemisinin) an antimalarial drug from China, *Science* 228 (1985) pp. 1049-55.
- [49] Krunghai Sr and Yuthavong Y, The Antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of Qinghaosu and artésunate in combination with agents which modulate oxidant stress. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81 (1987) pp. 710-14.
- [50] Le Bras J, Andrieu B, Hantin I, et al. *Plasmodium falciparum*: interprétation du semi-microtest de chimiosensibilité *in vitro* par incorporation de 3-hypoxanthine. *Path Bio* 32 (1984) pp. 463-66.
- [51] LE BRAS J et al. *in vitro* study of drug sensitivity of *P. falciparum* :evaluation of new micro-test . *Am J Trop Med Hyg* 32 (1983) pp. 44-53.
- [52] Lefèvre G, Looareesuwan S, Treeprasertsuk S, et al. A clinical and pharmacokinetic trial of six doses of artemether-lumefantrine for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 64 (2001) pp. 247-56.
- [53] Makler MT and Hinrichs DJ, Measurement of the lactate deshydrogenase : stage-specific lactate production in synchronized culture. *Exp Parasitol* 54 (1993) pp. 391-96.
- [54] Marafa F,Salzmann J R, Ensom M H H, et al. Atovaquone-Proguanil for prophylaxis and treatment of malaria. *Annals of Pharmacotherapy* 37 (2003) pp. 1266-75.
- [55] Martin Danis and Jean Mouchet, Paludisme d'importation tardif à *Plasmodium falciparum* de l'adulte. *Médecine Tropicale* 66 (2006) pp. 310-312.
- [56] Meshnick Sr, Artémisinine antimalariaux: mécanismes de action and résistance. *Médecine Tropicale* 58 (1998) pp. 13-17.
- [57] Ministère de la santé, Programme National De Lutte Contre Le Paludisme Au Mali, 2007.
- [58] Ministère de la santé, Système Local D'Information Sanitaire Du Mali, 2007.
- [59] Mordi M N, Mansor S M, Navaratman V, et al. Single dose pharmacokinetics of oral Artémether in healthy Malaysian volunteers. *J Clin Pharmacol* 43 (1997) pp. 363-65.
- [60] Neftel K A, Woodtly W, Schmid M, Amodiaquine induced agranulocytosis and liver damage. *Brit Med J* 292 (1986) pp. 721-23.
- [61] Niangaly H, Epidémiologie Du Paludisme Dans Un Village De La Plaine Du Pays Dogon Du Mali: Pongonon, thèse Médecine, FMPOS, Bamako, 2009.

- [62] Nikaido H and et al. Prevention of drug acces to bacterial target: Permeability barriers and active efflux. *Science* 264 (1994) pp. 382-88.
- [63] Noedl H, Se Y, Schaecher K, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 359 (2008) pp. 2619-20.
- [64] Nosny P.,[Alphonse Laverans and the discovery of the malaria parasite]. *Bull Acad Natl Med* 167 (1980) pp. 80-87.
- [65] Novartis pharma AG, International Package Leaflet, 2005.
- [66] Nyarango PM, Gebremeskel T, Mebrahtu G, et al. A steep decline of malaria morbidity and mortality trends in Eritrea between 2000 and 2004: the effect of combination of control methods.*Malaria J* (2006) pp. 5-33.
- [67] OonTek Ng and et al. Naturally Acquired Human *Plasmodium knowlesi* Infection, Singapore. *Emerg Infect Dis* 14 (2008) pp. 814-16.
- [68] Payned D, Aspects pratiques de l'utilisation des systèmes standard OMS d'épreuve *in vitro* (macro et microtest) pour la détermination de la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine, la méfloquine, l'amodiaquine, et la quinine. WHO/MAL 84 (1984) pp. 2-21.
- [69] Peerson DS, Di Santi SM, Pavao M Calvosa, et al. Prevalence of the dihydrofolate Ans-108 mutations as the basis for pyrimethamine resistance of *P. falciparum* malaria in the brasilian amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 45 (1991) pp. 492-97.
- [70] Randall K.Saiki, Stephen Scharf Fred, Faloona Kary B, et al. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230 (1985) pp. 1350-54.
- [71] Ritchie GY et al. *in vitro* selection of halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* is not associated with increased expression of Pghl. *Mol Biochem Parasitol* 83(1) (1996) pp. 35-46.
- [72] Sidhu AB,Verdier-Pinard D, Fidock DA, et al. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr* mutations, .*Science* 298 (2002) pp. 210-13.
- [73] SOGOBA M, Epidémiologie, Chloroquinorésistance, Et Etude De La Réinfection Après Traitement Au FANSIDAR Dans Deux Zones D'Endémicité Différente Au Mali, vol. Thèse médecine, ENMP, Bamako, 1999, pp. 1-64.

