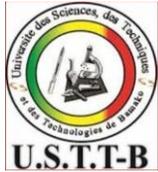


Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique

République du Mali
Un Peuple-Un But-Une Foi

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

Faculté de Pharmacie



Thèse de Doctorat en Pharmacie

Année universitaire 2018-2019

N.....

Titre :

**Etude des mutations du fond génétique de résistance de
Plasmodium falciparum à l'artémisinine dans deux
localités d'endémicités différentes au Mali : Nioro du
Sahel et Dangassa**

Thèse présentée et soutenue publiquement le 10/08 / 2019 devant la Faculté de
Pharmacie

Par M. MAIGA Souleymane

Pour l'obtention du titre de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Prof. Ousmane KOITA

Membres: Dr Souleymane DAMA

Dr Antoine DARA

Co-directeur: Dr Séidina A.S. DIAKITE

Directeur: Prof. Mahamadou DIAKITE

LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018

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	SPECIALITE
1	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
2	Mahamadou	CISSE	Biologie
3	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
4	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
5	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
6	Ousmane	DOUMBIA	Chimie Thérapeutique
7	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
8	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
9	Alou A.	KEÏTA	Galénique
10	Mamadou	KONE	Physiologie
11	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
12	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
13	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
14	Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER: SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
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	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOOGO	Bactériologie - Virologie
2	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
3	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
4	Kassoum	KAYENTAO	Santé/Bio-statistique
5	Bourèma	KOURIBA	Immunologie
6	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
7	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
8	Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
----	---------	-----	------------

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	Antoine	DARA	Biologie-Moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
10	Kléligui Casimir	DEMBELE	Biochimie clinique
11	Seydina S.A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOÏTA	Biochimie clinique
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé publique
16	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
17	Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
18	Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie

4	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Oumar	GUINDO	Epidémiologie
6	Falaye	KEÏTA	Santé publique/Santé Environnement
7	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
8	Yacouba	MAÏGA	Bio-statistique
9	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
10	Oumar	SANGHO	Epidémiologie
11	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

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	Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
7	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
8	Moussa	SANOGO	Gestion
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

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

DER: SCIENCES DU MÉDICAMENT

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
----	---------	-----	------------

1	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie

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	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie
2	Sekou 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	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
5	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

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

DEDICACES

Nous dédions ce travail à :

La mémoire de notre très cher et aimable père feu Idrissa Djibrilla Maïga

Maître d'œuvre de ma réussite académique, tu m'as enseigné durant toute ta vie les valeurs du travail, du dynamisme, de la sincérité et de l'honneur. Tu as incarné pleinement jusqu'à vos derniers instants de vie les vertus du savoir fécond. Je vous en suis reconnaissant pour votre éducation sans faille et pour tous les sacrifices consentis depuis notre bas âge. Que votre âme repose en paix et qu'Allah dans sa miséricorde vous élève au rang de ses élus qui siégeront dans la roseraie éternelle. Amen !

La mémoire de notre mère feu Salamata Touré

Pour ton amour et ton affection maternelle. Je vous témoigne toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance pour votre éducation, votre soutien affectif, et moral durant mes études. Que votre âme repose en paix dans le jardin d'Eden « Al Firdawssou ». Amen !

REMERCIEMENTS

A mes frères et sœurs, **Djibrilla Alassane Maiga, Aliou Idrissa, Djibrilla Abdourhamane, Abdourhamane Idrissa, Ahamadou Idrissa, Djibrilla Moussa, Amidou Togola, Mohamed Diakite Abdourhamane Ahamadou, Alassane Moussa, Agaichatou Moussa, Amou Daouda, Zeinaba Idrissa, Adjara Daouda, Taya Idrissa,** merci pour votre amour, votre confiance et soutien que vous m'avez apportés tout au long de mes études. Certes, vivre ensemble n'est pas facile mais vous avez toujours été patients et respectueux envers moi.

A mes amis du Lycée Sportifs Ben Oumar Sy, **Oumou Coulibaly, Djibrilla Moussa, Ali Touléna, Moussa Sidibé, Hamidou Nioumanta, Barema Samassekou, Aboubacar Bayaya Tounkara, Amadou Haidara, et Kadiatou M Touré,** merci pour votre soutien.

A mes amis de l'Institut National de Formation en Sciences de la Santé (INFSS), **Idrissa Bouaré, Sidi Modibi Kane Dialla, Fatoumata Diarra, David Coulibaly Djeneba wologuem, Mama Diakité, Cheick Diarra, Fatoumata Touré et Halidou Touré,** pour votre encouragement

A mes amis de la faculté de pharmacie, **Nouhoum Koné, Cabinet Doumbia, Morifing Doumbia, Sidi Modibo Kane Diallo, Idrissa Bouare, Moussa Tounkara ; Fanta Amadou Diane,** pour votre aide.

A tout le personnel de la pharmacie **Mariam Hady Belco, Dr Kodio Abdourhamane, Dr Cissé Hamidou, M. Siaka samake, M. Sory Sissoko, M. Touré Mohamed, M. Daouda Diabaté, M. Kodio Mohamed et Mme Maiga Mahydatou,** pour votre soutien

A toute l'équipe de l'unité immunogénétique et hémoglobinopathie du MRTC : Dr Seidina Diakite, Dr Sory I Diawara, Dr Drissa Konate, Dr Karim Traoré, Dr Oumou Coulibaly, Dr Bourama Keita, Dr Ibrahim Sanogo, Dr Mory Doumbia, Dr Kassé Fatoumata, Mrs Sidi Modibo Kane Diallo, Nouhoum Koné, Fomba, merci pour votre entière disponibilité, votre soutien et votre sympathie.

Hommages aux honorables membres du jury

A notre Maître et Président du Jury, Pr Ousmane KOITA

- Pharmacien biologiste ;
- PhD en Parasitologie moléculaire ;
- Professeur Titulaire de Biologie Moléculaire Appliquée à la FST et de Biologie Animale à la Faculté de Pharmacie ;
- Ancien Directeur-Adjoint du SEREFO ;
- Responsable du laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée à la FST
- Président du Groupe National technique de Travail pour le Confinement.

Cher maître

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de présider ce jury malgré vos multiples occupations, prouve votre amour pour la science et votre cordialité.

Votre rigueur scientifique, votre sens du travail bien fait font de vous un maître admiré et respecté.

Quel honneur pour nous de vous avoir comme Président de notre Jury. Que Dieu vous comble de grâces.

A notre Maître et Juge, Dr Souleymane DAMA

- Docteur en Pharmacie
- Titulaire d'un PhD en parasitologie ISFRA/ USTTB
- Titulaire d'un Master en Pharmacologie et en Parasitologie
- Maître Assistant en Parasitologie à la Faculté de Pharmacie

Cher maître

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

La qualité de votre contribution fut précieuse et inestimable pour parfaire ce travail.

Trouver ici, cher maitre, l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Juge, Dr Antoine DARA

- Docteur en Pharmacie
- PhD Microbiologie moléculaire et Immunologie
- Maître-assistant en Biologie-Moléculaire à la FAPH

Cher maître

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Votre désir profond de valoriser la profession fait de vous un homme respectable.

Trouver ici, cher maitre, l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Co-directeur, Dr Seidina A.S. DIAKITE

- Docteur en Pharmacie
- PhD Immunologie à l'Université Pierre et Marie Curie/USTTB
- Maître-assistant en Immunologie à la FAPH

Cher maître

Tout au long de ce travail, nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques.

Votre disponibilité constante et votre amour pour le travail bien fait font de vous un maitre respectable.

Permettez-nous cher maître de vous adresser l'expression de notre immense gratitude et de nos sincères remerciements.

A notre Maître et Directeur de Thèse, Pr Mahamadou DIAKITE

- PhD Immunogénétique à l'Université d'Oxford
- Responsable du Laboratoire Immunogénétique et Parasitologie MRTC
- Chef du Département des Affaires Étrangères et de Coopération de l'USTTB
- Directeur Scientifique Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique
- Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique de la FMOS/FAPH

Cher maître,

Vous nous avez fait un immense honneur en nous acceptant dans votre équipe de recherche médicale. Tout au long de ce travail nous avons apprécié vos grandes qualités scientifiques et humaines, vos enseignements et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail font de vous un exemple à suivre.

Cher maître veuillez recevoir en toute modestie l'expression de notre immense gratitude.

LISTE DES ABREVIATIONS

ART	Artémisinine
CTA	Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AL	Artéméther-Luméfantrine
ARNm	Acide Ribonucleique Messenger
<i>arps10</i>	Apicoplaste Ribosomal Protein s10
AS-AQ	Artésunate-Amodiaquine
AS-MQ	Artésunate-Méfloquine
As-Pyr	Artésunate- Pyronaridrine
AS-SP	Artésunate-Sulfadoxine-Pyriméthamine
ATP	Adenosine-TriPhosphate
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice 50
CME	Clathrin-Mediated Endocytosis
CQ	Chloroquine
<i>crt</i>	Chloroquine Résistance Transporter
CSP	Circumsporozoite Surface Protéin
DHA-PQ	Dihydroartémisinie-Pipéraquine
<i>Dhfr</i>	Dihydrofolate Réductase
<i>Dhps</i>	Dihydroptéroate Synthétase
<i>Fd</i>	Ferrodxin
G6PD	Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase
HIF-alpha	Facteur Induit par l'Hypoxie
HRP2	Histidine Rich Protein 2
IFN-γ	Interféron Gamma
IgG1	Immunoglobine de Type G1
IgG3	Immunoglobine de Type G3
IL-10	Interleukine-10
LDH	Lactates Déshydrogénases Parasitaires
<i>mdr2</i>	Multidrug Résistance Protein2
MHC	Système Majeur d'Histocompatibilité
MQ	Méfloquine
MSP-1	Mérozoïte surface Protein-1
MSP-2	Mérozoïte surface Protein-2
Nrf2	Facteur de Transcription 2
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
pfap2mu	Sous-unité 2 mu du complexe de protéine adaptatrice <i>P. falciparum</i>

<i>PfEMP1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Protein 1
PfHRPII	<i>P.falciparun</i> Histidin Rich ProteinII
<i>Pfmdr1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug Résistance Protein1
pfubpl	Protéase 1 Spécifique de l'Ubiquitine
Pgh1	<i>P. falciparun</i> P-Glycoprotéine Homologue1
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
PVM	Membrane de la Vacuole Parasitophore Sarco/endoplasmic Reticulum Membrane Calcium
SERCA	ATPases
SNPs	Polymorphismes Mononucleosidiques
TCTP	Translationally Controlled Tumor Protein
TNF- α	Facteur de Nécrose Tumorale Alpha

Table des matières

DEDICACES	X
REMERCIEMENTS	XI
LISTE DES ABREVIATIONS	XV
Liste des tableaux	XIX
Liste des figures	XX
1. INTRODUCTION	1
2. OBJECTIFS	4
2.1. Objectif général	4
2.2. Objectifs spécifiques	4
3. GENERALITES	5
3.1. Généralités sur le paludisme	5
3.1.1. Epidémiologie	5
3.1.2. Notion d'endémicité du paludisme	6
3.1.3. Agents pathogènes	7
3.1.4. Taxonomie de <i>Plasmodium</i>	7
3.1.5. Biologie de <i>Plasmodium</i>	8
3.1.6. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i>	10
3.1.7. Diagnostic biologique du paludisme	14
3.1.8. Prise en charge thérapeutique du paludisme	15
3.2. Artémisinine et ses dérivés	15
3.2.1. Historique	15
3.2.2. Pharmacologie	17
3.2.3. Définition et évolution de la résistance aux antipaludiques	19
3.2.4. Facteurs favorisant la résistance	20
3.2.5. Hypothèses de mécanismes d'action et de résistance à l'artémisinine	21
3.2.6. Marqueurs moléculaires de résistance à l'artémisinine	28
3.2.7. Déterminants génétiques de la résistance à l'artémisinine	30
3.2.8. Mutations du fond génétique de résistance à l'artémisinine (FGR-ART)	39
4. Méthodologie	41
4.1. Cadre d'étude	41
4.2. Sites d'étude	41
4.3. Type et période d'étude	44
4.4. Population d'étude	44
4.5. Echantillonnage	44
4.5.1. Critères d'inclusion	45
4.5.2. Critères de non inclusion	45
4.6. Variables mesurées	45
4.7. Définitions opérationnelles	45
4.8. Déroulement et procédure d'étude	46
4.9. Collecte gestion et analyse des données	47
4.10. Considérations éthiques	47
5. Résultats	48
5.1. Données sociodémographiques et cliniques	48

5.2 Données génétiques relatives aux isolats de <i>P. falciparum</i>	50
6. Commentaires et discussion	55
7. Conclusion et recommandations.....	58
8. Limite de l'étude	59
9. Références bibliographiques.....	60
10. Annexes	65
10.1. Détermination du taux d'hémoglobine	65
10.2. Technique de goutte épaisse.....	66
10.3. Technique ELISA	70
9.4. Mesure des taux de cytokines	77
9.5. Détermination du taux des anticorps IgG et IgM.....	77
9.6. Caractérisation et méthode de localisation du PfRON12.....	78
10.7. Numération formule sanguine.....	81
11. Fiche signalétique.....	83
Résumé	84
Summary	85
12. SERMENT DE GALIEN	86

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme.....	6
Tableau II : Liste des gènes incriminés dans la résistance de <i>P. falciparum</i> à l'artémisinine	32
Tableau III : répartition des patients en fonction du site d'étude et du sexe	48
Tableau : IV. Parasitémie moyenne en fonction du site d'étude	49
Tableau V. Taux moyen d'hémoglobine en fonction du site d'étude.....	50
Tableau VI. Fréquence des mutations Pfarps10_D127M chez les isolats de <i>P. falciparum</i> dans les sites d'étude.....	50
Tableau VII. Fréquence des mutations Pfarps10_V128M chez les isolats de <i>P. falciparum</i> dans les sites d'étude.....	51
Tableau VIII. Fréquence des mutations Pffd_D193Y chez les isolats de <i>P. falciparum</i> dans les sites d'étude.....	51
Tableau IX. Fréquence des mutations Pfcrt_I356T chez les isolats de <i>P. falciparum</i> dans les sites d'étude.....	52
Tableau X. Fréquence des mutations Pfcrt_N326S chez les isolats de <i>P. falciparum</i> dans les sites d'étude.....	52
Tableau XI. Fréquence des mutations Pfmdr2_T484M chez les isolats de <i>P. falciparum</i> dans les sites d'étude.....	53
Tableau XII. Prévalence globale des mutations dans les deux sites Dangassa et Nioro du sahel.....	53

Liste des figures

Figure 1 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques de l'épidémiologie du paludisme [25].....	6
Figure 2 : Ultrastructure du mérozoïte de <i>P. falciparum</i>	9
Figure 3: Cycle de vie du <i>Plasmodium</i> [33].....	11
Figure 4 : Processus d'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte [41]	13
Figure 5. Structure de l'artémisinine et ses dérivés [49].....	18
Figure 6 : Mécanismes supposés de la susceptibilité et de la résistance de <i>P. falciparum</i> [63].....	26
Figure 7: Structure de la protéine <i>kelch13</i> de <i>P. falciparum</i> [15].....	34
Figure 8. Base structurelle du pompage ionique par la Ca ²⁺ -ATPase du réticulum sarcoplasmique [82]......	36
Figure 9. Représentation schématique de PfCRT et des positions de mutations identifiées [74, 85]......	39
Figure 10. Répertoires de l'emplacement génomique des polymorphismes mononucléotidiques constitutifs du FGR-Art [22]	40
Figure 11. Sites de l'étude.....	42
Figure 12. Température moyenne et maximale à Nioro du Sahel	43
Figure 13. Précipitations moyennes mensuelles en mm de pluies à Nioro du Sahel	43
Figure 14. Répartition des patients en fonction des groupes d'âge et de la résidence	48
Figure 15. Répartition des patients en fonction du phénotype clinique du paludisme dans les villages de Dangassa et Nioro du Sahel	49
Figure 16. Répartition en fonction de l'existence du nombre de mutation chez les isolats de <i>P. falciparum</i> dans les deux sites.....	54
Figure 17. Analyseur et Microcuvette HemoCue	65
Figure 18. Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+	66
Figure 19. Technique de la goutte épaisse.....	68

1. INTRODUCTION

Le paludisme reste aujourd'hui la maladie parasitaire la plus fréquente au monde [1], précisément en Afrique subsaharienne où son fardeau est très lourd. Il est causé par un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre infectante de moustique femelle du genre *Anophèles* [2]. Le paludisme demeure un problème majeur de santé publique à cause de sa mortalité importante. Près de 216 millions de cas de paludisme ont été rapportés dans 91 pays au total en 2018 occasionnant 435000 cas de décès [3]. La plupart de ces cas et décès surviennent dans la région africaine, soit environ 90% [3]. Malgré les efforts considérables fournis dans la lutte contre le paludisme, beaucoup de personnes restent encore exposées au risque d'infection palustre [4].

Au Mali, le paludisme est responsable de 40% des motifs de consultation dans les centres de santé [5]. Il représente la première cause de décès des enfants de moins de cinq ans et la première cause d'anémie chez les femmes enceintes [5]. En cas d'infection palustre, un antipaludique efficace doit être administré le plus rapidement possible pour éviter d'éventuelles complications. En absence de vaccin, la chimiothérapie reste un composant très important dans la lutte contre le paludisme. Le traitement précoce des patients a pour avantage de réduire la probabilité de transmission du parasite au moustique.

Cependant l'émergence et la propagation de la chimiorésistance des parasites aux antipaludiques constituent un réel défi pour les programmes de lutte contre le paludisme à travers le monde [6]. Comme pour de nombreuses infections microbiennes, la pression médicamenteuse exercée au cours du temps sélectionne des parasites résistants [7]. Les premiers cas de résistance à la chloroquine (CQ) ont été rapportés en Asie du sud-est [8], et progressivement la résistance s'est étendue à toutes les zones d'endémies palustres [9]. Ce phénomène s'est élargi à d'autres antipaludiques de structures chimiques différentes ou apparentées. La dynamique de l'émergence et de la résistance des parasites résultent de l'interaction complexe entre les antipaludiques, l'hôte, le parasite et le vecteur [10, 11].

L'arsenal de traitement du paludisme a été renforcé à partir des années 2000 par l'artémisinine et ses dérivés. Actuellement les dérivés de l'artémisinine constituent une arme très efficace dans la lutte contre le paludisme [12, 13]. La grande efficacité de l'artémisinine repose sur sa capacité à tuer les parasites au stade très jeune de leur développement avant même qu'ils n'atteignent les stades susceptibles d'induire les manifestations cliniques. Pour protéger l'efficacité de ces molécules, l'OMS a recommandé leur utilisation en association avec d'autres molécules partenaires tout aussi efficace appelé Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine (CTA). Ainsi le Mali a révisé en 2005 sa politique nationale de lutte contre le paludisme [5]. Le programme national de lutte contre le paludisme préconise l'utilisation des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (Artéméther-Luméfántrine et artésunate-Amodiaquine) pour les formes non compliquées ; et l'artésunate, l'Artéméther ou la quinine injectable pour les formes sévères du paludisme.

Cependant le déploiement de ce nouvel arsenal se heurte à de sérieux problème de chimiorésistance. Malgré les efforts de développement et la mise en place de ces nouvelles stratégies, le *Plasmodium falciparum* s'est continuellement adapté et a développé des résistances, y compris contre les dernières combinaisons à base d'artémisinine [14]. Depuis 2008, il a été observé que les parasites en Asie du sud-est étaient capables de survivre aux dérivés de l'artémisinine [15]. Ceci se traduit par une réduction importante de la vitesse d'élimination des parasites chez les patients traités par un dérivé de l'artémisinine seul ou en association avec une molécule partenaire [16, 17]. Une des craintes majeures est que les parasites résistants à ces molécules diffusent en Afrique subsaharienne, continent le plus touché par le paludisme, comme cela fut le cas par le passé avec la chloroquine [18]. La propagation des parasites résistants à l'artémisinine et aux molécules associées serait une catastrophe et aurait des conséquences désastreuses en termes de santé publique [19]. L'utilisation des CTA répond à un souci de retarder l'émergence de la résistance à l'artémisinine. Même si aucun cas de résistance clinique et parasitologique à l'artémisinine n'a encore été décrit en Afrique [20] , une surveillance de l'émergence et de la propagation des parasites résistants à cette molécule s'y impose. L'étude des marqueurs moléculaires de résistance constitue un outil très important dans la surveillance de l'émergence et de

la propagation de la résistance. Plusieurs mutations sur le gène *Kelch* situé sur le chromosome 13 ont été décrites comme associées à la résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine [15, 20, 21]. Une étude sur le génome entier des parasites résistants à l'artémisinine a rapporté que ces mutations associées émergent toujours sur un fond génétique commun constitué de l'héritage concomitant de six mutations dans le génome du parasite [22]. La résistance à l'artémisinine n'a pas encore été décrite en Afrique. Cependant la surveillance de son émergence y est d'un intérêt capital pour les programmes de lutte contre le paludisme. L'étude des mutations constitutives du fond génétique de résistance à l'artémisinine chez les isolats de *P. falciparum* circulant constitue un précieux moyen de surveillance de l'émergence de la résistance à l'artémisinine en Afrique.

La présente étude a pour but d'étudier les mutations de ce fond génétique de résistance à l'artémisinine dans deux zones éco-climatiques différentes du Mali.

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif général

Etudier les mutations constitutives du fond génétique de résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine à Dangassa et Nioro du Sahel

2.2. Objectifs spécifiques

- Estimer les prévalences des mutations constitutives du fond génétique de résistance à l'artémisinine chez des isolats de *P. falciparum* circulant à Dangassa et Nioro du sahel au cours de la saison de transmission 2016-2017 ;
- Déterminer le degré de cumulation des mutations constitutives du fond génétique de résistance à l'artémisinine chez des isolats de *P. falciparum* circulant à Dangassa et Nioro du sahel au cours de la saison de transmission 2016-2017 ;
- Déterminer l'impact de l'endémicité sur le risque d'émergence de la résistance à l'artémisinine au Mali.

3. GENERALITES

3.1. Généralités sur le paludisme

3.1.1. Epidémiologie

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due au développement d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Le parasite est transmis à l'homme par la piqûre de moustiques femelles infectés. Ces moustiques, vecteurs du paludisme, appartiennent au genre *Anophèles* [23, 24].

Le paludisme touche une centaine de pays dans le monde, particulièrement les zones tropicales défavorisées d'Afrique, d'Asie et d'Amérique Latine. L'épidémiologie du paludisme peut varier considérablement même à l'intérieur d'une région géographique relativement petite. L'épidémiologie du paludisme est influencée par des facteurs liés à l'hôte humain, au vecteur, au parasite et aux facteurs environnementaux. Il s'agit essentiellement des facteurs génétiques influençant la susceptibilité de l'hôte aux infections plasmodiales, les capacités vectorielles des anophèles et leurs résistances aux insecticides, la capacité des parasites à résister aux antipaludiques et l'évasion du système immunitaire de l'hôte. Les facteurs environnementaux concernent surtout le climat, la pluviométrie et le relief auraient influencé la survie des vecteurs. Les changements brusques au niveau des facteurs environnementaux sont à l'origine des épidémies de paludisme.

