

REPUBLIQUE DU MALI

**Un Peuple - Un But - Une Foi**

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



**U.S.T.T.B**



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2018-2019

N°/ 112

**Prévalence des mutations sur le gène *Pfdhfr*  
dans les localités de Dioro, Missira et Sélingué.**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 10/12/2019 devant la Faculté de Pharmacie pour  
obtenir le grade de

**DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)**

Par

**M. Moustaf OULALE**

JURY

Président du jury :

Pr. Ababacar MAIGA

Membres :

Dr. Djéneba DABITAO

M. Ibrahim KEITA

Directeur de thèse :

Pr. Ousmane KOITA

Co-directeur de thèse :

Dr. Youssouf DIARRA

**LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2018-2019**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN** : M. Boubacar TRAORE, Professeur

**VICE-DOYEN** : M. Ababacar MAIGA, Professeur

**SECRÉTAIRE PRINCIPAL** : M. Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

**AGENT COMPTABLE** : M. Famalé DIONSAN, Contrôleur des Finances.

**PROFESSEURS HONORAIRES**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologue
2	Mahamadou	CISSE	Biologie
3	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
4	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
5	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
6	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
7	Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
8	Alou A.	KEÏTA	Galénique
9	Mamadou	KONE	Physiologie
10	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
11	Brehima	KOUMARE	Pharmacognosie
12	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
13	Elimane	MARIKO	Pharmacologie

**DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

**1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique

6	Amagana	DOLO	Parasitologie – Mycologie
7	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique / Nutrition
8	Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
9	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

**2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie - Virologie
2	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
3	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
4	Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER
5	Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé Environnement

**3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie Clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie Clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
6	Souleymane	DAMA	Parasitologie Entomologie Méd.
7	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
8	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
9	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
10	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
11	Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
12	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
13	Kassoum	KAYENTAO	Santé Publique/ Biostatistiques
14	Aminata	KONE	Biologie Moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé Publique
16	Dionkorma	OULOLOGUEM	Biologie Cellulaire

17	Issaka	SAGARA	Santé Publique/Biostatistiques
18	Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
19	Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé Communautaire
20	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique/ Biostatistique

#### 4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie Végétale
4	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
5	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
6	Oumar	GUINDO	Epidémiologie
7	Falaye	KEÏTA	Santé Publique/Santé Environnement
8	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
9	Yacouba	MAÏGA	Biostatistique
10	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
11	Oumar	SANGHO	Epidémiologie
12	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

#### DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

##### 1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Saïbou	MAÏGA	Législation
3	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie <b>Chef de DER</b>

##### 2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

### 3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
6	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
7	Moussa	SANOGO	Gestion
8	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

### 4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
2	Antoine	DARA	Sciences Pharmaceutiques
3	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
4	Adama	DENOU	Pharmacognosie
5	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
6	Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
7	Assitan	KALOGA	Législation
8	Ahmed	MAÏGA	Législation
9	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique
10	Aboubacar	SANGHO	Législation
11	Bourama	TRAORE	Législation
12	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
13	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
14	Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
15	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

**DER : SCIENCES DU MÉDICAMENT**  
**1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
2	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
3	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

**2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie <b>Chef de DER</b>

**3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
2	Mody	CISSE	Chimie Thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

**4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOOU	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
8	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
9	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
10	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

**DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

**1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
2	Cheick F.	TRAORE	Biologie/ Entomologie
3	Mahamadou	TRAORE	Génétique

**2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

**3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
2	Boureima	KELLY	Physiologie Médicale

**4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE**

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

**CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Adourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
4	Souleymane	COULIBALY	Psychologue
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Modibo	DIARRA	Nutrition
7	Moussa I	DIARRA	Biophysique
8	Babacar	DIOP	Chimie

Prévalence des mutations sur le gène *Pfdhfr* dans les localités de Dioro, Missira et Sélingué

9	Atimé	DJIMDE	Bromatologie
10	Yaya	KANE	Galénique
11	Boubacar	KANTE	Galénique
12	Aboubakary	MAÏGA	Chimie Organique
13	Massambou	SACKO	SCMP/SIM
14	Modibo	SANGARE	Anglais
15	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
16	Mme Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
17	Fana	TANGARA	Maths
18	Abdel Kader	TRAORE	Pathologies Médicales
19	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie Médicale
20	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique



**DEDICACE &  
REMERCIEMENTS**

**Dédicace :**

Je dédie ce **travail à ma famille.**

## REMERCIEMENTS

**A mon père, Elhadj Cheickné OULALE** 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.

### **A ma mère feu Aissata Haidara**

En témoignage de ce que j’étais pour toi : un fils, un confident. Je ne peux jamais te remercier pour les efforts que tu as consentis pour m’accompagner durant tout mon cycle. Je pleure ton absence à la cérémonie d’aujourd’hui car je suis le fruit de ton éducation et d’une sagesse incomparable de ta part. Tu as pu me supporter et m’entretenir avec un grand amour. Tu m’as laissé un très grand vide, je te porterai à jamais dans mon cœur et je prierai ALLAH tous les jours pour le repos éternel de ton âme. Ce travail est le fruit de ta détermination.

**A mes frères et sœurs**, Aissata dite **Djénéka, BALLA**, Abdoul **Kader, Babina, Karamoko, Mamadou, Oumar, Mah THINA, Kadidiatou, Tata** ... Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l’immense amour que je vous porte, Vous faites partie des hommes et des femmes qui ont constitué le socle de ma vie d’enfance et d’adolescence dont les efforts et les sacrifices n’ont jamais cessé pour mon instruction et mon bien-être. Je vous témoigne toute ma profonde gratitude pour vos engagements qui m’ont permis d’opter pour cette noble profession et vos « **critiques** » qui m’ont aidé à me surpasser.

Je vous rends hommage à travers ce modeste travail en guise de reconnaissance pour votre accompagnement indéfectible.

**A mes intimes amis** Abdourahamane El Moctar H Aidara, Aissata Saliou Dicko, Abdoulaye M Toure, Djibril S Toure, Aboubacar Kola, Hama Alkalifa Maiga, Demba Barry, Moussa Traore, et à tous mes autres amis de Tonka, Mopti pour leurs conseils et accompagnements sans faille. Chers amis, soyez rassurés 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** Dr Modibo Telly, Dr Nouhoum Thiam, Dr Zakaria Haidara et Dr Hamadou Bouare et Hamadoun Traore 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 tous mes collaborateurs du LBMA**

Cette thèse est le couronnement de vos efforts. J'ai passé de bons moments à vos côtés. Je me suis senti en famille. Puisse Dieu nous permettre de revivre de pareils instants ! Merci pour votre accueil chaleureux et vos aides bien précieuses.

**A toute la promotion Pr Albert Yéménique Dembélé** (10<sup>ème</sup> promotion) pour le climat d'entente, de gaieté et de compassion mutuelle que nous avons fait valoir durant notre cycle. Que Dieu puisse accorder beaucoup de chance et de réussite à nous tous dans nos carrières professionnelles respectives.

#### **A mes ami(e)s et collègues**

Mamadou DIALLO, Hampata DICKO, Marcel TRAORE, Ibrahim DIOP, Alhassane MARIKO, Balla COULIBALY, Sékou O SANGARE, Retrouvez ici toute ma profonde gratitude. Que le bon Dieu puisse consolider davantage nos liens d'amitié.

**A tous mes pères, oncles et tantes** à Tonka, Mopti, Bamako, Léré, et d'ailleurs, particulièrement à Boubacar OULALE. Ce travail est le vôtre. Recevez l'expression de mes sentiments de reconnaissance et gratitude.

**A mes Co-thésards du LBMA** : B MACALOU, M TRAORÉ, B COULIBALY, T TRAORÉ, A GUITÉYE, Amadou DIAKITÉ, Beatrice TOGO, RABIAS AMINOU. Nous avons partagé de bons moments ensemble. J'espère aussi que ce ne sont pas les derniers. Que Dieu soit notre guide !

**A tous les membres de l'Amicale des Etudiants en Pharmacie** : Hassane KANTE, Ibrahim DIOP, Lassine DIALLO PHENO, Mamadou Ben SIDIBE, Bintou COULIBALY ... ; j'ai apprécié cette collaboration saine et productive dans laquelle j'ai beaucoup eu et appris de vous.

**Merci à tous mes enseignants** du premier cycle, second cycle et du lycée plus particulièrement à **M. Harber TOUNKARA et Idrissa CAMARA**, pour m'avoir transmis vos connaissances et m'avoir guidée dans le domaine de la pharmacie. Travailler avec vous fut un réel plaisir pour moi.

Mention spéciale à ma Pharmacienne Dr **LANDOURE** Mariam **BOCOUM**, tu as été plus qu'une Pharmacienne pour moi, l'amour maternelle dont tu as fait preuve à mon égard m'a permis d'avoir confiance en moi et surmonter les obstacles de la vie. que le tout puissant te récompense pour cela....

Merci à tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.

# **Hommage aux membres du jury**

## HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

### A notre Maître et Président du Jury

#### Pr Ababacar I. MAIGA

- **Docteur en Pharmacie (PharmD, PhD) ;**
- **Professeur Titulaire de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Vice-Doyen de la Faculté de Pharmacie ;**
- **Ancien Directeur Adjoint de la Direction de Pharmacie et du Médicament.**

Cher maître,

Nous vous disons merci d'avoir présidé cette thèse. A votre école scientifique nous avons appris la rigueur, la patience, la persévérance dans le travail bien fait. Nous sommes heureux d'être comptés parmi vos élèves. Soyez rassuré, cher maître, de notre sincère admiration, et de notre profonde gratitude.

**A notre Maître et membre du Jury**

**Docteur Djénéba DABITAO**

- **Docteur en Pharmacie ;**
- **PhD en Biologie Moléculaire / Immunologie ;**
- **Maitre Assistante à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Chef du Laboratoire ImmunoCore de l'UCRC**

Chère maître,

Nous sommes très honorés que vous soyez parmi les membres du jury ayant dirigé les travaux de notre thèse. C'est une grande chance pour nous de recevoir les enseignements d'une maitresse d'une immense capacité scientifique comme vous. Malgré vos multiples occupations, vous nous avez accordé de votre temps pour améliorer ce travail. Nous vous remercions pour tous vos conseils et encouragements.

Veillez accepter, cher maitre, l'expression de notre profonde gratitude.



**A notre Maître et membre du Jury**

**M. Ibrahim KEITA**

- **Assistant en Biologie Moléculaire à la Faculté de Médecine et d’Odonto-Stomatologie ;**
- **Attaché de recherche au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée.**

Cher maître,

Encadrer n’est pas une tâche facile. Votre sympathie, votre courage, votre détermination, votre simplicité et surtout votre aptitude scientifique sont les qualités qui vous définissent. Vous nous avez initiés aux premiers pas de la recherche. Nous avons beaucoup bénéficié de vos judicieux conseils durant toute la réalisation de ce travail. Permettez-nous aujourd’hui encore de réitérer notre indéfectible gratitude.

## A notre Maître et Directeur de thèse

### Professeur Ousmane KOITA

- **Pharmacien Biologiste (PharmD, PhD) ;**
- **Professeur en Parasitologie Moléculaire ;**
- **Ancien Directeur-Adjoint du SEREFO ;**
- **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée.**

Cher maître,

Nous avons été très séduits par votre conviction pour la recherche, par votre disponibilité et la qualité de votre enseignement. Votre modestie, votre ouverture d'esprit et votre rigueur scientifique font de vous un modèle à suivre. Vos qualités de chercheur émérite vous placent aujourd'hui dans l'arène internationale.

Ce fut un honneur pour nous d'être comptés parmi vos étudiants.

Que Dieu vous donne une longue et heureuse vie !

**A notre Maître et co-directeur de thèse**

**Docteur Youssouf DIARRA**

- **Docteur en Pharmacie ;**
- **Attaché de Recherche à l'USTTB.**

Cher **maître**,

Nous avons beaucoup apprécié votre disponibilité et vos qualités humaines. Nous avons été marqués par la simplicité avec laquelle vous avez accepté de co-diriger ce travail. Vos qualités d'homme de science, votre gentillesse, votre modestie envers vos collègues et vos étudiants ont forgé une certaine admiration pour votre personne. Aussi ne pouvons-nous jamais assez-vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour la réalisation de ce travail. Nous vous prions cher maître, de recevoir l'expression de notre profonde reconnaissance malgré la distance qui nous sépare.

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Faciès épidémiologiques du paludisme au Mali .....	18
Tableau II: Composition du mélange réactionnel de la 1 <sup>ère</sup> réaction d'amplification du gène <i>Pfdhfr</i> .....	49
Tableau III: Composition du mélange réactionnel de la 2 <sup>ème</sup> réaction du premier produit d'amplification du gène <i>Pfdhfr</i> . ....	49
Tableau IV: Mélange réactionnel de l'ExoSAP .....	50
Tableau V: Cycle de séquençage .....	51
Tableau VI: Répartition des 111 échantillons selon leur site. ....	54
Tableau VII: Statut des échantillons selon qu'ils aient été séquencés ou pas.....	54
Tableau VIII: Répartition des séquences selon qu'elles soient bonnes ou mauvaises. ....	55
Tableau IX: Répartition des séquences selon la qualité des données brutes.....	55
Tableau X: Répartition des séquences selon leur le pourcentage en GC .....	56
Tableau XI: Répartition des séquences selon le résultat du blast. ....	56
Tableau XII: Répartition des patients en fonction des tranches d'âge. ....	57
Tableau XIII: Répartition des patients par tranches de parasitémies (n=111). ....	58
Tableau XIV: Mutations obtenues sur le gène <i>Pfdhfr</i> lors du séquençage. ....	59
Tableau XV: Prévalences des mutations ponctuelles individuelles rencontrées sur le gène <i>Pfdhfr</i> aux positions 51, 59, 108 et 164.....	60
Tableau XVI : Corrélation entre l'âge et les mutations sur le gène <i>Pfdhfr</i> aux positions 51, 59, 108 et 164 .....	60
Tableau XVII : Corrélation entre la parasitémie et les mutations sur le gène <i>Pfdhfr</i> aux positions 51, 59, 108 et 164.....	61
Tableau XVIII : Combinaison des multiples mutations sur le gène <i>Pfdhfr</i> . ....	62
Tableau XIX : Mutation 164L associée aux autres positions du gène <i>Pfdhfr</i> .....	63

## LISTE DES FIGURES

Figure I: Mutations sur le gène <i>Pfdhfr</i> associées à la résistance de <i>P. falciparum</i> à la pyriméthamine.....	10
Figure II: Carte de répartition du paludisme dans le monde .....	16
Figure III : Distribution de cas de paludisme au Mali.....	17
Figure IV: Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'Homme et le moustique. ....	23
Figure V: Structure chimique de la Sulfadoxine et Pyriméthamine.....	34
Figure VII: Structure chimique de l'amodiaquine .....	36
Figure VIII : Structure chimique de l'artémisinine .....	37
Figure IX : Structure chimique de l'artéméther et l'artésunate.....	37
Figure X: Séquenceur du LBMA (CEQ 8000 dna analyzer, beckman coulter).....	44
Figure XI : Cartes du Mali avec les sites d'études. ....	46
Figure XII: Répartition des patients selon le genre.....	57
Figure XIII: Image du séquençage sur le gène <i>Pfdhfr</i> à la position 108 .....	58

## LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>AQ</b>	Amodiaquine
<b>AEP :</b>	Amicale des Etudiants en Pharmacie
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>CI</b>	Concentration Inhibitrice
<b>C-G</b>	Cytosine-Guanine
<b>CPN</b>	Consultation Prénatale
<b>CPS</b>	Chimioprévention du Paludisme Saisonnier
<b>CQ</b>	Chloroquine
<b>CSCom</b>	Centre de Santé Communautaire
<b>CSRéf</b>	Centre de Santé de Référence
<b>CTA</b>	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
<b>CRT</b>	Chloroquine transférase
<b><i>DHFR</i></b>	<i>Dihydrofolate réductase</i>
<b><i>DHPS</i></b>	<i>Dihydroptéroate synthase</i>
<b>DTCS</b>	Dye Terminator Cycle Sequencing
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tétra Acétique
<b>FESPAO</b>	Fédération des Etudiants en Sciences Pharmaceutiques de l'Afrique de l'Ouest
<b>FM</b>	Frottis Mince
<b>FRC</b>	Formulaire de Report de Cas
<b>GE</b>	Goutte Epaisse
<b>HRM</b>	Hight Resolution Melting
<b><i>HRP2</i></b>	<i>Histidin Rich Protein 2</i>
<b>LBMA</b>	Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
<b>MIILDA</b>	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b><i>LDH</i></b>	<i>Lactate Déshydrogénase</i>

<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<i>Pfcr</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquino- resistance transporter
<i>Pfdhfr</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase
<i>Pfdhps</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydroptéroate synthase
<i>Pfmdr</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> multi-Drug resistance
<b>PNLP</b>	Programme National de Lutte contre le Paludisme
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>SLS</b>	Sample Loading Solution
<b>SP</b>	Sulfadoxine / Pyriméthamine
<b>TDR</b>	Test de Diagnostic Rapide
<b>TPI</b>	Traitement Préventif Intermittent
<b>TPIe</b>	Traitement Préventif Intermittent chez l'enfant
<b>TPIg</b>	Traitement Préventif Intermittent pendant la grossesse
<b>TPI<sub>n</sub></b>	Traitement Préventif Intermittent chez le nourrisson
<b>TPI<sub>v</sub></b>	Traitement Préventif Intermittent chez les voyageurs
<b>UCRC</b>	University Clinical Research Center
<b>VIH</b>	Virus de l'Immuno-déficience Humaine

## TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION .....	1
2	OBJECTIFS .....	4
2.1	Objectif General .....	4
2.2	Objectifs spécifiques.....	4
3	GÉNÉRALITÉS .....	5
3.1	Définitions .....	5
3.1.1	Paludisme .....	5
3.1.2	Mutation .....	5
3.1.3	Mutations du gène <i>dhfr</i> .....	9
3.2	Marqueurs moléculaires de résistance .....	12
3.3	Historique .....	14
3.4	Répartition géographique .....	15
3.5	Biologie .....	18
3.5.1	Vecteur .....	18
3.5.2	Systématique .....	19
3.5.3	Agent pathogène.....	20
3.5.4	Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> .....	20
3.6	Diagnostic biologique.....	23
3.7	Manifestation du paludisme.....	26
3.8	Traitement du paludisme .....	27
3.8.1	Politique de traitement du paludisme .....	27
3.8.2	Traitement du paludisme simple à <i>Plasmodium falciparum</i> .....	27
3.8.3	Traitement du paludisme grave à <i>Plasmodium falciparum</i> .....	28
3.8.4	Traitement du paludisme simple aux autres espèces plasmodiales.....	29
3.9	Lutte antivectorielle .....	29
3.10	Chimioprophylaxie .....	30



3.11	Classification des antipaludiques.....	32
3.12	Résistance aux antipaludiques .....	37
3.12.1	Conséquences de la résistance.....	38
3.12.2	Pharmacodynamique des antipaludiques et sélection de la résistance .....	39
3.13	Méthodes d'étude de l'efficacité des antipaludiques.....	41
3.13.1	Tests d'efficacité thérapeutiques .....	41
3.13.2	Tests <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i> .....	41
3.14	PCR classique .....	42
3.15	High Résolution Melting (HRM) : Fusion à Haute Résolution.....	42
3.16	Séquençage .....	43
4	MÉTHODOLOGIE.....	45
4.1	Sites et Populations d'étude.....	45
4.2	Type et période d'étude .....	46
4.3	Population d'étude .....	47
4.4	Critères d'inclusion.....	47
4.5	Critères de non inclusion .....	47
4.6	Echantillonnage .....	47
4.7	Traitement des échantillons .....	47
4.8	Méthodes moléculaires .....	48
4.8.1	Séquençage des échantillons .....	48
4.9	Considérations éthiques et déontologiques.....	52
4.10	Gestion des données .....	53
5	RÉSULTATS .....	54
5.1	Répartitions des échantillons .....	54
5.2	Qualité et Statut des séquences.....	54
5.2.1	Statut des séquences .....	54
5.2.2	Qualité des séquences.....	55

5.3	Paramètres de contrôle du séquençage .....	55
5.4	Facteurs sociodémographiques et densité parasitaire .....	56
5.4.1	Facteurs sociodémographiques .....	56
5.4.2	Densité parasitaire .....	57
5.5	Fréquence des mutations ponctuelles individuelles rencontrées sur le gène <i>Pfdhfr</i> ..	59
5.6	Corrélation entre les mutations sur le gène <i>Pfdhfr</i> aux positions (51, 59, 108 et 164) et l'âge et la parasitémie .....	60
5.6.1	Corrélation entre l'âge et les mutations.....	60
5.6.2	Corrélation entre la parasitémie et les mutations .....	61
5.7	Prévalence de haplotypes <i>Pfdhfr</i> .....	62
6	COMMENTAIRES ET DISCUSSION .....	64
6.1	Méthodologie.....	64
6.1.1	Lieux d'étude.....	64
6.1.2	Méthodes de laboratoire .....	64
6.1.3	Extraction de l'ADN de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	65
6.1.4	Utilisation de la PCR niché .....	65
6.2	Résultats.....	65
6.2.1	Facteurs démographiques .....	65
6.2.2	Paramètres de contrôle .....	66
6.2.3	Séquençage du matériel génétique de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	66
7	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	70
7.1	Conclusion.....	70
7.2	Recommandations .....	70
8	REFERENCE.....	71
9	ANNEXES .....	xxiv
9.1	Annexe 1.....	xxiv
9.2	Annexe 2.....	xxv

9.3 Annexe 3 ..... xxvii

# INTRODUCTION

## 1 INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie (maladie des globules rouges du sang) parasitaire potentiellement mortelle, dû à un hématozoaire (Parasite des globules rouges du sang) du genre *Plasmodium*, transmis par la piqûre de la femelle d'un moustique infecté du genre *Anophèles* [1]. « L'apparition et la propagation de parasites résistants aux antipaludiques ont eu des conséquences désastreuses en santé publique dans la seconde moitié du XXe siècle. Elles ont alourdi le coût économique de la lutte contre le paludisme et ont mis à mal les progrès obtenus lors de la campagne mondiale d'éradication lancée dans les années 50» [2].

Selon les dernières estimations de l'OMS en 2018, il a été enregistré en 2017, 219 millions de cas de paludisme contre 239 millions en 2010 et 217 millions en 2016. Même si les estimations du nombre de cas de paludisme pour 2017 sont en baisse de 20 millions par rapport à 2010, les données concernant la période 2015-2017 ne relèvent aucun progrès significatif vers une diminution du nombre de cas de paludisme dans le monde [3]. Le paludisme a causé la mort de plus de 435000 personnes majoritairement en Afrique. Parmi les 219 millions des cas d'infections, 200 millions ont été enregistrés en Afrique [3]. L'Afrique a enregistré 93% des décès liés au paludisme au niveau mondial en 2017. Même si c'est sur ce continent que 88% de diminution ont été enregistrés dont 172000 décès par rapport à 2010, cette zone reste géographiquement la plus touchée [3]. Au Mali en 2018, le nombre de cas suspects du paludisme était de 2 834 142 cas dont 1 757 292 cas ont été confirmés. Parmi les nombres de cas confirmés 34,32% sont survenus chez les enfants de moins de 5 ans. Au total 186 cas de décès ont été enregistrés en 2018 soit un taux de létalité de 0,065 % [4]. Au Mali, parmi les cinq espèces de parasites qui infectent l'homme, *Plasmodium falciparum* est la plus virulente et responsable des formes cliniques graves et la majorité de la mortalité associée au paludisme. Dans les communautés d'endémie palustre, les femmes enceintes, les nourrissons et les enfants sont les plus vulnérables aux épisodes du paludisme [5].

La résistance est apparue sur toutes les classes d'antipaludéen, ceci a augmenté le taux de morbidité mondiale due au paludisme et constitue une menace importante pour son éradication. L'utilisation très répandue et sans discernement des antipaludiques exerce une forte pression de sélection sur les plasmodies qui développent alors des taux de résistance élevés [6]. La stratégie de l'Organisation Mondiale de la Santé visant à protéger les mères pendant leur grossesse et à réduire les conséquences néfastes pour les enfants et nouveau-nés, inclut la mise en œuvre d'un traitement préventif intermittent chez la femme enceinte et

l'enfant (TPI) [5]. Pour cela, l'OMS recommande désormais une intervention supplémentaire pour lutter contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* : la chimioprevention du paludisme saisonnier CPS. Elle est définie comme l'administration intermittente de traitements complets d'un médicament antipaludique (sulfadoxine-pyriméthamine (SP)-amodiaquine (AQ)) aux enfants de 3 à 59 mois pendant la période où sévit la maladie dans les zones de forte transmission saisonnière [7]. Cette recommandation est particulièrement destinée aux pays de la zone du sahel dont le Mali pour leur forte endémicité et de mortalité du paludisme [8]. Il est à craindre que cette stratégie ne provoque une augmentation de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP, mettant en péril son utilisation non seulement pour la prévention du paludisme chez les enfants, mais également chez les femmes enceintes [9]. La résistance des parasites responsables du paludisme aux antipaludiques a démarré avec la chloroquinorésistance [10]. Ce même phénomène s'est répété avec la Sulfadoxine-pyriméthamine. Cependant, l'Afrique subsaharienne est moins atteinte par la résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP en atteste la recommandation de la CPS chez les enfants de 3 à 59 mois dans la zone du Sahel. L'utilisation de la SP plus l'Amodiaquine dans le cadre de la CPS chez les enfants de moins de cinq s'est avérée efficace en Afrique sub-saharienne selon différentes études [11-12]. Malgré tout, la surveillance des résistances demeure recommandée.