- [74] Sornchai Looareesuwan, Chaisin Viravan H, Kyle Webster Dennis, et al. Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for traitement of acute uncomplicated malaria in Thailand. *Am j Trop Med and Hyg* 54 (1996) pp. 62-66.
- [75] Spratt BG, Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264 (1994) pp. 388-93.
- [76] Targett, Drakeley C, Jawara M, et al. Artesunate reduces but does not prevent post treatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *J Inf Dis* 183 (2001) pp. 1254-59.
- [77] Togo A, Interet En Santé Publique De L'Utilisation Des Combinaisons Therapeutiques a Base D'Artemisine Dans Le Traitement De L'Acces Palustre Simple Au Mali, vol. thèse médecine, FMPOS, Bamako, 2009.
- [78] Uhlemann AC and Krishna S, Antimalarial multi-drug resistance in Asia: mechanisms and assessment, *Curr Top Microbiol Immunol* 295 (2005) pp. 39-53.
- [79] Wang P, Read M, et al. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determinate by mutation dihydrofolate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol* 23 (1998) pp. 979-86.
- [80] WHO, Vector Control for Malaria and Mosquito Borne Diseases, Geneva, 1995.
- [81] WHO, Severe and complicated malaria, *Trans R SOC Trop Med Hyg* 94 (2000) pp. 1-90.
- [82] WHO, L'Utilisation Des Antipaludiques, 2001.
- [83] WHO, Les Combinaisons Thérapeutiques Antipaludiques, Genève, 2001.
- [84] WHO, Rapport D' une Consultation De L'OMS 3-5 Decembre, Genève, 2001.
- [85] WHO, The World Malaria Report, Geneva, 2008.
- [86] WHO, List of Prequalified Medicinal Products., 2009.
- [87] WHO, Le Paludisme Dans Le Monde., 2011.
- [88] Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S Martin, et al. Amplification of *pfmdr-1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol* 57 (1993) pp. 151-60.

- [89] Wongsrichanalai C, A.L Pickard, W.H Wernsdorfer, Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infectious Diseases* 2 (2002) pp. 209-18.
- [90] World Health Organization, Assessment and Monitoring of Antimalarial Drug Efficacy for the Treatment of Uncomplicated *Falciparum Malaria*, Geneva, 2003.
- [91] A.C.Z.I.a. Yayon, H. *EMBO J* 3 (1984) pp. 2695-2700.
- [92] Zolg JW, Plitt JR, Palmers S, Mutations point in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *P. falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol* 36 (1989) pp. 253-62.

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : BAMADIO

Prénom : Amadou

Nationalité : Malienne

Année de soutenance :

Ville de soutenance : Bamako

Lieu de Dépôt: Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Secteur d'intérêt: Epidémiologie, Parasitologie, Chimiorésistance, Biologie moléculaire.

Titre : **Efficacité *in vivo* de l'Artéméther-Luméfantrine sur les souches de *P. falciparum* et son impact sur les marqueurs moléculaires de résistance parasitaires aux antipaludiques au Mali.**

Résumé :

Introduction: L'utilisation de l'Artéméther-Luméfantrine comme l'un des traitements de première ligne au Mali nécessite une évaluation continue de son efficacité clinique ainsi que recommande par l'OMS. Nous avons évalué l'efficacité *in vivo* d'AR-L sur *P. falciparum* et son impact sur les marqueurs moléculaires de résistances parasitaires (*pfprt*K76T, *pfmdr*-1N86Y) aux antipaludiques.

