

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences, Techniques et
Technologies de Bamako

FACULTE DE PHARMACIE

République du Mali
Un peuple – Un but – Une foi



THESE

Titre :

**Efficacité des combinaisons Artéméther-Luméfantrine et
Artésunate/Sulfadoxine-Pyriméthamine et quiescence des isolats
parasitaires de *P. falciparum* tolérants à l'artémisinine au Mali.**

Présentée et soutenue publiquement le 08/03/2013 devant le jury de la Faculté de Pharmacie par :

Monsieur **Karamoko NIARE**

Pour obtenir le grade de **Docteur en pharmacie (diplôme d'Etat)**.

Jury:

Président : Pr Ogobara K. DOUMBO

Membres : Dr Chiompéré KONE

Directeur de thèse : Pr Abdoulaye DJIMDE

Co-directeur: Pr Boubacar TRAORE

Thèse No:

Bamako, le/..../2012



Malaria Research and Training Center (MRTC)/ Département
d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP)



Fondation Mérieux, France



Organisation Mondiale de la Santé (OMS)



Service Universitaire de Parasitologie-
Mycologie/UPS/CHU de Toulouse

Ce travail a bénéficié de l'appui du MRTC, de la fondation Mérieux, de l'OMS et du Service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse

Dédicaces :

Je rends grâce à Dieu, le Tout Puissant et à son bien-aimé et prophète Muhammad (paix et salut de Dieu soit sur lui). Gloire est au Créateur qui nous a prêté la vie et la santé pour réaliser ce travail.

Je dédie ce travail à mon père, feu Issa NIARE pour m'avoir donné la chance d'aller à l'école afin d'accéder au savoir et à l'éducation. Cher papa, tu nous as pleinement donné l'amour et la chaleur d'un père. Tu nous as inculqué le sens de la droiture, de la loyauté, du respect, de l'honneur et de l'excellence. Ce qui nous a permis de résister et de surmonter les « intempéries » de la vie. Ce travail est pour moi, le fruit de tes efforts. Il magnifie ta mémoire. Je saisis l'occasion pour renouveler mes prières pour le repos de ton âme dans le paradis de Dieu aux délices éternels.

A mes mères, Nana KONARE et Djénéba SIDIBE pour m'avoir nourri, protégé et guidé. Chères mères, vous m'avez assuré un climat familial sublime qui m'a permis d'atteindre ce niveau. Vous m'avez fait un crédit en assumant irréfutablement votre rôle de mamans que je ne pourrai jamais vous rembourser. Puisse Dieu vous le payer et vous donner la bonne santé et la longue vie à nos cotés.

A mon beau-frère, Ogobara DOUMBO et à ma sœur aînée, Doumbo Safiatou NIARE pour leur indéfectible soutien social et moral. Cher beau-frère et chère sœur, c'est à vous que je dois la réussite de mes études universitaires pour m'avoir assuré très affectueusement les conditions studieuses les meilleures durant des ans. Soyez rassurés de ma sincère reconnaissance, de ma soumission infinie et de mon entière disponibilité. Que Dieu vous accorde la bonne santé et la longue vie aux cotés de vos charmants enfants.

A ma sœur, Nah dite Yaye NIARE et à mon frère, Djibril NIARE pour leurs soutiens et attachements très affectueux. Cher frère Djiby, très tôt je commençai à admirer instinctivement ta personnalité malgré nos domaines si différents. Tu es l'une des rares personnalités qui ont fortement marqué ma vie d'enfance et d'adolescence. Sois assuré de mon admiration sans fin. Chers frère et sœur, que Dieu vous donne la chance de réussir vos entreprises dans la santé et la tranquillité.

A l'ensemble de mes frères et de mes sœurs pour leurs conseils et soutiens incommensurables. C'est avec vous que je partage la réussite de ce travail. Veuillez croire à mon attachement fraternel très profond. Puisse Dieu nous accorder la bonne santé et la longue vie pour vivre ensemble dans l'entente et la cohésion.

A tous mes charmants enfants DOUMBO (Drissa, Fatou, Ada, Baïssa, Kady et Solo) pour la tendresse, la joie et les câlins qu'on a échangés. Que Dieu vous donne la bonne santé, la longévité, le succès et la chance de suivre les pas de vos parents.

A l'ensemble de mes neveux, nièces, cousins, cousines, oncles, tantes, beaux-frères, belles-sœurs et grands-parents pour leur soutien moral.

A mes intimes amis Moussa MOUNKORO, Amadingué GUINDO, Youssouf TRAORE, Hamady SAMAKE, Aude FABRE et Mama COULIBALY et à tous mes autres amis de Magnabougou, Sogoniko, Sévaré et Toulouse pour leurs conseils et accompagnements sans failles. Chers amis, soyez assurés de mon attachement chaleureux. Que Dieu nous donne la force et la longévité pour raffermir nos amitiés dans des moments de joie et de bonheur.

A mes aînés et proches collaborateurs du MRTC, Dr Antoine DARA, Dr Souleymane DAMA et Dr Amadou NIANGALY pour leur encadrement et leurs contributions dans la réalisation de ce travail. Chers aînés, votre simplicité, votre courtoisie et votre amabilité m'ont permis d'intégrer très vite la vie d'équipe de chercheurs. Que Dieu vous permette de gravir plein d'échelons scientifiques.

A Sékou DOUMBO pour son appui matériel et logistique et à tous mes autres collaborateurs et maîtres au MRTC sans exclusion aucune pour leurs fructueux échanges et transferts de savoirs.

Aux Professeurs Antoine BERRY et Françoise BENOIT-VICAL et à toute leur équipe pour leur transfert de technologie et leur disponibilité ayant permis la réalisation de ce travail. Acceptez, ici, chers maîtres, l'expression de ma profonde gratitude.

A tout le personnel du laboratoire Rodolphe Mérieux du centre Charles Mérieux de Bamako pour ma formation pratique en biologie clinique dans un cadre très convivial.

A tous mes collaborateurs du laboratoire d'hématologie de la FMPOS pour leur très grande courtoisie.

Au Dr Moussa Sacko et à tout le personnel du service de parasitologie de l'INRSP pour leur bon esprit de collaboration.

A toute la promotion Pr Moussa Harama (pharmacie 2004-2009) pour le climat d'entente, de gaieté et de compassion mutuelle que nous avons fait prévaloir durant notre cycle. Que Dieu puisse accorder beaucoup de chance et de réussite à nous tous dans nos carrières professionnelles respectives.

Remerciements :

Au Malaria Research and Training Center(MRTC)/ Département d'épidémiologie des affections parasitaires (DEAP) des Facultés de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et de Pharmacie (FAPH) qui a assuré les ressources humaines, la plate-forme technique, la logistique et les sites d'étude ayant permis de réaliser ce travail.

A la fondation Mérieux et à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui ont bien voulu sponsoriser gracieusement cette thèse.

Au Service Université de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rangueil-Larrey, Toulouse qui a assuré la formation sur le test de quiescence et fourni des réactifs et consommables pour l'accomplissement de ce travail.

Hommages aux membres du jury:

A notre maitre et président de Jury, Pr Ogobara K DOUMBO :

- *Professeur titulaire de Parasitologie-Mycologie à la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et à la faculté de Pharmacie (FAPH)/USTTB*
- *Médecin-chef du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP),*
- *Directeur du Pole d'Excellence de Recherche (PER) sur le Paludisme, Malaria Research and Training Center (MRTC),*
- *Membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine de France,*
- *Membre honoraire « Alpha Omega Alpha Honor Medical Society » des Etats-Unis.*

Cher maitre, nous sommes fiers et très honorés d'être parmi vos élèves. L'immensité de vos qualités scientifiques fait de vous la référence de notre carrière. C'est vous qui nous avez orienté vers la question de recherche qui a abouti à ce travail. Malgré vos multiples occupations nationales et internationales, votre disponibilité et votre encadrement rigoureux ne nous ont pas fait défaut durant les travaux de cette thèse. Par ailleurs, nous ne cesserons jamais de vous remercier pour tous les efforts que vous déployez en faveur de notre formation en parasitologie-mycologie.

Veillez agréer, cher maitre, l'expression de notre profonde gratitude et de notre pleine admiration.

A notre maitre et membre du Jury, Dr Chiompéré KONE :

- *Docteur en Pharmacie,*
- *Attaché de recherche à l'Institut National de Recherche en Santé publique (INRSP),*
- *Chargé de cours de Biochimie à l'Institut National de Formation en Sciences de la Santé (INFSS).*
- *Chef du service de Biochimie de l'INRSP - Bamako-coura.*

Cher maitre, c'est un grand honneur que vous nous faites en étant là pour juger les travaux de notre thèse d'exercice. Malgré la réception tardive de ce document et vos multiples occupations, vous avez tenu à apporter votre contribution dans l'amélioration de ce travail. Cela démontre votre très grand engagement pour la formation des jeunes. Nous vous prions, cher maitre, d'accepter l'expression de nos plus hautes considérations.

A notre maitre et directeur de thèse, Pr Abdoulaye DJIMDE :

- *Maître de Conférences Agrégé de Parasitologie- Mycologie à la FMOS et à la FAPH/USTTB*

- ***Responsable de l'Unité de Résistance aux Antipaludiques au Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires à la FMOS et à la FAPH de l'USTTB;***
- ***Coordinateur du projet WANECAM/EDCTP***

Cher maitre, c'est un immense privilège pour nous de vous avoir comme directeur de thèse. La grandeur de vos qualités scientifiques fait de vous un éminent maitre que nous admirons profondément. C'est pourquoi, nous avons la fierté d'avoir reçu vos enseignements. Nous vous remercions spécifiquement pour les améliorations de la qualité scientifique de ce travail.

Veillez recevoir, cher maitre, l'expression de mon très grand respect.

A notre Maitre et codirecteur de thèse, Pr Boubacar TRAORE :

- ***Maitre de conférences de Parasitologie-Mycologie FMOS FAHPH/USSTB***
- ***Ancien 1^{er} assesseur de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS)***
- ***Doyen de la FAPH,***
- ***Responsable de l'Unité Paludisme et Grossesse et Immuno-pathologie du MRTC***

Cher maitre, nous sommes très honorés que vous codiriez les travaux de notre thèse. C'est une grande chance pour nous de recevoir les enseignements d'un grand maitre d'une immense capacité scientifique que vous êtes. Malgré vos multiples occupations, vous nous avez accordé du temps pour améliorer ce travail. Nous vous remercions pour tous vos conseils et encouragements. Nous sommes aussi reconnaissants de vos efforts pour la bonne marche de notre internat.

Veillez accepter, cher maitre, l'expression de notre grande admiration

Liste des figures et des tableaux :

Figures :

Figure1 : Cycle biologique des psalmodies

Figure2 : Structure chimique des principaux antipaludiques

Figure3: Pieds d'*Artemisia annua*

Figure4 : Structure chimique de l'artémisinine et principaux dérivés.

Figure5 : Arsenal global des antipaludiques de la phase préclinique à la phase IV classés selon l'usage thérapeutique, 1er trimestre de l'année 2011

Figure6 : Arsenal global des antipaludiques classés de la phase de recherche à la phase de développement

Figure7 : Introduction des antipaludiques et apparition des résistances (R) de *P. falciparum*

Figure8: Bioactivation de l'artémisinine

Figure9: Principales protéines et processus biologiques incriminés dans le mode d'action de l'artémisinine et le mécanisme de résistance chez *P. falciparum*

Figure10 : Illustration schématique des niveaux de résistance à l'artémisinine

Figure11 : Cartographie des sites de l'étude

Figure12 : Classification des phénotypes parasitaires selon leur tolérance à l'artémisinine

Figure13 : Comparaison des stades parasitaires observés à H84

Figure14 : Comparaison des stades parasitaires observés à H132

Figure15 : Comparaison des stades parasitaires majoritaires à H84.

Figure16 : Comparaison des stades parasitaires majoritaires à H132

Tableaux :

Tableau I : Classification et mode d'action des antipaludiques.

Tableau II : Demi-vie de l'artémisinine et ses principaux dérivés.

Tableau III : Impact de la résistance aux antipaludiques sur la lutte mondiale contre le paludisme

Tableau IV : Marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques

Tableau V : Plan de procédure de suivi des participants

Tableau VI: Caractéristiques démographiques et biologiques des sujets enrôlés

Tableau VII: Classification des réponses thérapeutiques par bras de traitement avant correction moléculaire

Tableau VIII: Classification des réponses thérapeutiques par bras de traitement après correction moléculaire

Tableau IX: Répartition de la gamétocythémie par bras de traitement à J0 et à J14

Tableau X: Correction de l'anémie par la combinaison AL

Tableau XI: Correction de l'anémie par la combinaison AS/SP

Tableau XII: Classification des isolats étudiés dans le test de quiescence en fonction des critères d'inclusion

Tableau XIII: Proportions des cas de contaminations bactériennes des puits sur les plaques à H84 et 132

Tableau XIV: Taux de tolérance à chacune des concentrations d'artémisinine, aux témoins DMSO et RPMI à H84 et H132

Tableau XV : Distribution par site des résultats de tolérance à 50 d'artémisinine.

Tableau XVI : Distribution par site des résultats de tolérance à 100nM d'artémisinine.

Tableau XVII: Valeurs des paramètres de phénotypage des isolats ayant survécu à 50 et 100nM d'artémisinine

Tableau XVIII : Profil de la tolérance des isolats prélevés des patients ayant présenté l'échec thérapeutique

Tableau XIX : Répartition des cas d'anémie à J28 par tolérance à 50 et 100nM d'ART des isolats du test de quiescence

Tableau XX : Différentes stades parasitaires rencontrés dans les puits 50 et 100nM d'artémisinine et puits témoins DMSO classées par ordre croissant.

Tableau XXI : Résultats de survenue à H84 du stade de ring au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

Tableau XXII : Résultats de survenue à H132 du stade de ring au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

Tableau XXIII : Résultats de survenue à H84 du stade de trophozoïte au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

Tableau XXIV : Résultats de survenue à H132 du stade de trophozoïte au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

Tableau XXV : Résultats de survenue à H84 du stade de schizonte au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

.

Tableau XXVI : Résultats de survenue à H132 du stade de schizonte au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

Tableau XXVII : Résultats de survenue à H84 du stade de ring au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

Tableau XXVIII : Résultats de survenue à H132 du stade de ring au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

Tableau XXIX : Résultats de survenue à H84 du stade de trophozoïte au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

Tableau XXX : Résultats de survenue à H132 du stade de trophozoïte au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

Tableau XXXI : Résultats de survenue à H84 du stade de schizonte au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

Tableau XXXII : Résultats de survenue à H132 du stade de schizonte au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

Liste des sigles et abréviations :

ABC : ATP binding cassette.
ADN : Acide désoxyribonucléique.
AL : Artéméther-Luméfantrine.
ART : Artémisinine.
AS : Artésunate.
ASAQ : Artésunate-Amodiaquine.
AS/MQ : Artésunate-Méfloquine.
AS/SP: Artésunate-Sulfadoxine-Pyriméthamine.
AT: Artéméther.
ATP: Adénosine triphosphate.
AUC: Area under the curve
CE₅₀ : Concentration efficace 50.
CI₅₀, CI₉₀ : Concentration inhibitrice 50, 90.
CMI : Concentration minimale inhibitrice.
CQ: Chloroquine.
CTA: Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine.
CYP2B6 : Cytochrome2B6.
DFO : Desferrioxamine.
DHA : Dihydroartémisinine.
DHA-PIP : Dihydroartémisinine-Pipéraquline.
DMSO : Diméthyl sulfoxyde.
DNDi : Drugs for Neglected Diseases initiative.
dNTPs: Deoxyribonucleotide triphosphate.
DPI : Densité parasitaire initiale.
DP : Densité parasitaire
ECD: Electron capture detector.
ECT: Echec clinique tardif.
EDTA Na : Ethylène diamine tétraacétate de sodium
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.
EPT: Echec parasitologique précoce
ETP: Echec thérapeutique précoce.
FMPOS: Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.
glurp: glutamate-rich protein (gène).
GPARC: Global Plan for Artemisinin Resistance Containment.
HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique.
HPLC: High performance liquid chromatography.
IC95%: Intervalle de confiance à 95%.
IM: Intramusculaire.
MMV: Medicines for Malaria Venture.
MQ: Méfloquine.

MRTC: Malaria Research and Training Center.
msp1, msp2: mérozoïte surface protein 1, 2.
OMS : Organisation Mondiale de la Santé.
P. falciparum: *Plasmodium falciparum*
P. knowlesi: *Plasmodium knowlesi*.
P. malariae: *Plasmodium malariae*.
P. ovale: *Plasmodium ovale*.
P. vivax: *Plasmodium vivax*.
P. yoelli: *Plasmodium yoelli*.
PCR : Polymerase chain reaction.
PfATPase4 : *Plasmodium falciparum* ATPase4.
PfATPase6 : *Plasmodium falciparum* ATPase6.
PfATPase6: *Plasmodium falciparum* ATPase6 (gène).
Pfcrt : *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter.
Pfcytb : *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* (gène).
Pfdhfr : *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (gène).
Pfdhps : *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase (gène).
PfEMP1 : *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1.
Pfmdr1 : *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 (gène).
Pfmdr6 : *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 6 (gène).
Pfmrp : *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (gène).
Pfnhe-1 : *Plasmodium falciparum* Na⁺/H⁺ exchanger (gène).
PfTCTP : *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumour protein.
Pftctp : *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumour protein (gène).
PftetQ : *Plasmodium falciparum* tetracycline resistance TetQ (gène).
PIP : Pipéraquline.
PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme
PyTCTP : *Plasmodium yoelli* translationally controlled tumour protein.
QN : Quinine.
RCPA : Réponse clinique et parasitologique adéquate.
RPMI : Roswell Park Memorial Institute (milieu de culture)
S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*.
SERCA: Sarco/Endoplasmic Reticulum membrane Calcium ATPases.
SLIS : Système Local d'Information Sanitaire.
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SP : Sulfadoxine-Pyriméthamine.
TBE : Tris base + Acide borique + EDTA Na
UBP-1 : Ubiquinatin carboxyl-terminal hydrolase.
ubp-1 : Ubiquinatin carboxyl-terminal hydrolase (gène).
USA : United States of America.
U.V : Ultraviolet.

Table des matières :

I-	Introduction:.....	13
II-	Hypothèse de recherche	15
III-	Objectifs :.....	16
1-	Objectif général :.....	16
2-	Objectifs spécifiques :.....	16
IV-	Généralités:	17
1-	Paludisme et agents pathogènes :.....	17
1.2.	Paludisme.....	17
1.2.	Agents pathogènes :	17
2-	Médicaments et traitements antipaludiques	21
2.1.	Artémisinine et dérivés :.....	23
2.2-	Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine :	28
2.3.	Médicaments en cours de développement :	31
3-	Résistance aux antipaludiques :	32
3.1.	Définitions :	34
3.2.	Efficacité et résistance aux antipaludiques :	35
4-	Méthodes d'étude de l'efficacité des antipaludiques	41
4.1.	Test <i>in vivo</i> :.....	41
4.2.	Test <i>in vitro</i> :.....	42
4.4.	Mesure de la concentration d'antipaludique dans l'organisme :	45
5-	Mécanismes d'action et de résistance à l'artémisinine et dérivés :	46
5.1.	Hypothèse de l'hème comme cible :.....	48
5.2.	Hypothèse de la PfTCTP et autres protéines comme cibles :	49
5.3.	Hypothèse de l'ATPase6 comme cible.....	49
5.4.	Hypothèse de la mitochondrie comme cible :.....	50
5.5.	La quiescence et les facteurs parasitaires de résistance	50
V-	Matériels et méthodes:	54
1-	Sites d'étude :.....	54
2-	Types et périodes d'étude :	55
3-	Population d'étude	55
4-	Taille de l'échantillon :	55
5-	Echantillons d'isolats parasitaires :.....	55
6-	Critères d'inclusion :.....	56
7-	Critères de non inclusion :	56
8-	Equipe de suivi :.....	56
9-	Screening et procédure d'enrôlement	56
10-	Procédure de suivi :.....	56
11-	Traitement.....	58
12-	Considérations éthiques	58
13-	Examens de laboratoire.....	58
12.1-	Examens parasitologiques.....	58
12.2-	Examen hématologique.....	59
12.3-	Examen moléculaire :	59
12.4-	Test <i>in vitro</i> de quiescence.....	60
14-	Variables étudiées	63
13.1-	Variables principales.....	63

13.2.	Variables secondaires.....	63
13.3-	Gestion et analyse des données.....	64
VI-	Résultats.....	65
1.	Résultats de l'essai <i>in vivo</i> :.....	65
3.1.	Classification des réponses thérapeutiques.....	65
1.2.	Correction de l'anémie :.....	66
2-	Tolérance des parasites à l'artémisinine.....	67
2.1-	Taux de tolérance des isolats aux différentes concentrations d'artémisinine.....	67
2.2-	Répartition de la tolérance parasitaire à l'artémisinine par site.....	68
2.3-	Phénotypage des isolats en fonction de la tolérance à l'artémisinine.....	69
2.4-	Paramètres de phénotypage des isolats parasitaires tolérants à 50 et 100nM d'artémisinine.....	70
3-	Tolérance parasitaire et échecs thérapeutiques.....	71
3.1.	Tolérance des isolats parasitaires provenant des patients ayant présenté l'échec <i>in vivo</i>	71
4-	Tolérance parasitaire et correction de l'anémie :.....	72
5-	Différence de stades parasitaires.....	73
5.1-	Stades parasitaires retrouvés dans les puits témoins et dans les puits de 50nM et 100nM d'artémisinine.....	73
5.2-	Comparaison des stades parasitaires observés.....	74
VII-	Discussion.....	81
1.	Tolérance parasitaire :.....	81
2.	Tolérance parasitaire et échecs thérapeutiques :.....	82
3.	Quiescence parasitaire :.....	83
VIII-	Conclusion.....	85
IX-	Recommandations.....	86
	Références bibliographiques :.....	87
	Annexe:.....	94

I- Introduction:

Le paludisme est une affection parasitaire qui constitue un problème majeur de santé publique et socio-économique dans le monde en général et l'Afrique sub-saharienne en particulier. En 2010, 154 à 289 millions de cas de paludisme ont été enregistrés dans le monde avec près de 490 000 à 836 000 décès [1]. Au Mali, la fièvre présumée palustre constitue 37,5% des motifs de consultation [2] et le nombre de décès dû au paludisme en 2010 était de 39 283 dont 28 859 enfants âgés de moins de 5 ans [3].

De nos jours, face à la résistance des moustiques à la plupart des insecticides et au manque d'un vaccin efficace, la prophylaxie et le traitement médicamenteux restent la principale option de lutte contre le paludisme. Nombreux médicaments ont été utilisés depuis des années pour traiter le paludisme parmi lesquels la chloroquine (CQ) dont l'introduction dans les années 1940 a permis de réduire considérablement les souffrances liées au paludisme. La CQ fut considérée comme la molécule idéale dans le traitement, le contrôle et l'élimination du paludisme. Les premiers cas de résistance à cette molécule sont apparus environ une vingtaine d'années après son introduction. L'utilisation de la CQ pour le traitement du paludisme à *P. falciparum* fut ainsi abandonnée suite à la diffusion de la résistance. Des cas d'échec thérapeutique avec la quinine et de résistance des parasites à beaucoup d'autres médicaments antipaludiques notamment la sulfadoxine-pyriméthamine, l'amodiaquine, la méfloquine, l'atovaquone-proguanil ont été documentés. L'émergence et la diffusion de ce phénomène de résistance constituent l'un des obstacles majeurs dans la lutte contre le paludisme qui se manifeste par un changement considérable de l'épidémiologie mondiale de la maladie [4].

C'est au début des années 1970 que l'artémisinine fut extraite en Chine à partir d'une herbacée annuelle appelée *Artemisia annua*. De nos jours, l'artémisinine et ses dérivés, notamment, l'artéméthér, l'artésunate et la dihydroartémisinine constituent des molécules très efficaces dans la prise en charge du paludisme [5]. Pour prévenir l'émergence de la résistance à ces molécules et protéger le peu de médicaments antipaludiques encore efficaces, les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) ont été développées et adoptées dans le traitement du paludisme non compliqué en zone d'endémie. Au Mali, l'Artéméthér-Luméfántrine (AL) et l'Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) sont les deux CTA recommandées pour traiter les cas de paludisme non compliqué [3]. La quinine et l'Artéméthér injectables ou l'artésunate IV sont réservés pour le traitement des formes graves et compliquées et de tout cas de paludisme chez la femme enceinte [3]. La SP est indiquée dans le traitement préventif intermittent chez la femme enceinte [3]. L'utilisation de la combinaison Amodiaquine + Sulfadoxine-Pyriméthamine dans la chimioprévention du paludisme chez les enfants âgés de 3 à 59 mois est recommandée dans les zones sahéliennes d'Afrique à forte transmission saisonnière [6].

L'artémisinine et ses dérivés sont des endoperoxydes sesquiterpènes lactones possédant peu d'effets secondaires et très actifs sur les stades intra-érythrocytaires de *P. falciparum* [7]. Cependant, l'efficacité clinique de ces médicaments se trouve, de nos jours, énormément menacée et cela suscite une immense inquiétude pour les acteurs de la lutte contre le paludisme. En effet, depuis 2002, on assiste à une augmentation des taux d'échec thérapeutique et à un retard de clairance parasitaire au niveau de la frontière Cambodgio-thaïlandaise [8]. Ainsi, en

2009, Dondorp *et al.* ont rapporté la preuve d'un retard de clairance parasitaire avec l'artésunate [9]. Egalement, Phyo *et al.* ont constaté un allongement considérable du temps de clairance parasitaire entre 2001 et 2010 avec l'artésunate en Thaïlande [10]. Les conséquences de la baisse de sensibilité aux dérivés de l'artémisinine peuvent affecter le bien être des patients et provoquer l'accroissement des coûts économiques du paludisme et l'apparition et/ou la diffusion rapide de la résistance aux molécules partenaires dans les CTA à savoir la luméfantrine, l'amodiaquine, la méfloquine, la sulfadoxine-pyriméthamine, la pipéraquline et la pyronaridine [4].

Pour mieux lutter contre l'émergence de la résistance aux dérivés de l'artémisinine, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a adopté en Janvier 2011 un plan spécifique GPARC (Global Plan for Artemisinin Resistance Containment) dont deux des objectifs consistent en la surveillance de l'efficacité des antipaludiques et en la recherche sur la résistance aux dérivés de l'artémisinine [11].

La connaissance claire du mécanisme d'action exacte des dérivés de l'artémisinine serait très importante dans la compréhension et la mise en évidence de leur mécanisme de résistance. Ceci permettrait également d'établir la base moléculaire de cette résistance afin d'identifier des marqueurs moléculaires spécifiques. Toutefois, selon la quasi-totalité des postulats émis, l'activité des dérivés de l'artémisinine dépend du fer dans l'environnement cellulaire qui permet de cliver le pont endoperoxyde de leur structure. Il en résulte des radicaux libres très actifs dont la toxicité expliquerait l'action antiparasitaire des dérivés de l'artémisinine. Ces postulats sont basés sur des hypothèses de cible potentielle notamment, l'hème, la protéine *PfTCTP* (Translationally Controlled Tumour Protein), la protéine *PfATPase6* et la mitochondrie.

Plusieurs gènes furent associés au changement de sensibilité de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine. Il s'agit de : *Pfprt* et *Pfmrtd1* (transporteurs membranaires de la vacuole digestive), *Pfatpase6* (ATPase du réticulum endoplasmique), *G7* ou *Pfmdr6* (transporteur ABC de l'apicoplaste) et l'*ubp-1* (enzyme du métabolisme de l'ubiquitine). A ces facteurs de résistance, il faut ajouter les phénomènes de la quiescence parasitaire illustrés par les travaux de Witkowski *et al.* (2010) [12], de Teuscher *et al.* (2012) [13] et l'analyse faite par Cheng *et al.* (2012) [14]. Witkowski *et al.* ont sélectionné au laboratoire une souche de *P. falciparum* qui tolère des très fortes concentrations d'artémisinine grâce à la quiescence au stade de ring sans changement de la CI_{50} . Teuscher *et al.* ont montré que des phénotypes parasitaires résistants sélectionnés au laboratoire [15] étaient capables à la fois de quiescence et de croissance avec changement de la CI_{50} . Le processus de sélection de ces deux catégories de phénotype (tolérantes/résistantes) a consisté en l'exposition graduelle durant près de trois années des souches parentales à l'action de l'artémisinine ou de ses dérivés.

Depuis 2004, les CTA sont officiellement sur le marché malien et font l'objet d'une très large utilisation. Les populations parasitaires se trouvent depuis cette date sous la pression des dérivés de l'artémisinine. Ainsi, la possibilité de sélection de souches plasmodiales résistantes ou ayant une sensibilité diminuée aux CTA serait envisageable au Mali après ces quelques années de pression. Nous nous sommes proposés dans cette étude de mettre en évidence des isolats parasitaires de *Plasmodium falciparum* tolérants à l'artémisinine par un mécanisme de quiescence dans des zones endémiques au Mali ayant été sous pression des dérivés de l'artémisinine.

II- Hypothèse de recherche :

Des populations parasites de *P. falciparum* à sensibilité réduite à l'artémisinine par un phénomène de quiescence pourraient être présentes au Mali où les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine sont recommandées comme traitement de première intention depuis 2006.

III- Objectifs :

1- Objectif général :

Evaluer l'efficacité de l'artémisinine sur les isolats de *Plasmodium falciparum*, issus des zones d'endémie palustre sous pression des dérivés de l'artémisinine, par un test *in vitro* de la quiescence.

2- Objectifs spécifiques :

- Comparer l'efficacité *in vivo* des combinaisons AL et AS/SP dans les sites où les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine sont utilisées au Mali.
- Déterminer la relation entre la tolérance *in vitro* des isolats de *P. falciparum* et la prévalence des échecs thérapeutiques, de l'anémie et du portage de gamétocytes après traitement par l'AL et l'ASSP.
- Identifier des isolats de *P. falciparum* tolérants *in vitro* aux concentrations de 50 et 100nM d'artémisinine après 48 heures d'exposition.
- Isoler des isolats maliens de *P. falciparum* tolérants à l'artémisinine par un phénomène de quiescence.

IV- Généralités:

1- Paludisme et agents pathogènes :

1.2.Paludisme :

Le paludisme humain est une affection fébrile potentiellement mortelle causée par des protozoaires *Apicomplexa* du genre *Plasmodium*. Cinq espèces sont reconnues pathogènes pour l'homme à savoir : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi*. Ces parasites sont transmis à l'homme par la piqûre infectante de près d'une soixante-dizaine d'espèces femelles de moustique du genre *Anopheles* [16]. Au Mali, ce sont les espèces du complexe *Anopheles gambiae s.l* et *Anopheles funestus s.l* qui sont responsables de la transmission du paludisme. La phase sanguine du cycle biologique du parasite rend possible d'autres modes de transmission qui sont exceptionnels : il s'agit des transmissions congénitale, transfusionnelle, par greffe et par transplantation d'organes. Par ailleurs, un individu du groupe sanguin Duffy positif qui reçoit un foie infecté d'hypnozoïtes par transplantation pourrait faire un paludisme à *P. vivax*. Cliniquement, nous distinguons plusieurs formes de paludisme à savoir : l'accès palustre de primo-infection à *P. falciparum*, l'accès palustre simple, le paludisme grave et des formes de complications directes ou indirectes comme le paludisme viscéral évolutif, la splénomégalie malarique hyper-réactive et la fièvre bilieuse hémoglobininurique. La manifestation clinique la plus fréquente est l'accès palustre simple caractérisé par une fièvre avec des symptômes comme : céphalées, frissons, sueurs, nausées, vomissements ou diarrhées. Souvent, le paludisme peut s'avérer asymptomatique surtout chez les adultes en zone endémique. Les formes graves, parfois létales sont causées par l'espèce *P. falciparum*. Il s'agit surtout des atteintes neurocérébrales, de l'anémie hémolytique aigue, du syndrome de détresse respiratoire, de l'insuffisance rénale aigue, de l'acidose métabolique et de l'hypoglycémie. L'OMS a établi des définitions pratiques des cas graves de paludisme [17].

Plasmodium falciparum est l'espèce la plus fréquente au Mali et en Afrique. Le paludisme est la parasitose la plus répandue au monde. En 2012, l'OMS a annoncé près de 154 à 289 millions de cas de paludisme avec 490 000 à 836 000 décès [1] survenus en 2010. L'Afrique est le continent qui souffre le plus de cette maladie car elle a enregistré 80% des cas et 91% des décès [1]. Près de 3,3 milliard d'individus sont exposés à cette maladie soit la moitié de la population mondiale [18]. Le paludisme est une entrave au processus de développement des pays touchés, les pertes directes dues à ce fléau sont estimées à 12 milliard de Dollars US par an soit 1,3 % de croissance de produit national brut perdu chaque année en Afrique [18].

1.2. Agents pathogènes :

Ce sont des protozoaires endoparasites à tropisme hépatique puis sanguin.

1.1.1. Taxonomie [19] :

Règne : Protistes

Sous-règne : Protozoaires

Super-phylum : *Alveolata*

Phylum : *Apicomplexa*

Classe : *Aconoïdasida*

Ordre : *Haemosporida*

Famille : *Plasmodiidae*

Genre : *Plasmodium*

Espèces : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. knowlesi*.

1.2.2. Morphologie, niches écologiques et caractères différentiels des espèces [20]:

Divers stades parasitaires sont rencontrés au cours du cycle biologique des plasmodies. Chez l'homme, il s'agit des stades : sporozoïte, mérozoïte, trophozoïte, schizonte et gamétocytes. Chez le moustique on rencontre les stades : gamètes, ookinète, oocyste et sporozoïte. Le sporozoïte, le mérozoïte et l'ookinète sont les formes mobiles et invasives. Le mérozoïte mesure à peu près 1,5µm de long, le sporozoïte entre 12 - 15µm et l'ookinète entre 10 - 13µm de long sur 2 - 3µm de large. Ces cellules sont caractérisées par la présence de plusieurs organites particuliers dont un apicoplaste et un complexe apical constitué de rhoptries, de micronème, de granules denses et de conoïdes. L'ensemble du complexe apical est nécessaire à la reconnaissance de la cellule hôte, à l'invasion et au développement intracellulaire. Cependant, le complexe apical de l'ookinète est réduit (absence de rhoptries et de granules denses) et il est incapable de réaliser un développement intracellulaire. Le corps du parasite est constitué d'une architecture pelliculaire composée d'une membrane plasmique et d'un complexe membranaire interne. Le complexe membranaire interne isole le cytoplasme donnant une structure alvéolaire d'où le nom de super-phylum des *Alveolata*. Des réseaux de microtubules, des filaments intermédiaires, des molécules d'actine et de myosine, des protéines motrices et des particules transmembranaires assurent le mouvement du parasite. Ce mouvement se fait par planement appelé *gliding*.

Chez l'homme, les stades parasitaires des plasmodies sont intracellulaires dont les niches écologiques sont en général les hépatocytes et les érythrocytes. D'autres niches écologiques ont été mises en évidence chez la souris grâce aux nouvelles technologies moléculaires et d'immunologie. Il s'agit des kératinocytes de la peau, des cellules associées aux follicules pileux [21] et des cellules endothéliales du ganglion lymphatique [22]. Chez le moustique, les niches écologiques sont extracellulaires notamment l'estomac moyen et la lamina basale où ont lieu respectivement la reproduction sexuée et la multiplication asexuée.

Les différences entre les espèces pathogènes résident au niveau de leur morphologie à la phase sanguine, des variations mineures du cycle biologique, de la possibilité de séquestration des globules rouges infectés dans la microcirculation vasculaire et de leurs préférences en type de globule rouge pour l'invasion.

Plasmodium falciparum (du grec, *falx* : faucille, *parere* : donner naissance à) donne de nombreux trophozoïtes jeunes sous forme de petits anneaux (rings) et des gamétocytes en forme de croissant. Le schizonte renferme 16 à 32 mérozoïtes. Il n'a pas de préférence spécifique d'hôte érythrocytaire. Sur le frottis coloré au Giemsa, les érythrocytes infectés contiennent des taches jaune orangé autour du trophozoïte appelées taches de Maurer. Cette espèce possède la particularité de provoquer la cytoadhérence des globules rouges infectés sur les cellules

endothéliales des capillaires veineux, les monocytes et les plaquettes. Cela provoque la séquestration microvasculaire des érythrocytes infectés à l'origine des manifestations sévères de la maladie. Cette cytoadhérence est due à une protubérance de complexes moléculaires à la surface de l'érythrocyte infecté appelée *knob*. Ces knobs permettent également aux érythrocytes infectés de se fixer aux érythrocytes sains formant des structures en rosettes. Dans la structure du knob se trouve incorporée une famille de protéines antigéniquement variables appelée *PfEMP1* (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1). La protéine *PfEMP1* est un véritable facteur de virulence impliquée dans les processus d'évasion immunitaire, de cytoadhérence et de formation des rosettes.