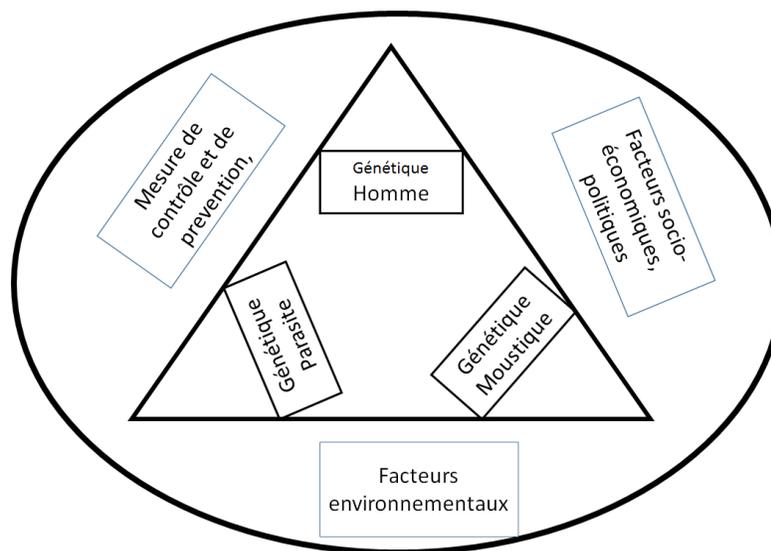


Figure 1 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques de l'épidémiologie du paludisme [25]

3.1.2. Notion d'endémicité du paludisme

Tableau I : Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme

Niveau d'endémicité	Transmission	Indice plasmodique Chez les enfants de 2-9 ans (%)	Commentaires
Paludisme hypo endémique	Faible: sub-périodique ou sporadique	Généralement ≤ 10	Les moustiques sont instables, généralement difficiles à détecter; des épidémies sérieuses peuvent survenir
Paludisme méso endémique	Saisonnière, périodique suivant une bonne saison pluvieuse	11-50 en fonction du temps de surveillance	les moustiques fluctuent, détectables en fonction des saisons, une fenêtre saisonnière peut survenir; les habitants acquièrent une certaine immunité
Paludisme hyper endémique	Intense (saisonnière) chaque année	51-75	Fluctuation saisonnière des cas de paludisme; fréquentes séquelles sévères chez les jeunes les enfants ; une certaine immunité chez les adultes
Paludisme holo endémique	La transmission peut survenir à travers l'année avec des pics de transmission	> 75	On peut détecter les moustiques toute l'année avec des pics; des taux élevés d'anémie chez les très jeunes enfants et la prémunition chez les adultes

▪ Faciès épidémiologiques

L'indice de stabilité, déterminé par McDonald, caractérise l'enracinement du paludisme et permet de distinguer [25] :

- les zones de paludisme stable, où la forte transmission entraîne une prémunition. Celle-ci n'empêche pas les habitants d'être parasités mais limite les manifestations pathologiques aux classes d'âge les plus jeunes alors que les adultes sont peu touchés.

- les zones de paludisme instable, où le caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition; la maladie sévit alors sous forme d'épidémie touchant toutes les classes d'âges.

Entre ces deux extrêmes existe toute une palette de situations intermédiaires, modulée par différents facteurs comprenant le type de transmission, le type de vecteur, l'espèce plasmodiale en cause et le niveau d'immunité dans la population ainsi que les caractéristiques environnementales.

Au Mali, il existe trois zones de transmission du paludisme:

- une zone de savane à transmission saisonnière longue de 4 à 6 mois correspondant à la zone soudano-guinéenne, sud des régions de Kayes, Koulikoro, Sikasso et Ségou;
- une zone de transmission saisonnière courte inférieure à 4 mois, correspondant à la zone du sahel, nord des régions de Kayes, Koulikoro, Ségou, et Mopti;
- une zone de transmission sporadique voire épidémique correspondant au Sahara, régions de Gao, Tombouctou et Kidal.

Dans la plupart des cas, le paludisme est essentiellement transmis par des piqûres des *Anophèles* femelles. Le cycle de transmission fait intervenir trois acteurs : le parasite, le vecteur et l'homme, tous en relations dynamiques avec les facteurs environnementaux et les conditions socio-économiques.

3.1.3. Agents pathogènes

Le paludisme est essentiellement transmis à l'homme par des piqûres de moustiques femelles du genre *Anopheles*. Il existe plus de 140 espèces de *Plasmodium* inféodés à diverses espèces animales mais seulement cinq espèces sont responsables du paludisme humain. Il s'agit de *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* et *P. vivax* qui diffèrent entre elles par des critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques [25-27].

3.1.4. Taxonomie de *Plasmodium*

La systématique des *Plasmodium* établie par Levine en 1988 fait la classification suivante :

- **Domaine** : Biota
- **Règne** : Chromista Cavalier-Smith, 1981
- **Sous-Règne** : Harosa Cavalier-Smith, 2010
- **Infra-Règne** : Alveolata Cavalier-Smith
- **Phylum** : Myzozoa Cavalier-Smith & Chao
- **Sous-Phylum** : Apicomplexa
- **Infra-Phylum** : Sporozoa Leuckart, 1879
- **Classe** : Aconoidasida
- **Ordre** : Haemospororida
- **Famille** : Plasmodiidae
- **Genre** : *Plasmodium*
- **Espèce** : *Plasmodium sp*

3.1.5. Biologie de *Plasmodium*

Le *Plasmodium* est une cellule eucaryote très polymorphe, qui reste haploïde pendant longtemps au cours de son cycle biologique. Les formes invasives que sont les sporozoïtes, les mérozoïtes et l'ookinète sont dotées d'apicomplexe. Par contre, le trophozoïte, le schizonte et les gamétocytes sont des formes de croissances non dotées d'apicomplexe.

Le complexe apical est constitué de [28] :

- Trois anneaux polaires
- Deux rhoptries : organites volumineux reliés par un canal commun
- Les micronèmes et les grains denses.

Le cortex cellulaire est constitué d'une membrane plasmique doublée sur la face interne et d'un cytosquelette microtubulaire.

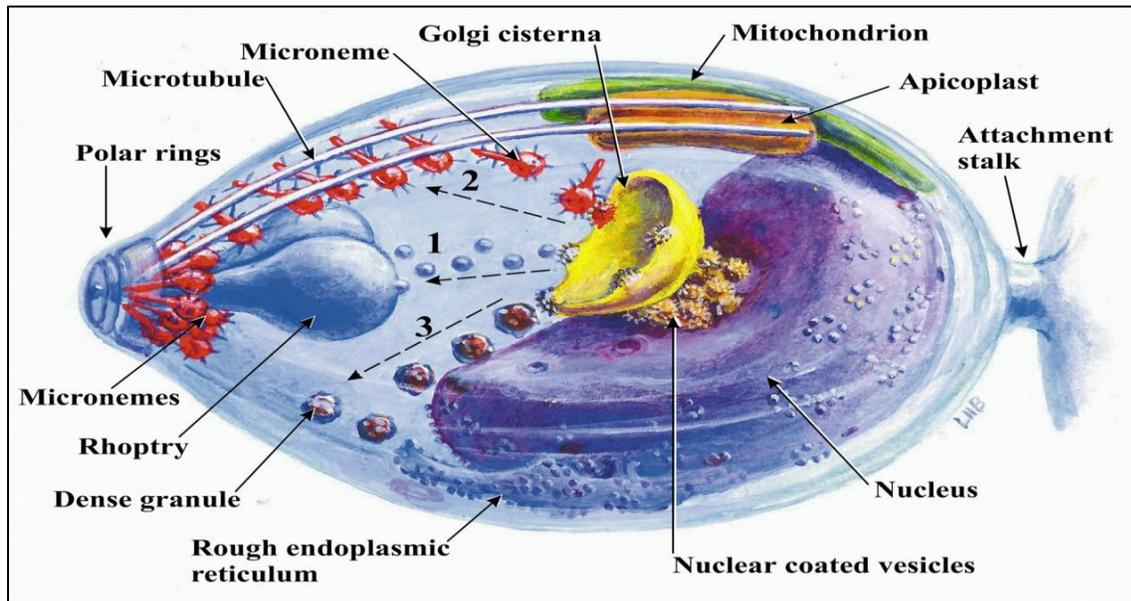


Figure 2 : Ultrastructure du mérozoïte de *P. falciparum* [29]

Le parasite est entouré par deux membranes : la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique. Le cytoplasme contient une seule mitochondrie, des granules denses, de nombreux ribosomes et le réticulum endoplasmique disposé à travers tout le cytoplasme. La membrane cytoplasmique est composée de phospholipides et de protéines de structure très polymorphes qui interviennent dans le mécanisme de prémunition et d'échappement du parasite au système immunitaire. La vacuole digestive assure la dégradation de l'hémoglobine.

Au cours de la maturation des parasites, les globules rouges subissent des modifications morphologiques importantes notamment aux stades trophozoïte et schizonte [30]. Le parasite n'est diploïde qu'au stade zygote, stade durant lequel a lieu les recombinaisons génétiques. Nous savons néanmoins que le *Plasmodium* possède 14 chromosomes. Outre ces chromosomes, il possède aussi des structures ADN extra-nucléaires, y compris un ADN mitochondrial et une structure apparentée au chloroplaste « l'apicoplaste » [31].

Il y'a au moins cinq divisions cellulaires dans le cycle biologique des plasmodies :

- La schizogonie pré érythrocytaire chez l'hôte vertébré,
- La schizogonie érythrocytaire chez l'hôte vertèbre,
- La micro gamétogenèse chez le moustique vecteur,

- La méiose chez le moustique vecteur,
- La schizogonie sporogonique chez le moustique vecteur [30, 31].

3.1.6. Cycle biologique du *Plasmodium*

Le cycle du paludisme comporte une phase sexuée ou sporogonie qui se passe chez le moustique, et une phase asexuée, schizogonie chez l'homme. Le parasite est haploïde durant toutes les phases de l'infection chez l'homme. Il n'est diploïde que pendant une courte période de la sporogonie chez le moustique [32].

➤ Cycle chez l'anophèle (vecteur du paludisme)

Le vecteur du parasite est la femelle du moustique du genre *Anophèles*. Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'Anophèle femelle ingère des gamétocytes à potentiels sexuels mâles ou femelles. Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'exflagellation durant lequel les gamètes femelles sont fécondés. Cette fécondation harmonieuse donne un œuf ou zygote appelé ookinète, celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique et est suivi par plusieurs mitoses qui conduisent au développement de sporozoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments mobiles et haploïdes dans l'hémolymphe. Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique où ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre.

Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule en 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et les espèces en cause. Seuls les moustiques femelles se nourrissent de sang et sont responsables de la transmission du paludisme.

P. ovale, *P. falciparum* ne possède pas de formes de persistance hépatiques ou hypnozoïtes.

- **Cycle intra-érythrocytaire**

Durant l'invasion de l'érythrocyte, la reconnaissance se fait par l'intermédiaire des récepteurs de membrane qui sont des protéines ou des glycoprotéines de surface de l'érythrocyte. Etant donné que les parasites ne peuvent pas se répliquer en dehors d'une cellule hôte, leur capacité à reconnaître et à envahir les érythrocytes est une étape essentielle pour la survie du parasite [34]. L'attachement peut se produire entre n'importe quelle partie de la surface du mérozoïte et de l'érythrocyte mais la pénétration ne peut avoir lieu que lorsque la région apicale du mérozoïte qui contient des micro-organites tels les micronèmes et les rhoptries est en contact avec le globule rouge [35]. Le processus d'invasion est rapide et débute par des déformations spasmodiques du globule rouge [32, 33], suivi par une invagination locale de la membrane qui tire le mérozoïte. Cela permet au parasite de déployer une série d'organites sécrétoires spécialisés : rhoptries, micronèmes et des granules denses. Ces organites déchargent ensuite leur contenu selon un calendrier précis sur le site de contact. Ces ligands libérés interagissent avec les récepteurs de surface des érythrocytes pour former un épaissement dense au lieu de contact érythrocyte-mérozoïte [28, 36]. Ce dernier pendant sa pénétration dans l'hématie est débarrassé de ses deux membranes pelliculaires internes et de ses antigènes de surface[37].

Lorsque le parasite a totalement pénétré dans le globule rouge, il paraît entouré d'une vacuole et possède deux membranes avec le cytoplasme de l'érythrocyte. Le *Plasmodium* une fois à l'intérieur dégrade l'hémoglobine et modifie la structure de la cellule hôte[38]. La virulence du parasite provient de sa capacité à se développer dans l'érythrocyte de l'hôte et à altérer les fonctions métaboliques. Par ailleurs, au cours de la croissance du parasite, la membrane du globule rouge parasité développe certaines altérations[39] qui varient selon l'espèce plasmodiale en cause. Ainsi, *P. falciparum* induit la formation de structures particulières en forme de protubérance à la surface de l'érythrocyte, appelées "knobs"[40]. Ces structures seraient à l'origine des phénomènes de séquestration des hématies contenant les parasites matures dans les capillaires des organes profonds ou se déroule une partie du cycle de cette espèce. Dans le globule

rouge, le parasite développe une vaste vacuole qui se présente sous la forme d'un anneau de cytoplasme.

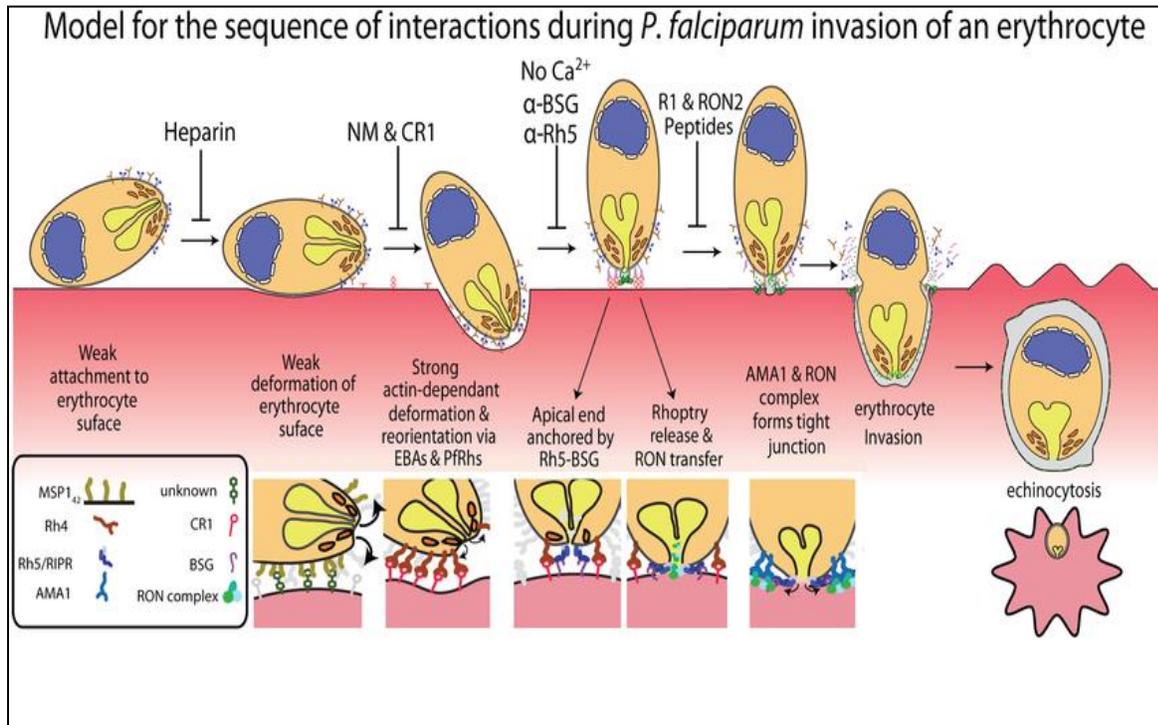


Figure 4 : Processus d'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte [41]

Seule cette phase est responsable des symptômes qui peuvent être d'intensité variable en fonction des espèces plasmodiales.

Lors de la phase sanguine, le mérozoïte pénètre grâce à un processus parasitaire actif et se différencie au sein de la vacuole parasitophore en anneau. Puis en trophozoïte, stade à partir duquel une intense phase répllicative commence. En fin, cette phase donne alors de schizonte, celui-ci après segmentation montre une forme caractéristique de rosace contenant 8 à 32 mérozoïtes en fonction des espèces, qui après libération, réinfectent rapidement d'autres érythrocytes sains. L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*. Les gamétocytes apparaissent en général vers la deuxième semaine qui suit l'infection et peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. A la suite d'un nouveau repas sanguin, l'anophèle femelle ingère les gamétocytes mâles et femelles à dimorphisme sexuel marqué.

Il est important de noter que l'érythrocyte ne possède pas de système de synthèse protéique ni de transport de protéines et n'exprime pas de molécules du MHC (système majeur d'histocompatibilité) de classe I ou II à sa surface, de ce fait il constitue un refuge idéal pour un parasite qui doit perdurer de longues périodes chez son hôte, afin d'être transmis au moustique.

3.1.7. Diagnostic biologique du paludisme

Microscopie (la goutte épaisse et le frottis sanguin)

Le diagnostic biologique du paludisme est une urgence médicale. La mise en évidence de l'hématozoaire permet de traiter de manière appropriée les individus parasités et d'éviter les traitements abusifs. Différentes méthodes diagnostiques sont actuellement disponibles. La goutte épaisse et le frottis sanguin demeurent les méthodes de références en termes de sensibilité et de spécificité. Ils permettent de confirmer la maladie, d'identifier l'espèce plasmodiale en cause et déterminer la charge parasitaire, ce qui conditionne à la fois le pronostic et la conduite thérapeutique.

Le test de diagnostic rapide

Le test de diagnostic rapide immunochromatographique est utilisé aussi pour le diagnostic sérologique du paludisme. Le principe de ce test consiste à détecter les protéines spécifiques de *Plasmodium* (antigènes HRP-2 ou enzymes pLDH, aldolase), en chromatographie sur un support solide.

- Détection de l'Ag *histidine rich protein 2* (HRP2) : cette glycoprotéine spécifique de l'espèce *P. falciparum* est produite par tous les stades érythrocytaires asexués du parasite. La persistance de l'Ag après guérison et la mono-spécificité vis-à-vis du *P. falciparum* ; ainsi que la possibilité des faux positifs et des faux négatifs constituent les inconvénients majeurs de ce test.
- Détection des lactates déshydrogénases parasitaires (LDH) : ce sont des enzymes glycolytiques qui ont l'avantage d'être communes aux 4 espèces plasmodiales, détectées à tous les stades sexués et asexués du parasite.

Technique de biologie moléculaire

Présentement, la *polymerase chain réaction* [PCR] s'affirme comme la technique la plus prometteuse. Elle est la plus sensible et permet de détecter de très faible parasitémie.

3.1.8. Prise en charge thérapeutique du paludisme

Pour le traitement curatif du paludisme simple, l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) est recommandée par l'OMS depuis 2004. En cas de paludisme grave, le traitement nécessite l'utilisation des dérivés de l'Artémisinine injectables ou les sels de quinine en perfusion intraveineuse. Tous ces moyens nécessitent une politique économique et sociale onéreuse impliquant la participation de chacun pour une meilleure amélioration de la couverture sanitaire de la population.

Les différentes options thérapeutiques recommandées par l'OMS pour le traitement des accès palustres simples sont les suivantes :

- Artéméther-Luméfantrine (Coartem[®]),
- Artésunate + Amodiaquine (ASAQ[®], dans les zones où le taux de succès thérapeutique de l'Amodiaquine en monothérapie est supérieur à 80%),
- Artésunate + Sulfadoxine Pyriméthamine (Artecon[®], dans les zones où le taux de succès thérapeutique de la SP en monothérapie est supérieur à 80%).

Pour le traitement des accès graves, l'artésunate injectable est le médicament de première intention en raison de 2,4 mg/kg de poids corporel par voie intraveineuse (IV) ou intramusculaire (IM) suivi par la même dose en 12 h et 24 h plus tard et, par la suite, une fois par jour jusqu'à ce que le patient puisse prendre ses médicaments par voie orale. En l'absence d'Artésunate injectable, l'Artéméther (3,2 mg/kg de poids corporel en intramusculaire le J1 puis 1,6 mg/kg par jour) ou la quinine (20 mg de sel de quinine/kg à l'admission, puis 10 mg/kg toutes les 8h en perfusion intraveineuse, diluée dans 10 ml/kg de soluté salin isotonique).

3.2. Artémisinine et ses dérivés

3.2.1. Historique

L'artémisinine est extraite d'une herbacée annuelle appelée *Artemisia annua* qui fut fort longtemps utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise pour traiter les maladies fébriles [42]. L'histoire de la découverte de l'artémisinine débute avec la guerre de Vietnam [1955-1975]. Faute de traitement efficace contre des isolats de *P. falciparum* devenus résistants à la chloroquine (CQ) et à la méfloquine (MQ), les soldats mourraient et il était urgent de chercher des molécules alternatives plus efficaces [43]. Face à ce défi existentiel, la Chine a initié un large programme entre les années 1960 et 1970 pour identifier et isoler de nouveaux composés antipaludiques à partir des plantes médicinales locales. C'est ainsi que le professeur Tu et son groupe ont expérimenté sur un modèle animal de paludisme plus de 380 extraits obtenus à partir de quelques 200 herbes chinoises, dont *Artemisia annua* L. Après plusieurs approches expérimentales basées sur les procédés d'extraction et sur l'évaluation clinique, l'équipe du professeur Tu démontre par la suite l'efficacité de cet extrait, son effet inhibiteur très prometteur sur la croissance parasitaire et la diminution de la fièvre. Ainsi, elle s'est engagée pour l'isolement et la purification du principe actif de l'*Artemisia annua* L. C'est en 1972 que cette équipe arriva à identifier une substance cristalline incolore de poids moléculaire de 282 Daltons, de formule brute C₁₅H₂₂O₅ et de point de fusion de 156 – 157°C comme le principe actif qu'elle nomma « Qinghaosu » [Qinghao est le nom chinois d'*Artemisia annua* L. et su signifie élément de base en chinois].

L'identification de cette substance active a été récompensée en 2015 par l'attribution du prix Nobel de médecine au Pr Y. Tu. Ainsi venait de naître un nouvel antipaludique possédant une structure chimique aussi rocambolésque que révolutionnaire dont l'efficacité est supérieure à celle des antipaludiques utilisés dans le traitement du paludisme [44]. Cette efficacité s'explique notamment par la diminution plus rapide de la biomasse parasitaire, du nombre de gamétocytes et de la fièvre contrairement aux autres médicaments antipaludiques conventionnels [45].

Bien que les vertus de l'artémisinine soient connues en Chine depuis longtemps, elles n'ont été étudiées en Occident qu'à partir des années 1970. Il a pourtant fallu attendre le début des années 1990 et avec l'avènement de la chloroquinorésistance pour qu'elle soit utilisée hors de la Chine. Les résultats spectaculaires suite à l'utilisation de

l'artémisinine et ses dérivés en chine ont attiré l'attention du reste du monde dans les années 1980. L'introduction de l'artémisinine et ses dérivés dans l'arsenal thérapeutique a été un facteur fondamental dans la lutte contre le paludisme, ce qui a ostensiblement conduit à la validation de ces molécules. En 2001 l'OMS considérait que l'artémisinine était le plus grand espoir mondial contre le paludisme. Elle agit très rapidement mais elle ne permet pas d'éliminer complètement tous les parasites, d'où la nécessité de l'associer à d'autres antipaludiques [46]. C'est pourquoi en 2005 l'OMS annonça un changement dans la stratégie de traitement du paludisme qui aboutit à l'adoption des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). Actuellement, l'artémisinine et ses dérivés sont une composante clé dans lutte contre le paludisme dans le monde notamment en Afrique.

