

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple – Un But – Une Foi

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



FACULTE DE MEDECINE ET
D'ODONTO-STOMATOLOGIE



Année Universitaire 2021-2022

Thèse N°.194...../

THESE

**DYNAMIQUE DES MARQUEURS MOLECULAIRES DE
RESISTANCE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* A LA
CHLOROQUINE *PfCRT K76T*, *PfMDR-1 N86Y* DE 2001 A
2015 A KOLLE, MALI**

Présentée et soutenue publiquement le 23/07 /2022

Devant le jury de la Faculté de Médecine, et d'Odonto-Stomatologie.

Par M. Bassirou DIAKITE

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

JURY

PRESIDENT DU JURY : Professeur Abdoulaye DJIMDE

MEMBRES DU JURY : Docteur Amadou NIANGALY

Docteur Antoine DARA

CO-DIRECTEUR DE THESE : Docteur Souleymane DAMA

DIRECTEUR DE THESE : Maître de Conférences Agrégé Abdoulaye Kassoum KONE

DEDICACE ET REMERCIEMENTS

DEDICACE

Je dédie cette œuvre à mon père, Broulaye DIAKITE et à ma mère, Fatimata DAMA, dont leur dévouement pour mon éducation a été considérable. Eux qui m'ont inscrit à l'école et qui ont suivi de près mon encadrement sans jamais céder au découragement. Vous avez été des parents que tout enfant désirerait avoir. C'est par vos qualités humaines, votre persévérance et votre courage que ce chemin a été parcouru. Grace à l'éducation rigoureuse que vous m'avez donnée et les sacrifices que vous avez consentis pour nous, j'ai pu surmonter ces marches ô combien importantes dans ma vie. Vos conseils, vos prières et votre soutien moral et matériel, m'ont permis de tenir et de surmonter ces longues années d'études. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour envers vous. Vous êtes les meilleurs parents, je suis très fier de vous. Que ce travail soit le témoignage de mon indéfectible affection. Que Dieu vous préserve et vous procure santé et longue vie.

REMERCIEMENTS

Je rends grâce au Tout Puissant, Paix et Salut sur le prophète Mohamed, sur sa famille, sur ses compagnons et sur tous ceux qui suivront ses pas, de m'avoir donné la force d'entreprendre ce cycle d'étude qui nourrit ma passion, et de l'avoir mené à terme dans la santé et le bonheur. Je me prosterne devant vous pour implorer votre miséricorde pour la vie d'ici-bas et surtout pour la vie d'au-delà. Je vous demande de guider mes pas et de veiller sur moi dans l'exercice de cette noble et dure profession qu'est la médecine.

- **A mes oncles et tantes :**

Pr Abdoulaye DJIMDE et famille, Dr Souleymane DAMA et famille, Dr Amadou BAMADIO et famille, Dr Amadou NIANGALY et famille, Dr Moussa DJIMDE et famille Dr Aly KODIO et famille, Mr Abdoul Salam DIAKITE et famille, Dr Antoine DARA et famille, Mr Sékou DOUMBO et famille, Mr Samba MAIGA et famille, Mr Bouba MAIGA et famille, Maya DIAKITE et Lassina DIAKITE et famille

Je vous remercie, pour tous vos soutiens qui m'ont été très utiles dans l'accomplissement de ce travail.

Vos soutiens moraux et matériels et vos encouragements m'ont été d'une aide capitale. Je ne saurai quoi vous dire, car les mots me manquent, je vous prie d'accepter ma profonde gratitude et toutes mes reconnaissances. Qu'Allah vous protège et vous procure longue vie Amen.

- **A mes aînés et collègues de CSCOM (ASACOKAL) :**

Dr COULIBALY Abdoulaye, Dr Mamadou BOITE, Dr Ousmane SAMAKE, Dr Inhissa BENGALY, Dr Dian DIALLO, Dr Salia KEITA, Dr Germain DEMBELE, Dr Amidou BERTHE, Dr Mamadou CAMARA, Dr Abdoulaye SIDIBE, Dr Mamadou DIALLO, Dr Bakary SAMAKE, Dr Oumar CAMARA Internes Oumar SOW, Fadjala COULIBALY, Harouna SOUMAORO, Famouké CAMARA, Mamadou KONE

Merci pour votre collaboration, une grande partie du chemin est franchie, puisse Dieu vous procurer une longue vie

- **A mes frères :** Oumar DIAKITE, Jackie DIAKITE, Solomane DIAKITE

En témoignage de l'affection qui nous a toujours unis sous le toit paternel, je voudrais que vous trouviez dans ce travail le fruit des efforts que vous avez consentis à mon égard. Gardons l'esprit de la cohésion familiale et le sens du devoir que nos parents nous ont inculqué. Ce travail est aussi le vôtre, j'espère avoir été un bon frère. Que le tout puissant préserve et renforce notre affection fraternelle.

- **A mes sœurs :** Jolie DIAKITE, Batoma DIAKITE, Fatim DOUGNON, Djélica ONGOIBA

Vos présences et vos soutiens tout au long de ce travail, m'ont beaucoup touché. Je vous dédie ce travail. Recevez du fond de cœur l'expression de ma sincère reconnaissance et mon éternel amour. Que Dieu vous accorde une très longue vie et beaucoup de bonheur.

- **A mes grands frères :**

Oumar DIAKITE, Jackie DIAKITE, Youssouf MAIGA, Amadou DICKO, Abba MAIGA, Boncana MAIGA, Seydou MAIGA

Vous m'avez traité en fils, frère, je prie le bon Dieu en foi de l'amour que vous avez porté à l'égard de ma modeste personne de bien vouloir sauvegarder la paix et la cohésion au sein de la famille. Merci pour votre générosité et votre soutien sans faille.

Veillez accepter toute ma reconnaissance.

- **A mes grands-parents :** Feu Baya DIAKITE, Feu Agadou DAMA,

Votre soutien, vos encouragements moraux et matériels ne m'ont jamais fait défaut et m'ont été d'un apport inestimable. Soyez rassuré de ma profonde gratitude et de mon éternelle reconnaissance pour vous, puisse Dieu vous accorder son paradis.

- **A ma grand-mère :** Feu Aichata yetemely ONGOIBA

Le monde est un perpétuel conflit entre la vie et la mort. En nous quittant de façon prématurée, tu nous as sevrées de ta grande qualité humaine de réconciliateur et de partage. En souvenir de tout ce que nous avons appris à tes côtés, nous prions le bon Dieu de t'accorder sa grâce et son pardon.

- **A mes Amis et grands frères :**

Mohamed SAMAKE, Mohamed SANGARE, Mohamed DIALLO, Mohamed DOUMBIA, Ousmane BELEM, Youssouf BERTHE, Mohamed KEITA, Souleymane SOW, Lassina HAIDARA, Fousseyni HAIDARA, Issa SAMAKE, Sorry SAMAKE, Lassina SAMAKE, Moussa SAMAKE.

Merci pour vos aides, amitiés et vos collaborations, une partie du chemin est faite.

Ensemble nous réussirons l'autre partie. Qu'Allah vous donne longue vie et bénédiction amen.

- **A Ma Chère aimée Salimata DEMBELE et ma fille Aichata dite YETEMELY DIAKITE**

Merci pour ton amour et soutien apportés à ma personne. Une vie de foyer est très complexe mais malgré tout tu es restée patiente et m'as soutenu dans l'accomplissement de mes Engagements je ne saurais te dire merci du profond du cœur.

A tous les volontaires de nos études : pensées profondes et ma disponibilité absolue !

A toute la population de Kollé et tous les volontaires et personnel du site de Kollé pour avoir accepté l'équipe,

Au Doyen de la Faculté de Médecine Professeur Seydou Doumbia

Au corps professoral de la Faculté de Pharmacie et de la faculté de Médecine et d Odonto-Stomatologie, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu.

Au personnel du MRTC/DEAP, pour votre disponibilité et votre franche collaboration.

A nos maîtres du MRTC/DEAP, pour votre engagement et votre souci constant pour une formation de qualité.

A l'équipe de l'unité de chimiorésistance du MRTC/DEAP: Particulièrement au Professeur Abdoulaye DJIMDE, aux Docteurs Souleymane DAMA, Mamadou TEKETE, Dinkorma OUOLOGUEM, Amadou Niangaly, Antoine DARA, Bintou DIARRA , Aminatou KONE, Nouhoum DIALLO, Oumar Bila TRAORE, Hamidou NIANGALY, Bakary FOFANA, Nianwalou DARA, Amadou BAMADIO, Aly KODIO, Fatoumata BALLO, Sékou SISSOKO, Diagassan DOUMBIA, Bilaly TRAORE, Aliou TRAORE, Bakary SIDIBE, Aboubecrin HAIDARA, Adam GARANGO, Mohamed KONATE , Siaka GOITA, Fatalmoudou TANDINA, Moussa DJIMDE, Bouran SIDIBE, Adoulaye DOUMBIA, Cheick Papa Oumar SANGARE, Dr AMATIGUE Zeguimè, Ahmed KONATE, François DAO, Adam BATRANE, Amadou Hamidou TOGO, Mohamed Lamine Alhousseini, Laurent DEMBELE, Mahamadou Daby CAMARA, Fanta SOGORE, Yacouba Nani BARRE aux internes, Amadou DAOU, Fatoumata CISSE, Bakoroba DIARRA, Boi KONE, Souleymane Babouya KONE, Djéneba DIALLO, Abdoul Karim SAMAKE, Moussa DOUMBIA.

Aux personnels d'administration Mme SISSOKO Daoulé DIALLO, Mme BATHILY Yaye dite Nah SISSOKO, Mlle Adama GUINDO, Madame OUEDRAOGO Mariam KOUYATE, Boubakar KODIO, Ibrahim KAMATE, Issouf FANE, Amadou ARAMA.

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du jury

Professeur Abdoulaye DJIMDE, PharmD, PhD

- ✓ **Professeur titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FAPH**
- ✓ **Directeur du MRTC Parasitologie**
- ✓ **Chef de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance (MEDRU)**
- ✓ **Directeur du Programme DELGEME**
- ✓ **Membre de l'académie Africaine des sciences**
- ✓ **Membre de l'académie Malienne des sciences**

Cher Maître, permettez-nous de vous témoigner notre satisfaction pour l'honneur et le privilège que vous nous avez accordé en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Nous avons admiré vos qualités humaines, scientifiques et pédagogiques, qui font de vous un maître apprécié et respecté de tous. Recevez ici cher maître l'expression de notre

Reconnaissance et de notre profond respect.

A notre Maître et membre du jury

Docteur Amadou NIANGALY, PharmD, PhD

- ✓ **Maître-assistant de Parasitologie-Mycologie à la FAPH**
- ✓ **Chercheur au MRTC- Parasitologie**

Cher Maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Vos qualités humaines, scientifiques et votre humilité font de vous un Maître apprécié par vos étudiants.

Trouvez ici cher Maître l'expression de nos sincères remerciements.

A notre Maître et membre du jury

Docteur Antoine DARA, PharmD, PhD

- ✓ **Maître-assistant de biologie moléculaire à la FAPH**
- ✓ **Chercheur au MRTC Parasitologie**

Cher Maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Nous avons été impressionnés par votre pédagogie. Vos qualités humaines, scientifiques et pédagogiques, qui font de vous un maître apprécié et respecté de tous. Nous ne saurions être assez reconnaissants envers vous pour tout l'intérêt et toute la considération que vous avez portés à ce travail.