Méthode: Nous avons mené une étude prospective multicentrique ouverte qui s'est déroulée entre Octobre 2009 et Janvier 2010, chez les adultes ou enfant de tout âge avec un poids corporel supérieur ou égale à 5 kg qui avaient un paludisme simple. Nous avons appliqué le protocole standard de l'OMS de 28 jours pour déterminer l'efficacité *in vivo* de l'Artéméther-Luméfantrine. Au total 337 sujets ont été inclus dans l'étude. L'analyse moléculaire a porté sur 337 confettis de J0 et de 85 confettis au jour d'échec de l'ensemble des sites. Il s'agissait de comparer la prévalence de la mutation des gènes *pfmdr*-1 N86Y et *pfprt* K76T avant et après le traitement.

Résultats: Après correction moléculaire le taux de réponse clinique et parasitologique adéquate était comparable entre les sites ($p > 0,05$).

Les taux de réinfections obtenus étaient de 24,5%, 28,5%, 34,8%, 5,7% respectivement à Bandiagara, Faladjè, Kollé et Pongonon ($p < 0,05$).

La fréquence de l'allèle *pfcr1* 76T a diminué de 49,3% (166/337) à J0 et 38,8% (33/85) après traitement ainsi que celle de *pfmdr-1* 86Y de 11% (37/337) à l'inclusion et 0% après le traitement.

La fréquence de l'allèle *pfcr1* K76 à augmenter de 50,7% (171/337) à J0 et 61,2% (52/85) après traitement ainsi que celle de *pfmdr-1* N86 de 89 % (300/337) à l'inclusion et 100%(85/85) au jour d'échec.

Conclusion : l'AR-L reste toujours efficace sur les souches de parasite circulant dans nos différents sites d'étude. Le gène *pfmdr-1*N86Y pourrait être utilisé comme un outil de surveillance de la Luméfantrine dans les zones d'endémie palustre.

Mots clés : *P.falciparum*, Artéméther-Luméfantrine, *pfcr1* K76T, *pfmdr-1* N86Y, RCPA, réinfections, sélection.

Name: Amadou Bamadio

Nationality: Malian

Defended in: Bamako

Year of Defense:

Submitted to: Library of the Faculty of Medicine, Pharmacy and Odonto-Stomatology

Field of Interest: Epidemiology, Parasitology, Drug Resistance, Molecular Biology

Title: In-vivo efficacy of Artemether-Lumefantrine and its impact on chloroquine resistance molecular markers (*Pfcrk76T*, *Pfmdr-1N86Y*).

Introduction: The increased use of Artemether-Lumefantrine (AR-L) in malaria endemic regions necessitates vigilant monitoring of clinical cases in order to quickly detect any instances of resistance, as recommended by the World Health Organization (WHO). Hence, it is necessary evaluate in-vivo AR-L efficacy as it pertains to molecular markers of resistance (*Pfcrk76T*, *Pfmdr-1N86Y*).

Methods: We conducted a prospective study between October 2009 and January 2010 on 337 microscopy confirmed uncomplicated cases of malaria in individuals of all ages, with the exclusion criterion of body weight less than 5 kilograms. We implemented the WHO standard 28 day follow up for assessing in-vivo AR-L efficacy. A molecular analysis was carried out on all 337 cases on day 0, and a follow up was carried out during dry season on 85 individuals with blood spotted filter paper in order to assess the prevalence of mutations in the *pfcrk* and *pfmdr-1* genes before and after treatment.

Results: The clinical responses to treatment were not statistically different across our field sites at 97%, 96.6%, 98.5%, and 98.6% in Bandiagara, Faladjè, Kollé and Pongonon respectively. The rates of reinfection were 24.5%, 28.5%, 34.8% and 5.7% in those respective villages, which prove to be different at the threshold of statistical significance ($p < .05$). The frequency of the *pfcrk76T* allele decreased from 49.3% (166/337) on day 0 to 38.8% (33/85) after the treatment, and the *pfmdr-1* 86Y allele changed from 11% (37/337) at day 0 to 0% (0/85) post treatment. The frequency of the *pfcrk76K* allele increased from 50.7% (171/337) on day 0 to 61.2% (52/85) after the treatment, and the *pfmdr-1* 86N allele changed from 89% (300/337) at day 0 to 100% (85/85) post treatment.

Conclusions: AR-L remains efficacious on the various malaria strains endemic to the study sites, and the use of chloroquine resistance molecular epidemiology markers *pfprt* and *pfmdr-1* in monitoring AR-L resistance is justified.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, artemether-lumefantrine, *Pfprt*K76T, *Pfmdr-1*N86Y, ACPR, reinfection, selection.