. *Plasmodium vivax* (du grec, *vivax* : vivace) préfère envahir les réticulocytes (érythrocytes jeunes de grande taille). Sur le frottis coloré au Giemsa, les érythrocytes infectés contiennent des vésicules rougeâtres appelées granulations de Schüffner. Le trophozoïte paraît motile d'où le nom de l'espèce. A ce stade, l'érythrocyte infecté s'élargit et devient amiboïde dont la taille s'approche de celle d'un leucocyte. Les schizontes contiennent 12 à 24 mérozoïtes irrégulièrement repartis autour de la masse d'hémozoïne. Les gamétocytes sont arrondis et remplissent le cytoplasme de la cellule hôte.

Plasmodium ovale est similaire à *Plasmodium vivax* mais ses schizontes sont compacts, il y a peu de mérozoïtes (8 à 12) dans les schizontes et les érythrocytes sont allongés en forme ovale d'où le nom de l'espèce.

Dans le cas de *Plasmodium malariae*, les parasites sont compacts dans les érythrocytes et les mérozoïtes sont en rosaces. Cette espèce préfère infecter les érythrocytes sénescents. L'apparition des pigments malariques est précoce. Le trophozoïte forme une bande équatoriale dans la cellule hôte.

Les trophozoïtes jeunes de *Plasmodium knowlesi* ressemblent beaucoup à ceux de *P. falciparum*. Ses trophozoïtes âgés et matures, ses schizontes et gamétocytes sont très semblables à ceux de *P. malariae*. Les trophozoïtes renferment fréquemment deux chromatines. Ils sont souvent retrouvés au nombre de 2 à 3 dans un érythrocyte. Les schizontes renferment en général 16 mérozoïtes contre 12 chez *P. malariae*. Sur le plan génétique, cette espèce zoophile se rapproche plutôt de *P. vivax*.

Les méthodes moléculaires ont permis de révéler, pour *P. ovale*, l'existence de deux sous-espèces : *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* [23]. Par ailleurs, *P. vivax* et *P. ovale* ont la particularité de former des hypnozoïtes. La schizogonie érythrocytaire dure 48 heures chez *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* entraînant une fièvre tierce tandis qu'elle est de 72 heures chez *P. malariae* et donne la fièvre quarte. Elle dure environ 24 heures chez *P. knowlesi*. Les périodes d'incubation sont de 7 à 12 jours pour *P. falciparum*, 11 à 13 jours pour *P. vivax*, 15 jours au minimum pour *P. ovale*, 15 à 21 jours pour *P. malariae* et d'environ 5 jours pour *P. knowlesi*.

1.2.3. Cycle biologique :

Le cycle biologique des plasmodies est un cycle dixène qui se déroule successivement dans le corps de l'anophèle femelle (vecteur) et l'organisme d'un hôte vertébré (hôte définitif). Les espèces : *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum* sont exclusivement inféodées à *Homo sapiens*.

L'espèce *P. malariae* est couramment retrouvée chez l'homme mais peut infecter le chimpanzé. *P. knowlesi* est une espèce simienne qui peut infecter l'homme. Dans l'organisme humain, le cycle présente deux phases distinctes de multiplication asexuée : la phase pré- ou exo-érythrocytaire qui a lieu dans le foie et la phase érythrocytaire au niveau du sang. Cette dernière phase correspond aux manifestations cliniques de la maladie du paludisme. La reproduction sexuée suivie d'une phase de sporogonie a lieu chez le moustique. Le cycle biologique du *Plasmodium* est illustré par la figure 1. L'infection de l'homme est initiée par l'inoculation des sporozoïtes dans l'organisme par la piqûre de l'anophèle femelle au cours de son repas sanguin. Lors de la piqure, le moustique injecte de la salive qui facilite sa prise de sang. C'est cette voie de sécrétion de salive que le parasite emprunte chez le moustique pour être transmis à l'homme. Une partie des sporozoïtes inoculés est détruite notamment par les macrophages locaux. Le reste pénètre dans les vaisseaux sanguins pour gagner le foie au bout de 15-30 minutes. Les sporozoïtes vont envahir les hépatocytes pour se différencier en trophozoïtes puis en schizontes. L'hépatocyte infecté augmente de volume pour donner une forme en plasmode remplis de mérozoïtes appelée corps bleu. Les corps bleus se détachent du tissu hépatique, pénètrent dans les capillaires hépatiques et libèrent les mérozoïtes. La phase hépatique constitue la phase d'incubation interne de la maladie dont la durée dépend de l'espèce plasmodiale. Pour *P. vivax* et *P. ovale*, certains trophozoïtes hépatiques se différencient en formes quiescentes appelées hypnozoïtes. Ces hypnozoïtes peuvent se réactiver des mois voire des années après l'infection initiale.

Les expériences ont montré chez la souris qu'en plus de la voie sanguine, un contingent de sporozoïtes emprunte les vaisseaux lymphatiques pour subir une multiplication asexuée exoérythrocytaire dans les cellules endothéliales des ganglions [22]. Cette phase entraîne une réaction immunitaire à lymphocytes T et cellules dendritiques. D'autres subissent directement leur schizogonie exoérythrocytaire dans les kératinocytes de la peau et les cellules associées aux follicules pileux. [21]

Dans le sang, les mérozoïtes envahissent immédiatement les hématies pour subir une multiplication asexuée (schizogonie érythrocytaire). Cette invasion fait intervenir des ligands et des récepteurs spécifiques respectivement à la surface du mérozoïte et de l'érythrocyte. Le complexe apical du mérozoïte est essentiel pour ce mécanisme. Une fois pénétré dans l'érythrocyte, le mérozoïte se différencie successivement en ring, trophozoïte et schizonte. Au cours de cette phase, le parasite consomme dans sa vacuole digestive l'hémoglobine de la cellule hôte comme source d'acides aminés. Les érythrocytes infectés se rompent et les schizontes libèrent de nouveaux mérozoïtes qui vont envahir d'autres érythrocytes. Ainsi, continue le cycle érythrocytaire de réplication asexuée. Alternativement à cette voie, une portion des parasites se différencient en formes sexuées mâles et femelles. A ce stade, lors que le moustique prend son repas sanguin sur l'individu infecté, il rapporte dans son estomac les parasites dont les formes asexuées seront digérées. Dans l'estomac moyen de l'anophèle, les gamétocytes sont libérés des globules rouges puis commence le développement du parasite chez le moustique [24]. En effet, les gamétocytes se transforment en gamètes grâce aux nouvelles conditions de pH (plus basiques), de température (plus basse) et biochimiques (action de l'acide xanthurénique). Les gamètes mâles subissent une exflagellation pendant environ 1 heure pour donner des

microgamètes. Les gamètes femelles ou macrogamètes seront fécondés par les microgamètes. Le zygote formé subit la méiose puis se différencie en une forme motile et allongée au bout de 10-25 heures environ appelée ookinète. L'ookinète traverse durant environ 48 heures la membrane péritrophique et l'épithélium stomacal pour se loger dans la couche laminaire basale. Les cellules épithéliales stomacales traversées vont subir une apoptose. Dans cette niche, l'ookinète se transforme en oocyste. L'oocyste subit une série de divisions nucléaires et d'organisations moléculaires et cellulaires au bout de 10 à 14 jours environ aboutissant à la formation des formes métacycliques infectantes haploïdes appelées sporozoïtes. La membrane de l'oocyste se rompt et libère de nombreux sporozoïtes dans l'hémolymphe de l'anophèle. Grâce à l'hémolymphe, les sporozoïtes parviennent à envahir la glande salivaire et le moustique devient infectant à partir de cet instant. Au cours d'un repas sanguin le moustique infectant va inoculer les sporozoïtes dans l'organisme de l'homme et le cycle continue.

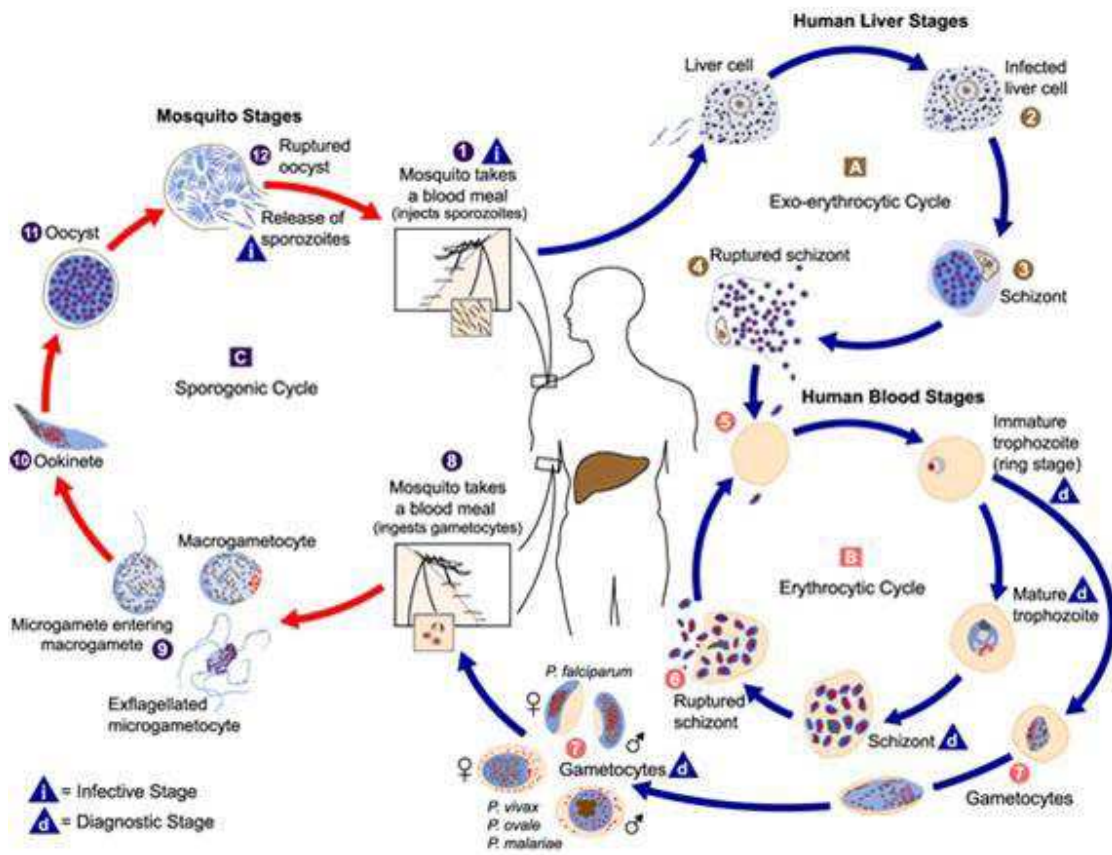


Figure1 : Cycle biologique des plasmodies (source : Centers for Disease Control and Prevention, USA).

2- Médicaments et traitements antipaludiques :

L'histoire des antipaludiques se trouve liée à celle de la recherche médicale militaire et des guerres. La plupart des antipaludiques disponibles aujourd'hui ont été jadis mis au point pour assurer la protection des personnels militaires en déploiement dans les régions tropicales sous conflits armés durant le siècle dernier.

Les antipaludiques sont soit des produits naturels extraits des plantes, soit des molécules d'hémi-synthèse issues des produits naturels ou soit des molécules entièrement synthétisées. On y compte également certains antibiotiques qui sont pourvus d'activité antipaludique

Le tableau 1 donne une classification de ces produits par classe chimique et par mode d'action. La Figure 2 contient les structures chimiques des principaux antipaludiques usuels.

Tableau I : Classification et mode d'action des antipaludiques.

Classes		Molécules d'exemples	Cible
Quinoléines	Quinoléines méthanols	Quinine	Schizontes et trophozoïtes endoérythrocytaires des diverses plasmodies
		Méfloquine	
	Amino-4-quinoléines	Chloroquine	Schizontes endoérythrocytaires des diverses plasmodies
		Amodiaquine	
		Pipéraquline	
	4-amino-acridines	Pyronaridine	Gamétocytes et schizontes et trophozoïtes intra-hépatiques
Amino-8-quinoléines	Primaquine Tafénoquine		
Phénanthrène-méthanols		Halofantrine	Schizontes endoérythrocytaires de <i>P. falciparum, vivax, malariae</i> et <i>ovale</i>
		Luméfantrine	
Antifoliques	Sulfonamides	Sulfadoxine Sulfaméthoxazole	Schizontes endoérythrocytaire (inhibition de la dihydroptéroate synthetase)
		Dapsone	
		Triméthoprim	
	Diaminopyridine	Pyriméthamine	Schizontes endoérythrocytaires, inhibition de la dihydrofolate réductase
	Biguanides	Proguanil Chloroproguanil	
		Hydroxynaphtoquinone	Atovaquone
Artémisinine et dérivés (sesquiterpènes trioaxanes lactone)		Artémisinine	Toutes les formes parasitaires des diverses plasmodies au stade érythrocytaire
		Artésunate	
		Artéméter	
		Artéether	
		Dihydroartémisinine	
Antibiotiques	Cyclines	Tétracycline	Formes asexuées endoérythrocytaire et intrahépatiques des diverses plasmodies
		Doxycycline	
	Macrolides et lincosamides	Clindamycine	Schizontes endoérythrocytaires
		Lincomycine	
		Azythromycine	
	Autres	Fosfomycine	Inhibe la synthèse des isoprénoïdes

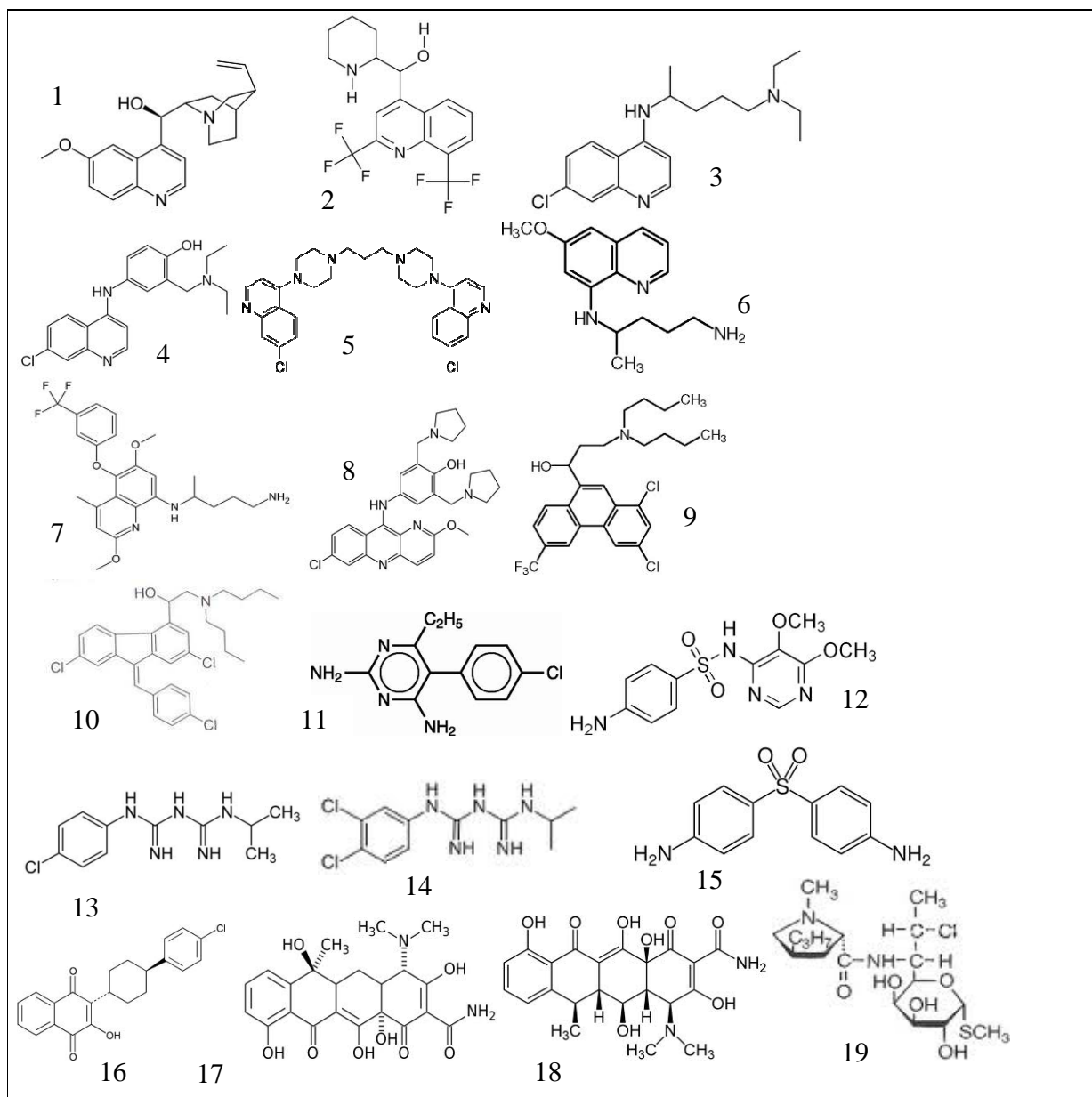


Figure2 : Structure chimique des principaux antipaludiques

1= quinine ; 2= méfloquine ; 3= chloroquine ; 4= amodiaquine ; 5= pipéraquine ; 6= primaquine ; 7= tafénoquine ; 8= pyronaridine ; 9= halofantrine ; 10= luméfántrine ; 11= pyriméthamine ; 12= sulfadoxine ; 13= proguanil ; 14= chloroproguanil ; 15= dapsonne ; 16= atovaquone ; 17= tetracycline ; 18= doxycycline ; 19= clindamycine.

2.1. Artémisinine et dérivés :

2.1.1 Historique [24] :

L'artémisinine est extraite d'une herbacée annuelle appelée *Artemisia annua* (voir fig.3) qui fut utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise pour traiter les maladies fébriles depuis plus de 2 000 ans.



Figure3: Pieds d'*Artemisia annua* (source: Centers for Disease Control and Prevention, USA)

L'artémisinine ou *Qinghaosu* fut découverte en Chine au début des années 1970. Cette découverte est attribuée à la phytochimiste You-You Tu de l'*Institute of Chinese Materia Medica* (Académie Chinoise de la Médecine Traditionnelle Chinoise).

A la suite de l'émergence de la résistance aux antipaludiques notamment à la CQ et à la méfloquine (MQ), il était devenu urgent de chercher des molécules alternatives plus efficaces. A cause de la guerre de Vietnam et des besoins internes du pays, la Chine a initié un large programme entre les années 1960 et 1970 pour identifier et isoler de nouveaux composés antipaludiques à partir des plantes médicinales locales. C'est ainsi que Tu et son groupe ont expérimenté sur un modèle animal de paludisme plus de 380 extraits obtenus à partir de quelques 200 herbes chinoises, dont *Artemisia annua* L. Un extrait d'*Artemisia* a montré un effet inhibiteur très prometteur de la croissance parasitaire. Ce résultat fut en accord avec les propriétés de cette plante décrite dans « *A Handbook of Prescriptions for Emergencies* » de Ge Hong (Dynastie des Jin, 284 – 346 avant JC). Après plusieurs expérimentations basées sur les procédés d'extraction et sur l'évaluation clinique, Tu démontra l'efficacité de cet extrait en termes de clairance parasitaire et de la fièvre. Ainsi, elle s'engagea pour l'isolement et la purification du principe actif de l'*Artemisia annua* L. Eventuellement, en 1972, elle parvint avec son équipe à identifier une substance cristalline incolore de poids moléculaire de 282 Da, de formule brute $C_{15}H_{22}O_5$ et de point de fusion de 156 – 157°C comme le principe actif qu'elle nomma « *Qinghaosu* » (*Qinghao* est le nom chinois d'*Artemisia annua* L. et *su* signifie élément de base en chinois). Plus tard, en 1975, Tu, avec le concours de l'Institut de Biophysique de l'Académie Chinoise des Sciences, travailla sur la stéréochimie et la structure du *Qinghaosu* et détermina enfin que cette substance est une sesquiterpène lactone. La structure fut publiée pour la première fois en 1977 [25].

Ainsi venait de naître un nouvel antipaludique possédant une structure chimique totalement différente et une plus grande efficacité comparé aux drogues conventionnellement utilisées. Les résultats de l'utilisation du *Qinghaosu* et de ses dérivés en Chine ont attiré l'attention du reste du monde entier dans les années 1980. L'introduction de l'artémisinine et de ses dérivés dans le reste du monde a été un facteur fondamental dans le combat de l'humanité contre le paludisme. En 2005, l'OMS annonça un changement dans la stratégie de traitement du paludisme qui aboutit à l'adoption des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). Actuellement, les

CTA sont largement utilisées et permettent de sauver de nombreuses vies humaines notamment les enfants en Afrique.

Le *Qinghaosu* obtint le statut de « découverte scientifique nationale (national scientific discovery) » délivré par le Comité des Sciences et des Technologies de la Chine en 1979.

Compte tenu de son efficacité et de son faible rendement de production à partir d'un produit naturel, de nombreuses recherches ont été initiées pour mettre au point des méthodes de synthèse chimique de l'artémisinine. Comme résultat, l'hémi-synthèse de l'artémisinine à partir de l'acide artémisinique a été possible ainsi que la synthèse totale de la molécule en 1983 [26]. Egalement, des progrès ont été enregistrés dans la biosynthèse hétérologue de ce produit. L'amorpha-4,11-diène, un précurseur de l'artémisinine a pu être produit en grande quantité dans *E. coli*.

Après la découverte de la structure prototype de l'artémisinine, les chimistes ont consacré leurs efforts dans l'amélioration de l'efficacité de l'artémisinine. Ce qui a abouti à la production de plusieurs molécules dérivées de l'artémisinine qui sont actuellement en usage clinique. En outre, les études chimiques basées sur la fonction endopéroxyde de l'artémisinine ont conduit au développement des dérivés peroxyde, trioxane, tétraoxane et d'autres à activité antipaludique, ouvrant ainsi une nouvelle page dans l'histoire des antipaludiques.

2.1.2 Structure et propriétés physico-chimiques :

L'artémisinine (ART) est structuralement différente des autres classes d'antipaludiques. Elle possède un noyau sesquiterpène avec un unique pont endopéroxyde et une fonction lactone.

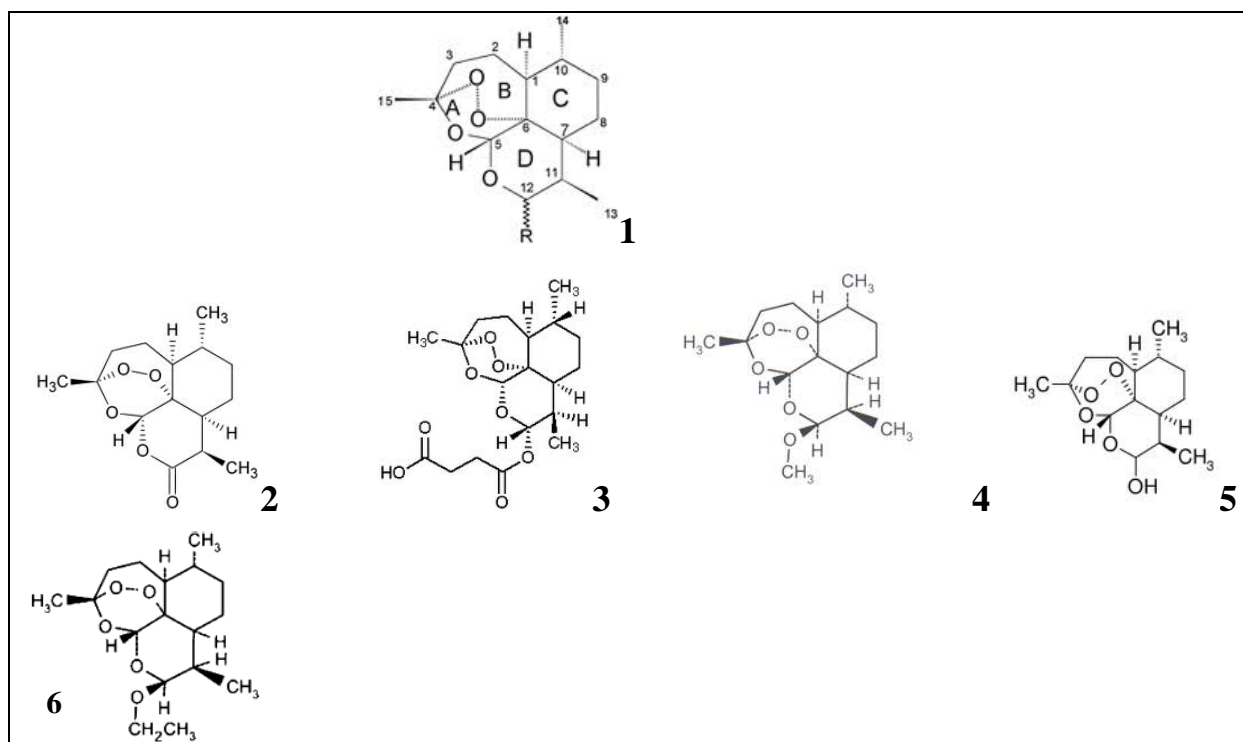


Figure4 : Structure chimique de l'artémisinine et principaux dérivés.

(1 = formule générale, 2 = artémisinine, 3 = artésunate, 4 = artéméther 5 = dihydroartémisinine, 6= artééther)

L'ART est peu soluble dans l'eau et dans l'huile, par contre, elle est soluble dans beaucoup de solvants aprotiques. Contrairement à la fragilité thermique des endoperoxydes en général, l'ART est paradoxalement thermostable, même quand la température atteint son point de fusion (156 - 157°C). Elle est instable en milieu basique et acide et génère des produits variés. La fonction peroxyde peut être réduite par hydrogénation avec le palladium et le carbone comme catalyseurs conduisant à la désoxyartémisinine qui n'a presque pas d'effet antipaludique. La fonction lactone peut être réduite en lactol en présence du borohydrure de sodium sans affecter la fonction peroxyde. C'est cette réaction qui a contribué au développement de la première génération des dérivés d'artémisinine.

2.1.3 Pharmacologie :

L'ART (le composé ancestral) fut facilement produite en formes orale et suppositoire. Son utilisation est supplantée dans la plupart des pays par ses dérivés éthers et esters (artésunate, artéméther, artééther) qui possèdent une activité *in vitro* 10 à 20 fois plus élevée. L'artésunate (AS), dérivé hémi-succinate hydrosoluble, est le plus utilisé et existe en formes orale, parentérale et suppositoire. L'artéméther (AT) est un dérivé méthyl éther lipophile, il est dispensé sous forme d'ampoule injectable IM et de comprimé *per os*. L'artééther, dérivé éthyl éther lipophile licencié en Europe, est disponible en IM. Dans l'organisme, les dérivés hydrophiles et lipophiles de l'ART sont convertis en dihydroartémisinine (DHA) qui est un métabolite actif. La DHA est elle-même disponible en forme orale.

Les dérivés de l'artémisinine possèdent une activité antimicrobienne contre plusieurs espèces de parasite tels que *Plasmodium spp.*, *Schistosoma spp.*, *Leishmania spp.*, *Pneumocystis jirovecii* et *Toxoplasma gondii*. Ils possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, antivirales et anticancéreuses.

Les dérivés de l'artémisinine sont actifs contre les stades de ring, trophozoïte, schizonte et gamétocytes [27]. Cette activité gamétocytocide permet de réduire la transmission palustre. Par contre, ils n'ont pas d'action sur les formes pré-érythrocytaires du parasite et non plus sur les hypnozoïtes de *P. vivax* et de *P. ovale*. L'activité spécifique de ces composés sur une très large période du cycle biologique du parasite (du stade de ring métaboliquement peu actif au stade de schizonte âgé) revêt deux conséquences thérapeutiques majeures. Primo, dans l'infection à *P. falciparum*, l'élimination massive des jeunes rings circulants par ces composés entraîne une réduction immédiate de la parasitémie. Ce résultat n'est pas obtenu avec les autres antipaludiques usuels. Secundo, la destruction considérable des formes parasitaires matures par cette classe d'antipaludiques prévient la séquestration microvasculaire de ces formes. En somme, comparés aux autres antipaludiques usuels, ces constats attribuent aux dérivés de l'artémisinine une plus grande rapidité des réponses cliniques (en 48 heures) et une très bonne protection contre l'évolution de la maladie vers le paludisme grave.

La méthode de choix utilisée pour mesurer l'ART et ses dérivés dans l'organisme est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec le détecteur à capture d'électron (ECD).

La biotransformation de l'ART fait intervenir majoritairement le CYP2B6 et conduit à des métabolites inactifs. Après administration orale ou parentale ; l'AS, l'AT et l'artééther sont tous

rapidement convertis par déméthylation (AT) ou par hydrolyse (AT) en DHA qui est éliminée par glucuronidation avec une demi-vie de près d'une heure. Les pics de concentration sont généralement atteints environ à partir d'une heure. Le tableau 2 donne une estimation des demi-vies d'élimination de l'artémisinine et de ses principaux dérivés.

Tableau II : Demi-vie de l'artémisinine et ses principaux dérivés.

Composé	Demi-vie d'élimination	Référence
Artémisinine	2 – 5 heures	[27]
Artésunate	0,7 – 1,4 heure	[28]
Artéméther	4 – 5 heures	[29]
Dihydroartémisinine (DHA)	1,9 heure	[30]

L'artémisinine et ses dérivés sont utilisés aussi bien dans le traitement du paludisme simple que dans celui du paludisme grave. Ces composés présentent des temps moyens de clairance de la fièvre et de clairance parasitaire respectivement d'environ 14, 6 et 32 heures. Malgré leur très grande activité, la recrudescence parasitaire est fréquente lorsqu'ils sont utilisés en monothérapie au cours du paludisme simple. Cette recrudescence est fonction de la durée de traitement. Un traitement de 7 jours est efficace et peut être indiqué. L'inobservance constatée avec ce schéma de 7 jours a conduit à la recommandation d'un schéma de 3 jours avec les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (voir le sous-chapitre consacré aux CTA). Dans le traitement du paludisme grave, les formes parentérales de l'AT et de l'AS peuvent être utilisées. L'AT est utilisé en IM tandis que l'AS est administré en IM et en IV. De plus, les formes suppositoires de l'AS et de l'ART peuvent être utilisées. Dans les années 1990 beaucoup d'essais cliniques randomisés comparant l'AT à la quinine (QN) dans le traitement du paludisme grave ont été conduits. Ces études n'ont pas permis de montrer une différence significative totale entre l'AT et la QN. Les formulations lipidiques d'AT sont lentement absorbées à partir des sites d'injection intramusculaires tandis que l'AS aqueux est rapidement et efficacement absorbé après injection IM. Dans l'une des plus grandes études randomisées menées sur le traitement du paludisme grave en Asie du Sud-est (travail publié en 2005), l'AS a entraîné une diminution de la mortalité de 22 à 15% (soit une réduction de 35%) [31]. L'AS en IV est actuellement le médicament de choix dans le traitement du paludisme grave en zone de haute transmission.

2.1.3. Toxicité :

Les études cliniques et sur modèles animaux ont montré que les dérivés de l'artémisinine sont beaucoup moins toxiques que les quinoléines [32]. Ce sont des médicaments bien tolérés, les effets secondaires sont bénins et les cas sévères sont encore très rares. Les effets secondaires communément rencontrés sont digestifs : nausées, vomissements et diarrhées qui sont aussi des symptômes caractéristiques du paludisme. Dans bien de cas les effets secondaires ne sont pas distinguables des symptômes du paludisme. Le ténesme a été observé chez 6% des patients traités avec l'ART en suppositoire [33]. Cependant, les expériences réalisées sur modèles animaux ont révélé une toxicité considérable de ces composés.

La neurotoxicité n'est pas un effet secondaire fréquent de l'artémisinine et ses dérivés dans le traitement du paludisme. Il n'est donc pas facile d'attribuer à ces produits des effets neurotoxiques spécifiques. Mais cependant on peut signaler quelques effets neurologiques mineurs et réversibles à savoir : ataxie, nystagmus, troubles de langage et ototoxicité.

Les études cliniques n'ont pas montré d'effets fœtotoxiques avérés liés à la prise de ces médicaments par la femme enceinte. Néanmoins, pour éviter tout danger d'embryotoxicité, l'OMS ne recommande pas l'utilisation de l'ART et ses dérivés pour le traitement du paludisme durant le premier trimestre de la grossesse.

2.2- Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine :

Les récentes décennies ont connu une énorme augmentation du paludisme due à l'émergence de la résistance à la chloroquine. La SP, qui fut introduite après, a malheureusement vite été confrontée à l'apparition de la résistance également. Ainsi, pour protéger le peu de médicaments de l'arsenal thérapeutique actuel, les combinaisons thérapeutiques ont été développées, particulièrement les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). Les caractéristiques pharmacologiques et thérapeutiques avantageuses des dérivés de l'artémisinine ont beaucoup motivé le choix porté sur les CTA.

Les combinaisons thérapeutiques permettent d'avoir des réponses thérapeutiques plus rapides voire améliorer les taux de guérison et de protéger les molécules elles-mêmes contre la résistance. Bien avant l'introduction des CTA, d'autres combinaisons avaient été utilisées avec succès en l'occurrence la quinine-tétracycline, la quinine-doxycycline, la sulfadoxine-pyriméthamine et l'atovaquone-proguanil. La quinine-tétracycline est associée à des effets secondaires très fréquents pouvant entraîner une mauvaise observance voire compromettre l'efficacité du traitement. L'atovaquone-proguanil est donnée en traitement de courte durée mais c'est l'un des médicaments antipaludiques les plus chers au monde.

Les caractéristiques d'une combinaison idéale d'antipaludiques stipulent comme suit :

- les différents composants de la combinaison doivent avoir des modes d'action différents ;
- il ne doit pas y avoir d'interactions négatives entre ces composants ;
- le traitement doit être de court terme (3 jours au plus) ;
- au moins, un des composants doit avoir une action rapide sur les formes asexuées du parasite ;
- au moins, un des composants doit avoir une longue demi-vie (>4 jours) ;
- les drogues doivent être bien tolérées et moins toxiques ;
- elles doivent avoir un large spectre d'activité (y compris l'activité gamétocytocide);
- la coformulation doit être possible et
- le coût de la combinaison abordable.

La diffusion de la résistance à la CQ est telle qu'elle n'est pas actuellement utilisée dans les CTA. Les combinaisons artésunate-Sulfadoxine-Pyriméthamine (AS/SP) et artésunate-amodiaquine (AS/AQ) sont utilisées dans les zones où le parasite est sensible respectivement à la SP et à l'amodiaquine (AQ). Dans les zones de résistance à la SP, CQ et AQ, les combinaisons des dérivés de l'ART avec la luméfantine ou avec la méfloquine sont utilisées. Dans son guide pratique du traitement anti-palustre de 2010 [34], l'OMS recommande cinq CTA pour le

traitement du paludisme non compliqué. Il s'agit de : l'artéméther-luméfantrine, l'artésunate-amodiaquine, l'artésunate-méfloquine, l'artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine et la dihydroartémisinine-pipéraquline. Sauf l'AS/SP, toutes les autres CTA recommandées existent actuellement en combinaisons fixes.

- **L'artésunate – sulfadoxine-pyriméthamine (AS/SP)** : c'est une combinaison libre constituée de comprimés d'artésunate dosés à 50 ou 100mg et de comprimés à 500 mg de sulfadoxine et 25 mg de pyriméthamine. Chez l'adulte, le traitement recommandé consiste à donner 3 comprimés de SP en dose unique et 200mg d'artésunate par jour pendant 3jours. Chez l'enfant, il s'agit donner 1 comprimé de SP en dose unique et 50mg d'artésunate par jour pendant 3jours. Pour la SP, le but du traitement est d'obtenir chez les enfants, des concentrations sanguines approximativement égales à la moitié de celles des adultes. L'AS/SP a été largement testée dans le traitement du paludisme non compliqué chez les enfants et les adultes et a été démontrée suffisamment efficace dans les zones où des taux de guérison avec la SP excèdent les 80% [35]. Cette CTA est surtout utilisée en Amérique du Sud, au Moyen-Orient et en Asie du Sud où la sensibilité à la SP reste toujours élevée.