A notre Maître et Directeur de thèse

Maître de Conférences Agrégé Abdoulaye Kassoum KONE, MD, PhD

- ✓ **Professeur Agrégé de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Médecine, et d'odontostomatologie**
- ✓ **Responsable de l'Unité de Diagnostic des parasitoses au MRTC**
- ✓ **Médecin-chercheur au MRTC**

Cher Maître, c'est un grand honneur et un réel plaisir que vous nous faites en acceptant de diriger ce travail malgré vos multiples occupations. Votre rigueur et votre sens élevé du travail bien fait ont contribué à améliorer le contenu de cette thèse. Trouvez ici très cher Maître, le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A notre Maître et Co-directeur de thèse

Docteur Souleymane DAMA, PharmD, PhD

- ✓ **Maître-assistant de Parasitologie-Mycologie à la FAPH**
- ✓ **Spécialiste en Pharmacologie préclinique et clinique**
- ✓ **Chercheur au MRTC Parasitologie**

Cher Maître, ce temps passé à vos côtés, nous avons beaucoup appris de vos valeurs humaines et scientifiques. Votre disponibilité, votre dévouement dans les labeurs nous ont été d'une grande aide. Nous ne saurions être assez reconnaissants pour tout l'intérêt et toute la considération que vous avez apportée à ce travail.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS :

- ADN** : Acide Désoxyribonucléique
AR-L : Artéméther – Luméfantrine
AS/AQ : Artésunate + Amodiaquine
BB : Bleu de Bromophénol
CTA : Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
°C : Degré Celsius
DEAP : Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaire
dhfr : Dihydro folate réductase
dhps : Dihydro ptéroate synthétase
dl : décilitre
dNTPs : désoxy Nucléotide Triphosphates
ECT : Echec Clinique Tardif
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétate
EPT : Echec Parasitologue Tardif
ETP : Echec Thérapeutique Précoce
FMOS : Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie
g : gramme
Hg : Hémoglobine
Ht : Hématocrite
INF-gamma : Interféron-gamma
J : Jour
Kg : kilogramme
Km : Kilomètre
l : litre
MCA₁ : Microsatellite Ca₁
MEDRU : Molecular Epidemiology and drug Resistance Unit
MgCl₂ : Chlorure de Magnésium
Mg²⁺ + : ion Magnésium
mg : milligramme
ml : millilitre
mmol : millimole
mmHg : millimètre de mercure
MRTC : Malaria Research and Training Center

MS-PCR: Mutation Specific-Polymerase Chain Reaction

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONG : Organisation Non Gouvernementale

pb : Paire de base

PCR : Polymérase Chain Réaction

PM : marqueur de Poids Moléculaire

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

Pfcr : *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*

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

RCPA : Réponse Clinique et Parasitologie Adéquate

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RSA: Ring Stage Survival Assay

SP : Sulfadoxine Pyrimethamine

TA : Tension artérielle

Taq : *Thermus aquaticus*

TBE: Tris Borate EDTA

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

UI : Unité Internationale

UV : ultra-violet

μ l : microlitre

μ mol : micromole

TABLE DES MATIERES

Table des matières :

1. INTRODUCTION :	2
Hypothèse de recherche	4
2. OBJECTIFS	5
2.1. OBJECTIF GENERAL :	5
2.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES :	5
3. GENERALITES :	6
3.1. GENERALITES SUR LE PALUDISME :	6
3.1.1. HISTORIQUE :	6
3.1.2. Cycle biologique :	7
3.1.2.1. Phase hépatique ou phase exo érythrocytaire :	7
3.1.2.2. Phase érythrocytaire :	8
3.1.2.3. Sporogonie ou multiplication sexuée (Chez le moustique) :	8
3.1.3. Physiopathologie :	10
3.1.4. Formes cliniques du paludisme :	12
3.1.4.1. Paludisme de l'enfant (non encore prémuni en zone d'endémie) :	12
3.1.4.1.1. Les accès paludisme non compliqué :	12
3.1.4.1.2. Les formes graves :	12
3.1.4.1.3. Le paludisme congénital :	13
3.1.4.2. Le paludisme de l'adulte :	13
3.1.4.3. Paludisme de la femme enceinte :	13
3.1.4.4. Le paludisme transfusionnel :	13
3.1.4.5. Le paludisme et l'infection à VIH/Sida :	14
3.1.5. Diagnostic biologique :	14
3.1.5.1. Diagnostic biologique direct :	14
3.1.5.1.1. Le prélèvement :	14
3.1.5.1.2. Techniques de référence :	15
3.1.5.1.3. Autres techniques :	15
3.1.5.2. Diagnostic biologique indirect :	16
3.2. Les antipaludiques :	16
3.2.1. Classification des antipaludiques :	16
3.2.1.1. Schizonticides érythrocytaires :	16
3.2.1.2. Schizonticides intra hépatiques :	17
3.2.1.3. Gamétocytocides :	17

3.2.1.4. Associations et combinaisons d'antipaludiques à effet synergique schizonticide :	17
3.2.1.5. La chloroquine :	18
3.2.1.5.1. Historique :	18
3.2.1.5.2. Structure chimique :	18
3.2.1.5.3. Mécanisme d'action :	18
3.2.1.5.4. Formulation :	19
3.2.1.5.5. Indication :	19
3.2.1.5.6. Résistance à la chloroquine :	19
3.2.1.5.7. Mécanisme de résistance de <i>P. falciparum</i> à la chloroquine :	19
3.2.1.5.8. Les marqueurs moléculaires de résistance de <i>P. falciparum</i> à la chloroquine :	21
3.2.1.5.8.1. <i>Pfmdr1</i> : <i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance gene 1 :	21
3.2.1.5.8.2. <i>Pfcr1</i> (<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter) gene :	22
3.2.1.5.9. Méthode d'évaluation de la résistance de <i>P. falciparum</i> à la chloroquine :	22
3.2.1.5.9.1. Test <i>in vivo</i> :	23
3.2.1.5.9.2. Test <i>in vitro/ex vivo</i> :	24
3.2.1.5.9.3. Les tests moléculaires :	24
3.2.1.6. Autre méthode d'évaluation de résistance de <i>P. falciparum</i> à la chloroquine :	25
4. METHODOLOGIE :	28
4.1. Description du site d'étude :	28
4.2. Description de l'échantillonnage et du type d'échantillon :	29
4.3. Type et Période d'étude :	29
4.4. Analyse moléculaire :	29
4.5. Extraction de l'ADN :	29
4.5.1. Matériel et réactifs :	29
4.5.2. Mode opératoire :	30
4.5.3. Recherche des mutations des codons 76 du gènes <i>Pfcr1</i> et 86 du gènes <i>Pfmdr1</i> :	30
4.5.3.1. Matériels :	31
4.5.3.2. Préparation des réactifs de PCR :	31
4.6. Détermination de la résistance parasitaire à partir de la prévalence moléculaire :	38
4.7. Analyses statistiques :	38
4.8. Considération éthique :	38
5. RESULTATS :	40
5.1. La prévalence des allèles du gène <i>Pfcr1</i> de 2001 à 2015 :	40
5.2. La prévalence des allèles du gène <i>Pfmdr1</i> de 2001 à 2015 à Kollé :	43

5.3. La résistance <i>in vivo</i> à la chloroquine par le modèle d'Index de Résistance	46
Génotypique (GRD)[23] :	46
6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION :	48
6.1. Prévalence de l'allèle mutant <i>PfCRT</i> K76T :	48
6.2. Prévalence de l'allèle mutant <i>PfMDR1</i> :	49
6.3. Prévalence de la résistance <i>in vivo</i> :	50
6.4. Limites de l'étude :	50
CONCLUSION	51
7. CONCLUSION :	52
8. RECOMMANDATIONS :	54
9. REFERENCES :	56

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des tableaux :

Tableau I: Composition du mélange réactionnel pour la première amplification du gène <i>pfcr</i>	32
Tableau II: Programme de la première amplification du gène <i>pfcr</i>	32
Tableau III : Composition du mélange réactionnel pour la deuxième amplification du codon 76 du gène <i>pfcr</i>	33
Tableau IV : Programme de la deuxième amplification du codon 76 du gene <i>Pfcr</i>	33
Tableau V: Composition du mélange réactionnel pour la digestion du codon76 du gène <i>pfcr</i>	34
Tableau VI: Composition du mélange réactionnel pour la première amplification du gène <i>pfmdr-1</i>	35
Tableau VII : programme de la première amplification du codon 86 gene <i>pfmdr-1</i>	35
Tableau VIII: Composition du mélange réactionnel pour la deuxième amplification du codon 86 du gène <i>pfmdr-1</i>	36
Tableau IX: Programme de la deuxième amplification du codon 86 du gène <i>pfmdr-1</i>	36
Tableau X: Composition du mélange réactionnel pour la digestion du codon 86 du gène.....	37
Tableau XI: Prévalences des allèles du gène <i>Pfcr</i> par année à Kollé :	42
Tableau XII: prévalence des allèles du gène <i>Pfmdr-1</i> par année à kollé.	44
Tableau XIII: L'estimation de la Résistance in vivo à la chloroquine à partir du ratio de la prévalence moléculaire <i>Pfcr</i> 76T et l'index moyen de 2,2.....	46

Liste des figures

Figure 1: Cycle de développement de plasmodium et particulièrement <i>P. falciparum</i>	9
Figure 2 : Structure chimique de la chloroquine	18
Figure 3: Mutations des gènes <i>Pfcr</i> t et <i>Pfmdr</i> entrainant un reflux de la chloroquine à l'extérieur de la vacuole digestive.....	21
Figure 4 : Carte du Mali montrant la position de notre site d'étude.	28
Figure 5 : photo du gel d'électrophorèse du produit de la deuxième PCR du gène <i>pfcr</i> t K76T. (source MEDRU/MRTC/Bassirou).....	40
Figure 6 : Photo du gel d'électrophorèse du produit de la digestion PCR du gène <i>pfcr</i> t K76T. (source : MEDRU/MRTC/Bassirou DIAKITE)	41
Figure 7 : photo du gel d'électrophorèse du produit de la deuxième PCR du gène <i>pfcr</i> t K76T (Source MEDRU/MRTC/Bassirou DIAKITE).....	43
Figure 8 : Photo du gel d'électrophorèse du produit de la digestion PCR du gene <i>pfmdr</i> -1 N86Y (Source MEDRU/MRTC/Bassirou DIAKITE).	43
Figure 9 : dynamique des allèles des codon 76 et 86 des gènes <i>Pfcr</i> t et <i>Pfmdr</i> -1 par année. ...	45

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION :

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à la présence et à la multiplication dans l'organisme humain d'une ou de plusieurs espèces plasmodiales inféodées à l'homme [1]. Il est essentiellement transmis à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique culicidé du genre *Anophèles* au moment de son repas sanguin. Seule la femelle, hématophage, transmet la maladie [1]. Elle préfère piquer au coucher du soleil avec un maximum d'activité entre 23 heures et 6 heures. Par ailleurs, il existe d'autres voies rares de transmission telles que la voie sanguine (transfusion sanguine) [2] et fœto-maternelle [3].

Cinq espèces sont inféodées à l'homme. Il s'agit de : *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*), *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*), *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*) [4].