Des études ont montré que les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) dans le gène de *dihydrofolate réductase (Pfdhfr)* du *P. falciparum* confère une résistance à la pyriméthamine [13-14]. Des mutations ponctuelles sur le gène *Pfdhfr* aux positions (51, 59, 108 et 164) agissent en synergie pour augmenter la résistance à la pyriméthamine. Il convient de noter que S108N confère un faible niveau de résistance, les doubles mutants 51I / 108N, 59R / 108N et 51I / 59R confèrent des niveaux de résistance modérés, le triple mutant 51I / 59R / 108N confère un niveau supérieur et le parasite quadruple mutant (51I / 59R / 108N / I164L) est considéré comme résistant aux effets de la pyriméthamine [14]. Malgré des niveaux élevés de résistance à la SP dans de nombreux pays, cette association médicamenteuse est encore largement utilisée pour prévenir le paludisme chez la femme enceinte dans le contexte du TPI ou en association avec Amodiaquine (SP-AQ) dans le contexte de TPIe recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). La surveillance systématique des mutations de résistance génétique affectant l'efficacité de la SP est utile pour déterminer si l'association (sulfadoxine-pyriméthamine) doit continuer à être utilisée pour le traitement préventif intermittent chez l'enfant ou d'une grossesse palustre.

Les localités de Dioro, Missira et Sélingué ont bénéficié de la CPS. Ces trois localités ont des profils épidémiologiques de transmission du paludisme différents de par leurs faciès.

**Hypothèse :** L'utilisation massive de la pyriméthamine, augmente le risque d'apparition des souches résistantes. C'est ainsi que nous nous sommes proposé d'estimer la prévalence des mutations sur le gène *Pfdhfr* à Dioro, Missira et Sélingué qui est un marqueur de résistance du *Plasmodium falciparum* à la pyriméthamine.

Pour bien mener cette étude, nous nous sommes fixé les objectifs suivants.

# **OBJECTIFS**



## 2 OBJECTIFS :

### 2.1 Objectif General

Déterminer la fréquence des mutations sur le gène *Pfdhfr* après l'introduction de la CPS à Dioro, Missira et Sélingué.

### 2.2 Objectifs spécifiques

- Identifier des mutations sur le gène *Pfdhfr* par séquençage dans les localités de Dioro, Missira et Sélingué,
- Estimer la prévalence des mutations du gène *Pfdhfr* dans les localités de Dioro, Missira et Sélingué ;
- Corréler la fréquence des mutations sur le gène *Pfdhfr* aux positions **51, 59, 108 et 164** avec : la parasitémie, l'âge ;
- Déterminer la fréquence des haplotypes (combinaisons des SNPs).

# **GENERALITES**

### 3 GÉNÉRALITÉS

#### 3.1 Définitions :

##### 3.1.1 Paludisme

Le paludisme est une érythrocytopathie (maladie des globules rouges du sang) parasitaire potentiellement mortelle, dû à un hématozoaire (Parasite des globules rouges du sang) du genre *Plasmodium*, transmis par la piqûre d'un moustique infesté du genre *Anophèles*. Il est aussi connu sous le nom de malaria, venant de l'italien « mal aria » qui signifie « mauvais air ». Ce nom lui a été attribué par des personnes infectées vivant dans des régions marécageuses dégageant des odeurs nauséabondes [1].

##### 3.1.2 Mutation

Le terme « mutation » désigne n'importe quel changement intervenu dans la séquence de l'ADN, sans préjuger de sa pathogénicité à l'échelle du gène ou du chromosome. On parle aussi de « variants » [15].

Dans une cellule vivante, l'ADN est en permanence exposé à différents types d'agression pouvant conduire à l'apparition de mutations, mais leur fréquence d'apparition peut être augmentée par des mutagènes parfois qualifiés d'agents ou de facteurs mutagènes. Il s'agit essentiellement d'agressions « exogènes » (radiations et agents génotoxiques de l'environnement), d'agressions endogènes (radicaux libres, ...), d'erreurs de réplication et d'accidents de recombinaison. La cellule possède une machinerie de réparation, qui corrige la plupart des anomalies. Mais un échappement au système de réparation est possible : c'est l'origine des mutations.

La conséquence de toute mutation dépend de son effet fonctionnel qui peut être neutre et conduit à l'amélioration d'une fonction (diversité, évolution) ou à l'altération d'une fonction (effet pathogène).

- ✓ Les mutations peuvent être héréditaires ou acquises. Les mutations héréditaires se produisent dans les cellules germinales. Par conséquent, elles peuvent être héritées par la progéniture. Mais les mutations acquises se produisent dans les cellules somatiques tandis que les mutations acquises ne sont pas souvent héritées par la progéniture.

## ❖ Polymorphismes du génome

La notion de « **polymorphisme** » est la présence de plus d'un allèle à un locus particulier dans une population donnée. Si la fréquence d'allèles mineurs d'un allèle particulier dans la population est supérieure à 1%, cette situation est appelée polymorphisme.

### 3.1.2.1 Les principaux types de mutations

On distingue : les mutations chromosomiques et les mutations génomiques

- Les mutations chromosomiques sont classées en mutations chromosomiques de nombre et mutations chromosomiques de structure. Les anomalies de structure comportent différents types par exemple les translocations, délétions, duplications de fragments chromosomiques, etc.
- Les mutations génomiques sont surtout des substitutions appelées également mutations ponctuelles. Il peut également s'agir de l'insertion et/ou de la délétion de quelques nucléotides et parfois jusqu'à quelques dizaines ou centaines de nucléotides.

#### □ Substitutions nucléotidiques [16]

Elles constituent près de 70 % de mutations. Les substitutions constituent le remplacement d'un nucléotide par un autre.

##### ○ Mutations faux sens

Cette mutation ponctuelle se traduit par le remplacement d'un nucléotide par un autre. Dans certains cas, cette modification entraîne une modification de l'acide aminé codé, lequel peut avoir ou non une répercussion sur la fonction de la protéine produite par le gène. On distingue classiquement les transversions et les transitions.

- Les transitions correspondent au remplacement d'une des purines (Adénine ou Guanine) par l'autre purine, ou d'une des pyrimidines (Cytosine ou Thymines) par l'autre pyrimidine.
- Les transversions en revanche sont un changement d'une des pyrimidines en l'une des purines, ou le contraire, d'une des purines en l'une des pyrimidines.

##### ○ Mutations non-sens

Le changement d'un nucléotide provoque le remplacement d'un codon spécifiant un acide aminé par un codon-stop. Cela entraîne la production d'une protéine tronquée.

### o Mutations silencieuses

Ce sont des mutations qui ne modifient pas la séquence d'une protéine, à cause de la redondance du code génétique (le nouveau triplet code c'est à dire le même acide aminé que le triplet original), ou parce qu'elle touche à une région non codante de l'ADN, ou un intron. Mais cette mutation peut néanmoins avoir de graves conséquences sur le phénotype. En effet, le changement d'un seul nucléotide peut changer le site donneur d'épissage, sans pour autant changer la séquence en acides aminés. Cela peut donc se traduire par une délétion entière d'un exon de la séquence peptidique, l'exon n'étant pas reconnu car le site d'épissage a été muté. Une mutation synonyme désigne une mutation silencieuse qui touche un exon, sans changer la séquence de la protéine.

Plusieurs mécanismes peuvent être en jeu dans la survenue des substitutions, et notamment des erreurs de répliation ayant échappé au système de réparation, des erreurs du système même de réparation, ou des perturbations biochimiques dues à des agents physiques ou chimiques exogènes ou produits par le métabolisme endogène [17].

### □ Insertions et délétions [15]

Ce sont des mutations décalantes, et constituent les deux types de mutations dites indel ou frame-shift.

Dans ce type de mutations, nous avons un ajout (insertion) ou une diminution (délétion) d'un petit nombre de paires de bases. Il existe deux types de mutations selon le nombre de nucléotides ajoutés ou supprimés : soit ce nombre est un multiple de 3 soit non multiple de 3. Pourquoi multiple de 3 ? Il faut rappeler ici que le code génétique est composé d'une unité de base qui est les codons. Un codon est formé de 3 nucléotides. Si le nombre de nucléotides supprimés ou ajoutés à une séquence est un multiple de 3, il y aura au niveau de la protéine un ajout ou une diminution d'un certain nombre d'aminoacides. Mais si le nombre de nucléotide ajoutés ou supprimés n'est pas un multiple de 3, il y a changement du cadre de lecture du message existant dans l'ADN, et donc aussi dans la partie correspondante dans l'ARNm. Ceci se traduit au niveau de la protéine par un changement de toute la séquence qui est en aval avec la mutation. C'est ce qu'on appelle des mutations de décalage "frame shift". Le décalage du cadre de lecture aboutit très fréquemment à l'apparition de codon stop (UAG, UAA ou UGA) ce qui provoque l'arrêt de la traduction et donne donc des protéines tronquées.

## □ Mutations chromosomiques [15]

Les mutations chromosomiques sont des altérations majeures des chromosomes. Elles touchent la structure des chromosomes, et touchent donc plusieurs gènes à la fois. Il existe quatre types de mutations chromosomiques.

- Les délétions ou déficiences : disparition d'un segment de chromosome,
- Les duplications : dédoublement d'un segment de chromosome ;
- Les inversions : un segment de chromosome trouve son orientation par rapport au reste du chromosome changé ;
- Les translocations : c'est un échange de segment de chromosome entre deux chromosomes non homologues. Quand il y a un échange réciproque de segments entre deux chromosomes c'est une translocation réciproque.

### 3.1.2.2 Conséquence des mutations [15]

- Mutation de type « faux-sens » : le codon muté code un autre acide aminé.

La modification d'acide-aminé au niveau de la protéine peut être tolérée par la cellule sans conséquence délétère, ce qui explique que de nombreuses variations de séquence de type « faux-sens » n'ont pas d'effet pathogène, et constituent par ailleurs une part importante des polymorphismes (de type SNPs). Mais en fonction de la localisation de l'acide-aminé touché, les mutations faux-sens peuvent avoir des effets délétères (altération du repliement protéique, de la stabilité protéique, de domaines fonctionnels, de sites d'interaction avec d'autres protéines, etc.), de type perte de fonction ou gain de fonction.

- Mutation de type « non-sens » : le codon muté code un codon stop. Ce type de mutation est généralement pathogène, responsable de la synthèse d'une protéine tronquée, qui sera instable et dégradée (effet perte de fonction), ou avec un effet dominant négatif (effet gain de fonction)

#### ➤ Insertions et/ou délétions de nucléotides en séquence codante

Deux situations sont possibles :

- Les insertions et/ou délétions multiples de trois nucléotides n'entraînent pas de décalage du cadre de lecture. La conséquence au niveau protéique pourra être un gain ou une perte en acides-aminés, avec éventuellement un changement d'acide-aminé par rapport à la séquence

initiale, au niveau de la jonction résultant de l'insertion et/ou la délétion. Le retentissement fonctionnel est variable selon la localisation au niveau de la protéine : l'insertion et/ou la délétion de nouveau(x) acide(s)-aminé(s) peut être « tolérée », ou délétère. Un effet délétère important peut aussi résulter de la création d'un codon stop à la jonction résultant de l'insertion et/ou la délétion.

- Les insertions et/ou délétions non-multiples de trois nucléotides, responsables d'un décalage du cadre de lecture qui entraîneront la survenue prématurée d'un codon stop (ou dans de rares cas un décalage du codon stop en aval). L'effet délétère sera donc semblable à l'effet des mutations non-sens : synthèse d'une protéine tronquée, qui sera instable et dégradée (effet perte de fonction), ou avec un effet dominant négatif (effet gain de fonction). Il y a donc un retentissement fonctionnel sévère expliquant que ce type de mutation est généralement pathogène.

### 3.1.2.3 Fréquences relatives des différents types de mutation

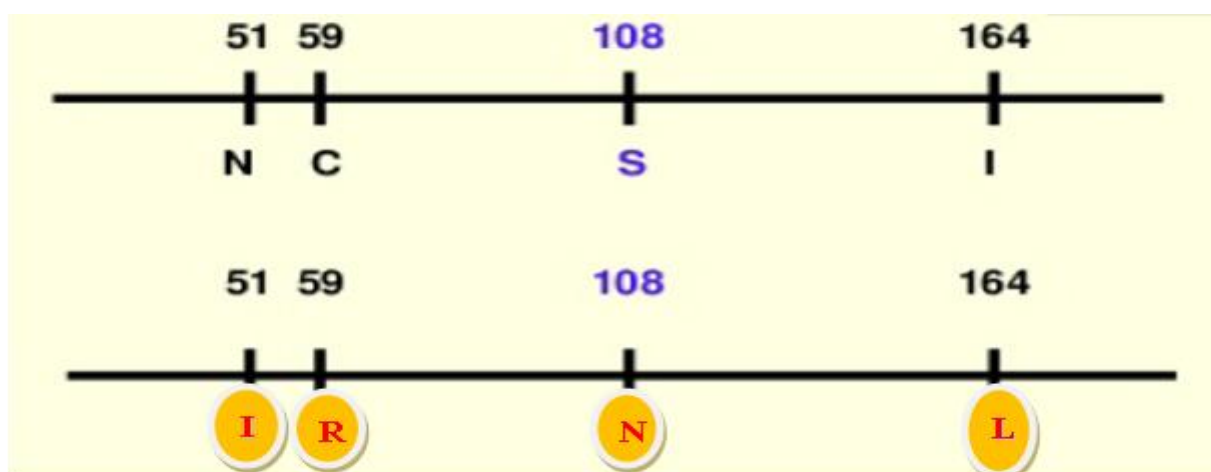
Elles varient évidemment selon les gènes mutés. Très approximativement, les délétions représentent de 5 à 15 % des mutations connues chez l'homme. Parmi les mutations ponctuelles, certaines sont très rares (mutations des zones de contrôle). Les plus habituelles sont sûrement les mutations faux-sens et les anomalies d'épissage [18].

### 3.1.3 Mutations du gène *dhfr* [6]

Pour les antifoliques la résistance de *P. falciparum* résulte de l'acquisition séquentielle de mutations dans le gène (*Pfdhfr*) codant pour la *dihydrofolate réductase* (*dhfr*). Chaque mutation confère une diminution progressive de la sensibilité. Chez *P. falciparum*, la mutation initiale est presque invariablement en position 108 (en général, sérine remplacée par l'asparagine), ce qui ne confère qu'une diminution d'un dixième de la sensibilité au médicament et ne modifie pas les réponses thérapeutiques à la sulfadoxine-pyriméthamine. Au début, cela a peu d'importance clinique, mais ensuite des mutations surviennent en position 51 et 59, conférant une résistance accrue aux médicaments contenant de la pyriméthamine. Les infections par des mutants triples sont relativement résistantes, mais on observe en général une certaine réponse thérapeutique. L'acquisition d'une quatrième et catastrophique mutation en position 164 (remplacement de l'isoleucine par la leucine) rend les antifoliques disponibles complètement inefficaces [19]. Il est intéressant de constater que les mutations qui confèrent une résistance modérée à la pyriméthamine ne confèrent pas nécessairement une résistance au cycloguanil, et vice versa. Par exemple, des mutations en

position 16 (valine plutôt qu'alanine) et 108 (thréonine plutôt que sérine) confèrent une résistance élevée au cycloguanil mais pas à la pyriméthamine. En général, les biguanides sont plus actifs que la pyriméthamine contre les mutants résistants (et ils sont plus efficaces en clinique également), mais n'agissent pas sur les plasmodies porteuses de la mutation du gène *Pfdhfr* à la position 164.

Positions dont les mutations sont reconnues être associées à la résistance au *Plasmodium falciparum* à la pyriméthamine.



**Figure I: Mutations sur le gène *Pfdhfr* associées à la résistance de *P. falciparum* à la pyriméthamine [20].**

Sur le gène *Pfdhfr*, la mutation à la position 108 est la plus fréquente et majeure, les positions 51 et 59 augmentent la résistance et la position 164 est rare en Afrique [21].

#### ✓ Mécanisme de résistance du gène *Pfdhfr* :

Les *Plasmodiums* humains peuvent utiliser les purines de leur hôte mais doivent synthétiser leurs pyrimidines. Les mutations ponctuelles du gène *Pfdhfr* sont les bases moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la pyriméthamine et au cycloguanil [22]. Les isolats de *P. falciparum* provenant d'échecs prophylactiques du proguanil ou d'échecs thérapeutiques de la sulfadoxine/pyriméthamine présentent une résistance *in vitro* à la fois au cycloguanil et à la pyriméthamine. La substitution S108N est la mutation primaire associée à la résistance de la pyriméthamine ou au cycloguanil en Afrique et en Asie du Sud-est. En Amérique du Sud, on rencontre également la substitution S108T [23]. Les mutations additives les plus fréquentes sont N51I et C59 R. La CI50 moyenne de cycloguanil augmente avec le nombre de mutations [22]. Une simple substitution Asn en 108 ou Thr en 108 sur la *dihydrofolate réductase* (*dhfr*)



recombinante du parasite réduit l'affinité de la molécule sans affecter le fonctionnement de l'enzyme vis à vis de son substrat naturel. Les mutations multiples diminuent l'efficacité de l'enzyme sur la *dihydrofolate*, ce qui suggère que des mutations additionnelles soient défavorables aux parasites en l'absence de pression médicamenteuse [24]. La mutation S108N est retrouvée chez 95 % des isolats de voyageurs en échec prophylactique du proguanil en France (n =55). Au Cameroun, les isolats présentant la mutation S108N de *Pfdhfr*, seule ou associée à une mutation du codon 59, ont une réponse clinique au Fansidar® adéquate (RCA) et ceux ayant trois mutations de *Pfdhfr* entraînent un échec thérapeutique précoce (ETP) ou tardif (ETT) [25].

### 3.1.3.1 Biosynthèse de folate dans les plasmodies

Les gènes codant pour les enzymes de la voie du folate ciblés par les médicaments antifolates existants, la *dihydrofolate réductase* (*dhfr*) et la *dihydropteroate synthase* (*dhps*) [26], et il a été déterminé que les mutations dans ces gènes jouent un rôle dans la résistance aux médicaments antifolates [27]. La perturbation de la synthèse du folate par le *dhfr* et les inhibiteurs de la *dhps* entraînent une diminution des niveaux de *tétrahydrofolate* totalement réduit, cofacteur nécessaire dans les importantes réactions de transfert d'un carbone dans les voies de biosynthèse de la purine, de la pyrimidine et des acides aminés [28]. Les taux inférieurs de *tétrahydrofolate* entraînent une diminution de la conversion de la glycine en sérine, une synthèse réduite de la méthionine et des taux inférieurs de thymidylate avec un arrêt ultérieur de la réplication de l'ADN [29].

### 3.1.3.2 Mécanisme d'action

L'hématozoaire ne peut utiliser qu'une très faible quantité des folates présents dans le plasma de l'hôte, si bien qu'il doit en assurer la synthèse de *novo* à partir de l'acide para-amino-benzoïque (PABA). La *dihydrofolate réductase* a la particularité d'être bifonctionnelle en ce sens qu'elle est couplée dans la même protéine avec une thymidilate synthétase [26]. La *dhfr* réduit la dihydrofolate en tétrahydrofolate, la *TS* condense le tétrahydrofolate avec l'acide désoxyurilidique pour former un désoxythymidylate, précurseur des bases puriques de l'ADN. Leurs gènes sont situés sur le chromosome 4. Pendant les 48 heures du cycle asexué intra érythrocytaire, la synthèse de la *dhfr-TS* coïncide avec celle de l'ADN. L'activité de l'enzyme commence environ 18 heures après l'invasion de l'hématie par le mérozoïte et exerce jusqu'à la fin de la schizogonie [30].

### 3.1.3.3 Dihydrofolate Réductase-Thymidylate Synthase

La *dihydrofolate réductase-thymidylate synthase* du *P. falciparum* (*dhfr-ts*) est codée par un gène à copie unique sur le chromosome quatre de *P. falciparum*, les deux enzymes formant une protéine bifonctionnelle [26], similaire aux autres protozoaires mais distincte des bactéries et des eucaryotes d'ordre supérieur. La *dhfr-ts* de *P. falciparum* contient 608 acides aminés, le premier 231 comprenant le domaine *dhfr*, les 89 résidus suivants formant la région de jonction, qui joignent les 288 résidus restants du domaine *thymidylate synthase*. La *dihydrofolate réductase* est composée de huit brins  $\beta$  centraux entre quatre hélices  $\alpha$ , et de trois autres hélices  $\alpha$  courtes [31]. Comme indiqué précédemment, *dhfr-ts* fournit du folate réduit pour une utilisation dans le cycle du *thymidylate*, et l'inhibition de *dhfr-ts* entraîne un arrêt de la synthèse de l'ADN secondaire à une réduction des niveaux de dTMP.

### 3.1.3.4 Les mutations ponctuelles au sein de la dihydrofolate réductase sont responsables de la résistance in vitro

La *dihydrofolate réductase* dérivée du clone sensible à la pyriméthamine, 3D7, et d'isolats présentant divers degrés de résistance à la pyriméthamine a été séquencée [32]. Une sérine résidait à la position 108 du clone sensible 3D7, mais il y avait un changement à l'asparagine (S108N) dans les isolats résistants. D'autres isolats, successivement plus résistants, ont présenté des mutations supplémentaires aux codons 51 (N51I), 59 (C59R) et 164 (I164L). On pensait que le changement conservateur d'isoleucine en leucine au niveau du codon 164 n'aurait pas d'effet profond sur la liaison de la pyriméthamine. Le « clone » de Palo Alto [29] portait un ensemble unique de mutations, A16V plus S108T. Une étude publiée au même moment par un autre groupe a également montré que l'addition des mutations DHFR N51I et C59R confère des niveaux de résistance à la pyriméthamine supérieurs à ceux de S108N seul [27], ce qui renforce la preuve que les mutations ponctuelles chez *dhfr* étaient la cause de la résistance à la pyriméthamine.

## 3.2 Marqueurs moléculaires de résistance

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

partir d'échantillons sanguins prélevés au bout du doigt et déposés sur papier filtre) et sont potentiellement automatisables. Il n'en existe que pour un nombre restreint d'antipaludiques.

- ***P. falciparum chloroquine transporter (Pfcr1)***. Ce gène est situé sur le chromosome 7 code pour un transporteur membranaire de la vacuole digestive. La mutation sur le codon 76 (K→T), associée à sept autres points de mutation [33], permet au parasite de limiter l'accumulation de chloroquine dans sa vacuole digestive où elle exerce son action inhibitrice [34]. Le *Pfcr1* est également impliqué dans la baisse de sensibilité du parasite à l'amodiaquine et à la quinine [35]. Dans les zones où les allèles de résistance ne sont pas fixés, on observe une augmentation de la fréquence de l'allèle sauvage après abandon de la chloroquine [36]. L'analyse de ce locus renseigne sur la pression médicamenteuse exercée au sein des populations.
- ***P. falciparum multi-drug resistance 1 (Pfmdr-1)***. Ce gène est situé sur le chromosome 5, code pour un transporteur de type ABC (*ATP binding cassette*). La protéine *Pfmdr-1* est impliquée dans la modulation de la sensibilité à de multiples antipaludiques et, plus particulièrement, dans l'efflux des antipaludiques hydrophobes [37]. Les mécanismes de résistance sont liés : soit à des phénomènes de duplication, entraînant une augmentation de l'expression de la protéine et la résistance aux aryl-amino-alcool (comme la méfloquine ou la luméfántrine) et une baisse de sensibilité aux dérivés de l'artémisinine ACT [38] ; soit à l'apparition de mutations au niveau des codons 86 (N→Y), 184 (Y→F), 1034 (S→C), 1042 (N→D) et 1246 (D→Y), entraînant une altération de sensibilité des parasites à certains antipaludiques comme les amino-4-quinoléines [37]. Il existe un effet antagoniste entre la sensibilité à la chloroquine et à la méfloquine : la mutation 86Y diminue la sensibilité des parasites à la chloroquine, mais augmente celle de la méfloquine. De même, l'augmentation du nombre de copies du gène (86N) renforce la résistance à la méfloquine et à l'inverse accroît la sensibilité à la chloroquine.
- ***P. falciparum dihydropteroate synthase (Pfdhps)***. La *dihydroptéroate synthase (DHPS)* est une autre enzyme intervenant dans la synthèse des folates (le gène correspondant est situé sur le chromosome 8). Elle est inhibée par les sulfamides et sulfones dont elle est la cible moléculaire. Les mutations se situant au niveau des codons 436 (S→A/F), 437 (K→G), 540 (K→E), 581 (A→G), 613 (A→S/T) confèrent une résistance à la sulfadoxine [29]. L'analyse groupée des mutations au niveau des

gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* permet de prévoir l'efficacité clinique de l'association sulfadoxine-pyriméthamine, largement utilisée en Afrique chez la femme enceinte en traitement préventif (TPI, traitement préventif intermittent) ou en association avec l'artésunate en traitement curatif.

- ***P. falciparum* dihydrofolate reductase (*Pfdhfr*).** Ce gène est situé sur le chromosome 4, code pour une enzyme intervenant dans la voie des folates, indispensable pour la synthèse de l'ADN [2]. Elle est la cible des médicaments anti-folates (pyriméthamine, par exemple). Elle est inhibée par la pyriméthamine, entraînant ainsi le blocage de la synthèse des pyrimidines et la réplication de l'ADN parasite [39]. L'accumulation de plusieurs mutations spécifiques au sein de cette protéine (codons 50N→R, 51C→I, 108S→N et 164I→L) entraînent la résistance clinique des parasites à l'action des anti-folates.

### 3.3 Historique [1]

Le paludisme est connu depuis très longtemps. Les médecins avaient déjà établi la relation entre les eaux stagnantes et la maladie mais ne savaient pas véritablement à quoi il était dû. C'est en 1880, en Constantine que le médecin militaire français Charles Louis Alphonse Laveran a découvert l'hématozoaire dans le sang des patients infectés : ce qui lui vaudra le prix Nobel de médecine en 1907. Il a ainsi décrit les principales formes de *Plasmodium falciparum* et était convaincu qu'il s'agissait d'un parasite et non d'une altération spontanée des globules rouges, comme les premières observations au microscope ont pu le démontrer. Toutefois, Laveran ne savait pas pour autant d'où provenaient ces hématozoaires qui causaient le paludisme, ni comment les patients contractaient cette maladie.