3.2.2. Pharmacologie

Les molécules de la famille de l'artémisinine sont une composante clé des récents succès dans la lutte contre le paludisme et elles permettent une diminution très rapide de la biomasse parasitaire. En plus de ces propriétés microbiennes, ces molécules possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antivirales et anticancéreuses [47, 48].

Les dérivés de l'artémisinine sont actifs sur les parasites au stade le plus jeune, dit stade anneau, ces derniers sont rapidement éliminés des globules rouges et de la circulation sanguine. Par contre, ils n'ont pas d'action sur les formes pré-érythrocytaires du parasite et non plus sur les hypnozoïtes de *P. vivax* et de *P. ovale*. L'activité spécifique de ces composés sur une très large période du cycle biologique du parasite revêt deux conséquences thérapeutiques majeures. D'une part, l'élimination massive des parasites jeunes circulants entraîne une réduction de la parasitémie ce qui empêche donc leur maturation et leur séquestration. D'autre part, le traitement précoce est associé à une diminution du nombre de gamétocyte et à une diminution de la transmission. Ces particularités confèrent aux dérivés de l'artémisinine une efficacité supérieure à celle des autres molécules utilisées dans le traitement du paludisme grave et compliqué.

➤ Propriétés physico-chimiques de l'artémisinine

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

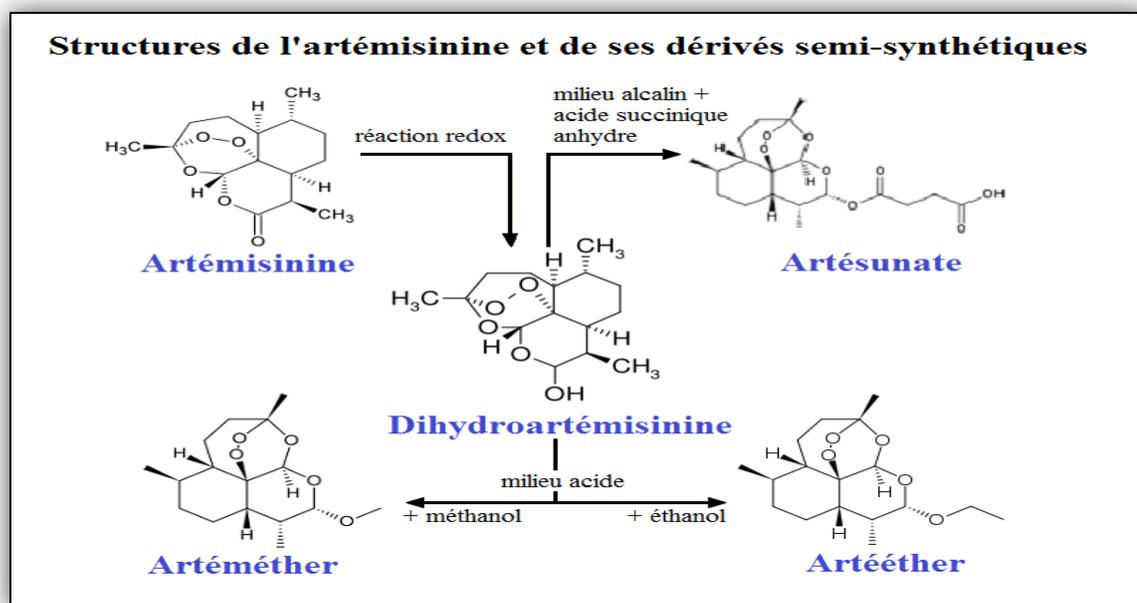


Figure 5. Structure de l'artémisinine et ses dérivés [49]

➤ Pharmacocinétique

L'artésunate et l'artéméther sont deux molécules différentes, dont le métabolisme aboutit à la formation du même composé actif, la dihydroartémisinine. Ces deux

molécules sont rapidement absorbées par voie orale. Après administration, la concentration maximale est atteinte moins d'une heure pour l'artésunate et environ deux heures pour l'artéméther. L'artéméther est fixé à 95% aux protéines plasmatiques et possède un volume de distribution apparent de 700 litre. L'artéméther est de son côté déméthylé en dihydroartémisinine par les cytochromes P4503A4 et 3A5, et sa demie vie d'élimination est de 2 à 3 heures.

Quant à l'artésunate, sa fixation aux protéines plasmatiques est 75%, avec un volume de distribution après administration en IV de 0.2l/kg environ. Il est très rapidement hydrolysé en dihydroartémisinine, soit dès le tractus digestif du fait de l'acidité des sécrétions gastriques, soit par des estérases hépatiques. Sa demi-vie d'élimination après administration I.V. est inférieure à 15 minutes, mais elle est en général comprise entre 20 à 72 minutes après administration. Quant à la dihydroartémisinine, elle est caractérisée par une fixation aux protéines plasmatiques qui diminue de 86 à 66% lorsque la concentration dépasse 25 ng/ml. Elle est métabolisée par glucuroconjugaison sous l'action des isoformes, et sa demi-vie après administration par I.V est généralement comprise entre 30 et 60 minutes.

Sur le plan pharmacodynamique, ces composés permettent une diminution rapide et très importante du nombre de parasite présent dans l'organisme. Cependant, du fait de leur élimination très rapide il est obligatoire dans le cas du paludisme non compliqué de leur associer un autre antipaludique à longue demi vie d'élimination qui permettra d'éradiquer les parasites restants et de prévenir la sélection de parasites résistants. En effet, les molécules combinées limitent la sélection des chimiorésistances grâce à leurs modes d'actions différents.

3.2.3. Définition et évolution de la résistance aux antipaludiques

L'organisation mondiale de la santé a défini la résistance dans son rapport technique comme étant l'aptitude d'une souche parasitaire de *Plasmodium* à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament donné à des doses égales ou supérieures à celles qui sont habituellement recommandées mais qui restent dans les limites de tolérance du sujet. Cette définition est basée sur des observations cliniques et parasitologiques. Elle a été établie alors que les techniques de la génétique

et de la pharmacologie étaient encore à un stade précoce de développement [50]. La thérapie d'association à base d'artémisinine est le traitement le plus efficace et le plus largement répandue dans le monde. Elle demeure la pierre angulaire dans le contrôle et le traitement du paludisme à *P. falciparum* compliqué [51].

La région située le long de la frontière thaïlondo-cambodgienne a toujours été l'épicentre des résistances développées par *P. falciparum* suivie d'une propagation vers les autres continents d'endémies palustres, comme ce fut le cas avec la résistance à la chloroquine [51]. Le déclin de l'efficacité de la chloroquine, puis de la méfloquine un peu plus tard a entraîné l'utilisation de l'artémisinine et ses dérivés à l'échelle mondiale. En effet, l'ART nécessite d'être utilisé en association pour assurer la destruction complète des parasites dans l'organisme. Malgré les espoirs initialement portés sur cette molécule des résistances sont rapidement apparues en Asie du Sud-Est. Ces phénotypes de résistances se sont ensuite disséminés avec le temps. Il va de soit de dire qu'une telle situation est inquiétante, au vu du nombre réduit d'alternatives thérapeutiques qu'il nous reste. La confirmation de la résistance dans cette région a conduit à une série d'études visant à identifier un marqueur moléculaire approprié à la résistance. A la suite de cette étude, un marqueur moléculaire candidat de la résistance à l'artémisinine, le gène kelch du chromosome 13 a été identifié en 2013 [15].

A ce jour, aucune résistance aux CTA n'a été rapportée en Afrique mais la menace est plus élevée par les observations récentes sur les parasites originaire d'Asie résistants aux CTA et qui semblent capable d'infecter et d'être transmis par un large panel d'espèces d'anophèle dont la principale espèce africaine est *Anophèle gambiae*. La détection précoce des marqueurs de résistance aux CTA sur le continent africain devient une priorité majeure parce que 90% des décès dus au paludisme sont concentrés dans 15 pays, essentiellement en Afrique.

3.2.4. Facteurs favorisant la résistance

Quatre facteurs sont en cause dans l'émergence des résistances de *P. falciparum* dans une zone.

- La pression médicamenteuse et la sélection des mutants résistants

Dans une zone d'endémie palustre, les premiers parasites mutants sont généralement très peu nombreux par rapport aux parasites sauvages. Dans une telle zone l'utilisation d'un médicament aurait pour conséquence l'élimination des parasites sauvages, ce qui va rompre l'équilibre en faveur des mutants résistants. Plus ce médicament sera utilisé, plus on sélectionnera des mutants résistants. C'est la pression médicamenteuse qui permet l'émergence des mutants préexistants et non l'adaptation progressive des parasites à des doses croissantes de produits.

➤ Le degré d'immunité de la population

Les sujets vivants en zone d'endémie palustre développent une prémunition qui joue un rôle capital dans la clairance parasitaire. Le système immunitaire agit de manière similaire aussi bien sur les isolats sensibles que résistants à un médicament [52]. Lorsque le degré d'immunité de la population est élevé, les parasites mutants qui échappent à l'action du médicament sont les cibles du système immunitaire. Si le niveau d'immunité n'est pas suffisant, les mutants résistants se multiplient et engendrent des manifestations cliniques.

➤ Voyage

Un voyageur non immun peut emporter des mutants résistants d'une zone de chimiorésistance à une zone où ces parasites mutants résistants n'existaient pas, permettant ainsi la dissémination de la résistance dans cette zone.

➤ Facteurs liés aux vecteurs

Les anophèles femelles jouent un rôle important dans la diffusion de la résistance :

- intensité de la transmission ;
- sélection des souches résistantes chez le moustique ;
- recombinaison génétique chez le vecteur.

3.2.5. Hypothèses de mécanismes d'action et de résistance à l'artémisinine

L'artémisinine appartient à une classe d'antipaludique de type lactone sesquiterpénique qui possède un noyau 1, 2, 4 trioxane et un pont endopéroxyde nécessaire à leur activité [16]. Leur mécanisme d'action n'est pas très élucidé mais on considère que les artémisinines sont des pro-drogues qui sont activés par clivage du pont endopéroxyde pour libérer des radicaux libres ou des espèces réactives de l'oxygène. La compréhension du mécanisme d'action exact de cette classe thérapeutique permettra de prédire les mécanismes de résistance probables et d'orienter le traitement. L'artémisinine a une action gamétocytocide ce qui présente l'avantage de réduire la transmission et de limiter les risques de voir émerger des résistances. La sélectivité de l'activité des dérivés de l'artémisinine au sein des érythrocytes est due à la bioactivation du pont endopéroxyde qui est fer-dépendant. Cela pourrait être dû, d'une part à une scission réductive du pont endopéroxyde catalysée par le fer hémique provenant de la dégradation de l'hémoglobine. D'autre part, le fer intracellulaire libéré dans le cytoplasme parasitaire lors de la réaction avec le glutathion réduit. A cet effet, plusieurs hypothèses ont été proposées afin de comprendre leur mécanisme d'action [53] :

➤ **Hypothèse de l'hème comme cible**

L'hème (Fe^{2+} + protoporphyrine IX) est une molécule tétra pyrole essentielle et omniprésente qui remplit une vaste gamme de fonctions physiologiques fondamentales, notamment le transport de l'oxygène, le transfert d'électrons et la régulation de la transcription [54].

Au stade intraérythrocytaire, la plasmodie dégrade au sein de sa vacuole digestive une grande partie de l'hémoglobine érythrocytaire utilisée comme source d'acides aminés nécessaires à sa synthèse protéique. Ce catabolisme libère de l'hème, le composant prosthétique de l'hémoglobine qui est une ferroprotoporphyrine très toxique pour le parasite.

L'hème est une molécule cellulaire essentielle dont les propriétés d'oxydo-réductions, et sa participation à diverses fonctions cellulaires importantes, en font une cible moléculaire potentiellement précieuse pour le développement d'agents antinéoplasiques [48]. Les mécanismes par lesquels l'artémisinine est sélectivement cytotoxique vis-à-vis des cellules cancéreuses ont été suggérés, notamment

l'augmentation du nombre d'espèces oxygénées réactives et l'inhibition de l'activation du facteur induit par l'hypoxie (HIF-alpha) [55]. C'est le principal facteur de transcription qui régule l'expression des gènes en réponse à l'hypoxie. Pendant l'hypoxie, les niveaux d'HIF-alpha s'accumulent et déclenchent une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et la fonction mitochondriale, la survie, l'apoptose des cellules et la résistance au stress oxydatif [56], processus physiologiques nécessitant l'hème. Les molécules à bases d'artémisinine contiennent une liaison endopéroxyde nécessaire à l'activité antiparasitaire [57]. Cette liaison endopéroxyde accepte probablement un électron issu de l'hème, ce qui entraîne l'activation du médicament, la rupture ultérieure de la liaison et la formation d'un radical dans la molécule d'artémisinine.

Pour détoxifier ces molécules d'hèmes, le parasite les transforme en hémozoïne (pigment malarique) grâce à un mécanisme de cristallisation. Il a été proposé que les radicaux libres produits lors du clivage du pont endopéroxyde des dérivés de l'artémisinine par le fer hémique provoquent en retour l'alkylation des molécules d'hèmes. Cette alkylation interfère avec le mécanisme de détoxification de l'hème dont l'accumulation provoque, par conséquent, la mort du parasite. Cette activation de l'artémisinine par le fragment hème de l'hémoglobine non digérée indique clairement la haute affinité de ce médicament pour l'hème et son aptitude à alkyler efficacement dans des conditions très douces [58]. Un tel mécanisme d'action explique la spécificité des dérivés de l'artémisinine contre les parasites. Cependant, il est également démontré que le fer non hémique est capable d'activer les dérivés de l'artémisinine et que ces composés peuvent provoquer l'alkylation d'autres protéines parasitaires.

➤ **Hypothèse de la PfTCTP et autres protéines comme cibles**

La structure de l'artémisinine est très sensible aux effets stériques. Pour cette raison, il a été suggéré qu'un phénomène général d'alkylation des résidus de cystéines serait impliqué dans le mécanisme d'action de l'ART, en interférant avec les fonctions protéiques. Un certain nombre d'études à l'artémisinine radio-marquée ont pu montrer que l'artémisinine en concentrations physiologiques réagit de manière covalente avec plusieurs protéines parasitaires. Parmi ces protéines, la protéine tumorale TCTP

(*translationally controlled tumor protein*) dont la fonction reste inconnue serait alkylée de façon dépendante de l'hème, les cystéines de cette protéine servant de source d'électron lors de l'activation de l'ART. La falcipaïne, une protéase à cystéine de la famille des papaïnes qui participe à la digestion de l'hémoglobine, serait également inhibée par les ART. De nombreuses autres protéines parasitaires (catalase, cytochrome c), seraient alkylées par l'artémisinine. Il a cependant été établi que les adduits formés par les radicaux libres provenant de l'ART et de l'hème présent dans l'hémoglobine pourraient interagir avec la protéine PfHRP11 (P.falciparum histidin rich protein11) afin d'inhiber la polymérisation et la formation de l'hémozoïne.

➤ Hypothèse de l'ATPase6 comme cible

La thapsigargine est une sesquiterpène lactone et un puissant inhibiteur sélectif des ATPases transporteuses de Ca^{2+} chez les mammifères appelées Sarco/endoplasmic Reticulum Membrane Calcium ATPases (SERCA). Le rôle des SERCA est de réduire la concentration du cytosol en calcium libre par accumulation des ions Ca^{2+} dans les réserves membranaires. Cette activité est vitale pour la cellule. Bien que différente de l'artémisinine par l'absence du pont endopéroxyde indispensable à l'activité antipaludique, la thapsigargine présente une grande similarité structurale avec cette dernière.

P. falciparum possède une seule enzyme orthologue aux SERCA qui est la PfATPase6. Il a été ainsi mentionné que les dérivés de l'artémisinine pourraient avoir comme cible la PfATPase6 et que ces mêmes dérivés et la thapsigargine inhibent l'ATPase6 de manière irréversible tandis que la désoxyartémisinine (forme inactive de l'artémisinine), la quinine et la chloroquine n'en étaient pas capables. Les expériences utilisant la desferrioxamine (DFO, un chélateur de fer) ont montré que l'activité antiparasitaire et anti-enzymatique des dérivés de l'artémisinine est fer-dépendant. Par contre l'activité inhibitrice de la thapsigargine sur la PfATPase6 n'était pas abolie par l'absence de fer. Lorsqu'elles sont utilisées simultanément, la thapsigargine antagonise l'activité de l'artémisinine. Ceci suggère une action compétitive entre ces deux composés pour la PfATPase6.

Les analyses ont révélé que la cible PfATPase6 se localise dans le réticulum endoplasmique et non dans la vacuole digestive. Il fut suggéré par la suite que la résistance à l'artémisinine serait due au changement d'un seul acide aminé (L263E) de la SERCA plasmodiale. Cet acide aminé influence la fixation de l'artémisinine sur son site, modulant ainsi la sensibilité *in vitro* des parasites à ce composé. Le manque de stéréosélectivité des dérivés de l'artémisinine est considéré comme un argument pouvant mettre en cause l'ATPase6 comme cible principale. Les dérivés de l'artémisinine sont des molécules chirales dont les énantiomères présentent des activités antipaludiques similaires.

➤ **Hypothèse de la mitochondrie comme cible**

Après plusieurs investigations, il a été proposé que la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie plasmodiale active directement l'artémisinine et entraîne l'accumulation des agents oxydants. Ces agents provoquent à leur tour la dépolarisation de la membrane mitochondriale et par conséquent la mort du parasite. Cependant, dans une récente étude, l'analyse de la fonction mitochondriale au sein des globules rouges parasités traités par des endopéroxydes n'a pas montré de modification morphologique de la mitochondrie parasitaire et suggère que le dysfonctionnement mitochondrial ne serait pas un événement précoce du mode d'action des dérivés de l'artémisinine ou des endopéroxydes synthétiques.

➤ **Rôle de la protéine Kelch 13 (PfK13)**

La protéine Pfk13 est décrite comme plus proche de la protéine KLHL chez l'homme qui code pour une protéine séquestrant de façon consécutive le facteur de transcription Nrf2 sur la membrane cellulaire. Soumis à un stress oxydatif, le complexe Nrf2 /KLHL19 est clivé et Nrf2 transloque vers le noyau où il induit la transcription des gènes impliqués dans la protection cellulaire contre le stress [59]. Lorsque le K13 de type sauvage détecte des oxydants tels que l'artémisinine il subit un changement de conformation pour libérer le facteur de transcription qui régule ensuite l'expression des gènes impliqués dans la lutte contre les dommages oxydatifs. On pense donc que la réponse des parasites de types sauvages est trop peu importante et trop tardive, de

sorte que l'action de l'artémisinine est trop puissante et trop rapide pour que les parasites puissent la surmonter avec succès.

Cependant, chez les parasites résistants à l'artémisinine, les mutations de l'hélice K13 déstabilisent l'interaction du facteur de transcription K13, ce qui entraîne une activation consécutive des modifications transcriptionnelles qui poussent le parasite à résister aux dommages oxydatifs causés par l'artémisinine [15]. Par ailleurs, le traitement avec l'artémisinine provoque l'entrée du parasite en phase dormante moins susceptible à l'action destructrice du médicament [60, 61], ce qui se traduit parfois par un cycle cellulaire plus long et un stade anneau assez prolongé [62].

Chez les parasites sensibles à l'artémisinine, le K13 se lie à un facteur de transcription putatif et la cible pour dégradation. Par contre pour les parasites résistants à l'artémisinine les mutations sur le gène *K13* empêcheraient de façon consécutive l'interaction de K13 avec sa cible, et provoqueraient ainsi la dérégulation de la réponse anti-oxydante. Dans cet état les parasites sont mieux préparés pour gérer le stress oxydatif imposé par l'artémisinine [63].

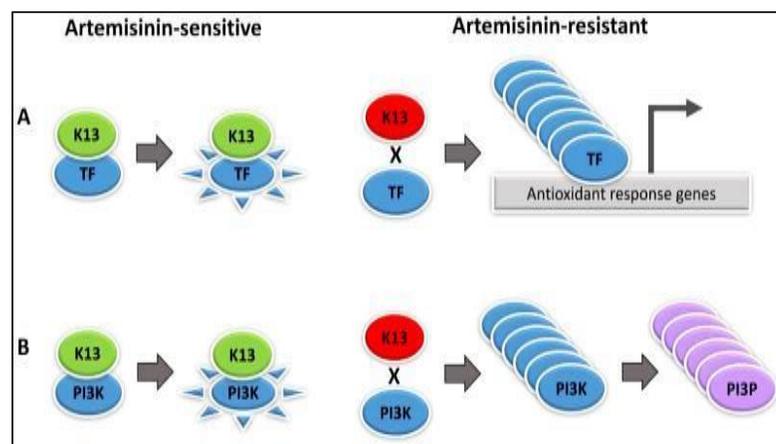


Figure 6 : Mécanismes supposés de la susceptibilité et de la résistance de *P. falciparum* [63]

Le polymorphisme de Pfk13 a donc un rôle majeur dans la résistance à l'artémisinine. Parmi les mutations que l'on y retrouve, une a été mise en évidence comme étant capable de perturber la fonction de la protéine. Il s'agit de la mutation A578S (alanine en sérine), et ceci grâce à la modification de l'interaction avec les autres protéines via l'altération des charges de surface [64].

Jusqu'à présent, et malgré la présence de souches de parasites présentant également des mutations du gène *kelch13* en Afrique, aucune corrélation n'a pu être établie avec une perte de sensibilité du parasite sur ce continent [65]. Cela pourrait refléter l'importance du fond génétique des parasites dans lesquels les mutations émergent. Il est très important de noter que l'impact des diverses mutations dans le gène *kelch13* sur la clairance parasitaire et sur le taux de survie des parasites au stade anneau était dépendant du fond génétique des parasites [15, 21].

➤ Quiescence /dormance

Il a été démontré grâce aux études menées sur la lignée F32-ART (une lignée parasitaire établie *in vitro* et hautement résistante à l'artémisinine, capable de survie à des très fortes concentrations correspondant à 70µM fois la valeur de la CI₅₀ observée avec la lignée parentale FR32-Tanzania. Pour sélectionner ces parasites tolérants à l'artémisinine, ils ont mis cette souche Tanzanie F32 sous pression de l'artémisinine à travers plusieurs cycles d'exposition avec des concentrations croissantes, et cela durant trois années. Chaque exposition durait 24 heures et après 100 cycles de pression, une lignée de parasites tolérants à l'artémisinine fut obtenue) puis confirmé sur des isolats du Cambodge, que la résistance de *P. falciparum* aux l'ART est médiée par un mécanisme de type quiescence/dormance. Ce phénotype de tolérance semble spécifique à l'artémisinine et à ses dérivés car il fut également constaté avec l'artésunate mais pas avec la chloroquine.

Ces parasites quiescents sont à l'origine des clairances retardées ainsi que des recrudescences parasitaires observées une fois que les concentrations plasmatiques en antipaludique chez le patient sont descendues en dessous de leur seuil d'efficacité. Les études cinétiques de proliférations de parasites *in vitro* ont par la suite montré que seul un faible nombre de parasites survivent au traitement complet et sont ensuite capable de se développer à nouveau une fois le médicament éliminé. Cela suggère que la capacité de quiescence induite par les ART est une propriété intrinsèque de *P. falciparum*.