- **L'artésunate-amodiaquine (ASAQ)**: la formulation libre disponible en blister composée de 50 mg d'artésunate et de 153 mg d'amodiaquine base a été mise au point. La coformulation de cette combinaison développée par le Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) est également disponible. Les comprimés sont dosés à 25/67.5 mg, 50/135 mg ou 100/270mg d'artésunate et amodiaquine respectivement Les doses thérapeutiques recommandées sont comprises entre 2 – 10mg/kg d'artésunate par jour et 7,5 – 15mg/kg d'amodiaquine par jour pendant 3 jours. L'ASAQ a été démontré efficace dans les zones où le taux de guérison à 28 jours avec l'AQ en monothérapie excède les 80% [36]. C'est l'un des deux médicaments de première ligne du traitement du paludisme non compliqué au Mali.

- **L'artéméther-luméfantrine (AL)** : c'est la première combinaison en doses fixes d'un dérivé de l'artémisinine avec un autre composé antipaludique a être adoptée. Cela fut pour la première fois en Chine en 1992. Elle est dispensée en comprimé dosé à 80 mg d'artéméther et 480 mg de luméfantrine. Cette combinaison avait été d'abord utilisée dans un schéma de 4 doses administrées successivement aux heures 0, 8, 24 et 48. Ce traitement de courte durée fut associée à une efficacité insuffisante due à des valeurs pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sous-optimales. En effet, avec ce schéma de 4 doses, les concentrations plasmatiques de luméfantrine durant les 4 à 8 jours après les prises sont insuffisantes pour enrayer définitivement l'infection. Pour améliorer les paramètres pharmacocinétiques notamment l'aire sous la courbe (AUC) ainsi que le taux de guérison, un schéma de 6 doses (soit en doses adultes de 80/480 mg administrées aux heures 0, 8, 24, 36, 48 et 60) a été testé tolérable et plus efficace[37]. L'AL en 6 doses est surtout préférée à l'artésunate-méfloquine dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* multi-résistant. La bonne tolérance et la faiblesse du coût ont fait de cette combinaison une option thérapeutique très appréciée. Cependant, la co-ingestion exigée de matières grasses qui permettent d'améliorer l'absorption de la luméfantrine et la fréquence d'administration complexe (2 doses/jour) de cette combinaison restent des obstacles. Des formes dispersibles et édulcorées pour les enfants ont été lancées en 2008 par Novartis et *Medicines for Malaria Venture* (MMV). A cause de son bon profil de sécurité, ce médicament peut-être

avantageux pour un traitement à long cours chez la femme enceinte [38]. L'AL est adoptée au Mali en tant que médicament de première ligne pour le traitement du paludisme non compliqué.

- **L'artésunate-méfloquine (AS/MQ)**: malgré la résistance à la méfloquine (MQ), la combinaison d'un dérivé de l'artémisinine avec des doses fortes de la MQ est moins susceptible de conduire à la résistance. L'AS/MQ est une combinaison très efficace. Le traitement consiste en un schéma de 4mg/kg d'artésunate par jour plus 25mg/kg de MQ par jour pendant 3 jours. La combinaison AS/MQ a été surtout largement utilisée en Asie du Sud-est et en Amérique du Sud. En 2010, l'OMS a recommandé l'introduction de cette CTA dans le traitement du paludisme simple en Afrique. L'AS/MQ était d'abord disponible sous forme de co-blister mais actuellement, elle existe en combinaison fixe. L'artéméther est également utilisé en combinaison avec la MQ. Les posologies sont les mêmes qu'avec l'AS/MQ.

- **La dihydroartémisinine (10mg)-pipéraquline (80mg) (DHA-PIP)** : c'est une combinaison fixe commercialisée dans certains pays Africains et surtout dans beaucoup de pays Asiatiques sous le nom de Duocotexcin®. L'émergence de la résistance à la pipéraquline a conduit à l'utilisation de ses combinaisons avec les dérivés de l'artémisinine. La plus étudiée de ces combinaisons est la DHA-PIP qui est aujourd'hui l'une des cinq CTA recommandées par l'OMS. Un programme de développement de la forme pédiatrique fut initié. La PIP-DHA est développée en vue de fournir un traitement abordable, court, mieux toléré et efficace contre les parasites multi-résistants. La longue demi-vie de la pipéraquline (23 jours) a suscité une grande préoccupation quant à la possibilité d'entraîner la sélection rapide de résistance. Cependant, la DHA-PIP fournit une longue protection contre la réinfection palustre plus que toutes les autres CTA à cause de la longue demi-vie de la pipéraquline. La plupart des études qui ont montré une bonne efficacité de cette CTA furent conduites en Afrique et dans la sous-région du Grand Mékong.

- **L'artésunate (60mg)-pyronaridine (20mg) (Pyramax)** : il s'agit d'une combinaison fixe employée pour traiter le paludisme non compliqué à *P. falciparum* chez tous les âges (nourrissons, enfants et adultes). C'est également employé pour traiter la phase sanguine de l'infection à *P. vivax*. Le Pyramax est mieux toléré et plus efficace comparativement aux CTA classiques. Quatre grands essais de phase III de cette combinaison ont été menés sur plus de 3 500 patients dans 18 pays d'Afrique sub-saharienne, d'Asie du Sud-est et d'Inde. L'efficacité et la sécurité des formes pédiatriques de cette CTA ont été confirmées chez les enfants de moins de 6 mois. Le pyramax est la première CTA à être approuvée par l'Agence Européenne des Médicaments et surtout pour le traitement du paludisme tant dû à *P. falciparum* qu'à *P. vivax*. Pour le moment, l'OMS recommande l'utilisation possible de ce médicament dans le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* au Cambodge lorsque la résistance à la pipéraquline a été confirmée [39].

Il y a, par ailleurs, d'autres CTA possibles qui doivent être profondément étudiées. Il s'agit entre autres des combinaisons artésunate-chloroprogaunil-dapsone, artésunate-atovaquone-proguanil, DHA-PIP-triméthoprime-primaquine, DHA-PIP-triméthoprime.

L'artésunate-sulfalène-pyriméthamine est une combinaison proche de l'AS/SP qui a montré une très grande efficacité en Afrique. La Sulfalène est une sulfonamide chimiquement proche de la sulfadoxine pour laquelle elle est considérée comme une alternative.

2.3. Médicaments en cours de développement :

Les médicaments antipaludiques sont jusque là considérés comme la clé de voute de la lutte contre le paludisme. L'émergence des parasites résistants à ces produits, pis encore aux plus récents, constitue une source de préoccupations. Cette inquiétude a considérablement marqué l'approche du développement des nouveaux antipaludiques. Le partenariat public-privé *Medicines for Malaria Venture* (MMV) a été une plaque tournante dans cette dynamique. En 2009, 21 projets concernaient soit des médicaments en développement clinique ou soit des produits prêts pour débiter la phase I [40]. En outre, il existe une multitude de projets de développement préclinique et de recherche de nouvelles entités chimiques. Ces médicaments en développement sont principalement conçus contre les stades sanguins de *P. falciparum*. Il est généralement présumé que tous les nouveaux médicaments actifs contre les stades sanguins de *P. falciparum* doivent également l'être contre ceux de *P. vivax*. Il y a seulement trois molécules en cours de développement qui soient actives contre les hypnozoïtes hépatiques de *P. vivax*. Les différents médicaments en cours de développement dans le monde en 2012 se trouvent listés sur les figures 5 et 6

Translational			Development		
Preclinical	Phase I	Phase IIa	Phase IIb/III	Registration	Phase IV
RKA182 Liverpool	DF02 Dilafor	Ferroquine sanofi	ARCO Naphthoquine / Artemisinin	DHA-Piperaquine sigma-tau	Coartem®-D Novartis APPROVED
NPC-1161-B University of Mississippi	Tafenoquine GSK	OZ 439 (Monash/UNMC)	Arterolane/PQP Ranbaxy	Pyramax® Shin Poong/University	ASAQ Winthrop sanofi aventis/DNDi APPROVED
GNF156 Novartis	NITD 609 Novartis	Fosmidomycin Clindamycin Jomaa Pharma GmbH	AZCQ Pfizer	Mefloquine Artesunate Farmaguinhos/DNDi	IV artesunate Guilin APPROVED
MK 4815 (Merck)	CDRI 97-78 Ipca	SAR97276 sanofi aventis	Co-trimoxazole Bactrim Institut of Tropical	Artesunate i.r. WHO/TDR	
AN3661	N-tert butyl isoquine Liverpool School of Tropical Medicine	Methylene Blue AQ Uni. Heidelberg			
	AQ13 Immtech	Artemisone UHKST			

Figure 5 : Arsenal global des antipaludiques de la phase préclinique à la phase IV classés selon l'usage thérapeutique, 1er trimestre de l'année 2011 (source : Medicines for Malaria Venture [41])

Research Lead Opt		Translational			Development		
		Preclinical	Phase I	Phase IIa	Phase IIb/III	Registration	Phase IV
Pyrazoles Drexel	Novartis 2 Projects	MK 4815 (Merck)	Tafenoquine GSK	OZ 439 (Monash/UNM)	AZCQ Pfizer	DHA - Piperaquine sigma-tau	Coartem®-D Novartis
Quinolones USF/VAMC	GSK 2 Projects	GNF156 Novartis	NITD 609 Novartis	Ferroquine sanofi aventis	Arterolane/ PQP	Pyramax® Shin Poong/Univer sity of Iowa	ASAQ Winthrop sanofi aventis/DNDi
Cell based lead Merck/Serono /WHO/TDR	Aminoindole Broad/Genzy	NPC-1161-B University of Mississippi	CDRI 97-78 Ica	Fosmidomycin Clindamycin Jomaa Pharma	Co- trimoxazole Bactrim Institut of Tropical Medicine	Mefloquine Artesunate Farmaguinhos /DNDi	IV artesunate Guilin
Cell base lead Pfizer/WHO/	Imidazolidi nediones WRAIR	RKA182 Liverpool	DF02 Dilafor	Methylene Blue AQ Uni. Heidelberg	ARCO Naphthoqui ne/	Artesunate I.r. WHO/TDR	
	dUTP ase inhibitors	AN3661	N-tert butyl isoquine Liverpool School of				
	Aminopyrid ine LICIT		AQ13 Immtech	SAR97276 sanofi			

Figure6 : Arsenal global des antipaludiques classés de la phase de recherche à la phase de développement (source : Medicines for Malaria Venture [41]).

Pour pallier le problème de résistance, diversifier et renforcer l'arsenal de médicaments antipaludiques, plusieurs approches peuvent être adoptées. Il s'agit de :

- optimiser l'utilisation des antipaludiques existants soit par un système de remplacement/utilisation par rotation ou soit par la réalisation des combinaisons thérapeutiques,
- reconsidérer les médicaments couramment utilisés pour traiter d'autres types de pathologie dans le traitement du paludisme,
- procéder à des modifications sur la structure chimique des composés antipaludiques existants,
- explorer les sources naturelles,
- procéder à une large investigation des divers répertoires chimiques,
- rechercher des antipaludiques à travers l'exploration du génome parasitaire.

Ces différentes approches commencent à générer des résultats qui donnent de l'espoir pour le traitement du paludisme.

3- Résistance aux antipaludiques :

Pendant des décennies, la résistance aux antipaludiques a été l'un des obstacles majeurs dans la lutte contre le paludisme. De nos jours, la résistance est documentée pour trois des cinq espèces de *Plasmodium* pathogènes pour l'homme. Il s'agit de *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae*. La figure7 illustre l'historique de l'introduction des différents antipaludiques et l'apparition des résistances parasitaires.

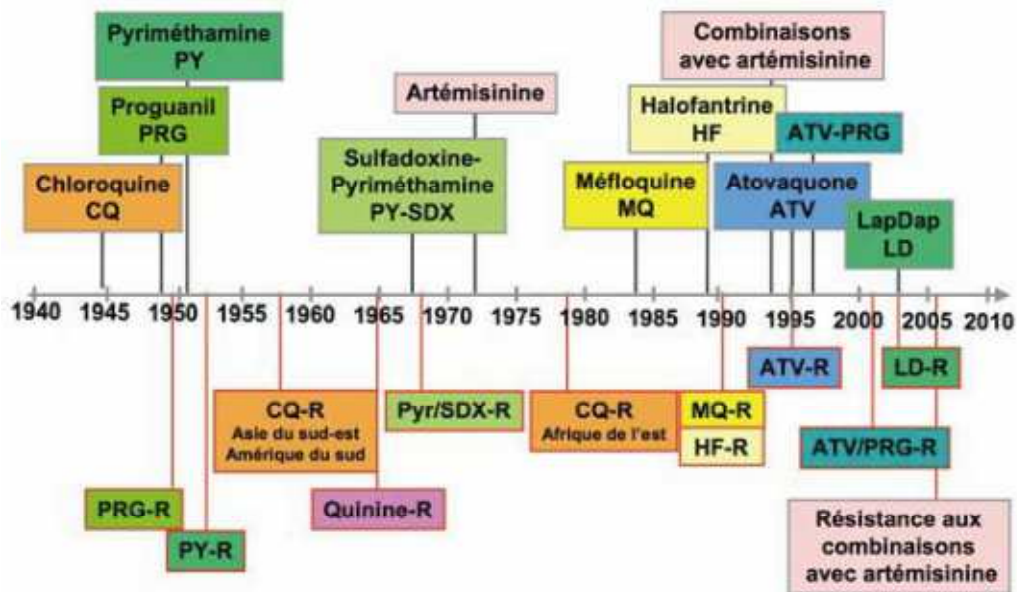


Figure7 : Introduction des antipaludiques et apparition des résistances (R) de *P. falciparum* [42].

L'évolution de la résistance aux antipaludiques change considérablement l'épidémiologie mondiale du paludisme quant au poids de la maladie, au coût économique, au changement dans la distribution des espèces plasmodiales et à l'accès au traitement de bonne qualité (voir tableau3).

Tableau III : Impact de la résistance aux antipaludiques sur la lutte mondiale contre le paludisme (source : OMS 2011[5]).

<p>Poids de la maladie</p>	<ul style="list-style-type: none"> • L'apparition de la chloroquinorésistance en Afrique a conduit à l'augmentation des admissions hospitalières [43]. • Une augmentation du taux de mortalité a été constatée au niveau communautaire suite à la chloroquinorésistance [44] • Le traitement inefficace entraîne l'anémie et le faible poids de naissance [45] rendant la santé des enfants et des adultes infectés par <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i> très fragiles. • La résistance aux antipaludiques est associée à une augmentation de la transmission palustre [46]
<p>Coût économique</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La résistance aux antipaludiques a augmenté le coût mondial de la lutte contre la maladie, y compris le coût de développement des nouveaux médicaments [47] • L'échec thérapeutique exige des consultations au centre de santé pour davantage de diagnostic et de traitement, entraînant ainsi une perte des jours de travail pour les adultes, un absentéisme scolaire des enfants et une élévation des coûts de la santé [48]
<p>Changement dans la distribution des espèces plasmodiales</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Le niveau du paludisme à <i>P. falciparum</i> a changé et on note une augmentation de <i>P. vivax</i> [49].
<p>Accès au traitement de bonne qualité</p>	<ul style="list-style-type: none"> • L'inefficacité des traitements au niveau des structures publiques pourrait conduire à une grande dépendance des patients aux structures privées irrégulières, ce qui peut favoriser l'utilisation des monothérapies, des médicaments illicites et contrefaits pouvant entraîner ainsi une augmentation du risque de résistance.

3.1. Définitions :

3.1.1- Résistance aux drogues antipaludiques :

En 1967, l'OMS a défini la résistance aux médicaments antipaludiques comme étant « la capacité du parasite à survivre ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un médicament donné en des doses supérieures ou égales à celles habituellement recommandées mais dans les limites de la tolérance du sujet » [50]. Cette définition fut modifiée par l'addition de la phrase suivante : « la forme active du médicament doit-être capable d'atteindre le parasite ou le globule rouge parasité pendant la durée de temps nécessaire à son action » [51]. Ce qui tient en compte les mécanismes des sulfonamides et des prodrogues.

Du fait de leur mode d'action complexe, la définition de la résistance aux dérivés de l'artémisinine suscite beaucoup de discussion et demande autant de clarification. Plusieurs définitions ont été proposées et chacune d'elles est utile pour des raisons diverses, tel que par exemple pour l'élaboration des politiques de lutte ou pour la détermination des questions de recherche spécifiques.

Uniquement, les patients présentant les critères suivants peuvent être considérés comme ayant une infection palustre résistante aux dérivés de l'artémisinine :

- en cas de monothérapie, la persistance des parasites après 7 jours de traitement ou leur recrudescence dans les 28 jours après le début du traitement,
- une concentration plasmatique normale de dihydroartémisinine,
- une prolongation du temps de clairance parasitaire et
- une réduction de la sensibilité *in vitro* des parasites à la dihydroartémisinine [52].

Pour Dondorp *et al.* [9], la résistance aux dérivés de l'artémisinine se définit par une prolongation nette du temps de clearance parasitaire. Une autre définition utilisée se base sur les critères suivants :

- une augmentation du temps de clearance parasitaire observée dans plus de 10% des cas avec des parasites détectables au jour 3 après traitement avec une CTA (suspicion de résistance) ou
- un échec thérapeutique après monothérapie *per os* avec une concentration sanguine adéquate du dérivé de l'artémisinine, cet échec étant déterminé par la persistance des parasites après 7 jours de traitement ou par la présence des parasites au jour 3 avec une recrudescence dans les 28/42 jours (confirmation de résistance).

3.1.2- Echec thérapeutique :

L'échec thérapeutique est défini comme étant une incapacité à enrayer la parasitémie ou les symptômes cliniques de la maladie malgré l'administration d'un médicament antipaludique. Cet échec n'est pas forcément dû à une résistance au médicament. Beaucoup d'autres phénomènes peuvent y contribuer, principalement les facteurs qui limitent la concentration du médicament dans l'organisme. Ces facteurs comprennent le dosage incorrect du médicament, la mauvaise observance de la dose ou de la durée du traitement, la mauvaise qualité du médicament et les interactions médicamenteuses négatives. Des variabilités interindividuelles en termes pharmacocinétiques peuvent conduire à un échec thérapeutique à cause d'une faible absorption du médicament, d'une élimination trop rapide (diarrhées ou vomissements) ou d'une faible biotransformation des prodrogues.

3.1.3- Marqueurs moléculaires de résistance :

Ce sont des gènes parasites dont les modifications sont associées à la résistance aux antipaludiques. La caractérisation de ces gènes par les techniques moléculaires constitue un moyen prometteur pour étudier les résistances aux antipaludiques. Les modifications de gènes incriminés sont généralement des mutations de bases et des changements du nombre de copies.

3.2. Efficacité et résistance aux antipaludiques :

Le développement d'une résistance parasitaire à un médicament peut s'effectuer en deux phases. En premier lieu, un événement génétique se produit antérieurement au traitement et donne un phénotype parasitaire nouveau qui possède l'aptitude de survivre en présence du médicament. En second lieu, ce phénotype parasitaire est sélectionné par le traitement puis se

multiplie pour aboutir éventuellement à une population parasitaire entièrement résistante au traitement. Les événements génétiques à l'origine des résistances parasitaires aux antipaludiques sont spontanés et rares. Ils se produisent au hasard et indépendamment des médicaments. Ces événements sont caractérisés par des mutations géniques ou par des changements du nombre de copies des gènes qui déterminent la cible du médicament ou les pompes membranaires qui régulent la concentration du médicament à l'intérieur du parasite. Un seul événement peut suffire pour engendrer une résistance mais souvent plusieurs événements indépendants peuvent être nécessaires.

Quand le parasite est exposé à une concentration insuffisante du médicament, cela peut favoriser la sélection du mutant résistant. Le médicament en concentration inadéquate ne peut tuer uniquement que les parasites qui en sont sensibles.

Lorsque les parasites résistants sont sélectionnés par rapport aux sensibles, il est difficile de prévenir leur expansion. La soustraction de la pression thérapeutique peut réduire la chance de survie des mutants résistants du fait du « *fitness cost* » de leur mécanisme de résistance [53]. Leur expansion est facilitée par l'administration des médicaments à longue durée d'élimination. L'activité antipaludique résiduelle qui persiste après le traitement sert de « filtre sélectif », lequel prévient toute infection par les parasites sensibles mais laisse développer les parasites résistants. Les médicaments comme la CQ, la MQ et la PIP qui persistent dans le sang pendant des mois fournissent un filtre sélectif très durable après l'arrêt de leur administration [54].

Sur des modèles expérimentaux (*in vitro*, animaux ou sur volontaires), des parasites résistants ont pu être sélectionnés sans intervention vectorielle, c'est-à-dire sans la recombinaison méiotique, après avoir exposé un grand nombre de parasites à des concentrations de drogue en deçà des seuils thérapeutiques.

Pour venir à bout de la recrudescence ou de la transmission des parasites résistants, un traitement précoce et approprié doit être administré pour prévenir la production des gamétocytes.

Les facteurs qui influent sur l'émergence et la diffusion des parasites résistants sont nombreux. On peut citer entre autres [55,56] :

- la fréquence intrinsèque avec laquelle les changements génétiques se produisent ;
- le degré de résistance conféré par le changement génétique ;
- le *fitness cost* du mécanisme de résistance ;
- la proportion de tous les agents infectieux transmissibles exposés à la drogue (pression sélective) ;
- le nombre de parasites exposés à la drogue ;
- les concentrations de la drogue auxquelles les parasites sont exposés
- la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des médicaments antipaludiques ;
- les problèmes liés à l'utilisation des médicaments aux plans individuel (dosage, durée, observance) et communautaire (qualité, disponibilité, distribution) ;
- le profil immunitaire aux niveaux communautaire et individuel ;
- la présence simultanée d'autres médicaments antipaludiques dans le sang auxquels le parasite n'est pas résistant et
- l'intensité de la transmission palustre.

3.2.1- Efficacité clinique des dérivés de l'artémisinine [4] :

Les commentaires suivants portent principalement sur la méta-analyse effectuée par l'OMS sur les études d'efficacité des antipaludiques dans le monde de 2000 à 2010 [4]. Dix-sept études menées au Mali faisaient partie de cette analyse. Ce résumé concerne principalement l'infection palustre à *P. falciparum*.

- Monothérapies :

L'analyse de 10 études d'efficacité de l'artéméther, l'artésunate et la dihydroartémisinine en administration orale de 5 jours a révélé un taux d'échec thérapeutique de 15% en Chine et au Viet Nam. Par contre, l'analyse de 18 études des mêmes produits utilisés en traitement oral de 7 jours a montré un taux d'échec de 3% dans ces deux

pays. Ces différents résultats sont en accord avec les essais cliniques réalisés dans les années 1970 où le schéma de 3 jours a donné un taux de recrudescence de 48%. Lorsque ce schéma a été porté à 5 et 7 jours le taux est descendu respectivement à 10% et 2%. Ces recrudescences s'expliquent par la très courte demi-vie de l'artémisinine et ses dérivés. Ces composés ne sont efficaces en monothérapie que lorsque le traitement s'effectue sur une longue durée. En cas de traitement incomplet ou court, les parasites sont exposés à des doses inadéquates du médicament. Cela peut favoriser l'apparition des résistances bien que la courte demi-vie de ces médicaments réduit la fenêtre de sélection des parasites résistants. Les échecs thérapeutiques constatés avec l'artésunate en monothérapie orale seraient dus à une parasitémie pré-thérapeutique très élevée et non pas seulement à une baisse de sensibilité des parasites [57].

Tout comme la QN, on constate souvent avec les dérivés de l'artémisinine une augmentation de parasitémie au début du traitement *per os* [58]. Chez les personnes immunodéprimées ou souffrant d'hémoglobinopathies, la réponse au traitement peut prendre excessivement du temps [59-61].

- Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) :

Pour maximiser l'efficacité de l'artémisinine et ses dérivés et pour les protéger contre l'apparition des résistances, l'OMS recommande qu'ils soient combinés avec d'autres molécules dont les critères ont été discutés plus haut. Ces combinaisons ont permis de raccourcir la durée de traitement avec les dérivés de l'artémisinine et de réduire par la suite le risque d'échecs thérapeutiques dus à une mauvaise observance. Les combinaisons fixes sont préférables à cause de leur facilité d'utilisation et de leur bonne observance. Le choix des CTA comme traitement de première ou de seconde ligne doit être guidé par les résultats des études d'efficacité au niveau local.

L'analyse portant sur 209 études d'efficacité de l'**artéméther-luméfantrine (AL)** menées dans 48 pays entre 2001 et 2009 a montré que sur 85% des études réalisées en Afrique, les taux d'échec thérapeutiques étaient < 5%. Le reste des études menées sur le continent Africain ont affiché des taux d'échec compris entre 8 et 10% exceptés seulement deux études conduites au Ghana (2006) et au Burkina Faso (2008) qui ont montré des taux >10%. Au Mali, entre 2004 et 2008, ce taux d'échec était compris entre 0.0-6.0% avec une médiane de 3.0%. Les études menées dans la grande partie du continent Asiatique ont rapporté des taux d'échec de l'AL généralement < 6%. Entre 2004 et 2009, dans la plupart des études menées en Birmanie, le taux

médian d'échec thérapeutique était de 2,5%. Au Cambodge, on a enregistré des taux d'échec de 26,1% en 2001 ; 28,9% en 2002 et par contre en 2003 lorsque la prise de l'AL a été associée avec la consommation d'aliments gras, ce taux est descendu à 13,5% [62]. Des analyses supplémentaires ont démontré qu'au jour 7 la concentration plasmatique moyenne en luméfantine était plus élevée chez les patients présentant des réponses cliniques et parasitologiques adéquates (~860ng/ml) que chez ceux qui ont connu des échecs thérapeutiques (~510ng/ml). Des auteurs suggèrent que certains cas d'échec seraient dus à une faible concentration sanguine de la drogue partenaire (c'est-à-dire la luméfantine dont la pharmacocinétique présente une grande variabilité interindividuelle). En raison de la possibilité de résistance croisée entre la méfloquine et la luméfantine, l'émergence de la résistance à la luméfantine est envisageable. En définitive, l'AL reste très efficace dans la plus grande partie des régions du monde excepté le Cambodge. Il fut rapporté que l'AL sélectionne l'allèle *Pfmdr1* Asn86 type sauvage dans les infections récurrentes, ce qui peut être considéré comme un marqueur de faible sensibilité à la luméfantine. Les études d'efficacité thérapeutique de l'AL doivent être complétées par la mesure de la concentration de la luméfantine dans le sang au jour 7 et par l'analyse du polymorphisme de *Pfmdr1*.

L'efficacité de l'**artésunate-amodiaquine (ASAQ)** est hétérogène en Afrique, ce qui est probablement dû à la préexistence de la résistance à l'amodiaquine [63]. Sur les 23 pays Africains qui ont adopté l'ASAQ comme traitement de première ligne (selon les données OMS de 2010) 6 ont rapporté entre 2000 et 2009 des taux d'échec thérapeutique > 10%. Également, en Indonésie, des études ont montré des taux d'échec > 10%. Au Mali, entre 2002 et 2006, les études d'efficacité de l'ASAQ ont montré des taux d'échec variant de 0,0 à 7,6% avec une médiane de 2,0%.

L'analyse portant sur 80 études d'efficacité de l'**artésunate-méfloquine (AS/MQ)** – administrée à la dose de 25 mg/kg/jour de MQ et de 12 mg/kg/jour d'AS pendant 3jours – effectuées dans 17 pays entre 2000 et 2010 montrent que les taux d'échec étaient < 10% en 28 jours de suivi. Quelques études menées au Cambodge et en Thaïlande durant cette période font exception à ce résultat. En effet, 9 essais conduits entre 2002 et 2010 au Cambodge, en Thaïlande et en Birmanie ont montré des taux d'échec compris entre 8,8 et 14%. Par ailleurs, des taux d'échec thérapeutique de plus de 12 et 20% ont été rapportés respectivement en Thaïlande et au Cambodge au cours des protocoles de 42 jours de suivi. Les analyses suggèrent que les taux élevés d'échec thérapeutique enregistrés au Cambodge (dans la province de Pailin) dans les années 2002-2004 étaient dus à la résistance à la MQ. En Afrique et en Amérique, l'AS/MQ reste très efficace. Les échecs sont principalement rencontrés dans les zones de haute prévalence de la résistance à la MQ. Du fait de la longue demi-vie de la MQ, la combinaison AS/MQ est testée efficacement selon un protocole de 42 jours de suivi.

Selon les essais conduits entre 2000 et 2008, les taux d'échec thérapeutique de l'**artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine (AS/SP)** restent bas en Amérique, au Moyen-Orient, en Asie Centrale et du Sud et en Afrique de l'Est, principalement dans les pays utilisant cette combinaison comme traitement de première ligne. Dans ces pays, le taux médian d'échec était de 0-1,5%. La très grande efficacité de cette combinaison pourrait être due en partie à la rareté des quintuples mutants parasitaires *Pfdhps* (A437G/K540E) et *Pfdhfr* (S108N/N51I/C59R).

Cependant, des taux élevés d'échec thérapeutique liés à cette combinaison ont pu être observés dans plusieurs pays Africains où la résistance à la SP est élevée. Au Mali, 2 études menées entre 2002 – 2006 ont rapporté des taux d'échec thérapeutique variant de 0,0 à 3,2% avec une médiane de 1,6%.

Presque toutes les études menées sur la combinaison **artésunate-sulfalène-pyriméthamine** ont montré une très grande efficacité de ce médicament. Au Mali, c'est un taux d'échec de 0,0% qui a été observé dans les 2 études réalisées entre 2003 et 2007 sur cette combinaison.

Beaucoup d'essais ont été conduits en Afrique et en Asie du Sud-est pour évaluer l'efficacité et la tolérance de la **dihydroartémisinine-pipéraquline (DHA/PIP)**. L'analyse de 49 études réalisées sur cette combinaison (donnée en 3 doses égales sur 3 jours ou en double dose au jour 1 et dose unique aux jours 2 et 3) a montré que les taux d'échec thérapeutique étaient < 10% (protocoles de 28 jours de suivi) dans toutes les études sauf une seule menée au Rwanda en 2004. En élargissant la durée du suivi à 42 jours, des taux d'échec de 9,1 – 12% ont pu être enregistrés au Burkina Faso, au Cambodge, en Mozambique, en Papouasie-Nouvelle-Guinée et en Ouganda. Après une large utilisation de la PIP en Chine, la résistance est apparue et a conduit à l'utilisation de cette drogue en combinaison thérapeutique [64]. Comme avec l'AL, le déterminant essentiel de l'échec parasitologique avec la DHA/PIP est la concentration plasmatique en pipéraquline au jour 7 du suivi. A cause de la longue demi-vie de la pipéraquline, l'efficacité de la DHA/PIP est mieux étudiée selon un protocole de 42 jours de suivi.

Huit essais de phases II et III sur la combinaison **artésunate-pyronaridine** conduits en Afrique et Asie entre 2006 et 2008 ont montré des taux d'échec thérapeutique de 0 – 0,5%. Au Mali, dans une étude menée entre 2007 et 2008, c'est un taux d'échec de 0,0% qui a été rapporté.

Les études cliniques ont montré que les CTA ont une action plus rapide sur l'infection à *P. vivax* que la CQ. Des taux élevés de guérison ont été observés dans beaucoup de pays avec les combinaisons AL, AS/SP et DHA/PIP. Dans l'infection à *P. falciparum*, l'action rapide de l'artémisinine et de ses dérivés limite le développement des gamétocytes mais par contre ils ont un effet très peu significatif sur la transmission de *P. vivax* car ses gamétocytes peuvent exister bien avant le début du traitement [65]. Les CTA sont recommandées dans le traitement de *P. vivax* soit en cas de résistance à la CQ ou dans les zones où elles ont été adoptées comme traitement de première ligne contre *P. falciparum*.

La résistance de *P. ovale* et de *P. malariae* aux antipaludiques est moins bien caractérisée. Ces parasites sont généralement très sensibles à la CQ. *P. knowlesi* en est également sensible en Malaisie [66]. En général, les CTA ne sont pas préconisées contre ces espèces.

3.2.2- Situation de la résistance à l'artémisinine et ses dérivés [4]:

La baisse de la sensibilité à l'artémisinine varie largement à travers la sous-région du Grand-Mékong. La plus grande preuve d'une forte diminution de la sensibilité à l'artésunate (AS) a été observée au Nord-est du Cambodge, à la frontière avec la Thaïlande où les proportions de patients restés parasités après 3 jours de CTA ou après l'AS en monothérapie orale étaient les plus élevées jamais rapportées. Dans la ville de Pailin au Cambodge, la proportion de patients

parasités après 3 jours de traitement avec la combinaison DHA/PIP a augmenté de 26 à 33% entre 2008 et 2009. A Pailin et à Tassanong (une autre ville Cambodgienne), plus de 40% des patients étaient parasités au jour 3 malgré 2-4mg/kg/jour d'AS en monothérapie orale. Quelques cas d'échec thérapeutique tardif avec des concentrations plasmatiques normales d'AS ou de DHA et avec des sensibilités *in vitro* réduites à la DHA ont été enregistrés dans ces deux localités du Cambodge. En outre, les analyses ont montré qu'au niveau de la frontière Cambodgio-thaïlandaise le retard de la clairance parasitaire est dû à des changements génétiques du parasite et suggèrent que ce phénomène pourrait se propager des foyers originaux vers les populations parasitaires voisines si rien n'est fait [67]. En Thaïlande, une étude longitudinale a fait état d'une évolution du temps de clairance parasitaire de 2,6 heures en 2001 à 3,7 heures en 2010 après traitement avec l'artésunate [10]. Cette étude a concerné les patients hyperparasités qui ont été traités avec un schéma d'artésunate *per os* en 7 jours combiné soit avec la méfloquine ou la doxycycline ou soit avec la clindamycine en 7 jours. Depuis avril 2012, L'OMS a annoncé la présence d'un foyer de baisse de sensibilité aux dérivés de l'artémisinine au Vietnam [39]. Ce foyer fut détecté dans la province de Gia Lai au cours d'une évaluation de routine. Le taux de patients parasités au jour 3 y était de 18% après traitement avec la DHA-PIP. Au niveau de la frontière Birmano-thaïlandaise la proportion de patients restés parasités après un traitement de 3 jours avec les CTA était de 10-20%. Sur la frontière Sino-birmane, les études sur l'artésunate en monothérapie orale ont montré que 25% des patients étaient parasités au jour 3.

Cependant, le taux d'échec thérapeutique avec l'artésunate reste faible malgré la proportion élevée des patients parasités au jour 3. En effet, malgré que le pourcentage de patients parasités au jour 3 soit >50% au jour 3 à Pailin et 25% sur la frontière Sino-birmane, le taux d'échec avec l'artésunate en monothérapie orale de 7 jours était <10% à l'issue de 28-63 jours de suivi au Cambodge, en Thaïlande, et sur la frontière Sino-birmane. A ce stade, il est difficile de savoir si la résistance à l'artémisinine et ses dérivés va se limiter seulement à l'augmentation des cas de retard de la clairance parasitaire et du taux de portage gamétocytaire ou si elle va conduire à des taux élevés d'échec thérapeutique tardifs.

Il faut signaler que dans l'étude où les taux d'échec thérapeutique étaient > 30% à Pailin avec l'AS en 7 jours, la taille de l'échantillon était faible et des parasitémiées > 200 000/μl étaient incluses alors que la recommandation de l'OMS est de 100 000/μl en zone de basse transmission. En plus, certains patients dans cette étude présentant des échecs thérapeutiques tardifs avaient une faible concentration sanguine d'AS ou de DHA.

Somme toute, ces constats indiquent un changement clair dans la sensibilité des parasites à l'artémisinine et ses dérivés.

Ce changement de sensibilité se manifeste par un retard de la clairance parasitaire. Le retard de clearance est, de nos jours, le marqueur phénotypique le plus couramment évoqué dans la résistance à l'artémisinine et ses dérivés.

Les dérivés de l'artémisinine restent très efficaces au Mali. La proportion de patients dépourvus de parasitémie au jour 1 a varié de 31,9% en 2002-2004 à 37,0% en 2010-2011 dans la localité de Bougoula-Hameau, région de Sikasso [68].

4- Méthodes d'étude de l'efficacité des antipaludiques :

4.1. Test *in vivo* :

Cet essai consiste à traiter les malades symptomatiques infectés par le parasite du paludisme avec des doses standards d'un antipaludique et à suivre l'évolution de la parasitémie, des signes cliniques et des paramètres biologiques sur une période définie. Il permet d'analyser l'efficacité clinique d'un médicament antipaludique. C'est une méthode simple et exige peu de formation sauf pour les observations microscopiques. Egalement, elle nécessite peu d'équipements et de fournitures. L'OMS a établi depuis 1964 un protocole pour la mise en œuvre de ce test qui fut successivement amendé en 1967, 1972, 1996, 2001 et 2009. Les différentes parties qui composent ce protocole à savoir : les critères d'inclusion et d'exclusion, le calcul de la taille de l'échantillon, la durée du suivi, les critères d'évaluation, l'analyse et la gestion des données, les considérations éthiques et le contrôle de qualité ont été largement décrites par l'OMS dans le document *Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy* [69].