C'est le 20 août 1889 que le médecin bactériologiste et entomologiste britannique de l'Armée des Indes britanniques Sir Ronald Ross parvint à montrer que la transmission du paludisme aux oiseaux se faisait par des vecteurs : les moustiques. Cette découverte lui a valu le prix Nobel de médecine en 1902 [1].

La résistance à la pyriméthamine est apparue rapidement après son déploiement pour le traitement, la prophylaxie dans certaines régions et le traitement de masse dans les années 50. La résistance de la sulfadoxine-pyriméthamine a été enregistrée peu après que ce médicament a été introduit une décennie plus tard. En Asie du Sud-Est, elle est apparue à la frontière séparant la Thaïlande du Cambodge au milieu des années 60. La résistance a commencé à

poser des problèmes opérationnels dans la même région au cours des années ayant suivi l'introduction de la sulfadoxine-pyriméthamine dans le programme de lutte antipaludique en 1975 [40]. On trouve une résistance importante dans de nombreuses régions d'Asie du Sud-Est, du sud de la Chine et du bassin amazonien, et des niveaux de moindre résistance s'observent sur les côtes d'Amérique du Sud, en Asie du Sud et en Océanie. En Afrique orientale, on s'est aperçu que la sensibilité à la sulfadoxine-pyriméthamine diminuait dans les années 80 et la résistance a progressé vers l'ouest traversant l'Afrique inexorablement au cours de la dernière décennie. Des taux d'échecs cliniques de plus de 25% ont déjà été rapportés au Libéria [41], en Guinée-Bissau [42] et au Malawi [43]. De nombreuses régions montrent désormais une résistance élevée avec des taux d'échecs thérapeutiques importants chez l'enfant. Les données moléculaires récentes laissent à penser que les plasmodies résistantes à *P. falciparum*, aujourd'hui prévalentes dans la plus grande partie de l'Afrique australe et centrale (triple mutant dhfr), ont une origine commune en Asie du Sud-Est [6].

Actuellement, la recherche demeure orientée vers la lutte anti vectorielle, la vaccination, le traitement (curatif et prophylactique). La lutte anti vectorielle est confrontée à un problème technique (résistance aux insecticides) et un problème économique (de coût et de mise en valeur des insecticides). Le traitement antipaludique requiert actuellement des nouveaux produits efficaces contre les souches de *P. falciparum* résistantes aux amino-4quinoléines [44].

### 3.4 Répartition géographique

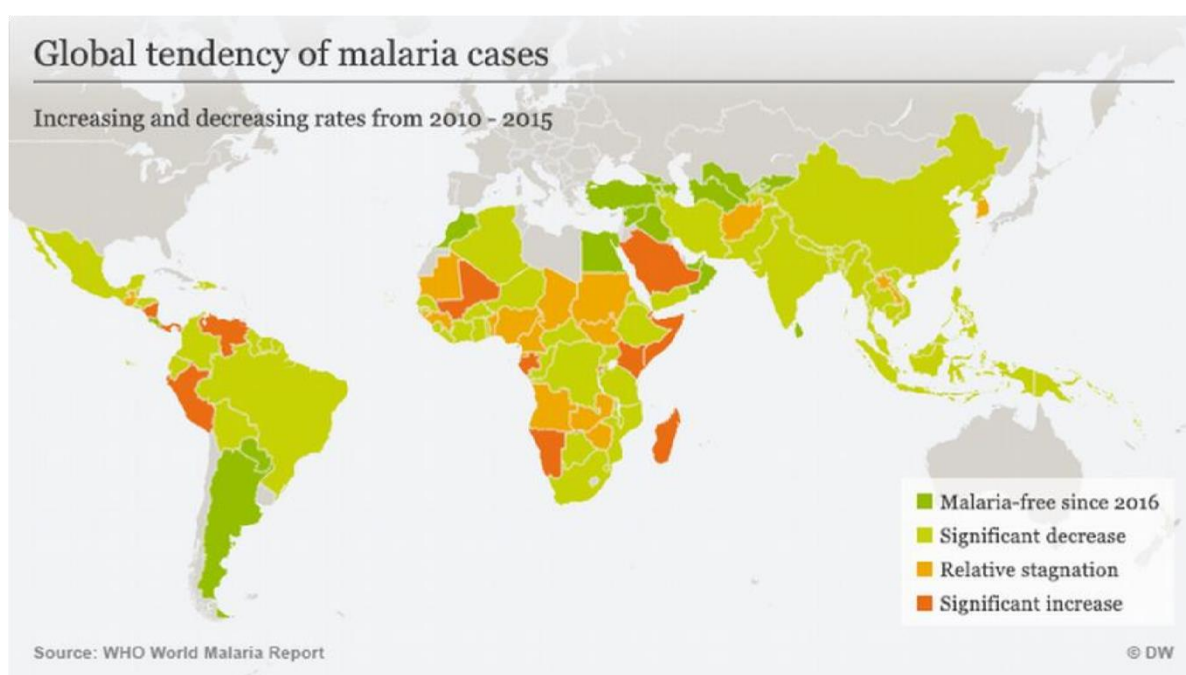
#### Dans le monde

Le paludisme est un problème majeur de santé publique. C'est la première endémie parasitaire mondiale [1]. Autrefois, cette maladie était plus étendue mais elle a été éliminée dans de nombreux pays tempérés au milieu du XXe siècle. Aujourd'hui, le paludisme est une pathologie endémique des régions tropicales et subtropicales de l'Afrique, de l'Asie du sud-est, de l'Amérique Latine et du Moyen-Orient [1]. Il est au premier rang des priorités de l'OMS pour ses ravages directs et pour ses conséquences socio-économiques. Selon l'OMS, près de la moitié de la population mondiale est exposée au paludisme. La plupart des cas et des décès dus à cette maladie surviennent en Afrique subsaharienne.

La chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* constitue l'un des obstacles majeurs qui entravent l'activité des programmes nationaux de lutte contre le paludisme depuis des

décennies [45]. La situation mondiale du paludisme est marquée par la résistance des parasites à des antipaludiques majeurs, notamment la chloroquine et la SP les moins chers des médicaments antipaludiques.

Les niveaux élevés de résistance à la chloroquine ont contraint certains pays à passer de la sulfadoxine-pyriméthamine (SP, nom commercial Fansidar) à leur médicament de première intention. Cependant, la résistance à cette combinaison de médicaments se développe rapidement et des échecs thérapeutiques ont été signalés en Afrique, en Asie, en Indonésie et en Amérique du Sud [19]. Cependant, l'émergence et la propagation de *P. falciparum* résistant à la SP ont été signalées dans le monde entier.



**Figure II: Carte de répartition du paludisme dans le monde (OMS, 2016)**

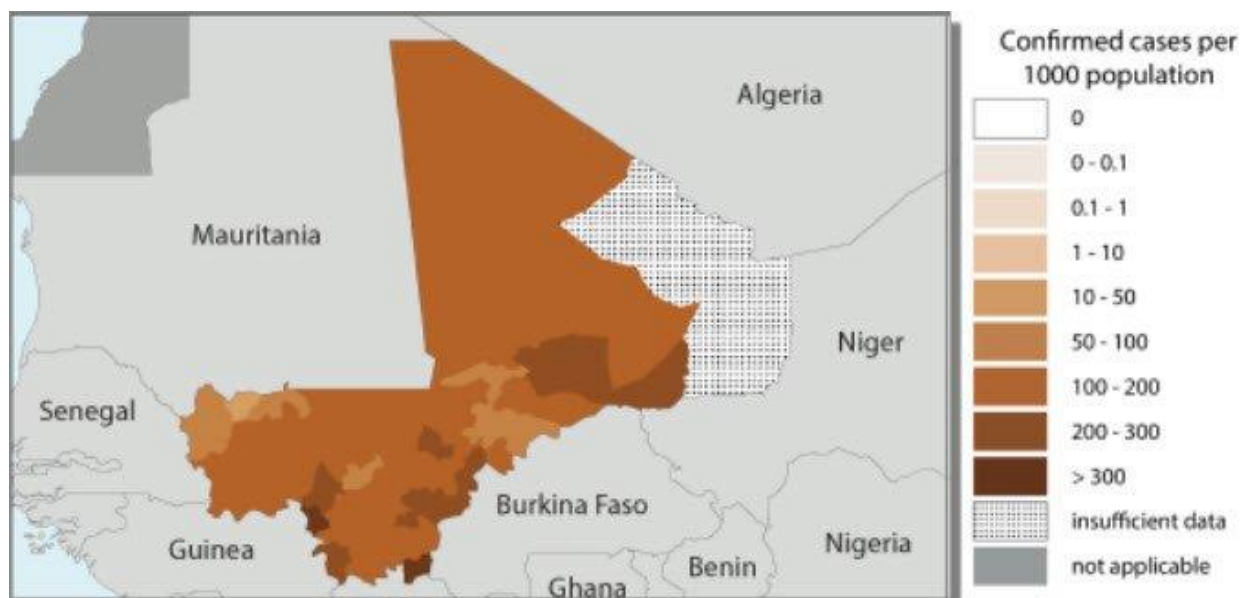
**Source:** [https://www.google.com/search?q=carte+paludisme+2017&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=HY5AfInG4hc3IM%253A%252CLVn\\_dXxADcioM%252C\\_&usg=\\_\\_uqLYO3vunFI1SrPaYXJMwABAPeo%3D&sa=X&ved=0ahUKEwj80ayurcraAhUMPBQKHR39CMoQ9QEIKDAA#imgrc=AnAQxPntQa2r9M](https://www.google.com/search?q=carte+paludisme+2017&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=HY5AfInG4hc3IM%253A%252CLVn_dXxADcioM%252C_&usg=__uqLYO3vunFI1SrPaYXJMwABAPeo%3D&sa=X&ved=0ahUKEwj80ayurcraAhUMPBQKHR39CMoQ9QEIKDAA#imgrc=AnAQxPntQa2r9M)

### En Afrique

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne, les enfants de moins de 5ans et les femmes enceintes sont les groupes à risque et présentent 90% de la charge mondiale du paludisme [46]. La sulfadoxine-pyriméthamine (SP) a été

largement utilisée comme traitement de première intention du paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum* dans toute l'Afrique subsaharienne en raison de son prix abordable, de sa facilité d'administration et jusqu'à récemment de son efficacité. C'est actuellement la seule option pour le traitement intermittent du paludisme pendant la grossesse. Récemment, la résistance croissante à la SP en Afrique est devenue une préoccupation majeure de santé publique [47]. En Afrique de l'Ouest, la résistance à la SP augmente, mais elle est toujours considérée comme efficace, néanmoins la surveillance de la résistance à la SP reste la plus importante pour garantir des changements de politique en temps opportun [48]. L'émergence de la résistance à la SP peut être surveillée en déterminant la prévalence de mutations dans deux gènes de *P. falciparum* [48] elle est utilisée en association avec l'amodiaquine dans le cadre de CPS afin de prévenir le paludisme chez les enfants de 03 à 59 mois.

### Au Mali



**Figure III : Distribution de cas de paludisme au Mali**

Nous constatons une légère augmentation de cas de paludisme dans le monde en 2018. L'augmentation des cas en 2018 au Mali pourra s'expliquer par la forte pluviométrie enregistrée.

**Tableau I:** Faciès épidémiologiques du paludisme au Mali

Faciès Epidémiologiques	Transmission Paludisme	Endémicité IP	Région géographique	Caractéristiques
Faciès soudano guinéen	-Intense (-6 mois/an)	Holoendémique IP > 75 %	Sikasso	Prémunition acquise 5 ans.
Faciès nord soudanien et Sahel	-Intense (3-4 mois/an)	Hyperendémique IP : 5 – 75 %	Ségou, Koulikoro, Mopti	Prémunition 9 ans. Neuropaludisme, fréquent à 1-9 ans.
Faciès saharien	-Sporadique -voire Epidémique	Epidémique IP < 10 %	Gao, Kidal, Tombouctou	Adultes aussi exposés risque paludisme grave et compliqué.
Faciès des Barrages	-Bimodale (Plurimodale)	Mésoendémique IP : 26 – 50 %	Sélingué, Manantali, Markala	Anémie palustre élevée chez moins 9ans.
Faciès urbain		Hypoendémique IP < 10 %	Bamako, Mopti ville	Adultes bamakois risque paludisme grave.

### 3.5 Biologie

Le paludisme est dû à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques anophèles infectés appelés « vecteurs du paludisme », qui piquent principalement entre le crépuscule et le petit matin [49].

#### 3.5.1 Vecteur

Le paludisme est transmis exclusivement par les piqûres de moustiques Anophèles. Parmi plus de 500 espèces d'anophèles reconnues à ce jour, 41 sont des vecteurs majeurs du paludisme, dont le plus grand nombre (39%) se trouve en Asie du Sud-est, alors que les vecteurs les plus compétents à savoir *An. Gambiae* et *An. arabiensis* sont en Afrique. Chaque espèce vectrice présente ses caractéristiques comportementales, géographiques et écologiques qui lui sont spécifiques et déterminent l'épidémiologie locale du paludisme [50].

Au Mali, des études conduites par Touré en 1983 ont montré qu'*An. gambiae s.l* est composé de 3 sous espèces qui sont : *An. gambiae s.s*, *An. arabiensis* et *An. funestus s.s*, celui-ci est composé de 3 formes chromosomiques dénommées Bamako, Savane et Mopti. La forme



Mopti se rencontre fréquemment dans les zones d'inondation du fleuve Niger. Elle coexiste avec la forme Bamako dans les régions humides du sud avec des fréquences faibles. La forme Savane se rencontre dans les zones du sud et du centre.

La transmission du paludisme est assurée en saison sèche et froide (Novembre –Février) par *An. arabiensis* et la forme Mopti de *An. gambiae s.s* lui succède en période sèche et chaude (Mars - Juin). Les formes Savane et Bamako de *An. gambiae s.s* deviennent les principaux vecteurs pendant la saison des pluies (Juillet-Octobre). Ainsi, tout au long de l'année, les vecteurs se relayent dans la transmission du *plasmodium* [51].

### 3.5.2 Systématique [52]

<b>Règne</b>	<b>Animalia</b>	<b>(=Animaux)</b>
<b>Sous-Règne</b>	Metazoa	(=Composé de plusieurs cellules)
<b>Embranchement</b>	<b>Arthropoda</b>	<b>(=Pattes articulées)</b>
<b>Sous-embranchement</b>	Hexapoda	(=3 paires de pattes)
<b>Super-classe</b>	Protostomia	(=bouche en premier lors du développement)
<b>Classe</b>	<b>Insecta</b>	<b>(=corps segmenté en 3 parties)</b>
<b>Sous-classe</b>	Pterygota	(=avec des ailes)
<b>Intra Classe</b>	Neoptera	(=ailes qui se replient en arrière au repos)
<b>Super-ordre</b>	Endopterygota	(=larve dépourvue d'ailes)
<b>Ordre</b>	<b>Diptera</b>	<b>(= avec 2 ailes)</b>
<b>Sous-ordre</b>	<b>Nematocera</b>	<b>(Avec antennes longues et fines)</b>
<b>Famille</b>	<b>Culicidae</b>	<b>(= moustiques)</b>
<b>Sous-famille</b>	<b>Anophelinae</b>	<b>(= anophèles)</b>
<b>Genre</b>	<b>Anophèles</b>	
<b>Sous-genre</b>	<b>Anophèles, Cellia, Nyssorhynchus, Kerteszia</b>	

Il existe plus de 3 500 espèces répertoriées à ce jour au sein de la famille des Culicidae qui regroupe l'ensemble des insectes connus sous le nom vernaculaire de moustiques, classés dans l'ordre des Diptères (2 ailes) et le sous-ordre des Nématocères (antennes filiformes). Ces insectes sont caractérisés par des longues antennes et fines à multiples articles, des ailes pourvues d'écaillés et la présence chez les femelles de pièces buccales en forme de trompe rigide appelée proboscis. Les Culicidae sont répartis en deux sous-familles : Anophelinae et Culicinae.

### 3.5.3 Agent pathogène :

*Plasmodium* est responsable du paludisme. C'est un parasite intracellulaire, amiboïde, colonisant les hématies et produisant un pigment.

#### Différentes espèces de *Plasmodium* [1]

Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium*, touchant diverses espèces animales mais seulement cinq de ces espèces se sont retrouvées en pathologie humaine. Il s'agit de :

- *Plasmodium falciparum*
- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium malariae*
- *et Plasmodium knowlesi*

*Plasmodium* a été découvert par l'italien Giovanni Battista Grassi en 1899. Les cinq espèces différentes par des critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développé des résistances aux antipaludiques.

### 3.5.4 Cycle biologique du *Plasmodium*

*Plasmodium* est un sporozoaire ayant deux types de multiplications :

- Une multiplication asexuée (schizogonie) chez l'Homme ;
- Une multiplication sexuée (sporogonie) chez le moustique.

Cycle biologique du *plasmodium* :

## Phase asexuée chez l'homme [1]

Chez l'homme, le cycle est lui-même divisé en 2 phases :

La phase hépatique ou pré-érythrocytaire, ou encore exo-érythrocytaire : elle correspond à la phase d'incubation, cliniquement asymptomatique, et la phase sanguine ou érythrocytaire : elle correspond à la phase clinique de la maladie.

**Cycle exo-érythrocytaire :** Il débute par l'inoculation du sporozoïte (stade infectant pour l'homme) lors de la piqûre du moustique. En effet, au cours d'un repas sanguin l'Anophèle infestée par le *Plasmodium* inocule des sporozoïtes dans l'hôte humain. Les sporozoïtes inoculés restent pendant une trentaine de minutes maximum dans la peau, la lymphe et le sang. Beaucoup sont détruits par les macrophages mais certains parviennent à échapper aux cellules du système immunitaire humain et en une heure infectent les hépatocytes (cellules du foie) où ils se multiplient par divisions cellulaires pendant 10-15 jours et forment des schizontes hépatiques. Ces schizontes arrivent à maturité 8 à 10 jours plus tard puis se lysent, libérant plusieurs milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine : c'est la phase pré-érythrocytaire ou exo-érythrocytaire du parasite.

Dans les infestations à *P. vivax* et *P. ovale*, certains sporozoïtes intra-hépatiques restent quiescents (hypnozoïtes) et sont responsables d'une schizogonie hépatique retardée, qui entraîne la libération dans le sang de mérozoïtes plusieurs mois après la piqûre du moustique, expliquant ainsi les reviviscences tardives observées avec ces deux espèces. Les hypnozoïtes n'existent pas dans l'infestation à *P. falciparum* (pas de rechute) et ils n'ont pas été mis en évidence non plus dans l'infection à *P. malariae*, malgré l'existence de rechutes tardives, ni pour *P. knowlesi*.

Pour certaines espèces (sauf *P. falciparum*), l'infestation hépatique peut devenir latente et permettre au parasite de survivre longtemps dans l'organisme, alors qu'il aura disparu du sang. C'est ce qui explique les rechutes à longue échéance pour deux des espèces infestant l'homme : *P. vivax* et *P. ovale*.

**Cycle érythrocytaire :** Après le premier cycle exo-érythrocytaire a lieu le cycle érythrocytaire qui dure 48 heures. Cette phase est caractérisée par la pénétration des mérozoïtes dans les érythrocytes où ils se transforment en trophozoïtes puis en schizontes

érythrocytaires dont chacun comporte 16 ou 32 noyaux-fils. Chaque noyau donne un mérozoïte lorsque l'hématie éclate : c'est la multiplication asexuée.

Les éclatements brutaux et synchrones des globules rouges sont les caractéristiques des accès de fièvre. La destruction des hématies provoque une anémie et, dans le cas du paludisme cérébral par exemple, le décès du patient survient à la suite d'une micro obstruction des capillaires cérébraux par les érythrocytes impaludés.

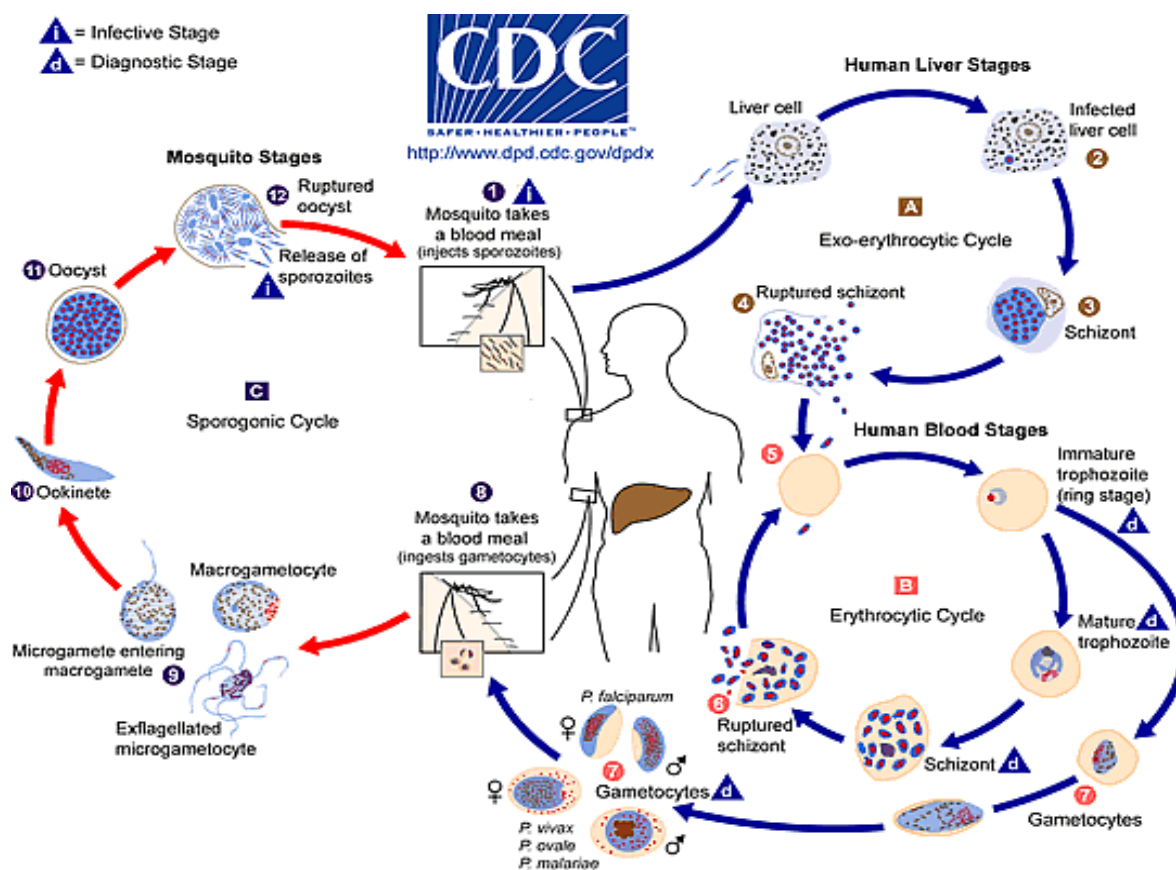
Le mérozoïte libéré du globule rouge va ensuite parasiter une hématie saine et le cycle schizogonique recommence. Plusieurs cycles se succèdent, ce qui favorise la prolifération du parasite dans le corps humain.

Environ une semaine plus tard, certains mérozoïtes se différencient en gamétocytes sexués mâles et femelles qui restent dans le sang périphérique. Le sexe des parasites du paludisme est déterminé, au moins en partie, par les signaux hormonaux de l'hôte vertébré. Les parasites utilisent ces signaux pour déterminer leur sexe de manière optimale afin de préserver les conditions les plus favorables à leur reproduction et à leur transmission. Pour poursuivre leur évolution, ces cellules sexuées doivent être transmises de l'hôte vertébré au moustique-vecteur. Ce dernier absorbera les gamétocytes contenus dans le sang. Ils se reproduiront chez le moustique et il y aura lieu des fécondations [53].

### **Phase sexuée chez l'anophèle (cycle sporogonique)**

Les parasites au stade gamétocytes ingérés par le moustique lors du repas sanguin, se transforment en gamètes dans l'estomac de l'insecte. Les gamètes mâle et femelle, issus des gamétocytes mâle et femelle, s'unissent pour former un zygote mobile appelé Ookinète. L'Ookinète pénètre la paroi de l'estomac et devient un oocyste sphérique.

A l'intérieur de l'oocyste, le noyau se divise à répétition, un grand nombre de sporozoïtes est formé et l'oocyste grossit. Quand les sporozoïtes sont complètement développés, l'oocyste se rompt, libérant les sporozoïtes dans la cavité générale du corps du moustique. Ils migrent alors vers les glandes salivaires. La durée du cycle sporogonique varie pour chaque parasite suivant la température [54].



**Source :** <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

**Figure IV: Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'Homme et le moustique.**

### 3.6 Diagnostic biologique

#### Diagnostic de présomption :

L'hémogramme révèle une anémie de type hémolytique, normochrome ou hypochrome, avec ou sans réticulocytose. Au cours des accès aigus et dans les accès pernicioeux, on retrouve parfois une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, remplaçant la leuconéutropénie habituelle, une thrombopénie est en rapport avec la séquestration splénique des plaquettes, tandis que dans les accès de reviviscence et le paludisme viscéral évolutif, une leucopénie est de règle, de même qu'une thrombopénie et une hypergammaglobulinémie [55].

#### ❖ Diagnostic parasitologique [55]

C'est un diagnostic d'urgence, consistant à mettre en évidence le parasite présent dans le sang, permettant de faire le diagnostic de certitude de l'infestation palustre.

Toutes ces techniques sont des méthodes de diagnostic direct.