La quiescence se met en place au tout premier stade du cycle érythrocytaire du parasite, appelé « anneau » en raison de sa forme caractéristique. Cependant, ce

phénomène ne concerne qu'une infime partie des parasites au stade anneau, ce qui lui confère un caractère très particulier comparativement aux autres mécanismes de résistance connus qui affectent généralement tous les parasites d'une population clonale. Par ailleurs, les parasites résistants aux ART ont un développement ralenti au stade anneau ce qui pourrait favoriser leur mise en quiescence lors d'un traitement par ART. Au sein même de cette population de parasite au stade anneau, il a été démontré que l'âge des parasites après invasion du globule rouge est un facteur important dans leur capacité à résister.

Ceci suggère que le phénomène de quiescence pourrait être impliqué dans les mécanismes d'action et de résistance à l'artémisinine. Ni une mutation sur le gène *PfATPase6*, ni un changement du nombre de copie de *Pfmdr1* n'ont été associés à ce phénomène. L'expression de quelques gènes était faiblement élevée ou diminuée au niveau de la souche tolérante mais aucune ne pouvait expliquer le nouveau phénotype observé. La quiescence serait une réponse naturelle des plasmodies au stade de ring face au stress provoqué par les molécules de la classe de l'artémisinine. Ainsi, une hypothèse selon laquelle la résistance aux dérivés de l'artémisinine se présenterait en deux niveaux fut établie. En effet, au cours du premier niveau, l'action de l'artémisinine deviendrait incapable d'induire une portion des rings en état de quiescence qui évolueront jusqu'au stade de trophozoïte. Les stades matures étant sensibles (changement non significatif de la concentration inhibitrice CI) seraient éliminés par le médicament. Au second niveau, les stades matures perdraient leur sensibilité et deviendront capables de se développer continuellement jusqu'au stade de schizonte malgré la pression de l'artémisinine. A ce niveau, un changement significatif de la CI serait perçu. Le premier niveau de résistance serait illustré par le retard de clairance parasitaire constaté au Cambodge et en Thaïlande. Par contre, aucune indication sur le terrain ne fait état du phénotype du second niveau à ce jour.

3.2.6. Marqueurs moléculaires de résistance à l'artémisinine

Il est remarquable que ce ne sont qu'un petit nombre de mutations, toujours les mêmes, qui affectent le plus souvent le site actif de l'enzyme, sont responsable de la résistance.

L'évolution de la résistance parasitaire à un médicament peut s'effectuer en deux phases :

- ✓ En premier lieu un évènement génétique se produit antérieurement au traitement et donne un phénotype parasitaire nouveau qui possède l'aptitude de survivre en présence du médicament. Les mutations apparaissent au hasard dans le génome de *Plasmodium*, avec des taux variables mais indépendamment de la pression médicamenteuse. Bien que ce phénomène soit rare, les mutations peuvent donner un avantage sélectif à certains parasites en leur permettant de se multiplier plus rapidement que d'autre ou de survivre en présence d'un antipaludique.
- ✓ En second lieu, ce phénotype parasitaire est sélectionné par le traitement puis se multiplie pour aboutir éventuellement à une population parasitaire entièrement résistante au traitement. Les évènements génétiques à l'origine des résistances parasitaires aux antipaludiques sont spontanés et rares. Ils se produisent au hasard et indépendamment des médicaments. Ces évènements sont caractérisés par des mutations géniques ou par des changements du nombre de copies des gènes qui déterminent la cible du médicament ou les pompes membranaires qui régulent la concentration du médicament à l'intérieur du parasite. Un seul évènement peut suffire pour engendrer une résistance mais souvent plusieurs évènements indépendants peuvent être nécessaires.

Dans le cas de *P.falciparum*, il y a une adaptation constante aux associations à base d'artémisinine. Avec un matériel génétique important le parasite se multiplie cinq fois en 48 heures, avec des réplifications asexuées rapides qui finissent par engendrer des erreurs de réplifications de l'ADN, conséquence ou non au traitement. Les systèmes de réparations de l'ADN sont censés les réparer, mais eux aussi font parfois des erreurs, surtout lorsque ses systèmes sont endommagés. Si une mutation n'est ni létale ni silencieuse pour le parasite, elle peut être effective et potentiellement utile dans sa survie au traitement [échappement au système immunitaire, augmentation de la multiplication, adaptations aux molécules toxiques].

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

les parasites résistants sont sélectionnés par rapport aux sensibles, il est difficile de prévenir leur expansion. La soustraction de la pression thérapeutique peut réduire la chance de survie des mutants résistants du fait du « fitness cost » de leur mécanisme de résistance. Leur expansion est facilitée par l'administration des médicaments à longue durée d'élimination. L'activité antipaludique résiduelle qui persiste après le traitement sert de « filtre sélectif », lequel prévient toute infection par les parasites sensibles mais laisse développer les parasites résistants

3.2.7. Déterminants génétiques de la résistance à l'artémisinine

L'émergence de la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine menace les efforts récents de contrôle et de lutte contre le paludisme. C'est pourquoi l'identification des marqueurs moléculaires de résistance à l'artémisinine est essentielle pour surveiller la propagation du phénotype résistant et identifier des mécanismes de résistance. Quatre gènes candidats, dont le gène *P. falciparum* *mdr1* (*pfmdr1*), le gène *P. falciparum* *ATPase6* (*pfATPase6*), le génome mitochondrial de 6 kb et *ubp-1*, codant pour une enzyme deubiquitinante, de protéines de *P. falciparum* résistantes à l'artémisinine de l'ouest du Cambodge ont été examinés et comparés à ceux de souches sensibles du nord-ouest de la Thaïlande, où l'artémisinine est encore très efficace [66]. La résistance à l'ART se caractérise par une augmentation d'échec thérapeutique aux traitements et une diminution de la clairance parasitaire. Cette résistance à l'ART est héréditaire et repose donc sur une base génétique qui semble avoir été sélectionnée parmi une population de parasite prédisposé présentant un polymorphisme des gènes *P.ffd* (*ferrodoxin*), *P.farps10* (*apicoplaste ribosomal protein s10*), *P.fmdr2* (*multidrug résistance protein2*) et *P.fcrt* (chloroquine résistance transporter). Ces gènes constituent de potentiels marqueurs d'un fond génétique sur lequel des polymorphismes sont particulièrement susceptibles de se reproduire [22]. Des études génomiques d'isolats avaient associés, tout d'abord des régions du chromosome 13 à la résistance à l'artémisinine avec une clairance parasitaire retardée [67]. Ensuite, des tentatives de sélections *in vitro* de la résistance à l'ART avaient identifié une amplification du gène *pfmdr1* chez les parasites sélectionnés. Suite à ces études, plusieurs marqueurs potentiels ont été identifiés :

Tout d'abord sur le chromosome 13

- La zone kelch 13, le système de réparation de l'ADN nommé RAD5, une zone de 35 KB ou des mutations sont associées à des modifications de temps de clairance parasitaire et la région pour le codage de la *fd* (ferrédoxine).

Ensuite sur le chromosome 14

- Le gène codant pour (apicoplast ribosomal protein S10, *arps10*) et gène multi drug résistance 2 (*mdr2*).

En fin d'autres gènes, non regroupés au même endroit, qui sont :

- Chloroquine résistant transporteur (*crt*) sur le chromosome 7, la protéine cystéine falciparine 2a sur le chromosome 11, le gène *Pfubp1* sur le chromosome 1, le gène *Pfubp2* sur le chromosome 12 et le SERCA (*sarco/ endoplasmic reticulum*).

Tableau II : Liste des gènes incriminés dans la résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine [22].

Locus	Positions	Gene ID	Gene description	N/S	Altération
13-01 (<i>Pfkelch</i>)	1, 725,259	PF3D7_1343 700	Kelch,protein, putative	N	p.Cys580Tyr
14-01 (<i>Pfarp10</i>)	2, 481,070	PF3D7_1460 900	Apicoplast ribosomal protein S10 precursor	N	p.Val127Met
13-02 (<i>Pffd</i>)	748,395	PF3D7_1318 100	Ferredoxin, putative	N	p.Asp193Tyr
14-02 (<i>Pfmdr2</i>)	1, 956,225	PF3D7_1447 900	Multidrug resistance protein 2+ (heavy metal transport family) (MDR2)	N	p.Thr484Ile
07-01 (<i>PfCRT</i>)	405,600	PF3D7_0709 000	Chloroquine resistance transporter (CRT)	N	p.Ile356Thr
10-01 (<i>Pfpph</i>)	490,720	PF3D7_1012 700	Protein phosphatase, putative	N	p.Val1157Leu

Selon l'OMS, les marqueurs les plus disposés à être impliqués dans la résistance à l'ART sont la protéine PfATP6, le gène *Pfmdr1*, la protéine PfUBP1, et le SERCA. L'implication de la protéine Kelch 13 est aussi maintenant certaine dans la résistance.

➤ **Mutations de la protéine kelch 13**

L'étude du polymorphisme du gène kelch 13 dans des isolats au Cambodge a mis en évidence l'étroite corrélation entre la présence de ce gène muté et le phénotype de résistance à l'artémisinine [68]. Ce phénotype de résistance se traduit par une diminution de la clairance parasitaire au stade anneau [69]. Le rôle central du locus K13 dans la résistance de *P. falciparum* aux ART a été confirmé par des modifications du génome d'isolats cliniques cambodgiens et de diverses souches de laboratoire soit en introduisant la mutation dans des parasites sensibles, soit en restaurant le caractère sauvage dans des parasites résistants [21]. D'autres études d'association du génome ont impliquées quatre polymorphismes mononucléotidiques associés à une clairance parasitaire retardée dont (un) situé sur le chromosome 10, (deux) sur le chromosome 13 et (un) sur le chromosome 14. Les deux sur le chromosome 13 se trouvent dans une région du génome qui semble faire l'objet d'une sélection fortement positive [70]. En effet, la protéine K13 appartient à la famille des protéines kelch 13, dont le domaine en hélice abrite de multiples sites d'interaction entre protéine-protéine et intervient dans différentes fonctions cellulaires telles que les réponses au stress oxydatif [71]. L'hélice k13 est formée par trois domaines de 225 acides aminés :

- Un domaine N-terminal spécifique du *Plasmodium*
- Un domaine BTB / POZ
- Un domaine de type hélice C-terminal à six pales qui forme les motifs de la protéine.

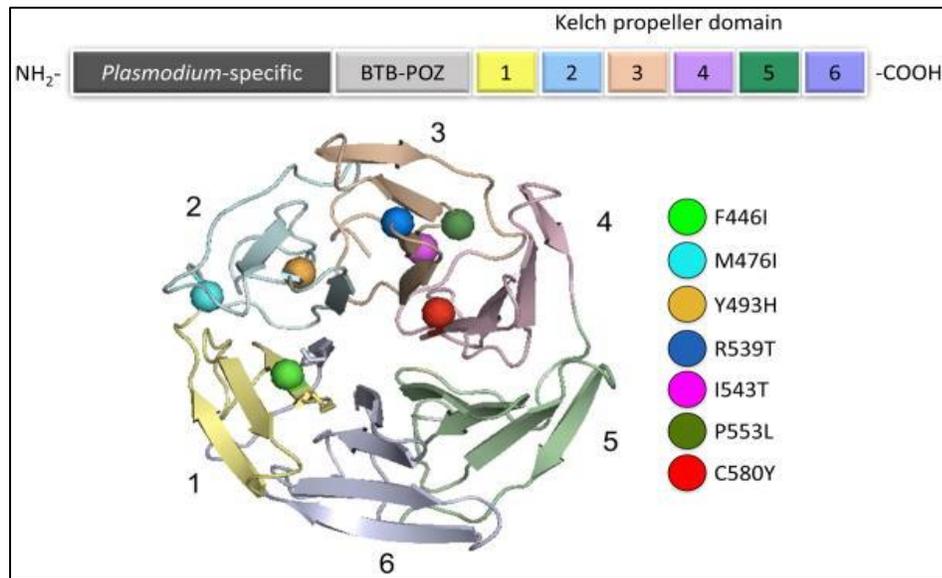


Figure 7: Structure de la protéine *kelch13* de *P. falciparum* [15]

➤ Gène *Pfmdr1*

Les dérivés d'artémisinine sont le pilier actuel de l'arsenal utilisé dans la lutte antipaludique [72]. Mais des études ont démontrés, en utilisant des approches moléculaires et génétiques, des associations fortes, bien qu'incomplètes, entre la résistance à l'artémisinine et la mutation du gène *pfmdr-1* [67], avec des réductions d'efficacité de la molécule constatées *in vitro* lors de l'augmentation du nombre de copie du gène *pfmdr-1*[73, 74].

Le gène *pfmdr-1* code pour un second transporteur *P. falciparum* P-glycoprotéine homologue1 [Pgh1] localisé dans la membrane de la vacuole digestive [67]. Or la (Pgh1) participe aux mécanismes de concentration des antipaludiques dans la vacuole digestive du parasite, soit directement, soit par régulation du pH. L'apparition de polymorphismes dans les gènes *pfmdr-1* au niveau des codons (N86Y, N1042D, S1034C et D1246Y) dans lesquels l'asparagine des codons 86 et 1042, la sérine du codon 1034 et l'acide aspartique du codon 1246. Les protéines (Pfm_{dr}-1) ont été respectivement remplacées par la tyrosine, l'acide aspartique, la cystéine et la tyrosine. Ces substitutions modifient les propriétés physico-chimiques de la protéine car tous les acides aminés substitués sont plus polaires que leur substituant.

Chaque acide aminé a certaines propriétés distinctives qui déterminent son impact dans la fonction du canal, telles que la masse molaire, le volume, les forces de van der Waal et le point isoélectrique. La substitution dans la structure de la protéine modifie les propriétés physicochimiques du transporteur et affecte par conséquent son potentiel de liaison et de transfert. Toute mutation ponctuelle qui modifie la séquence d'acides aminés de n'importe quel canal entraîne la modification de ses propriétés physicochimiques et de ses caractères fonctionnels. Par conséquent, ces différentes mutations et amplification du gène ont également été associées à une sensibilité réduite *in vitro* à l'artémisinine [67, 75].

➤ Gène **SERCA**

Le *P. falciparum* possède un seul gène SERCA, décrit à l'origine sous le nom de PfATPase6, contrairement aux autres vertèbres qui en possèdent trois [76]. D'autres parasites Apicomplexa, tels que *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium parvum*, possèdent également un gène SERCA à copie unique [77]. Les protéines SERCA sont évolutives et bien conservées. Elles sont composées de trois domaines cytoplasmiques (A, N, et P) qui participent à la régulation de la liaison du calcium et sa libération dans la lumière du réticulum endoplasmique, de dix hélices transmembranaires constituant la porte membranaire et des petites boucles lumineuses. La totalité de la molécule subit des changements conformationnels complexes lors de l'activation, impliquant une liaison coopérative de deux (Ca^{2+}) et une phosphorylation de la tête cytosolique de la molécule conduisant à des transitions conformationnelles ouvrant le canal transmembranaire [78, 79].

Le calcium intracellulaire contrôle plusieurs événements cellulaires cruciaux chez *P. falciparum* notamment la sécrétion de protéines, la motilité, ainsi que l'invasion des cellules hôtes et la sortie de celles-ci. Le transport intracellulaire de (Ca^{2+} -ATPase) joue un rôle important dans le réticulum endoplasmique et dans les compartiments de la voie de sécrétion cellulaire en maintenant une concentration suffisamment élevée de (Ca^{2+}) et de (Mn^{2+}) dans ces compartiments à fonctions cellulaires et cytosoliques très différentes [80]. Le composé végétal thapsigargin inhibe l'ATPase calcique du réticulum sarcoplasmique-endoplasmique (SERCA), ce qui entraîne une élévation du

taux de calcium et l'induction de la sécrétion de protéines dans *Toxoplasma gondii*. Les artémisinines sont des produits naturels qui exercent une activité puissante et sélective contre les parasites, ce qui explique leur efficacité dans la prise en charge du paludisme. Bien que le mécanisme d'action soit incertain, des études antérieures ont suggéré que l'artémisinine pourrait inhiber SERCA, perturbant ainsi l'homéostasie du calcium [81].

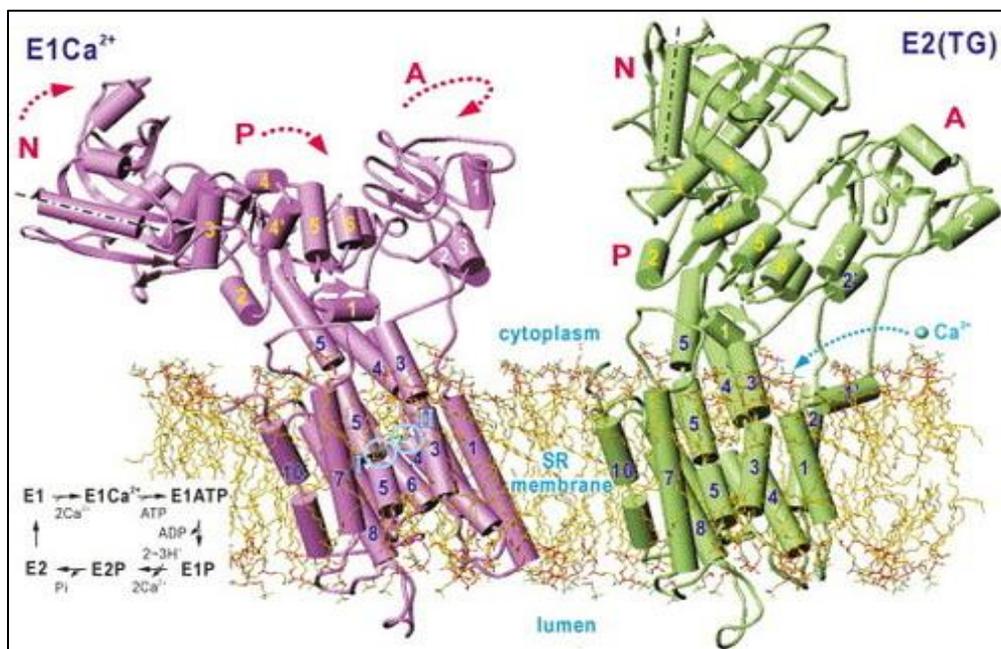


Figure 8. Base structurale du pompage ionique par la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique [82].

L'artémisinine et ses dérivés constituent la classe la plus importante d'antipaludique. Elles inhibent spécifiquement PfATP6, une ATPase de type SERCA de *P. falciparum*. Les mutations de l'enzyme PfATPase6 sont aussi des pistes très intéressantes pour la résistance à l'artémisinine. Une simple mutation d'acide aminé sur le gène codant pour cette enzyme suffit parfois à moduler l'affinité de l'artémisinine pour sa cible [83]. Une mutation d'une sérine en asparagine en position 769, ainsi que d'une leucine en acide glutamique en position 268 ont montré des diminutions intenses d'efficacité de l'ART, mais cela se limite à des résultats *in vitro*. Des modifications de l'inhibition de la chaîne respiratoire par l'ART au niveau mitochondrial ont aussi été constatées, et reliées à des

mutations du gène codant pour PfATPase6. Les modifications du SERCA expliqueraient donc certains dysfonctionnements du système mitochondriale.

➤ **Gènes *pfap2mu* et *pfubp1***

Depuis plus de dix ans, les marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques sont utilisés pour surveiller l'émergence et la propagation de la résistance dans les zones d'endémie palustre. Ces marqueurs génétiques sont principalement des polymorphismes mononucléotidiques dans les gènes codant pour des protéines cibles de médicaments dans des voies métaboliques essentielles du parasite. Des polymorphismes dans deux gènes, la sous-unité 2 mu du complexe de protéine adaptatrice *P. falciparum* (*pfap2mu*) et la protéase 1 spécifique de l'ubiquitine (*pfubp1*) sont associés à la clairance retardée des parasites [84].

Le *pfap2mu* est un hétérotétramère (α , β , μ , σ) qui sélectionne et recrute d'autres facteurs, notamment la protéine membranaire (cargo) et la clathrine intracellulaire qui est médiateur de l'endocytose [85]. L'endocytose à médiation par la clathrine est un mécanisme, commun aux cellules eucaryotes, par lequel les protéines associées à la membrane et d'autres protéines sont transportées de la membrane plasmique du réseau trans-Golgi vers des compartiments accepteurs. Le complexe adaptateur 2 est associé à une endocytose à la surface des cellules, recrutant dans la vésicule à la fois des composants de la cargaison et des éléments structurels [86], y compris la clathrine, et pourrait jouer un rôle déterminant dans le trafic d'hémoglobine des parasites [87].

La CME (*clathrin-mediated endocytosis*) est impliquée dans l'internalisation des molécules et des ligands extracellulaires (lipoprotéines de basse densité, transferrine, facteurs de croissance, anticorps et toxines bactériennes), le remodelage de la membrane plasmique (élimination de l'antigène variable), le trafic de protéines membranaires et le tri vésiculaire [88]. Elle joue un rôle crucial dans la régulation du renouvellement des protéines [89]. La mutation du gène *pfap2mu* se situe au niveau du codon 160, entraînant le changement d'acide aminé de la serine en asparagine ou en thréonine (S160N/T).

La mutation (I568T) dans le gène *pfap2mu* peut réduire sa liaison au cargo membranaire et servir de médiateur au phénotype 2 de résistance à l'artémisinine en réduisant l'endocytose ou le recyclage ou le trafic d'une ou plusieurs protéines membranaires. Cela impliquerait que l'artémisinine interagisse avec les voies endocytaires et endosomales. Les mutations du gène *pfubpi* se situent respectivement au niveau du codon 1525 avec une substitution d'acide aspartique en acide glutamique (D1525E) et au niveau du codon 1528 où l'acide glutamique est remplacé par acide aspartique (E1528D). Nous pouvons donc dire que les mutations *ubp1* et AP2- μ peuvent éventuellement moduler l'endocytose ; et son fonctionnement en une voie indépendante de la clathrine.

➤ **Gène *Pfcr***

Le *Pfcr* est un gène situé sur le chromosome 7 codant pour une protéine transmembranaire de la vacuole digestive du *Plasmodium*. Ce gène est très polymorphe, contient 424 acides aminés, disposés en 10 domaines transmembranaires qui se trouvent dans la membrane de la vacuole digestive des parasites intra-érythrocytaires. Le *Pfcr* joue un rôle significatif dans l'efflux d'alcaloïde, de cations divalents, d'acides aminés et de peptides résultants de la dégradation vacuolaire de l'hémoglobine [90]. Bref, la fonction du *pfcr* est fondamentale dans le maintien de l'hémostase H⁺.

Le mécanisme par lequel le *Pfcr* intervient dans la résistance à la CQ n'est pas clair, bien qu'il soit associé à une diminution de l'accumulation du médicament dans la vacuole digestive [91]. Cependant seule la mutation ponctuelle PfCRTk76T est associée à la chloroquinorésistance. Ce polymorphisme se traduit par une substitution qui élimine une charge positive d'un site de liaison du substrat dans *pfcr*. D'autres mutations [K76I et K76N] se produisent également lorsque *P. falciparum* est exposé in vitro à des concentrations létales de CQ [92]. La présence de cette mutation permet au parasite de limiter l'accumulation de chloroquine dans sa vacuole digestive grâce à la capacité du *pfcr* à exporter la CQ vers l'extérieur [93].