En effet, le malade est d'abord examiné sur le plan clinique et biologique pour permettre son inclusion à l'étude. Ensuite, il est mis sous un traitement antipaludique selon une posologie standard et suivi pendant une durée définie par la nature du traitement utilisé. Avant l'inclusion du patient et à chaque jour ou heure du suivi, des prélèvements sanguins et/ou d'urines sont effectués pour permettre de suivre l'évolution de la parasitémie et du taux d'hémoglobine, mesurer la concentration de la drogue ou ses métabolites et pour réaliser des analyses moléculaires ou des tests *in vitro*. Lors du suivi, les données du patient sont portées dans un cahier d'observation. Une durée de suivi de 28 jours est adéquate pour étudier l'efficacité de la plupart des antipaludiques notamment celles qui ont des demi-vies inférieures à 7 jours à savoir : l'amodiaquine, l'artémisinine et ses dérivés, l'atovaquone-proguanil, la chloroquine, l'halofantrine, la luméfantrine, la quinine et la sulfadoxine-pyriméthamine. Pour les médicaments à demi-vies plus longues comme la méfloquine et la pipéraquline, il faut au moins un suivi de 42 jours. Etant donné que la plupart des échecs dans les études cliniques des CTA surviennent après le jour 21, la durée minimum de suivi doit être de 28 jours.

L'OMS classe les réponses au traitement en plusieurs types standards qui sont applicables à tous les niveaux de transmission palustre. Ils sont définis comme suit:

- Echec thérapeutique précoce :

- signes de danger ou paludisme grave au jour 1, 2 ou 3 avec parasitémie ;
- parasitémie au jour 2 plus élevée que celle du jour 0 quelque soit la température axillaire ;
- parasitémie au jour 3 avec température axillaire $\geq 37,5$ °C et
- parasitémie au jour 3 $\geq 25\%$ de celle du jour 0.

- Echec clinique tardif :

- signes de danger ou paludisme sévère avec parasitémie entre les jours 4 et 28 (ou 42) chez les patients qui n'avaient au préalable présenté aucun critère d'échec thérapeutique précoce et
- parasitémie entre les jours 4 et 28 (ou 42) avec température axillaire $\geq 37,5$ °C chez les patients qui n'avaient au préalable présenté aucun critère d'échec thérapeutique précoce.

- **Echec parasitologique tardif :**
- parasitémie entre les jours 7 et 28 (ou 42) avec température axillaire < 37,5 °C chez les patients qui n'avaient au préalable présenté aucun critère d'échec thérapeutique précoce ou d'échec clinique tardif.
- **Réponse clinique et parasitologique adéquate :**
- absence de parasitémie au jour 28 (ou 42), quelque soit la température axillaire chez les patients n'ayant au préalable présenté aucun critère d'échec thérapeutique précoce, d'échec clinique tardif ou d'échec parasitologique tardif.

Lorsqu'il y a échec thérapeutique au cours du suivi d'un patient, le génotypage des parasites par une technique de PCR qualitative est pratiqué sur les confettis sanguins effectués pour trancher entre recrudescence et réinfection parasitaire. Les marqueurs couramment utilisés pour différencier les clones parasites sont les gènes *msp1*, *msp2*, *glurp* et souvent des microsatellites.

Sur les échantillons sanguins prélevés lors du suivi des sujets à des intervalles de temps définis, on peut mesurer la parasitémie soit par microscopie ou soit par PCR quantitative en temps réel pour évaluer la clearance parasitaire. Les temps de clearance parasitaire, les ratios de réduction de la parasitémie et la proportion de gouttes épaisses positives au jour 3 sont autant de paramètres importants pour évaluer l'efficacité des antipaludiques, particulièrement les CTA.

L'essai *in vivo* est la méthode de référence pour évaluer et suivre l'efficacité d'un antipaludique mais cependant ses résultats doivent être considérés avec prudence.

En effet, les limites de cette méthode peuvent conduire à des résultats qui ne traduisent pas l'efficacité réelle d'un médicament. Le système immunitaire, la prise antérieure de médicament, les variabilités pharmacocinétiques (absorption, métabolisme) peuvent interférer sur les résultats. Les échecs thérapeutiques peuvent ne pas refléter nécessairement le niveau réel d'une vraie résistance. En outre, il y a souvent un problème de classification entre cas de réinfection et de recrudescence parasitaire. Par ailleurs, de nombreuses difficultés se posent pour conduire ce test dans les zones de faible transmission palustre car le nombre de patients éligibles est limité. On constate également une surestimation des échecs thérapeutiques précoces pour les médicaments à action lente. Les nombreux cas d'adaptations et de modifications locales de ce test peuvent entraîner des comparaisons biaisées entre différentes localités. Enfin, la durée du suivi des patients peut entraîner d'important cas de pertes de vue.

Les résultats de l'essai *in vivo* doivent être complétés par ceux des autres tests.

4.2. Test *in vitro* :

Depuis le début du 20^{ème} siècle, l'activité des antipaludiques était étudiée sur les parasites en culture. Les méthodes utilisées étaient liées à d'énormes problèmes techniques et de précision. Il a fallu attendre la maîtrise de la culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum* par Trager et Jensen en 1976 [70] pour que l'étude de l'activité *in vitro* des antipaludiques se développe. Les différents tests *in vitro* actuellement utilisés sont basés sur la technique de Trager et Jensen.

Le principe d'un test *in vitro* consiste à mesurer la sensibilité intrinsèque du parasite *P. falciparum* aux antipaludiques en des concentrations définies. Les parasites sont exposés à des

concentrations précises et croissantes de médicament dans un milieu de culture et au bout d'une période d'incubation donnée, l'effet d'inhibition du médicament est observé sur la maturation des parasites en schizontes. Cet effet est mesuré soit par l'observation microscopique des parasites à partir du milieu de culture ou soit par des méthodes radio-isotopiques, immuno-enzymatiques ou fluorimétriques permettant de quantifier la croissance parasitaire.

Ce test est généralement réalisé sur une plaque à multiples puits. Plusieurs tests peuvent être effectués avec le même échantillon de parasites et plusieurs médicaments antipaludiques et même ceux qui sont en phase d'expérimentation précliniques peuvent être testés à la fois. Pour chaque produit, une gamme de concentrations peut être préparée et testée. Contrairement à l'essai *in vivo*, le test *in vitro*, basé sur le contact direct du médicament avec le parasite, permet de contourner les facteurs liés à l'hôte qui biaisent l'interprétation de la sensibilité du parasite.

Cependant, ce test est complexe, coûteux et nécessite des moyens techniques importants. La grande difficulté qui se pose est qu'il existe plusieurs variantes du test *in vitro* dont les résultats ne sont pas toujours comparables. En outre, pour le même type de test, les résultats sont difficiles à comparer à cause des différences entre les laboratoires ou entre les lectures. Des exemples de tests sont : le Mark III Test de l'OMS, le test radio-isotopique développé pour la première fois par Desjardins *et al.* en 1979 [71], le test ELISA avec des anticorps dirigés contre la lactate déshydrogénase ou l'*Histidine-rich protein* et le test fluorométrique avec fluorochromes liant l'ADN.

Les résultats sont exprimés par la concentration inhibitrice 50 (ou CI_{50} , concentration nécessaire pour inhiber 50% de la population parasitaire), la concentration inhibitrice 90 (ou CI_{90} , concentration nécessaire pour inhiber 90% de la population parasitaire) ou la concentration minimale inhibitrice (CMI). Ces paramètres dépendent d'une dizaine de facteurs comme par exemples la fraction du volume globulaire, la parasitémie initiale, le volume distribué dans les puits qui sont généralement différents selon les laboratoires. Les résultats sont en effet déterminés sous forme de moyennes géométriques de CI_{50} , CI_{90} ou CMI plutôt qu'en termes de pourcentage de résistance *in vitro*.

Il existe un problème de corrélation entre les résultats des essais *in vivo* et *in vitro* qui est dû surtout aux facteurs liés à l'hôte dans les essais *in vivo*.

Un isolat parasitaire peut contenir un mélange de différents phénotypes de sensibilité qui peut masquer la mise en évidence des résistants. En plus des difficultés d'adaptation des parasites à la culture *in vitro* en général, les parasites prélevés chez un patient récemment traité avec un antipaludique sont particulièrement difficiles à cultiver et présentent une CI_{50} diminué dû à la présence du médicament dans le sang. Ce phénomène permet d'exclure du test une importante quantité d'échantillons. Egalement, avec la méthode radio-isotopique, des parasitémies $< 0,1\%$ sont éliminées. Les techniques utilisant les anticorps monoclonaux sont assez sensibles pour détecter des parasitémies de l'ordre de $0,01\%$. La sensibilité des techniques fluorométriques comme le Syber green I sont en cours d'étude, mais l'important bruit de fond constaté, dû à la présence de l'ADN humain pourrait limiter l'utilisation de cette méthode pour tester les échantillons sur le terrain.

Le test *in vitro* peut également être utilisé pour étudier l'action synergique, additive ou antagoniste de deux médicaments sur un clone parasitaire de référence.

Plusieurs tests *in vitro* pour *P. vivax* ont été étudiés mais la meilleure méthode reste encore à déterminer.

4.3. Techniques moléculaires :

Elles consistent à détecter les mutations génétiques qui modifient les cibles, les fonctions de transport des médicaments ou leurs affinités. En d'autres termes, elles permettent d'identifier les résistances aux médicaments associées à des mutations, au niveau d'amplification des gènes ou à des SNP et microsatellites parasitaires utilisés comme marqueurs. Ce sont des moyens qui permettent d'alerter précocement la résistance aux antipaludiques dans une localité. Les techniques courantes consistent à faire des prélèvements sanguins sur des confettis de papier buvard avec lesquels l'ADN parasite est extrait pour la réalisation des expériences de PCR quantitative ou qualitative axées sur les gènes suspects à étudier.

Ce sont des techniques fiables. Un même confetti peut servir, à la fois, à caractériser les marqueurs moléculaires pour plusieurs médicaments différents. Les prélèvements sont très simples à effectuer, ils peuvent être facilement transportés et conservés pendant très longtemps. Les techniques moléculaires sont indépendantes des facteurs humains et environnementaux et n'utilisent qu'une faible quantité de prélèvement sanguin.

Cependant, la corrélation des résultats de ces techniques avec ceux des essais *in vitro* n'est pas suffisamment établie. Une technique moléculaire exige des équipements chers et requiert une qualification spécifique. L'approche est limitée par la possibilité d'avoir une population parasite mixte avec des allèles mixtes. L'allèle de la population parasite résistante peut être minoritaire et passer en deçà de la limite de sensibilité des techniques de PCR lors des analyses pré ou post-thérapeutiques. En outre, les marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* sont connus seulement pour un nombre limité de médicaments antipaludiques. Il faut davantage de recherche pour identifier des marqueurs moléculaires de résistance à certains antipaludiques notamment les dérivés de l'artémisinine.

Actuellement, les marqueurs moléculaires de résistance qui ont une association *in vivo* validée sont : le *chloroquine resistance transporter (Pfcr1)* associé à la résistance à la chloroquine, la *dihydrofolate reductase (Pfdhfr)* associée à la résistance à la pyriméthamine et au proguanil (cycloguanil), la *multidrug resistance 1 protein (Pfmdr1)* associée à la résistance à la méfloquine et à la luméfantrine, la *dihydropteroate synthetase (Pfdhps)* et la *multidrug resistance-associated protein (Pfmrp)* associées à la résistance à la sulfadoxine et le Cytochrome b (*Pfcbt*) associé à la résistance à l'atovaquone. La liste des marqueurs moléculaires majeurs de résistance aux antipaludiques avec leur niveau de validation se trouve dans le tableau 4.

Tableau IV : Marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques [42].

Médicament	Marqueurs de résistance		Niveau de validation
	Gène ou locus	Allèle associé à la résistance ou à la diminution de sensibilité	
Chloroquine	<i>Pfcrt</i>	Lys76Thr	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Amodiaquine	<i>Pfmdr1</i>	Asn86Tyr	Association <i>in vitro</i>
	<i>Pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Méfloquine	<i>Pfmdr1</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vivo</i>
Sulfadoxine-Pyriméthamine	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Asn	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfdhfr</i>	Triple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile + Cys59Arg	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfdhps</i>	Ala437Gly	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfdhps</i>	Double mutation : Ala437Gly + Lys540Glu	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfdhfr</i> + <i>Pfdhfr</i>	Quintuple mutation : Ser108Asn (<i>dhfr</i>) + Asn51Ile (<i>dhfr</i>) + Cys59Arg (<i>dhfr</i>) + Ala437Gly (<i>dhps</i>) + Lys540Glu (<i>dhps</i>)	Association <i>in vivo</i>
Proguanil (cycloguanil)	<i>Pfmrp</i>	Lys1466Arg	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Thr + Ala16Val	Association <i>in vivo</i>
Atovaquone	<i>Pfdhfr</i>	Double/triple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile et/ou + Cys59Arg	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfcytb</i>	Tyr268Asn ou Tyr268Ser	Association <i>in vivo</i>
Luméfantine	<i>Pfmdr1</i>	Asn86 & Nombre de copie > 1	Sélection d'allèle en cas d'échec thérapeutique
Quinine	<i>Pfnhe-1</i> (ms4760)	Nombre de motifs : DNNND > 2 ou NHNDNHNNDDD < 3	Association <i>in vitro</i>
	<i>Pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Doxycycline	<i>PftetQ</i>	Nombre de motif KYNNNN < 3	Association <i>in vitro</i>
	<i>PftetQ</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
	<i>Pfmdt</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
Artéméter	<i>Pfserca</i>	Ser769Asn	Association <i>in vitro</i> en Guyane

4.4. Mesure de la concentration d'antipaludique dans l'organisme :

Dans l'étude de l'efficacité des antipaludiques, un point crucial est de savoir faire la distinction entre un échec thérapeutique dû à une résistance et celui relatif à d'autres causes notamment une concentration insuffisante du médicament dans l'organisme. Pour ce faire, la concentration du médicament dans l'organisme est mesurée. Cette mesure consiste à déterminer

la concentration d'un médicament ou de son (ses) métabolite(s) actif(s) dans le sang total, le plasma ou le sérum. Il est aussi possible de procéder à des dosages dans les urines ou la salive.

C'est un moyen qui concourt à définir la résistance parasitaire aux antipaludiques avec plus de fiabilité. Les techniques utilisent simplement les prélèvements sanguins sur confettis de papier buvard excepté pour le cas des dérivés de l'artémisinine où les prélèvements de sang veineux sont exigés. Les prélèvements sur confettis sont simples à conserver et à transporter par contre, la collecte et le transport des prélèvements veineux nécessitent des coûts élevés. Un même prélèvement sanguin peut servir à mesurer simultanément plusieurs antipaludiques différents.

Cependant, les techniques employées coutent chères et exigent des formations spécifiques. Il faut également une standardisation des méthodes utilisées. L'utilisation de la HPLC est importante ici.

Un échec thérapeutique avec une concentration du médicament en deçà de la concentration minimale inhibitrice ne signifie pas que la souche parasitaire est résistante. Les prélèvements peuvent avoir été effectués quelques jours après la réapparition des manifestations cliniques et aussi l'affection palustre peut provoquer une modification du volume de distribution du médicament. Ce qui aboutit au dosage d'une concentration réduite du médicament dans le sang. Par contre, un échec thérapeutique avec une concentration médicamenteuse supérieure à la concentration minimale inhibitrice suspecte généralement une diminution de la sensibilité parasitaire et constitue ainsi un argument fort envers la résistance.

La mesure de la concentration du médicament dans l'organisme peut permettre, par ailleurs, d'interpréter les effets secondaires des médicaments et d'identifier des populations de patients qui ont besoin d'adaptation de doses (enfants, sujets âgés, insuffisants rénaux et insuffisants hépatiques).

5- Mécanismes d'action et de résistance à l'artémisinine et dérivés :

L'artémisinine et ses dérivés sont des sesquiterpènes trioxanes lactones dont le pont endopéroxyde est essentiel à l'activité antipaludique. Quoique le mécanisme d'action précis de ces composés fasse l'objet d'importantes controverses, le pharmacophore endoperoxyde a permis le développement de plusieurs classes d'endoperoxydes possédant l'activité antipaludique. La compréhension du mécanisme d'action exact de cette classe de médicaments permettra de prédire les mécanismes de résistance probables et d'orienter le design des futurs agents antipaludiques.

La sélectivité de l'activité des dérivés de l'artémisinine au sein des érythrocytes est due à la bioactivation du pont endopéroxyde qui est fer-dépendant. Deux voies d'activation différentes par leur dépendance en fer et leur implication en radicaux centrés de carbone ont été identifiées : le modèle de scission réductrice et le modèle d'ouverture de l'endoperoxyde (voir fig.8).

Dans le premier modèle, le fer II (hémique ou exogène non-hémique) se lie à l'artémisinine, il se passe un transfert d'électron qui induit la scission réductrice du pont endoperoxyde produisant des radicaux centrés d'oxygène. Ces radicaux centrés d'oxygène se réarrangent pour donner des radicaux centrés de carbone. Vu l'asymétrie du pont endoperoxyde, le fer peut réagir avec la fonction peroxyde dans 2 directions différentes pour produire soit un radical centré de carbone primaire ou un radical centré de carbone secondaire [72, 73].

Dans le second modèle, l'ouverture du pont est due à la protonation du peroxyde ou à sa complexation avec le Fe^{2+} . Certains auteurs ont supposé que le fer agit comme un acide de Lewis pour faciliter la bioactivation plutôt ionique que radicalaire de ces composés [74]. Il est également suggéré que l'oxygène non peroxydique y joue un rôle en facilitant l'ouverture du pont endoperoxyde pour donner de l'hydroxyperoxyde ouvert [75]. Le clivage hétérolytique du pont endoperoxyde et la capture éventuelle de molécule d'eau conduisent à la formation d'un Fenton insaturé dont la dégradation de la fonction hydroxyperoxyde produit un radical hydroxyl (un radical centré de carbone secondaire). Ce radical peut éventuellement oxyder les résidus acides aminés.

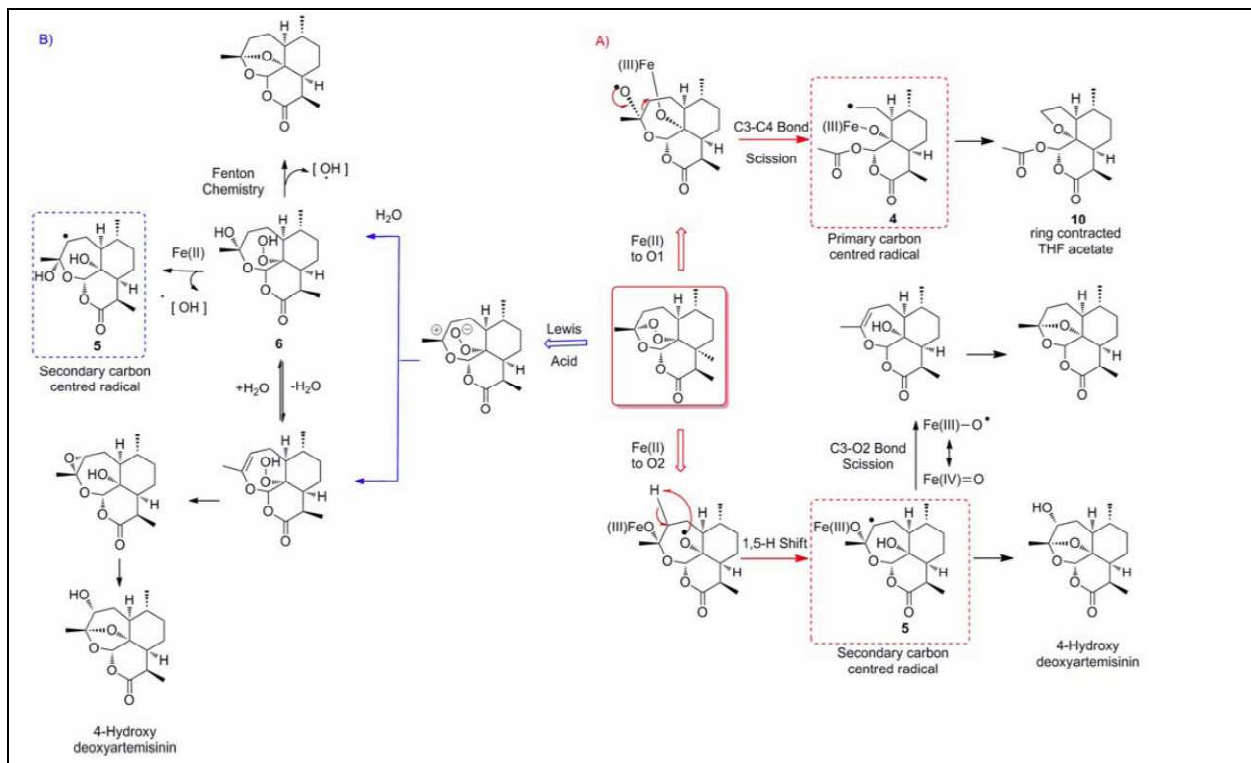


Figure 8: Bioactivation de l'artémisinine.[76]

A : Modèle de la scission réductrice ; B : Modèle de l'ouverture du pont endoperoxyde par protonation et par complexation avec le Fe^{2+} .

Plusieurs postulats ont été établis pour expliquer le mécanisme d'action des dérivés de l'artémisinine après leur bioactivation. Ces postulats ne sont pas mutuellement exclusifs. Il existe de nombreux arguments en faveur ou à l'encontre de chacune des hypothèses données. La figure 9 illustre les différents modes d'action évoqués et les facteurs parasites incriminés dans la résistance à ces composés.

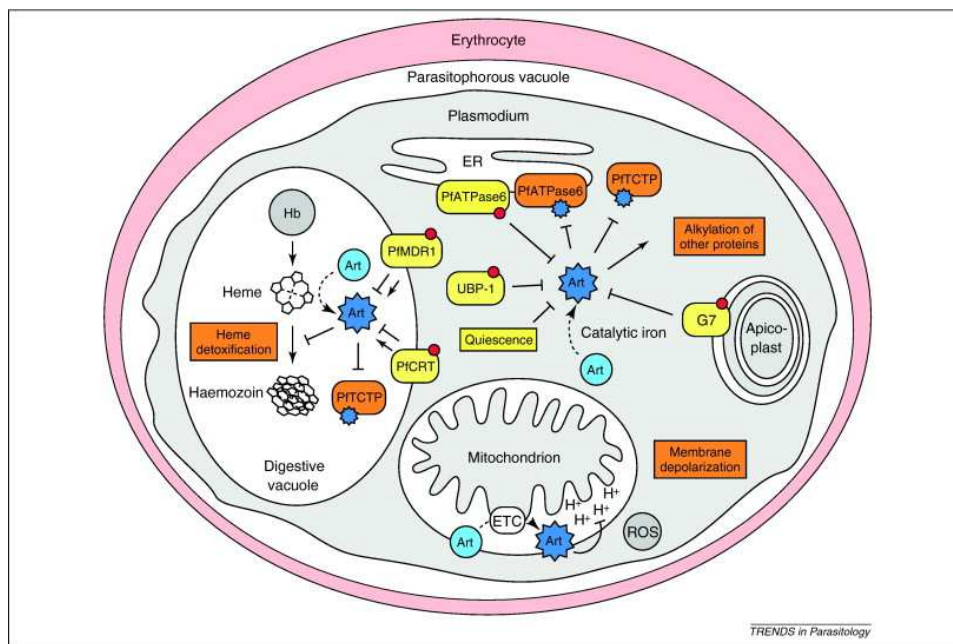


Figure9: Principales protéines et processus biologiques incriminés dans le mode d'action de l'artémisinine et le mécanisme de résistance chez *P. falciparum* [77]

Les points rouges concernent les protéines dont les mutations ont été associées à une diminution ou augmentation de la sensibilité à l'artémisinine (Art). Les molécules ou mécanismes cibles supposés de l'action de l'artémisinine sont encadrés en couleur orangé tandis que les présumés facteurs parasitaires de résistance sont encadré en jaune.

5.1.Hypothèse de l'hème comme cible :

Au stade intra-érythrocytaire, la plasmodie dégrade au sein de sa vacuole digestive une grande partie de l'hémoglobine érythrocytaire utilisée comme source d'acides aminés nécessaires à sa synthèse protéique. Ce catabolisme libère de l'hème, le composant prosthétique de l'hémoglobine qui est une ferroporphyrine très toxique pour le parasite. Pour détoxifier ces molécules d'hème, le parasite les transforme en hémozoïne (pigment malarique) grâce à un mécanisme de cristallisation.

Il est proposé que les radicaux libres produits lors du clivage du pont endoperoxyde des dérivés de l'artémisinine par le fer hémique provoquent en retour l'alkylation des molécules d'hème. Cette alkylation interfère avec le mécanisme de détoxification de l'hème dont l'accumulation provoque, par conséquent, la mort du parasite. Un tel mécanisme d'action explique la spécificité des dérivés de l'artémisinine contre les parasites du paludisme.

Cependant, il est également démontré que le fer non hémique est capable d'activer les dérivés de l'artémisinine et que ces composés peuvent provoquer l'alkylation d'autres protéines parasitaires [78]. En outre, Haynes *et al.* (2004) ont montré que les dérivés de l'artémisinine qui n'interagissent pas avec l'hème pouvaient par contre présenter l'activité antipaludique [79]. Egalement, Eckstein-Ludwig *et al.* (2003) ont pu démontrer que l'inhibition de la dégradation de l'hémoglobine n'avait pas d'effet direct sur l'activité des dérivés de l'artémisinine [80].

Ainsi, l'hypothèse selon laquelle l'hème serait activatrice et cible des dérivés de l'artémisinine présente d'importantes zones d'ombre à éclaircir.

5.2.Hypothèse de la PfTCTP et autres protéines comme cibles :

La structure de l'artémisinine est très sensible aux effets stériques. Pour cette raison, on a suggéré que sa cible serait une protéine ou enzyme particulière. Un certain nombre d'études à l'artémisinine radio-marquée ont pu montrer que l'artémisinine en concentrations physiologiques réagit de manière covalente avec plusieurs protéines parasitaires.

En effet, en 1998, Bhisutthibhan *et al.* ont pu mettre en évidence de manière spécifique une réaction covalente *in situ* et *in vitro* entre l'artémisinine et une protéine parasitaire de 25kD, homologue de la *Translationally Controlled Tumour Protein* (TCTP) humaine appelée PfTCTP [81]. Cette alkylation *in vitro* semble hème-dépendant et la cystéine de la protéine PfTCTP est considérée indispensable à ce mécanisme en servant de source d'électron pour l'activation de la drogue par l'hème.

Meshnick *et al.* (1994) ont aussi démontré dans des expériences *in vitro* que l'artémisinine est capable de provoquer l'alkylation de diverses autres protéines notamment les hémoprotéines telles que la catalase, le cytochrome c et l'hémoglobine [82]. Cette alkylation des hémoprotéines ne nécessite pas l'activation de l'artémisinine par l'hème qui est libérée de la globine. Les falcipaines sont également inhibées par les dérivés de l'artémisinine par un mécanisme qui serait dépendant de l'hème [76].

Cependant, le manque de données fonctionnelles par rapport au rôle de l'interaction entre l'artémisinine et la PfTCTP met en cause la PfTCTP comme cible centrale des dérivés d'artémisinine. Par ailleurs, une légère élévation du niveau d'expression de la PfTCTP a été observée chez des souches de *P. yoelli* résistantes de manière instable à l'artémisinine. Cela est en faveur de l'hypothèse de la PfTCTP comme cible de l'artémisinine.

5.3.Hypothèse de l'ATPase6 comme cible [76] :

La thapsigargine est une sesquiterpène lactone et un puissant inhibiteur sélectif des ATPases transporteuses de Ca²⁺ chez les mammifères appelées *Sarco/endoplasmic Reticulum Membrane Calcium ATPases* (SERCA). Le rôle des SERCA est de réduire la concentration du cytosol en calcium libre par accumulation des ions Ca²⁺ dans les réserves membranaires. Cette activité est vitale pour la cellule.

Bien que différente de l'artémisinine par l'absence du pont endopéroxyde indispensable à l'activité antipaludique, la thapsigargine présente une grande similarité structurale avec cette dernière. *P. falciparum* possède une seule enzyme orthologue aux SERCA qui est la PfATPase6. Il a été ainsi proposé que les dérivés de l'artémisinine pourraient avoir comme cible la PfATPase6. Pour tester cette hypothèse, la PfATPase6 fut exprimée dans les oocystes de la grenouille *Xenopus laevis* afin de permettre les expériences. Il fut ainsi démontré que les dérivés de l'artémisinine et la thapsigargine inhibent l'ATPase6 de manière irréversible tandis que la desoxyartémisinine (forme inactive de l'artémisinine), la quinine et la chloroquine n'en étaient pas capables. Ce mécanisme s'est montré également très sélectif car nuls autres transporteurs parasitaires n'ont été affectés, y compris la PfATPase4 (non-SERCA) [83]. Les expériences utilisant la desferrioxamine (DFO, un chélateur de fer) ont montré que l'activité antiparasitaire et anti-enzymatique des dérivés de l'artémisinine est fer-dépendant. Par contre l'activité inhibitrice de la thapsigargine sur la PfATPase6 n'était pas abolie par l'absence de fer. Lorsqu'elles sont

utilisées simultanément, la thapsigargine antagonise l'activité de l'artémisinine. Ceci suggère une action compétitive entre ces deux composés pour la PfATPase6. Les analyses ont révélé que la cible PfATPase6 se localise dans le réticulum endoplasmique et non dans la vacuole digestive.

Par ailleurs, l'activité de l'artémisinine a été mise en évidence chez *Toxoplasma gondii* à travers l'inhibition d'un homologue SERCA. Les constats supposent fortement que les ATPases sont des cibles potentielles pour les dérivés de l'artémisinine chez les parasites.

Peu après la découverte de cette cible potentielle, il fut suggéré que la résistance aux dérivés de l'artémisinine serait due au changement d'un seul acide aminé (L263E) de la SERCA plasmodiale [84]. Cet acide aminé influence la fixation des dérivés de l'artémisinine sur leur site, modulant ainsi la sensibilité *in vitro* des parasites à ces composés. Toutefois, cette mutation n'a jamais été observée chez les souches de terrain.

Cependant, contrairement à la thapsigargine, l'artémisinine, même en fortes concentrations, n'a aucune action marquée sur la morphologie du réticulum endoplasmique qui est riche en PfATPase6. Des études menées par Crespo *et al.* (2008) [85] ont pu montrer qu'il n'y a pas d'antagonisme entre l'artémisinine et la thapsigargine.

Le manque de stéréosélectivité des dérivés de l'artémisinine est considéré comme un argument pouvant mettre en cause l'ATPase6 comme cible principale. Les dérivés de l'artémisinine sont des molécules chirales dont les énantiomères présentent des activités antipaludiques similaires [86, 87].

5.4.Hypothèse de la mitochondrie comme cible :

L'action de l'artémisinine fut étudiée sur *Saccharomyces cerevisiae*. Il fut démontré qu'en absence d'une source fermentescible de carbone l'artémisinine inhibe la croissance de *S. cerevisiae*. Ce qui suggère un mode d'action relatif aux fonctions mitochondriales. Il est, ainsi, proposé après plusieurs investigations que la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie plasmodiale active directement l'artémisinine et entraîne l'accumulation des espèces réactives d'oxygène. Ces espèces réactives d'oxygène provoquent en leur tour la dépolarisation de la membrane mitochondriale et par conséquent la mort du parasite [88].

Il faut en effet davantage d'études pour décrire les facteurs moléculaires impliqués dans ce mécanisme.

Cependant, dans une récente étude, l'analyse de la fonction mitochondriale au sein des globules rouges parasités traités par des endoperoxydes n'a montré aucune modification morphologique de la mitochondrie parasitaire et suggère que le dysfonctionnement mitochondrial ne serait pas un évènement précoce du mode d'action des dérivés de l'artémisinine ou des endoperoxydes synthétiques [85].

5.5.La quiescence et les facteurs parasitaires de résistance [12] :

En 2010, Witkowski *et al.* (2010) [12] ont décrit une souche de *P. falciparum* tolérante à l'artémisinine qu'ils ont sélectionnée au laboratoire. Cette souche pouvait survivre à des très fortes concentrations (70µM) d'artémisinine par un mécanisme de quiescence au stade de ring.

En effet, pour sélectionner ces parasites tolérants à l'artémisinine, ils ont mis la souche Tanzanie F32 sous pression de l'artémisinine à travers plusieurs cycles d'exposition avec des

concentrations croissantes, et cela durant trois années. Chaque exposition durait 24 heures et après 100 cycles de pression, une lignée de parasites tolérants à l'artémisinine fut obtenue. Celle-ci fut ensuite testée pour des doses encore plus élevées d'artémisinine et pendant des temps d'exposition plus longs (48 à 96 heures). Avec des doses d'artémisinine de 9 et 18 μM , la souche sélectionnée, nommée F32-ART, était capable de regagner la parasitémie de 5% au minimum 10 jours plus vite que la souche Tanzanie F32. Avec des doses de 35 et 70 μM ou avec une longue durée d'exposition de 96 heures, seule la souche F32-ART était capable de survivre. Cette souche était devenue capable de survivre à des doses équivalent à 7000 fois sa CI_{50} initiale ($9,9 \pm 1 \text{ nM}$). Ce phénotype de tolérance semble spécifique à l'artémisinine et à ses dérivés car il fut également constaté avec l'artésunate mais pas avec la chloroquine. Le test *in vitro* classique basé sur la maturation des schizonte n'a pas déterminé une augmentation significative de la CI_{50} de l'artémisinine pour ce phénotype. Ce qui montre que ce phénotype de résistance ne peut pas être détecté par les essais *in vitro* classiques. Les analyses microscopiques et cytométriques ont montré qu'en présence de l'artémisinine, les rares parasites survivants arrêtaient leur croissance (entraient dans un état de dormance) au stade de ring et juste après la soustraction de la pression médicamenteuse, ils devenaient capables de poursuivre normalement leur développement. Ceci suggère que le phénomène de quiescence pourrait être impliqué dans les mécanismes d'action et de résistance à l'artémisinine et ses dérivés. Ni une mutation sur le gène *PfATPase6*, ni un changement du nombre de copie de *Pfmdr1* n'ont été associés à ce phénomène. L'expression de quelques gènes était faiblement élevée ou diminuée au niveau de la souche tolérante mais aucune ne pouvait expliquer le nouveau phénotype observé. Plus récemment, d'autres souches quiescentes et résistantes à l'artémisinine furent sélectionnées au laboratoire par Chavchich *et al.* (2010) grâce à un processus similaire [15]. Contrairement à F32-ART, ces souches avaient montré une augmentation significative de la CI_{50} . Dans des expériences effectuées par Tucker *et al.*, un mélange de parasites quiescents et normaux pouvait être observé au terme de l'exposition à l'artémisinine[89].

Le mécanisme de quiescence au stade de ring fut également démontré *in vitro* chez les parasites sensibles aux dérivés de l'artémisinine [14]. C'est ce qui expliquerait la fréquence des recrudescences parasitaires au cours du traitement avec l'artésunate en monothérapie. La quiescence serait une réponse naturelle des plasmodies au stade de ring face au stress provoqué par les molécules de la classe de l'artémisinine [14].

Selon la synthèse des études *in vitro*, *in vivo* et de modèles animaux réalisée par Cheng *et al.* en 2012 [14], l'émergence de la résistance aux dérivés de l'artémisinine serait due à des changements du caractère de la quiescence des parasites couplés à des modifications de cibles ou de transporteurs de ces médicaments. Ainsi, une hypothèse selon laquelle la résistance aux dérivés de l'artémisinine se présenterait en deux niveaux fut établie (voir figure10) [14].

En effet, au cours du premier niveau, l'action de l'artémisinine deviendrait incapable d'induire une portion des rings en état de quiescence qui évolueraient jusqu'au stade de trophozoïte. Les stades matures étant demeurés sensibles (changement non significatif de la CI_{50}) seraient éliminés par la drogue. Au second niveau, les stades matures perdraient leur sensibilité et deviendraient capables de se développer continuellement jusqu'au stade de schizonte malgré la pression de l'artémisinine. A ce niveau, un changement significatif de la CI_{50} serait perçu. Le

premier niveau de résistance serait illustré par le retard de clairance parasitaire constaté au Cambodge et en Thaïlande [9; 10]. Par contre, aucune indication sur le terrain ne fait état du phénotype du second niveau à ce jour. Les souches résistantes sélectionnées par Tucker *et al.* (2012) correspondraient à ce second niveau. Cependant, la souche tolérante de Witkowski *et al.* (2010) aurait plutôt une augmentation de la capacité de quiescence.