Au vingt unième siècle, le paludisme est la première endémie parasitaire mondiale et reste un problème majeur de santé publique. Le paludisme sévit dans toute la ceinture de pauvreté du globe. Il demeure redoutable en zone tropicale où prédomine *P. falciparum* qui est l'agent pathogène le plus meurtrier [5].

En 2021, il a été estimé à 241 millions le nombre de cas de paludisme dans le monde dont 627000 décès. Cette hausse brutale est due à la perturbation des services sanitaires pendant la pandémie de Covid-19 [6].

La période entre 2000 et 2020 connaît une diminution marquée de la mortalité et de l'incidence des cas de paludisme dans le monde [5].

Les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes constituent les groupes les plus vulnérables au paludisme avec plus de 67 % de décès dans le monde (soit 274 000) [6].

Au Mali, comme la plupart des pays de l'Afrique subsaharienne, le paludisme constituait la première cause de mortalité et de morbidité. En 2018, selon le système d'information sanitaire, 2 614 104 cas de paludisme confirmés et 1 001 décès ont été enregistrés dans les structures sanitaires du Mali [7] ; le paludisme est responsable de 44,5% des motifs de consultation dans les services de santé en 2012 et 39% des motifs de consultation de 2018 à 2020 [8].

En plus du fardeau humain, le paludisme affecte l'économie nationale par la réduction du Produit National Brut (PNB) du fait de jours de travail perdus par les personnes actives et entrave la scolarité des enfants et le développement social. Selon une étude menée par

l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) du Mali, les pertes économiques dues au paludisme sont estimées à 72 milliard de francs CFA par an [9]. Il est ainsi considéré comme une maladie de la pauvreté et une cause de pauvreté. Pour lutter efficacement contre le paludisme, le pays s'est doté d'une politique nationale de lutte contre le paludisme en 1993 pour donner suite à sa participation à la conférence ministérielle d'Amsterdam et a adhéré à l'initiative Roll Back Malaria [10].

Depuis 2005 la chloroquine a été abandonnée à cause du taux de résistance très élevé de *P. falciparum* à cette molécule [11].

De nos jours, les médicaments recommandés pour le traitement du paludisme non compliqué sont les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). Les études récentes ont évoqué une baisse de sensibilité des parasites à ces CTA [12]. Il y a très peu de nouveaux médicaments en cours de développement contre le paludisme.

Des études menées au Malawi et en Zambie par LAUFER M K et *al.*, et MWANZA et *al.*, respectivement en 2010 et 2016, ont montré qu'après une dizaine d'année d'arrêt de la chloroquine, les parasites du paludisme sont redevenus quasi sensibles à la chloroquine [13, 14]. Ces études ont suggéré le retour possible de la chloroquine dans la politique thérapeutique de cette maladie.

Les dernières données sur l'efficacité de la chloroquine au Mali remontent d'une étude réalisée avec les échantillons de 2002 et 2003 et publiée en 2010 par DJIMDE A et *al.*, qui a montré une prévalence moyenne de la mutation *PfCRT 76T* de 84,5% à l'échelle nationale [11]. Il y'a très peu de données actualisées sur la chloroquinorésistance au Mali.

Cette présente étude a été initiée dans le but d'évaluer la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine quinze ans après son retrait dans le traitement du paludisme au Mali.

Hypothèse de recherche

Après quinze ans d'abandon de la chloroquine dans la prise en charge du paludisme, les souches résistantes de *P. falciparum* seraient en nette décroissance au Mali.

Question de recherche :

Quelle est la dynamique des marqueurs de la chloroquinorésistance à Kollé au Mali ?

2. OBJECTIFS

2.1. OBJECTIF GENERAL :

Etudier la dynamique des marqueurs moléculaires de *Plasmodium falciparum Pfcr*t et *Pfmdr*1 de 2001 à 2015 à Kollé.

2.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES :

1. Mesurer les prévalences des allèles mutants du codon 76 du gène *Pfcr*t de 2001 à 2015 à Kollé.
2. Mesurer les prévalences des allèles mutants du codon 86 du gène *Pfmdr*1 de 2001 à 2015 à Kollé.
3. Comparer les prévalences des allèles mutants du codon 76 du gène *Pfcr*t et du codon 86 du gène *Pfmdr*1 de 2001 à 2015 à Kollé.
4. Déterminer la résistance *in vivo* en utilisant l'Index de Résistance Génotypique (GRI) de *P. falciparum* à la chloroquine à Kollé.

3. GENERALITES :

3.1. GENERALITES SUR LE PALUDISME :

3.1.1. HISTORIQUE :

L'origine géographique du paludisme est controversée et se perd dans la nuit des temps. Il fait partie des plus vieilles affections de l'humanité et des indices suggèrent que l'homme préhistorique en était atteint [15]. On trouve ainsi dans les anciens manuscrits chinois et égyptiens, de même que dans la littérature grecque et romaine, des témoignages relatifs aux fièvres épidémiques dont les signes ressemblent beaucoup à ceux du paludisme [15]. Il a fallu attendre 1717 pour que Giovanni Lancisi attribue cette maladie aux émanations nocives des marais, d'où le nom malaria, de l'italien « malera » ou air vicié ; puis en 1880 pour que Docteur Alphonse Laveran, un médecin de l'armée française, soit témoin de l'ex flagellation d'un gamétocyte mâle lors de l'observation au microscope d'échantillons de sang des patients impaludés [16]. Deux ans plus tard, l'hypothèse de la transmission du paludisme par le moustique était déjà émise. Cette hypothèse fut confirmée en 1897 par Ronald Ross qui fit la découverte de l'importance du moustique dans le cycle de vie du paludisme aviaire et décrivit des kystes paludéens dans les parois de l'estomac d'*anophèles* [17]. En 1898, Grassi décrivit le cycle de transmission complet du parasite et prouva que le paludisme observé chez l'homme est transmis par des moustiques du genre *Anophèles* [18]. La nomenclature concernant les différents stades de développement du parasite sera publiée en 1900 par Schaudinn [19].

L'agent pathogène a d'abord été nommé *Oscillare malariae* puis *Heamaoeba malaria* [20]. Successivement, furent mis en évidence les espèces *P. vivax* [15] ; *P. malariae*, *P. falciparum* et *P. ovale* [15, 21].

Les dégâts causés par le paludisme pendant la première guerre mondiale vont susciter la recherche et la mise à disposition des nouvelles molécules antipaludiques telles que les dérivés des amino-8-quinoleines, des amino-9-acridines et des amino-4-quinoleines dont la plus représentative est la chloroquine [22, 23].

La chloroquine sera ensuite largement utilisée aussi bien en traitement curatif qu'en chimio prophylaxie jusqu'à ce que l'OMS ait lancé en 1950 un programme d'éradication du paludisme à l'échelle mondiale : le monde unit contre le paludisme. C'est ainsi qu'il y a eu le développement de nombreux antipaludiques de synthèses dont les plus connus sont l'amodiaquine, la pyriméthamine, le cycloguanil et le proguanil [24]. L'activité

antiplasmodique de l'extrait d'*Artemisia annua* dont le principal principe actif est l'artémisinine qui a été identifié en 1971.

3.1.2. Cycle biologique :

Ce n'est qu'à partir de 1948 que toutes les phases du cycle de développement du parasite ont été élucidées. Ce cycle biologique de *Plasmodium* peut être caractérisé par deux phases (Figure 1) : une phase de multiplication asexuée ou schizogonie (comportant une phase hépatique ou exo érythrocytaire et une phase érythrocytaire) se déroulant chez l'homme et une phase de différenciation sexuée suivie d'une multiplication asexuée, appelée sporogonie, se déroule chez le moustique.

3.1.2.1. Phase hépatique ou phase exo érythrocytaire :

Cette phase hépatique commence avec la pique de l'anophèle femelle. Le moustique infecté inocule la salive contenant des sporozoïtes dans les tissus sous-cutanés de l'hôte humain. Une fois inoculés, les sporozoïtes traversent les couches vasculaires endothéliales pour se retrouver dans la circulation sanguine (Figure 1) [25]. Les sporozoïtes entament les phases du cycle dans un état dit de compétence d'infectivité [26]. Les sporozoïtes du sang périphérique atteignent les cellules hépatiques. Une fois dans le foie, les sporozoïtes pénètrent dans l'hépatocyte par invagination et deviennent des trophozoïtes puis des cryptozoïtes qui forment à leur tour des schizontes hépatiques. La vacuole parasitophore se forme. Cette vacuole a pour rôle de protéger le parasite du cytosol de l'hôte [27]. Le parasite se multiplie par division cellulaire pendant 7 à 20 jours selon les espèces, ce qui aboutit à la production de dizaines de milliers de mérozoïtes. Après 6 à 10 jours (cas de *P. falciparum*) d'infestation, les hépatocytes éclatent et larguent leur contenu dans le sang périphérique [28] . Au niveau hépatique, *P. ovale* et *P. vivax* peuvent donner la forme dormante appelé hypnozoïtes. Les mérozoïtes hépatiques atteignent alors la circulation sanguine sous forme de paquets de parasites de taille et de forme variable.

L'enveloppe de ces paquets appelée « mérosome » ou « extrusome » est celle d'un hépatocyte nécrosé grâce à laquelle le parasite mime une cellule vivante afin d'être reconnue comme cellule du soi pour échapper aux cellule Natural Killer (CK) [29]. La libération de mérozoïtes hépatocytaires est un processus synchrone dans le paludisme à *P. falciparum* [30]. Les mérozoïtes libérés après éclatement des corps bleus qui vont infecter les globules rouges pour entamer la phase érythrocytaire.

3.1.2.2. Phase érythrocytaire :

Les mérozoïtes issus des schizontes hépatiques pénètrent ainsi les érythrocytes à l'intérieur desquels ils se multiplient à nouveau (Figure 1), c'est l'invasion [31]. Après l'invasion de l'hématie, le parasite, entouré d'une vacuole parasitophore, se développe en anneau [32], puis en trophozoïte qui digère le contenu de la cellule hôte (Figure 1). Les trophozoïtes se transforment en schizontes. A maturation, les schizontes entraînent la lyse des hématies parasitées avec libération de l'hémozoïnes (pigment malarique) qui sont à l'origine des accès de fièvre. Les mérozoïtes libérés après éclatement de l'hématie envahissent de nouveaux globules rouges et bouclent ainsi le cycle schizogonique érythrocytaire. Après l'invasion des globules rouges, certains mérozoïte se différencient en gamétocytes mâles ou femelles. Cette étape, appelée gamétocytogenèse. se déroule en parallèle du cycle érythrocytaire [33, 34].

3.1.2.3. Sporogonie ou multiplication sexuée (Chez le moustique) :

L'anophèle femelle, au cours d'un repas sanguin (chez un sujet infecté) nécessaire pour la maturation de ses œufs, ingère des trophozoïtes, des schizontes et des gamétocytes. Dans l'estomac du moustique, les trophozoïtes et les schizontes sont digérés tandis que les gamétocytes se transforment en gamètes mâles et femelles (Figure 1). Les gamètes mâles et femelles fusionnent pour former d'abord un zygote (immobile), qui devient un œuf mobile, l'ookinète [15]. L'ookinète migre dans le tube digestif du moustique et se fixe à la paroi de l'estomac. Dans les heures qui suivent sa formation, l'ookinète diploïde devient à la suite d'une méiose [35] un oocyste haploïde, immobile et arrondi. A l'intérieur de l'oocyste, surviennent des divisions mitotiques successives qui aboutissent à la formation de milliers de sporozoïtes haploïdes [36]. L'oocyste mature est appelé sporocyste. Le sporocyste va éclater et libérer les sporozoïtes qui regagnent avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle. Après maturation des sporozoïtes par l'expression différenciée de certains gènes, le moustique devient alors infectieux et reste dans cet état pendant environ un mois [37]. La reproduction sexuée assure donc un brassage génétique important des parasites. La durée du cycle sporogonique varie de 10 à 40 jours et est fonction de la température et l'espèce plasmodiale. D'une manière générale, en dessous de 16°C, le cycle sporogonique ne peut s'accomplir. Les conditions optimales sont, une température de 20°C à 30°C et une humidité d'au moins 60% [38].