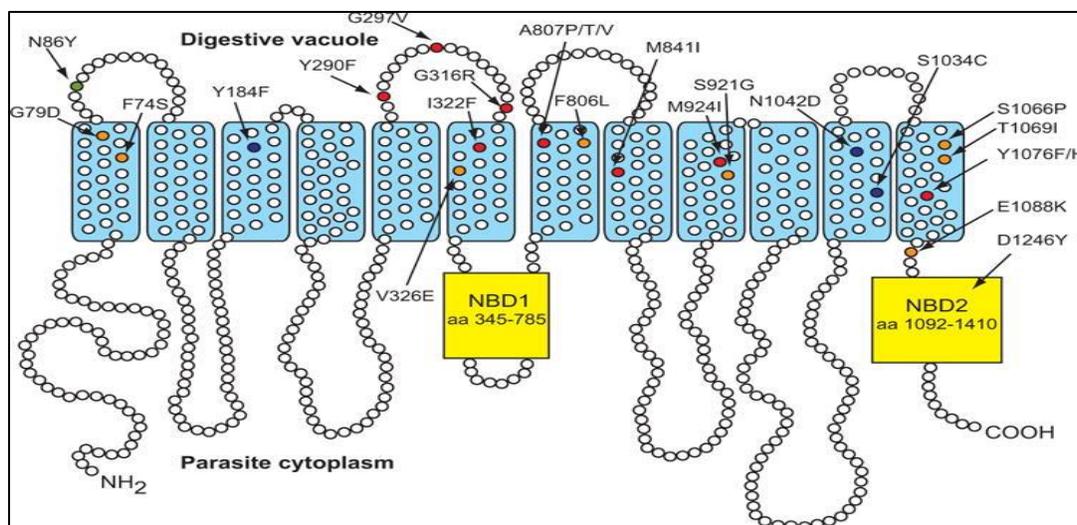


Figure 9. Représentation schématique de PfCRT et des positions de mutations identifiées [74, 85].

3.2.8. Mutations du fond génétique de résistance à l'artémisinine (FGR-ART)

Les mutations au niveau du domaine propeller de la protéine Kelch13 ont été largement incriminées dans la résistance à l'artémisinine. Plus de 124 mutations ont été décrites à ce jour parmi lesquelles 20 ont été associées à un prolongement du temps de clairance parasitaire post artémisinine [94, 95].

Les mutations du gène Kelch13 associées à la résistance à l'artémisinine chez *P. falciparum* ont été décrites dans différentes zones géographiques en Asie du Sud-est. Toutes ces mutations semblent émerger de façon indépendante. Une étude portant sur le génome entier du parasite a révélé que bien que ces mutations associées à la résistance à l'artémisinine soient diverses et indépendantes, elles apparaissent toujours sur un fond génétique constitué de l'héritage concomitant de six mutations au niveau de 5 gène du parasite qui sont : le gène *Pfcr*t, *Pfpp*h, *Pffd*, *Pfar*ps, et le gène *Pfmd*r2.

La présence concomitante de ces mutations chez un parasite semble prédisposer ces parasites à l'avènement de mutation au niveau du gène Kelch13 induisant ainsi la résistance à l'artémisinine.

En Afrique où la résistance à l'artémisinine n'est pas encore observée, une surveillance de ces mutations offre aux chercheurs et responsables des programmes de lutte contre le paludisme un moyen précieux pour suivre l'évolution de ce problème et anticiper les mesures qui s'imposent.

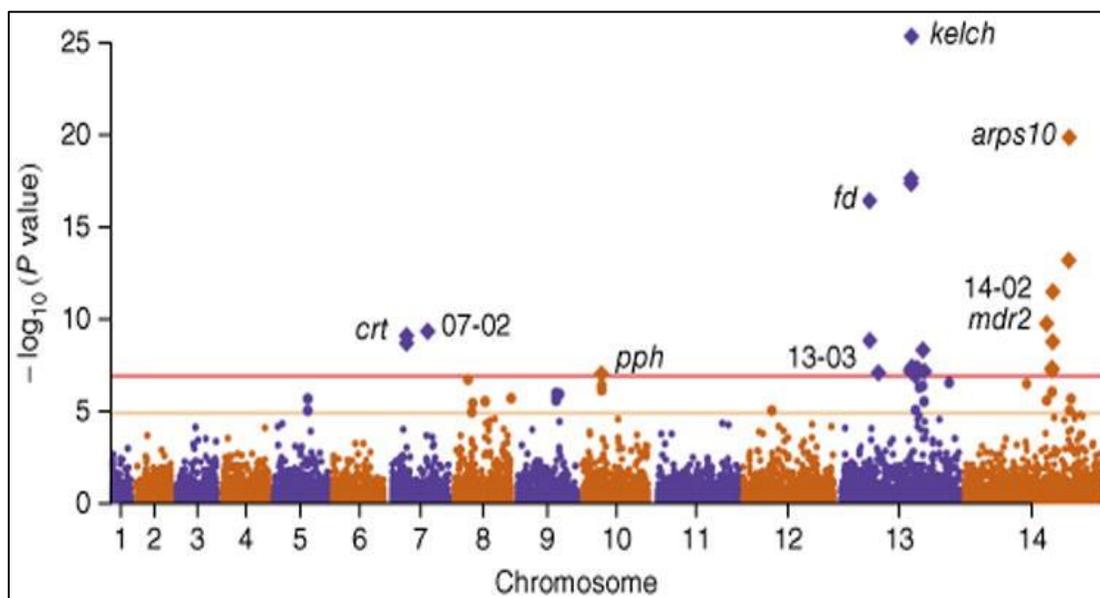


Figure 10. Répertoires de l'emplacement génomique des polymorphismes mononucléotidiques constitutifs du FGR-Art [22]

4. Méthodologie

4.1. Cadre d'étude

Cette étude entre dans le cadre d'une étude globale sur la diversité génomique des parasites du paludisme au Mali financée par le DELTAS AFRICA, une initiative de l'Académie Africaine des Sciences à travers le Centre Ouest Africain de Biologie Cellulaire des Pathogènes Infectieux (WACCBIP) basé à l'Université de Ghana (grant DEL-15-007 : Awandare). L'étude a aussi bénéficié de l'accompagnement technique de l'Institut Sanger du Royaume Unis dans le cadre du consortium « Malaria gen ».

4.2. Sites d'étude

L'étude s'est déroulée dans deux localités du Mali : Nioro du Sahel et Dangassa choisis pour leur grande différence sur le plan épidémiologique palustre.

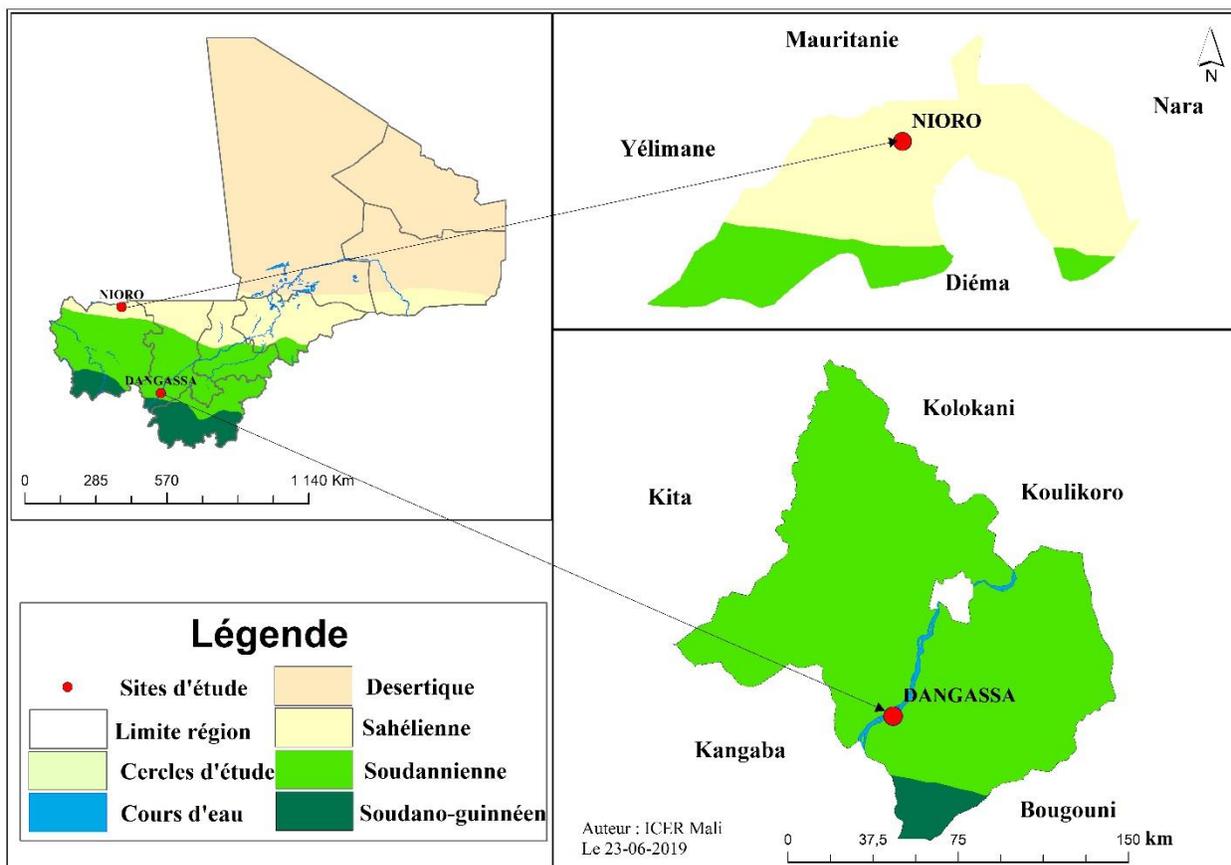


Figure 11. Sites de l'étude

➤ Nioro du Sahel

Nioro du Sahel est situé à 241 km au nord-est de Kayes (chef-lieu de la première région administrative du Mali) et à 447 km de Bamako. Il est situé entre la latitude 14°30 et 16°30 nord et les longitudes 11°00 et 9°00 ouest. Nioro du Sahel est le chef-lieu de la commune et du Cercle du même nom. Il compte 16 communes et couvre une superficie de 11 060 km².

Le climat est nord sahélien avec deux saisons bien marquées : l'hivernage va de juillet à septembre. En année moyenne, on enregistre en moyenne 300 mm de pluies (figure 12). Il fait très chaud en avril, mai et juin (45°C, figure 2). Ce qui caractérise surtout Nioro du Sahel est le fort taux d'évaporation des eaux de surface avec 80%. Ceci explique en grande partie le tarissement précoce des points d'eaux naturels. Les mares de Korkodio et de Gakou constituent des réservoirs d'eaux importants.

La végétation est essentiellement composée d'arbustes épineux avec une domination d'Acacia.

La population du cercle est cosmopolite, composée de Soninké, Peuls, Maures, Kagoro et Bambara y vivent en paix. Cette population est estimée à environ 253 000 habitants.

L'agriculture et l'élevage restent les deux occupations majeures de la population. Le commerce et l'artisanat sont assez bien développés dans la ville de Nioro du Sahel. La commune urbaine de Troungoumbé abrite le plus grand marché à bétail de la région. La population du cercle est confrontée à d'énormes problèmes de santé, d'éducation, de communication. Le manque d'infrastructure et d'équipements est senti à tous les niveaux. La couverture sanitaire en termes d'infrastructures construites est passée du simple au triple (07 CSCOM en 2001 contre 14 en 2005 et 21 en 2015). Par rapport à l'accessibilité géographique de la population aux services socio- sanitaires, le taux est passé à 42% pour les populations situées à moins de 5 km et à 62% pour celles résidentes à moins de 15 km. Le taux de consultation prénatale est passé de 37% en 2001 à 65% en 2005. Le taux d'accouchement assisté demeure constant à 31%. Les

maladies courantes sont le paludisme et les infections respiratoires chez les enfants. On note une recrudescence de la tuberculose liée à l'épidémie du SIDA.



Figure 12. Température moyenne et maximale à Nioro du Sahel

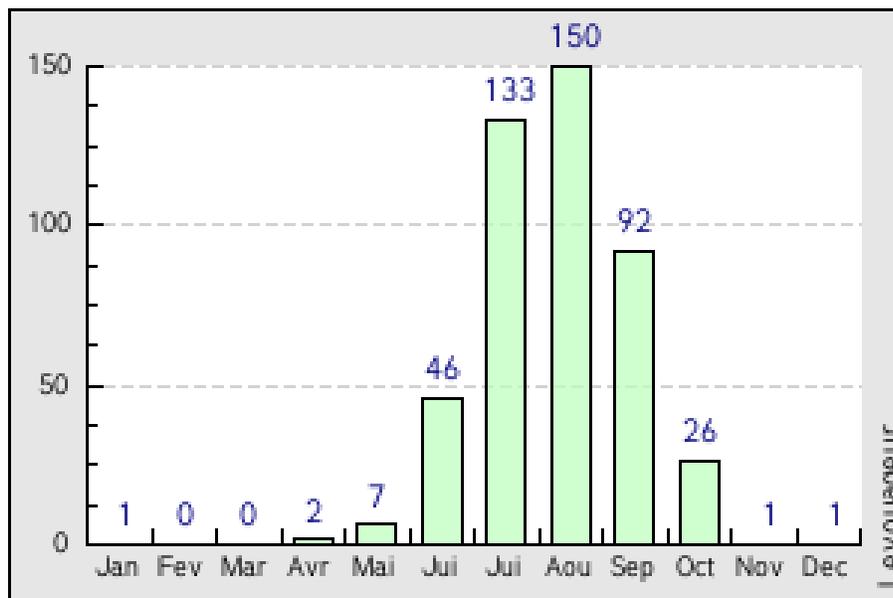


Figure 13. Précipitations moyennes mensuelles en mm de pluies à Nioro du Sahel

➤ **Village de Dangassa**

Dangassa est situé dans le district sanitaire de Ouéléssebougou, cercle de Kati, région de Koulikoro. Autre fois, le village s'appellait Tintinibilé (plateau rouge), et aurait été fondé vers le 13ème siècle par Manssa Dan camara venu de Kong. Il s'installa sur un plateau où poussait une herbe appelée en malinké Ngasan. Quand son frère kamadjan lui rendit visite et dit « nous viendrons nous installer à Dan ka Ngasanfièra » ce qui signifie en malinké (le plateau où pousse l'herbe Ngasan) que le village prend le nom de Dangassa. Ce village compte environ onze milles(11000) composés essentiellement de malinké, mais aussi les bambaras, peuhls, les somono, les dogons et les mossis.

Situation géographique

Le village de Dangassa est situé à 82km au Sud-ouest de Bamako sur la route nationale 7, dans la commune rurale de Niagadina, sous-préfecture de Kourouba, préfecture de Kati, région de Koulikoro. Il est limité à l'Est par le village de Ballala, au Nord-Est par le village de Makono à l'Ouest par le village de Niagadina, au Nord par le fleuve Niger, et au Sud par le village de Faraba de Bamako.

4.3. Type et période d'étude

Nous avons mené une étude transversale prospective qui consistait à collecter des données chez les patients reçus en consultation aux centres de santé de Nioro et Dangassa au cours de la saison de transmission palustre de septembre à décembre 2016 et d'août à décembre 2017. Une équipe médicale assurait la permanence dans le centre de santé des deux localités pendant toute la période de l'étude. Et les populations étaient encouragées à fréquenter les centres en cas maladie.

4.4. Population d'étude

La population d'étude était constituée de toutes les personnes âgées de 6 mois et plus se présentant aux centres de santé de Nioro et Dangassa pour paludisme.

4.5. Echantillonnage

L'échantillonnage était exhaustif nous avons inclus tous les patients qui se sont présentés aux centres avec des signes de paludisme et ayant accepté de participer à l'étude chez qui un test rapide de diagnostic du paludisme (TDR) a été réalisé.

4.5.1. Critères d'inclusion

Les personnes répondant aux critères suivants ont été inclus dans cette étude :

- être âgé de 6 mois et plus ;
- avoir donné son consentement libre et éclairé ;
- avoir un taux d'Hb \geq 8,5 g/dl ;
- avoir un TDR positif ;
- avoir une goutte épaisse (GE) positive

4.5.2. Critères de non inclusion

- parasitémie faible inférieure à 5000Pf /ul de sang ;
- autres espèces que *P. falciparum*

4.6. Variables mesurées

- sociodémographiques : l'âge, le sexe, la résidence.
- cliniques : température, le poids
- biologiques : taux d'hémoglobine (Hb).
- parasitologiques : parasitémie, les mutations Pfarps10_D127M, Pfarps10_V128M, Pffd_D193Y, Pfcr1_I356T, Pfcr1_N326S, et Pfmdr2_T484M

4.7. Définitions opérationnelles

- **Accès palustre** : il a été défini par la présence d'au moins un signe du paludisme et la présence de *P. falciparum* dans le sang.
- **Accès palustre grave** : présence de l'un des signes du paludisme grave et la présence du *P. falciparum* dans le sang selon l'OMS[20].

4.8. Déroulement et procédure d'étude

Avant le démarrage de l'étude, une autorisation communautaire a été obtenue auprès du chef de village, des chefs de familles et des autorités communautaires et administratives.

En mai 2016 et 2017, nous avons procédé à l'inclusion des sujets dans l'étude. Pour chaque patient reçu en consultation et après l'obtention d'un consentement individuel éclairé et volontaire. Un interrogatoire suivi d'un examen clinique était réalisé. Cela nous a permis de recueillir les données cliniques sur un formulaire de report de cas. Un prélèvement sanguin était par la suite effectué au niveau du doigt pour réaliser, le TDR, la GE et déterminer le taux d'Hb. Un prélèvement veineux était ensuite fait dans les tubes EDTA pour d'autres analyses. Les prélèvements veineux étaient centrifugés pour séparer le plasma du culot. Le plasma était utilisé pour rechercher des facteurs pouvant influencer les manifestations cliniques du paludisme. Et le culot de globules rouges était utilisé pour extraire l'ADN parasite qui nous a permis de faire les géotypages. Pour chaque cas confirmé de paludisme, une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (CTA) était administrée pour le paludisme non compliqué, et la Quinine en perfusion ou artéméther injectable pour le paludisme grave. En cas de complications nécessitant des actions thérapeutiques particulières, les patients étaient orientés ou référés vers des services spécialisés.

Extraction de l'ADN et le géotypage

Les ADN parasites ont été extraits des papiers buvards imbibés de sang de patients positifs pour *P. falciparum* en utilisant le kit d'extraction Qiagen Kit (No. 56504, Qiagen, Crawley, UK).

Une amplification complète [96] ou partielle [97] du génome du parasite était réalisée à partir de l'ADN ainsi obtenu en utilisant des amorces spécifique du génome de *P. falciparum*. Le géotypage a été réalisé sur le produit de l'amplification en utilisant la plateforme robotique Agena MassARRAY® iPLEX (Agena Bioscience, Hamburg, Germany). Ce système est capable de géotyper simultanément avec précision un grand nombre de mutations nucléotidiques et dans un grand nombre d'échantillon [98].

L'amplification et le génotypage de l'ADN parasite ont été effectués par des partenaires de l'Institut Sanger des Royaume-Uni.

4.9. Collecte, gestion et analyse des données

Les informations cliniques et biologiques ont été collectées sur les formulaires de rapport de cas (*FRC*). Les données ont été saisies sur Microsoft Excel 2007 et analysées avec le logiciel SPSS. Les résultats ont été présentés sous forme de tableaux et de figures. Le test de Khi2 de Pearson a été utilisé pour comparer les variables catégorielles entre elles, le test de Student a été utilisé pour comparer les variables quantitatives. Le seuil de signification statistique a été fixé à 5%.

4.10. Considérations éthiques

Le protocole de recherche a été soumis à l'approbation du comité d'éthique des Facultés de Médecine et d'Odontostomatologie, et de Pharmacie. Nous avons également travaillé selon les bonnes pratiques de recherche clinique sur l'homme et selon les bonnes pratiques de laboratoire telles qu'énoncées dans les conventions internationales (déclaration d'Helsinki, Conférence internationale d'harmonisation des bonnes pratiques de recherche biomédicale).

5. Résultats

5.1. Données sociodémographiques et cliniques

Tableau III : répartition des patients en fonction du site d'étude et du sexe

Site d'étude/Sexe	Masculin	Féminin	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Dangassa	93 (43,7)	120 (56,3)	213 (100)
Nioro	41 (73,2)	15 (26,8)	56 (100)

La majorité des participants ont été enrôlés à Dangassa, soit au total 213 sur 269. Le sexe ratio était 1,3 en faveur de sexe féminin à Dangassa et 2,7 en faveur de sexe masculin à Nioro.

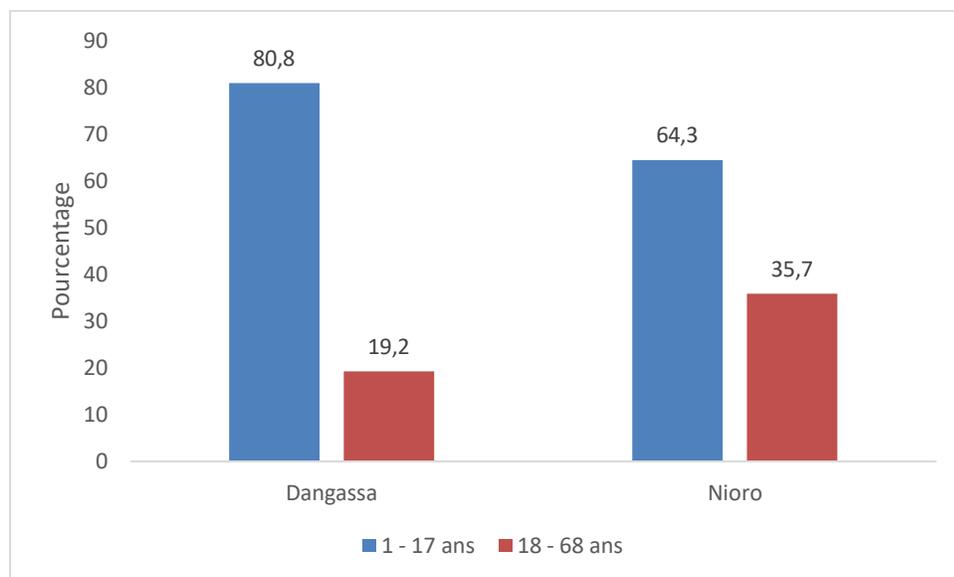


Figure 14. Répartition des patients en fonction des groupes d'âge et de la résidence

Les enfants de 0-17 ans représentaient jusqu'à 80,8% des participants à Dangassa contre et 64,3% à Nioro du sahel.

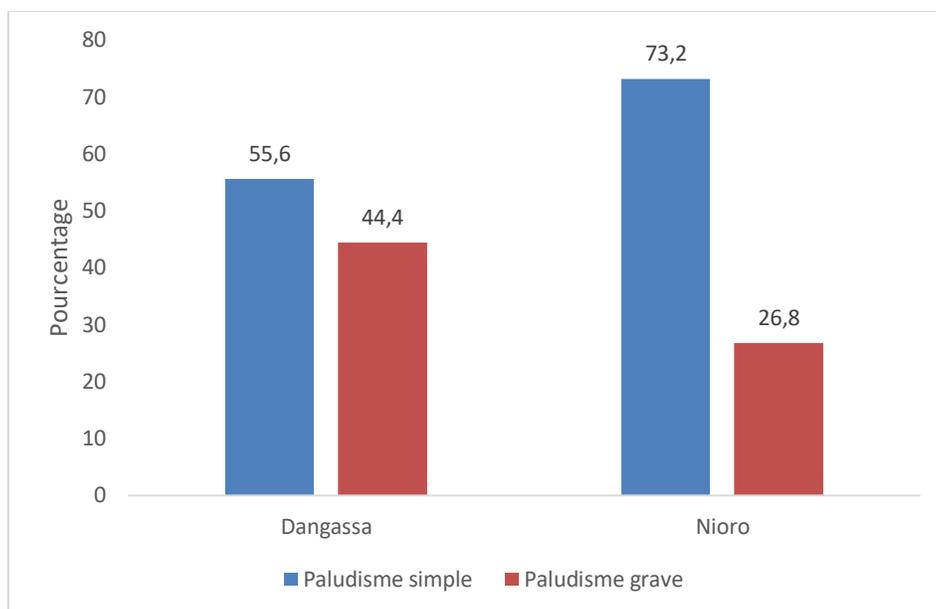


Figure 15. Répartition des patients en fonction du phénotype clinique du paludisme dans les villages de Dangassa et Nioro du Sahel

Nous avons remarqué que la prévalence du phénotype de paludisme grave était plus élevée à Dangassa avec 44,4% que celle de Nioro, soit 26,8%. Inversement, la proportion du paludisme simple était élevée à Nioro qu'à Dangassa.