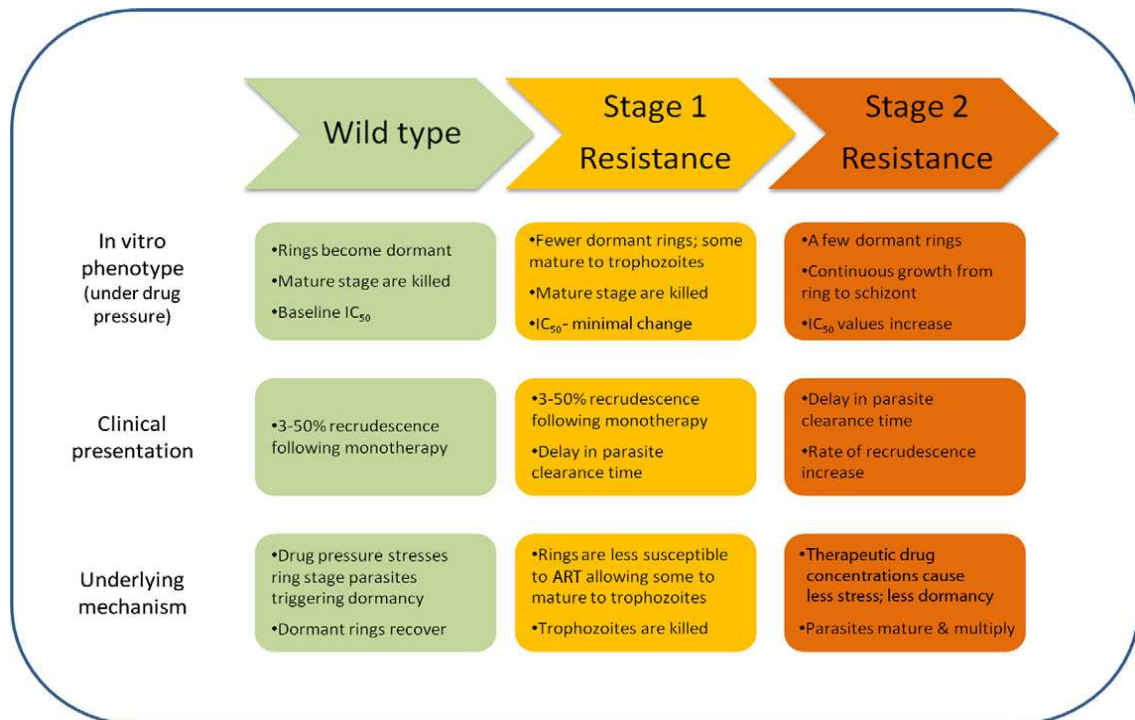


Figure10 : Illustration schématique des niveaux de résistance à l'artémisinine [14]

Par ailleurs, plusieurs gènes furent associés au changement de sensibilité de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine. Ce sont surtout le *Pfcr1* et le *Pfmr1* qui codent pour des transporteurs localisés au niveau de la membrane de la vacuole digestive. Ils sont aussi associés à la sensibilité du parasite à une multitude d'antipaludiques à savoir la quinine, la chloroquine, la méfloquine et l'halofantrine. D'autres gènes sont aussi évoqués en l'occurrence le *Pfatpase6*, le *G7* ou *Pfmdr6* (PF13_0271) et l'*ubp-1*. La protéine G7 est supposée être un transporteur ABC liant l'ATP localisé au niveau de l'apicoplaste, et l'UBP-1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase), une enzyme agissant sur l'ubiquitine. Ces gènes et leurs mutations respectives ont été identifiés grâce à des analyses génétiques, au génotypage partiel des isolats de terrain ou de laboratoire et grâce aux analyses ayant porté sur des parasites issus des échecs thérapeutiques ou des études *in vitro* de sensibilité aux dérivés de l'artémisinine.

Récemment, il fut démontré que l'artémisinine s'accumule dans les lipides neutres et provoquer l'altération de la membrane parasitaire. La fonction endoperoxyde fut déterminée essentielle à cette activité [90]. En 2009, Kumura *et al.* ont montré que les tétraoxanes étaient

capables de produire la dégradation oxydative des phospholipides contrairement aux dérivés de l'artémisinine [91].

V- Matériels et méthodes:

1- Sites d'étude :

Les parasites étaient récoltés dans deux sites de caractéristiques éco-épidémiologiques différentes (voir fig.11). Il s'agit des villages de Kollé et de Sotuba. Ces sites ont connu l'utilisation des dérivés de l'artémisinine depuis plus depuis 2004.

- **Kollé** : c'est un village situé à 57 km au Sud-ouest de Bamako, la capitale du Mali. Il compte environ 2500 habitants. C'est une savane soudanienne située à 9 km du fleuve Niger. Le climat est dominé par l'alternance des saisons froide, chaude et pluvieuse. Les habitants pratiquent l'agriculture et l'élevage. La transmission du paludisme y est saisonnière avec une allure hyper-endémique sur une période de 3 à 4 mois (saison pluvieuse). Le taux d'inoculation entomologique est de 5,2 piqûres infectantes par personne et par mois. Les espèces de moustiques responsables de la transmission sont : *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*.

- **Sotuba** : il est situé dans la savane soudanienne. C'est un village périurbain de Bamako avec une population estimée à 5665 habitants. La transmission du paludisme s'étend de juin à novembre. La pluviométrie annuelle est comprise entre 700 et 1200 mm.

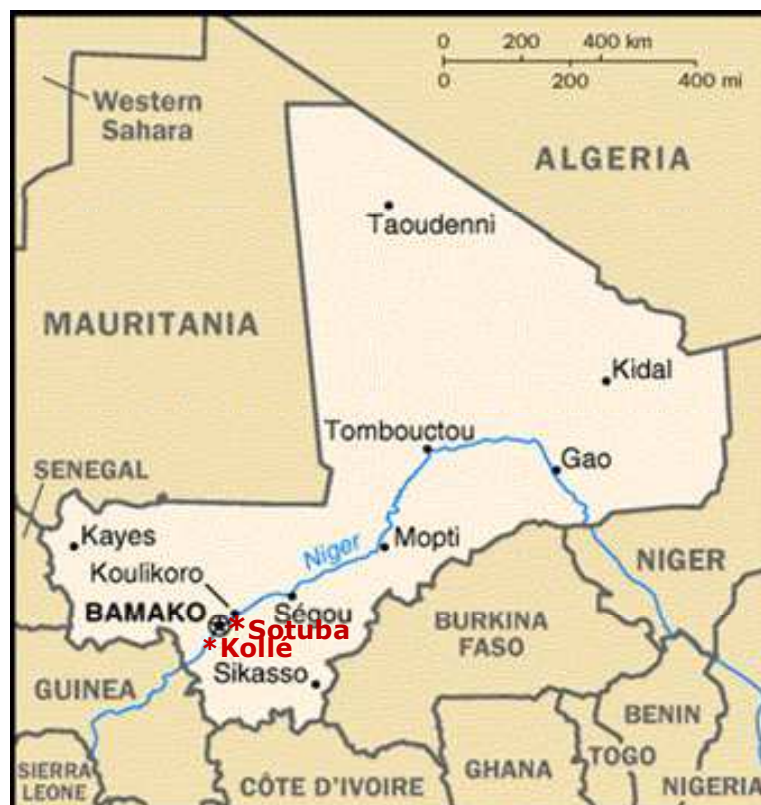


Figure11 : Cartographie des sites de l'étude. Source : MRTC, 2010

2- Types et périodes d'étude :

Les échantillons de sang parasité traités au laboratoire provenaient d'un essai *in vivo* d'efficacité de deux antipaludiques. Il s'agissait d'une étude prospective comparative randomisée, ouverte, utilisant des antipaludiques ayant l'Autorisation de Mise sur le Marché au Mali [Artéméther+Luméfantrine (AL) et Artésunate+Sulfadoxine-Pyriméthamine (AS/SP)].

Les échantillons parasitaires faisaient l'objet de test *in vitro* au cours duquel chaque isolat était exposé à la fois aux concentrations d'artémisinine de 1nM, 10nM, 50nM et 100nM et au milieu vierge à 0,05% de DMSO (servant de témoin).

L'étude s'est déroulée d'Octobre 2010 à Janvier 2011. Elle a couvert une partie de la période de haute transmission des deux sites concernés.

3- Population d'étude :

L'étude concernait les patients atteints de paludisme non compliqué à *P. falciparum*. Il s'agissait des sujets âgés de 6 mois et plus qui consultaient pendant la période de l'étude. N'étaient inclus dans l'étude que les patients volontaires qui donnaient librement leur consentement ou assentiment.

4- Taille de l'échantillon :

La taille de l'échantillon de l'essai *in vivo* a été calculée par le test de non infériorité basé sur le critère principal à savoir : proportion de guérison parasitologique et clinique à J28 après correction moléculaire (PCR) de AS/SP par rapport à l'AL (une des CTA de référence au Mali). Sur la base des études antérieures, l'hypothèse pour le pourcentage de référence est de 97% [92]. En prenant un delta de non infériorité de 5%, un risque de première espèce α de 5% et un risque de deuxième espèce β de 20%, le nombre de patients évaluables nécessaire par groupe de traitement était de 174, soit 348 (174x2) patients au total. En estimant un taux de perdu de vue de 10% pendant l'étude, nous avons ajusté cette taille à 192 sujets par groupe de traitement, soit au total 384 patients (192x2).

La présente thèse est une analyse à mi-chemin de cette étude, par conséquent elle a porté sur 47,14% de la taille totale prévue, soit 181 sujets.

5- Echantillons d'isolats parasitaires :

Il s'agissait d'isolats de *P. falciparum* au stade de ring. Pour les obtenir dans le test de quiescence, tous les sujets qui présentaient un échec thérapeutique au cours de l'essai *in vivo* étaient systématiquement prélevés. Les sujets qui avaient des parasitémiées comprises entre 22500 et 90 000/ μ l à J0 de l'essai *in vivo* étaient également inclus mais dans la limite de nos possibilités logistiques car le test de quiescence est une expérience lourde, manuelle, couteuse et très longue. Cet intervalle de parasitémiées a été établi pour minimiser l'influence éventuelle de l'effet inoculum sur l'appréciation de la tolérance des parasite au test de quiescence. Au total, 46 isolats ont pu être inclus.

6- Critères d'inclusion :

Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- être âgés de plus de 6 mois et avoir présenté une mono-infection palustre à *P. falciparum* ;
- avoir une température axillaire supérieure ou égale à 37,5 °C ou à défaut la survenue d'une fièvre dans les dernières 24 heures déterminée à l'interrogatoire ;
- avoir une parasitémie comprise entre 1000 et 200 000/ μ l;
- avoir la possibilité de se déplacer pour les visites de suivi et d'accéder facilement au service de santé et
- avoir donné librement son consentement ou assentiment éclairé après avoir reçu une information précise du protocole de l'étude.

7- Critères de non inclusion :

Les critères suivant faisaient l'objet de non recrutement à l'étude :

- la présence d'un ou de plusieurs signes de danger général ou de tout signe de paludisme grave ou compliqué défini par l'OMS ;
- la présence d'une co-infection par une autre espèce que *P. falciparum* ;
- le refus de signer le consentement ou assentiment éclairé ;
- toute contre-indication à l'une des molécules des combinaisons utilisées pour le traitement ou la présence d'un antécédent d'allergie ;
- la grossesse cliniquement patente et
- la prise antérieure d'un traitement antipaludique depuis moins de 14 jours avant le jour de l'inclusion.

8- Equipe de suivi :

Le suivi des sujets était effectué par des équipes du *Malaria Research and Training Center* (MRTC) basées à Sotuba et à Kollé. Ces équipes étaient sous la responsabilité des investigateurs seniors et de l'investigateur principal de l'étude.

9- Screening et procédure d'enrôlement :

Après l'obtention du consentement/assentiment libre et éclairé, tous les patients fébriles ou ayant connu une histoire de fièvre dans les dernières 24 heures étaient enregistrés. Un examen clinique suivi d'un interrogatoire était réalisé. Les données sociodémographiques, la température, le poids corporel et la taille de ces patients étaient notés. Les patients qui remplissaient les critères cliniques au cours de cette phase étaient prélevés au bout du doigt pour faire la goutte épaisse et le frottis mince. Ces examens permettaient de faire le diagnostic parasitologique du paludisme et d'évaluer la parasitémie. Tous les patients impaludés présentant des parasitémies telles que indiquées dans les critères d'inclusion étaient retenus. L'ensemble du processus était documenté dans un cahier d'observation établi à cet effet.

10- Procédure de suivi :

Notre procédure de suivi a duré 28 jours. Le tableau 5 montre comment le suivi était organisé.

Tableau V : Plan de procédure de suivi des participants :

Jour 0	Jour 1	Jour 2	Jour 3,7,14,21,28	Autres jours
Evaluation clinique pour écarter le paludisme grave et les signes de danger				
Prise de la température axillaire				
Ecarter tous les critères de non inclusion et vérifier les critères d'inclusion	Evaluation parasitologique (gouttes épaisses et frottis) en cas de paludisme grave ou des signes de danger	Evaluation parasitologique (gouttes épaisses et frottis)		
Evaluation parasitologique (gouttes épaisses et frottis).	Administration de la 2 ^{ème} dose ou traitement de secours en cas d'ETP	Administration de la 3 ^{ème} dose ou traitement de secours (quinine) en cas d'ETP	Traitement de secours en cas d'échec thérapeutique (quinine)	Prélèvement sanguin de 5 ml environ, en cas d'échec, pour test de quiescence
Obtention du consentement éclairé et enrôlement			Prélèvement sanguin pour PCR (confettis) au jour 28 ou aux jours 14, 21 en cas d'échec.	Confettis pour PCR en cas d'échec.
Prélèvement pour PCR (confettis)			Prélèvement sanguin de 5 ml environ, en cas d'échec, pour test de quiescence	Traitement de secours en cas d'échec thérapeutique (quinine)
Prélèvement sanguin de 5ml environ test de quiescence			Traitement de secours en cas d'échec thérapeutique ; (quinine)	
Mesure du poids et de la taille, administration de la première dose				

La fin du suivi des patients était justifiée par l'apparition d'une des situations suivantes telles que définies par l'OMS : réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA), échec parasitologique tardif (EPT), échec clinique tardif (ECT), échec thérapeutique précoce (ETP), perte de vue ou d'arrêt de suivi.

11- Traitement :

Les médicaments utilisés pour traiter les patients étaient les combinaisons artéméther (20mg)/luméfantrine (120mg) et artésunate (50 ou 100mg)/sulfadoxine (500mg)-pyriméthamine (25mg) sous forme de comprimés. L'AL utilisée était la spécialité Coartem® commercialisée par la firme Novartis®. L'AS/SP était la spécialité Artescospe® manufacturée par Guilin Pharmaceutical Co., Ltd, China que nous avons obtenue auprès du Programme National de Lutte contre le Paludisme du Mali.

Les paramètres pharmacologiques et les effets secondaires de ces médicaments sont étudiés dans le chapitre des généralités. Les posologies adoptées étaient les suivantes :

- **Pour artésunate/sulfadoxine-pyriméthamine** : 25mg/kg de sulfadoxine et 1,25mg/kg de pyriméthamine en dose unique à J0 + artésunate 4mg/kg à J0, J1 et J2 ;
- **Pour artéméther/luméfantrine** : Deux prises quotidiennes, les doses ont été administrées à l'inclusion (H0) et aux heures H8, H24, H36, H48 et H60. Pour sujets de 5 à <15kg, 1 comprimé était donné à chaque prise ; pour 15 à <25kg, 2 comprimés ; pour 25 à <35kg, 3 comprimés et pour ≥ 35 kg, 4 comprimés.

-

12- Considérations éthiques :

Le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS) : lettre N°2012-44/FMPOS du juillet 2012.

Un consentement (ou assentiment) libre et éclairé a été obtenu de tous les patients enrôlés ou de leurs tuteurs. Des formulaires de consentement et d'assentiment ont été établis pour expliquer complètement l'étude aux patients ou à leurs tuteurs tout en faisant un exposé des bénéfices et des risques éventuels liés à l'étude.

Les patients enrôlés bénéficiaient de la gratuité pour la totalité de leur prise en charge jusqu'à J28. Une équipe de chercheurs du MRTC était présente sur les sites pendant toute la durée de l'étude afin de garantir la qualité de la prise en charge.

Les patients qui ne souhaitaient pas être enrôlés dans notre étude étaient systématiquement et gratuitement traités avec les médicaments recommandés par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP).

La confidentialité était assurée par l'anonymisation des données de chaque patient.

Il avait été expliqué aux chefs de village et aux parents avant le démarrage de l'étude qu'un volontaire de l'étude ne pourra pas recevoir directement de l'argent en espèce pour sa participation. Cependant, il bénéficiait d'une prise en charge gratuite des pathologies concomitantes. Il est à signaler que les médicaments utilisés dans notre étude se composaient de molécules bien tolérées et acceptées par le PNLN du Mali.

13- Examens de laboratoire :

12.1- Examens parasitologiques :

Ils consistaient en la réalisation des gouttes épaisses et des frottis minces selon une fréquence définie par la procédure de suivi (cf. procédure de suivi). Ces examens permettaient de pouvoir faire l'inclusion des volontaires et d'assurer leur suivi parasitologique. Les charges parasitaires étaient déterminées par l'examen de la goutte épaisse en appliquant la formule suivante :

$\text{Charge parasitaire } (/ \mu\text{l}) = \frac{\text{Nombre de plasmodies asexuées dénombrées} \times 7500}{\text{Nombre de leucocytes dénombrés } (\geq 300)}$
--

12.2- Examen hématologique :

C'était la mesure du taux d'hémoglobine qui servait à l'évaluation clinique de nos sujets. Pour ce faire, nous utilisons un appareil Hémocue dont le principe consiste à placer le sang dans une microcuvette et un photomètre portable détermine le taux d'hémoglobine.

12.3- Examen moléculaire :

Il consistait à pratiquer la technique de *Nested-PCR* pour faire le génotypage des isolats parasitaires prélevés sur confettis au jour 0 et au jour d'échec thérapeutique. Ce moyen moléculaire permettait de comparer les isolats parasitaires avant et après échecs thérapeutiques survenant sur les deux bras de traitement. Le but est de faire la distinction entre recrudescence et réinfection parasitaire pour corriger les résultats d'échec. Les gènes et microsatellites utilisés successivement pour le génotypage étaient par ordre: *msp2*, *msp1*, *Ca-1*, *Ta-87*, *Ta-99* et *glurp*. Le processus comprend trois étapes à savoir : l'extraction de l'ADN, les amplifications de séquence par PCR et l'électrophorèse de l'amplicon. L'ensemble de ces étapes a été conduit selon les modes opératoires en vigueur au sein de l'unité d'épidémiologie moléculaire et de chimiorésistance du MRTC. Les ADN parasitaires étaient extraits par la méthode Chelex (Chelex® 100 resin Bio-Rad®, Catalog 143-2832) à partir du sang des malades séché sur confettis. C'est une méthode simple et rapide utilisant le Chelex qui est une résine chélatrice échangeuse d'ions (cf. annexe3). Nous avons réalisé deux étapes d'amplification. Pour chaque amplification [93,94], un mélange réactionnel nommé Master Mix contenant tous les ingrédients d'une PCR était préparé.

A la première amplification, le Master Mix (pour un volume de 25µl) comprenait :

- pour les gènes *msp2*, *msp1* et *glurp* : 1,5mM de tampon à MgCl₂ ; 200µM de dNTPs ; 1µM de couple d'amorces ; 0,025U de Taq polymérase et 1µl d'extrait d'ADN parasitaire en solution dans de l'eau pour PCR ;
- pour les microsatellites *Ca-1*, *Ta-87* et *Ta-99* : 3,5mM de tampon à MgCl₂, 200µM de dNTPs, 1µM de couple d'amorces ; 0,025U de Taq polymérase et 1µl d'extrait d'ADN parasitaire en solution dans de l'eau pour PCR.

A la deuxième amplification, le Master Mix contenait :

- pour les gènes *msp2*, *msp1* et *glurp* : 3,5mM de tampon à MgCl₂ ; 200µM de dNTPs ; 1µM (*msp1* et *glurp*) ou 100nM (*msp2*) de couples d'amorces ; 0,025U de Taq polymérase et 1µl du produit de la première amplification en solution dans 25µl d'eau pour PCR ;
- pour les microsatellites *Ca-1*, *Ta-87* et *Ta-99* : 3,5mM de tampon à MgCl₂ ; 200µM de dNTPs ; 1µM de couples d'amorces ; 0,025U de Taq polymérase et 1µl du produit de la première amplification en solution dans 25µl d'eau pour PCR.

A chaque étape d'amplification des échantillons, deux contrôles négatifs et un contrôle positif étaient également préparés. L'ensemble des PCR a été réalisé sur la machine DNA Engine Tetrad® 2 Peltier Thermal cycler, Bio-Rad®. Les programmes des différentes amplifications se trouvent dans l'annexe 4. Le produit de la deuxième amplification est déposé sur un gel pour migration par électrophorèse. A ce niveau, un marqueur de poids moléculaire était également préparé et mis sur le gel en même temps que les échantillons et les contrôles. La solution de marqueur de poids moléculaire comprenait 16,67% d'ADN et 16,67% de colorant bleu 5X dans de l'eau stérile. Le gel de migration était constitué de 0,02g/ml d'agarose dans le TBE 0,5X (pH= 8) à 0,003% de bromure d'éthidium. Le tampon TBE 0,05X était composé de Tris base (8,9mM), d'acide borique (8,9mM) et d'EDTA Na (200µM) dissout dans de l'eau désionisée. Le bromure d'éthidium s'intercale entre les deux brins d'ADN pour donner une fluorescence rouge orangé à la lumière U.V apparaissant sous forme de bandes sur le gel. Après migration, le gel est révélé et photographié dans une machine d'imagerie de gels de type GENE GENIUS, BIO-IMAGING SYSTEM®. La photo du gel est soumise à un processus de contrôle de qualité, d'interprétation et de validation du résultat. L'interprétation est basée sur les conditions :

- la conformité des tailles du produit de la 2^{ème} amplification par rapport à celles attendues,
- la taille du produit de la 2^{ème} amplification
- l'absence de bande au niveau des contrôles négatifs,
- la présence de bande au niveau du contrôle positif
- les échantillons qui présentent des bandes de même taille sont considérés identiques
- les échantillons qui présentent des bandes de taille différente sont non identiques
- les échantillons qui présentent plusieurs bandes sont dits mixtes.

Les séquences des différentes amorces utilisées se trouvent dans l'annexe 5

12.4- Test *in vitro* de quiescence :

12.3.1- Prélèvement sanguin (H0) :

Les prélèvements étaient effectués dans des tubes héparinés de 5 ml au moment de l'inclusion des sujets et à chaque fois qu'il y avait eu des échecs thérapeutiques. Les échantillons de sang parasité étaient acheminés au laboratoire de culture du MRTC à Bamako moins de 6 heures après le prélèvement.

12.3.2- Lavage des échantillons d'isolat avant le test et pour cryoconservation (H0) :

Chaque échantillon était centrifugé pour éliminer le plasma puis lavé deux fois par centrifugation avec du RPMI 1640 GIBCO. Nous réalisons un frottis avec le culot lavé afin de connaître la densité parasitaire pré-test. La densité parasitaire était déterminée en appliquant la formule suivante :

Nombre de Globules rouges infectés comptés Densité parasitaire (%): ----- 500 Globules rouges totaux comptés
--

Nous prélevions 1 ml du culot lavé pour réaliser le test de quiescence et le reste était suspendu dans un cryotube contenant 1 ml de solution de cryoconservation stérile. Cette solution de cryoconservation était composée de sorbitol, de NaCl, de glucose et d'eau distillée. Après incubation à la température ambiante, le cryotube était placé à -80° C pour la conservation d'une partie de l'isolat parasitaire. L'échantillon conservé était destiné à des tests de quiescence ultérieurs afin de confirmer les résultats que nous obtenions.

12.3.3- Milieu de culture :

Les milieux de culture étaient préparés par séries de 250 ml. Chaque milieu préparé contenait 95% de RPMI 1640 GBCO, 5% de sérum humain du groupe sanguin AB dans lequel on a dissous 5 mg d'hypoxanthine (0,02mg/ml) et 1,25g d'Albumax (5mg/ml). Pour stériliser, nous filtrions la solution sur un tamis de 0,22µm. Les milieux préparés étaient conservés à +4° C. Le RPMI était fourni par la firme INVITROGEN® (Grand Island, USA) et contenait déjà de la L-glutamine et 25mM d'HEPES.

12.3.4- Mise en suspension de l'isolat parasitaire (H0) :

Pour la mise en œuvre du test de quiescence, les isolats parasites lavés étaient mis en suspension dans le milieu de culture puis distribués sur une plaque de culture cellulaire de 24 puits de marque FALCON® (Franklin Lakes, USA). Nous traitons 3 isolats par plaque à raison de 8 puits par isolat. Dans chaque puits était distribué 1 ml de la suspension à 4% d'hématocrite. Après la distribution des suspensions dans les puits, la plaque était mise dans l'incubateur à + 37° C en attendant d'être utilisée pour la suite des opérations.

12.3.5- Préparation de la gamme de solutions d'artémisinine (H0) :

Nous préparions dans des tubes secs et stériles des solutions intermédiaires d'artémisinine de 200nM, 100nM, 20nM et 2nM dans le RPMI à 0.05% de DMSO. Pour ce faire, une solution mère de 17,7mM (5mg/ml) dans le DMSO était d'abord préparée. Celle-ci permettait d'obtenir les 4 concentrations après 16 gestes de dilution en 3 étapes avec le DMSO et le RPMI comme solvants. Les tubes contenant les solutions intermédiaires d'artémisinine dans le DMSO étaient conservés à +4° C et utilisés durant 3 à 7 jours. Par contre, les solutions dans le RPMI à 0,05% de DMSO étaient préparées extemporanément.

L'artémisinine poudre à 98% de pureté que nous utilisions était fournie par la firme SIGMA-ALDRICH® (St-Louis, USA).

12.3.6- Dépôt des solutions d'artémisinine sur la plaque (H0) :

Après la préparation des solutions d'artémisinine, la plaque contenant les suspensions d'isolats était retirée de l'incubateur. Pour chaque isolat, nous ajoutons 1 ml de chacune des 4 solutions d'artémisinine dans des puits correspondants de la plaque selon un plan de plaque préétabli (cf. annexe 6).

Une solution témoin de DMSO à ~ 0,1% (5µl de DMSO + 4ml de RPMI) était préparée. Un millilitre de cette solution était transféré dans un puits témoin DMSO 0,05% au niveau de la

plaque (cf. annexe 6). En plus, 1ml de RPMI était ajouté dans trois autres puits qui servaient de deuxième témoin (témoin RPMI) et de secours (cf. annexe 6). Au terme, nous obtenions pour chaque isolat:

- 4 puits de 2ml de volume à 2% d'hématocrite ; 2,5% de sérum humain AB et contenant successivement 100nM ; 50nM ; 10nM et 1nM d'artémisinine ;
- 1 puits témoin DMSO ~0,05% de 2ml de volume à 2% d'hématocrite et 2,5% de sérum humain AB.
- 2 puits témoins RPMI et un puits secours de 2ml de volume à 2% d'hématocrite et 2,5% de sérum humain AB.

A la fin de ces opérations, la plaque était mise dans la cloche à bougie et placée dans l'incubateur à 37° C pour 48 heures d'incubation.

12.3.7- Arrêt de l'action de l'artémisinine et remise en culture (H48):

Après environ 48 heures d'exposition à l'artémisinine (J2), les contenus des puits de la plaque étaient transférés dans des tubes stériles portant chacun le numéro du puits correspondant. Ces tubes étaient centrifugés pour éliminer le milieu. Les culots étaient lavés une fois par centrifugation avec du RPMI. Les puits étaient également lavés deux fois par pipetage avec de l'eau stérile préchauffée à 37° C. Chaque culot était remis en suspension dans 2ml d'un nouveau milieu de culture puis transféré dans le puits correspondant. Tous les puits contenaient cette fois-ci 5% de sérum humain AB et aucun ne renfermait de l'artémisinine. Seul le puits secours n'était pas touché pendant cette étape. La plaque était placée dans la cloche à bougie et remise dans l'incubateur à 37°C pour 36 heures d'incubation.

12.3.8- Observation des parasites (H84 et H132) :

A la fin des 36 heures d'incubation (H84), nous prélevions 750µl du contenu de chaque puits pour réaliser des frottis minces. Pour chaque puits, 3 frottis étaient réalisés dont le premier était coloré au Giemsa, le deuxième à l'acridine orange et le troisième conservé pour servir à la confirmation par le Service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rangueil à Toulouse. Après cette étape, la plaque était replacée dans la cloche à bougie et remis dans l'incubateur à 37°C pour 48 heures. Au bout de cette période (H132), des frottis minces étaient également réalisés comme précédemment. Les frottis au Giemsa étaient observés au microscope optique à l'objectif x 100 en immersion. Cela permettait de noter les stades d'évolution des parasites observés et d'évaluer les densités parasitaires. Les frottis à l'acridine orange étaient observés au microscope à fluorescence U.V aux objectifs x 40 puis x 100 en immersion. Ces frottis étaient destinés à l'observation facile des parasites.

Pour différencier les trois stades parasitaires (ring, trophozoïte et schizonte) qui peuvent être souvent confondus à certains niveaux du cycle érythrocytaire de *P. falciparum*, les descriptions suivantes étaient considérées :

- Les rings sont sous forme de petits anneaux avec un cytoplasme réduit et un noyau bien visible à l'intérieur d'une hématie dont le cytoplasme est très bien visible.

- Les trophozoïtes ont un cytoplasme dense, une taille plus grande avec une forme en anneau pas très nette ou totalement disparue, le cytoplasme de l'hématie est réduit mais encore bien visible.
- Les schizontes ont une taille très développée, un cytoplasme d'aspect syncytial très dense (plusieurs noyaux donnant les mérozoïtes), le cytoplasme de l'hématie est presque absent.

L'ensemble des opérations du test de quiescence était effectué sous la hotte afin d'éviter la contamination des cultures. Les puits secours étaient destinés éventuellement à la culture continue des parasites révélés quiescents.

14- Variables étudiées :

13.1- Variables principales :

- Tolérance des parasites à l'artémisinine:

La tolérance est basée sur 5 facteurs essentiels qui sont : la capacité intrinsèque de survie des isolats, la concentration d'artémisinine d'exposition, la durée d'exposition, la densité parasitaire initiale pré-test et le temps d'incubation après exposition. Elle est exprimée par les taux des isolats qui survivaient aux différentes concentrations d'artémisinine dans les conditions expérimentales définies. La survie est constatée par l'observation de parasites vivants sur le frottis.

En effet, cela a permis de quantifier les différents phénotypes parasitaires qui survivaient aux heures 36 et 84 après 48 heures d'exposition à 1nM, 10nM, 50nM et 100nM d'artémisinine. Ces mêmes pourcentages ont été déterminés pour les puits témoins afin de faire la différence entre l'action de l'artémisinine et l'effet du solvant ou un échec de culture.

- Différence de stades parasitaires :

C'est un paramètre qui permet d'étudier le phénomène de quiescence chez les isolats parasitaires tolérants à l'artémisinine. Pour ce faire, les stades parasitaires retrouvés dans les puits exposés à l'artémisinine étaient comparés à ceux des puits témoins. La différence obtenue avait pour but de témoigner le déphasage significatif entre les cycles érythrocytaires des parasites exposés à l'artémisinine et des non-exposés.

13.2. Variables secondaires :

- Taux d'échecs et d'efficacité thérapeutiques:

Ce sont les taux des différentes catégories de réponse aux traitements au cours de l'essai *in vivo*. Ces taux étaient exprimés avant et après correction moléculaire par PCR. L'OMS donne une classification de ces réponses en plusieurs catégories (cf. chapitre généralités section 4.1). Il s'agit de :

- l'échec thérapeutique précoce ;
- l'échec clinique tardif ;
- l'échec parasitologique tardif et
- la réponse clinique et parasitologique adéquate

Ces cas d'échec étaient comparés aux résultats de la tolérance des isolats parasitaires prélevés chez les patients qui les présentaient. Cette comparaison était faite pour obtenir des arguments en faveur de l'évidence d'une baisse de sensibilité de *P. falciparum* à l'artémisinine.

- **Portage gamétocytaire au cours du traitement :**

Il s'agit de la présence des gamétocytemies durant le traitement des patients avec les combinaisons AL et AS/SP. Ce facteur nous permettait d'étudier d'une part, la transmission des phénotypes parasitaires qui tolèrent les fortes concentrations d'artémisinine de notre étude (50 et 100nM) et d'autre part l'efficacité des deux combinaisons par rapport au portage gamétocytaire. Ce paramètre s'exprimait par les proportions des cas de gamétocytemies aux différents jours de suivi des sujets dans l'étude

- **Taux d'anémie :**

Il s'agit des proportions de sujets anémiés aux jours 0, 14 et 28 dans les deux bras de traitement de notre étude. Pour chaque bras de traitement, les proportions de sujets anémiés étaient ensuite comparées avant (à J0) et après suivi (à J28) pour décrire la correction de l'anémie par chaque médicament. En plus, ces proportions étaient particulièrement exprimées chez les sujets dont les isolats des tests de quiescence ont été prélevés. Cela nous permettait de comparer la présence de l'anémie à la tolérance des parasites aux fortes concentrations d'artémisinine du test de quiescence de notre étude.

- **Densité parasitaire :**

C'est le rapport entre le nombre de globules rouges parasités sur le nombre total de globules rouges exprimé en pourcentage. Ce paramètre nous permettait d'étudier l'effet d'inoculum par rapport aux résultats obtenus.

13.3- Gestion et analyse des données :

Les données *in vitro* étaient portées dans un cahier de paillasse puis saisies sur SPSS version 12.0 (SPSS, Chicago, IL). Les données de l'essai *in vivo* étaient enregistrées dans des cahiers d'observation et saisies également sur SPSS version 12.0. Ces données ont été ensuite transférées sur le Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Washington) pour l'analyse. Les variables comparées étaient des variables qualitatives. Nous avons utilisé le test exact de Fisher pour les comparaisons à cause de la petite taille des effectifs des cas. Un risque $\alpha = 0,05$ a été adopté. La valeur de $p > 0,05$ était considérée comme seuil de significativité. Le test chi 2 de McNemar a été utilisé pour étudier la correction de l'anémie en comparant les proportions des sujets anémiés avant et après suivi par bras de traitement.

VI- Résultats :

1. Résultats de l'essai in vivo :

Le nombre total de sujets inclus s'élève à 182. Le nombre de sujets entièrement suivis selon le protocole de l'étude était de 172 (94 à Kollé et 78 à Sotuba) soit 5,49% de perdu de vue. Les deux combinaisons de notre étude (AL et AS/SP) ont entraîné chacune une clairance parasitaire totale au bout de 48 heures après le début du traitement

Tableau VI: Caractéristiques démographiques et biologiques des sujets enrôlés

Caractéristiques	AL	AS/SP	Total
Age (année)			
Moyenne±écart-type	11,51±9,08	10,44±8,41	10,95±8,72
Maximum - minimum	0,92 – 48	1,08 – 43	0,92 – 48
Catégories d'âge			
< 5 ans			38 (20,99%)
≥ 5 ans			143 (79,01)
Sexe			
Féminin (%)	47,06 (40)	54,64 (53)	51,10 (93)
Masculin (%)	52,94 (45)	45,36 (44)	48,90 (89)
Taux d'anémiés (%)			
J0	36,14 (30)	39,58 (38)	37,99 (68) p-value=0,647
J14	43,21 (35)	46,81 (44)	45,14 (79) p-value=0,651
J28	21,52 (17)	31,18 (29)	26,74 (46) p-value=0,170

Ce tableau montre que la moyenne d'âge des sujets inclus dans notre étude était de 10,95 ans. Les enfants de moins de 5 ans représentaient 20,99%. Le sexe féminin prédominait avec 51,10%. Le taux d'anémiés à J28 était comparable dans les deux bras de traitement (p-value=0,170) avec une prédominance chez les sujets qui recevaient l'AS/SP (31,18%).

3.1. Classification des réponses thérapeutiques:

Tableau VII : Classification des réponses thérapeutiques par bras de traitement avant correction moléculaire

	AL	AS/SP	Total
EPT	4 (5,00)	3 (3,26)	7 (4,07)
ECT	0 (0,00)	1 (1,09)	1 (0,58)
RCPA	76 (95,00)	88 (95,65)	164 (95,35)
Total :	80	92	172

Test exact de Fisher: p-value = 0,843.