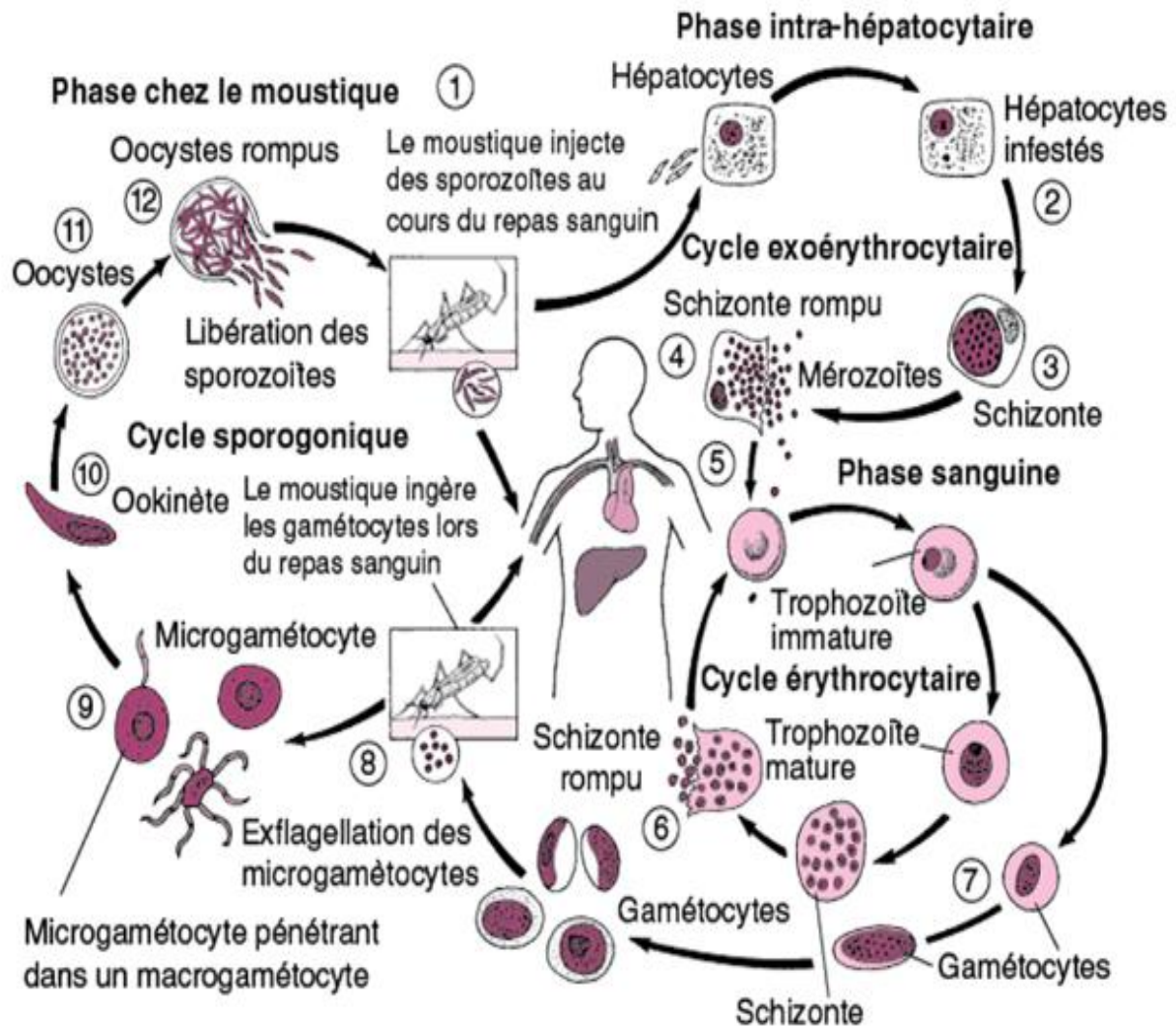


Figure 1: Cycle de développement de plasmodium et particulièrement *P. falciparum*.

Source : <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> visité 24-08-20

3.1.3. Physiopathologie :

La physiopathologie du paludisme est encore imparfaitement connue mais les répercussions de l'infection palustre sur certains organes ont été bien décrites.

Le sang : la phase de schizogonie érythrocytaire entraîne une hémolyse responsable d'une anémie d'installation progressive grave chez les jeunes enfants et les femmes enceintes. L'hémoglobine libérée par l'hémolyse provoque une surcharge rénale et est partiellement transformée en bilirubine dans le foie. L'excès est éliminé dans les urines entraînant une hémoglobinurie. D'autre part l'utilisation de l'hémoglobine par le parasite amène la précipitation dans son cytoplasme de granules de pigment (hémozoïnes), dont la libération lors de l'éclatement du globule rouge est en partie responsable de la fièvre. Le pigment, accumulé dans le cytoplasme du schizonte, est relargué dans le plasma lors de la libération des mérozoïtes. Il est alors phagocyté par les monocytes-macrophages et les polynucléaires neutrophiles (leucocytes mélanifères).

Les plaquettes sont séquestrées par des mécanismes, encore mal précisés, probablement immunologiques. La conséquence en est une thrombopénie, perturbation biologique fréquemment et précocement observée au cours d'un accès palustre.

La rate : la rate est hypertrophique, molle et congestive. Sa couleur caractéristique, rouge foncé, parfois brune est due à l'accumulation du pigment internalisé par les phagocytes. L'augmentation de volume est provoquée par l'hypertrophie de la pulpe blanche (lymphocytes, cellules réticulaires, macrophages). L'activité phagocytaire concerne les globules rouges parasités, les débris cellulaires, le pigment parasitaire. Histologiquement, au cours du paludisme viscéral évolutif, la rate est énorme, fibro-congestive et foncée à la coupe avec une hyperplasie lymphoïde et histiocytaire mais les parasites y sont rares.

Le foie : La schizogonie exo-érythrocytaire ne produit aucune lésion inflammatoire. La destruction par les schizontes d'un certain nombre de cellules parenchymateuses passe inaperçue. On observe une hyperplasie des cellules de Küpffer chargées de la phagocytose des débris cellulaires et de l'hémozoïne, associée à des dépôts d'hémossidérine. Ultérieurement les dépôts de pigment envahissent les espaces portes au sein d'infiltrats lympho-histiocytaires.

Physiopathologie de l'accès grave : le neuropaludisme (accès pernicieux = « cerebral malaria » des anglo-saxons) et l'anémie, sont les complications majeures du paludisme à *P.*

falciparum. Basées au départ sur des études anatomopathologiques post-mortem réalisées chez des patients décédés de neuropaludisme, de très nombreuses recherches ont été développées pour élucider sa physiopathologie. Plusieurs théories, probablement complémentaires sont actuellement retenues, notamment la séquestration d'hématies parasitées par des formes matures de *Plasmodium*, adhérant aux cellules endothéliales des microvaisseaux, et l'intervention de cytokines ou autres médiateurs.

Séquestration : Les formes âgées de *P. falciparum* (trophozoïtes âgés, schizontes) disparaissent de la circulation sanguine périphérique et sont séquestrées dans les capillaires des organes profonds (cerveau mais aussi reins, poumons ...). Cette séquestration est, au moins en partie, due à des phénomènes d'adhésion cellulaire (cytoadhérence) entre les globules rouges parasités et les cellules endothéliales de ces capillaires. Cette cytoadhérence est sous la dépendance d'interactions entre des récepteurs moléculaires présents à la surface des globules rouges parasités (PfEMP1) et des récepteurs spécifiques des cellules endothéliales (ICAM-1). Cette séquestration peut aussi être accentuée par des blocages dans les capillaires due à une déformabilité moindre des hématies parasitées, et à la formation de « rosettes » : agrégats constitués d'une hématie parasitée à laquelle adhèrent plusieurs hématies non parasitées.

Cytokines et autres médiateurs : des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN- γ , IL1, IL6...) et différents produits métaboliques (NO, acide lactique ...) sont produits, en cascade, au cours du neuropaludisme. Leur action se conjugue probablement au phénomène de blocage circulatoire conséquence de la séquestration. Les modèles expérimentaux étant forcément réducteurs, il est difficile de savoir comment s'articulent, in vivo, ces différents mécanismes. Ce qui a été décrit au niveau du cerveau est probablement vrai au niveau des autres organes (reins, poumon, placenta...) expliquant la défaillance multiviscérale parfois observée lors d'un accès grave. Il apparaît évident maintenant que la physiopathologie du paludisme grave est probablement beaucoup plus complexe qu'on a pu le penser initialement [39].

3.1.4. Formes cliniques du paludisme :

3.1.4.1. Paludisme de l'enfant (non encore prémuni en zone d'endémie) :

Le paludisme de l'enfant apparaît après la disparition de la protection du nouveau-né par les anticorps maternels et le remplacement progressif de l'HbF par l'HbA, après l'âge de 3 mois. L'enfant acquiert une immunité labile et incomplète, au prix de nombreux accès palustres graves. Il faut insister d'emblée sur la nécessité d'un traitement rapide et efficace et sur le rôle protecteur d'une supplémentation en vitamine A.

3.1.4.1.1. Les accès palustres non compliqués:

- toute fièvre chez un enfant en zone d'endémie palustre doit faire évoquer le paludisme,
- elle peut être isolée ou accompagnée de signes digestifs (vomissements, diarrhée surtout chez le nourrisson), de céphalées, de convulsions,
- la présence de convulsions ne doit pas être abusivement attribuée à une fièvre élevée, mais doit faire craindre l'installation d'un neuropaludisme.

3.1.4.1.2. Les formes graves :

Trois formes cliniques graves prédominent : le neuropaludisme, l'anémie grave, la détresse respiratoire. Les facteurs de gravité sont : le neuropaludisme (profondeur du coma, convulsions répétées, âge < 3 ans, parasitémie > 10 %), et l'hypoglycémie attribuée au paludisme. En zone d'endémie, plus de 90 % des décès sont observés chez des enfants.

Un coma peut survenir brutalement 12 à 24 heures après le début de la fièvre. L'examen du fond d'œil peut montrer des anomalies dont la sévérité est corrélée à la gravité (pâleur rétinienne, modifications vasculaires et/ou hémorragies rétiniennes et exsudats). Devant des troubles de la conscience, il faut rechercher une complication cérébrale (si possible par IRM) et éliminer une méningite bactérienne par une PL en l'absence de contre-indication.

Le syndrome de détresse respiratoire est en rapport avec l'acidose métabolique (dyspnée d'acidose). La défaillance cardio-respiratoire se définit par une hypotension (pression systolique inférieure à 70 mm Hg) associée à des signes de choc. L'hypotension doit faire suspecter une co-infection (à BGN), une infection nosocomiale ou une déshydratation chez le nourrisson [40].