#### ❖ **Le frottis mince et la goutte épaisse [56]**

L'examen microscopique du FM et de la GE est la technique de référence préconisée par l'OMS. Il a une bonne sensibilité et une bonne spécificité pour la détection du *Plasmodium*. Il permet un diagnostic rapide et un contrôle de l'efficacité du traitement antipaludique par le suivi de la parasitémie. C'est un examen peu coûteux en moyens et en réactifs et demeure la technique la plus utilisée. Cependant, ses performances en termes de sensibilité et de fiabilité dépendent directement de l'expérience du microscopiste et du niveau de la parasitémie du sujet infecté. Ceci est essentiel d'une part pour juger de l'évolution potentielle et de la gravité de la maladie et d'autre part pour instaurer le traitement adéquat. L'infection à *P. falciparum* étant particulièrement recherchée car elle peut donner des complications graves et s'accompagner d'éventuelles résistances au traitement. Par ailleurs, l'identification de *P. ovale* ou *P. vivax* impose un traitement associé pour prévenir les rechutes liées aux hypnozoïtes intrahépatiques de ces espèces. Le FM permet en outre, de calculer la parasitémie, exprimée en pourcentage d'hématies parasitées, très utile en cas d'infection par *P. falciparum*. Le seuil de détection du FS est de 100 parasites/ $\mu$ l. Cet examen doit par conséquent, être associé systématiquement à la GE, qui détecte des parasitémies plus faibles de l'ordre de 10 à 20 parasites/ $\mu$ l en revanche, la GE ne permet pas le diagnostic de certitude des espèces plasmodiales en raison de la lyse des hématies qui réduit les critères morphologiques d'identification.

La GE classique nécessite un certain délai de réalisation du fait du temps nécessaire au séchage puis à l'hémolyse. Quelques variantes comme le séchage au four à micro-ondes ou l'hémolyse à la saponine suivie d'une concentration par centrifugation ont été proposées pour réduire le temps d'exécution.

#### ❖ **Test de diagnostic rapide (TDR) :**

Ces tests reposent sur la migration d'antigènes de *Plasmodiums* contenus dans le sang périphérique sur une membrane de nitrocellulose et sur leur détection par immuno- capture et immuno- marquage [57]. Ces tests sont faciles et rapides d'emploi (< 20 minutes), relativement bon marché et ne nécessitent ni une source d'électricité ni un entraînement poussé des manipulateurs. Ces tests sont moins sensibles que la goutte épaisse avec une sensibilité de l'ordre de plusieurs centaines de parasites par microlitres de sang (< 500 / $\mu$ L)

pour *P. falciparum*, de plusieurs milliers de parasites par microlitres de sang (< 5000 / $\mu$ L) pour *P. vivax* et une sensibilité encore moindre pour *P. ovale* et *P. malariae* [58]. La qualité de ces tests peut varier d'un lot à l'autre et peut être altérée par des températures ou des humidités extrêmes. La plupart des tests sont à conserver entre 4 et 30°C, à < 70 % d'humidité. La plupart des tests utilisés ne détectent que *P. falciparum* mais il existe de nombreux tests qui détectent les autres espèces plasmodiales selon les antigènes cibles. En pratique, les tests commercialisés combinent souvent la détection de plusieurs antigènes en fonction des conditions épidémiologiques où ils doivent être employés (consulter <http://www.wpro.who.int/sites/rdt/>).

Ces antigènes sont généralement les suivants [58].

- ✓ *HRP2* (histidin rich protein 2) de *P. falciparum* : Cet antigène est sécrété par les formes asexuées et les jeunes gamétocytes et peut persister dans le sang périphérique plus de 15 jours après la disparition des parasites. Sa détection fait l'objet de faux positifs en présence de facteur rhumatoïde ou de faux-négatifs à cause de mutations du gène *hrp2* ou de présence d'anticorps anti*HRP2*. La protéine est codée par le gène *PfHRP2* qui est basé sur la séquence de la souche 3D7 et située sur la région subtelomérique du chromosome 8.
- ✓ la *LDH* (lactate déshydrogénase) : Selon les tests, la *LDH* de *P. falciparum*, la *LDH* de *P. vivax* ou les *LDH* des quatre principales espèces de plasmodium infectant les humains peuvent être détectées. La sensibilité des tests détectant la *LDH* de *P. falciparum* est généralement meilleure que celle des tests détectant la *LDH* de *P. vivax*. La sensibilité de la détection de *P. ovale* et de *P. malariae* est médiocre. Cet antigène est aussi sécrété par les formes asexuées et les gamétocytes mais il disparaît plus rapidement du sang que l'*HRP2*.
- ✓ L'aldolase : Des anticorps capables de reconnaître les aldolases de tous les *Plasmodiums* humains peuvent être utilisés. La sensibilité de détection de ces antigènes est cependant encore moindre que celle des tests détectant l'*HRP2* et la *LDH*. L'avantage essentiel de ces tests est que leur rapidité et facilité d'emploi ne nécessitent pas une formation et un entraînement important. Leur défaut majeur est leur manque de sensibilité et l'absence d'estimation de la densité parasitaire. Le manque de sensibilité de ces tests est acceptable pour le diagnostic de la morbidité palustre dans les zones d'endémie où les accès palustres s'accompagnent habituellement de densités parasitaires élevées. Il limite cependant leur intérêt pour les

études épidémiologiques menées sur les populations asymptomatiques et sur les populations où les densités parasitaires sont basses.

#### ❖ Tests moléculaires [59]

Des techniques de biologie moléculaire sont utilisées depuis plus de 20 ans pour diagnostiquer la présence de *Plasmodium* dans des échantillons sanguins et pour caractériser les populations parasitaires ainsi détectées. La plupart font appel à un stade ou à un autre à la PCR, réaction de polymérisation en chaîne qui permet d'amplifier un fragment d'ADN compris entre deux courtes séquences nucléotidiques servant d'amorces. Ces techniques n'ont cessé d'évoluer et de se perfectionner gagnant en sensibilité, en spécificité, en rapidité, en sûreté en simplicité d'emploi et en capacité d'évaluation quantitative ou semi quantitative des densités parasitaires. L'ADN du *Plasmodium* amplifié et servant à porter un diagnostic d'espèce plasmodiale sont nombreuses. La sensibilité et la spécificité de certaines de ces techniques sont proches de 100 % avec parfois des seuils de détection extrêmement bas, de l'ordre de 0,001 parasite par  $\mu\text{L}$ . Ces techniques sont reconnues comme méthodes de référence car leur performance et leur fiabilité dépendent de la variabilité génétique des séquences d'ADN plasmodial ciblées. Par ailleurs, elles nécessitent des équipements sophistiqués et coûteux, un personnel spécialisé et ont des coûts unitaires bien plus élevés que la microscopie. Leur adaptation au haut débit est cependant possible et leur coût peut être diminué. Ces méthodes sont les seules à permettre en épidémiologie de distinguer les populations plasmodiales présentes simultanément dans un même isolat et d'analyser leur diversité génétique et leur dynamique intra-hôte à l'échelle d'une communauté humaine ou d'un continent ou de la terre. Pour cela, le génotypage concerne des gènes polymorphes codant des antigènes comme *msp1*, *msp2* et *glurp* ou des loci microsatellites supposés être sélectivement neutres. Les premiers servent d'ailleurs à distinguer les recrudescences des nouvelles infections dans les essais d'efficacité des médicaments antipaludiques.

### 3.7 Manifestation du paludisme [44]

- La forme « classique » :

C'est l'accès palustre, fièvre intermittente à fréquence variable plus ou moins caractéristique du *Plasmodium* infestant. La fièvre survient lors de l'éclatement des hématies et de la libération des mérozoïtes.



▪ **Accès pernicieux :**

C'est la forme suraiguë du paludisme à *P. falciparum*, susceptible de tuer rapidement le malade en absence de traitement. C'est une urgence médicale. Le début est brutal (crise convulsive, coma) avec fièvres, troubles de la conscience, du comportement, hémoglobinurie.

▪ **Fièvre bilieuse hémoglobinurique :**

Survenant parfois après prise de quinine motivée par un accès fébrile, cette fièvre s'accompagne d'hémoglobinurie et d'ictère. Il y a hémolyse brutale et massive. Cette forme est devenue rare.

▪ **Rechutes :**

Elles peuvent se produire plusieurs années ou dizaines d'années après un accès palustre, sauf pour *P. falciparum* dont les hépatozoïtes ne peuvent rester dans le foie.

### 3.8 Traitement du paludisme

#### 3.8.1 Politique de traitement du paludisme

On entend par politique de traitement un ensemble de recommandations et de réglementations relatives à la disponibilité et à l'utilisation rationnelle des antipaludiques dans un pays donné [60]. La lutte anti vectorielle qui passe par l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII), la pulvérisation d'insecticides à l'intérieur des habitations (PID), l'adoption de la chimioprevention chez les enfants et les femmes enceintes et le traitement par des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) constituent la pierre angulaire de la stratégie technique édictée par l'OMS et la communauté antipaludique qui ont pour objectif de créer un monde sans paludisme [44].

#### 3.8.2 Traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* [61]

Dans les cas du paludisme simple à *Plasmodium falciparum*, l'OMS recommande de traiter avec une des associations à base d'artémisinine suivante :

- ✓ Artéméther + Luméfantrine
- ✓ Artésunate + Amodiaquine
- ✓ Artésunate + Méfloquine
- ✓ Dihydroartémisinine + Pipéraquine

✓ Artésunate + Sulfadoxine–pyriméthamine (SP)

Le traitement à base d'artémisinine doit s'étendre sur au moins trois jours.

Chez les enfants de moins de 25 kg traités avec la dihydroartémisinine + Pipéraquline, ils doivent recevoir au minimum de 2,5 mg/kg de poids corporel de dihydroartémisinine par jour et 20mg/kg de poids corporel de pipéraquline pendant trois (03) jours.

Au cours du premier trimestre de la grossesse, le traitement s'étend sur 7 jours et s'effectue avec la Quinine + Clindamycine.

Chez les nourrissons de moins de cinq (05) kilogrammes, le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* se fait avec les CTAs et les mêmes dosages que chez les enfants.

Chez les patients co-infectés au VIH/SIDA, l'OMS recommande d'éviter les associations.

Artésunate + SP si le patient est traité avec du Cotrimoxazole (triméthoprime plus Sulfométhoxazole) ;

Artésunate + amodiaquine si le patient est traité avec Efavirenz ou Zidovudine.

Chez les voyageurs non-immunisés, le paludisme simple à *Plasmodium falciparum* sera traité avec les CTAs avant leur retour en zone non-endémique.

### 3.8.3 Traitement du paludisme grave à *Plasmodium falciparum*

#### ❖ Définition

Chez un malade présentant une parasitémie positive avec des formes asexuées de *P. falciparum* et l'absence des symptômes, la présence d'une ou plusieurs des caractéristiques cliniques ou biologiques suivantes indique qu'il souffre de paludisme grave [6].

#### **Manifestation clinique**

- Prostration
- Troubles de la conscience
- Détresse respiratoire (respiration acidotique)
- Convulsions multiples
- Collapsus cardiovasculaire
- Œdème pulmonaire (radiologique)
- Saignement anormal

#### **Manifestation biologique**

- Anémie sévère
- Hypoglycémie
- Acidose
- Insuffisance rénale
- Hyperlactatémie
- Hyperparasitémie

- Ictère
- Hémoglobinurie

L'adulte et l'enfant ayant le paludisme grave (y compris les nourrissons, les femmes enceintes et allaitantes à tous les stades) doivent être traités avec de l'artésunate en injection intraveineuse ou intramusculaire pendant au moins 24 heures jusqu'à ce que le patient tolère l'administration du médicament par la voie orale puis compléter le traitement avec trois (03) jours de traitement avec les CTAs [61].

L'administration de l'artésunate se fait à raison de 3mg/kg de poids corporel chez les enfants de moins de 20 kg et 2,4 mg/kg de poids corporel chez le grand enfant et l'adulte. Dans les milieux où l'artésunate n'est pas disponible en injectable, il faut préférer l'artéméther injectable que la quinine dans les cas de paludisme grave chez l'enfant et l'adulte.

#### **3.8.4 Traitement du paludisme simple aux autres espèces plasmodiales :**

Lorsque l'espèce plasmodiale n'est pas connue avec certitude, le traitement peut se faire avec le protocole de traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum*. Dans les zones où le *Plasmodium* a déjà été déclaré résistant à la chloroquine, le traitement se fera avec les CTAs.

### **3.9 Lutte antivectorielle [62]**

La lutte antivectorielle est essentiellement basée sur :

- ✓ L'aménagement de l'environnement destiné à diminuer le nombre de gîtes anophéliens,

La technique de l'insecte stérile : elle permet la diminution ou l'éradication d'une population d'insectes. Les mâles irradiés par un rayonnement gamma (bombe au Cobalt 60) deviennent sexuellement stériles à cause de mutations dominantes au niveau du sperme.

- ✓ Les aspersion intra-domiciliaires d'insecticides à effet rémanent,
- ✓ Les moustiquaires imprégnées d'insecticides : outil majeur de prévention du paludisme au niveau communautaire, stratégie de lutte recommandée par l'OMS. La résistance des vecteurs est préoccupante, mais il est nécessaire de ré-imprégner régulièrement les moustiquaires pour maintenir leur efficacité. Actuellement, il y a un développement de moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée d'action (MILDA) [OLYSET®, PERMANET®] avec une efficacité de 5 ans.
- ✓ Les ports de vêtements imprégnés d'insecticides (utilisés par les armées),

- ✓ Les répulsifs (insecticides ou repellents). Beaucoup de répulsifs sont disponibles sur le marché. Deux produits sont recommandables en pratique : le DEET et le KBR 3023.

### 3.10 Chimio prophylaxie

#### ❖ Chimio prophylaxie des expatriés et des voyageurs [63]

La prophylaxie médicamenteuse est indispensable pour les zones à *P. falciparum*. Elle n'est pas efficace à 100% mais elle doit être prise pendant tout le séjour et après le retour pendant une durée variable avec l'antipaludique.

Schéma prophylactique pour l'adulte suivant les groupes 1, 2 ou 3 :

- **Pays du groupe 1:** Chloroquine (Nivaquine®) 100 mg/j, séjour + 4 semaines après,
- **Pays du groupe 2:** Association chloroquine (100 mg/j) + proguanil (200 mg/j) (Savarine®) 1 comprimé par jour, séjour + 4 semaines après ; ou association atovaquone + proguanil (Malarone®) : Dose chez les sujets de plus de 40 kg : 1 comprimé adulte (250 mg/100 mg) par jour, séjour + une semaine après.
- **Pays du groupe 3:** Trois choix sont possibles :

Choix n°1 Lariam®, comprimés à 250 mg, 1 comprimé par semaine, 10 jours avant + séjour + 3 semaines après,

Choix n°2 Malarone® : même dose que pour les pays du groupe 2, séjour + une semaine après,

Choix n°3 Doxycycline (Doxypalu®, Granulodoxy®Gé), comprimés à 100 et 50 mg : 100 mg chez l'adulte et chez l'enfant de plus de 8 ans ou pesant plus de 40 kg, 50 mg chez l'enfant de plus de 8 ans pesant moins de 40 kg, séjour + 4 semaines après.

Schéma prophylactique chez la femme enceinte suivant les groupes 1, 2 ou 3 :

- **Pays du groupe 1:** Nivaquine®
- **Pays du groupe 2:** Savarine® ou Malarone®,
- **Pays du groupe 3:** Séjour déconseillé, si séjour indispensable : Lariam® ou Malarone®

Schéma prophylactique Nivaquine chez l'enfant

- **Pays du groupe 1:** Nivaquine®

- **Pays du groupe 2:** Association chloroquine (Nivaquine®) 1,5 mg/kg/j + proguanil (Paludrine®) 3 mg/kg/j (la Savarine® n'étant prescrite qu'à partir de 15 ans) ou Malarone®, comprimé enfant (62,5 mg/25 mg) suivant poids : 1 cp/j de 11 à 20 kg, 2 cp/j de 21 à 30 kg, 3 cp/j de 31 à 40 kg à heure fixe et en prise unique.
- **Pays du groupe 3:** Si poids > 15 kg ou âge > 3 ans : Lariam® ; alternative : doxycycline si > 8 ans ou Malarone® si poids entre 11 kg et 40 kg : de 11 à 20 kg 1cp/j, de 21 à 30 kg : 2cp.j, de 31 à 40 kg : 3 cp/j. Si enfant < 11 kg, ½ cp/j de 5 < 7 kg (hors AMM), ¾ cp/j de 7 < 11kg (hors AMM).

La chimioprophylaxie doit être poursuivie pendant 4 semaines après le retour sauf pour le Lariam® pendant 3 semaines et pour la Malarone® pendant une semaine seulement. Ce court délai s'explique par l'activité schizonticide de la Malarone® dans les formes tissulaires de *P. falciparum* en développement transitoire dans le foie.

#### ❖ **Traitement Préventif Intermittent (TPI) chez les femmes enceintes et les enfants des pays en développement [63]**

Le traitement préventif intermittent (TPIp) consiste à l'administration intermittente et systématique d'antipaludiques : amodiaquine ou sulfadoxine-pyriméthamine (SP) chez les femmes enceintes à titre prophylactique. La chimioprophylaxie est recommandée par l'OMS pendant la grossesse. Elle est associée aux moustiquaires imprégnées dans les zones de haute transmission d'endémie palustre. La SP est utilisée préférentiellement lors des visites prénatales (femmes enceintes ayant plus de 16 semaines d'aménorrhée). Il faut prescrire deux doses de TPIp séparées d'au moins un mois et une 3ème dose si la femme enceinte est séropositive plus trois comprimés de SP en prise unique.

Le traitement préventif intermittent chez les enfants (TPIe) réduit la prévalence de l'infection palustre. La chimioprevention du paludisme saisonnier (CPS) est recommandée chez les nourrissons de 3-11 mois et les enfants de 12-59 mois. Elle associe l'amodiaquine et la sulfadoxine-pyriméthamine.

Chez les nourrissons : un demi-comprimé de 153 mg d'Amodiaquine une fois par jour pendant 3 jours et une dose unique d'un demi-comprimé de 500/25 mg de SP. Chez l'enfant, un comprimé entier de 153 mg d'amodiaquine une fois par jour pendant 3 jours et une dose unique d'un comprimé entier de 500/25 mg de SP. La CPS est prescrite pendant la période au cours de laquelle le risque de contracter le paludisme est plus élevé pour les enfants : par

exemple au Mali en août, septembre et octobre, donc en trois occasions à un mois d'intervalle. La CPS doit être couplée à l'utilisation des moustiquaires imprégnées permettant de réduire de façon substantielle le paludisme, la maladie, l'infection et l'anémie. La mise en œuvre du traitement préventif intermittent du paludisme chez les enfants de moins de 5 ans (TPIe) a été lente au départ.

#### ❖ Effets indésirables des médicaments antimalariques en chimioprophylaxie

Tous les médicaments antimalariques utilisés en chimioprophylaxie : chloroquine, méfloquine, doxycycline, chloroquine + proguanil, atovaquone + proguanil ont des effets indésirables, neuropsychiques, digestifs, cutanés mais en général pas graves. La méfloquine a la plus haute proportion de manifestations neuropsychiques surtout chez les femmes (céphalées, vertiges, troubles psychiques : tendance dépressive, confusion, obnubilation, anxiété, hallucinations). L'association chloroquine + proguanil a la plus haute proportion de troubles cutanés (prurit, éruptions). Tous entraînent des troubles digestifs. La photosensibilité à la doxycycline a dose dépendante non significative à 50 mg, peu significative à 100 mg, fréquente à 200 mg. Une des complications potentielles de la doxycycline est la diarrhée à *Clostridium difficile*, elle est très rare et ne doit pas faire éliminer ce médicament dans cette indication.

### 3.11 Classification des antipaludiques :

#### ❖ Les antipaludiques

Un antipaludique est un composé naturel ou de synthèse qui, administré par voie orale, parentérale ou rectale, à dose unique ou répétée, permet de détruire le parasite ou de bloquer sa croissance dans le but de prévenir ou de guérir la maladie palustre [64].

#### ❖ Mécanisme d'action des antipaludiques [64]

Inhibition de la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive du *Plasmodium*

- Alkylation des métabolites de l'hémoglobine, production de radicaux libres,
- Blocage de la fabrication des acides nucléiques.

Les antipaludiques sont classés en fonction de leur mode d'action ou la structure chimique. La plupart d'entre eux ciblent le stade érythrocytaire de l'infestation palustre. Cette phase est la phase de l'infestation qui provoque une maladie symptomatique [65].

Classification des antipaludiques selon leur mécanisme d'action [66]:

Selon le mode d'action et la structure chimique, la classification suivante est classique.

➤ Les schizonticide

○ Schizonticide érythrocytaires :

- Amino-4-quinoléine : chloroquine, amodiaquine
- Arylamino-alcools :
  - ✓ quinoléine méthanol : quinine, méfloquine
  - ✓ quinghaosu et dérivés de l'artémisinine (artéméter, artésunate, dihydroartémisinine)

Les antipaludéens à effet intra érythrocytaire traversent la membrane des globules rouges puis celle du parasite et pénètrent dans sa vacuole digestive où ils s'accumulent. La résistance aux antipaludéens intra-érythrocytaires serait due à des expulsions des antipaludéens par les parasites.

○ Schizonticide érythrocytaires et tissulaires :

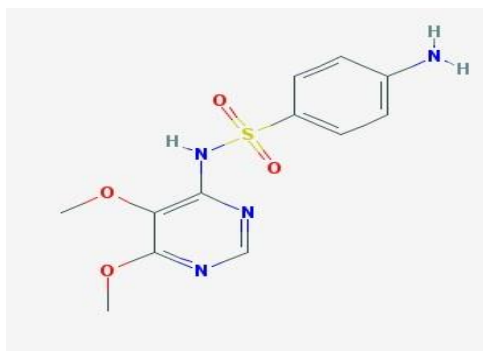
- Antifoliques : sulfamides (sulfadoxine)
- Antifoliniques : pyriméthamine, proguanil
- Antibiotiques : doxycycline

➤ Gaméticide :

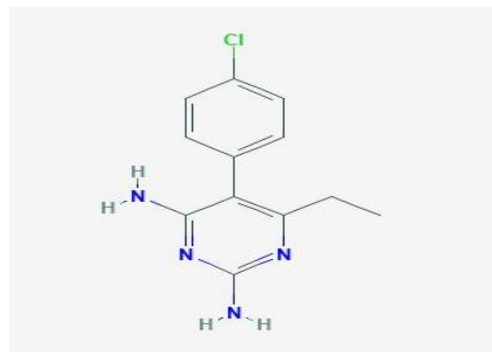
Amino-8-quinoléines : Primaquine, Tafénoquine.

❖ **Molécules utilisées pour la chimioprevention CPS**

➤ **Sulfadoxine** :



**Pyriméthamine**



**Figure V: Structure chimique de la Sulfadoxine et Pyriméthamine**

**Source** : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17134#section=2D-Structure>.

**Elément de pharmacologie de la Sulfadoxine [44]**

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

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

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

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



**Autres familles** : les sulfones (Promine, Dapsone).

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

**Mécanisme d'action :**

➤ **Inhibition de la *dhps*** : sulfadoxine, dapsone (antifoliques).

La sulfadoxine est un antifolique inhibant la *dihydroptéroate synthase* « *dhps* » par compétition avec son substrat, l'acide para-amino-benzoïque (PABA). Elle est inactive sur les gamétocytes et les formes pré érythrocytaires, peu active sur les trophozoïtes, modérément active sur les schizontes érythrocytaires. Son rôle essentiel est la potentialisation des antifoliques, notamment de la pyriméthamine (qui est un antifolique d'action lente, inhibant la *dihydrofolate réductase* « *dhfr* »).

➤ **Pyriméthamine**

**Éléments pharmacologiques de la Pyriméthamine [44]**

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

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

Elle est bien absorbée avec un pic plasmatique obtenu 2 à 3 heures après l'administration une demi-vie longue de 4 à 5 jours. Son efficacité sur les schizoses érythrocytaires des plasmodies est lente mais bonne.

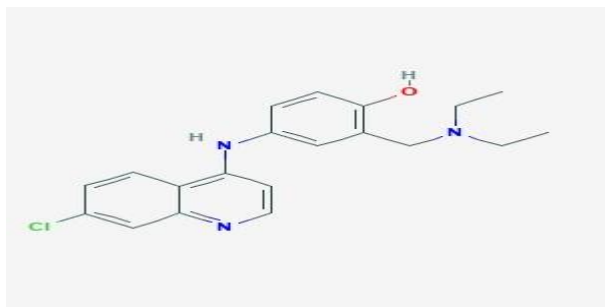
Le taux plasmatique efficace sur les souches sensibles est de 10 ug/ml.

Cette concentration est présente dans le sérum pendant environ 15 jours. Elle a une cinétique voisine de celle des sulfamides retard, elle apparaît donc licite de les associer.

La pyriméthamine est généralement bien tolérée aux doses préconisées en prophylaxie en raison de 25 à 50mg par semaine chez l'adulte. Cependant lors de l'administration prolongée

chez les enfants malnutris, des anémies mégaloblastiques peuvent être observées mais chez la femme enceinte le risque d'anémie est très important. L'élimination très prolongée se fait par voie urinaire et fécale sous forme métabolisée. La pyriméthamine passe dans le lait maternel et traverse la barrière placentaire. Les dérivés les plus intéressants sont la METOPRIME et TRIMETHOPRIME qui sont plutôt des antibactériens que des anti-malariques.

➤ **Amodiaquine** :



**Figure VI: Structure chimique de l'amodiaquine**

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2165#section=2D-Structure>

Les amino-4 quinoléines, à des doses assez élevées ont des propriétés anti-inflammatoires utilisées en rhumatologie dans le lupus érythémateux et la polyarthrite rhumatoïde

Après prise orale, l'absorption est totale et rapide. Le pic sérique est atteint entre la 2<sup>e</sup> et la 4<sup>e</sup> heures. Les amino-4 quinoléines se fixent aux protéines sériques et dans certains tissus (foie, reins, rate, cœur). L'élimination rénale est très lente, d'où la possibilité de prises espacées.

**Effets indésirables [66]**

Rares aux doses utilisées en paludologie, des effets indésirables peuvent survenir dans le traitement de maladies du collagène qui nécessitent des doses trois fois plus élevées. Dans ce cas, peuvent apparaître :

- Des troubles nerveux : vertiges, céphalées ;
- Des troubles oculaires : rétinopathie non réversible.