Nous n'avons pas enregistré d'échec thérapeutique avec la combinaison AL avant le jour 28. En outre, aucun cas d'échec n'a été enregistré avant le jour 21 quelque soit le bras de traitement. Les taux d'efficacité des combinaisons AL et AS/SP étaient respectivement 95% IC95% [87,69 – 98,62] et 95,65% IC95% [89,24 – 98,80] selon l'analyse *per protocol*. En appliquant le test exact de Fischer, on constate que les deux traitements ont une efficacité comparable (p-value>0,05).

Tableau VIII: Classification des réponses thérapeutiques par bras de traitement après correction moléculaire

	AL	AS/SP	Total
EPT	1 (1,25)	0 (0,00)	1 (0,58)
RCPA	79 (98,75)	92 (100,00)	171 (99,42)
Total :	80	92	172

Test exact de Fischer: p-value =0,465

Après la correction moléculaire, nous n'avons observé qu'un seul cas d'échec parasitologique tardif avec la combinaison AL. Le taux d'efficacité était de 98,75% pour le bras AL CI95% [93,23 – 99,97] et 100% pour le bras AS/SP selon l'analyse *per protocol*. L'efficacité des deux combinaisons est resté comparable après la correction moléculaire (p-value>0,05).

Tableau IX: Répartition de la gamétocytémie par bras de traitement à J0 et à J14

	Gamétocytémie à J0			Gamétocytémie à J14		
	AL	AS/SP	Total	AL	AS/SP	Total
Gamétocyte négatif	81(95,29%)	90(7,3%)	171(93,96)	81(98,78%)	90 (96,77%)	171(97,71%)
Gamétocyte positif	4(4,71%)	7(7,22%)	11(6,04%)	1 (1,22%)	3(3,23%)	4 (2,29%)
Total	85	97(1,3%)	182	82	93	175

Test exact de Fisher: p-value (J0)= 0,546 et p-value (J14)= 0,624.

Les proportions de porteurs de gamétocytes par bras de traitement étaient comparables avant le début du traitement (J0, p-value>0,05). Cette comparabilité est demeurée constante pendant tout le suivi comme par exemple à J14 où p-value>0,05.

1.2. Correction de l'anémie :

Tableau X: Correction de l'anémie par la combinaison AL

Situation d'anémie à J0	Situation d'anémie à J28		
	Anémiés	Non anémiés	Total
Anémiés	12	17	29
Non anémiés	4	45	49
Total	16	62	78

Test chi 2 de McNemar : chi2 de McNemar = 8,05> Chi2 =0,0046. P-value : 0,0072.

Les calculs effectués sur ce tableau montrent que la combinaison AL entraînait une correction significative de l'anémie entre le début et la fin du suivi (p-value=0,0072).

Tableau XI: Correction de l'anémie par la combinaison AS/SP

Situation d'anémie à J0	Situation d'anémie à J28		Total
	Anémiés	Non anémiés	
Anémiés	20	16	36
Non anémiés	9	47	56
Total	29	63	92

Test chi 2 de McNemar : χ^2 de McNemar = 1,96 > $\chi^2 = 0,1615$. P-value : 0,2295.

Le résultat des calculs effectués sur ce tableau montre que la combinaison AS/SP n'entraînait pas de correction significative de l'anémie entre le début et la fin du suivi dans notre étude (p-value > 0,05).

2- Tolérance des parasites à l'artémisinine:

2.1- Taux de tolérance des isolats aux différentes concentrations d'artémisinine :

Tableau XII: Classification des isolats étudiés dans le test de quiescence en fonction des critères d'inclusion

Site d'étude	Critères d'inclusion des isolats du test de quiescence		Total
	A J0 de l'essai <i>in vivo</i> *	Après échec thérapeutique	
Kollé	20	5	25
Sotuba	19	2	21
Total	39	7	46

* Parasitémie comprise entre 22500 - 90 000/ μ l.

Au total, 46 isolats ont été inclus dans le test de quiescence 7 ont été prélevés systématiquement des sujets qui présentaient les échecs thérapeutiques (voir tableau12). Les autres 39 isolats provenaient des sujets qui avaient des parasitémies comprises entre 22500 - 90 000/ μ l au jour de l'inclusion à l'inclusion.

En traitant ces 46 isolats, nous avons rencontré plusieurs cas de contaminations bactériennes sur les plaques au cours du test de quiescence. Le tableau13 donne la situation de ces contaminations.

Tableau XIII: Proportions des cas de contaminations bactériennes des puits sur les plaques à H84 et 132

Temps de culture	Contaminations des différents puits sur les plaques* n/N (%)					
	1nM ART	10nM ART	50nM ART	100nM ART	DMSO	RPMI
Contaminés/Total à H84	4/46 (8,70%)	4/46 (8,70%)	5/46 (10,87%)	2/46 (4,35%)	1/46 (2,17%)	1/46 (2,17%)
contaminés/Total à H132	8/46 (17,39%)	7/46 (15,22)	14/46 (30,43%)	4/46 (8,70%)	4/46 (8,70%)	7/46 (15,22%)

* Nombre total de plaques concernées par la contamination = 14, soit 30,43%.

Les résultats du tableau ci-dessous ont été obtenus en écartant tous les cas de contaminations bactériennes de puits ou souvent de plaques entières observés au cours du test de quiescence.

Tableau XIV: Taux de tolérance à chacune des concentrations d'artémisinine, aux témoins DMSO et RPMI à H84 et H132

Temps de culture	1nM ART	10nM ART	50nM ART	100nM ART	DMSO	RPMI
Survécu/Total H84	100% (42/42)	88,10% (37/42)	29,27% (12/41)	9,09% (4/44)	100% (45/45)	100% (45/45)
Survécu/Total H132	100% (38/38)	89,74% (35/39)	37,5% (12/32)	14,29% (6/42)	100% (42/42)	100% (39/39)

Ce tableau nous montre que tous les isolats ont survécu à 1nM d'artémisinine et plus de 88% ont survécu à 10nM. Sur l'ensemble des cultures réussies, 12 isolats ont survécu à la concentration de 50nM d'artémisinine. Au bout du temps d'incubation à H84 suite à l'élimination de la pression de l'artémisinine, nous avons observé des parasites vivants à 100nM d'artémisinine chez 4/44 des isolats. Lorsque nous avons prolongé l'incubation à H132, 6 isolats survivants sur 42 exposés à 100nM d'artémisinine ont été observés.

2.2- Répartition de la tolérance parasitaire à l'artémisinine par site :

Les isolats parasitaires qui survivaient aux concentrations d'artémisinine de 50 et 100nM dans le test de quiescence provenaient de tous les deux sites étudiés dans notre étude. Nous avons classé par site ces phénotypes de tolérance à 50 et 100nM d'artémisinine. Ils étaient plus élevés à Kollé qu'à Sotuba. Le risque relatif a été calculée et l'intervalle de confiance déterminée pour savoir s'il y a une liaison entre la présence de ces phénotypes et le site de kollé.

Tableau XV : Distribution par site des résultats de tolérance à 50 d'artémisinine.

	50nM ART positif	50nM ART négatif	Total
Kollé	8	16	24
Sotuba	4	18	22
Total	12	34	46

Risque relatif, RR= 1,83. IC95% RR [0,64 – 5,25],

L'analyse de ce tableau montre que le risque de survenue de la tolérance parasitaire à 50nM d'artémisinine est 1,83 fois plus élevé chez les isolats de Kollé. Avec un IC95% de [0,64 – 5,25], nous trouvons qu'il n'y a pas de liaison entre la présence des phénotypes parasitaires tolérants à 50nM d'artémisinine et le site de Kollé.

Tableau XVI : Distribution par site des résultats de tolérance à 100nM d'artémisinine.

	100nM ART positif	100nM ART négatif	Total
Kollé	4	20	24
Sotuba	2	20	22
Total	6	40	46

Risque relatif, RR= 1,83. IC95% RR [0,37 – 9,04].

Après l'analyse de ce tableau, nous trouvons que le risque de survenue de la tolérance parasitaire à 100nM d'artémisinine est également 1,83 fois plus élevé chez les isolats de Kollé. Avec un IC95% de [0,37 – 9,04], nous trouvons qu'il n'y a pas de liaison entre la présence des phénotypes parasitaires tolérants à 50nM d'artémisinine et le site de Kollé.

2.3- Phénotypage des isolats en fonction de la tolérance à l'artémisinine :

A la fin des tests de quiescence, 41 isolats pouvaient être exploités pour la description des phénotypes. Nous avons mis en évidence une hétérogénéité des isolats par rapport à leur sensibilité à l'artémisinine. Quatre catégories de phénotypes ont été identifiées.

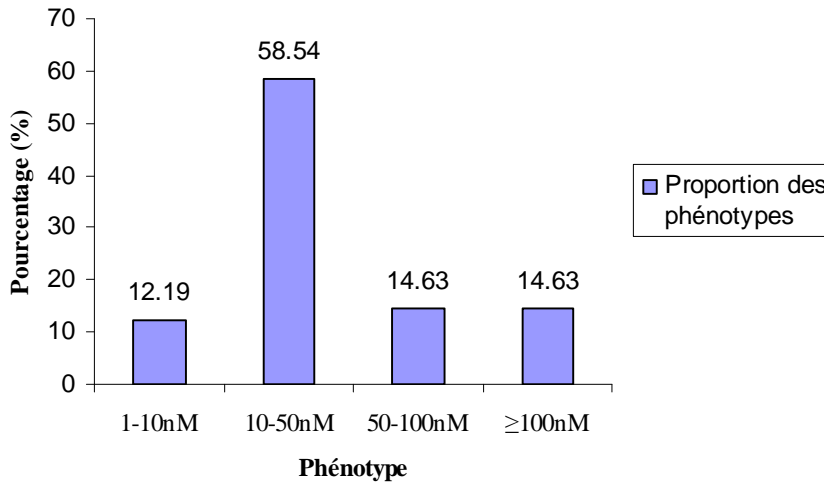


Figure12 : Classification des phénotypes parasitaires selon leur tolérance à l'artémisinine.

Test exact de Fisher: 10nM vs 50nM (ou 100nM), p-value = 0,00007

10nM vs 1nM, p-value = 0,00002.

Cette figure nous donne les 4 catégories de phénotypes parasitaires selon la tolérance spécifique pour chacune des concentrations d'artémisinine utilisées dans notre test. Les isolats dont les limites de tolérance sont comprises dans l'intervalle [10 – 50nM[d'artémisinine étaient les plus nombreux avec 58,54%. Les limites de tolérance dans l'intervalle [50 - 100nM[et celles supérieures ou égales à 100nM comprenaient la même proportion d'isolats, soit 14,64%.

2.4- Paramètres de phénotypage des isolats parasitaires tolérants à 50 et 100nM d'artémisinine :

Les paramètres pratiques qui ont permis de sélectionner les parasites tolérants à 50 et 100nM d'artémisinine sont présentés dans le tableau17. Le temps moyen d'exposition des isolats parasitaires à 50 et 100nM d'artémisinine était de 47,72 heures IC95% [46,74 – 48,70]. Quant aux temps d'incubation après l'élimination de la pression de l'artémisinine, les moyennes étaient de 45,29 heures IC95% [43,42 – 47,16] à l'heure 84 et 45,73 heures IC95% [47,71 – 43,75] à l'heure 132.

Tableau XVII : Valeurs des paramètres de phénotypage des isolats ayant survécu à 50 et 100nM d'artémisinine

No Isolat	Temps d'exposition à l'ART (heure)	DP initiale (%)	DP à H84 (%)		Temps d'incubation à H84 (heure)	DP à H132 (%)		Temps d'incubation à H132 (heure)
			50nM	100nM		50nM	100nM	
smt022	51,58	ND	1	1,4	48	3	2,3	43
smt041	50	0,1	0,4	ND	49	0,1	ND	42
smt001	46,50	1	1,2	0,6	48,50	0,2	1	42
kmt003	47,33	1,2	1	0	47,50	0,6	0,1	42
kmt004	47,67	2	1,5	0	47	1,7	0,1	42
kmt005	47	1	3	0	42	5,2	0	48
kmt007	48	2,3	0,3	0	40	0,2	0	48
smt049	47	3	0,5	2	47,50	1	1,7	44
kmt049	48,58	1,3	2	0	39,75	6	0	50,25
kmt073	45,50	1,2	0,5	0	43	0,3	0	48,50
smt078	45,50	1,2	0,9	0	46,50	1,9	0	50,50
kmt099	48	6,4	4,7	1,2	44,75	1,2	1,8	48,50
Moyennes	47,72±1,96	1,9±1	1,4±0,7	0,4±0,4	45,29±3,74	1,8±1,2	0,6±0,5	45,73±3,96

ND : non déterminé

Les densités parasitaires initiales ou pré-test étaient comprises entre 1% et 2.3% à l'exception de l'isolat smt041 avec 0.1% et de l'isolat kmt099 avec 6,4%.

Malgré une faible densité parasitaire initiale (DPI) de 0,1% nous avons observé des parasites vivants après 50 heures d'exposition à 50nM d'artémisinine.

3- Tolérance parasitaire et échecs thérapeutiques :

3.1.Tolérance des isolats parasitaires provenant des patients ayant présenté l'échec *in vivo* :

Parmi les patients qui ont présenté les échecs lors de l'essai *in vivo*, deux ont été inclus deux fois dans le test de quiescence, notamment au moment de l'inclusion à l'essai et après l'apparition de l'échec thérapeutique. Un seul cas d'échec *in vivo* n'a pas été inclus dans le test de quiescence.

Tableau XVIII : Profil de la tolérance des isolats prélevés des patients ayant présenté l'échec thérapeutique.

No Isolat	Densité parasitaire initiale (%)	Temps d'incubation	10nM ART	50nM ART	100nM ART
smt004*	1,2	H84	+	-	-
		H132	+	-	-
smt004	1,4	H84	+	-	-
		H132	+	-	-
kmt004*	2	H84	+	+	+
		H132	+	-	-
kmt004	0,3	H84	-	-	-
		H132	-	-	-
kmt012		H84	-	-	-
		H132	-	-	-
smt025	0,1	H84	-	-	-
		H132	+	-	-
kmt014	3,5	H84	+	-	-
		H132	+	-	-
Kmt018	0,3	H84	+	-	-
		H132	+	-	-
kmt028	0,19	H84	-	-	-
		H132	-	-	-

* Isolat prélevé à J0 avant échec.

Ce tableau montre qu'aucun isolat, après échec à l'essai *in vivo*, n'a survécu à 50 et 100nM d'artémisinine. Un isolat provenant d'un patient avait survécu à 50 et 100nM d'artémisinine à J0 mais après l'échec thérapeutique, l'isolat prélevé du même patient n'a pas survécu à ces concentrations de la drogue. Il faut aussi noter que la densité parasitaire de ce deuxième isolat était très faible et il n'avait pas survécu même à 10nM d'artémisinine.

Par ailleurs, aucun des isolats inclus dans le test de quiescence n'a été associé au portage gamétocytaire

4- Tolérance parasitaire et correction de l'anémie :

Les proportions des sujets anémiés (taux d'hémoglobine <11g/dl) étaient comparables pendant tout le suivi dans les deux bras de traitement de notre étude. Pour mesurer la correction de l'anémie obtenue avec chaque traitement, nous avons comparé les proportions des sujets anémiés avant (J0) et après (J28) suivi en appliquant le test chi 2 de McNemar.

Tableau XIX : Répartition des cas d'anémie à J28 par tolérance à 50 et 100nM d'ART des isolats du test de quiescence

	Tolérants	Non tolérants	Total
Non Anémiés	9	28	37
Anémiés	3	6	9
Total	12	34	46

Test exact de Fisher : p-value= 0,6777.

En appliquant le test exact de Fisher sur ce tableau, nous constatons qu'il n'y a pas de liaison entre la tolérance parasitaire à 50 et 100nM d'ART au cours du test de quiescence et la présence de l'anémie chez les sujets à la fin du suivi (à J28).

5- Différence de stades parasitaires :

Les isolats considérés dans cette analyse sont ceux qui survivaient à 50nM et 100nM d'artémisinine.

5.1- Stades parasitaires retrouvés dans les puits témoins et dans les puits de 50nM et 100nM d'artémisinine :

Pour l'ensemble des isolats qui survivaient à 50 et 100nM d'artémisinine, tous les stades érythrocytaires du parasite étaient observés à H84 et à H132.

Tableau XX : Différentes stades parasitaires rencontrés dans les puits 50 et 100nM d'artémisinine et puits témoins DMSO classés par ordre croissant.

No Isolat	50nM ART		100nM ART		Témoin DMSO		Témoin RPMI	
	H84	J132	H84	H132	H84	H132	H84	H132
smt022	2	1 -2	2-3	1-2-3	2-1	1-2	2	2-1
smt041	3	2	0	0	3-1-2	2-1-4-3	3-1-2	2-1-3
kmt001	2-3-4	3-4	3-2-1	2-1-3	2-3-1-4	4-1-2	2-3-1-4	1-2-4
kmt003	4-2-1-3	1-4	1	1	3-4-2-1	4-1-2	3-2-4-1	1-2-4
kmt004	2-3-1-4	2-1-3	0	2	2-3-4	1-2-2	2-3-1-4	1-2-3-4
kmt005	1	1-2-3	0	0	3-1	1-3	3-1-2-4	3-1-2-4
kmt007	2	1	0	0	3	2	3-1	2
smt049	1-2	1	1-2	1-2-3	1-2	3-1-2	1-3	3
kmt049	1-3-2	1-2-3	0	0	3-1	5-2	3-1	5
kmt073	1-4-3	3-2	0	0	1-3	1-3-2	1-3	1-3
smt078	1-3	3-1	0	0	1-3	1-3	3-1	1-3
kmt099	3-2-1	2-3	2-3	2-1	1-3-2	3-2-4	1-3-2	1-2-4

1= ring ; 2= trophozoïte ; 3= schizonte ; 4= gamétocyte ; 5= mérozoïte.

Ce tableau montre que pour la plupart des isolats, plusieurs stades parasitaires étaient observés à la fois dans un même puits (traité ou témoin). Ce manque de synchronie des cycles

parasitaires rend difficile de manière générale la comparaison entre puits traités à l'artémisinine et puits témoins. Toutefois, la présence simultanée de plusieurs stades parasitaires est moins accentuée dans les puits traités à 50 et 100nM d'artémisinine que les autres puits.

5.2- Comparaison des stades parasitaires observés :

Nous avons calculé la fréquence de chaque stade parasitaire (ring, trophozoïte, schizonte, gamétocyte et mérozoïte) pour les puits à 50 et 100nM d'artémisinine et les puits témoins DMSO aux heures 84 et 132 du test de quiescence.

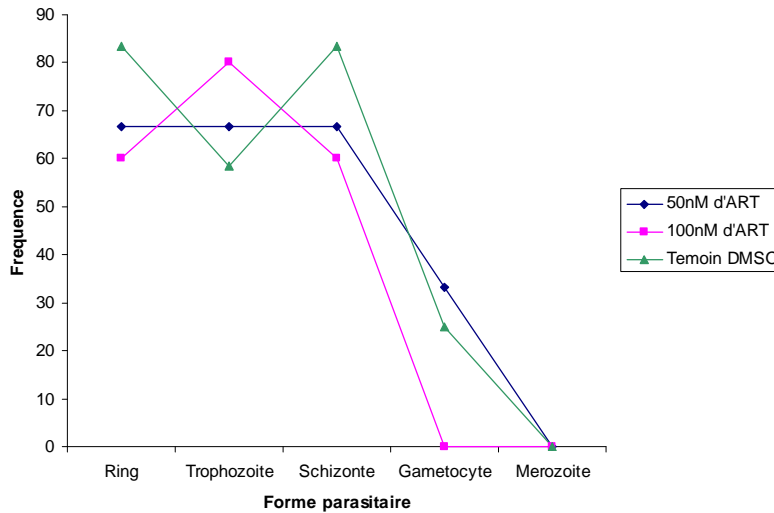


Figure13 : Comparaison des stades parasitaires observées à H84.

Sur cette figure, nous constatons à H84 que le stade de trophozoïte était de 80% à 100nM d'artémisinine ; 66,67% à 50nM et 58,33% au témoin DMSO. En utilisant le test exact de Fisher, nous n'avons pas trouvé que ces différences étaient statistiquement significatives ($p > 0,05$).

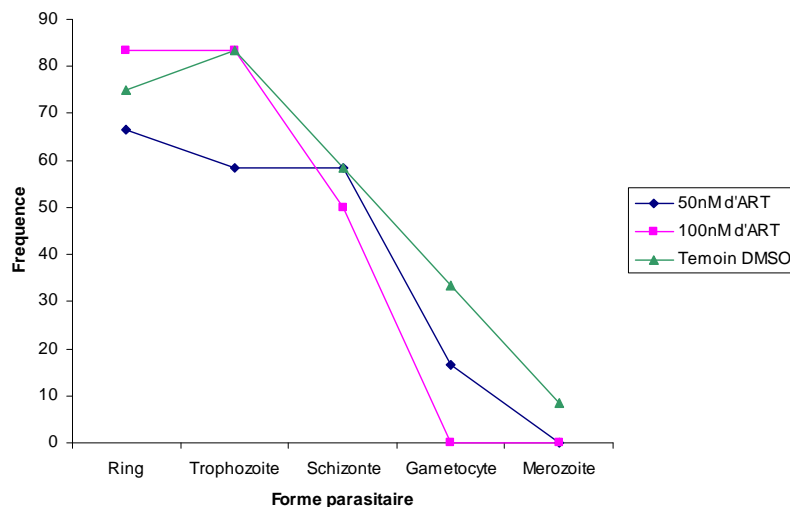


Figure14 : Comparaison des stades parasitaires observés à H132.

Cette figure nous montre à H132 un effet asynchrone très élevé de la culture des isolats rendant difficile la comparaison des fréquences de stades parasitaires observés. Toutefois, nous remarquons que c'est le stade de ring qui domine à 50nM (66,67%), les stades de ring et trophozoïte à 100nM d'artémisinine (83,33%) tandis que c'est spécifiquement le stade de trophozoïte qui prédomine pour le témoin DMSO (83,33%). Le test exact de Fisher ne nous a pas permis de trouver une différence statistiquement entre ces fréquences ($p>0,05$).

Par ailleurs, nous avons constitué une population statistique avec le stade majoritaire de chaque puits sans tenir compte des stades de gamétoocyte et mérozoïte. A partir de cette population nous avons déterminé, à H84 et à H132, les fréquences des stades parasitaires pour les puits à 50nM et 100nM d'artémisinine et témoin DMSO.

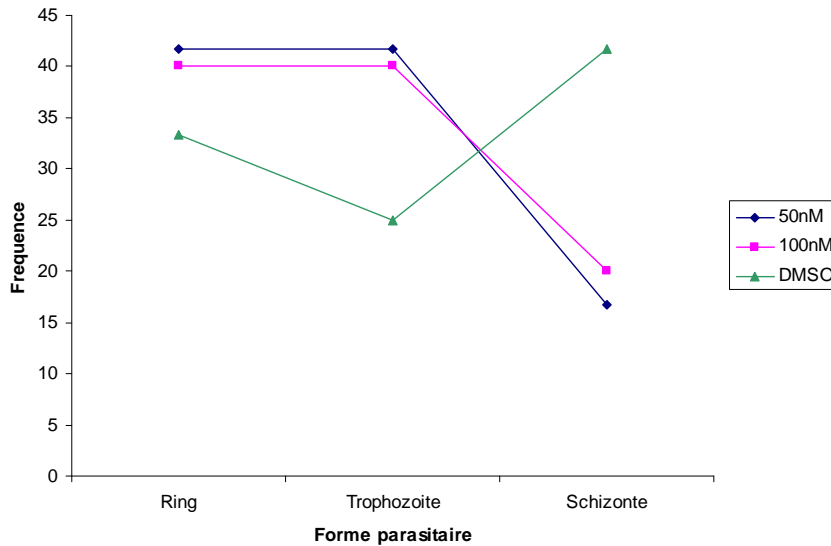


Figure15 : Comparaison des stades parasitaires majoritaires à H84.

En effet, sur cette figure, nous constatons à H84 que les stades de ring et trophozoïte étaient de 41,67% à 50nM, 40% à 100nM d'artémisinine et respectivement de 33,33% et 25% au témoin DMSO. Nous n'avons pas trouvé de différences statistiquement significatives (test exact de Fisher, $p>0,05$) mais nous constatons que les courbes de 50nM et 100nM d'artémisinine sont très proches et présentent la même allure.

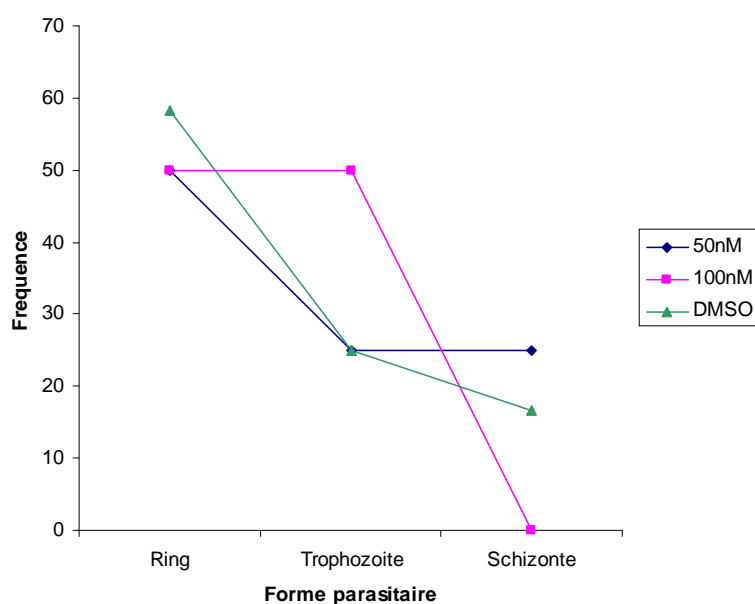


Figure16 : Comparaison des stades parasitaires majoritaires à H132.

A J6, malgré l'effet asynchrone, nous constatons sur cette figure que le stade de trophozoïte apparaît nettement plus fréquent à 100nM d'artémisinine (50%) qu'aux autres puits (25%).

Pour déterminer s'il y a une liaison entre la survenue d'un stade parasitaire donné et l'exposition aux concentrations d'artémisinine de 50 et 100nM, nous avons utilisé le test exact de Fisher. Les tableaux de contingence ci-dessous (voir Tableaux21 à 32) nous ont permis d'effectuer le test pour chaque stade parasitaire aux heures 84 et 132.

Tableau XXI : Résultats de survenue à H84 du stade de ring au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

	Ring positif	Ring négatif	Total
100nM ART	3	2	5
Témoin DMSO	10	2	12
Total	13	4	17

Test exact de Fisher, p-value: 0,537

p-value > 0,05 ; nous n'avons pas trouvé de liaison entre la survenue du stade de ring et l'exposition des parasites à 100nM d'ART à H84.

Tableau XXII : Résultats de survenue à H132 du stade de ring au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

	Ring positif	Ring négatif	Total
100nM ART	5	1	6
Témoin DMSO	9	3	12
Total	14	4	18

Test exact de Fisher, p-value: 1

p-value > 0,05 ; nous n'avons pas trouvé de liaison entre la survenue du stade de ring et l'exposition des parasites à 100nM d'ART à H132.

Tableau XXIII : Résultats de survenue à H84 du stade de trophozoïte au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

	Trophozoïte positif	Trophozoïte négatif	Total
100nM ART	4	1	5
Témoin DMSO	7	5	12
Total	11	6	17

Test exact de Fisher, p-value: 0.6.

p-value > 0,05 ; nous n'avons pas trouvé de liaison entre la survenue du stade de trophozoïte et l'exposition des parasites à 100nM d'ART à H84.

Tableau XXIV : Résultats de survenue à H132 du stade de trophozoïte au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

	Trophozoïte positif	Trophozoïte négatif	Total
100nM ART	5	1	6
Témoin DMSO	10	2	12
Total	15	3	18

Test exact de Fisher, p-value: 1.

p-value > 0,05 ; nous n'avons pas trouvé de liaison entre la survenue du stade de trophozoïte et l'exposition des parasites à 100nM d'ART à H132.

Tableau XXV : Résultats de survenue à H84 du stade de schizonte au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

	Schizonte positif	Schizonte négatif	Total
100nM ART	3	2	5
Témoin DMSO	10	2	12
Total	13	4	17

Test exact de Fisher, p-value: 0.537.

p-value > 0,05 ; nous n'avons pas trouvé de liaison entre la survenue du stade de schizonte et l'exposition des parasites à 100nM d'ART à H84.

Tableau XXVI : Résultats de survenue à H132 du stade de schizonte au niveau des puits à 100nM d'ART et témoins

	Schizonte positif	Schizonte négatif	Total
100nM ART	3	3	6
Témoin DMSO	7	5	12
Total	10	8	18

Test exact de Fisher, p-value: 0,344.

p-value > 0,05 ; nous n'avons pas trouvé de liaison entre la survenue du stade de schizonte et l'exposition des parasites à 100nM d'ART à H132.

Tableau XXVII : Résultats de survenue à H84 du stade de ring au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

	Ring positif	Ring négatif	Total
50nM ART	8	4	12
Témoin DMSO	10	2	12
Total	18	6	24

Test exact de Fisher, p-value: 0.640.

p-value > 0,05 ; nous n'avons pas trouvé de liaison entre la survenue du stade de ring et l'exposition des parasites à 50nM d'ART à H84.

Tableau XXVIII : Résultats de survenue à H132 du stade de ring au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

	Ring positif	Ring négatif	Total
50nM ART	8	4	12
Témoin DMSO	9	3	12
Total	17	7	24

Test exact de Fisher , p-value: 1.

p-value > 0,05 ; nous n'avons pas trouvé de liaison entre la survenue du stade de ring et l'exposition des parasites à 50nM d'ART à H132.

Tableau XXIX : Résultats de survenue à H84 du stade de trophozoïte au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

	Trophozoïte positif	Trophozoïte négatif	Total
50nM ART	8	4	12
Témoin DMSO	7	5	12
Total	15	9	24

Test exact de Fisher , p-value: 1.

p-value > 0,05 ; nous n'avons pas trouvé de liaison entre la survenue du stade de trophozoïte et l'exposition des parasites à 50nM d'ART à H84.

Tableau XXX : Résultats de survenue à H132 du stade de trophozoïte au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

	Trophozoïte positif	Trophozoïte négatif	Total
50nM ART	7	5	12
Témoin DMSO	10	2	12
Total	17	7	24

Test exact de Fisher, p-value: 0.371.

p-value > 0,05 ; nous n'avons pas trouvé de liaison entre la survenue du stade de trophozoïte et l'exposition des parasites à 50nM d'ART à H132.

Tableau XXXI : Résultats de survenue à H84 du stade de schizonte au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

	Schizonte positif	Schizonte négatif	Total
50nM ART	8	4	12
Témoin DMSO	7	5	12
Total	15	9	24

Test exact de Fisher , p-value: 0.640 .

p-value > 0,05 ; nous n'avons pas trouvé de liaison entre la survenue du stade de schizonte et l'exposition des parasites à 50nM d'ART à H84.

Tableau XXXII : Résultats de survenue à H132 du stade de schizonte au niveau des puits à 50nM d'ART et témoins

	Schizonte positif	Schizonte négatif	Total
50nM ART	7	5	12
Témoin DMSO	7	5	12
Total	14	10	24

Test exact de Fisher, p-value: 1.

p-value > 0,05 ; nous n'avons trouvé de liaison entre la survenue du stade de schizonte et l'exposition des parasites à 50nM d'ART à H132.

En somme, nous constatons qu'aucun des tests réalisés n'a permis de montrer une liaison entre la survenue d'un stade parasitaire donné (ring, trophozoïte et schizonte) à H84 et à H132 et l'exposition des parasites à 50 et 100nM d'ART pendant en moyenne 47,72 heures (p-value> 0,05).

VII- Discussion :

1. Tolérance parasitaire :

Les résultats de notre étude montrent une hétérogénéité de phénotypes de *P. falciparum* par rapport à la tolérance à l'artémisinine (ART) au Mali avec une prédominance des phénotypes dont la limite de tolérance est comprise entre 10 – 50nM d'ART (p-value = 0,00002 et p-value = 0,00007 par rapport aux phénotypes $1 - 50\text{nM}$ et $\geq 100\text{nM}$ d'ART respectivement). Cette structure se constate sur l'ensemble des deux sites étudiés. Ce résultat est basé sur l'observation positive ou négative de parasites vivants successivement aux heures 36 et 84 après une exposition de 48 heures à l'ART. En tout, nous avons classé ces phénotypes parasitaires en 4 catégories à savoir : les parasites ayant exclusivement survécu à 1nM (12,19%), 10nM (58,54%), 50nM (14,63%) et 100nM (14,63%) d'ART. Le test de quiescence n'est pas comparable au test *in vitro* classique de chimiosensibilité basé sur la maturation des schizontes. Le taux de tolérance des isolats à une concentration donnée n'est pas comparable à la CI_{50} dans les tests classiques. La tolérance est un phénomène qualitatif qui caractérise la survie des parasites malgré l'exposition à une concentration donnée d'ART pendant un temps donné. Par contre, la CI_{50} est un paramètre mathématique fixant un seuil de concentration d'une drogue qui caractérise l'inhibition de la croissance des parasites exposés à cette drogue. L'augmentation de ce seuil permet de témoigner une baisse de sensibilité des parasites à la drogue. Cependant, la CI_{50} peut donner une information sur la survie des parasites qui est exploitable dans le test de quiescence. Dans notre étude, nous n'avons pas pu effectuer parallèlement de tests classiques pour déterminer la CI_{50} des isolats étudiés. Par ailleurs, en 1993, Basco et Le Bras ont obtenu une CI_{50} d'ART = 7,67nM avec des isolats chloroquino-résistants (n=21) provenant d'Afrique Centrale et Occidentale [95]. Cette valeur étant proche de 10nM nous permet de comprendre la prédominance des phénotypes tolérant les concentrations d'ART dans les limites de 10 – 50nM dans notre étude.

L'existence de phénotypes tolérants aux fortes concentrations à savoir 50nM (12 cas sur 32 cultures réussies) et à 100nM (6 cas sur 42 cultures réussies) est évocatrice d'une sensibilité réduite à l'ART. Ces fortes concentrations valent respectivement 6,5 et 13 fois la CI_{50} des isolats étudiés par Basco et Le bras en 1993 [95]. Cependant, elles sont en deçà du niveau de concentration sérique (~864nM ou 244ng/ml [96]) chez un patient traité avec l'ART. En 2012, Tucker *et al.* ont montré qu'une souche résistante d'origine Africaine qu'ils ont sélectionnée au laboratoire était capable de tolérer une gamme de concentrations d'ART variant de 283nM (80ng/ml) jusqu'à 1204nM (340ng/ml) [89]. Après avoir sélectionné une souche résistante de Tanzanie F32 au laboratoire, Witkowski *et al.* ont montré en 2010 que cette dernière pouvait tolérer une concentration d'ART équivalente à 7000 fois la CI_{50} de la souche parentale (~10nM) [12]. Dans ces différentes études, des parasites tolérants d'aspect normal pouvaient être observés 48 heures après l'arrêt de l'exposition à l'artémisinine.

La densité parasitaire initiale (DPI) ou densité pré-test est un paramètre important qui peut introduire un biais dans les résultats d'un test *in vitro* grâce à un effet inoculum. Dans notre test

qui avait une approche qualitative, nous n'avons pas effectué de dilutions pour uniformiser les DPI. Nous nous sommes fixés un intervalle de DPI de [0.5% - 5%] à partir duquel les isolats étaient inclus à J0 du suivi des patients. Cependant, les isolats provenant des patients qui présentaient les échecs thérapeutiques étaient systématiquement inclus quelque soit leur DPI. La DPI de la plupart des isolats qui ont survécu à 50 et 100nM d'ART (9/12) était comprise entre 1 – 3%. Par exception, un isolat qui avait une DPI de 6,4% a été inclus. Ce dernier a survécu à toute la gamme de concentrations d'ART de notre expérience. Par contre, un autre isolat qui avait une DPI exceptionnellement très faible (0,1%) a pu survivre à 50nM d'artémisinine. Ces constats permettent de suspecter un effet inoculum pour le premier cas tandis que le second montre un profil de tolérance marqué à l'ART. De manière générale, les DPI de notre étude étaient en deçà de celles des tests de quiescence réalisés par Witkowski *et al.* qui étaient de l'ordre de 5 à 7% [12].