3.1.4.1.3. Le paludisme congénital :

La réalité de l'infection transplacentaire du nouveau-né est admise, liée au passage de globules rouges parasités du placenta. Le paludisme congénital-maladie est rare. Il apparaît après un délai variable de 5 à 60 jours et le signe clinique constant est la fièvre.

3.1.4.2. Le paludisme de l'adulte :

Classiquement, l'adulte autochtone ne présente pas de formes graves en zone d'endémie palustre. En pratique, le paludisme grave de l'adulte est une réalité. C'est une pathologie émergente dont la recrudescence actuelle relève de plusieurs facteurs : urbanisation non contrôlée croissante, variations climatiques, usage erroné des antipaludiques, prolifération dense d'anophèles dans les quartiers périphériques des villes.

Par rapport au paludisme de l'enfant, l'hypoglycémie et l'anémie sont rares. On note la fréquence des tableaux polymorphes associant état de choc, insuffisance rénale, coagulopathie, hémoglobinurie et détresse respiratoire, l'atteinte neurologique étant alors au second plan. La mortalité est proche de 20 %. On note la fréquence des infections nosocomiales et des décès par choc septique.

3.1.4.3. Paludisme de la femme enceinte :

Le paludisme est beaucoup plus fréquent chez la femme enceinte, surtout pendant le 3^{ème} trimestre et à l'accouchement. Des complications aiguës et graves sont notées : mortalité fœto-maternelle, accès pernicieux palustre dans les régions d'endémie instable où les cas sont peu fréquents en dehors des épisodes épidémiques. En zone de paludisme stable, problèmes d'anémie chez la mère et retard de croissance fœtale responsable d'un déficit pondéral à la naissance, principalement marqué chez les primipares. Fréquence de l'hypoglycémie sévère après début du traitement par la quinine (qui favorise la libération d'insuline), de l'œdème pulmonaire, de l'anémie.

La prophylaxie pendant la grossesse dans les zones d'endémie doit être systématique.

Le rapport 2019 insiste particulièrement sur les conséquences du paludisme sur la santé maternelle et infantile.

3.1.4.4. Le paludisme transfusionnel :

Il survient 2 à 3 semaines après une transfusion. Dans les pays développés, le dépistage se fait chez les donneurs de sang ayant séjourné en zone d'endémie palustre depuis plus de 4 mois et

jusqu'à la 3ème année après leur retour, un séjour remontant à moins de quatre mois en zone d'endémie est une contre-indication absolue à un don homologué.

3.1.4.5. Le paludisme et l'infection à VIH/Sida :

Les infections par plasmodium et le VIH sont deux problèmes majeurs de santé publique notamment en Afrique subsaharienne. L'infection par le VIH augmente l'incidence des accès palustres d'autant que l'immunodépression est profonde. L'existence d'une parasitémie est associée à une majoration transitoire de la charge virale, surtout lorsque le niveau de parasitémie est élevé. La prise en charge comprend, outre le traitement de l'infection à VIH, l'application à large échelle des mesures de prévention du paludisme, l'utilisation du cotrimoxazole ou du traitement préventif intermittent du paludisme au cours de la grossesse, le traitement curatif de tout patient parasitémique fébrile, ainsi que l'amélioration de la sécurité transfusionnelle.

L'OMS recommande que toutes les femmes enceintes infectées par le VIH vivant dans des zones d'endémie palustre reçoivent un traitement préventif intermittent antipaludique par au moins deux doses de sulfadoxine-pyriméthamine afin de limiter les conséquences materno-placentaires de l'infection plasmodiale en association avec l'utilisation systématique des moustiquaires imprégnées.

Quant à la chimioprophylaxie par le cotrimoxazole recommandé chez les patients infectés par le VIH en Afrique subsaharienne lorsque le taux de CD4 est inférieur à 500/mm³, elle est très intéressante pour son efficacité antipaludique.

3.1.5. Diagnostic biologique :

3.1.5.1. Diagnostic biologique direct :

C'est un diagnostic d'urgence qui repose sur la mise en évidence des formes érythrocytaires de *Plasmodium* sur un prélèvement de sang périphérique. Le résultat doit être obtenu dans un délai maximal de 2 heures avec un contact direct entre le médecin prescripteur et le biologiste [41].

3.1.5.1.1. Le prélèvement :

Le plus simple est de recueillir, sur une lame porte-objet de microscope, une ou deux gouttes de sang par piqûre au doigt (face latérale de l'annulaire), au lobe de l'oreille ou au talon (chez l'enfant) et de confectionner immédiatement les étalements (frottis minces et/ou goutte épaisse).

3.1.5.1.2. Techniques de référence :

❖ Goutte épaisse

Cette technique très ancienne réalise une microconcentration, et reste la méthode de référence. Elle consiste à examiner environ 20 µl de sang après hémolyse des globules rouges et coloration selon la méthode de Giemsa. C'est une excellente technique mais de réalisation un peu délicate et qui nécessite une bonne expérience pour la lecture. Le diagnostic d'espèce n'est pas toujours possible. Le nombre de parasites pour 200 leucocytes doit être compté [42].

❖ Frottis mince

La lame est colorée selon la méthode de May-Grünwald-Giemsa ou par du Giemsa après fixation à l'alcool. Les parasites, colorés en rouge (noyau) et bleu (cytoplasme) sont retrouvés à l'intérieur des globules rouges (pas d'hémolyse dans cette technique). Le diagnostic positif et le diagnostic d'espèce s'en trouvent facilités. C'est une technique qui permet l'étude morphologique des hématozoaires. Le diagnostic différentiel entre les espèces plasmodiales reste toujours un défi même pour un lecteur qualifié. La sensibilité du frottis mince est entre 100-200 hématies parasitées/µl ; 50 parasites par µl [42].

3.1.5.1.3. Autres techniques :

Pour tenter de simplifier et d'améliorer le diagnostic biologique du paludisme, d'autres techniques ont été développées dont les tests rapides par immunochromatographie sur bandelette, le quantitative Buffy Coat (QBC) et les techniques moléculaires.

❖ Tests de diagnostic rapide immunochromatographiques :

Le principe de ces tests est la détection de protéines spécifiques de *Plasmodium* (antigènes HRP-2 ou enzymes pLDH, aldolase), en chromatographie sur un support solide. Certains de ces tests permettent maintenant d'affirmer un diagnostic positif (présence de *Plasmodium*) et d'orienter le diagnostic d'espèce : *P. falciparum* et/ou autre espèce. Ces tests rapides, très simples d'utilisation et conditionnés en emballages unitaires, sont très pratiques et ont une bonne sensibilité (surtout pour *P. falciparum* s'ils détectent l'antigène HRP-2) mais ne permettent pas de mesurer la parasitémie et restent positifs, pour certains, plusieurs jours après la disparition des plasmodies du sang. L'utilisation de ces tests rapides dans les

algorithmes de prise en charge du paludisme est recommandée lorsque l'examen microscopique n'est pas possible [43].

❖ **QBC Malaria® (Quantitative Buffy Coat) :**

Il s'agit d'une technique basée sur une centrifugation en tube capillaire et un marquage non spécifique des parasites par un fluorochrome (acridine orange). Il s'agit d'une technique de concentration, très facile à maîtriser, donnant une sensibilité équivalente à celle de la goutte épaisse (mais ne permettant pas un diagnostic d'espèce). En revanche elle nécessite un matériel spécifique. Sa commercialisation a été arrêtée.

❖ **Place de la biologie moléculaire :**

Des techniques de biologie moléculaire ont été développées pour le diagnostic du paludisme. Leur sensibilité est excellente et elles permettent un diagnostic d'espèce. Elles peuvent donc constituer une aide au diagnostic dans certains cas difficiles. Mais leur temps de réalisation et leur coût ne permettent pas, à l'heure actuelle, de les envisager en diagnostic de routine.

3.1.5.2. Diagnostic biologique indirect :

La sérologie n'est d'aucun apport pour le diagnostic d'urgence de l'accès palustre ; une sérologie positive signe uniquement un contact préalable avec le parasite.

Les indications de la sérologie sont [44] :

- le diagnostic rétrospectif d'un accès palustre (par exemple, patient traité en zone d'endémie sans argument biologique de certitude) ;
- le diagnostic d'un paludisme viscéral évolutif ou d'une splénomégalie palustre hyperréactive ;
- le contrôle des donneurs de sang ou d'organes à risque ;
- les enquêtes épidémiologiques.

3.2. Les antipaludiques :

3.2.1. Classification des antipaludiques :

3.2.1.1. Schizonticides érythrocytaires :

- **Amino-4-quinoleines** : chloroquine (Nivaquine®), amodiaquine (Flavoquine®), pipéraquline.

- **Amino-alcools** : quinine (Quinimax®, Surquina®, Quinine Lafranc®), méfloquine (Lariam®), halofantrine (Halfan®), luméfantrine.

- **Sesquiterpènes** : artémisinine et ses dérivés : dihydroartémisinine, artéméther, artésunate.

- **Antimétabolites** :

antifoliques : sulfadoxine, dapsone,

antifoliniques : proguanil (Paludrine®), pyriméthamine (Malocide®),

antibiotiques : cyclines (Doxypalu®, Granudoxy®Gé, Vibraveineuse®), clindamycine (Dalacine®, Zindacine®),

- analogues de l'ubiquinone : atovaquone.

3.2.1.2. Schizonticides intra hépatiques :

- Amino 8 quinoléines : primaquine (Primaquine®), tafenoquine (Krintafel®, Arakoda®).

- Antimétabolites : proguanil, cyclines.

3.2.1.3. Gamétocytocides :

- Amino 8 quinoléines : primaquine (Primaquine®), tafenoquine (Krintafel®, Arakoda®).

3.2.1.4. Associations et combinaisons d'antipaludiques à effet synergique schizonticide :

L'action synergique schizonticide de plusieurs molécules permet d'augmenter l'efficacité des médicaments antimalariques et d'obtenir une protection mutuelle des produits contre l'acquisition de résistance des plasmodies, essentiellement de *P. falciparum*.

Certaines de ces associations sont déjà anciennes :

- Quinine + tétracyclines en zones de quininorésistance (forêts d'Asie du sud-est et Amazonie);

- Sulfadoxine + pyriméthamine (Fansidar®)

- Méfloquine + sulfadoxine + pyriméthamine (Fansimef®, utilisé en Asie du sud-est),

- Chloroquine + proguanil (Savarine®, utilisée en chimioprophylaxie seulement),

Les « nouveaux » antimalariques sont tous associés, au moins en bithérapie :

- soit en associations libres (2 sortes de comprimés) : artésunate +

sulfadoxine/pyriméthamine (Arsudar®), artésunate + amodiaquine (Arsucam®), artésunate + méfloquine (Artequin®) ;

- soit en associations fixes (FDC : fixed dose combination) : atovaquone +

proguanil (Malarone®), artéméther + luméfantrine (Coartem®/Riamet®), artésunate + amodiaquine (AS/AQ®, Coarsucam®), artésunate + méfloquine (AS/MQ®).