## Structure Chimique de quelques antipaludiques couramment utilisés en association :

### ➤ Dérivés de l'artémisinine : artéméther, artésunate, dihydroartémisinine

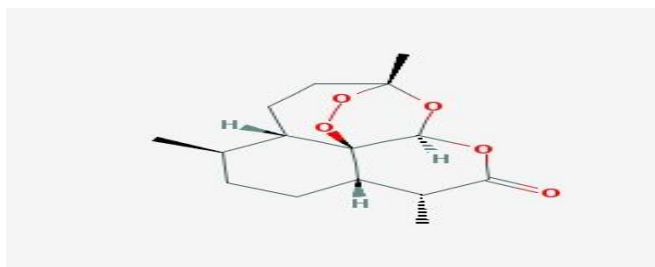


Figure VII : Structure chimique de l'artémisinine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68827#section=2D-Structure>

### ➤ Artéméther et Artésunate

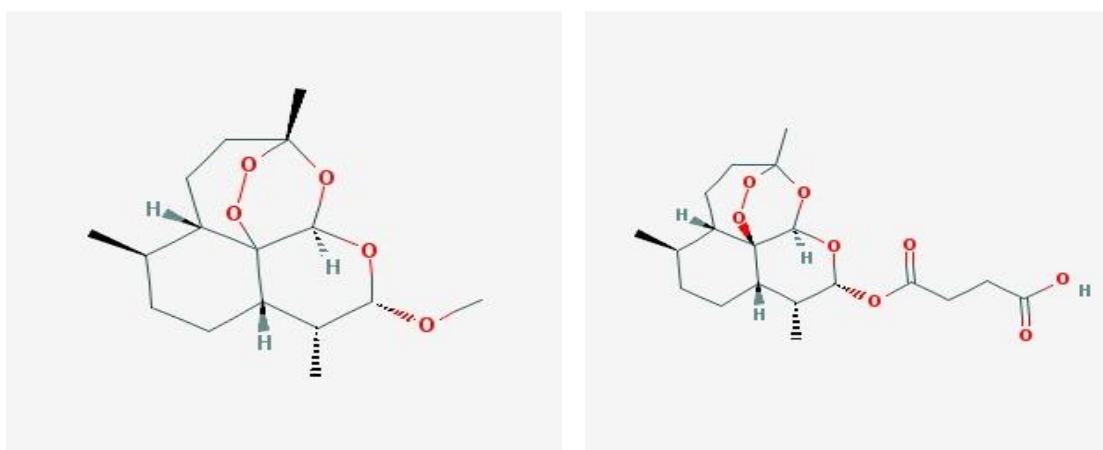


Figure VIII : Structure chimique de l'artéméther et l'artésunate

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/45357887#section=2D-Structure>

## 3.12 Résistance aux antipaludiques [6]

### ❖ Résistance aux antipaludiques :

La résistance aux antipaludiques se définit comme la capacité qu'a une souche plasmodiale de survivre et/ou de se multiplier malgré l'administration et l'absorption correctes d'un antipaludique donné à la dose normalement recommandée [6].

La résistance aux antipaludiques n'est pas nécessairement synonyme d'échec thérapeutique », qui est l'impossibilité d'éliminer la parasitémie palustre et/ou de venir à bout des symptômes cliniques malgré l'administration d'un antipaludique. Ainsi, tandis que la pharmacorésistance

peut conduire à un échec thérapeutique, tous les échecs thérapeutiques ne sont pas dus à une pharmacorésistance. L'échec thérapeutique peut également être le résultat d'une posologie inadaptée, de problèmes liés à l'adhésion au traitement (l'observance), de la mauvaise qualité du médicament, d'interactions avec d'autres médicaments, d'une mauvaise absorption du médicament, ou d'une erreur de diagnostic. En dehors du fait qu'ils conduisent à une prise en charge inappropriée du cas, tous ces facteurs peuvent également accélérer la propagation d'une véritable pharmacorésistance en exposant les plasmodies à des concentrations insuffisantes de médicament.

### 3.12.1 Conséquences de la résistance [6]

Au début, lorsque la résistance et la prévalence du paludisme sont faibles, les effets de la résistance aux antipaludiques sont insidieux. Les symptômes initiaux de l'infestation disparaissent et le malade semble se porter mieux pendant quelques semaines. Lorsque les symptômes réapparaissent, en général plus de deux semaines plus tard, l'anémie peut s'aggraver et la probabilité qu'il soit porteur de gamétocytes (qui portent les gènes de la résistance) et qui transmettent le paludisme est plus grande. Toutefois, le malade et celui qui lui prodigue un traitement peuvent interpréter cela comme une nouvelle infestation. A ce stade, au moment de procéder à des essais cliniques de médicaments, la résistance peut passer inaperçue. Au fur et à mesure que la résistance se renforce, l'intervalle entre primo-infestation et recrudescence se raccourcit jusqu'à ce qu'en fin de compte les symptômes ne disparaissent pas lors du traitement. A ce stade de la situation, l'incidence du paludisme peut augmenter dans les zones de faible transmission et il est probable que la mortalité augmente dans tous les cas de figure.

### Emergence et propagation d'une résistance à un antipaludique [6]

L'émergence de la résistance reflète le produit de la probabilité d'émergence de *novo* (événement rare) et de propagation ultérieure. La résistance de *novo* apparaît au hasard parmi les parasites du paludisme, les patients non immunisés infectés par un grand nombre de parasites reçoivent un traitement inadéquat (en raison de la qualité médiocre du médicament, d'une mauvaise observance du traitement, des vomissements d'un traitement par voie orale, etc.) constituent une source de résistance de *novo* [67]. Cela souligne l'importance de la prescription correcte, du respect des schémas thérapeutiques prescrits et de la mise en place de schémas thérapeutiques toujours très efficaces chez les patients

hyperparasitémiqes. L'immunité constitue un puissant « frein » à l'émergence de la résistance en réduisant les chances de survie et de propagation des parasites résistants.

La propagation de parasites du paludisme mutants résistants est facilitée par l'utilisation généralisée de médicaments avec de longues phases d'élimination. Ceux-ci fournissent un « filtre sélectif », permettant l'infection par les parasites résistants tandis que l'activité antipaludéenne résiduelle empêche l'infection par des parasites sensibles [68].

### 3.12.2 Pharmacodynamique des antipaludiques et sélection de la résistance :

- **Aminoquinoléines [6]**

La chloroquinorésistance peut être multigénique chez *P. falciparum* et est au début conféré par des mutations au niveau d'un gène codant pour un transporteur (*PfCRT*). Ce *PfCRT* peut être un canal anionique pompant la chloroquine hors de la vacuole nutritive. La mutation initiale, qui confère un niveau modéré de chloroquinorésistance est le remplacement d'une lysine par une thréonine au niveau du codon 76. Les positions 72 à 76 sont essentielles pour la fixation de la déséthylamodiaquine (le métabolite biologiquement actif de l'amodiaquine) et du vérapamil (qui peut inverser la chloroquinorésistance). Onze autres mutations du *PfCRT* ont été décrites à ce jour. Ces mutations supplémentaires peuvent jouer un rôle dans la résistance aux aminoquinoléines bien que les mécanismes précis par lesquels elles agissent n'aient pas encore été élucidés. La résistance à l'amodiaquine est liée à la chloroquinorésistance, mais n'est pas bien caractérisée. En présence de mutations du *PfCRT* et des mutations ponctuelles dans un deuxième transporteur (le *PfMDR1*) modulent le degré de résistance de *P. falciparum* *in vitro*. Les plasmodies qui sont hautement résistantes à la chloroquine ont souvent les mutations Lys76Thr et Ala220Ser dans le *PfCRT* Asn86Tyr dans le *PfMDR*. Le rôle des mutations du *PfMDR1* dans la détermination de la réponse thérapeutique après traitement par la chloroquine n'est toujours pas élucidé. Par ailleurs, on n'a pas encore trouvé quelle était la cause de la chloroquinorésistance de *P. vivax*.

- **Méfloquine [6]**

La résistance à la méfloquine et à d'autres amino-alcools structurellement apparentés chez *P. falciparum* résulte d'amplifications (c'est-à-dire de duplications et non pas de mutations) du *Pfmdr* qui code pour la glycoprotéine-p, une pompe membranaire grosse consommatrice d'énergie. Ce phénomène explique près de deux tiers de la variance observée dans la sensibilité. Il est intéressant de noter qu'il semble qu'en général seul le « type sauvage »

(*PfMDR* Asn86) s'amplifie de sorte que dans le passage à partir de la chloroquinorésistance, une réversion du mutant vers le type sauvage précède l'amplification. La duplication des gènes est particulièrement fréquente dans le génome de *P. falciparum*. C'est un événement génétique beaucoup plus courant que la mutation. La fréquence de fond très faible de l'amplification génique laisse à penser qu'elle pourrait bien conférer un désavantage adaptatif en l'absence d'une pression de sélection. Les produits de ces divers événements génétiques entraînent une diminution des concentrations intracellulaires de quinoléines chez la plasmodie (l'importance relative de l'absorption réduite et de l'afflux accru n'est toujours pas élucidée.)

- **Sulfamides et sulfones [6]**

La synergie marquée entre sulfamides et sulfones est très importante pour l'activité antipaludique des associations sulfadoxine-pyriméthamine ou sulfone biguanide. Chez *P. falciparum*, la résistance aux sulfamides et aux sulfones se développe également progressivement au fur et à mesure des mutations du gène codant pour l'enzyme cible, à savoir la *Pfdhps* (qui est une protéine bifonctionnelle avec l'enzyme PPPK). Des résidus d'acides aminés spécifiquement modifiés ont été retrouvés aux positions 436, 437, 540, 580 et 613 du domaine de la *Pfdhps*. Les mutations en position 581 et 631 n'apparaissent pas isolément, mais toujours à la suite d'une mutation initiale (en général en position 437, la glycine remplaçant l'alanine).

- **Les CTA : résistance de *P. falciparum* aux CTA**

Au cours des dernières années, le nombre de personnes infectées par le paludisme, ou qui en sont mortes, a diminué de manière considérable [69]. Ce succès est attribué à un accroissement de l'investissement dans la prévention et dans les mesures de traitement, notamment les moustiquaires de lit imprégnées d'insecticide et l'utilisation des thérapies combinées à base d'artémisinine qui se sont avérées très efficaces.

Toutefois, ces gains récents en vies sauvées sont menacés par l'apparition de la résistance à l'artémisinine et sa propagation dans de nombreuses régions d'Asie du Sud-Est [70]. La résistance aux thérapies couramment utilisées à base d'artémisinine a été fermement établie dans l'ouest du Cambodge, de la Thaïlande, du Vietnam, de la Birmanie orientale et dans le nord du Cambodge, tandis que des signes de résistance émergents ont été observés dans le centre de la Birmanie, le sud du Laos et le nord-est du Cambodge.

Par contre, le continent Africain est exempt de cas confirmés de résistance aux CTA à ce jour. Tout de même, on assiste à une diminution de leur efficacité rapportée par quelques études.

### **3.13 Méthodes d'étude de l'efficacité des antipaludiques [71]**

#### **3.13.1 Tests d'efficacité thérapeutiques**

Méthodes de référence standardisées par l'OMS [60], ces tests permettent d'évaluer l'efficacité clinique des schémas thérapeutiques recommandés pour traiter les accès palustres non compliqués. L'efficacité du principe actif est déduite de la disparition de la parasitémie et de l'amélioration du tableau clinique du patient. Le suivi biologique et parasitologique, pendant 28 ou 42 jours, des patients traités permet de distinguer quatre types de réponse au traitement : l'échec thérapeutique précoce (ETP), l'échec parasitologique tardif (EPT), l'échec clinique tardif (ECT), et une réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) qui caractérise un parasite sensible. Ces études cliniques sont généralement coordonnées avec des tests *in vitro* et moléculaires [2].

#### **3.13.2 Tests *ex vivo* et *in vitro***

Ils consistent à mettre en culture, soit directement (test *ex vivo*), soit après adaptation en culture continue (test *in vitro*), un isolat sauvage de *P. falciparum* en présence d'une concentration croissante d'un antipaludique [25]. La mesure de la croissance des parasites (microscopique, isotopique, ELISA ou fluorimétrique) en fonction de la concentration d'un antipaludique permet de définir son niveau de sensibilité. Le résultat est objectivé par la concentration inhibitrice 50 % (IC50), valeur correspondante à la concentration d'antipaludique permettant d'inhiber la croissance de 50 % des parasites (par rapport au témoin sans drogue). Même si cette technique nécessite une logistique et un plateau technique de qualité, elle permet de tester plusieurs antipaludiques en parallèle et de s'affranchir des facteurs liés à l'hôte (immunité, variation individuelle de la concentration sérique en antipaludique) [2].

- **Etudes 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 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 extraire l'ADN pour la réalisation des expériences de PCR quantitative ou qualitative axées sur les gènes suspects à étudier.

### **3.14 PCR classique [72]**

#### **❖ Principes :**

La PCR ou Polymérase Chain Réaction est une technique qui permet l'amplification des acides nucléiques humains ou exogènes. Elle repose sur la capacité d'une enzyme, une ADN polymérase, à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces (ou primer). Celles-ci sont constituées d'un segment d'acide nucléique. Leur association à l'ADN cible est suivie d'une élongation par la polymérase, aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin. Cette amplification est répétée à un certain nombre de fois afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour être détectée et analysée.

#### **❖ PCR-RFLP Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restrictions :**

L'approche PCR-RFLP conduit à comparer la longueur des fragments de restriction d'une région choisie du génome et préalablement amplifiée par PCR, afin de déterminer le polymorphisme. Cette région est utilisée comme substrat pour les enzymes de restriction. Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui reconnaissent spécifiquement une séquence courte (4 à 8 bases) et coupent la chaîne d'ADN chaque fois qu'elles reconnaissent cette séquence élémentaire. L'ADN se retrouve ainsi fragmenté en morceaux de différentes longueurs séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur un support physique. Un fragment va migrer d'autant plus loin qu'il est court. Un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction est ainsi mis en évidence. Les profils observés permettent l'analyse de la diversité des souches. Cette méthode permet d'éviter l'étape d'hybridation et l'utilisation de sonde radioactive.

### **3.15 High Résolution Melting (HRM) : Fusion à Haute Résolution [44]**

Le HRM est une technique de biologie moléculaire permettant la détection de mutations de polymorphisme génétique et de différences épigénétiques dans des échantillons d'ADN double brin.



## **Principe :**

L'analyse HRM est réalisée à partir d'échantillons d'ADN double brin. La région de l'ADN potentiellement porteuse de la mutation est d'abord amplifiée par PCR. L'amplicon est alors chauffé très progressivement et précisément d'environ 50°C à 95°C. À un certain point, les deux brins d'ADN se séparent : c'est ce processus que l'on appelle fusion de l'ADN. Le principe de la HRM est d'observer cette fusion en temps réel.

## **3.16 Séquençage :**

Le séquençage d'un génome consiste en la détermination de la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN donné. Cette détermination est en général d'autant plus difficile que le génome étudié est grand et riche en séquences répétées [73].

## **PRINCIPE :**

Le principe consiste à obtenir une suite de brin d'ADN de toutes les tailles comprises entre une base et le nombre total de bases du fragment. Tous ces brins déterminent par une base modifiée qui émet, sous l'action d'un rayon laser, une onde lumineuse reconnaissable : toutes les adénines modifiées émettent une même onde lumineuse, différentes des thymines, des guanines et des cytosines modifiées, remettants elles même des ondes lumineuses spécifiques de la nature de la base. Par la technique d'électrophorèse on classe ensuite les brins selon leur taille, sur un gel. Le gel est finalement passé devant un lecteur laser qui interprète la fluorescence. Par exemple si après l'électrophorèse, le lecteur laser lit que l'on a obtenu des brins d'une base se terminant par une guanine, des brins de deux bases se terminant par une adénine, des brins de trois bases se terminant par une thymine, on apprend que le fragment que nous avons séquencé commence par un nucléotide possédant une guanine, se prolonge par un nucléotide possédant une adénine, puis par un nucléotide portant une thymine [74].

## **Séquençage par la méthode de SANGER**

La technique a été mise au point par Sanger en 1977. Il a mis au point des nucléotides dit terminateur ; lorsque l'un d'entre eux est ajouté au brin néosynthétisé, l'ADN polymérase arrête la synthèse, elle ne peut plus ajouter de nucléotide. Il s'agit de didésoxynucléotide ne possédant pas de groupement hydroxyle en 3'. L'absence de ce groupement ne permet plus la formation d'une liaison phosphodiester et la synthèse d'ADN est stoppée.



**Figure IX: Séquenceur du LBMA (CEQ 8000 dna analyzer, beckman coulter).**

# **METHODOLOGIE**

## 4 MÉTHODOLOGIE

### 4.1 Sites et Populations d'étude

L'étude s'est tenue dans trois localités du Mali (Dioro, Missira et Sélingué).

- La commune rurale de Dioro qui relève du District sanitaire de Markala dans la région de Ségou est située dans une zone inondée à vocation rizicole et peuplée de 47 836 habitants. C'est cette position géographique naturelle qui favorise le paludisme par millier de cas surtout pendant la saison pluvieuse. Le paludisme touche pratiquement toutes les couches de la société.

La commune rurale de Dioro dispose d'un CSCom bien doté (en ressources matérielles et humaines) et accessible à tous les villages environnants. Le CSCom dispose d'un laboratoire équipé dont les capacités ont été renforcées par le LBMA dans le cadre de l'exécution du programme ICEMR en Afrique de l'Ouest.

- Le village de Missira : Le second site d'étude relevant de la sous-préfecture de Kolokani est situé sur la rive droite de la rivière Baoulé. Il marque la limite entre les préfectures de Kolokani et de Kita. En fait, la zone de Missira est située dans l'entité géographique nommée « Boucle de Baoulé ».

La population de Missira est estimée à 1200 habitants. Elle se compose de sédentaires, de nomades et comprend différentes ethnies telles que les Kakolo, Soninké ; Peulh ; Malinké ...

- La commune rurale de Sélingué qui relève du cercle de Yanfolila en région de SIKASSO et représentative de l'un des faciès épidémiologiques du paludisme au Mali. Avec une population de 111 469 habitants, Sélingué est un district sanitaire qui, de par sa situation géographique, héberge le paludisme pendant la saison des pluies, mais aussi pendant la saison sèche à cause de la présence du barrage de Sélingué qui lui confère le caractère de transmission bimodale du paludisme. Pendant cette période toute la population est exposée au paludisme, mais les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes sont les plus touchés.

Le district sanitaire de Sélingué dispose d'un Centre de Santé de Référence et sept aires de santé organisée en centre de santé communautaire (CSCoM) et gérées par des associations de santé communautaire (ASACO).

Le Centre de Santé de Référence de Sélingué a un laboratoire d'analyse médicale bien équipé. Ce laboratoire a été aussi renforcé en termes de capacité (formation et équipements de laboratoire) par le LBMA dans le cadre du programme PMI.

Ces différentes caractéristiques ont fait de nos trois zones des sites qui répondaient à nos attentes dans le cadre de cette étude.

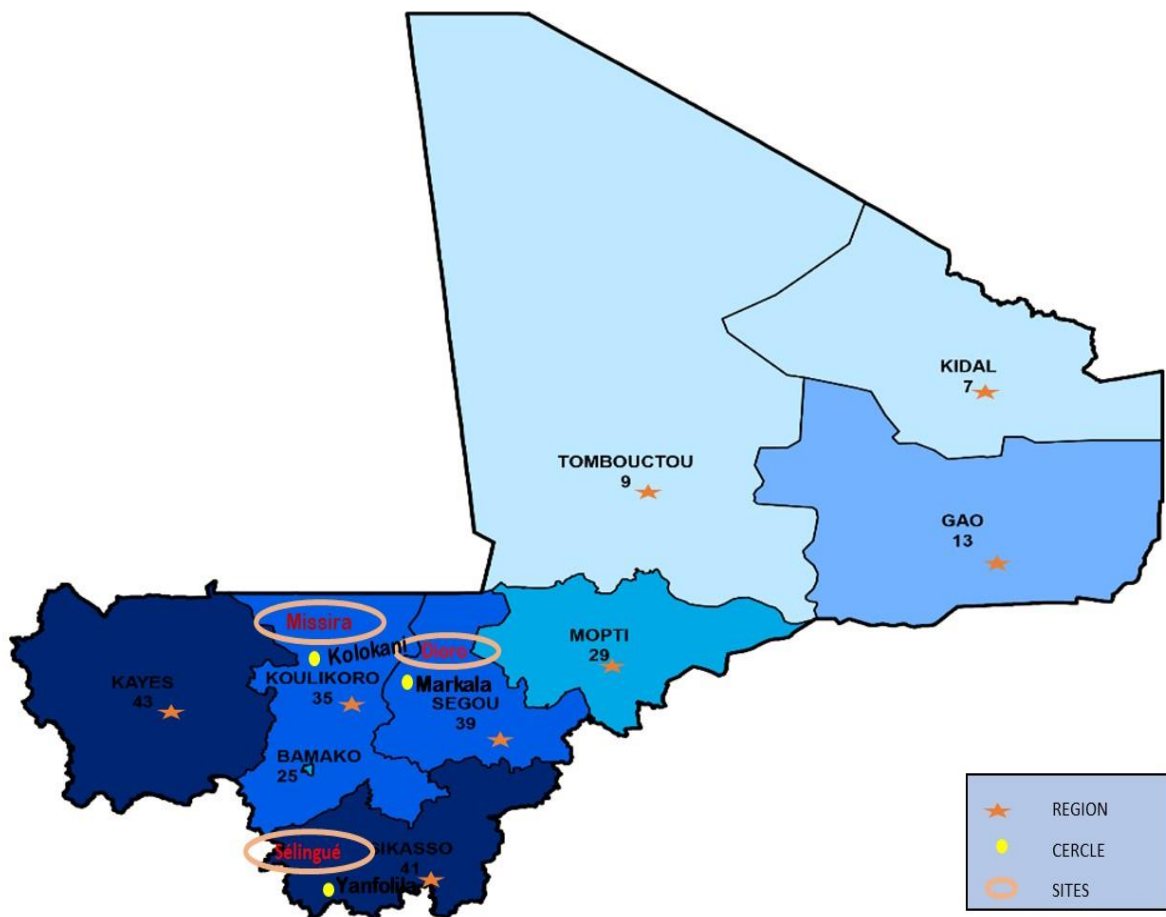


Figure X : Cartes du Mali avec les sites d'études.

#### 4.2 Type et période d'étude :

Il s'agissait d'une étude transversale qui a été menée entre Octobre 2018 et Juin 2019.

#### 4.3 Population d'étude :

Notre population d'étude était constituée d'enfants âgés de 3 à 59 mois.

#### 4.4 Critères d'inclusion :

- Patients âgés de 3 à 59 mois ;
- Patients ayant reçu les 4 passages CPS 2018 ;
- Assentiment des parents ou du tuteur ;
- Goutte épaisse positive avec une parasitémie supérieure à 1000 trophozoïtes/ $\mu$ L.

#### 4.5 Critères de non inclusion :

- Patients âgés de moins de 3 mois et plus de 59 mois ;
- Patients n'ayant pas reçu les 4 passages de la CPS.

#### 4.6 Echantillonnage :

Les patients étaient tous des enfants âgés de 3 à 59 mois. A leur arrivée au centre de santé, les enfants étaient soumis à un examen clinique puis à un test de diagnostic rapide (**cf. annexes 1**) et la goutte épaisse (**cf. annexes 2**). Une fois l'accès palustre simple à *P. falciparum* confirmé, les enfants répondant aux critères d'inclusion étaient enrôlés après l'obtention de l'assentiment de leurs parents ou accompagnants. Sur un total 432 échantillons enrôlés, 111 ont été sélectionnés, extrait et soumis au séquençage lors de cette étude puisqu'ils répondaient aux critères d'inclusion de d'étude. Pour la sélection de ces 111 échantillons, nous avons considéré le site de Dioro comme un groupe et les sites de Missira et Sélingué comme un autre groupe. Pour chaque échantillon provenant du groupe de Sélingué et Missira, deux échantillons provenant du groupe de Dioro étaient sélectionnés en se basant sur la parasitémie du jour de récurrence supérieure ou égale à 1000 trophozoïtes par microlitre de sang. La commune Dioro détenait le plus grand nombre. C'est pour cela qu'elle a été choisie comme site prioritaire et Missira et Sélingué comme site secondaires.

#### 4.7 Traitement des échantillons

Les lames des gouttes épaisses étaient lues par deux lecteurs différents et un troisième dans les cas où la différence entre les parasitémies trouvées par les deux premiers lecteurs valait 20%. Après la lecture des lames, ces dernières sont arrangées dans des boîtes à lames pour leur conservation au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) à Bamako. Au

bout de chaque lame se trouve une étiquette contenant les informations du patient (l'identifiant, la date, le numéro de la lame).

Un confetti s'effectuait pour chaque patient, sur le confetti des patients se trouvaient également ses informations. Après le dépôt des gouttes de sang dans des spots on les laissait sécher avant de les introduire dans des enveloppes avec du dessiccant afin de les protéger contre la poussière. Nous faisons au minimum trois (03) spots par confetti et par patient.

Nous écrivions les identifiants des patients sur les cassettes des TDRs, puis on les conservait dans une boîte.

## 4.8 Méthodes moléculaires

Les analyses moléculaires ont été réalisés au LBMA.

### 4.8.1 Séquençage des échantillons

Nous avons fait le séquençage de ces échantillons dans le but de rechercher les mutations sur les gènes *Pfdhfr*.

- **Extraction d'ADN de *Plasmodium falciparum*** : l'extraction de l'ADN a été réalisée avec le QIAamp® DNA Blood Mini Kit (250) (cf. **annexe 3**). Elle a été faite conformément aux instructions du fabricant.
- **Séquençage du gène *Pfdhfr***

### Séquençage par la méthode de SANGER

Le séquençage sur le gène *Pfdhfr* s'est déroulé en cinq (5) étapes successives.

#### Etape 1 : Nested-PCR (PCR nichée)

Une série de deux réactions de PCR a été utilisée pour amplifier le gène *Pfdhfr*. Le produit de la première PCR a été dilué au 1 :10 et a servi de matrice pour la seconde PCR. Le produit de PCR de la deuxième réaction contient le gène *Pfdhfr* amplifié.