2. Tolérance parasitaire et échecs thérapeutiques :

Il était difficile d'associer la tolérance parasitaire à 50 et 100nM d'ART aux échecs thérapeutiques qui survenaient au cours du traitement des volontaires avec les combinaisons AL et AS/AQ. A l'exception d'un seul cas, tous les isolats des échecs thérapeutiques ont été inclus dans le test de quiescence. Aucun d'entre eux n'a survécu aux concentrations d'ART de 50 et 100nM. Un isolat provenant d'un patient avait survécu à 50nM et 100nM d'ART mais lorsque ce dernier présentait un échec thérapeutique, l'isolat d'échec prélevé n'a pas toléré à ces mêmes concentrations d'ART. Le fait d'avoir exclusivement des échecs tardifs avec des DPI faibles a limité la correspondance entre échec *in vivo* et tolérance parasitaire aux concentrations élevées d'ART (50 et 100nM). La plupart des isolats d'échec avaient des DPI faibles et on ne parvenait pas à observer des parasites survivants même pour 10nM d'ART. C'est le cas de l'isolat du seul cas d'échec confirmé après correction moléculaire par PCR.

La molécule étudiée pour le test de quiescence (artémisinine) était différente de celles qui étaient utilisées pour l'essai *in vivo* (combinaisons artéméther + luméfantrine (AL) et artésunate + sulfadoxine/ pyriméthamine (AS/SP)). L'efficacité *in vivo* des deux combinaisons AL et AS/SP après correction moléculaire par PCR était comparable et s'élevait à plus de 98% dans notre étude. Ceci est comparable aux résultats des travaux de Sagara *et al.* qui ont obtenu un taux d'efficacité de plus de 99% pour ces combinaisons en 2012[97]. Dans notre étude, les deux combinaisons ont entraîné une clearance parasitaire totale au bout de 48 heures. Ce qui est également comparable aux résultats de Sagara *et al.* [98] qui n'ont pas également enregistré d'échec précoce avec ces deux médicaments. Notre étude montre que la combinaison AL corrige mieux l'anémie que l'AS/SP. L'artésunate et l'artéméther possèdent une activité *in vitro* plus élevée que celle de l'ART [99]. Toutefois, ces deux composés sont considérés comme ayant le même mécanisme d'action que l'ART car ils appartiennent à la même classe chimique. La souche tolérante à l'ART sélectionnée par Witkowski *et al.* (2010) était aussi tolérante à l'artésunate aux mêmes concentrations. La sensibilité de *P. falciparum* à ces molécules se

présenterait de la même manière. Ce sont ces constats qui nous permettaient de comparer la tolérance *in vitro* à l'ART aux échecs survenant au cours du traitement des patients avec les combinaisons contenant l'artésunate et l'artéméter.

Par ailleurs, aucun isolat provenant des cas de portage gamétoocytaire au cours du traitement avec les combinaisons AL et AS/SP n'avait survécu à 50 et 100nM d'ART. Ce constat montre que les phénotypes parasitaires qui toléraient les fortes concentrations d'ART ne pouvaient pas être liés à une production particulière *in vivo* de gamétocytes. Nous n'avons pas pu trouver également que la tolérance aux concentrations de 50 et 100nM est associée à la survenue de l'anémie chez les sujets traités avec les combinaisons AL et As/SP après 28 jours de suivi.

3. Quiescence parasitaire :

Le mécanisme de la tolérance parasitaire serait dû à deux phénomènes distincts. Le premier serait la présence durant l'exposition à l'ART d'une très faible minorité de parasites non affectés par l'ART et qui se seraient multipliés. Le deuxième serait l'existence de phénotypes parasitaires capables d'entrer en quiescence durant l'exposition à la drogue et de continuer leur développement après la soustraction de la drogue. Dans une analyse récente faite par Cheng *et al.* en 2012 [14] *P. falciparum* aurait une capacité de quiescence naturelle à l'ART et ses dérivés. Les phénotypes de retard de clearance parasitaire [9, 10] et ceux de tolérance parasitaire à de très fortes concentrations d'ART ou ses dérivés (même supérieures aux concentrations sériques thérapeutiques) [12, 89] ne seraient que des changements au niveau de leur caractère de quiescence.

En effet, nous avons comparé les stades parasitaires retrouvés dans les puits à 50 et 100nM d'artémisinine à ceux des puits témoins à 0,05% de DMSO. Cette comparaison était difficile à établir non seulement à cause du caractère très asynchrone de la culture *in vitro* des plasmodies indépendamment de l'action de l'ART mais aussi du fait de la très faible taille des isolats qui ont survécu à ces fortes concentrations d'ART. Toutefois, nous avons observé que le stade de trophozoïte était plus fréquent à 50 et 100nM d'ART qu'au témoin DMSO 45,29 heures de temps moyen d'incubation après l'élimination de la pression de l'ART. Dans les tests de quiescence réalisés par Witkowski *et al.* (2010) avec la souche tolérante de F32 Tanzanie, c'est le stade de schizonte mature qui était observé 30 heures d'incubation après l'élimination de l'action de l'ART [12]. Par comparaison à cette étude de Witkowski *et al.* (2010), les parasites étaient observés environ 15 heures de plus dans notre étude. Ce temps est nécessaire pour passer du stade de schizonte mature à celui de trophozoïte. Ainsi, la prédominance du stade de trophozoïte est en accord avec nos attentes, a priori, pour expliquer le mécanisme de tolérance de *P. falciparum* à l'ART par le phénomène de quiescence tel que décrit par Witkowski *et al.* en 2010. Pour investiguer davantage ce fait, nous avons constitué une population statistique avec le stade parasitaire majoritaire de chaque puits traité avec 50nM et 100nM d'ART et des témoins DMSO. A partir de cette population nous avons calculé la fréquence des stades de ring, trophozoïte et schizonte. Nous avons trouvé qu'à l'heure 84 (45,29 heures d'incubation en moyenne après l'élimination de l'ART) les stades de trophozoïte et de ring étaient largement les plus fréquents pour 50nM (41,67%) et 100nM (40%) d'ART tandis que le stade de schizonte était nettement le

plus dominant pour le témoin DMSO (41,67%). En plus de cela, l'allure des courbes de 50 et de 100nM d'ART était la même mais différente de celle du témoin (fig.15). Ce résultat montre l'effet de l'ART sur la cinétique du cycle érythrocytaire des isolats de *P. falciparum*. Par ailleurs, à l'heure 132 (91 heures d'incubation en moyenne après l'élimination de l'ART), il était difficile de reproduire les mêmes résultats qu'à l'heure 84. Cela serait dû au caractère asynchrone de la culture qui devenait plus marqué. L'allure de la courbe de 50nM d'artémisinine se rapproche de celle du témoin tandis que celle de 100nM reste encore presque invariable. En prenant le temps de maturation des schizontes dans l'étude de Witkowski *et al.* (2010) [12] comme référence, à H132 nous devrions observer majoritairement les stades de ring et de trophozoïte. Nos résultats sont en accord avec cette hypothèse puisque nous avons observé majoritairement les stades de ring et de trophozoïte (50% pour chaque) contre 0,0% de schizonte. L'ensemble de tous ces constats permet de suspecter le phénomène de quiescence mais qui doit être confirmé par des études plus approfondies

Nous avons utilisé le test exact de Fisher pour comparer chaque stade parasitaire entre les concentrations de 50 ou 100nM d'ART et le témoin DMSO. Les p-value obtenus (0,344 – 1) étaient supérieurs à 0,05. Nous n'avons pas, ainsi, trouvé de différences significatives des stades parasitaires entre les puits de 50 ou 100nM d'ART et ceux des témoins DMSO. La très faible taille des phénotypes parasitaires qui survivaient aux concentrations d'ART de 50 et 100nM dans notre étude a beaucoup limité ces comparaisons. Egaleme nt, les limites de la mise en œuvre du protocole de notre test ont influencé ces comparaisons. Selon le protocole établi, les isolats devaient être exposés à l'ART pendant 48 heures puis lavés et remis en culture pour être observés successivement après 36 et 84 heures. Dans la pratique, le temps d'exposition moyen à l'artémisinine était de 47,72 heures et les parasites étaient observés en moyenne 45,29 heures et 91,02 heures d'incubation après lavage. Cette différence s'explique par la difficulté logistique d'exécuter certains travaux aux moments précis tels que théoriquement mentionnés dans le protocole.

Toutefois, les résultats obtenus montrent que ces isolats, que nous avons conservés, servent de bons modèles pour mener des investigations poussées. Celles-ci pourront être basées sur un protocole d'étude de quiescence élargi aux analyses moléculaires, à l'adaptation des isolats en culture continue afin de procéder à des analyses cellulaires et à une évaluation améliorée de la chimiosensibilité.

VIII- Conclusion :

Après avoir fait une exposition *in vitro* des isolats de *P. falciparum* (n=46) à l'action de l'artémisinine pendant en moyenne 47,72 heures, nous avons constaté qu'il y a une hétérogénéité de phénotypes parasitaires de *P. falciparum* par rapport à la tolérance à l'artémisinine avec une prédominance des phénotypes dont les limites de tolérance sont comprises entre 10 – 50nM d'ART. Certains de ces isolats sont capables de survivre malgré des concentrations de 50nM et 100nM d'artémisinine. Ces isolats proviennent des zones d'endémie palustre au Mali où les dérivés de l'artémisinine sont utilisés depuis 2004. Aucun des isolats parasitaires qui toléraient les fortes concentrations d'artémisinine n'a pu être associé ni à un échec thérapeutique, ni à un portage gamétocytaire, ni à la présence de l'anémie au cours l'essai *in vivo* (n=181) des combinaisons AL et AS/SP.

L'efficacité *in vivo* des combinaisons AL et AS/SP était comparable. Elle était au dessus de 98% pour les deux médicaments après correction moléculaire par PCR. L'AL avait un meilleur impact sur l'amélioration de l'anémie que l'AS/SP. Les deux CTA ont entraîné une clearance parasitaire totale au bout de 48 heures.

L'analyse des stades parasitaires des isolats qui survivaient aux concentrations d'artémisinine de 50nM et 100nM a suspecté un ralentissement de leur cycle érythrocytaire dû à l'effet de l'artémisinine. Cependant, le test exact de Fisher ne nous a pas permis de déterminer une liaison entre la survenue d'un stade parasitaire intraérythrocytaire quelconque et l'exposition des isolats aux concentrations d'artémisinine de 50 et 100nM. Des études plus complètes et approfondies basées sur la mise en évidence de la tolérance ou résistance des plasmodies à l'artémisinine et ses dérivés par le mécanisme de quiescence doivent être menées sur les populations parasitaires des sites étudiés.

IX- Recommandations :

A la fin de ce travail, nous formulons des recommandations suivantes à l'endroit :

- des spécialistes des tests *in vitro* du Malaria Research and Training Center (MRTC) pour améliorer le protocole du test de quiescence et étudier davantage d'isolats surtout provenant de diverses localités d'endémie palustre au Mali.
- des partenaires publics et privés de la lutte contre le paludisme pour doter le MRTC de toute la plateforme d'équipements complets qui va permettre non seulement de couvrir les aspects moléculaire et cellulaire de l'étude des phénotypes quiescents de *P. falciparum* vis-à-vis de l'artémisinine et ses dérivés mais aussi de participer à la surveillance épidémiologique de la sensibilité de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine à travers cette approche de la quiescence.

Références bibliographiques :

1. World Health Organization. World malaria report 2011. Geneva; 2012
2. Ministère de la santé du Mali. Système Local d'Information Sanitaire (SLIS) 2007. Mali 2007
3. Murray CJL, Rosenfeld LC, Lim SS *et al.* Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The lancet.* 2012. **379** : 413 – 431.
4. World Health Organization. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. Geneva; 2011.
5. Balint GA. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacol. Ther.* 2001. **90**: 261-265.
6. World Health Organization. WHO policy recommendation: seasonal malaria chemoprevention (SMC) for *Plasmodium falciparum* malaria control in high seasonal transmission area of the Sahel sub-region in Africa, March 2012. Geneva; 2012.
7. ter Kuile F, White NJ, Holloway P *et al.* *Plasmodium falciparum*: *in vitro* studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. *Exp. Parasitol.* 1993. **76**:85–95.
8. Denis MB, Tsuyuoka R, Poravuth Y *et al.* Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Cambodia. *Trop Med Int Health.* 2006. **11**:1360–1366.
9. Dondorp AM, Nosten F, Yi P *et al.* Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* 2009. **361**: 455-467.
10. Pyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K *et al.* Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *The lancet.* 2012. **6736** : 60484-60490.
11. World Health Organization. Global Plan for Artemisinin Resistance Containment. Geneva 2011.
12. Witkowski B, Lelièvre J, Barragán MJ *et al.* Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. **54**: 1872-1877.
13. Teuscher F, Chen N, Kyle DE *et al.* Phenotypic changes in artemisinin resistant *Plasmodium falciparum* lines *in vitro*: evidence for decreased sensitivity to dormancy and growth inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. **56**: 428-431.
14. Cheng Q, Kyle DE and Gatton ML. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*: a process linked to dormancy? *Int. J. Parasitol. Drugs Drug. Resist.* 2012. doi:10.1016.2012.01.001.
15. Chavchich M, Gerena L, Peters J *et al.*. Role of *pfmdr1* amplification and expression in induction of resistance to artemisinin derivatives in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. **54**:2455–2464.
16. Service M and Townson H. The anopheles vector. In *Essential Malariology*; Gilles, H., Warrell, D.A., Eds. Arnold: London, UK, 2002; pp. 59-84.

17. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria, second edition. Geneva; 2010
18. Roll Back Malaria. Key malaria facts. Source: Global Malaria Action Plan (2008). Available at <http://www.rbm.who.int/keyfacts.html>.
19. NCBI taxonomy browser (*Plasmodium*). Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5820>
20. Tulane University course of Medical Protozoology (TRMD 607): Distinguishing *Plasmodium* species. Jan 2009, chapter 15, PD 60-67. Available at http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/pl_sp.html
21. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S *et al*. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010. **107**: 18640–18645.
22. . Amino R, Thiberge S, Martin B *et al*. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*. 2006. **12**: 220–224.
23. Colin JS, Naowarat T, Debbie N *et al*. Two non recombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J. Infect. Dis*. 2010. **201**: 1544-1550
24. Fiona A, Yan-Hong T, Angelika St *et al*. Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut – Placing the *Plasmodium* ookinete centre stage. *Int. J. Parasitol*. 2012. **42**: 519-527
25. Liao F. Discovery of Artemisinin (Qinghaosu). *Molecules*. 2009. **14**: 5362-5366.
26. Collaboration research group dfor Qinghaosu. A new sesquiterpene lactone-Qinghaosu (in Chinese). *Kexue Tongbao*. 1979. **3**: 142.
27. Balint GA. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacol Therapeut*. 2001. **90**:261-5
28. Duc DD, de Vries FJ, Nguyen XK *et al*. the pharmacokinetics of a single dose of artemisinin in healthy Vietnamese subjects. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1994. **51**: 785-790
29. Newton P, Suputtamongkol Y, Teja-Isavadharm P *et al*. Antimalarial bioavailability and disposition of artesunate in acute *falciparum* malaria. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000. **44**: 972-977
30. Teja-Isavadharm P, Nosten F, Kyle DE *et al*. Comparative bioavailability of oral, rectal and intramuscular artemether in healthy subjects: use of simultaneous measurement by high performance liquid chromatography and bioassay. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 1996. **42**: 599-604.
31. South East Asia Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) group. Artesunate versus quinine for treatment of severe *falciparum* malaria: a randomised trial. *Lancet*. 2005. **366**: 717-725.
32. Price RN: Artemisinin drugs: novel antimalarial agents. *Opin. Invest. Drugs*. 2000. **9**: 1815-1827.
33. Hien TT, White NJ. Qinghaosu. *Lancet*. 1993. **341**: 603-608.
34. WHO. Guidelines for the treatment of malaria. Second edition. Worl Health Organization. Geneva; 2010.

35. Adjuik M, Babiker A, Garner P, Olliaro P *et al.* International Artemisinin Study Group. Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet.* 2004. **363**: 9–17.
36. Adjuik M, Agnamey P, Babiker A *et al.* Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomised, multi-central trial. *Lancet.* 2002 **359**: 1365–1372.
37. van Vugt M, Wilairatana P, Gemperli B *et al.* Efficacy of six doses or artemether-benflumetol in the treatment of multi-drug resistant *falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999. **60**: 936–942.
38. McGready R, Stepniewska K, Lindegardh N *et al.* The pharmacokinetics of artemether and lumefantrine in pregnant women with uncomplicated *falciparum* malaria. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2006. **62**: 1021–1031.
39. World Health Organization. Update on artemisinin resistance – April 2012. Geneva; 2012.
40. Olliaro P, Wells TNC. The global portfolio of new antimalarial medicines under redevelopment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2009. **85**: 584-595
41. Medicines for Malaria Venture. The global malaria portfolio. 1st quarter 2011. Available at <http://www.mmv.org/research-development/science-portfolio>
42. Pradines B, Dormoi J, Briolant S *et al.* La résistance aux antipaludiques. *Rev. Francoph. Lab.* 2010. **422** : 51-62.
43. Zucker, Lackritz EM, Ruebush TK II *et al.* Childhood mortality during and after hospitalization in Western Kenya: effect of malaria treatment regimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996. **55**: 655-660.
44. Trape JF, Prison G, Preziosi MP *et al.* Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. *C. R. Acad. Sci III.* 1998. **321**: 689-697.
45. Björkman A. Malaria associated anaemia, drug resistance and antimalarial combination therapy. *Int. J. Parasitol.* 2002. **32**: 1637-1643.
46. Price RN and Nosten F. Drug resistant *falciparum* malaria: clinical consequences and strategies for prevention. *Drug Resist. Update.* 2001. **4**: 187-196.
47. Philipps M and Phillips-Howard PA. Economic implications of resistance to antimalarial drugs. *Pharmacoeconomics.* 1996. **10**: 225-238.
48. Talisuna AO, Boland P and D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004. **17**: 235-254.
49. Dash AP, Valecha N, Anvikar AR and Kumar A *et al.* Malaria in India: challenges and opportunities. *J. Biosci.* 2008. **33**: 583-592.
50. World Health Organization. Chemotherapy of malaria. Report of a WHO scientific group. Geneva; 1967.
51. Bruce-CHwatt LJ, Black RH, Canfield CJ *et al.* Chemotherapy of malaria. Revised 2nd edition. Geneva, World Health Organization; 1986.
52. Noedl H. Artemisinin resistance: how can we find it? *Trends. Parasitol.* 2005. **21**: 404-405.
53. Felger I and Beck HP. Fitness cost of resistance to antimalarial drugs. *Trends Parasitol.* 2008. **24**: 331-333.

54. Yeung S, Pongtavornpinyo W, Hastings IM *et al.* Antimalarial drug resistance, artemisinin-based combination therapy, and the contribution of modeling to elucidating policy choices. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004. **71**: 179-186.
55. White NJ. Antimalarial drug resistance and combination therapy. *Philos. T. Roy. Soc B.* 1999. **354**: 739-749.
56. White NJ and Pongtavornpinyo W. The *de novo* selection of drug-resistant malaria parasites. *Proc.R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* 2003. **270**: 545-554.
57. Ittarat W, Pickard AL, Rattanasinganchan P *et al.* Recrudescence in artesunate-treated patients with *falciparum* malaria is dependent on parasite burden not on parasite factors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003. **68**: 147-152.
58. Silachamroon U, Phumratanaprapin W, Krudsood S *et al.* Frequency of early rising parasitemia in *falciparum* malaria treated with artemisinin derivatives. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2001. **32**: 50-56.
59. Yuthavong Y, Butthep B, Bunyaratvej and Fucharoen S. Decreased sensitivity to artesunate and chloroquine of *Plasmodium falciparum* infecting hemoglobin H and/or hemoglobin Constant Spring erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 1989. **83**: 503-505.
60. Thu LTA, Davis TME, Binh TQ *et al.* Delayed parasite clearance in a splenectomized patient with *falciparum* malaria who was treated with artemisinin derivatives. *Clin. Infect. Dis.* 1997. **25**: 923-925.
61. Treeprasertsuk S, Viriyavejakul P, Silachamroon U *et al.* Is there any artemisinin resistance in *falciparum* malaria? *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2000. **31**: 825-828.
62. Denis MB, Tsuyuoka R, Lim P *et al.* Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in northwest Cambodia. *Trop. Med. International Health.* 2006.**11**:1800-1807.
63. Zwang J, Olliaro P, Barennes H *et al.* Efficacy of artesunate-amodiaquine for treating uncomplicated *falciparum* malaria in sub-Saharan Africa: a multi-centre analysis. *Malar. J.* 2009. **8**: 203.
64. Davis TM, Hung TY, Sim IK *et al.* Piperaquine: a resurgent antimalarial drug. *Drugs.* 2005. **65** : 75-87.
65. Douglas NM, Anstey NM, Angus BJ *et al.* Artemisinin combination therapy for *vivax* malaria. *Lancet Infect. Dis.* 2010. **10**: 405-416.
66. Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J *et al.* Clinical and parasitological response to oral chloroquine and primaquine in uncomplicated human *Plasmodium knowlesi* infection. *Malar. J.* 2010. **9**:238.
67. Anderson TJ, Nair S, Nkhoma S *et al.* High heritability of malaria parasite clearance rate indicates a genetic basis for artemisinin resistance in western Cambodia. *J. Infect. Dis.* 2010. 1326-1330.
68. Maiga AW, Fofana B, Sagara I *et al.* No evidence of delayed parasite clearance after oral artesunate treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Mali. *Am. J. Med. Trop. Hyg.* 2012. **87**: 23-28.
69. World Health Organization. Methods for Surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva; 2009.

70. Trager W and Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976. **193**: 673-675.
71. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD and Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979. **16**: 710-718.
72. Butler AR, Gilbert BC, Hulme P *et al.* EPR evidence for the involvement of free radicals in the iron-catalysed decomposition of qinghaosu (artemisinin) and some derivatives; antimalarial action of some polycyclic endoperoxides. *Free Radical Res.* 1998. **28**: 471-476.
73. O'Neil PM, Bishop LPD, Searle NL, *et al.* Biomimetic Fe(II)-mediated degradation of arteflene (Ro-42-1611). The first EPR spin-trapping evidence for the previously postulated secondary carbon-centered cyclohexyl radical. *J. Org. Chem.* 2000. **65**: 1578-1582.
74. Haynes RK, Chan WC, Lung CM *et al.* The Fe²⁺-mediated decomposition, PfATP6 binding, and antimalarial activities of artemisone and other artemisinins: the unlikelihood of C-centered radicals as bioactive intermediates. *ChemMedChem.* 2007. **2**: 1480-1497.
75. Haynes RK, Pai HHO and Voerste A. Ring opening of artemisinin (qinghaosu) and dihydroartemisinin and interception of the open hydroxperoxides with formation of N-oxides: a chemical model for antimalarial mode of action. *Tetrahedron Lett.* 1999. **40**: 4715-4718.
76. O'Neill PM, Barton VE and Ward SA. The molecular mechanism of action of artemisinin – the debate continues. *Molecules* 2010. **15**: 1705-1721.
77. Ding XC, Beck HP and Raso G. *Plasmodium* sensitivity to artemisinins : magic bullets hit elusive targets. *Trends Parasitol.* 2011. **27**: 73-81
78. Li J and Zhou B. Biological actions of artemisinin: insights from medicinal chemistry studies. *Molecules.* 2010. **15**: 1378-1397.
79. Haynes RK, Ho WY, Chan HW *et al.* Highly antimalaria-active artemisinin derivatives: biological activity does not correlate with chemical reactivity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2004. **43**: 1381-1385.
80. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, van Goethem LDA *et al.* Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2003. **424**: 957-961.
81. Bhisutthibhan J, Pan X, Hossler PA, *et al.* The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumour protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artmisinin. *J. Biol. Chem.* 1998. **273**: 16192-16198.
82. Meshnick SR, Little B and Yang YZ. Alkylation of proteins by artemisinin. *Biochem. Pharm.* 1994. **48**: 569-573.
83. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, van Goethem LDA *et al.* Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2003. **424**: 957-961.
84. Jung M, Kim H, Ki YN and Kyoung TN. Tree-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* Ca²⁺-ATPase (Pf $atp6$) and docking of artemisinin derivatives to Pf $atp6$. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005. **15**: 2994-2997.

85. del Pilar Crespo M, Avery TD, Hanssen E *et al.* Artemisinin and a series of novel endoperoxide antimalarials exert early effects on digestive vacuole morphology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. **52**: 98-109.
86. O'Neill PM, Rawe SL, Borstnik K *et al.* Enantiomeric 1,2,4-trioxanes display equivalent *in vitro* antimalarial activity versus *Plasmodium falciparum* malaria parasites: implications for the molecular mechanism of action of the artemisinins. *ChemBiochem.* 2005. **6**: 2048-2054.
87. Jefford CW. Synthesis, structure, and antimalarial activity of some enantiomerically pure cis-fused cyclopenteno-1,2,4-trioxanes. *Helv. Chim. Acta.* 1995. **78**: 647-662.
88. Wang J, Huang L, Li J *et al.* Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation *PLoS ONE.* 2010. **5**: e9582.
89. Tucker MS, Mutka T, Sparks K *et al.* Phenotypic and genotypic analysis of *in vitro* selected artemisinin-resistant progeny of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. **56**: 302-314.
90. Hartwig CL, Rosenthal AS, Dangelo J *et al.* Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of *Plasmodium falciparum* malaria parasites is endoperoxide-dependent. *Biochem. Pharmacol.* 2009. **77**: 322-336.
91. Kumura N, Furukawa H, Onyango AN *et al.* Different behavior of artemisinin and trioxane in the oxidative degradation of phospholipid. *Chem. Phys. Lipids* 2009. **160**: 144-120.
92. Ndiaye JL, Randrianarivelosia M, Sagara *et al.* Randomized, multicentre assessment of the efficacy and safety of ASAQ--a fixed-dose artesunate-amodiaquine combination therapy in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J.* 2009. **8**:125.
93. Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de Chiomiorésistance du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de Bamako. Mode opératoire normalisé du génotypage *msp1*, *msp2*, *glurp*, version 1.0 du 01/03/2006. Bamako.
94. Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de Chiomiorésistance du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de Bamako. Mode opératoire normalisé du génotypage *Ca-1*, *Ta-87*, *Ta-99*, version 1.0 du 01/03/2006. Bamako.
95. Basco LK and Le Bras J. *In vitro* activity of artemisinin derivatives against African isolates and clones of *P. falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993. **49** : 301-307.
96. Gordi T, Huong DX, Hai TN *et al.* Artemisinin pharmacokinetics and efficacy in uncomplicated-malaria patients treated with two different dosage regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. **46**: 1026-1031.
97. Hassan AM, Björkman A and Ashton M. *In vitro* activity of artemisinin, its derivatives, and pyronaridine against different strains of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990. **84** : 635-637.
98. Sagara I, Fofana B, Gaudart J *et al.* Repeat artémisinine-based combination therapies in a malaria hyperendemic area of mali: efficacy, safety, and public health impact. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012. **87**: 50-56.

99. Skinner T, Manning LS, Johnston WA and Davis TME. *In vitro* stage-specific sensitivity of *Plasmodium falciparum* to quinine and artemisinin drugs. *Int. J. Parasit.* 1996. **26** : 519-525.

Annexe:

Annexe1 : Formulaire de consentement de participation à l'étude

Titre du projet: Essai *in vivo* de la sensibilité de *P. falciparum* aux combinaisons AS/SP et AL en zones sous pression thérapeutique par des dérivés d'artémisinine et étude de phénotypes parasitaires et de marqueurs moléculaires de résistance au Mali

Sponsor:

Site: _____

Nom du patient _____

Prénom

2èmePrénom

Nom de famille

Numéro d'Identification du Participant ___ - ___ - ___ - ___ - ___ Age _____(jour)

Nous vous invitons à participer à une étude de recherche initiée par la Faculté de Médecine, de Pharmacie et Odontostomatologie (FMPOS) de l'Université du Mali. Il est important que vous compreniez plusieurs principes généraux qui s'appliquent à tous ceux qui participent à cette étude:

Votre participation à cette étude est entièrement volontaire. Toutes les informations recueillies sur vous resteront strictement confidentielles et ne seront connues que par les chercheurs directement impliqués et vous-même. Les dossiers individuels complets seront mis dans une cantine fermée à clé. Les prélèvements biologiques porteront un numéro individuel et non le nom du malade. L'analyse des données sera faite à partir de ces numéros d'identification.

Vous pouvez décider de mettre fin à votre participation à l'étude à tout moment. Si malgré des explications vous ne manifestez pas le désir d'y participer, votre décision sera respectée par l'équipe et vous ne serez pas inclus dans cette étude.

Des bénéfices personnels pour vous peuvent ne pas résulter immédiatement de votre participation à l'étude. Mais les connaissances obtenues pourraient être bénéfiques pour vous, et bien d'autres dans l'avenir.

But

Le paludisme est une maladie causée par de très petits parasites qui peuvent entrer dans le corps quand les moustiques vous piquent. Il peut causer de la fièvre, des maux de tête, des douleurs du corps, des vomissements et de la faiblesse. Il peut évoluer vers des formes sévères ou mortelles, notamment chez les enfants s'il n'est pas traité avec des médicaments appropriés. Il peut guérir complètement si le traitement est approprié. Mais certains parasites apprennent à devenir résistant à ces médicaments. Le but de cette étude est de recueillir des informations sur l'efficacité de AS/SP(artésunate+sulfadoxine/pyriméthamine), et AL(artéméther+luméfantrine)

dans les zones sous pression des dérivés de l'artémisinine et comprendre les mécanismes de la baisse de la sensibilité de ces parasites au traitement .

Procédures auxquelles vous serez soumis dans cette étude

Si vous acceptez de participer à cette étude, nous prendrons quelques gouttes de sang au niveau de votre doigt et/ou un peu de sang veineux aujourd'hui pour voir si vous n'avez pas une infection palustre. Si vous êtes infectés, vous recevrez soit de l'AL soit AS/SP comme traitement contre le paludisme gratuitement. Nous testerons votre sang pour la recherche des parasites du paludisme durant la période de traitement pour être sûr que vous n'avez plus de parasites. Pendant cette période, nous vous examinerons et vérifierons si vous êtes guéri de votre infection par le paludisme. Si malgré le traitement les parasites persistent, nous vous administrerons un traitement à base de la quinine. Au début de l'étude nous vous prélèverons une à deux cuillerée à café de sang.. Vous serez suivi pendant 28 jours dont tous les jours pendant la première semaine ensuite, une fois par semaine soit 4 semaines au total.

Autres procédures supplémentaires auxquelles vous pourrez être soumis : si vous acceptez, après la confirmation que vous avez une infection palustre, nous pourrions vous hospitaliser gratuitement pour être suivi plus près et en détail pendant 72 heures. En effet, nous vous prendrions quelques gouttes de sang au niveau de votre doigt 2 à 3 fois par 24 heures pendant la durée de votre hospitalisation. Nous testerons votre sang pour la recherche des parasites du paludisme durant la période de traitement pour être sûr que vous n'avez plus de parasites. Pendant cette période, nous vous examinerons et vérifierons si vous êtes guéri de votre infection par le paludisme. Si malgré le traitement les parasites persistent, nous vous administrerons un traitement à base de la quinine. Au début de l'étude nous vous prélèverons une cuillerée à café de sang. Après 72 heures vous serez libéré mais suivi pendant 28 jours dont tous les jours pendant la première semaine ensuite, une fois par semaine soit 4 semaines au total. Vous pouvez participer à cette étude, toute fois, sans accepter ces procédures supplémentaires.

Faire un choix:

Accepteriez-vous d'être hospitalisé ?

Oui Non

Risques

Les risques liés à cette étude sont minimes. Le prélèvement sanguin peut causer des malaises et une meurtrissure occasionnelle au site de prélèvement, et rarement, l'évanouissement peut survenir. Nous nettoierons le site de prélèvement avant de prélever le sang et nous utiliserons des aiguilles ou des vaccinostyles neufs.

Les effets secondaires peu rares liés à la prise de SP sont : les maux de tête, nausées, vomissements, carence en folate. De très rares cas de réactions cutanées sévères telles que le syndrome de Stevens Jonson, érythème polymorphe, érythrodermie bulleuse avec épidermolyse ont été rapportés avec la sulfadoxine-pyriméthamine. Cependant, pris en dose unique, la sulfadoxine-pyriméthamine est bien tolérée.

L'artésunate est un médicament recommandé par l'OMS et le Ministère de la Santé pour le traitement du paludisme. Cependant, dans quelques rares cas, de légères modifications biologiques peuvent survenir : baisse du nombre de réticulocytes et une augmentation légère et

transitoire des transaminases. En général, ces modifications ne donnent pas lieu à des manifestations cliniques. L'artésunate est l'un des antipaludiques les mieux tolérés.

Artéméther et Luméfantrine

L'AL est des médicaments essentiels recommandés par l'OMS particulièrement dans les zones où la résistance au paludisme est très élevée. Ce médicament n'est pas indiqué en prophylaxie. . L'analyse effectuée par 'The Clinical Safety Review for Coartem' a démontré l'efficacité et la sécurité/tolérance de l'AL.

Bénéfices/Les bénéfices que vous pourrez tirer de votre participation à cette étude?

Nous vous fournirons gratuitement, un traitement complet contre le paludisme et toute autre affection aiguë que vous pourrez contracter durant la période de l'étude. Les traitements que nous donnons sont ceux recommandés par le Programme National de Lutte contre Paludisme et qui sont également utilisés dans les centres de santé du Mali. Un traitement conventionnel sera appliqué pour les autres affections qui seront diagnostiquées.

Coûts

Toutes les analyses et les soins médicaux relatifs à l'étude vous seront procurés sans aucun frais.

Confidentialité et utilisation des informations

Les découvertes qui seront faite dans cette étude seront rapportées dans des conférences ou dans des revues médicales. Votre nom ne figurera, ni ne sera utilisé dans ces rapports, et les informations spécifiques que nous obtiendrons sur vous ne seront partagées avec personne excepté les investigateurs de l'étude. Nous partagerons les informations qui découleront de cette étude avec les institutions de santé nationales et locales afin qu'elles puissent mieux aider les communautés contre le paludisme.

Utilisation future de vos échantillons de sang

Avec votre permission nous conserverons une partie des échantillons que nous allons collecter au cas où il y aurait des analyses additionnelles que nous souhaiterions faire dans le futur. Les échantillons seront conservés dans des congélateurs à Bamako. Ils seront utilisés par des chercheurs de l'Université de Bamako, Mali sous l'approbation du Comité t'Ethique de la FMPOS. Les chercheurs ne tireront aucun profit financier de la conservation ou de l'utilisation de ces échantillons. Nous prévoyons conserver ces échantillons pendant un temps indéfini. Vous avez le droit de demander à ce que vos échantillons ne soient pas conservés, vous pourrez demander aussi que vos échantillons soient détruits à tout moment.

Faire un choix:

Êtes-vous d'accord que votre sang soit conservé pour une utilisation ultérieure?

Oui Non

Vos droits dans cette étude

Votre participation dans cette étude est volontaire. Vous n'êtes pas obligé de participer à ce travail de recherche. Vous êtes libre de retirer votre consentement de participer à cette étude à tout moment. Que vous participiez à cette étude ou non, vous pourrez toujours venir au centre de santé du cite de l'étude pour vous traiter pour tout autre problème médical dans le futur et vous recevrez les soins requis.

Avez-vous des questions par rapport à vos participations à cette étude?

Signature du témoin

Date

(Optionnel seulement si le participant est illettré, incapable de signer ou un assentiment oral ayant été obtenu)

Nom du témoin

Annexe 2 : Formulaire d'assentiment de participation à l'étude

Titre du projet: Essai *in vivo* de la sensibilité de *P. falciparum* aux combinaisons AS/SP et, AL en zones sous pression thérapeutique par des dérivés d'artémisinine et étude de phénotypes parasitaires et de marqueurs moléculaires de résistance au Mali.

Sponsor:

Site: _____

Nom du patient _____

Prénom

2èmePrénom

Nom de famille

Numéro d'Identification du Participant __ - __ - __ - __ - __ Age _____ (jour)

Nom de l'adulte Consentant _____

Prénom

2èmePrénom

Nom de famille

Age _____ (année)

Relation avec l'enfant _____

Nous invitons votre enfant à participer à une étude de recherche initiée par la Faculté de Médecine, de Pharmacie et Odontostomatologie (FMPOS) de l'Université de Bamako. Il est important que vous compreniez plusieurs principes généraux qui s'appliquent à tous ceux qui participent à cette étude:

1. Sa participation à cette étude est entièrement volontaire. Toutes les informations recueillies sur votre enfant resteront strictement confidentielles et ne seront connues que par les chercheurs directement impliqués et vous-même. Les dossiers individuels complets seront mis dans une cantine fermée à clé. Les prélèvements biologiques porteront un numéro individuel et non le nom du malade. L'analyse des données sera faite à partir de ces numéros d'identification.