3.2.1.5. La chloroquine :

3.2.1.5.1. Historique :

La chloroquine a vu le jour en 1936 sous le nom de sontochine, elle devient chloroquine en février 1946 et entre dans la pratique clinique l'année suivante comme antipaludique. Elle est mise sur le marché en 1949, en France sous le nom de NIVAQUINE® et aux États-Unis sous le nom d'ARALEN®.

3.2.1.5.2. Structure chimique :

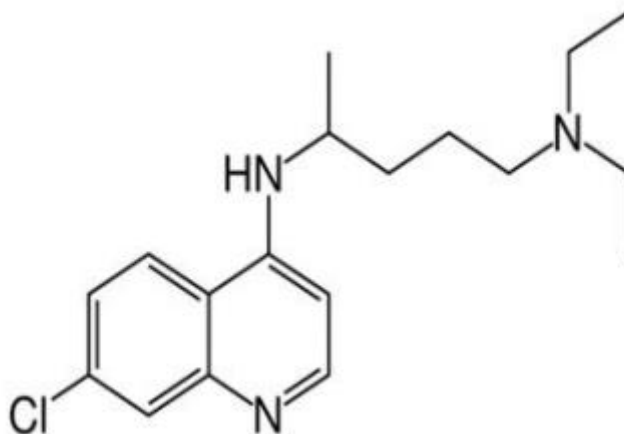


Figure 2 : Structure chimique de la chloroquine

Source: [http:// Medicinal/ Chemistry,.org/article/google scholar](http://Medicinal/Chemistry,.org/article/google%20scholar)
journal of medecine chemistry. Consult. 29-07-2022

3.2.1.5.3. Mécanisme d'action :

La chloroquine est un antipaludique de synthèse de la famille des amino-4-quinoléines. Elle exerce une action essentiellement schizontocide sur les formes érythrocytaires de *Plasmodium*.

Le mode d'action de la chloroquine (amino-4-quinoléine) est incomplètement élucidé. La chloroquine se lierait à la ferriprotoporphyrine IX pour produire un complexe toxique pour le parasite. On pense que l'efficacité de la chloroquine réside dans sa capacité à interrompre la détoxification de l'hème chez les parasites du paludisme au fur et à mesure de leur croissance dans les globules rouges de leur hôte [45, 46]. L'hématine est libérée en grandes quantités car le parasite consomme et digère l'hémoglobine dans sa vacuole alimentaire digestive. L'hème libre est très toxique pour le parasite. L'hème est normalement détoxifié par polymérisation en cristaux inoffensifs de pigment d'hémozoïne et peut-être aussi par un processus de destruction médié par le glutathion [47].

La chloroquine est inactive sur les formes intrahépatiques de *Plasmodium*.

3.2.1.5.4. Formulation :

La chloroquine (Nivaquine®) existait sous forme de comprimés dosés à 100 et à 300 mg, elle existait également sous forme de sirop pédiatrique dosé à 5 mg/ml et d'ampoule injectable dosée à 100 mg IM, la posologie était de 25 mg/kg en 3 jours. J1 et J2 : 10 mg/kg, J3 : 5 mg/kg.

3.2.1.5.5. Indication :

La chloroquine est utilisée dans la prise en charge de :

- Paludisme non compliqué
- Polyarthritides rhumatoïdes,
- Lupus érythémateux,
- Lupus systémiques,
- Lucites.

3.2.1.5.6. Résistance à la chloroquine :

Douze ans après l'introduction de la chloroquine dans les années 1940, les premiers cas de résistance de *Plasmodium falciparum* à cette molécule ont été observés [48]. Les souches résistantes se sont propagées régulièrement dans les années 1960 et 1970 à travers l'Amérique du Sud, l'Asie du Sud-Est et l'Inde. L'Afrique a été épargnée jusqu'à la fin des années 1970, lorsque des résistances ont été détectées au Kenya et en Tanzanie ; le médicament autrefois efficace est devenu de plus en plus inefficace [49, 50].

3.2.1.5.7. Mécanisme de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine :

Certaines études de terrain ont trouvé une association entre les mutations *Pfmdr1* et la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine [51, 52, 53].

Une étude menée depuis les années 2000 a montré que le *PfCRT*, un gène à 13 exons, a été identifié près de *cg2* sur le chromosome 7 [54]. Ce gène code pour PfCRT, une protéine transmembranaire présente dans les vacuoles digestives des parasites du paludisme. Des ensembles de mutations ponctuelles dans *PfCRT* ont été associés à la résistance à la chloroquine *in vitro* dans des lignées de laboratoire de *P. falciparum* d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie du Sud-Est. Une mutation, la substitution de la thréonine (T) à la lysine (K) en position 76 (K76T), était présente dans tous les isolats résistants et absente chez tous les isolats sensibles testés *in vitro*. De plus, des expériences de transformation génétique avec des plasmides exprimant des formes mutantes de *PfCRT* ont conféré une résistance à la chloroquine à trois clones différents sensibles à la chloroquine. Ces études ont mis en évidence le rôle clé de la mutation *PfCRT* T76 dans l'obtention d'une résistance *in vitro* à la chloroquine. Les auteurs s'accordent à reconnaître que la caractéristique commune des parasites résistants est

une altération de l'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive. Lorsqu'un parasite est résistant, il y a un efflux rapide de l'antipaludique de sa vacuole digestive, ce qui lui permet de survivre. Ces défauts d'accumulation du médicament seraient dus à une altération des gradients de pH et/ou de la perméabilité de la membrane (figure 3).

Selon Wünsch et *al*, la résistance à la CQ repose sur une stimulation de l'échange Na^+/H^+ [55]. Ils ont pu démontrer que la CQ stimule mieux l'échange Na^+/H^+ chez les parasites sensibles ce qui accroît le transport du médicament. Cependant, le contraire se produit chez les parasites résistants. Deux mécanismes majeurs ont été évoqués dans la diminution de la susceptibilité de *P. falciparum* à la chloroquine :

- L'accès restreint de la chloroquine à sa cible, l'hème, rendu insoluble par la diminution du pH dans la vacuole digestive consécutive aux changements du transport des ions via la protéine mutée PfCRT ;
 - Une expulsion directe de la chloroquine à partir de la vacuole digestive via la protéine mutée PfCRT, résultant d'une augmentation d'affinité pour ce transporteur de la chloroquine.
- Le rôle de pompage attribué au PfCRT pourrait aussi compter pour la divergence observée occasionnellement entre les mutations et la susceptibilité à la chloroquine. Dans ce cas, le parasite module sa réponse à la chloroquine en modifiant son niveau de production du PfCRT, au moins dans le système de remplacement allélique récemment développé pour les analyses fonctionnelles fines du gène *PfCRT* [56].

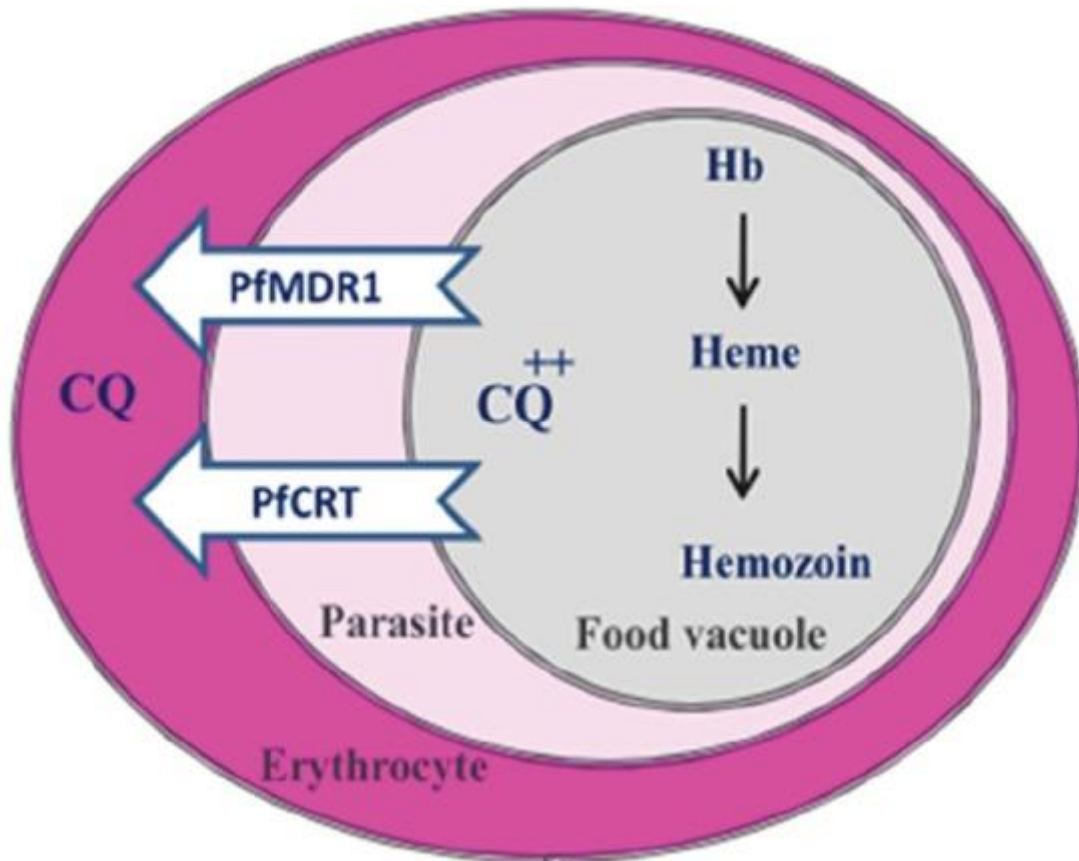


Figure 3: Mutations des gènes *Pfcrt* et *Pfmdr* entraînant un reflux de la chloroquine à l'extérieur de la vacuole digestive.

Source : <http://europepmc.org/article/PMC/5366359>. Consult 05-07-22

3.2.1.5.8. Les marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine :

3.2.1.5.8.1. *Pfmdr1* : *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 :

Des homologues du gène *Pfmdr*, responsables de la multirésistance des cellules cancéreuses aux médicaments anticancéreux ont été découvertes chez *P. falciparum* et nommés *Pfmdr1* et *Pfmdr2*. Le *Pfmdr2* est localisé sur le chromosome 14 de *P. falciparum*.

Ce gène ne présente pratiquement aucune variation entre les parasites sensibles et ceux résistants [57]. En revanche des variations dans le nombre de copies du gène *Pfmdr1*, le gène situé sur le chromosome 5 du parasite, associées ou non avec des mutations ponctuelles, ont été initialement considérées dans la chloroquinorésistance. Des mutations ponctuelles de *Pfmdr1* sont décrites comme liées à la chloroquinorésistance dans certaines études de terrain, par contre certains auteurs ont trouvé le contraire [58]. Le gène *Pfmdr1* code pour une

protéine de perméabilité d'un poids moléculaire de 170kD. Comme les homologues des cellules cancéreuses, cette protéine serait impliquée dans le transport transmembranaire de la chloroquine et d'autres molécules [59].

Une mutation au niveau du *Pfmdr1* Asn-Tyr en position 86 pourrait contribuer à la chloroquino-résistance [60] ; ou une augmentation du nombre de copies aurait aussi un impact sur la modulation de l'efficacité de l'artésunate, l'amodiaquine, l'artéméther et la luméfantine [61, 62].