**NB** : En cas de besoin, le protocole peut être stoppé à ce niveau et garder l'amplicon entre 2-4°C pour une semaine.

**Tableau II:** Composition du mélange réactionnel de la 1<sup>ère</sup> réaction d'amplification du gène *Pfdhfr*

Réactifs	Conc Initiale	Pour 25,0 µL de réactif	Conc finale
ddH <sub>2</sub> O	-----	13,0µL	-----
HF Tampon	5X	5,0µL	1X
Amorce Aller	10µmol	1,0µL	0,5µmol
Amorce retour	10µmol	1,0µL	0,5µmol
dNTPs	10nM	2µL	0,5mM
HF fusion Taq	-----	1µL	1U
ADN		2,0µL	
<b>TOTAL</b>		<b>25,0µL</b>	

**Tableau III:** Composition du mélange réactionnel de la 2<sup>ème</sup> réaction du premier produit d'amplification du gène *Pfdhfr*.

Réactifs	Conc Initiale	Pour 25,0 µL de réactif	Conc finale
ddH <sub>2</sub> O	-----	13µL	-----
HF Tampon	5X	5,0µL	1X
Amorce Aller	10µmol	1,0µL	0,5µmol
Amorce retour	10µmol	1,0µL	0,5µmol
dNTPs	10nM	2,0µL	0,2µM
HF fusion Taq	-----	1,0µL	1U
Diluat (1 :10) 1°RxN		2,0µL	-----
<b>TOTAL</b>		<b>25,0µL</b>	

Conditions du cycle de la PCR nichée

1 <sup>ère</sup> Réaction		2 <sup>ème</sup> Réaction	
98°C	2:00min	98°C	2:00min
98°C	0:10min	98°C	0:10min
48°C	0:30min	54°C	0:30min
68°C	2:30min	68°C	2:30min
68°C	10:00min	68°C	10:00min
4°C	∞	4°C	∞
} 30X		} 30X	

### Etape 2 : Purification des produits de la PCR par ExoSAP (Purification de l'amplicon)

Cette étape a pour objectif de purifier l'amplicon en le débarrassant des autres produits de la PCR tels que le restant de MgCl<sub>2</sub>, de dNTPs, d'amorces, enzymes et autres sous-produits de la réaction de PCR.



#### Tableau IV: Mélange réactionnel de l'ExoSAP

Exonucléase I	1,25µL
TSAP	1,5µL
ddH <sub>2</sub> O	247,25µL
<b>TOTAL</b>	<b>250µL</b>

Le nettoyage de l'amplicon s'est déroulé étape par étape de la manière suivante :

- Préparer le mélange tableau 4 ;
- Ajouter 5µL du master mix (tableau 4) à chaque échantillon de 20µL de la deuxième réaction ;
- Placer les tubes dans le thermocycleur puis lancer le cycling comme illustré dans le tableau 4.

#### Condition de cycle de l'ExoSAP

37°C	25 :00min	] 1X
80°C	20 :00min	
4°C	∞	

#### Etape 3 : Cycle du séquençage

Après le nettoyage, les produits de la PCR sont de nouveaux amplifiés dans un mélange contenant à la fois les dNTPs et ddNTPs. Cette opération est réalisée sur une plaque de 96 puits.

**NB :** En cas de besoin, le protocole peut être stoppé à ce niveau et garder l'amplicon entre 2-4°C pour une semaine.

#### Matériel nécessaire pour le séquençage :

- ✓ CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS)
- ✓ pUC18 Control Template
- ✓ M13-47 Sequencing Primer
- ✓ Glycogène
- ✓ Sample Loading Solution
- ✓ Huile minérale

Matériel non fourni avec le kit :

- ✓ H<sub>2</sub>O stérile, éthanol 95%, éthanol 70%

- ✓ Acétate de Sodium 3M pH 5,2
- ✓ Na<sub>2</sub>-EDTA 100 mM pH8
- ✓ Tubes stériles – 0,5 ml, tubes « PCR » 0,2 ml ou plaques 96 puits de 0,2 ml
- ✓ Thermocycleur avec couvercle chauffant
- ✓ Kit de purification

### Tableau V: Cycle de séquençage

Lors de la préparation du mélange, les réactifs sont conservés dans la glace.

- ADN	2	µl
- Amorce (1.6 µM)	2	µl
- DTCS Quick Start Master Mix	4	µl
- H <sub>2</sub> O ultra pure	2	µl
Volume total	10	µl

Centrifuger brièvement les réactions afin d'en homogénéiser les différents constituants au fond du tube.

Conditions du cycle de séquençage

96°C	1:00min	}	30X
96°C	0:20s		
50°C	0:20s		
60°C	4 :00min		
4°C	∞		

### Etape 4 : Précipitation

La précipitation s'est déroulée selon la procédure suivante :

- ✓ Préparer un tube de 0,5ml pour chaque échantillon,
- ✓ Préparer la solution « stop » comme suit : 2µL d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2), 2 µL Na<sub>2</sub>-EDTA à 100 mM (pH 8,0) et 1 µL de 20 mg / ml de glycogène à chaque tube étiqueté, ajouter 5 µL du mélange solution d'arrêt,
- ✓ Transférer chaque échantillon dans un tube de 0,5ml et les vortex.
- ✓ Ajouter 60 µl d'éthanol 95% (-20°C) et vortex.
- ✓ Centrifuger à 14 000rpm (4°C, 15 min). Retirer délicatement le surnageant à l'aide d'une micropipette (le culot doit être visible).
- ✓ Laver le culot 2 fois avec 200 µl d'éthanol à 70%. Après chaque lavage, centrifuger à 14 000 rpm (4°C, 2min), et retirer le surnageant à l'aide d'une micropipette.
- ✓ Sécher les culots sous vide pendant 10 minutes (ou jusqu'au séchage).

- ✓ Remettre les culots en suspension dans 40 µl de solution de chargement (Sample Loading Solution)

### Etape 5 : Séquençage

Procédure d'utilisation pour la réalisation de programmes de séquençage

- ✓ Transférer les échantillons sur la plaque de chargement au format standard 96 puits
- ✓ Recouvrir chaque échantillon d'une goutte d'huile minérale.
- ✓ Charger la plaque sur le passeur d'échantillons
- ✓ Changer l'eau (permutée) de la cuve de rinçage des capillaires.

Dans cette dernière étape, la plaque est insérée dans le séquenceur. Le mélange est aspiré par les capillaires du séquenceur et les séquences des fragments sont fournies par la machine et analysées à l'aide du logiciel Geneious Prime®2019.0.4.

### Analyses des séquences

Au cours de cette étude :

- La souche *P. falciparum* 3D7 a été utilisée comme souche sauvage puis Dd2 comme souche mutée pour le gène *Pfdhfr*.

Après le séquençage des échantillons, les données brutes sont recueillies et analysées avec le logiciel Geneious Prime®2019.0.4. La séquence de la souche *Pf3D7* est utilisée comme séquence consensus pour rechercher les mutations sur les autres séquences.

Nous avons exporté les données brutes dans le logiciel Geneious, toutes les séquences dont la qualité des données est inférieure à 40% ont été exclues de l'analyse au même titre que les extrémités des séquences qui comportent très souvent des données de faible qualité. Les séquences sont ensuite alignées et analysées à l'aide logiciel Geneious pour voir les mutations.

### 4.9 Considérations éthiques et déontologiques

Le protocole de recherche de cette étude a été soumis et validé par le Comité d'éthique de l'INRSP, (Ministère de la Santé, Mali). Tout changement ultérieur du protocole était soumis à l'approbation de ce comité d'éthique. C'était une étude à risque minimal car il ne s'agissait

pas de tester un nouveau médicament ou un matériel à usage biomédical. Elle s'appuie sur des tests de diagnostic et du schéma thérapeutique qui sont utilisés en routine dans les centres de santé dans lesquels nous avons mené cette étude. Pour un assentiment éclairé avant le prélèvement capillaire du sang, nous, investigateurs, avons eu à :

- Expliquer le protocole à chaque parent ou tuteur ;
- Répondre aux questions des parents ou tuteurs ;
- Obtenir un assentiment libre, éclairé et signé ;
- Remettre une copie originale de l'assentiment signé aux parents ou accompagnants ;
- Prélever du sang au bout du doigt.

La décision de participer ou de ne pas participer relevait exclusivement du parent ou tuteur de l'enfant. Ce dernier était informé de la possibilité de se retirer de l'étude à tout moment sans aucune conséquence ou préjudice.

Tous les documents de l'étude (y compris les codes de nos données) étaient gardés dans un lieu sécurisé, et les échantillons de sang étaient étiquetés avec un code unique sans le nom du patient pour assurer la confidentialité des informations.

#### 4.10 Gestion des données

Les séquences obtenues ont été importées et analysées avec le logiciel Geneious Prime®2019.0.4. Pour la comparaison des séquences, nous avons utilisé la séquence de la souche 3D7 « PF3D7-0417200-9221804 » prise sur Genbank,

L'analyse des données a été faite avec **SPSS IBM version 21** et Microsoft Office Excel 2019.

Les tests de PEARSON ont été faits pour observer les corrélations statistiques entre différents paramètres (âge, mutation et parasitémie, mutation).

La base de données, et les autres fichiers électroniques étaient gérés avec Microsoft office Excel et Word 2019.

# **RESULTATS**

## 5 RÉSULTATS

### 5.1 Répartitions des échantillons

Sur un total 432 enfants, l'ADN de 111 enfants ont été extrait et soumis au séquençage lors de cette étude puisqu'ils répondaient aux critères d'inclusion de l'étude. Pour la sélection de ces 111 échantillons, nous avons considéré le site de Dioro comme un groupe et les sites de Missira et Sélingué comme un autre groupe. Pour chaque échantillon provenant du groupe de Sélingué et Missira, deux échantillons provenant du groupe de Dioro étaient sélectionnés en se basant sur la parasitémie du jour de récurrence supérieur ou égale à 1000 parasites par microlitre de sang.

**Tableau VI: Répartition des 111 échantillons selon leur site.**

Echantillons	Effectifs	%
Dioro	74	66,67
Missira	26	23,43
Sélingué	11	9,90
<b>Total</b>	<b>111</b>	<b>100</b>

Les échantillons ont été repartis en fonction de leur site de provenance et il a été trouvé que la plupart de ces patients soit 67% étaient de Dioro.

### 5.2 Qualité et Statut des séquences

#### 5.2.1 Statut des séquences

**Tableau VII: Statut des échantillons selon qu'ils aient été séquencés ou pas.**

Statut	Effectif	%
Non séquencés	41	36,9
Séquencés	70	63,1
<b>Total</b>	<b>111</b>	<b>100</b>

Au total nous avons pu séquencer 70 échantillons soit 63,1% des échantillons sélectionnés. Parmi les 70 échantillons séquencés, tous n'avaient pas des fragments avec un rendement

suffisant. Ainsi les échantillons ont été répartis selon que la séquence soit de bonne ou de mauvaise qualité.

### 5.2.2 Qualité des séquences

**Tableau VIII: Répartition des séquences selon qu'elles soient bonnes ou mauvaises.**

Qualité des séquences	Effectifs	%
Mauvaise	23	32,85
Bonne	47	67,14
<b>TOTAL</b>	<b>70</b>	<b>100</b>

La plupart de nos échantillons amplifiés avec succès, 67,14% ont donné des séquences interprétables.

### 5.3 Paramètres de contrôle du séquençage

La qualité des données brutes (HQ), le pourcentage en GC, et le pourcentage de similarité obtenu par la recherche d'homologie via l'outil Blast ont été utilisés comme paramètres de contrôle

**Tableau IX: Répartition des séquences selon la qualité des données brutes**

Qualités des données brutes	Effectifs	%
≤ 90%	4	6,0
[90-95%]	10	14,9
≥ 95%	53	79,1
<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>100</b>

Ces résultats portent sur le contrôle de qualité des résultats obtenus.

Après séquençage, 79,1% de nos séquences (n=53) avaient des données brutes de lecture des nucléotides supérieures à 95% et 14,9% (n=10) avaient un taux de précision compris entre 90 et 95%.

**Tableau X: Répartition des séquences selon leur le pourcentage en GC**

CG%	Effectifs	%
≤ 20%	1	1,5
[20-30%]	48	71,6
≥ 30%	18	26,9
<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>100</b>

La majorité de nos séquences soit 71,6% (n=48) de *Pfdhfr* avaient une composition en CG compris entre 20 et 30%.

**Tableau XI: Répartition des séquences selon le résultat du blast.**

Résultats BLAST	Effectifs	%
≤ 90%	5	10,9
≥ 90%	41	89,1
<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>100</b>

Après Blast des séquences obtenues, nous avons obtenu un taux de similarité de plus 90% dans 89% (n=41) des cas avec les séquences de *Pfdhfr* prises dans GenBank.

## 5.4 Facteurs sociodémographiques et densité parasitaire

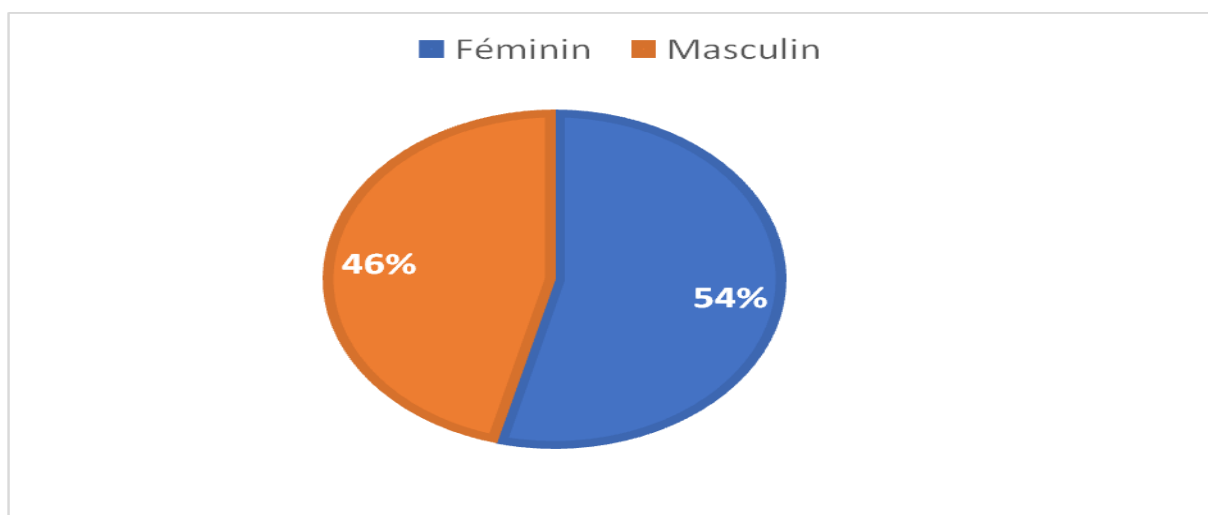
### 5.4.1 Facteurs sociodémographiques

Nos échantillons ont été répartis selon le genre et le site d'étude.

#### 5.4.1.1 Répartition des patients selon le genre.

Nous avons reparti nos patients n=111 ayant participé à cette étude selon le genre.





**Figure XI: Répartition des patients selon le genre.**

Sur les 111 enfants sélectionnés pour le séquençage, 54,1% de ces enfants étaient du sexe féminin. Le sexe ratio était de 1,17 en faveur des filles.

#### 5.4.1.2 Répartition des patients en fonction de l'âge

Nous avons reparti nos patients par tranches d'âge.

**Tableau XII: Répartition des patients en fonction des tranches d'âge.**

Age en mois	Effectifs	%
[03-12]	3	2,7
[13-24]	12	10,8
[25-36]	18	16,2
[37-48]	33	29,7
[49-59]	45	40,5
<b>Total</b>	<b>111</b>	<b>100</b>

L'âge minimum était 9 mois et le maximum 59 mois. La tranche d'âge [49-59] mois était la plus représentée avec 40,5% (n =45). La moyenne d'âge était de 44 mois.

#### 5.4.2 Densité parasitaire

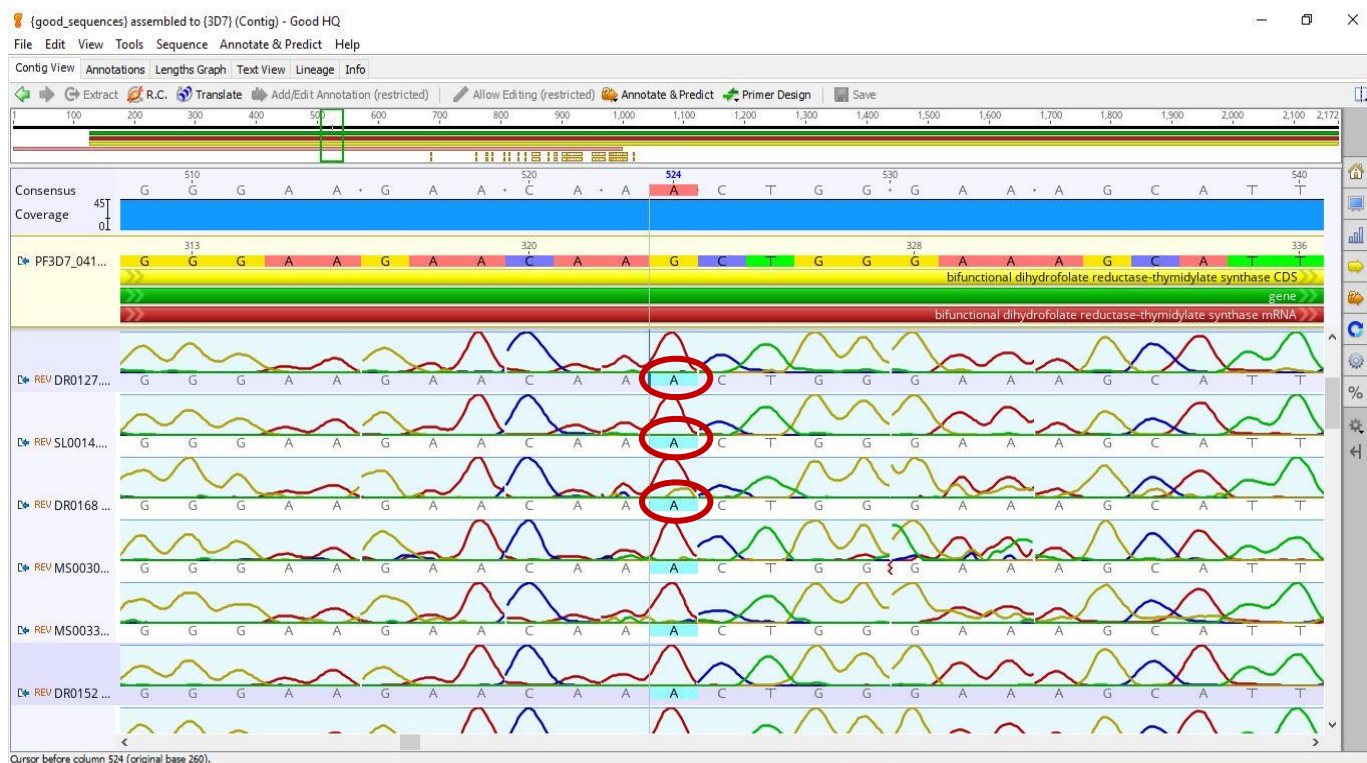
Nous avons reparti les parasitémies par tranches.

**Tableau XIII: Répartition des patients par tranches de parasitémies (n=111).**

Parasitémies (Tf/μL)	Effectifs	%
[1000-50000]	79	71,2
]50000-100000]	21	18,9
]100000-150000]	7	6,3
]150000-200000]	2	1,8
]200000-600000]	2	1,8
<b>TOTAL</b>	<b>111</b>	<b>100</b>

La parasitémie minimale était 1000 trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* (Tf)/μL et le maximum 537500 Tf/μL. La plupart des patients avaient une parasitémie comprise entre 1000 et 50000 trophozoïtes par μL de sang soit 71,2% des patients.

Durant nos activités, nous n'avons pas pu amplifier tous les ADN pour le séquençage.



**Figure XII: Image du séquençage sur le gène *Pfdhfr* à la position 108**

### 5.5 Fréquence des mutations ponctuelles individuelles rencontrées sur le gène *Pfdhfr*

Durant ces activités, nous avons retrouvé des mutations sur différentes positions sur le gène *Pfdhfr*.

**Tableau XIV: Mutations obtenues sur le gène *Pfdhfr* lors du séquençage.**

Positions	49	51	59	108	133	144	145	150	153	155	158	159	160	161	164	165	166	167	168	169	171
<b>Sauvages</b>	39	10	4	2	35	26	28	27	22	29	25	25	16	20	20	19	19	11	16	19	7
<b>Mutés</b>	8	37	42	43	9	6	9	15	5	8	8	4	7	13	14	12	13	6	16	9	24
<b>Effectifs</b>	47	47	46	45	44	32	37	43	27	37	33	29	23	33	34	31	32	17	32	28	31

En plus des mutations majeures 108N ; 51I ; 59R ; et 164L pouvant entraîner une résistance élevée à la pyriméthamine, nous avons trouvé des mutations sur différentes positions sur le gène *Pfdhfr* durant ces activités. Nous avons aussi trouvé d'autres positions qui suscitent des inquiétudes telles que les positions 150 ; 161 ; 166 ; 168 ; et 171 qui avaient des fréquences élevées.

**Prévalence des mutations sur le gène *Pfdhfr* dans les localités de Dioro, Missira et Sélingué.**

**Tableau XV: Prévalences des mutations ponctuelles individuelles rencontrées sur le gène *Pfdhfr* aux positions 51, 59, 108 et 164.**

Mutation	Effectifs (mutés)	%	Total
N51I	37	78,72	47
C59R	42	91,30	46
S108N	43	95,55	45
I164L	14	41,17	34

La prévalence de codons mutants individuels a été déterminée sur des échantillons. Ces échantillons ont montré une prévalence élevée (> 75%) des mutations 51I, 59R et 108N sur le *Pfdhfr*, connues pour être associées à la résistance à la pyriméthamine. La mutation S108N était la plus représentée avec une prévalence de 95,55%, et la mutation I164L avait la plus faible prévalence.

## 5.6 Corrélation entre les mutations sur le gène *Pfdhfr* aux positions (51, 59, 108 et 164) et l'âge et la parasitémie

### 5.6.1 Corrélation entre l'âge et les mutations

**Tableau XVI : Corrélation entre l'âge et les mutations sur le gène *Pfdhfr* aux positions 51, 59, 108 et 164**

Age en mois	Allèle Mutés			
	N51I n=37(%)	C59R n=42(%)	S108N n=43(%)	I164L n=14(%)
[03-12]	1 (2,70)	2 (4,77)	2 (4,65)	1 (7,14)
[13-24]	4 (10,81)	5 (11,90)	5 (11,63)	0 (0,0)
[25-36]	8 (21,62)	9 (21,42)	9 (20,93)	2 (14,29)
[37-48]	10 (27,03)	10 (23,81)	11 (25,59)	6 (42,86)
[49-59]	14 (37,84)	16 (38,10)	16 (37,20)	5 (35,71)
<b>Total</b>	37 (100)	42 (100)	43 (100)	14 (100)

La fréquence des allèles mutés se retrouve dans la tranche d'âge de 49 à 59 mois ; variant de 35,71% pour I164L à 38,10% pour C59R.

### 5.6.2 Corrélation entre la parasitémie et les mutations

**Tableau XVII : Corrélation entre la parasitémie et les mutations sur le gène *Pfdhfr* aux positions 51, 59, 108 et 164**

Parasitémies	Allèle mutés			
	C51I n=37(%)	C59R n=42(%)	N108S n=43(%)	I164L n=14(%)
[1000-50000]	24 (64,86)	28 (66,67)	28 (65,11)	7 (50)
[50025-100000]	10 (27,03)	10 (23,81)	11 (25,59)	5 (35,71)
[100025-150000]	2 (5,41)	2 (4,76)	2 (4,66)	1 (7,14)
[150025-200000]	1 (2,70)	1 (2,38)	1 (2,32)	1 (7,14)
[200025-600000]	0 (0,0)	1 (2,38)	1 (2,32)	0 (0)
<b>TOTAL</b>	37 (100)	42 (100)	43 (100)	14 (100)

Les fréquences les plus élevées des mutations se retrouvent chez les patients ayant une parasitémie comprise entre 1000 à 50 000 parasites/ $\mu$ l de sang. Cette fréquence varie de 64,86% avec 51I à 50% avec 164L.

### 5.7 Prévalence de haplotypes *Pfdhfr*

Tableau XVIII : Combinaison des multiples mutations sur le gène *Pfdhfr*.

Types de Mutation	Haplotypes <i>Pfdhfr</i>	Effectif n=47	%
Double	N51I-S108N	19	40,42
	C59R-S108N	19	40,42
	N51I-C59R	19	40,42
Triple	N51I-C59R-S108N	18	38,29
Quadruple	N51I-C59R-S108N- I150M	03	6,38
	N51I-C59R-S108N-C161G	06	12,76
	N51I-C59R-S108N- G165V	07	14,89
	N51I-C59R-S108N-G166S	04	8,51
	N51I-C59R-S108N-Q171K	01	2,12
Quintuple	N51I-C59R-S108N- I150M- C161G	01	2,12
	N51I-C59R-S108N-C161G-G165V	05	10,63
	N51I-C59R-S108N-C161G- G166S	03	6,38
	N51I-C59R-S108N-G165V- G166S	04	8,51
	N51I-C59R-S108N-C161G-G165V- G166S	04	8,51
Sextuple	N51I-C59R-S108N-C161G-G165V- G166S	04	8,51

La prévalence des quadruple, quintuple et sextuple mutants était faible. Par contre les doubles et triples ont montré des prévalences significativement plus élevées avec respectivement 40,42% et 38,29%.