Vous pouvez décider de mettre fin à la participation à l'étude de votre enfant à tout moment. Si malgré des explications vous ne manifestez pas le désir qu'il y participe, votre décision sera respectée par l'équipe et il ne sera pas inclus dans cette étude.

Des bénéfices personnels pour vous ou votre enfant peuvent ne pas résulter immédiatement de votre participation à l'étude. Mais les connaissances obtenues pourraient être bénéfiques pour vous, votre enfant et d'autres dans l'avenir.

But

Le paludisme est une maladie causée par de très petits parasites qui peuvent entrer dans le corps quand les moustiques vous piquent. Il peut causer de la fièvre, des maux de tête, des douleurs du corps, des vomissements et de la faiblesse. Il peut évoluer vers des formes sévères ou mortelles, notamment chez les enfants s'il n'est pas traité avec des médicaments appropriés. Il peut guérir complètement si le traitement est approprié. Mais certains parasites apprennent à devenir résistant à ces médicaments. Le but de cette étude est de recueillir des informations sur

l'efficacité de AS/SP(artésunate+sulfadoxine/pyriméthamine), et AL(artéméter+luméfantrine) dans les zones sous pression des dérivés de l'artémisinine et comprendre les mécanismes de la baisse de la sensibilité de ces parasites au traitement .

Procédures auxquelles votre enfant sera soumis dans cette étude

Si vous acceptez la participation de votre enfant à cette étude, nous prendrons quelques gouttes de sang au niveau de son doigt et/ou un peu de sang veineux aujourd'hui pour voir s'il a une infection palustre. S'il est infecté, il recevra soit de l'AL soit AS/SP comme traitement contre le paludisme gratuitement. Nous testerons son sang pour la recherche des parasites du paludisme durant la période de traitement pour être sûr qu'il n'a plus de parasites. Pendant cette période, nous examinerons votre enfant et vérifierons s'il est guéri de son infection par le paludisme. Si malgré le traitement les parasites persistent, nous lui administrerons un traitement à base de la quinine. Au début de l'étude nous lui prélèverons une cuillerée à café de sang. Il sera suivi pendant 28 jours dont tous les jours pendant la première semaine ensuite, une fois par semaine soit 4 semaines au total.

Autres procédures supplémentaires auxquelles votre enfant pourrait être soumis : si vous acceptez, après la confirmation que votre enfant a une infection palustre, nous pourrions lui hospitaliser gratuitement pour être suivi plus près et en détail pendant 72 heures. En effet, nous lui prendrions quelques gouttes de sang au niveau de son doigt 2 à 3 fois par 24 heures pendant la durée de son hospitalisation. Nous testerons son sang pour la recherche des parasites du paludisme durant la période de traitement pour être sûr qu'il n'a plus de parasites. Pendant cette période, nous vous examinerons et vérifierons s'il est guéri de son infection par le paludisme. Si malgré le traitement les parasites persistent, nous lui administrerons un traitement à base de la quinine. Au début de l'étude nous lui prélèverons une cuillerée à café de sang. Après 72 heures il sera libéré mais suivi pendant 28 jours dont tous les jours pendant la première semaine ensuite, une fois par semaine soit 4 semaines au total. Votre enfant peut participer à cette étude, toute fois, sans accepter ces procédures supplémentaires.

Faire un choix:

Accepteriez-vous que votre enfant soit hospitalisé ?

Oui Non

Risques

Les risques liés à cette étude sont minimes. Le prélèvement sanguin peut causer des malaises et une meurtrissure occasionnelle au site de prélèvement, et rarement, l'évanouissement peut survenir. Nous nettoierons le site de prélèvement avant de prélever le sang et nous utiliserons des aiguilles ou des vaccinostyles neufs.

Les effets secondaires peu rares liés à la prise de SP sont : les maux de tête, nausées, vomissements, carence en folate. De très rares cas de réactions cutanées sévères telles que le syndrome de Stevens Jonson, érythème polymorphe, érythrodermie bulleuse avec épidermolyse ont été rapportés avec la sulfadoxine-pyriméthamine. Cependant, pris en dose unique, la sulfadoxine-pyriméthamine est bien tolérée.

L'artésunate est un médicament recommandé par l'OMS et le Ministère de la Santé pour le traitement du paludisme. Cependant, dans quelques rares cas, de légères modifications

biologiques peuvent survenir : baisse du nombre de réticulocytes et une augmentation légère et transitoire des transaminases. En général, ces modifications ne donnent pas lieu à des manifestations cliniques. L'artésunate est l'un des antipaludiques les mieux tolérés.

Artéméther et Luméfantrine)

L'AL est l'un des médicaments essentiels recommandés par l'OMS particulièrement dans les zones où la résistance au paludisme est très élevée. Ce médicament n'est pas indiqué en prophylaxie. L'analyse effectuée par 'The Clinical Safety Review for Coartem' a démontré l'efficacité et la sécurité/tolérance de l'AL.

Bénéfices/Les bénéfices que vous pourrez tirer de votre participation à cette étude?

Nous fournirons gratuitement à votre enfant un traitement complet contre le paludisme et toute autre affection aiguë qu'il pourra contracter durant la période de l'étude. Les traitements que nous donnons sont ceux recommandés par le Programme National de Lutte contre Paludisme et qui sont également utilisés dans les centres de santé du Mali. Un traitement conventionnel sera appliqué pour les autres affections qui seront diagnostiquées.

Coûts

Toutes les analyses et les soins médicaux relatifs à l'étude seront procurés sans aucun frais.

Confidentialité et utilisation des informations

Les découvertes qui seront faites dans cette étude seront rapportées dans des conférences ou dans des revues médicales. Le nom de votre enfant ne figurera, ni ne sera utilisé dans ces rapports, et les informations spécifiques que nous obtiendrons sur lui ne seront partagées avec personne excepté les investigateurs de l'étude. Nous partagerons les informations qui découleront de cette étude avec les institutions de santé nationales et locales afin qu'elles puissent mieux aider les communautés contre le paludisme.

Utilisation future de vos échantillons de sang

Avec votre permission nous conserverons une partie des échantillons que nous allons collecter au cas où il y aurait des analyses additionnelles que nous souhaiterions faire dans le futur. Les échantillons seront conservés dans des congélateurs à Bamako. Ils seront utilisés par des chercheurs de l'Université de Bamako, Mali sous l'approbation du comité d'Ethique de la FMPOS. Les chercheurs ne tireront aucun profit financier de la conservation ou de l'utilisation de ces échantillons. Nous prévoyons conserver ces échantillons pendant un temps indéfini. Vous avez le droit de demander à ce que les échantillons de votre enfant ne soient pas conservés, vous pourrez demander aussi que ces échantillons soient détruits à tout moment.

Faire un choix:

Êtes-vous d'accord que le sang de votre enfant soit conservé pour une utilisation ultérieure?

Oui Non

Vos droits dans cette étude

La participation de votre enfant dans cette étude est volontaire. Vous n'êtes pas obligé de le faire participer à ce travail de recherche. Vous êtes libre de mettre fin à la participation de votre enfant à tout moment. Qu'il participe à cette étude ou non, il pourra toujours venir au centre de santé pour se faire soigner pour tout autre problème médical dans le futur et recevoir les soins requis.

Avez-vous des questions par rapport à la participation de votre enfant à cette étude?

Si vous avez des questions ou des inquiétudes au sujet de la participation de votre enfant à cette étude ou si vous voulez que les échantillons de sang soient détruits à tout moment dans le futur, vous pourrez parler à un membre de notre équipe ou vous pourrez contacter le Pr. Ogobara Doumbo ou un membre du Comité d’Ethique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d’Odonto-Stomatologie de l’Université de Bamako. Les médecins de l’équipe peuvent vous aider à contacter le chercheur principal, le Dr Antoine Dara (00223)76 28 73 42, le Pr. Doumbo au (00223) 222 81 09 ou le président du Comité d’Ethique en la personne du Pr Mamadou Marouf Keita

Mobiles : (223) 66.72.20.22 / (223) 73.05.50.84

Email : mmaroufkeita@yahoo.fr

ou le secrétaire permanent du comité d’éthique le Dr Idrissa Ahmadou CISSE

Tél. : (223) 20.22.52.77 poste 113

Fax : (223) 20.22.96.59

Mob. (223) 76.13.20.11

Email : idicisse@hotmail.com

J’ai lu ou je me suis fait lire ce document et j’ai compris le but de la participation de mon enfant à cette étude.

Si vous êtes d’accord de faire participer votre enfant à cette étude, veuillez signer ou appliquer votre empreinte digitale au bas de cette page.

Faire un choix:

Participant ayant moins de 18 ans le parent ou tuteur légal signant le formulaire d’assentiment de recherche à sa place.

Mère de l’enfant signant le formulaire d’assentiment de recherche.

Père de l’enfant signant lui-même le formulaire d’assentiment de recherche.

Signature ou Empreinte du Volontaire ou Parent/Tuteur

Date

Nom du Volontaire ou Parent/Tuteur (SVP caractères d’imprimerie) Numéros d’étude

Adresse du Volontaire

Signature de l’Investigateur

Date

Signature du témoin

Date

(Optionnel seulement si le participant est illettré, incapable de signer ou un assentiment oral ayant été obtenu)

Nom du témoin

Annexe3 :

Protocol for preparation of dried blood-samples for Chelex extraction and PCR

Materials: dried blood-blotted filter papers (we use 3MM Whatmann); 10% saponin in water (this can be stored at -20°C); 1XPBS (pH about 7.4); 20% Chelex-100 in water (this can be stored at room temp.); a heat block at 95°C.

1. Cut the blotted filter paper to appropriate size using a razor blade – the same blade can be used, wiping it on a dry Teritowel between cuttings. For a dried, blood-impregnated piece of filter paper of approximately one square centimeter, add paper to a 1.5 ml microfuge tube containing 1 ml of PBS with 50 µl of a 10% solution of saponin in water.
2. Invert tube a few times and leave at 4°C for 4 hours to overnight.
3. Aspirate the reddish solution and discard, and add another 1 ml of PBS (without saponin) mix manually, and leave at 4°C for 15 minutes.
4. Microfuge tubes for 2 min. Aspirate again and discard. Transfer filter paper to a 0.5 ml microfuge tube using a micropipette tip, pressing paper into lower one-third of tube without crushing it to the bottom.
5. To 0.5 ml tube containing filter paper, add 100 µl of PCR-quality water and 50 µl of a 20% stock solution of Chelex-100 in water. Add 100 µl of sterile water to each tube.
Note: if blood blot is very small or very thin, and/or if the parasitemia is known to be low (e.g., <1000tf), add 50 µl instead of 100 µl. (You can add the Chelex slurry to the tubes before the filter paper too). Incubate the tubes in a heat block or PCR machine at 9-100°C for 10 minutes, vigorously vortexing the tubes periodically (every two minutes or so) throughout the incubation.
6. Spin tubes for 30 sec, and using micropipette transfer supernatant to a new microfuge tube. (Don't worry if you pick up a little of the Chelex, as you will be transferring to a third tube). Spin again for 5 min, and carefully transfer supernatant to a third microfuge tube, avoiding the pelleted Chelex. This final extract, which may be faintly amber-colored, can now be used for your primary PCR or stored frozen at -20°C.

Annexe 4: Programmes d'amplification des séquences de gènes et microsatellites

- Programme de 1^{ère} amplification pour *Msp2*:

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

- Programme de 2^{ème} amplification pour *Msp2*:

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	94°C	3min
Dénaturation	94°C	25s
Hybridation	50°C	35s
Elongation	70°C	2min 30s
30 cycles à partir de 2 ^{ème} étape		
Elongation finale	72°C	3min
Conservation	4°C	∞

- Programme de 1^{ère} et 2^{ème} amplification pour *Msp1*:

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	94°C	3min
Dénaturation	94°C	25s
Hybridation	50°C	35s
Elongation	68°C	2min 30s
30 cycles à partir de 2 ^{ème} étape		
Elongation finale	72°C	3min
Conservation	4°C	∞

- Programme de 1^{ère} amplification pour *Glurp*:

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	94°C	3 min
Dénaturation	94°C	25 s
Hybridation	45°C	36 s
Elongation	68°C	2 min
30 cycles à partir de 2 ^{ème} étape		
Elongation finale	72°C	3 min
Conservation	4°C	∞

- Programme de 2^{ème} amplification pour *Glurp*:

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	94°C	3 min
Dénaturation	94°C	1 min
Hybridation	55°C	2 min
Elongation	70°C	2 min
30 cycles à partir de 2 ^{ème} étape		
Elongation finale	72°C	3 min
Conservation	4°C	∞

- Programme de 1^{ère} amplification pour *Ca-1*, *Ta-87* et *Ta-99*:

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	95°C	5min
Dénaturation	92°C	30s
Hybridation	45°C	30s
Elongation	65°C	30s
45 cycles à partir de 2 ^{ème} étape		
Elongation finale	65°C	5min
Conservation	4°C	∞

- Programme de 2^{ème} amplification pour *Ca-1*, *Ta-87* et *Ta-99*:

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	95°C	5min
Dénaturation	92°C	30s
Hybridation	45°C	30s
Elongation	65°C	30s
20 cycles à partir de 2 ^{ème} étape		
Elongation finale	65°C	5min
Conservation	4°C	∞

Annexe5 : Séquences des amorces :

Couple d'amorces de 1^{ère} amplification pour *MSP2*:

S2: 3'GAAGGTAATTAAAACATTGTC 5'

S3: 5'GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG 3'

Couple d'amorces de 2^{ème} amplification pour *MSP2*:

S1: 3' GAGTATAAGGAGAAGTATG 5'

S4: 5' CTAGAACCATGCATATGTCC 3'

Couple d'amorces de 1^{ère} amplification pour *MSP1*:

O1 : 3'CACATGAAAGTTATCAAGAACTTGTC 5'

O2 : 5'GTACGTCTAATTCATTTGCACG 3'

Couple d'amorces de 2^{ème} amplification pour *MSP1*:

N1: 3' GCAGTATTGACAGGTTATGG 5'

N2: 5' GATTGAAAGGTATTTGAC 3'

Couple d'amorces de 1^{ère} amplification pour *Ca-1*:

CA 1-1L : 3'GCTGTAAAACGTGAACAACAAA 5'

CA 1-1R : 5'CAATTCTGCTTCAGTTGGATT 3'

Couple d'amorces de 2^{ème} amplification pour *Ca-1*:

CA1-L : 3'ATTATGAACAATTCAGAC5'

CA1-R : 5'GTTGTTATAGCTAATGAG 3'

Couple d'amorces de 1^{ère} amplification pour *Ta-87*:

Ta-87-1L : 3'ATTATTTCCAAATGTTTCAATGTC5'

Ta-87-1R : 5'GTTTGGTCCTAAATTATTCAACAT3'

Couple d'amorces de 2^{ème} amplification pour *Ta-87*:

Ta-87-L : 3'AATGGCAACACCATTCAAC5'

Ta-87-R : 5'ACATGTTTCATATTACTIONCAC3'

Couple d'amorces de 1^{ère} amplification pour *Ta-99*:

Ta-99-1L : 3'AACATGAATCTTGCAACAAATA5'

Ta-99-2R : 5'GTATGTATAGGCACTGCATTTAT3'

Couple d'amorces de 2^{ème} amplification pour *Ta-99*:

Ta-99-L : 3'ATGCTATGGGAAATATAAC5'

Ta-99-R : 5'ATGAATCTTCATTATTAATAATGT3'

Annexe 6: Protocole du test de quiescence.

Protocole de test de quiescence *in vitro* d'un isolat de *P. falciparum*

Chaque jour, 3 prélèvements par site seront inclus dans l'étude :

- 1 échantillon correspondant à une parasitémie comprise entre 0.5 et 1% et - 2 échantillons avec une parasitémie comprise entre 1 et 2%.

Les prélèvements seront effectués en alternance sur les 2 sites de façon à recevoir 1 jour/2 des échantillons du site 1 et 1 jour/2 des échantillons du site 2 et ainsi à obtenir un total de 40 échantillons du site 1 et 40 échantillons du site 2.

Jour 0 :

Préparation du milieu de culture : peut être conservé à 4°C pendant 8 à 10j maximum.
Penser à noter la date le jour de préparation.

[Milieu de culture : RPMI 1640 GIBCO 50 ml qsp - ALBUMAX II 250 mg - Sérum humain du groupe AB 5% - Hypoxathine 1 mg.]

- Peser 250 mg d'ALBUMAX II et 1 mg d'Hypoxathine. Dissoudre dans 50 ml de RPMI 1640 et filtrer sur 0.2 µm afin d'obtenir une solution stérile.
- Ensuite, ajouter 2.5 ml de sérum humain AB stérile dans 47.5 ml de cette solution. On obtient ainsi le milieu de culture qui doit être conservé à 4°C.

Conservation et lavage des échantillons d'isolat inclus dans l'étude:

- Prélever du sang veineux chez le patient dans 2 tubes héparinés de 3 ml.
- Centrifuger un tube à 230 x g pendant 5 minutes. Eliminer le plasma avec une pipette de 5 ml stérile dans un périmètre stérile à côté d'un bec bunsen.
- Transférer le culot globulaire (correspondant à environ 1,2 à 1,5 ml) avec cette même pipette de 5 ml stérile dans un cryotube contenant déjà la solution de congélation. Bien homogénéiser.
- Déposer immédiatement le tube dans l'azote liquide pour conservation.

[Composition de la solution de congélation déjà préparée = sorbitol 3% ; NaCl 0.65% ; glycérol 28% dans de l'eau distillée stérile.]

- Ce 1^{er} tube sera stocké dans une bonbonne portable d'azote liquide puis acheminé quotidiennement à Bamako.
- Le second tube de sang veineux hépariné sera stocké immédiatement à 4°C dans une glacière puis acheminé quotidiennement à Bamako.

A Bamako, sous hotte stérile

- Au MRTC, sur ce 2nd tube, centrifuger à 230 x g pendant 5 minutes. Eliminer le plasma, transférer le culot globulaire dans un tube Falcon de 50 ml et ajouter 20 ml de RPMI pour lavage. Centrifuger à 230 x g pendant 5 minutes et éliminer le surnageant. Refaire ce lavage 1 fois. Après lavage, faire un frottis coloré au Giemsa pour estimer la parasitémie.

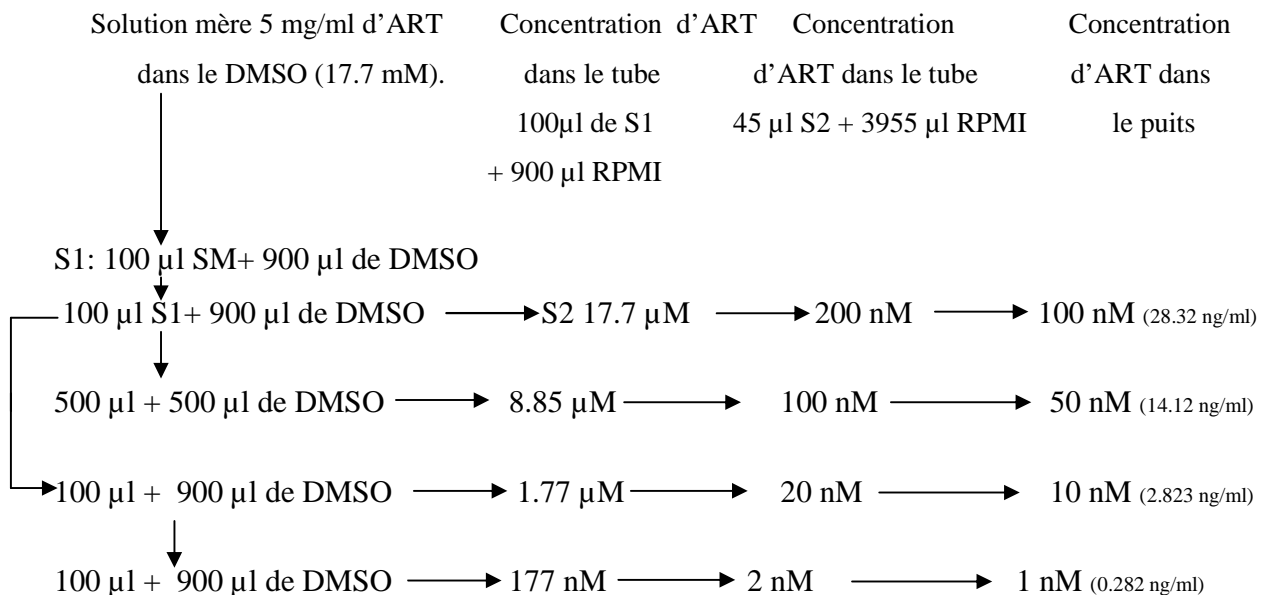
Préparation de la suspension de l'isolat :

- Mettre en suspension 360 µl de ce culot globulaire dans 9 ml de milieu de culture, déjà préparé et préchauffé à 37°C. On obtient ainsi un hémocrite de 4%.
- Distribuer précautionneusement 1 ml de cette suspension avec une P1000 successivement dans 8 puits d'une plaque de 24 puits.
- Mettre immédiatement la plaque à l'étuve 37°C, en atmosphère trigaz et continuer la suite des opérations.

- **Préparation des solutions d'artémisinine :** Les solutions d'artémisinine dans le DMSO peuvent être conservées à 4°C et utilisées pendant 3 jours mais les solutions dans le RPMI doivent être faites extemporanément tous les jours. (penser à noter sur les tubes les dates correspondant au jour de préparation)

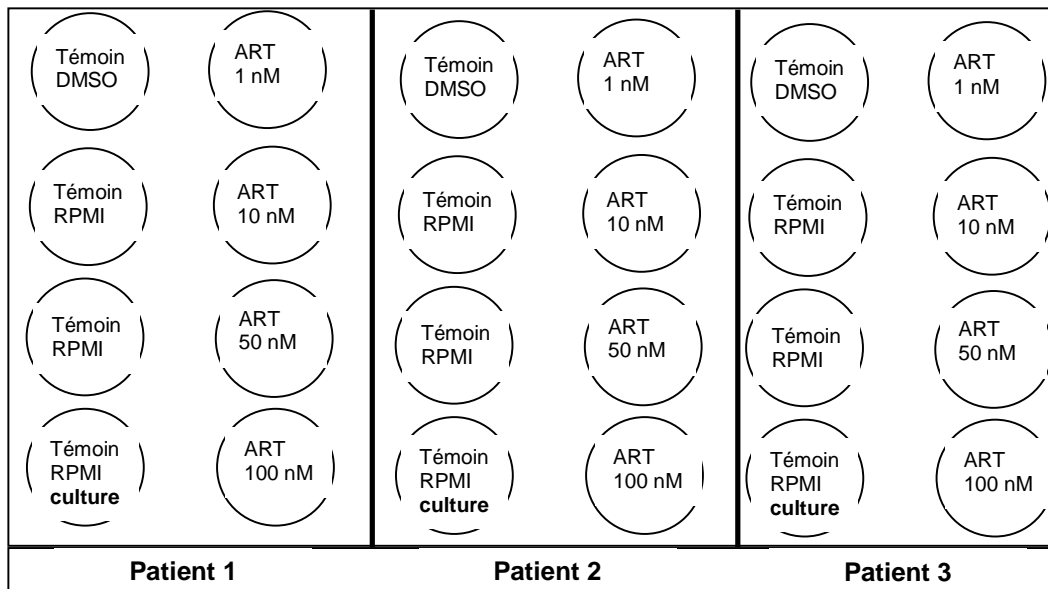
Il s'agit de préparer dans des tubes des solutions de concentrations de 2000 nM, 200 nM, 100 nM, 20 nM et 2 nM d'artémisinine (ART) dans le RPMI à 0.05% de DMSO :

- Préparer une solution mère d'ART de 5 mg/ml dans le DMSO : dissoudre 5 mg d'ART dans 1 ml de DMSO dans un tube et vortexer.
- A partir de cette solution mère, préparer des dilutions pour obtenir 4 ml/ plaque de chaque concentration d'ART dans le RPMI 1640 contenant 0.05 % de DMSO (Voir schéma). A chaque étape de dilutions, vortexer les tubes pour homogénéiser.



Dépôt des solutions d'ART sur la plaque :

- Préparer un tube témoin DMSO à 0.1% (diluer 10 µl de DMSO dans 10 ml de RPMI et vortexer). Ce tube sera utilisé durant 3 jours maximum (penser à noter la date du jour de sa préparation)
- Retirer la plaque de l'étuve et faire un plan de plaque selon schéma ci-dessous. Chaque tube d'une concentration donnée d'ART doit correspondre à un puits numéroté de la plaque. Il faut avoir 4 puits pour les 4 solutions d'ART, un puits témoin à 0.05% de DMSO et 3 puits témoins RPMI 1640.
- Déposer 1 ml de chaque solution d'ART et 1 ml de chaque témoin RPMI 1640 et de DMSO dans leur puits correspondant, sans homogénéiser.
- Fermer la plaque et remettre à l'étuve 37°C, en atmosphère trigaz (ou cloche à bougie) pour 48 heures d'incubation. Noter précisément l'heure de la fin de mise en plaque correspondant à **Heure 0**.



Jour 2 : (Heure 48)

Changement de milieu et lavage des puits : (arrêt de l'action de l'artémisinine)

- Après les 48 heures d'incubation, retirer la plaque de l'étuve et transférer le contenu de chacun des puits dans des tubes de 15 ml.
- Centrifuger les tubes à 230 x g pendant 3 minutes. Eliminer le surnageant.
- Laver le culot en ajoutant 10 ml de RPMI 1640, homogénéiser pour remettre en suspension le culot parasitaire.
- Centrifuger à 230 x g pendant 5 minutes.
- Eliminer le surnageant.
- Pour chaque tube ajouter 2 ml du milieu de culture préparé (RPMI-Albumax-hypoxanthine-SH) et mettre les tubes à l'incubateur 37°C.

- Rincer les puits de la plaque avec de l'eau stérile préchauffée à 37°C : remplir chaque puits de 2.5 ml d'eau stérile avec une pipette de 5 ml qui sera changée pour chaque puits et aspirer et refouler plusieurs fois pour bien laver les parois des puits.
- Ensuite enlever cette eau et remplir de nouveau les puits avec le même volume d'eau et refaire le lavage pour une seconde fois.
- Après, sortir les tubes de l'étuve et transférer tout leur contenu (2 ml) dans leur puits correspondant. Remettre la plaque à l'incubateur 37°C, en atmosphère trigaz pour environ 36 heures.
- Noter l'heure de la remise en incubation.

Jour 4 : (Heure 84) : Coloration au Giemsa et à l'Acridine orange (AO) :

- Après les 36 heures d'incubation qui ont suivi le lavage, sortir la plaque de l'incubateur. Remettre en suspension le contenu de chaque puits **sauf un puits témoin RPMI (qui ne sera pas touché et servira de réserve de parasites)**,
- Prélever 1000 µl de chacune de ces suspensions et transférer dans des tubes Eppendorf de 2 ml.
- Remettre la plaque à l'incubateur 37°C, en atmosphère trigaz pour 48 heures.
- Centrifuger les tubes Eppendorf pour avoir un culot.
- Pour chacun, faire **3 frottis** et Sécher rapidement.

Au Giemsa :

- 1 des 3 frottis sera coloré au Giemsa.
- **Observation microscopique** : Observer les lames à l'objectif x 100 en immersion au Microscope optique et apprécier l'état de vie des parasites. Déterminer si possible la parasitémie des formes vivantes.

A l'Acridine orange :

- les 2 autres frottis sont fixés au méthanol par « trempage avec 40 aller-retour ».
- 1 Frottis sera conservé fixé au méthanol mais ne sera coloré à l'AO qu'à Toulouse.

Pour l'autre frottis fixé au méthanol :

- A partir d'une solution mère d'Acridine orange de 1 mg/ml dans de l'eau distillée déjà préparée et conservée à l'abri de la lumière et à 4°C, diluer cette solution mère à 1/100 dans du PBS (mettre 100 µl de la solution d'AO dans 9.9 ml de PBS) pour obtenir une solution de travail de 10µg/ml (qui doit être conservée à l'abri de la lumière et à 4°C). Cette solution au 1/100 d'AO sera utilisée durant 3 jours maximum (penser à noter la date le jour de sa préparation)
- Placer la lame pendant 1 minute dans un récipient contenant cette solution de travail d'AO au 1/100 de façon à ce que le frottis soit entièrement recouvert. L'ensemble de ce dispositif doit être à l'abri de la lumière.
- Rinçage : Après 1 minute à l'AO, tremper le lame dans un récipient contenant du PBS pendant 1 minute
- Laisser sécher à l'air libre mais à l'abri de la lumière

L'observation microscopique doit être faite le plus rapidement possible (3 jours maxi). Observer, à l'obscurité, les lames au microscope à fluorescence UV aux objectifs x 20 sans immersion; et éventuellement x 100 en immersion pour confirmation. Les parasites apparaissent colorés en vert clair

sur fond noir. Sur certaines zones du frottis (flamme), les parasites peuvent apparaître en orange. Apprécier l'état de vie des parasites et le nombre de parasites vivants / champ. Lire environ 10 champs.

Jour 6 : (Heure 132)

Refaire encore les colorations au Giemsa et à l'acridine après 48 heures d'incubation (Jour 6) et passer aux observations microscopiques.

Remise en culture continue

Lorsqu'il y a suspicion de parasites résistants des puits traités à l'artémisinine aux jours 4 et 6 ou si retard de clairance parasitaire clinique avérée, réaliser une culture continue à partir du puits témoin RPMI de réserve en transférant dans une flasque 25 cm², les 2ml du puits avec 100 µl de sang non immun et 10 ml de milieu de culture (RPMI - Albumax - hypoxanthine sérum humain AB).

Remettre la flasque à l'incubateur 37°C, en atmosphère trigaz. Faire un changement de milieu tous les 2 jours avec un rajout de 25 µl de sang 2 fois par semaine.

Au bout de 8 jours de culture, faire frottis avec coloration en AO. Si aucun parasite vivant visible, éliminer cette flasque. Si parasites vivants présents, culture continue classique avec changement de milieu tous les 2 jours et réajustement de l'hématocrite pour avoir un hématocrite entre 2 et 3 %.

Dès que la culture de parasites semble pérenne et qu'elle a atteint une parasitémie d'environ 5%, penser à congeler (avec la solution de congélation déjà préparée). Attention toujours congeler lorsque les parasites sont majoritairement au stade ring (les autres stades sont tués par la congélation).

Fiche signalétique

Nom: NIARE

Prénom: Karamoko

Nationalité: Malienne

Date de soutenance:janvier 2012

Ville de soutenance: Bamako

Titre: Efficacité des combinaisons AL et AS/SP et quiescence des isolats parasitaires de *P. falciparum* tolérants à l'artémisinine au Mali.

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie. BP 1805 – Mali.

Secteur d'intérêt: Parasitologie, Santé publique, Pharmacodynamie primaire,.

Résumé:

Il a été montré que *Plasmodium falciparum* entre en quiescence en réponse au stress provoqué par l'exposition à l'artémisinine (ART) et ses dérivés. Récemment, des souches de laboratoire résistantes à ces molécules ont été sélectionnées. Le mécanisme de résistance affecterait le caractère de quiescence des parasites.

Le but de notre travail consistait à évaluer l'efficacité de l'ART sur les isolats de *Plasmodium falciparum* provenant des zones d'endémie palustre au Mali où les dérivés d'artémisinine sont utilisés pour la prise en charge de tous les cas de paludisme simple.

Nous avons effectué des tests *in vitro* basés sur la révélation des parasites tolérants à l'ART par un mécanisme de quiescence sur des isolats prélevés au cours d'un essai *in vivo* des combinaisons AL et AS/SP dans deux zones endémiques au Mali.

Les isolats parasitaires ont été exposés à une gamme de concentrations d'ART dans une plaque à 24 puits (1nM – 10nM - 50nM - 100nM et un puits témoin avec du DMSO) et gardés en culture pendant environ 48 heures (cloche à bougie, 37°C, hématocrite 2%, Sérum AB 2.5%). Les parasites ont été ensuite lavés et remis en culture (cloche à bougie, 37°C, hématocrite 2%, Sérum AB 5%) dans un milieu exempt de ART afin de déterminer la survie et le stade des parasites après environ 46 et 92 heures. Les résultats des puits exposés à l'ART ont été comparés à ceux des puits témoins DMSO.

Sur les 46 isolats traités, les proportions des phénotypes tolérants à 100nM d'ART et à 50nM étaient comparables, soit 14,64%. Les phénotypes parasitaires (58,54%) dont les limites de tolérance sont comprises entre 10 – 50nM étaient les plus dominants.

Les taux d'efficacité *in vivo* des combinaisons AL (98,75%) et AS/SP (100%) après correction moléculaire par PCR étaient comparables. L'AL corrigeait mieux l'anémie que l'AS/SP.

Nous n'avons pas de liaison significative entre la tolérance des parasites aux concentrations d'ART de 50 et 100nM et la survenue des échecs *in vivo*, de la gamétocytémie et de l'anémie.

Pour les 12 isolats tolérants, nous avons observés plus de stade trophozoïte à 100nM (80%) et 50nM (66,67%) d'ART qu'au témoin DMSO (58,33%). Contrairement au témoin, la majorité des stades parasitaires à 50 et 100nM d'ART était des rings et trophozoïtes. Ces observations étaient comparables à celles de l'étude menée par Witkowski sur la résistance de *P. falciparum* à l'ART par le phénomène de quiescence.

Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence la relation directe entre les concentrations d'ART de 50 et 100nM et l'apparition d'un stade parasite donné.

Au vu des résultats obtenus, la poursuite de cette étude est nécessaire pour effectuer des expériences et analyses plus approfondies sur la recherche d'isolats tolérants à l'ART par le phénomène de quiescence au Mali.

Mots clés : test *in vitro*, quiescence, artémisinine, tolérance, *P. falciparum*.

Specification sheet:

Fist name: Karamoko

Nationality: Mali

City of graduation: Bamako

Name: NIARE

Date of thesis defense: January .../2013

Title: Efficacy of the combinations AL and AS/SP and quiescence of *P. falciparum* isolates tolerant to artemisinin in Mali.

Deposition: Library of the Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology. BP 1805 – Mali.

Subject area: Parasitology, Public health, Primary pharmacodynamics,.

Summary:

It has been showed that *P. falciparum* entered a state of quiescence in response to stress caused by exposure to artemisinin (ART) and its derivatives. Recently, some laboratory strains resistant to artemisinin have been selected. The quiescence character was demonstrated to be implicated in the mechanism of resistance to ART.

The goal of our present study was to evaluate the effectiveness of ART on *Plasmodium falciparum* isolates from malaria-endemic areas in Mali, where artemisinin derivatives are used for the management of all cases of uncomplicated malaria.

We performed *in vitro* assay based on the revelation of quiescent artemisinin-tolerant parasites from isolates collected during an *in vivo* study of two artemisinin-based combination therapies, namely, AL and AS / SP in two endemic areas in Mali.

Isolates from the field sites were exposed to a range of concentrations of artemisinin (ART) in a 24 well plate (1nM, 10nM, 50nM, 100nM, and a control with DMSO) and kept in culture for approximately 48 hours (candle jar, 37°C, 2% hematocrit, AB serum 2.5%). Parasites were then washed and returned to culture (candle jar, 37 ° C, hematocrit 2% AB serum 5%) in a ART free medium to determine the survival and stages of parasites after 46 and 92 hours. The parasites exposed to ART were compared with those of DMSO control wells.

From a total of 46 isolates, the proportion of tolerant phenotypes at 100nM of artemisinin was comparable with those at 50nM (14.64%). We observed higher proportion (58.54%) of parasite phenotype with tolerance limit comprised in 10 - 50nM.

The PCR-corrected *in vivo* efficacy rates of both combinations AL (98.75%) and AS/SP (100%) were comparable. AL corrected the anemia better than AS/SP.

We found no direct relationship between the tolerance to high concentrations of ART (50 and 100nM) and the occurrence of treatment failure, anemia and gametocyte carriage with AL and AS / SP.

For the 12 tolerant isolates, we observed more trophozoite stage at 100nM (80%) and 50nM (66.67%) of ART than in the DMSO control (58.33%). In contrast to the control, the majority of the parasite was ring and trophozoite stages at 50 and 100nM of ART. Our observations were similar to those of study carried out by Witkowski on the resistance of *P. falciparum* to ART by quiescence phenomenon.

However, we have not been able to demonstrate the direct relationship between concentrations of 50 and 100nM of ART and the occurrence of a given parasite stage.

Considering the results obtained, further studies are necessary to understand the tolerance of parasite isolates to ART by the phenomenon of quiescence in Mali.

Keywords: *in vitro* assay, quiescence, artemisinin tolerance, *P. falciparum*.

Serment de Galien:

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.