3.2.1.5.8.2. *Pfprt* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) gene :

Il a été décrit dans le chapitre mécanisme de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine que la mutation, notamment le remplacement de l'acide aminé K par le T de la protéine PfCRT expliquait la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine. Cette observation a été confirmée par une étude réalisée sur terrain en adoptant le protocole de l'OMS 1996. Cette étude a montré que tous les patients porteurs d'une infection palustre après traitement à la chloroquine présentaient la forme mutée de ce gène [63]. L'allèle muté du gène *Pfprt* est également impliqué dans la baisse de sensibilité du parasite à l'amodiaquine et à la quinine [64, 65].

Différents haplotypes de *Pfprt* IEK, IET, MEK, MET, INK, INT, MNK, MNT (positions 74, 75, 76) ont été décrits. Les parasites chloroquino-sensibles présentent un haplotype CVMNK (positions 72-76) représentant l'allèle sauvage. Les allèles résistants sont CVIET pour l'Afrique et l'Asie et SVMNT pour l'Amérique du Sud et la Papouasie-Nouvelle Guinée.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme de la chloroquinorésistance.

La résistance de *P. falciparum* à la chloroquine pourrait être multigénique et est initialement conférée par les mutations dans le gène *Pfprt*. En présence des mutations sur le *Pfprt*, les mutations dans un second transporter (*Pfmdr1*) module le degré de résistance *in-vitro*, mais le rôle du *Pfmdr1* dans la survenue de la chloroquinorésistance après un traitement à base de chloroquine reste non élucidé [66]. La résistance à la chloroquine de *P. falciparum* est survenue spontanément moins de dix fois dans les cinquante dernières années [67]. Ceci suggère que la probabilité que le parasite lui-même développe la résistance est sous l'ordre de 1 sur 1020 multiplications du parasite [68].

3.2.1.5.9. Méthode d'évaluation de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine :

L'évaluation de la résistance à la chloroquine a été standardisée par l'OMS pour l'espèce *P. falciparum*. Il s'agit d'épreuves d'évaluation *in vivo*, *in vitro/ex vivo* et moléculaire.

3.2.1.5.9.1. Test *in vivo* :

Le test *in vivo* a évolué en passant par le protocole de 1973, qui a été révisé en 1996, celui-ci a été révisé en 2003. Les révisions les plus récentes ont concerné surtout l'évaluation de l'efficacité des combinaisons thérapeutiques à bases d'artémisinine.

❖ Résumé du protocole *in vivo* de l'OMS de 1973

Le test standard de l'OMS consistait en l'administration de 25 mg de chloroquine base par kg de poids corporel pendant 3 jours, avec une période d'observation de 7 jours. Les réponses étaient classées par Sensible (S) si les formes asexuées disparaissaient du sang dans les 7 jours suivant le début du traitement sans recrudescence ultérieure. Il y a résistance de type I (RI) s'il y a disparition des formes asexuées comme dans la sensibilité, suivie d'une recrudescence. Il y a résistance de type II (RII) s'il y a une réduction marquée de la parasitémie des formes asexuées mais sans clairance. Il y a résistance de type III (RIII) s'il n'y a pas de réduction marquée de la parasitémie des formes asexuées [69].

❖ Résumé du protocole *in vivo* de l'OMS de 1996

Le protocole de 1996 de l'OMS consistait à enregistrer les informations essentielles du patient, incluant l'évaluation clinique, la température corporelle, la parasitémie, le poids corporel au jour 0 (avant le traitement), le traitement était fait sous supervision avec 25mg/kg de poids corporel de chloroquine (fractionnée en trois prises : 10 mg/kg le jour 0 et le jour 1 ; 5mg/kg le jour 2). L'évaluation clinique et l'examen de la température corporelle sont effectués aux jours 1, 2, 3, 7 et 14 et l'examen de la parasitémie aux jours 3, 7 et 14 [70].

En fonction des résultats obtenus, les réponses peuvent être classées selon les cas suivants : échec thérapeutique précoce (ETP), échec thérapeutique tardif (ETT), réponse clinique adéquate (RCA).

On considère qu'il y a échec thérapeutique précoce si l'on constate la présence d'un des quatre critères suivants :

- ✓ goutte épaisse positive et symptômes de paludisme grave les jours 1, 2 ou 3;
- ✓ goutte épaisse positive (densité parasitaire > densité du jour 0) et fièvre le jour 2;
- ✓ goutte épaisse positive et fièvre le jour 3;
- ✓ goutte épaisse positive le jour 3 (densité parasitaire \geq 25 % de la densité parasitaire avant traitement).

L'échec thérapeutique tardif se définissait par la présence d'un signe de gravité du paludisme et une goutte épaisse positive entre le jour 4 et le jour 14.

On parle enfin de réponse clinique adéquate lorsque le malade présente une goutte épaisse négative au jour 14, soit lorsque le malade présente une goutte épaisse négative et qu'il reste apyrétique pendant le suivi, sans avoir auparavant satisfait aux critères d'échec thérapeutique précoce ou tardif.

❖ **Résumé du protocole *in vivo* de l'OMS de 2003**

Le protocole de 2003 est une révision de celui de 1996. En plus des autres jours de suivi, l'évaluation du patient continue hebdomadairement jusqu'au jour 28. C'est-à-dire le suivi se fait aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28 [71].

3.2.1.5.9.2. Test *in vitro/ex vivo*:

Il consiste à mesurer l'inhibition de la maturation en schizontes des parasites isolés chez un sujet directement (*ex vivo*) ou après des phases d'adaptation (*in vitro*), en présence de doses croissantes d'un antipaludique donné. Les tests actuellement utilisés sont : le test isotopique, les tests à base de fluorochrome, le ring stage survival assay (RSA). Ils sont basés sur la capacité des doses croissantes d'antipaludiques testés à empêcher la maturation des trophozoïtes de *P. falciparum* en schizontes, lorsque le prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI (Roosevelt Park Memorial Institute) et incubé à 37°C, en présence de CO₂ et de l'O₂, pendant 24 à 48 heures. Les résultats s'expriment en concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) pour le test isotopique et les tests à base de fluorochrome et en taux de survie pour le RSA.

3.2.1.5.9.3. Les tests moléculaires :

Plusieurs tests moléculaires sont actuellement disponibles mais c'est la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) classique qui est développée dans ce travail.

Principe :

Cette technique permet de génotyper les parasites. Il consiste en une amplification exponentielle de l'ADN plasmodial en présence d'une enzyme (Taq polymérase), d'amorces spécifiques et d'un milieu tampon. La révélation se fait par électrophorèse de l'ADN amplifié sur gel d'agarose à 2%.

Technique :

Cette technique décrite en 1986 par Kary Mullis [72], permet une amplification enzymatique *in vitro* de l'ADN initial. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent le fragment d'ADN à amplifier. Connaissant ces deux séquences, il faut synthétiser deux oligonucléotides qui vont servir d'amorces. Des cycles successifs sont entrepris, chaque cycle. Ce cycle comprend :

- Dissociation par la chaleur pour séparer les deux brins de l'ADN.
- Association avec les deux amorces spécifiques. La fixation des amorces aux brins d'ADN est rendue possible grâce à un abaissement de température. Un des deux oligonucléotides se fixe sur un brin de l'ADN, le deuxième sur l'autre.
- Elongation des amorces avec une DNA polymérase.

Cette technique a eu de l'ampleur avec la découverte en 1988 d'un ADN polymérase non inactivé par la chaleur [73]. Il s'agit de la Taq polymérase (isolée d'une bactérie thermophile adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude ("*Thermus aquaticus*")). Avec la Taq polymérase on peut effectuer un nouveau cycle (dissociation, Association des amorces, réplication de l'ADN) sans avoir à ajouter chaque fois de l'enzyme. Il est maintenant possible d'automatiser ces réactions grâce à des thermocycleurs programmables en température et en temps.

3.2.1.6. Autre méthode d'évaluation de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine : la méthode de GRI (Genotype Resistance Indice) et de GFI (Genotype Failure Indice) (DJIMDE A et al.,) [23] : C'est une méthode mathématique qui consiste à déterminer le taux de résistance parasitologique et d'échec thérapeutique à partir du taux de résistance génotypique. Pour cela les auteurs ont mesuré la prévalence de la résistance parasitologique, d'échec thérapeutique et le taux de prévalence de l'allèle mutant *Pfcr*t 76T de quelques sites sentinelles parmi lesquels Kollé ; pour calculer le GRI et le GFI.

Le GRI et le GFI tous les deux variaient entre 1,6 et 2,8. Ces variations étaient fonction de l'âge.

Ils trouvèrent des GRI et GFI stables et proches entre les sites, qui étaient différents sur le plan épidémiologique. Les résultats obtenus ont permis d'estimer les taux de résistance parasitologique et d'échec thérapeutique à partir du taux de résistance moléculaire. Le GRI est calculé en divisant la prévalence de la résistance génotypique (*Pfcr*t T76) par la prévalence de la résistance parasitologique. Le GFI est déterminé de façon similaire en calculant le ratio de la résistance génotypique (*Pfcr*t T76) et l'échec thérapeutique.

C'est une méthode qui permet de déterminer rapidement la prévalence de la résistance parasitologique et d'échec thérapeutique en divisant respectivement la prévalence moléculaire par le GRI et le GFI [23].

METHODOLOGIE

4. METHODOLOGIE :

4.1. Description du site d'étude :



Figure 4 : Carte du Mali montrant la position de notre site d'étude.

Source : <https://www.unicef.org>

Kollé est un village de 3.000 habitants, situé à 57 km au Sud-ouest de Bamako. Limité au sud par le fleuve Niger distant de 9 km, à l'ouest par Samako, au sud-ouest Bancoumana dont il est distant de 3 km, au nord par Ténéya, au nord-est par Coursalé. La transmission du paludisme y est saisonnière avec une allure hyperendémique sur une courte saison de 3 à 4 mois avec un indice plasmodique (IP) situé entre 40 et 50 % en saison sèche et entre 70 et 85 % en saison pluvieuse. Le taux d'inoculation entomologique durant la période de forte transmission est de 5,2 piqûres infectantes par personne et par mois. Kollé a été l'objet de plusieurs de nos études par le passé.

4.2. Description de l'échantillonnage et du type d'échantillon :

Nous avons estimé la taille de notre échantillon par convenance. Les confettis avant traitement ont été préalablement collectés des études antérieures menées à Kollé

Nous avons estimé 50 échantillons par année de façons aléatoire sur les 15 années d'étude soit 750 échantillons. En estimant 10% de données non interprétables, le total faisait 825.

4.3. Type et Période d'étude :

Nous avons mené une étude rétrospective. Les échantillons utilisés sont issus des études antérieures menées à Kollé de 2001 à 2015. L'analyse moléculaire a été faite durant la période de 2020 à 2021.

4.4. Analyse moléculaire :

L'analyse moléculaire a été effectuée dans le laboratoire annexe de l'Unité d'Épidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance (abrégé MEDRU en anglais, Molecular Epidemiology and Drug Resistance Unit) du Département d'Épidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Pharmacie (FAPH) de l'Université des Sciences des Techniques et de Technologies de Bamako (USTTB) sis à Sotuba.

L'analyse a porté sur les papiers buvards imbibés de sang des patients n'ayant pas pris de médicaments, séchés et gardés à l'abris de l'humidité.

Nous avons procédé à l'extraction de l'ADN, à l'amplification, à la migration, à la révélation par photographie aux rayons UV des marqueurs de la chloroquinorésistance et à l'interprétation des résultats obtenus. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) basée sur la méthode de restriction enzymatique a été utilisée pour la recherche de mutation.