**Tableau XIX : Mutation 164L associée aux autres positions du gène *Pfdhfr*.**

<b>Types de Mutation</b>	<b>Haplotypes <i>Pfdhfr</i></b>	<b>Effectif n=47</b>	<b>%</b>
<b>DOUBLE</b>	N51I-I164L	09	19,14
	C59R- I164L	09	19,14
	S108N- I164L	10	21,27
	N51I-C59R-I164L	08	17,02
<b>TRIPLE</b>	C59R-S108N-I164L	09	19,14
	N51I-S108N-I164L	09	19,14
<b>QUADRUPLE</b>	N51I-C59R-S108N-I164L	08	17,02
	N51I-C59R-S108N-I164L-I150M	01	2,12
	N51I-C59R-S108N-I164L- C161G	05	10,63
<b>QUINTUPLE</b>	N51I-C59R-S108N-I164L-G165V	06	12,76
	I51I-C59R-S108N-I164L- G166S	04	8,51

La prévalence de l'haplotype I164L a été trouvée en combinaison avec des doubles, triples quadruples et quintuples mutants. Cette position est connue pour être associée à la résistance à la pyriméthamine. La double mutation S108N-I164L avait la plus forte prévalence.



# **COMMENTAIRES ET DISCUSSION**

## 6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Notre étude s'est déroulée d'octobre 2018 à juin 2019 et a porté sur la prévalence des mutations sur le gène *Pfdhfr* dans trois sites différents à savoir Sélingué, Missira et Dioro au Mali. Il s'agissait d'une étude transversale basée sur les enfants de moins de cinq ans qui répondaient à nos critères d'inclusion. En effectuant cette étude, notre objectif était de déterminer la fréquence des mutations sur le gène *Pfdhfr* afin de fournir des données de base sur la proportion de mutations *Pfdhfr* après l'introduction du SP-TPIe dans les localités ci-dessus citées.

### 6.1 Méthodologie

#### 6.1.1 Lieux d'étude

Nos trois sites d'étude ont été choisis sur la base que ce sont tous des sites d'endémie palustre. Les localités de Missira et Sélingué ont des modes de transmission du paludisme différents. A Sélingué, la transmission est assurée à la fois par la pluviométrie et l'eau de rétention créée par le barrage de Sélingué. Le barrage crée beaucoup de gîtes larvaires exposant ainsi les habitants des ménages aux piqûres infectantes des moustiques tout autour de l'eau. En plus de ces gîtes larvaires créés par le barrage, il y a la formation de poches d'eau suite à la pluviométrie qui est assez élevée à Sélingué. Dans cette même localité, la transmission ne s'interrompt pratiquement pas tout le long de l'année car pendant la saison sèche, les niches écologiques créées par le Barrage de Sélingué persistent. Différemment de Sélingué, Missira a un mode dont la transmission est assurée uniquement par la pluviométrie. La zone de Missira est située dans l'entité géographique nommée « Boucle de Baoulé » sur la rive droite de la rivière Baoulé. Missira et ses villages environnants abritent beaucoup de marres. Ceci a pour conséquence la rétention de l'eau pendant la saison des pluies aux voisinages de ces villages.

Pour la commune rurale de Dioro, son choix était justifié par le fait qu'elle bénéficie de la présence du barrage de Markala sur le fleuve Niger, qui permet l'irrigation par gravité de milliers d'hectares de terre pour la culture du riz. Dioro est une zone endémique du paludisme. Mener cette étude, nous a permis d'estimer la prévalence des mutations du gène *Pfdhfr* dans les trois localités.

#### 6.1.2 Méthodes de laboratoire

Les données de notre étude ont été collectées sur les formulaires du report de cas (FRC) et saisies sur le logiciel Microsoft Excel 2013 pour en faire une base de données. Cette méthode nous a permis de collecter des données fiables et exploitables.

Le dépistage se faisait à l'aide de TDR et la goutte épaisse. La lecture des lames des gouttes épaisses se faisait par plusieurs lecteurs. Ces lectures répétées des lames nous ont permis d'éviter les cas de faux positifs. Les papiers confettis ont été faits avec le sang total, séchés à la température ambiante à l'abri des mouches et du soleil suivant les recommandations de l'OMS [75]. Ensuite les papiers confettis ont été rangés dans des sachets secs avec des dessiccants (desséchants) pour une bonne conservation. Ces dessiccants ont été utilisés dans le but de prévenir le développement des moisissures sur ces papiers filtres. Le respect de ces mesures lors de la confection des confettis augmente les chances d'avoir des confettis de bonne qualité et donc du matériel génétique adéquat pour les tests moléculaires [75].

### 6.1.3 Extraction de l'ADN de *Plasmodium falciparum*

Le kit Qiagen a été utilisé pour l'extraction de l'ADN et a été indiqué de préférence comme comportant certains avantages notamment l'extraction d'une quantité optimale d'ADN surtout chez les organismes intracellulaires ainsi que l'élimination des facteurs inhibiteurs de la PCR comme les sels biliaires, l'urée, l'hémoglobine et l'héparine [76].

### 6.1.4 Utilisation de la PCR niché

L'utilisation de la PCR nichée qui est une technique de génotypage nous a permis d'avoir à la fois une plus grande sensibilité et une plus grande spécificité.

## 6.2 Résultats

### 6.2.1 Facteurs démographiques :

Notre étude de séquençage a porté sur 111 enfants souffrant du paludisme simple, tous âgés de 3 à 59 mois (Tableau 11). Ce groupe d'enfants dont le système immunitaire est moins développé constitue le groupe le plus vulnérable à développer le paludisme grave d'où l'intérêt de mener sur eux des études visant à nous renseigner sur les mutations pouvant nuire à la chimioprévention. La tranche d'âge (moins de 5 ans) concernée par cette étude est une bonne tranche pour faire un bon échantillonnage vu que c'est la même tranche d'âge qui comporte le plus grand pourcentage de la population malienne subdivisée. Aussi, selon la cinquième enquête démographique et sanitaire du Mali, les enfants de moins de cinq ans représentent 17% de la population malienne.

La majorité des enfants inclus dans l'étude était de la tranche d'âge [49-59 mois], soit 40,5% de la population d'étude. (Tableau 11). Le sexe ratio 1,17 (60/51) était en faveur du sexe féminin. Ce résultat est similaire au sexe ratio rapporté dans une étude au Ghana sur la concurrence des mutations

de *dhfr* et *crt* de *Plasmodium falciparum* par **MOCKENHAUPT** et coll [77]. La plupart des enfants avaient une parasitémie comprise entre 1000 et 50000 trophozoïtes par  $\mu\text{L}$  ce qui pourrait s'expliquer par l'allaitement exclusif durant les premiers mois de vie et le passage d'anticorps anti palustres de la circulation maternelle dans la circulation fœtale qui protège l'enfant des formes graves de paludisme. A ces dernières raisons s'ajoute le fait que la plupart de ces enfants dorment avec leur maman sous les moustiquaires.

### 6.2.2 Paramètres de contrôle

Nous avons évalué la qualité (HQ%) des séquences obtenues des échantillons dans le but de nous assurer que les mutations qui proviendront de cette étude ont été lues avec un niveau de précision élevée. Nous avons aussi utilisé l'outil BLAST de nos séquences dans le but de les comparer avec celles déjà existantes dans GenBank et nous avons eu des niveaux de similarité supérieurs à 90% dans la plupart des cas. Nous avons également tenu compte du pourcentage en CG dans le but de nous rassurer du pourcentage en CG du *Plasmodium* car chaque espèce a un pourcentage en CG qui lui est spécifique, dont la plupart étaient compris entre [20-30%]. Ces éléments ont été utilisés comme paramètres de contrôle de qualité lors de notre étude. En nous focalisant sur ces trois paramètres lors l'analyse à l'aide le logiciel Geneious, nous avons obtenu 67,15% de séquences interprétables sur les 70 qui ont pu être amplifiées et séquencées.

Nous avons utilisé les souches 3D7, Dd2 comme références. Les souches 3D7 et Dd2 sont respectivement sensibles et résistantes à la SP et ne comportent donc pas les mêmes acides aminés aux positions étudiées. Ces souches ont été utilisées comme références dans beaucoup d'études de recherche des mutations notamment par **DANIELS** et coll [78].

### 6.2.3 Séquençage du matériel génétique de *Plasmodium falciparum*

Le génotypage des échantillons a été fait par séquençage suivant la méthode de Sanger. Cette méthode est actuellement l'une des plus utilisées de préférence en termes de séquençage [79]. Le séquençage par la méthode de Sanger a été décrite dans certaines études comme ayant une sensibilité de 98-100% [80]. Les séquences obtenues après séquençage ont été trimées, alignées et analysées à l'aide du logiciel Geneious Prime [81].

Le séquençage du gène *Pfdhfr* a révélé que dans l'ensemble, la mutation la plus prévalente de *Pfdhfr* se situait à la position d'acide aminé 108 avec une prévalence de 95,56% des infestations contenant la mutation S108N suivie de la mutation C59R observée avec une prévalence de 91,31%, et la mutation

N51I a été observée avec une prévalence de 78,723% des infestations. Plus de 40% des infestations ont été trouvée à la position 164 du gène *Pfdhfr*.

Une étude menée à Dakar au Sénégal entre 2013 à 2014 par **BOUSSAROQUE** et coll. sur la prévalence des gènes de résistance aux antipaludiques [82] ont eu une prévalence de 85,9% pour la mutation C59R, 85,9% pour N51I et 87,9% pour S108N qui étaient similaires à nos prévalences de 78,72% pour N51I, 91,31% pour C59R et 95,56% pour S108N.

Nos résultats étaient similaire en Tanzanie lors d'une étude menée par **BARAKA** et coll. [83] à Nachingwea sur la prévalence du gène *Pfdhfr* qui avaient une prévalence de 67,5% pour la mutation N51I, 95,5% pour S108N et 81,8% pour C59R qui était très proche de nos prévalences.

En Guinée Equatoriale dans le district de Bata, **BERZOSA** et coll. [84] ont trouvé une prévalence de 99%, 79%, 100% et 1,4% respectivement pour les mutations N51I, C59R, S108N, et I164L. Cette prévalence est proche de celle de notre étude sauf pour la mutation I164L où la prévalence est nettement inférieure à notre prévalence **41,17%**.

Une autre étude sur la prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance à la sulfadoxine – pyriméthamine et à l'artémisinine chez *Plasmodium falciparum* menée au Pakistan par **YAQOOB** et coll [14] ont révélé des taux des prévalences de 100%, et 98,8% pour la mutation S108N et C59R qui étaient similaires à nos prévalences mais là il y avait une faible prévalence pour la mutation N51I 8,6% qui était nettement inférieure à notre prévalence de 78,723% pour N51I.

Par contre l'étude que **DICKO** et coll. ont menée au Mali sur les marqueurs moléculaires de la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine un an après la mise en œuvre du traitement préventif intermittent du paludisme chez les nourrissons au Mali [9], avait une prévalence de 51,0%, 51,0%, et 47,7% respectivement au N51I, C59R, et S108N qui était inférieure à notre prévalence. Cela peut s'expliquer par le fait que l'utilisation approfondie de la SP en association avec l'amodiaquine n'avait pas pris de l'ampleur dans la prévention du paludisme au Mali et aussi les mutations évoluent avec le temps. Par contre, elles sont similaires à une étude menée par **DIAWARA** et coll. en 2017 dans le cercle de Kita au Mali, ayant mis en évidence de fortes prévalences de mutations sur le gène *Pfdhfr* aux positions 51 ; 59 et 108 respectivement 79,2%, 81,2% et 87,5% [85]. Nous avons eu une prévalence de 41,17% pour l'allèle I164L qui est un signe de danger pour le Mali car à cette position, la résistance à la molécule devient plus élevée.

Les doubles mutants N51I-S108N, C59R-S108N, N51I-C59R ont été observés respectivement avec une prévalence de 40,42%

Nous avons confronté les multiples mutations rencontrées dans notre étude aux résultats d'une étude menée au Niger par **WOÏ** et coll en 2017 [86]. Il ressort que les 40,42% des doubles mutations sur le gène *Pfdhfr* aux positions 51 et 59 que nous avons, étaient inférieur à 58,3% trouvés par **WOÏ** et coll [86]. Cette différence pourrait s'expliquer par la pression médicamenteuse induite par l'administration massive et continue de la pyriméthamine.

Une étude similaire menée au Pakistan par **YAQOUB** et coll. [14] où la prévalence du double mutant C59R-S108N a été observé à 100% à Sindh et 93,8% à Punjab sont nettement supérieurs à notre prévalence 40,42%. Cette différence pourrait être due aux profils épidémiologiques du paludisme qui varient d'une localité à une autre.

Une étude menée en Angola par **KAINGONA** et coll. en 2016 [5] avaient une prévalence de 47% pour le C59R-S108N qui est proche de notre prévalence 40,42% et une prévalence faible pour N51I-S108N 29% dans la même étude qui est différente de notre prévalence 40,42%.

Le triple mutant N51I-C59R-S108N a été observé avec une prévalence de 38,29%. Une étude menée au Mali par **DICKO** et coll. [9] ont eu une prévalence de 38,5%, qui est similaire au résultat de 38,29% que nous avons obtenu.

Une autre étude menée en 2017 sur des échantillons provenant respectivement du Sénégal et de la Tanzanie par **NDIAYE** et coll. [7] avec des prévalences de 44% et 48% a démontré une prévalence proches aux résultats de nos triples mutations avec une prévalence de 38,29%.

Nos résultats de triple mutant 38,29% étaient proche à ceux d'une étude menée au Ghana par **MOCKENHAUPT** et coll. qui avaient une prévalence de 47% [77].

La prévalence de l'haplotype I164L a été observée dans 14/34 des échantillons avec une prévalence de 41,17% qui est supérieure à celle à l'étude que **BERZOSA** et coll ont menée en 2017 [84] avaient une prévalence de 1,4% ; dans la même étude **BERZOSA** et coll ont détecté une prévalence de l'haplotype quadruple mutant N51I / C59R / S108N / I164L, dans 1,4% des échantillons qui est inférieur à notre quadruple mutant. Ces différences pourraient être dues aux profils épidémiologiques du paludisme qui varient d'une localité à une autre.

Il est important de surveiller la propagation et l'augmentation de cette mutation unique pour permettre la prévention de combinaisons potentielles de cette mutation avec d'autres.

Les patients ayant les quadruples, quintuples et sextuples mutations étaient des enfants âgés de plus de 2 ans avec des parasitémies très élevées (moyenne parasitaire 52142 trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* (Tf)/ $\mu$ L) dont la majorité était de Dioro, une zone très endémique où la transmission est trimodale. La qualité et le Blast des séquences étaient de plus de 95% et leur C-G était dans l'intervalle de 25 à 30%.

La prévalence des haplotypes quadruple mutant était faible sauf chez N51**I**-C59**R**-S108**N**- G165**V** où une prévalence significativement plus élevée a été trouvée.

L'haplotype sextuple mutant a été principalement observé sur des patients provenant de Dioro où la prévalence était de 8,51%.

Tous les patients ayant des triples, quadruples quintuples et sextuples mutations avaient comme mutation initiale N51**I**-C59**R**-S108**N** associée à la mutation I150**M** ; C161**G** ; G165**V** ; G166**S** ; Q171**K**.

La fréquence accrue d'allèles mutants du gène *Pfdhfr* et l'émergence de nouveaux allèles mutants du gène *Pfdhfr* au Mali sont des signaux alarmants précoces de la possibilité d'une diminution de l'efficacité de la SP. La présence de ces mutants était associée à des échecs cliniques et parasitologiques durant la prophylaxie saisonnière (SP/AQ). Tous ces patients se sont présentés au centre de santé avec des symptômes du paludisme et des parasitémies supérieures ou égales à 1,000 parasites par microlitre.

# **CONCLUSION & RECOMMENDATIONS**



## 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

### 7.1 Conclusion

La présence de ces multiples mutations après les 4 passages de la CPS, associée aux échecs cliniques et parasitologiques doit pousser à revoir la stratégie de l'administration des doses de SP/AQ. La présence de l'allèle muté I164L mérite d'être mieux étudié afin d'évaluer son association avec la capacité du *P. falciparum* à résister à la pyriméthamine. Ainsi, avec ces données, la stratégie de l'IPTn doit être évaluée pour s'assurer de son efficacité dans la prévention du paludisme chez la femme enceinte.

### 7.2 Recommandations

#### Au PNLP et au Ministère de la Santé et des Affaires Sociales

- ✓ Effectuer des grandes enquêtes transversales avant et après l'intervention de la CPS.
- ✓ Contrôler l'utilisation de la SP et veiller à ce que son utilisation soit exclusivement réservée pour TPI.

#### Au LBMA et ses partenaires

- ✓ Continuer régulièrement la surveillance des mutations associées à la résistance à la SP.

#### À la population

- ✓ Veiller à l'administration de la CPS aux J2 et J3.

# **REFERENCES**

## 8 REFERENCE

1. **Neveu N.** Une complication majeure du paludisme : le neuropaludisme. 4 juill 2017 [cité 19 août 2019]; Disponible sur: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01557440>
2. **Ménard D, Ariey F, Mercereau-Puijalon O.** Étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (RIIP-Palu). médecine/sciences. 1 juin 2013;29(6-7):647-55.
3. **WHO | Malaria [Internet]. WHO.** [cité 19 août 2019]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/en/>
4. **Rapport 2018 PNLP.** Canevas de synthèse des rapports d'activités 2018 et de programmation 2020 pour les journées d'évaluation des structures centrales.
5. **Kaingona-Daniel EP, Gomes LR, Gama BE, Almeida-de-Oliveira NK, Fortes F, Ménard D, et al.** Low-grade sulfadoxine–pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* parasites from Lubango, Angola. Malar J. 2016;15(1):309.
6. **World Health Organization, éditeur.** Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: World Health Organization; 2006. 253 p.
7. **Ndiaye YD, Diédhiou CK, Bei AK, Dieye B, Mbaye A, Mze NP, et al.** High-resolution melting: a useful field-deployable method to measure *dhfr* and *dhps* drug resistance in both highly and lowly endemic *Plasmodium* populations. Malar J [Internet]. déc 2017 [cité 3 juill 2019];16(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-1811-2>
8. **Ndiaye D, Dieye B, Ndiaye YD, Tyne DV, Daniels R, Bei AK, et al.** Polymorphism in *dhfr/dhps* genes, parasite density and ex vivo response to pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria parasites in Thies, Senegal. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 1 déc 2013;3:135-42.
9. **Dicko A, Sagara I, Djimé AA, Touré SO, Traore M, Dama S, et al.** Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine one year after implementation of intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali. Malar J. 2010;9(1):9.

10. **Ringwald P, Basco LK.** Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring : 1996-2004. 2005.
11. **Maiga H, Lasry E, Diarra M, Sagara I, Bamadio A, Traore A, et al.** Seasonal Malaria Chemoprevention with Sulphadoxine-Pyrimethamine and Amodiaquine Selects *Pfdhfr-dhps* Quintuple Mutant Genotype in Mali. *PloS One*. 2016;11(9):e0162718.
12. **Zakeri S, Afsharpad M, Raeisi A, Djadid ND.** Prevalence of mutations associated with antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum* isolates prior to the introduction of sulphadoxine-pyrimethamine as first-line treatment in Iran. *Malar J*. 13 nov 2007;6:148.
13. **Roper C, Pearce R, Bredenkamp B, Gumedde J, Drakeley C, Mosha F, et al.** Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet Lond Engl*. 5 avr 2003;361(9364):1174-81.
14. **Yaqoob A, Khattak AA, Nadeem MF, Fatima H, Mbambo G, Ouattara A, et al.** Prevalence of molecular markers of sulfadoxine–pyrimethamine and artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* from Pakistan. *Malar J* [Internet]. déc 2018 [cité 23 août 2019];17(1). Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-018-2620-y>
15. **Martin Krahn.** Bases moléculaires des mutations et Bases moléculaires du mode de transmission des maladies génétiques.
16. **Hanna N, Parfait B, Vidaud D, Vidaud M.** Mécanismes et conséquences des mutations. *MS Médecine Sci*. 2005;21(11):969–980.
17. **Krawczak M, Ball EV, Cooper DN.** Neighboring-nucleotide effects on the rates of germ-line single-base-pair substitution in human genes. *Am J Hum Genet*. août 1998;63(2):474-88.
18. **Kahn A.** Les différents types de mutations d'un gène et leurs conséquences. 1986;
19. **Gatton ML, Martin LB, Cheng Q.** Evolution of Resistance to Sulfadoxine-Pyrimethamine in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 juin 2004;48(6):2116-23.
20. **Unité de Recherche sur le Paludisme - Institut Pasteur de Madagascar** [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <http://www.pasteur.mg/departement/unite-paludisme/>

21. **Institut Pasteur de Madagascar.** Evolution de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux médicaments a... [Internet]. Santé & Médecine présenté à; 02:41:19 UTC [cité 12 juin 2018]. Disponible: <https://fr.slideshare.net/atelierpaludisme/fac-2011-clainipm29avril-2011>
22. **Basco LK, Eldin de Pécoulas P, Wilson CM, Le Bras J, Mazabraud A.** Point mutations in the *dihydrofolate reductase-thymidylate synthase* gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* janv 1995;69(1):135-8.
23. **Nzila-Mounda A, Mberu EK, Sibley CH, Plowe CV, Winstanley PA, Watkins WM.** Kenyan *Plasmodium falciparum* field isolates: correlation between pyrimethamine and chlorcycloguanil activity in vitro and point mutations in the *dihydrofolate reductase* domain. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 1998;42(1):164-9.
24. **Sirawaraporn W, Sathitkul T, Sirawaraporn R, Yuthavong Y, Santi DV.** Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase*. *Proc Natl Acad Sci.* 18 févr 1997;94(4):1124-9.
25. **Basco LK, Tahar R, Ringwald P.** Molecular Basis of In Vivo Resistance to Sulfadoxine-Pyrimethamine in African Adult Patients Infected with *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 1998;42(7):1811.
26. **Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J.** Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase-thymidylate synthase* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1987;84(23):8360-4.
27. **Peterson DS, Walliker D, Wellems TE.** Evidence that a point mutation in *dihydrofolate reductase-thymidylate synthase* confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1988;85(23):9114-8.
28. **Ferone R.** Folate metabolism in malaria. *Bull World Health Organ.* 1977;55(2-3):291.
29. **Gregson A, Plowe CV.** Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. *Pharmacol Rev.* 1 mars 2005;57(1):117-45.
30. **Bras JL, Basco LK, Charmot G.** Les bases de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* et ses différents profils. *Cas D'études Rech Francoph Santé.* 1 juill 1993;3(4):293-301.

31. **Yuvaniyama J, P Chitnumsub, S Kamchonwongpaisan, J Vanichtanankul, W Sirawaraporn.** Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures [Internet]. ResearchGate.[cité-9-nov-2019].-Disponible sur:[https://www.researchgate.net/publication/10797451\\_Insights\\_into\\_antifolate\\_resistance\\_from\\_malarial\\_DHFR-TS\\_structures](https://www.researchgate.net/publication/10797451_Insights_into_antifolate_resistance_from_malarial_DHFR-TS_structures)
32. **Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ.** Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the *dihydrofolate reductase-thymidylate* synthase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A. déc 1988;85(23):9109-13.
33. **Sidhu ABS, Verdier-Pinard D, Fidock DA.** Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites Conferred by *pfcr* Mutations. Science. 4 oct 2002;298(5591):210-3.
34. **Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M.** Is *Pfcr* a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol. juill 2007;23(7):332-9.
35. **Cooper RA, Lane KD, Deng B, Mu J, Patel JJ, Wellem TE, et al.** Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. Mol Microbiol. janv 2007;63(1):270-82.
36. **Laufer MK, Thesing PC, Eddington ND, Masonga R, Dzinjalama FK, Takala SL, et al.** Return of Chloroquine Antimalarial Efficacy in Malawi. N Engl J Med. 9 nov 2006;355(19):1959-66.
37. **Duraisingh MT, Cowman AF.** Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. Acta Trop. juin 2005;94(3):181-90.
38. **Price RN, Uhlemann A-C, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al.** Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *Pfmdr1* gene copy number. Lancet Lond Engl. 31 août 2004;364(9432):438-47.
39. **Sibley CH, Hyde JE, Sims PFG, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, et al.** Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: Trends Parasitol. 1 déc 2001;17(12):570-1.