Tableau : IV. Parasitémie moyenne en fonction du site d'étude

Site d'étude	Parasitémie moyenne (Pf/μl)	p
Dangassa	29342,771±31265,7184	
Nioro	23281,473±20015,8429	0.08

La moyenne parasitaire ne variait pas significativement en fonction des sites d'étude (p= 0,08).

Tableau V. Taux moyen d'hémoglobine en fonction du site d'étude

Site d'étude	Taux moyen d'hémoglobine (g/dl)	p
Dangassa	11,2598±1,56444	
Nioro	11,8036±1,89410	0.03

Dans l'ensemble, nous avons observé que le taux moyen d'hémoglobine était élevé de plus 0,5 g/dl à Nioro du Sahel qu'à Dangassa. Cette différence était statistiquement significative ($p= 0,03$).

5.2 Données génétiques relatives aux isolats de *P. falciparum*

Tableau VI. Fréquence des mutations Pfarps10_D127M chez les isolats de *P. falciparum* dans les sites d'étude

Pfarps10_127	Dangassa		Nioro	
	n	%	n	%
D/M	1	0,9	0	0
D	171	99.4	45	100
Total	172	100	45	100

La mutation Pfarps10_D127M a été retrouvée chez un seul isolat de parasite à Dangassa sous forme d'infection mixte. Aucune mutation Pfarps10_D127M n'a été détectée à Nioro.

Tableau VII. Fréquence des mutations Pfarps10_V128M chez les isolats de *P. falciparum* dans les sites d'étude

Pfarps10_128	Dangassa		Nioro	
	n	%	n	%
V/M	1	0,5	0	0
V	186	99.5	48	98
M	0	0	1	2
Total	187	100	49	100

Chacun des deux sites d'étude a présenté un seul cas de mutation Pfarps10_V128M. Le cas de Dangassa était une infection mixte.

Tableau VIII. Fréquence des mutations Pffd_D193Y chez les isolats de *P. falciparum* dans les sites d'étude

Pffd_193	Dangassa		Nioro	
	n	%	n	%
D/Y	1	0,5	0	0
D	201	95.7	48	90.6
Y	8	3.8	5	9.4
Total	210	100	53	100

La mutation Pffd_D193Y a été retrouvée à Dangassa et à Nioro à des prévalences respectives de 4.3% et 9,4%. Un des isolats présentant la mutation à Dangassa était retrouvée sous forme d'infection mixte.

Tableau IX. Fréquence des mutations Pfcrt_I356T chez les isolats de *P. falciparum* dans les sites d'étude

Pfcrt_356	Dangassa		Nioro	
	n	%	N	%
I/T	23	11	10	18.9
I	113	53.8	26	49.1
T	74	35.2	17	32.1
Total	214	100	53	100

Au total 46.5% des isolats de Dangassa ont présenté la mutation PfcRT_I356T parmi lesquels 11% était sous forme d'infection mixte. Ces proportions étaient de 51% et 18.9% à Nioro.

Tableau X. Fréquence des mutations Pfcrt_N326S chez les isolats de *P. falciparum* dans les sites d'étude

Pfcrt_326	Dangassa		Nioro	
	N	%	N	%
N/S	1	0,5	1	2
N	182	98.9	50	98
S	1	0.5	0	0
Total	184	100	51	100

La mutation Pfcrt_326S a été retrouvée chez seulement deux (2) isolats de parasite à Dangassa dont un présentait une infection mixte avec une souche sauvage Pfcrt_326N.

Tableau XI. Fréquence des mutations Pfmdr2_T484M chez les isolats de *P. falciparum* dans les sites d'étude

Pfmdr2_484	Dangassa		Nioro	
	n	%	n	%
T/M	1	0,5	0	0
T	212	99.5	55	1000
M	0	0	0	0
Total	213	100	55	100

Seul un isolat de Dangassa a présenté la mutation Pfmdr2_T484M sous forme

Tableau XII. Prévalence globale des mutations dans les deux sites Dangassa et Nioro du sahel

Mutations	Dangassa		Nioro		P
	n	%	n	%	
Pfarps10_127M	1	0.5	1	2	
Pfarps10_128Y	1	0.6	0	0	
Pffd_193Y	9	4.3	5	9,4	0,161
Pfcrt_326S	2	1	1	2	
Pfcrt_356T	97	46.4	27	51	0,299
Pfmdr_484I	1	0.5	0	0	

Dans notre étude, nous avons observé que les mutations les plus répandues étaient Pfcrt_I356T et les mutations Pffd_D193Y avec respectivement 46,4% et 4,3% à Dangassa contre 51% et 9,4% à Nioro. Il n'a pas été observé de différences statistiquement significatives entre les prévalences des mutations dans les deux sites d'étude ($p > 0,05$).

Chacune des mutations étudiées ont été détectées à Dangassa. Cependant, les mutations Pfarps10_D128Y / H, Pfcrt_N326S et Pfmdr2_T484I n'ont pas été détectées à Nioro

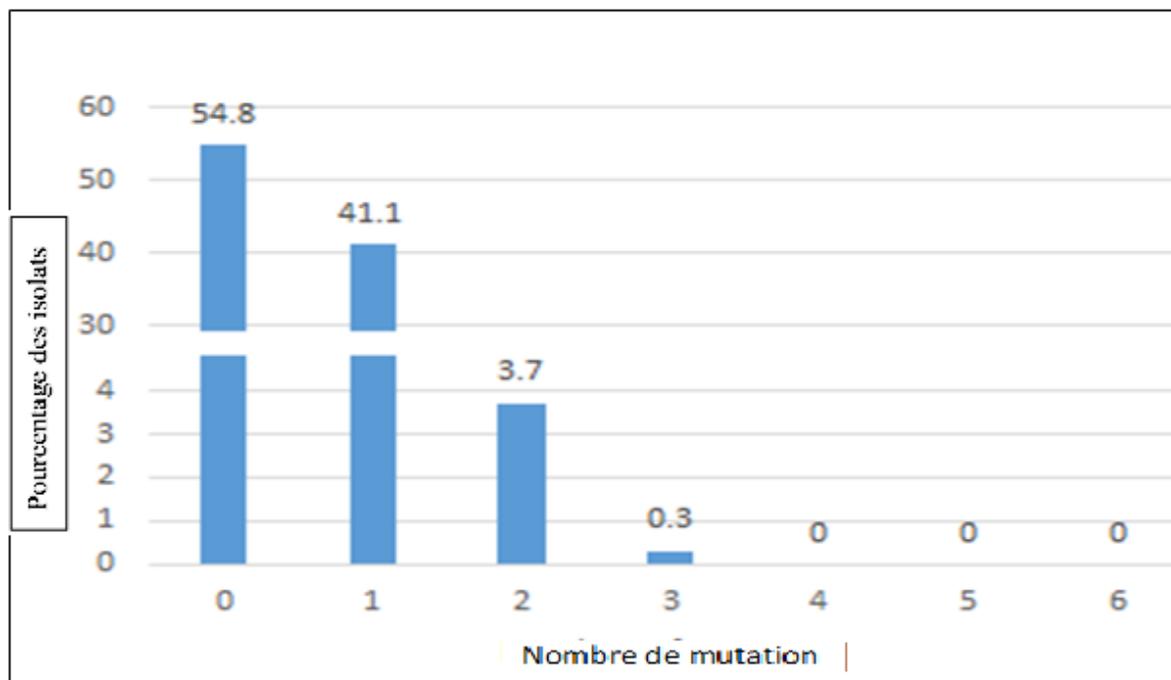


Figure 16. Répartition en fonction de l'existence du nombre de mutation chez les isolats de *P. falciparum* dans les deux sites

Dans notre étude, nous avons observé que plus de 41,1% des isolats de *P. falciparum* portaient au moins une des mutations étudiées, 3.7% des isolats de *P. falciparum* en portaient deux. Seuls 0.3% des isolats cumulaient 3 des mutations étudiées. Aucun isolat ne cumulait plus de trois mutations.

6. Commentaires et discussion

Cette étude est le fruit d'une collaboration entre le Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme et L'Institut Sanger des Royaumes-Uni sur un projet de recherche sur la génomique des populations de parasite. Les résultats de cette étude permettront de mieux surveiller l'émergence de la résistance de *Plasmodium falciparum* à l'artémisinine au Mali. Elle s'est déroulée dans deux zones éco-climatiques différentes du Mali arborant des paramètres d'endémicité palustre différents : Nioro du Sahel et Dangassa. Ces deux zones peuvent être considérées comme représentatives de l'épidémiologie du paludisme sur tout le territoire Malien. Nioro est une ville située dans une zone de faible transmission dans le sahel avec une courte saison de transmission qui s'étend de juillet à septembre. Le paludisme y est instable. Dangassa est un village situé le long du fleuve Niger dans la savane forestière de type Guinéenne. Le paludisme y est stable et endémique avec des saisons de forte transmission intense et plus longue allant de Mai à janvier. Cependant on y trouve des cas de paludisme toute l'année ou la transmission du paludisme est intense et longue.

L'étude a consisté en la détermination des prévalences de six (6) mutations dans le génome des isolats de *P. falciparum* collecté chez les patients dans les sites de l'étude. La présence concomitante de ces mutations chez le parasite appelée fond génétique de résistance à l'artémisinine a été toujours retrouvé chez les parasites résistants à l'artémisinine [94]. Il s'agit de la mutation Pfarps10_V127M, la mutation Pffd_D193Y, la mutation Pfmldr2_T484I, la mutation Pfcrf_N326S et la mutation Pfcrf_I356T. L'étude des mutations constitutives de ce fond génétique de résistance constitue un précieux moyen de surveillance de l'émergence de la résistance à l'artémisinine en Afrique, bien qu'aucune résistance à l'artémisinine n'ait été rapportée en Afrique pour le moment.

La majorité des patients inclus résidait à Dangassa, soit 79,2%. Le sexe féminin était prédominant à Dangassa avec 56,3%, contrairement à Nioro où le sexe masculin était majoritaire avec 73,2%. L'étude a concerné les patients reçus en consultation dans les centres de santé des deux localités pour paludisme, La grande représentativité des échantillons de Dangassa pourrait s'expliquer par le fait que c'est une zone d'endémie

paludisme et que la majorité des consultations dans cette zone est due au paludisme surtout pendant la saison de transmission palustre. Cette même observation a été faite lors de l'enquête démographique et de santé en 2014 au Mali [99]. Nous avons également remarqué que les enfants étaient prédominants aussi bien à Dangassa qu'à Niore. Cette observation confirme la grande vulnérabilité de cette couche de la population à la maladie comme mentionné dans une étude antérieure [100].

La moyenne parasitaire était de 29342tf/ μ l de sang à Dangassa contre 23281tf/ μ l à Niore du Sahel mais cette variation n'était pas significative ($p=0,169$). Dans les zones d'endémie palustre, le portage des parasites est fréquent sans manifestations cliniques à cause de l'immunité naturellement acquise ce qui explique des parasitémies plus élevées dans ces zones que dans les zones instables. Dans l'ensemble, le taux moyen d'hémoglobine était significativement plus élevé à Niore qu'à Dangassa ($p=0,03$). Dans les zones d'endémie palustre comme Dangassa, le phénotype clinique du paludisme est l'anémie, les individus développent une certaine immunité qui arrive à maintenir la parasitémie à un seuil sans manifestations cliniques mais n'empêche pas l'infection palustre responsable de la destruction progressive du globule rouge provoquant ainsi l'anémie dans ces zones comme rapporté dans une étude antérieure [94].

Les prévalences des mutations ont été déterminées dans les deux sites et leurs associations ont été analysées. Au total, 269 patients ont été recrutés (213 à Dangassa et 56 à Niore), dont 270 (113 à Dangassa et 36 à Niore) ont été génotypés. Les mutations les plus répandues étaient Pfcrt_I356T et les mutations Pffd_D193Y avec respectivement 46,4% et 4,3% à Dangassa contre 51% et 9,4% à Niore. La mutation Pfcrt_356T était la plus répandue dans notre population d'étude à Niore avec une prévalence de 51%, suivi respectivement de la mutation Pffd_193Y 9,4%, et la mutation Pfarps10_127M 2. Aucune mutation Pfmndr_484I et Pfarps10_128Y n'a été détectée à Niore du Sahel.

Toutes les mutations ont été détectées à Dangassa ce qui peut paraître alarmant, dans la mesure où toutes les mutations constitutives du fond génétique ont été retrouvées dans cette localité où la transmission est intense. La présence concomitante des mutations suscitées a été décrite chez les parasites résistants à l'artémisinine en Asie

[101] . Elle est désignée sous le nom de fond génétique de résistance à l'artémisinine. Ce fond ne procure pas la résistance en elle-même au parasite mais a été retrouvé chez les parasites résistants ce quel que soit leur origine géographique. Au cours de cette étude nous n'avons pas retrouvé ce fond génétique chez les isolats de parasite même si toutes les mutations constitutives du fond sont présentes. La plus forte accumulation de mutation a été retrouvée chez un isolat de Dangassa et elle était de trois (3) mutations sur les six (6). L'intensité de la transmission du paludisme à Dangassa semble favoriser cette accumulation et augmenterait donc le risque d'émergence de la résistance dans cette zone.

7. Conclusion et recommandations

7.1. Conclusion

Au terme de notre étude, nous avons constaté que les mutations les plus fréquemment rencontrées sont les mutations *Pffd_D193Y* et *Pfcr1_I356T*. La plus forte accumulation de mutations constitutives du fond génétique de résistance à l'artémisinine était de 3 mutations sur 6 retrouvées chez un isolat de parasite de Dangassa. Nous n'avons retrouvé aucun isolat de parasite arborant le fond génétique de résistance à l'artémisinine dans cette étude. Cependant toutes les mutations constitutives du fond ont été retrouvées de façon séparée à Dangassa, ce qui représente un risque d'émergence de la résistance à l'artémisinine dans cette localité.

7.2. Recommandations

Au terme de notre étude et vu nos résultats, nous pouvons formuler les recommandations suivantes :

Aux autorités sanitaires et administratives

- d'encourager et de financer d'avantage la recherche médicale afin d'adapter nos stratégies de lutte contre le paludisme aux réalités basées sur des évidences scientifiques.

Aux chercheurs

- de continuer la surveillance de la résistance à l'artémisinine dans les zones d'endémie palustre afin de prévoir l'apparition de l'émergence des souches résistantes ;

A la population

- d'accepter de participer aux protocoles de recherche afin de permettre aux chercheurs de tester les hypothèses de recherche pour trouver des solutions aux problèmes posés.

8. Limite de l'étude

Nous avons été limités dans cette étude par la taille de l'échantillon à Nioro du sahel malgré le caractère exhaustif de notre échantillonnage. Cette étude n'a pas étudié directement les marqueurs moléculaires de résistance à l'artémisinine associés au gène Kelch13. Il serait aussi intéressant d'évaluer la présence de ces marqueurs dans les localités d'étude et de vérifier si le fond génétique de résistance à l'artémisinine ci-dessus étudié reste valable dans le contexte africain.

9. Références bibliographiques

1. Dekel, E., et al., *Identification and classification of the malaria parasite blood developmental stages, using imaging flow cytometry*. *Methods*. **112**: p. 157-166.
2. Mace, K.E., P.M. Arguin, and K.R. Tan, *Malaria Surveillance - United States, 2015*. *MMWR Surveill Summ*. **67**(7): p. 1-28.
3. OMS, *Organisation Mondiale de la Sante: Rapport sur le Paludisme dans le Monde 2018*. 2018: p. 210.
4. Gil, J.P. and S. Krishna, *pfmdr1 (Plasmodium falciparum multidrug drug resistance gene 1): a pivotal factor in malaria resistance to artemisinin combination therapies*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. **15**(6): p. 527-543.
5. *Politique Nationale de lutte contre le Paludisme au Mali*. 2004. **19**: p. 9.
6. Olliaro, P.L. and W.R. Taylor, *Developing artemisinin based drug combinations for the treatment of drug resistant falciparum malaria: A review*. *J Postgrad Med*, 2004. **50**(1): p. 40-4.
7. White, N.J., et al., *Malaria*. *Lancet*. **383**(9918): p. 723-35.
8. Ojurongbe, O., et al., *Rapid detection of PfCRT and PfMDR1 mutations in Plasmodium falciparum isolates by FRET and in vivo response to chloroquine among children from Osogbo, Nigeria*. *Malar J*, 2007. **6**: p. 41.
9. Wongsrichanalai, C., et al., *Epidemiology of drug-resistant malaria*. *Lancet Infect Dis*, 2002. **2**(4): p. 209-18.
10. Chou, E.S., et al., *A high parasite density environment induces transcriptional changes and cell death in Plasmodium falciparum blood stages*. *FEBS J*. **285**(5): p. 848-870.
11. Young, K., et al., *Inverse associations of human leukocyte antigen and malaria parasite types in two West African populations*. *Infect Immun*, 2005. **73**(2): p. 953-5.
12. Mbengue, A., et al., *A molecular mechanism of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria*. *Nature*. **520**(7549): p. 683-7.
13. White, N.J., *Qinghaosu (artemisinin): the price of success*. *Science*, 2008. **320**(5874): p. 330-4.
14. Price, R.N. and F. Nosten, *Drug resistant falciparum malaria: clinical consequences and strategies for prevention*. *Drug Resist Updat*, 2001. **4**(3): p. 187-96.
15. Ariey, F., et al., *A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria*. *Nature*. **505**(7481): p. 50-5.
16. Adjui, M., et al., *Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis*. *Lancet*, 2004. **363**(9402): p. 9-17.
17. Denis, M.B., et al., *Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Cambodia*. *Trop Med Int Health*, 2006. **11**(9): p. 1360-6.
18. Ouji, M., et al., *Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies: A sword of Damocles in the path toward malaria elimination*. *Parasite*. **25**: p. 24.
19. White, N.J., et al., *Averting a malaria disaster*. *Lancet*, 1999. **353**(9168): p. 1965-7.
20. OMS, *Status report on artemisinin resistance and ACT efficacy (August 2018)*. 2018. **10**: p. 8.
21. Straimer, J., et al., *Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in Plasmodium falciparum clinical isolates*. *Science*. **347**(6220): p. 428-31.
22. Miotto, O., et al., *Genetic architecture of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*. **47**(3): p. 226-34.
23. Graves, P.M., et al., *Effects of transmission-blocking monoclonal antibodies on different isolates of Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*, 1985. **48**(3): p. 611-6.

24. Cohuet, A., et al., *Anopheles and Plasmodium: from laboratory models to natural systems in the field*. EMBO Rep, 2006. **7**(12): p. 1285-9.
25. Pierre Carnevale and V. Robert, *Les anopheles Biologie, Transmission du Plasmodium et lutte Antivectorielle*. 2017. **391**: p. 146-186.
26. Konate, L., et al., [*Biology of the vectors and transmission of Plasmodium falciparum, P. malariae and P. ovale in a village in the savanna of west Africa (Dielmo, Senegal)*]. Parasite, 1994. **1**(4): p. 325-33.
27. Rossati, A., et al., *Climate, environment and transmission of malaria*. Infez Med. **24**(2): p. 93-104.
28. Hanssen, E., et al., *Electron tomography of Plasmodium falciparum merozoites reveals core cellular events that underpin erythrocyte invasion*. Cell Microbiol. **15**(9): p. 1457-72.
29. bannister, L.H., hopkins J.M, *A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual Blood Stages*. science Direct, 2000. **16**(10): p. 427-433.
30. Karimi, A., et al., *A morphology-based method for the diagnosis of red blood cells parasitized by Plasmodium malariae and Plasmodium ovale*. Scand J Infect Dis. **46**(5): p. 368-75.
31. Van der Ploeg, L.H., et al., *Chromosome-sized DNA molecules of Plasmodium falciparum*. Science, 1985. **229**(4714): p. 658-61.
32. Bray, R.S. and P.C. Garnham, *The life-cycle of primate malaria parasites*. Br Med Bull, 1982. **38**(2): p. 117-22.
33. prevention), C.C.f.D.c.a., *Cycle biologique du Plasmodium spp. chez l'homme et chez le moustique selon le CDC (Centers for Disease control and prevention)* 2012.
34. Wright, G.J. and J.C. Rayner, *Plasmodium falciparum erythrocyte invasion: combining function with immune evasion*. PLoS Pathog. **10**(3): p. e1003943.
35. Langreth, S.G., P. Nguyen-Dinh, and W. Trager, *Plasmodium falciparum: merozoite invasion in vitro in the presence of chloroquine*. Exp Parasitol, 1978. **46**(2): p. 235-8.
36. Singh, S., et al., *Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites*. PLoS Pathog. **6**(2): p. e1000746.
37. G.H.Mitchell, L.H.B., *Malaria parasite invasion : Interactions with the red cell membrane*. Critical Reviews in oncology/ hematology, 1988. **8**(4): p. 255-310.
38. Eric Hanssen, P.J., *Cellular architecture og plasmodium falciparum infected erythrocytes*. International Journal For Parasitology, 2010. **40**(10): p. 1127-1135.
39. Miako Sakaguchi, O.K., *Three-dimensional analysis of morphological chandes in the malaria parasite infected red blood cell by serial block-face scannin electron microscopy*. Journal of structural biology, 2016. **193**(3): p. 162171.
40. Atkinson, C.T. and M. Aikawa, *Ultrastructure of malaria-infected erythrocytes*. Blood Cells, 1990. **16**(2-3): p. 351-68.
41. Weiss, G.E., et al., *Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes*. PLoS Pathog. **11**(2): p. e1004670.
42. White, N.J., T.T. Hien, and F.H. Nosten, *A Brief History of Qinghaosu*. Trends Parasitol. **31**(12): p. 607-610.
43. Mazier, D. and M. Thellier, [*Youyou Tu, from Mao Zedong to the Nobel Prize*]. Med Sci (Paris). **32**(1): p. 106-9.
44. Eastman, R.T. and D.A. Fidock, *Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(12): p. 864-74.
45. Woodrow, C.J., R.K. Haynes, and S. Krishna, *Artemisinins*. Postgrad Med J, 2005. **81**(952): p. 71-8.
46. Nosten, F. and N.J. White, *Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(6 Suppl): p. 181-92.