40. **Hurwitz ES, Johnson D, Campbell CC.** Resistance of *Plasmodium falciparum* malaria to sulfadoxine-pyrimethamine ('Fansidar') in a refugee camp in Thailand. *Lancet Lond Engl.* 16 mai 1981;1(8229):1068-70.
41. **Checchi F, Durand R, Balkan S, Vonhm BT, Kollie JZ, Biberson P, et al.** High *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Harper, Liberia: results *in vivo* and analysis of point mutations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 déc 2002;96(6):664-9.
42. **Rodrigues A, Schellenberg JA, Kofoed P-E, Aaby P, Greenwood B.** Changing pattern of malaria in Bissau, Guinea Bissau: Malaria in Bissau. *Trop Med Int Health.* 19 févr 2008;13(3):410-7.
43. **Plowe CV, Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DS, Chimpeni P, Molyneux ME, et al.** Sustained clinical efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated *falciparum* malaria in Malawi after 10 years as first line treatment: five year prospective study. *BMJ.* 4 mars 2004;328(7439):545.
44. **Modibo Telly.** Prevalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* dans la commune rurale de Dioro. Bamako;
45. Study on the *in vitro* resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs coupled with *Pfmdr1* mutation in Bobodioulasso, Burkina faso [Internet]. ResearchGate. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: [https://www.researchgate.net/publication/261705109\\_](https://www.researchgate.net/publication/261705109_)
46. **Koita OA, Sangaré L, Sango HA, Dao S, Keita N, Maiga M, et al.** Effect of seasonality and ecological factors on the prevalence of the four malaria parasite species in northern Mali. *J Trop Med.* 2012;2012:367160.
47. **McCollum AM, Poe AC, Hamel M, Huber C, Zhou Z, Shi YP, et al.** Antifolate Resistance in *Plasmodium falciparum*: Multiple Origins and Identification of Novel dhfr Alleles. *J Infect Dis.* 15 juill 2006;194(2):189-97.
48. **Ruizendaal E, Tahita MC, Geskus RB, Versteeg I, Scott S, d'Alessandro U, et al.** Increase in the prevalence of mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates collected from early to late pregnancy in Nanoro, Burkina Faso. *Malar J* [Internet]. déc 2017 [cité 3 juill 2019];16(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-1831-y>

49. **Organisation Mondiale de la Santé.** Journée mondiale de lutte contre le paludisme 2017: principaux messages [Internet]. Organisation mondiale de la Santé; 2017. Disponible sur: WHO/HTM/GMP/2017.7
50. **Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, et al.** Biodiversité du paludisme dans le monde [Internet]. Paris: J. Libbey; 2004. Disponible sur: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010035112>
51. **Touré YT.** Etude de la sensibilité d'*Anopheles funestus* et d'*Anopheles gambiae* sensu lato aux insecticides dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali. Cah orstomsérie Entomol Médicale Parasitol. 1982;20(2):125-31.
52. **Institut de recherche pour le développement (IRD)** [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <https://www.ird.fr/la-mediathèque/dossiers-suds-en-ligne/vaincre-le-paludisme-archive>
53. **Silvie O, Rubinstein E, Franetich J-F, Prenant M, Belnoue E, Rénia L, et al.** Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. Nat Med. janv 2003;9(1):93-6.
54. **Biodiversité du paludisme dans le monde** [Internet]. Unithèque. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <https://www.unitheque.com/Livre/john-libbey-eurotext/biodiversite-paludisme-dans-monde/4330>
55. **Professeur Pierre Aubry, Docteur Bernard-Alex Gaüzère.** Mise à jour le 03/10/ PDF [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <https://docplayer.fr/17515111-Generalites-sur-la-medecine-tropicale-actualites-2015-professeur-pierre-aubry-docteur-bernard-alex-gauzere-mise-a-jour-le-03-10-2015.html>
56. **Siala E, Ben Abdallah R, Bouratbine A, Aoun K.** Actualités du diagnostic biologique du paludisme: current biological diagnosis of malaria. Rev Tunis D'Infectiologie. 2010;4:5–9.
57. **Murray CK, Gasser RA, Magill AJ, Miller RS.** Update on rapid diagnostic testing for malaria. Clin Microbiol Rev. janv 2008;21(1):97-110.



58. **Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH.** A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg.* déc 2007;77(6 Suppl):119-27.
59. **Rogier C, Henry M-C, Trape J-F.** Revue générale. *Médecine Trop.* 2009;69(2):165–172.
60. **OMS | Paludisme** [Internet]. WHO. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/fr/>
61. **Organisation Mondiale de la Santé.** Accès universel aux tests diagnostiques du paludisme: manuel pratique. 2012;
62. **Pierre Aubry, Bernard-Alex Gaüzère.** Paludisme [Internet]. [cité 25 août 2019]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
63. **Nouhoum Thiam.** Prévalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* dans les localités de Missira et Sélingué au Mali en 2017 [Internet]. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2018/pharma/pdf/18P65.pdf>
64. **Gentilini Marc, Caumes Eric, Danis Martin, Bégué Pierre.** *Médecine tropicale* (6e éd.) [Internet]. calameo.com. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <https://www.calameo.com/read/00128213647ba851bb743>
65. **Mark Travasso.** Antimalarial drugs: An overview [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: [http://freeuptodate.scientificjournals4all.com/contents/mobipreview.htm?20/20/20809?source=see\\_link&anchor=H13](http://freeuptodate.scientificjournals4all.com/contents/mobipreview.htm?20/20/20809?source=see_link&anchor=H13)
66. **Dr D Filisetti & Pr L Monassier.** Les antipaludeens [Internet]. 2012 [cité 5 juin 2018]. Disponible sur: [http://udsmed.u-strasbg.fr/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco\\_Chap16-Antipaludeens\\_2012.pdf](http://udsmed.u-strasbg.fr/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco_Chap16-Antipaludeens_2012.pdf)
67. **The assessment of antimalarial drug efficacy.** - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377597>
68. **Ringwald P.** Monitoring Antimalarial Drug Efficacy. *Clin Infect Dis.* 15 avr 2004;38(8):1192-3.

69. **Rapport OMS sur le paludisme indique une stagnation des progrès** [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/detail/29-11-2017-global-response-to-malaria-at-crossroads>
70. **Résistance aux médicaments antipaludiques**: Vue d'ensemble [Internet]. WorldWide Antimalarial Resistance Network. 2015 [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <https://www.wwarn.org/fr/propos-de-nous/resistance-aux-medicaments-antipaludiques-vue-densemble>
71. **Niare K.** Efficacité des combinaisons AL et AS/SP et quiescence des isolats parasitaires de *Plasmodium falciparum* tolérants à l'artémisinine au Mali. 2013; Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2013/pharma/pdf/13P08.pdf>
72. **Wassiatou Kingnide AA.** Prévalence des mutations de la *dhfr* et de la *dhps*, marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum* a la sulfadoxine-pyriméthamine étude menée dans quatre districts sanitaires du Sénégal janvier 2007 [PhD Thesis]. 2008.
73. **Séquencage des génomes** [Internet]. Planet-Vie. [cité 7 sept 2019]. Disponible sur: <https://planet-vie.ens.fr/content/sequencage-des-genomes>
74. **Séquencage principe** [Internet]. [cité 7 sept 2019]. Disponible sur: [http://www.sciences-en-ligne.com/DIST/Data/Ressources/gene\\_genome/module\\_flash/sequence/seqtxt.htm](http://www.sciences-en-ligne.com/DIST/Data/Ressources/gene_genome/module_flash/sequence/seqtxt.htm)
75. **Mei JV, Zobel SD, Hall EM, Jesús VRD, Adam BW, Hannon WH.** Performance properties of filter paper devices for whole blood collection [Internet]. <http://dx.doi.org/10.4155/bio.10.73>. 2010 [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <https://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/bio.10.73>
76. **Menu E, Mary C, Toga I, Raoult D, Ranque S, Bittar F.** Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples. BMC Res Notes. déc 2018;11(1):1-6.
77. **Mockenhaupt FP, Bousema JT, Eggelte TA, Ehrhardt S, Otchwemah RN, Sauerwein RW,** et al. Concurrence of *Plasmodium falciparum dhfr* and *crt* mutations in northern Ghana. Malar J. 2005;4(1):42.

78. **Daniels R, Ndiaye D, Wall M, McKinney J, Sène PD, Sabeti PC**, et al. Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2012;56(6):2976-86.
79. Review of sequencing platforms and their applications in pheochromocytoma and paragangliomas. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1 août 2017;116:58-67.
80. Comparison of high-resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequenci... - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24410877>
81. **Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S**, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 15 juin 2012;28(12):1647-9.
82. **Boussaroque A, Fall B, Madamet M, Wade KA, Fall M, Nakoulima A**, et al. Prevalence of anti-malarial resistance genes in Dakar, Senegal from 2013 to 2014. *Malar J* [Internet]. déc 2016 [cité 23 août 2019];15(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-016-1379-2>
83. **Baraka V, Ishengoma DS, Fransis F, Minja DTR, Madebe RA, Ngatunga D**, et al. High-level *Plasmodium falciparum* sulfadoxine-pyrimethamine resistance with the concomitant occurrence of septuple haplotype in Tanzania. *Malar J* [Internet]. déc 2015 [cité 23 août 2019];14(1). Disponible sur: <http://www.malariajournal.com/content/14/1/439>
84. **Berzosa P, Esteban-Cantos A, García L, González V, Navarro M, Fernández T**, et al. Profile of molecular mutations in *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfmdr1*, and *Pfcrt* genes of *Plasmodium falciparum* related to resistance to different anti-malarial drugs in the Bata District (Equatorial Guinea). *Malar J* [Internet]. déc 2017 [cité 17 avr 2019];16(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-016-1672-0>
85. **Diawara F, Steinhardt LC, Mahamar A, Traore T, Kone DT, Diawara H**, et al. Measuring the impact of seasonal malaria chemoprevention as part of routine malaria control in Kita, Mali. *Malar J.* 10 août 2017;16(1):325.

86. **Woï L, Amambua NA, Laouali MM, Grais RF.** Evaluation de la résistance moléculaire de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine chez les enfants de moins de 5 ans, Madarounfa, région de Maradi au Niger. 2017 [cité 27 août 2019]; Disponible sur: [http://www.epicentre.msf.org/sites/preprod.epicentre.actency.fr/files/WOI%20MESSE\\_poster](http://www.epicentre.msf.org/sites/preprod.epicentre.actency.fr/files/WOI%20MESSE_poster).

# **ANNEXES**

## 9 ANNEXES

### 9.1 Annexe 1

Le Test de Diagnostic Rapide (TDR)

Les tests de diagnostic rapide dont nous disposions étaient des cassettes de la firme SD BIOLINE.

C'est un test de diagnostic rapide pour la détection qualitative et différentielle de la *HRP-II (Protéine riche en Histidine II)* spécifique de *P. falciparum*.

La sensibilité de ce test est estimée à 99,7% avec une spécificité de 99,5%.

L'utilisation de ces TDRs requiert à chaque fois certains matériels comme :

- Un nouveau sachet de test non ouvert ;
- Un nouveau coton imbibé d'alcool à 70° non ouvert ;
- Une nouvelle lancette stérile ;
- Une nouvelle paire de gants d'examen jetables ;
- Un chronomètre ;
- Un container pour évacuer les déchets tranchants et pointus ;
- Une poubelle pour les déchets non pointus et non tranchants ;

Les TDRs étaient utilisés immédiatement après leur ouverture selon le schéma qui suit :

- D'abord la vérification de la date de péremption ;
- Enfiler une nouvelle paire de gants d'examen ;
- Ouvrir et sortir la cassette du sachet ;
- Ecrire l'identifiant du patient sur la cassette ;
- Nettoyer le 4<sup>ème</sup> ou le 3<sup>ème</sup> doigt du patient avec le coton imbibé d'alcool ;
- Laisser le doigt se sécher à l'air libre ;
- Piquer le doigt d'un coup sec avec la lancette et jeter cette dernière dans la boîte de sécurité ;
- Prélever une goutte de sang avec l'anse de prélèvement et placer la goutte de sang dans l'alvéole de la cassette destinée à recevoir la goutte de sang (carrée marquée de la lettre A) ;
- Ajouter 5 à 6 gouttes de la solution tampon dans l'alvéole ronde marquée de la lettre B ;
- Observer 5 à 10 minutes puis lire ;
- Le test est dit positif si des lignes apparaissent dans les deux fenêtres (du test et du contrôle) ;
- Le test est dit négatif si une ligne apparaît dans la fenêtre de contrôle et pas de ligne dans la fenêtre de test ;
- Le test est dit invalide s'il n'y a pas de ligne dans la fenêtre de contrôle et apparition d'une ligne dans la fenêtre de test.

## 9.2 Annexe 2

- La goutte épaisse :

Cet examen microscopique se faisait en 4 étapes :

### - Etape 1 : Prélèvement du malade

#### Matériel nécessaire

- Lames d'examen de microscope
- Lancettes stériles à usage unique
- Ethanol
- Coton hydrophile
- Crayon gras ou stylo graveur
- **Méthode :**
- Chez les enfants, la piqûre se faisait au niveau du 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> doigt et uniquement sur le côté le moins sensible
- Nettoyer l'endroit choisi d'abord avec un tampon de coton imbibé d'alcool et avec un coton sec pour enlever toute trace d'alcool
- Piquer d'un coup sec et rapide
- Déposer les premières gouttes de sang sur du papier filtre (confettis)
- Tenir de la main droite une lame par les bords et de la main gauche le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang qui sera déposée sur une première lame ensuite prendre une 2<sup>ème</sup> lame pour la même opération.

### - Etape 2 : Préparation et coloration de la goutte épaisse

La goutte épaisse se préparait comme suit :

- On fait un étalement épais au centre de la lame.
- On étale le sang avec le bout d'une lame propre jusqu'à épaissement uniforme
- Au bout de la lame, on colle les étiquettes sur lesquelles se trouvent les identifiants des patients.
- On laisse sécher les lames à l'air libre pendant 10 minutes à l'intérieur du laboratoire à l'abri de la poussière et des mouches.

### **La goutte épaisse :**

La solution de coloration était diluée à 10% et pour cela on prenait 45 ml d'eau distillée plus 5 ml de Solution concentrée de Giemsa que l'on mélange.

Puis plonger les lames à colorer dans la cuve à coloration contenant la solution de Giemsa et laisser colorer pendant 15 minutes. Sortir les lames, rincer à l'eau de robinet et laisser sécher pendant quelques minutes.

### **-Etape 3 : Examen de la goutte épaisse à la recherche des parasites du paludisme**

On dépose une goutte d'huile à immersion sur la goutte épaisse, puis on amène à l'objectif 100 au-dessus de la goutte épaisse. On abaisse l'objectif jusqu'à ce qu'il rentre en contact avec l'huile à immersion ensuite on fait la mise au point et on observe les trophozoïtes. A l'aide d'un compteur, on compte les trophozoïtes observés et aussi les leucocytes.

Le nombre de parasites se comptait sur 300 leucocytes.

#### **- Etape 4 : Estimation de la densité parasitaire sur la goutte épaisse :**

La densité parasitaire est estimée afin de voir le niveau de gravité de l'infection palustre lié au taux d'hématies parasités.

Un paludisme à *P. falciparum* est considéré comme sévère quand le nombre de trophozoïte est supérieur à 100.000 / $\mu$ L, l'accès pernicieux est probable au-delà de 150.000 /  $\mu$ L et une parasitémie supérieure à 400.000 /  $\mu$ L est un élément de très mauvais pronostic.

Vu l'estimation que le nombre moyen de leucocyte par  $\mu$ L est 8.000 :

Le calcul du nombre de parasite par  $\mu$ l se faisait selon la formule suivante :

$$\text{Nombres de parasites par } \mu\text{l} = \frac{7.500 \times \text{Nombres de trophozoïtes comptés}}{\text{Nombre de leucocytes comptés}}$$



### 9.3 Annexe 3

Extraction d'ADN de *Plasmodium falciparum*

L'ADN génomique a été extrait à l'aide du QIAamp® DNA Blood Mini Kit (250) conformément aux instructions du fabricant.

#### Découpage des papiers confettis

##### Matériel

Il faut disposer de : Puncheur, de plaque de découpage des confettis, de kimwipes, d'alcool 70 à 90°, portoir de tube 1,5mL, de tubes 1,5mL, de tubes 50mL.

##### Procédures

Les tubes et les colonnes sont rangés par ordre en fonction des numéros d'échantillon. Chaque colonne correspond au tube qui porte le même numéro d'échantillon

Découper 3 spots de sang puis les placer dans les tubes 1,5mL de l'une des rangées des tubes 1,5mL.

Lors du découpage pour passer d'un échantillon à un autre, le puncheur doit être trempé dans la solution d'alcool puis dans de l'eau distillée ensuite nettoyé avec le kimwipes. Il faut s'assurer que le puncheur est débarrassé de toute trace d'alcool. La plaque de découpage doit être nettoyée aussi à l'alcool. Il faut aussi s'assurer que la plaque n'est pas mouillée par l'alcool au moment de découper les confettis.

##### Extraction proprement dite

Il faut disposer de :

Au moins 3 bains-marie, portoir de tube 1,5mL, portoir de tube 1,5mL pour le bain-marie, vortex, éthanol 96-100° pipettes de [20, 200, 1000 µL], centrifugeuse de tube 1,5mL.

Avant de commencer l'extraction, il faut s'assurer que :

- Les bains marie sont à 85°C pour l'étape 2, 56°C pour l'étape 3 et 70°C pour l'étape 4,
- Equilibrer le buffer AE ou l'eau distillée à la température ambiante pour éluer l'étape 12,
- S'assurer que les buffers AW1 et AW2 ont été préparés avec l'alcool comme indiqué dans le guide du kit d'extraction,
- S'assurer que les buffers AL et ATL ne contiennent pas de précipités, sinon les faire dissoudre en les incubant à 56°C.

##### Procédure

1. Dans les tubes de 1,5mL contenant les 3 spots de sang déjà découpés, ajouter 180  $\mu$ L de buffer ATL,
2. Incuber à 85°C pendant 10mn puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,
3. Ajouter 20  $\mu$ L de protéinase k de la solution de stock, vortex puis incuber à 56°C pendant une heure. Centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,
4. Ajouter 200  $\mu$ L de buffer AL aux échantillons. Centrifuger bien et incuber à 70°C pendant 10mn puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,
5. Ajouter 200  $\mu$ L d'éthanol (96-100°) aux échantillons bien vortex puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,
6. Transférer soigneusement la solution de l'étape 4 dans les colonnes. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000 rpm pendant 1mn. Transférer dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat, bien fermer les colonnes pour éviter la formation des aérosols lors de la centrifugation,
7. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 50  $\mu$ L du buffer AW1,
8. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000 rpm pendant 1mn. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat,
9. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500  $\mu$ L de buffer AW2,
10. Fermer les colonnes puis centrifuger à 14000 rpm pendant 3mn,
11. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les colonnes qui contiennent le filtrat puis centrifuger à haute vitesse pendant 1mn,  
  
Cette étape aide à éliminer le restant de la solution du buffer AW2 restée après l'étape précédente,
12. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes 1,5mL, stériles puis jeter les tubes de collection qui peuvent contenir encore du filtrat. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 150  $\mu$ L du buffer AE ou d'eau distillée. Incuber à la température ambiante (15°C - 25°C) pendant 1mn puis centrifuger à 8000 rpm pendant 1mn,

Après l'extraction, l'ADN obtenu était conservé à -20°C.

## FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom :** OULALE

**Prénom :** Moustaf

**Tel :** (00223) 79 36 57 06 / 63 80 60 66 E-mail : [moustafoulale10@gmail.com](mailto:moustafoulale10@gmail.com)

**Titre de la thèse :** Prévalence des mutations sur le gène *Pfdhfr* dans les localités de Dioro, Missira et Sélingué.

**Nationalité :** Malienne

**Année Universitaire :** 2019-2020

**Ville de soutenance :** Bamako-Mali

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

**Secteur d'intérêt :** Epidémiologie, Biologie

### Résumé

Le traitement préventif intermittent du paludisme chez les enfants de moins de 5 ans (TIPi) par la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et l'amodiaquine réduit les effets indésirables du paludisme pendant la période où le risque de transmission du paludisme est élevé. La résistance à la SP est liée aux mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* de *Plasmodium falciparum*. Cette étude a pour but d'estimer la prévalence du gène *Pfdhfr* chez les enfants de 0 à 59 mois.

L'étude s'est déroulée à Dioro, Missira et Sélingué. Il s'agissait d'une étude transversale se déroulant de la période allant d'Octobre 2018 à juin 2019. Cette étude a été menée dans le cadre du projet PMI. Notre population d'étude était composée d'enfants de 3 à 59 mois. Nos échantillons ont été collectés sur des papiers confetti. Le diagnostic était basé sur l'examen clinique, le TDR et la goutte épaisse. Un prélèvement capillaire sur papier filtre était effectué si l'accès palustre est confirmé par TDR puis le patient est enrôlé. L'extraction de l'ADN a été réalisée avec le kit Qiagen conformément aux instructions du fabricant. Le gène *Pfdhfr* a été amplifié par PCR nichée et les produits ont été séquencés pour identifier les mutations conférant une résistance. Le consentement éclairé a été obtenu des parents des patients avant leur inclusion dans l'étude. Au titre des résultats 111 échantillons sélectionnés pour le séquençage, 70 ont été séquencés soit 63% des échantillons. Parmi les 70 séquencés 47 ont donné des séquences avec un rendement suffisant soit 67.14% des échantillons séquencés. Nous avons observé une forte prévalence du gène *Pfdhfr* aux positions majeures 51 ;59 ;108 et 164 respectivement 78,72% ; 91,30% ; 95,55% et 41,17 %, en plus de ces positions nous avons trouvé plusieurs autres mutations sur ce gène lors du séquençage. La double mutation était de 40,42% pour les haplotypes (N51I-C59R) ; (N51I-S108N) ; et (C59R-S108). La combinaison de l'haplotype triple mutant du gène *Pfdhfr* (N51I-C59R-S108N) avait une prévalence de 38,29%. Par ailleurs Les quadruples, quintuples et sextuples mutations du gène *Pfdhfr* obtenus dans cette étude avaient des prévalences faibles. Le nombre élevé de mutants et la présence de quintuple mutants dans cette étude confirment les inquiétudes quant à l'efficacité de l'TPIe dans un avenir proche.

**Mot clé:** Prévalence, mutations, séquençage, *Pfdhfr*.

## IDENTIFICATION SHEET

**Last Name:** OULALE **First Name:** Moustaf

**Tel :** (00223) 79 36 57 06 / 63 80 60 66 **E-mail :** [moustafoulale10@gmail.com](mailto:moustafoulale10@gmail.com)

**Title:** Prevalence of mutations on *Pfdhfr* gene in Dioro, Missira and Sélingué localities in Mali.

**Academic Year:** 2019-2020

**City of defense:** Bamako-Mali

**Place of deposit:** Library of Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology

**Focus area:** Epidemiology and Biology

### ABSTRACT

The intermittent preventive treatment of malaria in children under 5 years old (TIPi) with sulfadoxine-pyrimethamine (SP) and amodiaquine reduces the adverse effects of malaria during the period when the risk of malaria transmission is high. MS resistance is linked to mutations in *Plasmodium falciparum Pfdhfr* and *Pfdhps* genes. This study aims to estimate the prevalence of the *Pfdhfr* gene in children from 0 to 59 months.

The study took place in Dioro, Missira and Sélingué. This was a cross-sectional study from October 2018 to June 2019. This study was conducted as part of the PMI project. Our study population consisted of children aged 3 to 59 months. Our samples were collected on confetti papers. The diagnosis was based on clinical examination, RDT and thick blood. Capillary sampling on filter paper was performed if malaria was confirmed by RDT and the patient was enrolled. DNA extraction was performed with the Qiagen kit according to the manufacturer's instructions. The *Pfdhfr* gene was amplified by nested PCR and the products were sequenced to identify mutations conferring resistance. Informed consent was obtained from patients' parents prior to inclusion in the study. As a result of the 111 samples selected for sequencing, 70 were sequenced or 63% of the samples. Of the 70 sequenced 47, 67.14% of the sequenced samples were interpretable. We observed a high prevalence of the *Pfdhfr* gene at the major positions 51, 59, 108 and 164 respectively 78.72%; 91.30%; 95.55% and 41.17%, in addition to these positions we found several other mutations on this gene during sequencing. The double mutation was 40.42% for haplotypes (N51I-C59R); (N51-S108N); and (C59R-S108). The combination of the triple mutant haplotype of the *Pfdhfr* gene (N51I-C59R-S108N) had a prevalence of 38.29%. Moreover, the quadruple quintuple and sextuple mutations of the *Pfdhfr* gene obtained in this study had low prevalences. The high number of mutants and the presence of five-fold mutants in this study confirms concerns about the effectiveness of TIPi in the near future.

Key words: Prevalence, mutations, sequencage, *Pfdhfr*.



## 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 les actes criminels,

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

Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Je le jure !

## FICHE SIGNALETIQUE



**Nom :** OULALE

**Prénom :** Moustaf

**Tel :** (00223) 79 36 57 06 / 63 80 60 66

**E-mail :** [moustafoulale10@gmail.com](mailto:moustafoulale10@gmail.com)

**Année Universitaire :** 2018-2019

**Nationalité :** Malienne

**Ville de soutenance :** Bamako-Mali

**Titre de la thèse :** Prévalence des mutations sur le gène *Pfdhfr* dans les localités de Dioro, Missira et Sélingué.

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

**Secteur d'intérêt :** Epidémiologie, Biologie

### Résumé

Le traitement préventif intermittent du paludisme chez les enfants de moins de 5 ans (TIPi) par la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et l'amodiaquine réduit les effets indésirables du paludisme pendant la période où le risque de transmission du paludisme est élevé. La résistance à la SP est liée aux mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* de *Plasmodium falciparum*. Cette étude a pour but d'estimer la prévalence du gène *Pfdhfr* chez les enfants de 0 à 59 mois.

L'étude s'est déroulée à Dioro, Missira et Sélingué. Il s'agissait d'une étude transversale se déroulant de la période allant d'Octobre 2018 à juin 2019. Cette étude a été menée dans le cadre du projet PMI.

Notre population d'étude était composée d'enfants de 3 à 59 mois. Nos échantillons ont été collectés sur des papiers confetti. Le diagnostic était basé sur l'examen clinique, le TDR et la goutte épaisse.

Un prélèvement capillaire sur papier filtre était effectué si l'accès palustre est confirmé par TDR puis le patient est enrôlé. L'extraction de l'ADN a été réalisée avec le kit Qiagen conformément aux instructions du fabricant. Le gène *Pfdhfr* a été amplifié par PCR nichée et les produits ont été séquencés pour identifier les mutations conférant une résistance. Le consentement éclairé a été obtenu des parents des patients avant leur inclusion dans l'étude. Au titre des résultats 111

échantillons sélectionnés pour le séquençage, 70 ont été séquencés soit 63% des échantillons. Parmi les 70 séquencés 47 ont donné des séquencés avec un rendement suffisant soit 67,14% des échantillons séquencés. Nous avons observé une forte prévalence du gène *Pfdhfr* aux positions majeures 51 ;59 ;108 et 164 respectivement 78,72% ; 91,30% ; 95,55% et 41,17 %, en plus de ces positions nous avons trouvé plusieurs autres mutations sur ce gène lors du séquençage. La double mutation était de 40,42% pour les haplotypes (N51I-C59R) ; (N51-S108N) ; et (C59R-S108). La combinaison de l'haplotype triple mutant du gène *Pfdhfr* (N51I-C59R-S108N) avait une prévalence de 38,29%. Par ailleurs Les quadruples, quintuples et sextuples mutations du gène *Pfdhfr* obtenus dans cette étude avaient des prévalences faibles. Le nombre élevé de mutants et la présence de quintuple mutants dans cette étude confirment les inquiétudes quant à l'efficacité de l'TPIe dans un avenir proche.

**Mot clé :** Prévalence, mutations, séquençage, *Pfdhfr*.