47. Lai, H., et al., *Effects of artemisinin-tagged holotransferrin on cancer cells*. Life Sci, 2005. **76**(11): p. 1267-79.
48. Efferth, T., et al., *Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(2): p. 382-94.
49. B, B. and W. B., *Reflexion autour de la culture d'Artemisia annua et de la production d'artémisinine*. **6**: p. 3.
50. Basco, L. and P. Ringwald, [*Drug-resistant malaria: problems with its definition and technical approaches*]. Sante, 2000. **10**(1): p. 47-50.
51. Kobasa, T., et al., *Emergence and Spread of kelch13 Mutations Associated with Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Parasites in 12 Thai Provinces from 2007 to 2016*. Antimicrob Agents Chemother. **62**(4).
52. Bruce-Chwatt, L.J., *Lessons learned from applied field research activities in Africa during the malaria eradication era*. Bull World Health Organ, 1984. **62 Suppl**: p. 19-29.
53. Gautam, A., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of endoperoxide antimalarials*. Curr Drug Metab, 2009. **10**(3): p. 289-306.
54. Zhang, S. and G.S. Gerhard, *Heme mediates cytotoxicity from artemisinin and serves as a general anti-proliferation target*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7472.
55. Huang, X.J., et al., *Dihydroartemisinin exerts cytotoxic effects and inhibits hypoxia inducible factor-1alpha activation in C6 glioma cells*. J Pharm Pharmacol, 2007. **59**(6): p. 849-56.
56. Loor, G. and P.T. Schumacker, *Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 686-90.
57. Mercer, A.E., *The role of bioactivation in the pharmacology and toxicology of the artemisinin-based antimalarials*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2009. **12**(1): p. 125-32.
58. Selmececi, K., et al., *Alkylation of human hemoglobin A0 by the antimalarial drug artemisinin*. FEBS Lett, 2004. **556**(1-3): p. 245-8.
59. Ma, Q., *Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. **53**: p. 401-26.
60. Klonis, N., et al., *Altered temporal response of malaria parasites determines differential sensitivity to artemisinin*. Proc Natl Acad Sci U S A. **110**(13): p. 5157-62.
61. Tucker, M.S., et al., *Phenotypic and genotypic analysis of in vitro-selected artemisinin-resistant progeny of Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother. **56**(1): p. 302-14.
62. Mok, S., et al., *Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum is associated with an altered temporal pattern of transcription*. BMC Genomics. **12**: p. 391.
63. Fairhurst, R.M., *Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes*. Curr Opin Infect Dis. **28**(5): p. 417-25.
64. Talundzic, E., et al., *Selection and spread of artemisinin-resistant alleles in Thailand prior to the global artemisinin resistance containment campaign*. PLoS Pathog. **11**(4): p. e1004789.
65. Ashley, E.A., et al., *Spread of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria*. N Engl J Med. **371**(5): p. 411-23.
66. Imwong, M., et al., *Exploring the contribution of candidate genes to artemisinin resistance in Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother. **54**(7): p. 2886-92.
67. Duraisingh, M.T. and A.F. Cowman, *Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance*. Acta Trop, 2005. **94**(3): p. 181-90.
68. Takala-Harrison, S., et al., *Independent emergence of artemisinin resistance mutations among Plasmodium falciparum in Southeast Asia*. J Infect Dis. **211**(5): p. 670-9.
69. Intharabut, B., et al., *Artemisinin Resistance and Stage Dependency of Parasite Clearance in Falciparum Malaria*. J Infect Dis.

70. Takala-Harrison, S., et al., *Genetic loci associated with delayed clearance of Plasmodium falciparum following artemisinin treatment in Southeast Asia*. Proc Natl Acad Sci U S A. **110**(1): p. 240-5.
71. Adams, J., R. Kelso, and L. Cooley, *The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(1): p. 17-24.
72. Djuika, C.F., et al., *Knockout of the peroxiredoxin 5 homologue PFAOP does not affect the artemisinin susceptibility of Plasmodium falciparum*. Sci Rep. **7**(1): p. 4410.
73. Ngalah, B.S., et al., *Analysis of major genome loci underlying artemisinin resistance and pfmdr1 copy number in pre- and post-ACTs in western Kenya*. Sci Rep. **5**: p. 8308.
74. Price, R.N., et al., *Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number*. Lancet, 2004. **364**(9432): p. 438-447.
75. Sisowath, C., et al., *In vivo selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem)*. J Infect Dis, 2005. **191**(6): p. 1014-7.
76. Kimura, M., et al., *Cloning of a Ca(2+)-ATPase gene of Plasmodium falciparum and comparison with vertebrate Ca(2+)-ATPases*. J Cell Sci, 1993. **104 (Pt 4)**: p. 1129-36.
77. Nagamune, K. and L.D. Sibley, *Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa*. Mol Biol Evol, 2006. **23**(8): p. 1613-27.
78. Toyoshima, C., H. Nomura, and Y. Sugita, *Structural basis of ion pumping by Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum*. FEBS Lett, 2003. **555**(1): p. 106-10.
79. Ma, H., et al., *Functional and structural roles of critical amino acids within the "N", "P", and "A" domains of the Ca2+ ATPase (SERCA) headpiece*. Biochemistry, 2005. **44**(22): p. 8090-100.
80. Wuytack, F., L. Raeymaekers, and L. Missiaen, *Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps*. Cell Calcium, 2002. **32**(5-6): p. 279-305.
81. Nagamune, K., W.L. Beatty, and L.D. Sibley, *Artemisinin induces calcium-dependent protein secretion in the protozoan parasite Toxoplasma gondii*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(11): p. 2147-56.
82. Toyoshima, C. and G. Inesi, *Structural basis of ion pumping by Ca2+-ATPase of the sarcoplasmic reticulum*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 269-92.
83. Uhlemann, A.C., et al., *A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(7): p. 628-9.
84. Henriques, G., et al., *Directional selection at the pfmdr1, pfcr1, pfubp1, and pfap2mu loci of Plasmodium falciparum in Kenyan children treated with ACT*. J Infect Dis. **210**(12): p. 2001-8.
85. Traub, L.M., *Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(9): p. 583-96.
86. Rappoport, J.Z., et al., *Dynamics of clathrin and adaptor proteins during endocytosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(5): p. C1072-81.
87. Ni, Y.X., et al., *A new role of anterograde motor Kif5b in facilitating large clathrin-coated vesicle mediated endocytosis via regulating clathrin uncoating*. Cell Discov. **4**: p. 65.
88. Bonifacino, J.S. and L.M. Traub, *Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 395-447.
89. Zhang, Z., et al., *Regulation of the stability of P-glycoprotein by ubiquitination*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(3): p. 395-403.
90. Ibraheem, Z.O., et al., *Role of Different Pfcr1 and Pfmdr-1 Mutations in Conferring Resistance to Antimalaria Drugs in Plasmodium falciparum*. Malar Res Treat. **2014**: p. 950424.
91. Cooper, R.A., 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, 2007. **63**(1): p. 270-82.

92. Pulcini, S., et al., *Mutations in the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter, PfCRT, enlarge the parasite's food vacuole and alter drug sensitivities*. Sci Rep. **5**: p. 14552.
93. Sanchez, C.P., W.D. Stein, and M. Lanzer, *Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol, 2007. **23**(7): p. 332-9.
94. Amaratunga, C., et al., *Plasmodium falciparum founder populations in western Cambodia have reduced artemisinin sensitivity in vitro*. Antimicrob Agents Chemother. **58**(8): p. 4935-7.
95. Phyto, A.P., et al., *Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study*. Lancet. **379**(9830): p. 1960-6.
96. Zhang, L., et al., *Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5847-51.
97. Oyola, S.O., et al., *Whole genome sequencing of Plasmodium falciparum from dried blood spots using selective whole genome amplification*. Malar J. **15**(1): p. 597.
98. Manske, M., et al., *Analysis of Plasmodium falciparum diversity in natural infections by deep sequencing*. Nature. **487**(7407): p. 375-9.
99. *Republique du Mali Enquete demographique et de Sante 2018*. 2018. **61**: p. 41.
100. S.Dioufa, et al., *Prévalence et déterminants de l'anémie chez le jeune enfant en Afrique francophone – Implication de la carence en fer*. 2015: p. 1188-1197.
101. He, Y., et al., *Artemisinin resistance-associated markers in Plasmodium falciparum parasites from the China-Myanmar border: predicted structural stability of K13 propeller variants detected in a low-prevalence area*. PLoS One. **14**(3): p. e0213686.

10. Annexes

10.1. Détermination du taux d'hémoglobine

Le taux d'hémoglobine a été mesuré par l'appareil HemoCue Hb201+ microcuvette



Figure 17. Analyseur et Microcuvette HemoCue

Source : www.hemocue.com

✓ Principe de la méthode

La réaction dans la microcuvette repose sur une réaction modifiée de formation d'azoture de méthémoglobine. Les érythrocytes sont hémolysés pour libérer l'hémoglobine. L'hémoglobine est convertie en méthémoglobine, laquelle réagit avec de l'azoture pour donner de l'azoture de méthémoglobine dont l'absorbance est mesurée dans l'analyseur. Cette absorbance est directement proportionnelle à la concentration de l'Hb.

- ✓ Matériel et réactifs
- Appareil analyseur
- Microcuvette HemoCue
- Lancette
- Alcool 70°C

- Coton
- ✓ Technique

-cibler un doigt, bien désinfecté avec le tampon d'alcool à 70°;

-piquer en un coup sec avec une lancette ; nettoyer la première goutte de sang, presser le bout du doigt pour avoir une deuxième goutte ;

-Appliquer la microcuvette sur la goutte de sang. La quantité nécessaire est aspirée automatiquement dans la microcuvette par capillarité.

-Après avoir enlevé minutieusement toute trace de sang présente à la surface de la microcuvette, la mettre sur son support et l'insérer ensuite dans le photomètre. Le résultat est exprimé en gramme d'hémoglobine par décilitre de sang (g/dl).



Figure 18. Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+

Source : www.hemocue.com

10.2. Technique de goutte épaisse

- ✓ Principe

C'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang et l'identification des différentes espèces (frottis sanguin).

Taux d'hémoglobine

- ✓ Matériel

Deux (2) lames porte-objet propres et bien dégraissées, vaccinostyle stérile, alcool 70°, colorant de Giemsa pur, coton hydrophile sec, eau tamponnée (PH=7,2), boîte à lames, chiffon de coton propre, crayon noir à mine grasse ou marqueur indélébile, stylo à bille,

bacs de coloration, éprouvette graduées, râtelier, chronomètre, huile d'immersion, registre ou formulaire de notification, un compteur manuel et gant.

✓ Lieu du prélèvement

Face latérale à l'extrémité d'un doigt (en général gauche, 3^e doigt après le pouce), sur le lobe de l'oreille après avoir réchauffé avec les doigts, au niveau du talon ou gros orteil chez le nourrisson.

✓ Réalisation de la goutte épaisse

Après avoir noté les renseignements relatifs sur le formulaire ou le registre approprié, ainsi que l'identité du patient sur la lame, réaliser la goutte comme suite :

- En tenant la main gauche du malade la paume tournée vers le haut, choisir le troisième doigt après le pouce (le gros orteil peut être utilisé chez les nourrissons. Le pouce ne doit jamais être utilisé chez les adultes ou les enfants) ;
- Avec un tampon de coton légèrement imbibé d'alcool, nettoyer le doigt en appuyant fermement pour enlever la saleté et la graisse du bout du doigt ;
- Avec le chiffon de coton propre, essuyer le doigt en appuyant fermement pour stimuler la circulation du sang ;
- Avec un vaccinostyle stérile, piquer le bout du doigt d'un seul geste ;
- Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec. S'assurer qu'il ne reste pas de fibres de coton sur le doigt, qui pourraient se mélanger au sang ;
- Appuyer doucement sur le doigt et recueillir une petite goutte de sang au milieu de la lame (**cf. figure 18**) ;
- Essuyer le sang restant sur le bout du doigt avec un tampon de coton ;
- Tenir la lame supérieure par les bords ;
- Placer le coin de l'autre lame au centre de la goutte de sang ;
- Étendre légèrement la surface de la goutte par des mouvements spirales appuyés de la lame (**cf. figure 18**) ;
- Assurer cette défibrination mécanique pendant quelques secondes et étendre la goutte sur environ 1 cm de diamètre ;

- Laisser la préparation à plat, à l'abri de la poussière, de la chaleur et des mouches pendant deux heures en zone sahélienne. Respecter ce long temps de séchage sinon il y a risque de décollement de la préparation lors de la coloration (cf. figure 18).

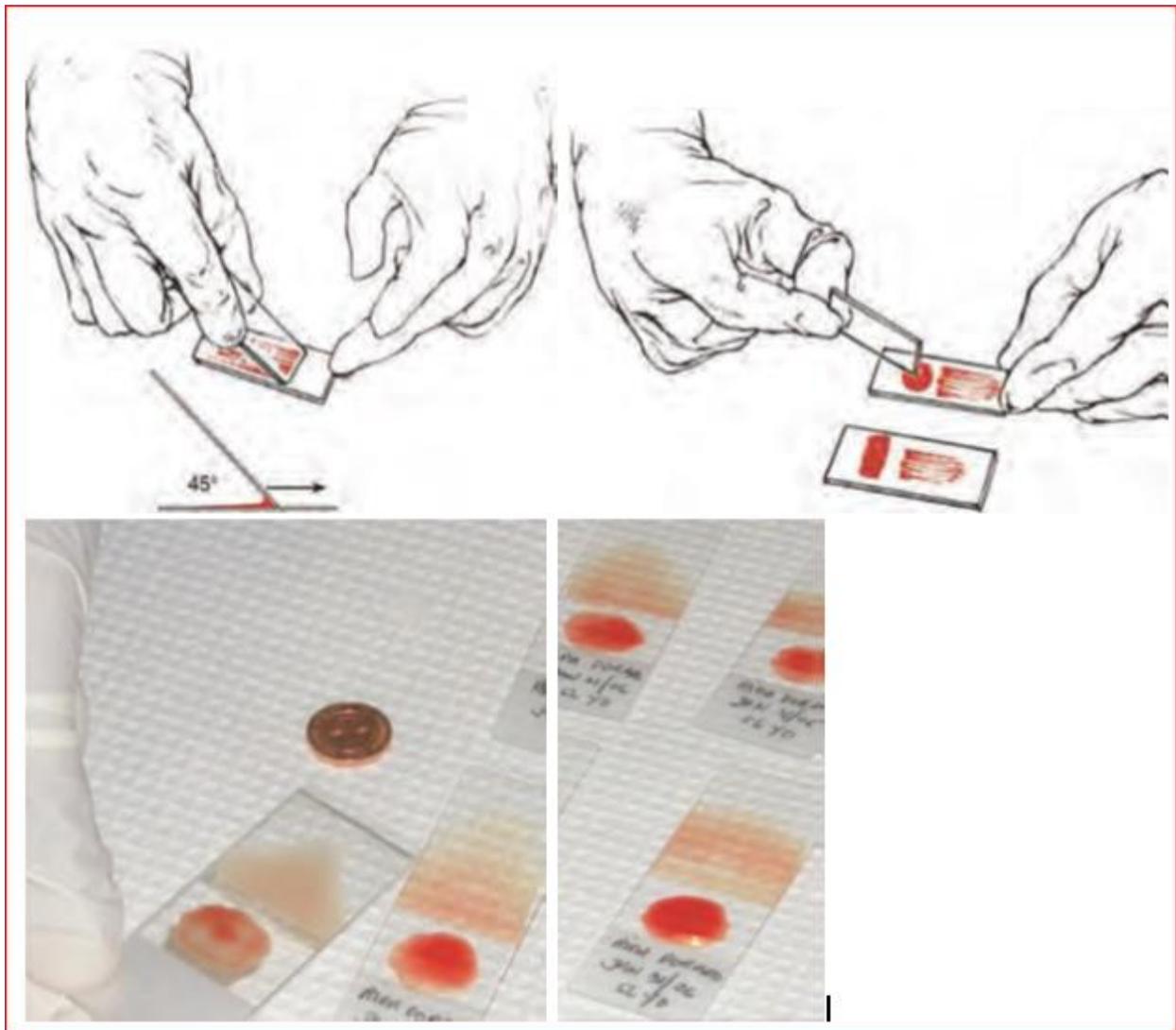


Figure 19. Technique de la goutte épaisse

Source :

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/164472/9789242547825_fre.pdf;jsessionid=E91A5F3B156FD17C40C695BEED177FFB?sequence=1

✓ Coloration au Giemsa

C'est une méthode de coloration classique employée en routine pour la coloration des étalements sanguins et pour le diagnostic du paludisme.

Toujours maintenir la bouteille bien fermée dans un endroit frais, à l'abri de la lumière solaire directe. Les bouteilles en verre blanc peuvent être recouvertes d'une enveloppe de papier noir épais pour les protéger de la lumière.

- Fixer le frottis mince en le tapotant doucement avec un tampon de coton imbibé de méthanol, ou en le trempant dans un récipient de méthanol pendant quelques secondes.
- Préparer la solution de Giemsa à 3 ou 5 dans l'eau tamponnée (ph 7,2) et bien mélanger le colorant ;
- Verser doucement le colorant dans la bague jusqu'à ce que la lame soit entièrement recouverte ;
- Laisser colorer pendant 30 à 45 mn pour 30 (15mn pour 10), à l'abri de la lumière solaire et de la poussière ;
- Les lames sont ensuite rincées et séchées sur un râtelier.

✓ Aspects

La lecture se fait au microscope à l'objectif 100 à l'huile d'immersion

- Le fond doit être propre, exempt de débris, coloré en bleu ;
 - Les noyaux des leucocytes sont en violet foncé ;
 - Les parasites du paludisme sont bien définis, avec une chromatine rouge foncée et un cytoplasme bleu pale. Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, on peut voir un semis de granulations de Schuffner dans le fantôme de l'érythrocyte hôte, en particulier sur les bords du frottis.
- ✓ Méthodes de numération des parasites du paludisme dans les gouttes épaisses

On trouvera ci-dessous une méthode pratique de précision suffisante. Elle consiste à dénombrer les parasites par μl de sang dans un frottis épais, par rapport à un nombre prédéterminé de leucocytes. On prend comme norme une moyenne de 7 500

leucocytes par μl de sang Malgré l'imprécision due aux variations du nombre de leucocytes parmi des personnes en bonne santé et aux variations encore plus grandes observées chez les malades, cette valeur permet des comparaisons valables. Avant de commencer à compter, on examinera l'équivalent de 0,25gr de sang (environ 100 champs, avec un oculaire 7 X (ou 10X) et un objectif à immersion dans l'huile 100X) dans le frottis épais pour déterminer l'espèce de parasite et les stades présents. Ensuite, on appliquera la méthode suivante qui convient pour les frottis positifs :

1. Un compteur manuel à 4 chiffres est nécessaire pour dénombrer séparément les parasites et les leucocytes.

2. a) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié 10 parasites ou plus, noter les résultats sur le formulaire de notification, en indiquant le nombre de parasites par 300 leucocytes.

b) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié neuf parasites ou moins, continuer de compter jusqu'à 500 leucocytes et noter le nombre de parasites par 500 leucocytes.

3. Dans chaque cas, le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes peut être converti en nombre de parasites par μl par la simple formule mathématique suivante :

$$\frac{\text{Nombre de parasites} \times 7500}{\text{Nombre de leucocytes}} = \text{parasites par } \mu\text{l}$$

10.3. Technique ELISA

➤ Matériel et réactifs

-Matériel - Machine de lavage des plaques d'ELISA (ELISA Ultrawash ELISA Plus, Dynex Technologies),

- Lecteur de microplaques, (Spectramax 340PC Molecular Devices) - Agitateur (Daigger Vortex Genie 2, A Daigger & Co., Inc, Cat # 22220A ou équivalent) - Pipetboy, Integra Biosciences, ou l'équivalent,

- Agitateur Magnétique muni de système de chauffage (modèle PC-420 ou l'équivalent)
- Micropipette multicanal 50-300µl, 5-50 µl,
- Micropipette 2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl,
- Microplaque à fond plat
- Plaques de dilution ELISA 2ml,
- bassin de solution pour les micropipettes multicanaux, - Embout de micropipette jetables de 1000µl, 200µl, 20µl, 10µl et 2µl,
- Flacon Erlenmeyer stérile jetable 250 ml,
- Tubes coniques jetables avec bouchon à vis stérile 50 ml et 15 ml - Tubes coniques jetables avec bouchon à vis stérile 15 ml, Stardsted # 62.554.00 - filtre de stérilisation à usage unique 0,2 µm, 150ml, la société Nalgen© 155-0020, ou équivalent,
- Tube Eppendorf 1,5 ml,
- Barreaux magnétiques,
- Feuille d'aluminium,
- Mouchoir de nettoyage jetable,
- Eprouvettes graduées, 100ml, 500ml, 1000ml,
- gants stériles
- Chronomètre approprié pour mesurer 20 min à 2 heures d'intervalle

➤ **Réactifs**

- Antigène de revêtement,
- Sérum (E.1: 1000),
- Carbonate de Sodium,
- Bicarbonate de sodium,
- Trinitrite de sodium (N3Na),

- eau déminéralisée purifiée, des fournitures de laboratoire, - Eau distillée,
- Lait,
- Solution tampon Tris (TBS) 10X,
- Comprimé de substrat pour la Phosphatase alcaline, - Tween-20,
- glycérol ultra pur,
- Anticorps de chèvre anti-IgG humain marqué avec la Phosphatase alcaline,

➤ **Préparation des solutions**

- Tampon de revêtement (10X) : (Carbonate de Sodium 0.15M + Bicarbonate de sodium 0.35M), pH = 9,6,

Pour préparer 1000 ml de Tampon de revêtement (10X), dissoudre 15.74g du carbonate de sodium (Na) $2CO_3$ et 29.4g de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) dans 1000 ml d'eau distillée.

* Note : Pour préparer une solution 1X à partir d'une solution 10X mélangée à 100ml solution 10X et 900 ml d'eau distillée. - Tampon de lavage : 0,1% de Tween-TBS.

Pour 1000 ml de tampon de lavage, mélanger 100 ml TBS (10x), 900 ml eau distillée et 1ml de Tween-20. Mélanger avec un agitateur magnétique pendant au moins 20 min à température ambiante avant utilisation.

- Tampon de Dilution / Blocage : 5% de lait dans du TBS (1X).

Pour préparer 300 ml de Tampon de dilution/blocage, mélanger 15g lait écrémé en poudre et 300 ml de TBS (1x) dans un Erlenmeyer sur l'agitateur magnétique pendant 20 minutes ou jusqu'à dissolution complète. Conserver à 4 ° C pour un maximum de cinq jours. Facultatif :

1) faire des aliquotes de 50 ml pour préparer du blocage / tampon dilution et conserver à -20°C

2) Ajouter le trinitride de Sodium (0,01% final) au tampon de Dilution/ de la manière suivante et le lait peut être stocké pendant 2-3 semaines.

Pour obtenir le tampon de dilution/ blocage (1x) au trinitride de Sodium (0,01%): Mélanger 500 ml de tampon Dilution/ blocage (1x) et 2,5 ml de Trinitride de Sodium à 2%. Le tampon de dilution/ blocage (1x) au trinitride de Sodium doit être gardé dans l'obscurité.

- glycérol (50%) pour la dilution secondaire des anticorps : mélanger 5 ml glycérol (100%) et 5 ml d'eau distillée. Stériliser par filtration et le garder en aliquotes de 1.5 ml à -20°C.

- solution d'anticorps secondaire :

Note : * Les lyophilisés des anticorps secondaires sont reconstitués à 1 mg/ml avec 50% dans du glycérol (50%) et stockés à -20°C.

Mélanger 10 µl de la solution d'anticorps secondaires marqués avec de la phosphatase alcaline (1mg/ml) avec 10 ml de du Tampon de dilution/ blocage (1x). Cette solution peut être préparée pendant que les plaques sont en incubation avec les anticorps primaires.

➤ **Solution de substrat**

Pour 10 ml de solution de substrat, dissoudre 2 comprimés de substrat Phosphatase dans du tampon de revêtement (1x). Utiliser 10 ml de solution de substrat par plaque. Cette solution doit être Préparée juste avant la fin de l'incubation avec les anticorps secondaires.

➤ **Procédures**

Revêtement des plaques avec l'antigène

* Note : Les plaques revêtu avec l'antigène doivent être conservées à 4°C et doivent être utilisées dans un délai d'une semaine.

- Identifier chaque plaque avec le nom de l'antigène et la date de revêtement avec marqueur indélébile sur le côté de la plaque.
- Le revêtement de chaque plaque nécessite 10 ml de solution de revêtement. Déterminer le volume total de solution de revêtement nécessaire pour revêtir le nombre de plaques Utilisées.
- Diluer l'antigène de revêtement dans le tampon de revêtement (1x) à une concentration de 1µg/ml dans un tube de 50 ml ou un Erlenmeyer de 250 ml. La dilution souhaitée de l'antigène est déterminée par la concentration de la solution mère d'antigène.
- Mélanger la solution en retournant le tube ou le flacon, puis versez la solution dans le bassin de solution pour micropipette multicanal.
- En utilisant une micropipette multicanale, mettre chaque puits 100 µl de la solution de revêtement.
- empilez soigneusement les plaques en utilisant une plaque vide comme fermeture de l'autre, et les envelopper dans une pellicule en plastique ou en aluminium. Laissez les plaques pendant au moins une nuit au réfrigérateur à 4 °C.

➤ **Plaques de blocage**

- Prendre un nombre désiré de plaques du réfrigérateur. Marquer chaque plaque avec un marqueur indélébile.
- Laver les plaques à l'aide de la machine de lavage des plaques ELISA ((ELISA Ultrawash ELISA Plus, Dynex Technologies). Prendre soin de s'assurer que les plaques ne sont pas complètement séchées avant d'ajouter le tampon de blocage. - A l'aide d'une pipette multicanal, mettre dans chaque puits 200 µl de tampon de blocage et de placer les plaques dans la chambre humidifiée (Square BioAssay-vaisselle) ou les couvrir d'une pellicule en plastique et laisser pendant 2 heures 15min à température ambiante.

- Laver les plaques. Remplir les plaques avec le tampon de lavage si les anticorps primaires ne sont pas prêts à être appliqués immédiatement.

- Mettre les plaques dans une chambre humidifiée jusqu'à ce que les anticorps primaires soient prêts à être appliqués.

Préparation des sérums à tester et préparation des plaques

* NOTE: 24 sérums en triple exemplaire, à une seule dilution peuvent être testés sur une plaque.

Sérum standard de dilution. Une série de dilution en double exemplaire, des sérums de référence sont inclus dans chaque plaque d'ELISA.

➤ **Application des anticorps primaire (sérums)**

- Veiller à ce que toutes les plaques revêtues, les plaques de dilution des sérums test et les plaques de sérums standard soient disponibles et à la température ambiante. Régler le volume de deux pipettes (STANDARD et TEST) multicanaux 50-300 µl à 100 µl

- Régler le chronomètre à 2 heures.

- A l'aide de la pipette multicanal TEST, mélanger le contenu des puits de la ligne A de la plaque de dilution et ensuite transférer 100 µl dans les puits de la ligne A de la plaque ELISA correspondante. Ne pas changer d'embout, utiliser le même embout pour l'ensemble des trois rangées A, B et C. Mélanger le contenu des puits de la ligne B de la plaque de dilution et transférer 100 µl dans les puits de la ligne B de la plaque ELISA correspondante. Mélanger le contenu des puits de la ligne C de la plaque de dilution et transférer 100 µl dans les puits de la ligne C de la plaque ELISA correspondante.

- Changer les embouts. A l'aide de la pipette multicanal "TEST", mélanger le contenu des puits de la ligne D de la plaque de dilution et ensuite transférer 100 µl dans les puits de la ligne D de la plaque ELISA correspondante. Ne changer pas l'embout, utiliser le même embout pour l'ensemble des trois rangées D, E et F. Changer les embouts, mélanger le contenu de la ligne G de la plaque de dilution et ensuite transférer 100 µl de la ligne E de la plaque ELISA correspondante. Mélanger le contenu de la ligne H de

la plaque de dilution et ensuite transférer de 100 µl dans les puits de la ligne F de la plaque ELISA correspondante. - Lorsque 6 lignes de la première plaque ELISA ont été pourvus, en utilisant la micropipette "STANDARD", et en prenant soin que la pipette est toujours utilisée dans la même orientation, transférer 100 µl d'une rangée de la plaque de dilution standard à la ligne G de la plaque ELISA. Sans changer d'embout, transférer 100 µl des puits de la ligne suivante de la plaque de dilution standard aux puits de la ligne H de la plaque ELISA.

- Premier démarrer le chronomètre et mettre la plaque ELISA dans une chambre humide. - Le temps d'incubation des sérums (anticorps primaires) est de 2 heures à la température ambiante.

➤ **Lavage et application des anticorps secondaires**

- Pendant l'incubation avec les anticorps primaires, réorganiser les plaques dans la chambre humide de sorte que la première plaque soit plus accessible, seconde suivante, etc. Préparer anticorps secondaires. Veiller à ce que la machine de lavage des plaques soit allumée et qu'un volume suffisant de tampon de lavage soit préparé.

- A 2 heures commencer à laver la plaque. Dès que la plaque est lavée, régler le chronomètre à 2 heures et ajouter 100 µl de dilution des anticorps secondaires dans chaque puits, en utilisant les micropipettes multicanales de 50-300 µl. Démarrer le chronomètre

- Le temps d'incubation des anticorps secondaires est de 2 heures à la température ambiante.

➤ **Lavage et l'addition du substrat**

- Pendant l'incubation avec un anticorps secondaire, au moins 30 minutes avant la fin de l'incubation, allumer le lecteur de la plaque ELISA (SpectraMAX ELISA Reader). À 10 minutes avant la fin de l'incubation préparer la solution de substrat. A la fin de l'incubation (2 heures) commencer à laver la plaque,

- Régler le chronomètre à 20 minutes. Dès que la plaque est lavée, s'assurer que le fond de la plaque est propre (essuyer soigneusement avec un tissu si nécessaire). En utilisant une micropipette multicanale, ajouter 100 µl de substrat par puits. Démarrer le Chronomètre. Recouvrir la plaque avec du papier aluminium. Lecture des plaques ELISA

- A la fin des 20 minutes, lire la plaque à 405 nm sur SpectraMAX ELISA Reader. Le lecteur doit être programmé pour agiter la plaque pendant 5 secondes avant de lire. - Enregistrer les données sous forme de fichier PDF.

9.4. Mesure des taux de cytokines

Les taux sériques des cytokines IL-6, IL-10, IFN-γ et TNF ont été quantifiés par cytométrie de flux en utilisant le BD IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF Human Flex Set (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, Ca, USA) selon les instructions fournies par le fabricant. Ces analyses ont été faites au LMVR avec l'aide de nos collaborateurs américains.

Les analyses de données ont été réalisées à l'aide du logiciel FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Les concentrations de cytokines dans chaque échantillon ont été déterminées à partir de courbes standard. Les concentrations plasmatiques de cytokines pour chaque échantillon ont été extrapolées à partir de la courbe standard et les données ont été exprimées en pg/mL.

9.5. Détermination du taux des anticorps IgG et IgM

Les anticorps IgG et IgM acquis naturellement contre rPfRON12 ont été mesurés dans les échantillons de sérum par dosage immuno-enzymatique direct (ELISA). Des échantillons de plasma provenant d'individus infectés (n = 93) et non infectés (n = 97) de Thaïlande et d'individus infectés de Kéniéroba (n = 124) ont été testés pour la présence d'anticorps IgG contre rPfRON12. Les mêmes groupes ont été évalués pour la présence d'anticorps IgM dirigés contre le rPfRON12, comme suit : individus infectés de Thaïlande (n = 56), individus non infectés de Thaïlande (n = 97), et les individus

infectés de Kéniéroba (n = 68). Des échantillons provenant de personnes non infectées d'une région non endémique ont été utilisés comme témoins négatifs (n = 21).

Des plaques ELISA à 96 puits à liaison protéique élevée ont été enduites de 50 µL de rPfRON12 à 5 µg/ml dans du bicarbonate carbonate 0,05 M, pH 9,6, pendant la nuit à 4°C. Ensuite, des échantillons de plasma (100 µL) dilués à 1:100 ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 1h à température ambiante. Pour la détection des anticorps liés, les échantillons ont été incubés avec une dilution de 1:2000 d'IgG ou d'IgM antihumaines de chèvre conjuguées à la peroxydase (Sigma). La densité optique (OD) a été mesurée à 490 nm à l'aide de l'analyse des données CLARIOstar®.

Afin d'éviter un biais dans les résultats causé par la réactivité possible de l'étiquette GST lors de l'expression des protéines, l'excès de taille de bande a été mesuré sur le gel SDS PAGE avec ImageJ. Pour calculer l'excédent de protéines, les plaques ont été enduites de GST. Les valeurs obtenues dans chaque réaction de l'échantillon à la GST ont été soustraites de la valeur obtenue dans la réaction contre PfRON12.

Toutes les plaques testées ont été normalisées en utilisant les valeurs des contrôles anti-GST (4 puits par plaque). La valeur limite a été calculée comme étant la moyenne plus trois écarts-types du témoin négatif. Les indices de réactivité (RI) ont été obtenus à partir du rapport des valeurs d'absorbance de chaque échantillon et de la valeur limite. La prévalence des IgG et des IgM contre l'antigène rPfRON12 était considérée comme positive si les valeurs (RI) étaient supérieures à 1,0. La détection des sous-classes d'IgG a été effectuée comme indiqué ci-dessus, à l'exception des IgG1 (HRP), IgG2 (HRP), IgG3 (HRP) et IgG4 (HRP) spécifiques des anticorps monoclonaux secondaires anti-humains (Abcam) dilués au 1:2000. Les résultats ont été exprimés en $RI \pm SEM$ (erreur-type de la moyenne) (cf. annexe4).

9.6. Caractérisation et méthode de localisation du PfRON12

Le PfRON12 recombinant a été exprimé avec succès dans les cellules STAR d'E. coli comme protéine de fusion GST. La pureté et la qualité de la protéine recombinante ont été vérifiées par SDS-PAGE, qui a révélé une seule bande d'environ 56 kDa. La protéine recombinante générée (rPfRON12) a été reconnue par le plasma de patients

infectés par *P. falciparum*, confirmant son immuno-réactivité. Ces analyses ont été faites avec nos collaborateurs japonais.

Pour caractériser PfRON12, nous avons d'abord généré un PfRON12 recombinant fusionné à la GST comme décrit [8]. Brièvement, un fragment codant pour PfRON12 mais dépourvu du peptide signal (PF3D7_1017100 : positions des acides aminés [aa] 26-310) a été amplifié par PCR à partir d'ADNc obtenu à partir de schizonte *P. falciparum* 3D7 en utilisant une amorce de détection avec le site XhoI et une amorce antisens avec le site NotI (PfRON12-F1 : 5'-ctcgagAAGACACAACA AAAAAAATGAAGGAATTATTG-3', PfRON12-R1 : 5'- gcggccggcCTAT TCTTGTGTTAAATCGGGAAACGTTCTC-3'). Le fragment d'ADN amplifié a été cloné dans le plasmide pEU-E01-GST-TEV-MCS-N2 (CellFree Sciences, Matsuyama, Japon) et GST-PfRON12 a été exprimé en utilisant le système de traduction sans germes de blé (CellFree Sciences). Le GST-PfRON12 exprimé (Fig. 7A, pointe de flèche de la ligne 1, environ 70 kDa) a été purifié par affinité à l'aide de la colonne Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare, Camarillo, CA, USA) et la fraction PfRON12 purifiée a été éluée par clivage sur colonne avec la protéase AcTEV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Fig. 1A, flèche voie 5, environ 40 kDa).

Pour produire des antisérums PfRON12, 250 µg de PfRON12 purifié avec l'adjuvant complet de Freund ont été utilisés pour immuniser par voie sous-cutanée un lapin blanc japonais. Deux rappels de 250 µg du PfRON12 avec l'adjuvant incomplet de Freund ont ensuite été administrés à intervalles de 3 semaines. L'antisérum a été prélevé 14 jours après la dernière vaccination. Le travail sur les animaux a été effectué par Kitayama Labes (Ina, Japon) conformément aux directives basées sur la "Charte pour le bien-être des animaux de laboratoire" (Japanese Society for Laboratory Animal Resources). La spécificité des anticorps anti-PfRON12 a été examinée par Western blotting à l'aide de 106 extraits de parasites riches en schizontes provenant de *P. falciparum* 3D7 en culture [9]. L'analyse immunoblot a détecté une seule bande à environ 40 kDa dans des conditions réductrices (Fig. 7B, pointe de flèche de la ligne R), ce qui concorde avec les données avec le poids moléculaire prédit. En revanche, les anticorps anti-PfRON12 ont reconnu une seule bande à environ 80 kDa dans des conditions non réductrices (Fig.

7B, flèche NR), ce qui suggère que le PfRON12 natif forme un multimère à liaison disulfure. Ces résultats indiquent que les anticorps anti-PfRON12 du lapin reconnaissent spécifiquement le PfRON12 natif.

(A) Analyse SDS-PAGE des protéines exprimées par le système sans cellules germinales du blé. Le mélange de protéines a été séparé par des gels de polyacrylamide SDS à 12,5% (SDS-PAGE) dans des conditions réductrices et coloré avec du bleu brillant Coomassie. Les échantillons de chaque ligne étaient les suivants : mélange réactionnel total (ligne 1), fractions surnageantes et précipitées après une brève centrifugation (lignes 2 et 3, respectivement), protéines non liées et purifiées par affinité (lignes 4 et 5, respectivement), protéine adsorbée restant sur la matrice d'affinité (ligne 6), et marqueur du poids moléculaire des protéines (ligne M). Les produits à base de PfRON12 fusionné à la GST et les protéines purifiées avec digestion par protéase AcTEV sont indiqués respectivement par une tête de flèche et une flèche. La GST clivée restée sur la matrice d'affinité est indiquée par une flèche en pointillés.

(B) Analyses par transfert Western utilisant des antisérums contre PfRON12. Dans chaque ligne, les protéines extraites par le tampon de chargement SDS-PAGE d'environ 10^6 *P. falciparum* 3D7 schizontes ont été séparées soit sous condition réductrice (ligne R) ou non réductrice (ligne NR). Une seule bande d'environ 40 kDa dans des conditions réductrices (pointe de flèche) correspond au poids moléculaire prévu du PfRON12. Une seule bande à environ 80 kDa dans des conditions non réductrices (flèche) représente le PfRON12 natif qui forme un multimère à liaison disulfure.

(C) Localisation sous-cellulaire de PfRON12 dans les schizontes et les mérozoïtes libres par immunofluorescence indirecte. PfRON12 : coloration avec des anticorps polyclonaux anti-PfRON12 de lapin, RON2 : coloration avec des anticorps polyclonaux anti-RON2 de souris, MTIP : coloration avec des anticorps polyclonaux anti-MTIP de souris, Merge : image fusionnée comprenant le noyau coloré DAPI, DIC : image microscopique à contraste différentiel. Triton (+) ; perméabilisé avec 0,1% de Triton X-100 ; barres 5 μ m.

(D) Localisation sous-cellulaire de PfRON12 dans le mérozoïte de *P. falciparum* au stade schizontale par immunomicroscopie électronique. La localisation de PfRON12 a été indiquée par des particules d'or de 15 nm observées sur l'extrémité de la rhoptrie. Rh : Rhoptry, N : noyau ; barre 500 nm.

10.7. Numération formule sanguine

La numération formule sanguine est faite au moyen d'une simple prise de sang, puis l'analyse est effectuée par un automate qui mesure les différents paramètres.

➤ Principe

L'appareil XT-1800i réalise l'analyse du nombre total des leucocytes en utilisant un bloc détecteur photosensible dont le fonctionnement repose sur la méthode de cytométrie de flux et l'utilisation d'un laser à semi-conducteur. Les taux d'érythrocytes et de plaquettes sont analysés par le compteur GR qui emploie la méthode de focalisation hydrodynamique. L'hémoglobine est analysée par le compteur de l'hémoglobine sur la base de la méthode spectrophotométrie. Elle fournit des résultats pour les paramètres suivants: globule rouge, hémoglobine, hématocrite, plaquette etc....

➤ Matériel et réactifs

La numération formule sanguine est effectuée sur l'appareil sysmex XT-1800i qui est un analyseur automatique d'hématologie utilisé pour les diagnostics in vitro en laboratoires cliniques. Elle est capable d'analyser et de livrer les résultats de 21 paramètres d'un échantillon sanguin.

Les différents réactifs utilisés par l'appareil sysmex XT-1800i sont :

CELLPACK : diluant qui sert à nettoyer l'aiguille après l'aspiration d'un Echantillon

STROMATOLYSER-FB Réactif lytique : l'analyse des leucocytes

STROMATOLYSER-4DL : diluant d'une partie du sang total après l'aspiration.

STROMATOLYSER- 4DS : colore les leucocytes dans un échantillon de sang lysé

SULFOLYSER : lyse les érythrocytes et agit sur la globine de l'hémoglobine pour former un complexe stable.

RET SEARCH: dilue et colore en même temps les réticulocytes, pour déterminer la concentration sanguine en réticulocytes effectuée sur l'appareil.

CELLCLEAN : détergent alcalin puissant qui supprime les réactifs lytiques, les résidus cellulaires et les protéines sanguines restées dans l'automate.

➤ **Prélèvement**

Après s'être assuré de la disponibilité de tous les nécessaires pour le prélèvement, le numéro du participant est écrit sur le tube plus la date et l'heure du prélèvement. Le prélèvement peut être effectué sur du sang capillaire ou sur du sang veineux en tube contenant une substance anticoagulante EDTA (éthylène diamine tétra acétique) qui va empêcher le sang de se "gélifier" et permet une meilleure conservation des cellules. Dès que la prise de sang est terminée il faut homogénéiser le prélèvement par des mouvements de retournement doux pour éviter l'apparition de caillot. Les tubes de prélèvement (la couleur du bouchon est normalisée en fonction de l'anticoagulant, en l'occurrence, le violet) utilisés dans la plupart des cas ont un volume de 5 ml et sont calibrés pour des prélèvements de 4 ml de sang + 1 ml d'EDTA. Ce prélèvement se fait selon les bonnes pratiques de laboratoire.

➤ **Mode d'analyse**

En mode manuel, après que les échantillons aient été agités manuellement, les bouchons des tubes sont retirés à la main et l'échantillon est aspiré via l'aiguille d'aspiration de sang total. La lecture se fait automatiquement et les résultats sont sauvegardés dans l'automate.

11. Fiche signalétique

Nom : MAIGA

Prénom : Souleymane

Pays d'origine : MALI

Email : souleymanemaiga13@yahoo.fr

Faculté de Pharmacie de Bamako /MALI

Tel : 00223 71 09 56 28-0023 66 65 99 50

Année universitaire : 2018-2019 **Ville de soutenance :** Bamako

Dépôt légal : Bibliothèque de la FMOS/FAPH de Bamako

Source d'intérêt : Immunologie, parasitologie santé publique, génétique.

Titre de la thèse : Etude des mutations du fond génétique de résistance de *Plasmodium falciparum* à l'artémisinine dans deux localités d'endémicités différentes au Mali : Nioro du Sahel et Dangassa.

Résumé

Bien que la résistance à l'artémisinine n'ait pas été encore décrite en Afrique, la possibilité de son émergence et de sa propagation dans cette zone préoccupe énormément l'OMS. Il paraît donc important de surveiller l'émergence de cette résistance en Afrique. La présente étude a pour but d'étudier les mutations du fond génétique de résistance à l'artémisinine dans deux zones éco-climatiques différentes du Mali.

De juillet 2016 à janvier 2017, nous avons mené une étude transversale de détection passive de cas de paludisme à Nioro et Dangassa. Tous les cas confirmés de paludisme ont été enrôlés dans l'étude et des échantillons de sang ont été collectés sur du papier buvard. Nous avons extrait l'ADN parasite à partir de ces échantillons et les mutations Pfarps10_V127M, Pfarps10_D128Y/H, Pffd_D193Y, Pfcrt_N326S, Pfcrt_I356T, and Pfmdr2_T484I ont été recherchés. Les prévalences de ces mutations ont été évaluées ainsi que leurs associations mutuelles.

Dans notre étude, nous avons observé que les mutations les plus répandues étaient Pfcrt_I356T et les mutations Pffd_D193Y avec respectivement 46,4% et 4,3% à Dangassa contre 51% et 9,4% à Nioro. Il n'a pas été observé de différences statistiquement significatives entre les prévalences des mutations dans les deux sites d'étude. Toutes les mutations étudiées ont été détectées à Dangassa. Cependant, les mutations Pfarps10_D128Y / H, Pfcrt_N326S et Pfmdr2_T484I n'ont pas été détectées à Nioro. De surcroît, 41,1% des isolats de *P. falciparum* portaient au moins une des mutations étudiées, 3,7% des isolats de *P. falciparum* en portaient deux. Seuls 0,3% des isolats cumulaient 3 des mutations étudiées. Aucun isolat ne cumulait plus de trois mutations.

Nous n'avons pas retrouvé le fond génétique de résistance à l'artémisinine chez les isolats collectés dans cette étude. Cependant toutes les mutations constitutives du fond ont été retrouvées de façon séparée à Dangassa.

Mots clés : Mutations consécutives, *P. falciparum*, Fond génétique de résistance, Artémisinine

Summary

The emergence of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin in Africa or its spread from East-Asia to Africa is of great concern to the WHO and the national malaria control programs. Thus, the monitoring of artemisinin-resistant parasites is of tremendous interest. A specific genetic background has been described for artemisinin-resistance arising in *P. falciparum* composed of mutations in apicoplast ribosomal protein S10 gene (Pfarps10_V127M, Pfarps10_D128Y/H), ferredoxin gene (Pffd_D193Y), Chloroquine resistance transporter gene (Pfcr1_N326S, Pfcr1_I356T), and the multi-drug resistance protein-2 gene (Pfmdr2_T484I). The assessment of those mutations may help to predict the emergence of artemisinin resistant parasites in different geographical areas.

From July 2016 to January 2017, we carried out a passive cross-sectional case detection study in two different malaria transmission settings in Mali. All confirmed malaria cases, were enrolled and dried blood spots (DBS) were collected. DNA were extracted from DBS samples assessed for Pfarps10_V127M, Pfarps10_D128Y/H, Pffd_D193Y , Pfcr1_N326S , Pfcr1_I356T, and Pfmdr2_T484I mutations. The prevalences of the mutations were determined in both sites and their associations were assessed.

In total, 270 (216 in Dangassa and 54 in Nioro) were genotyped. The most prevalent mutations were Pfcr1_I356T and the Pffd_D193Y mutations with respectively 46.4% and 4.3% in Dangassa vs 51% and 9.4% in Nioro. The Pfarps10_V127M, Pfarps10_D128Y/H, Pfcr1_N326S, and Pfmdr2_T484I mutations were detected respectively in two, one, three and one samples. All of the mutations were detected in Dangassa. The highest accumulation of mutations, 3 out of 6 was detected in one sample in Dangassa.

No parasite isolate with resistance genetic background was detected in this study, but all of the constitutive mutations of the background were found in Dangassa, putting this locality at risk of artemisinin resistance emergence.

Key words: Malaria, *Plasmodium falciparum*, artemisinin-resistance genetic background, Mali

12. 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 consentirais à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

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

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

Je le jure !