Il s'agit d'identifier la mutation ponctuelle au codon 76 du gène *PfCRT* et au codon 86 du gène *PfMDR1*.

4.5. Extraction de l'ADN :

4.5.1. Matériel et réactifs :

Blouse, paire de gants, paire de ciseaux, papier hygiénique, confettis, marqueur indélébile, racks, tubes eppendorf, Becher, poubelle, micropipette (100, 200, 1000 µl), embouts (100, 200, 1000 µl), QIAamp DNA Mini Kit, hotte, plaque chauffante, thermomètre à mercure, Bain-marie, vortex, Eau pour nettoyage des ciseaux, congélateur.

4.5.2. Mode opératoire :

L'extraction de l'ADN plasmodial a été faite à l'aide du Kit QIAGEN dont la procédure est la suivante :

- Découper approximativement 3 mm² du papier buvard imprégnés de sang, le transférer dans un microtube de 1,5ml, puis ajouter 180 µl de tampon ATL et incuber à 85°C pendant 10 minutes. Puis centrifuger brièvement.
- Ajouter de 20 µl de Protéinase K, homogénéiser, et incuber à 56°C sur une plaque chauffante ou un bain –marie pendant une heure. Puis centrifuger brièvement.
- Ajouter 200 µl de tampon AL puis homogénéiser, et incuber à 70°C pendant 10 minutes. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du couvercle du tube.
- Ajouter 200 µl d'éthanol (96-100%) à la solution précédente puis homogénéiser. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du couvercle du tube.
- Transférer les solutions dans des colonnes QIAamp, fermer la colonne puis centrifuger à 8 000 rotations par minute (rpm) pendant 1 minute.
- Placer les colonnes dans des nouveaux tubes de collection, suivi de l'ajout de 500 µl de tampon AW1, puis centrifuger à 8 000 rpm pendant 1 minute.
- Retirer et placer les colonnes dans des nouveaux tubes de collection, ajouter 500 µl de tampon AW2, puis centrifuger à 14 000 rpm pendant 3 minutes.
- Répéter cette étape si nécessaire pendant 1 minute.
- Placer les colonnes dans des tubes pré labellisés de 1,5 ml puis ajouter de 150 µl de tampon AE et incuber à la température ambiante pendant 1 minute puis centrifuger à 8 000 rpm pendant 1 minute.
- Utiliser directement cet éluat ainsi obtenu ou garder à la congélation à – 20 C ou – 80C pour une congélation a température.

4.5.3. Recherche des mutations des codons 76 du gènes *Pfcr*t et 86 du gènes *Pfmdr*1 :

La PCR nichée a été utilisée suivie de la digestion enzymatique pour l'analyse moléculaire des échantillons.

4.5.3.1. Matériels :

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

4.5.3.2. Préparation des réactifs de PCR :

- dNTPs : une solution de travail équimolaire des quatre dNTPs de 2mM était préparée à partir d'un stock de 100mM.
- Solution tampon (PCR Buffer) : concentrées à 10X, elles étaient fournies par les compagnies commerciales avec le Mg²⁺. Pour le stock de travail, préparait les aligots de 5X avec une teneur de 7,5mM Mgcl₂ ; 12,5mM Mgcl₂ et 17,5mM Mgcl₂.
- Amorces (Primer) : elles venaient sous forme de poudre (lyophilisée), à partir de la poudre, le stock de travail 100µM (ou 100x) était préparé ; la concentration finale dans le tube réactionnel était de 1µM.
- TBE : pour constituer une solution de stock de travail d'un litre avec une concentration de 5X et avec un pH = 8. Prenait 54g de Tris base (89mM) ; 27,5g d'acide Borique (89mM) ; et 0,37g d'EDTA Na (2mM), à dissoudre dans un litre d'eau deionisée. La solution finale était 0,5 fois concentrée soit 0,5X.
- Colorants de migration : il s'agit du bleu de Bromophénol (BB) et xylène cyanol (XC). Pour préparer chacun des colorants, on prenait 35ml de glycérol, 15ml d'eau deionisée et 0,125g soit du bleu de bromophénol ; soit du xylène cyanol.
- Marqueur de poids moléculaire : ce marqueur de poids moléculaires constituait la solution de référence. Pour la résuspension, on dilue 100µl de paires de bases de l'ADN dans 400µl d'eau stérile. Puis on associe 100µl du colorant bleu six fois concentré, pour former un mélange de 600µl.

Les techniques

❖ **Génotypage du gène *Pfcr*** : une PCR niché a été faite pour amplifier le fragment du gène *Pfcr* portant la mutation ponctuelle au codon 76.

• Première amplification :

Les séquences des couples d'amorces ayant servi à l'amplification le fragment du gène *Pfcr* pour le codon 76 sont :

CRT-P1: CCGTTAATAATAAATACACGCAG

CRT-P2: CGGATGTTACAAAACACTATAGTTACC

Identifié les tubes de 200 ou 500µl conformément aux numéros des confettis à traiter. Puis nous avons préparé le mélange des réactifs dans un tube de 1,5ml, en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau I. Ensuite repartir dans chaque tube identifié 20µl du mélange. Puis ajouter 5µl d'ADN extrait dans le tube correspondant ce qui fait un volume total de 25 µl. Ensuite centrifuger brièvement les tubes. Ensuite placer les tubes bien fermés dans la machine pour l'amplification avec le programme approprié selon le tableau II.

Tableau I: Composition du mélange réactionnel pour la première amplification du gène *Pfprt*.

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction en µl
H2O	-	11.875
5X Tampon 12,5mM Mg ²⁺	1X (2,5mM Mg ²⁺)	5
10XDNTP's	1X (200µM)	2.5
100X CRT-P1+CRT-P2	1X (1µM)	0.25
TAQ Polymérase (5U/µl)	0,625 U	0.125
ADN		5
TOTAL		25 µl

Tableau II: Programme de la première amplification du gène *Pfprt*.

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

- **La deuxième amplification :**

Séquences du couples d'amorce ayant servi à amplifier le fragment du gène *Pfprt* pour le codon 76

CRT-D1 : TGTGCTCATGTGTTTAACTT

CRT-D2 : CAAAACCTATAGTTACCAATTTTG

Comme pour la première amplification, identifier les tubes de 200 ou 500µl. Conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter.

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

Après nous avons reparti dans chaque tube identifiée 24µl de la solution du mélange.

Puis ajouter 1µl du produit de la 1 ère amplification dans le tube correspondant ce qui fait un volume total de total 25 µl.

Ensuite centrifuger brièvement les tubes. Les tubes bien fermes sont à la fin places dans la machine pour l'amplification selon le programme approprié (tableau IV).

Tableau III : Composition du mélange réactionnel pour la deuxième amplification du codon 76 du gène *Pfcr*.

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction en µl
H2O	-	15.875
5X Tampon 12,5mM Mg ²⁺	1X (2,5mM Mg ²⁺)	5
10XDNTP's	1X (200µM)	2.5
100X CRT-D1+CRT-D2	1X (1µM)	0.25
TAQ Polymérase (5U/µl)	0,625 U	0.125
ADN(Produit de la PCR 1)		1
TOTAL		25 µl

Tableau IV : Programme de la deuxième amplification du codon 76 du gene *Pfcr*.

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

▪ **La digestion du produit de la deuxième amplification :**

Trier les échantillons qui ont des bandes correctes plus les quatre témoins. Numéroté des nouveaux tubes de 200 ou 500µl conformément aux numéros du produit de la deuxième

amplification à traiter. Ensuite préparé le mélange des réactifs dans un tube 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter (tableau V).

Après repartir dans chaque tube identifie 15µl du mélange.

Ensuite ajouter 5µl du produit de la deuxième amplification dans le tube correspondant. Puis brièvement centrifuger. En fin placer les tubes dans l'incubateur, ou le bain marie, ou les plaques chauffantes.

La digestion a été faite à une température de 50°C pendant 6heures au minimum.

Procéder à l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pendant au moins 30 mn à 100 V.

En fin faire la révélation sous UV. Puis prendre la photo du gel, et l'interpréter.

Tableau V: Composition du mélange réactionnel pour la digestion du codon76 du gène *Pfcrt*.

Réactifs	Concentrations Finales	Volume par réaction en µl
H2O	-	12,55
10X Buffer N°3	1X	2
100xBSA	1X	0,2
Enzyme (Apo 1) 10000U /ml	2,5U	0,25
ADN	-	5
TOTAL		20

❖ **Interprétation de la photo de la digestion :**

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

La taille attendue pour les produits d'amplifications est de 537 pb pour la 1ère amplification et de 134 pb pour la 2ème amplification. L'enzyme ne coupe que les souches de génotypes sauvages. Les bandes de la même taille que le témoin sauvage (100pb) correspondent aux souches sauvages. En revanche celles qui ont la même taille que le témoin mutant (134pb) correspondent aux souches mutantes. Les échantillons présentant à la fois les deux bandes (sauvage et mutante) correspondent aux isolats mixtes.

❖ **Génotypage du gène *Pfmdr1* :**

• **La première amplification :**

Séquences du couples d'amorces ayant servi à l'amplification du fragment du gène *Pfmdr1* au codon 86 sont :

MDR-1 : ATGGGGTAAAGAGAGAAAGA

MDR-2 : AACGCAAGTAATACATAAAGTCA

Identifier les tubes de 200 ou 500µl conformément aux numéros des confettis à traiter. Puis nous avons préparé le mélange des réactifs dans un tube de 1,5ml, en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau I. Ensuite repartir dans chaque tube identifié 20µl du mélange. Puis ajouter 5µl d'ADN extrait dans le tube correspondant ce qui fait un volume total de 25 µl. Ensuite centrifuger brièvement les tubes. Ensuite placer les tubes bien fermés dans la machine pour l'amplification avec le programme approprié selon le tableau VI.

Tableau VI: Composition du mélange réactionnel pour la première amplification du gène *Pfmdr1*.

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

Tableau VII : programme de la première amplification du codon 86 gène *Pfmdr1*.

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

- **La deuxième amplification du gène *Pfmdr1***

Séquences du couple d'amorces utilisées sont les suivantes :

MDR-3 : TGGTAACCTCAGTATCAAAGAA

MDR-4 : ATAAACCTAAAAAGGAACTGG

Nous avons identifié les tubes de 200 ou 500µl conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter. Ensuite nous avons préparé le mélange dans un tube 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon le tableau VI. Puis repartir dans chaque tube identifié 24µl de la solution du mélange.

Ensuite ajouter 1µl du produit de la 1^{ère} amplification dans le tube correspondant ce qui fait un volume total de total 25 µl.

Puis centrifuger brièvement les tubes, fermer et placer les dans la machine pour l'amplification selon le programme approprié (tableau VII).

Tableau VIII: Composition du mélange réactionnel pour la deuxième amplification du codon 86 du gène *Pfmdr1*.

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction en µl
H2O	-	16,125
5X Tampon 12,5 Mg ²⁺	1X (2,5mM Mg ²⁺)	5
10X dNTPs	1X (100µM)	2,5
100X Amorces MDR3+4	1X (1µM)	0,25
Taq Polymérase (5U/µl)	0,625 U	0,125
ADN (Produit de la PCR1)		1
TOTAL		25

Tableau IX: Programme de la deuxième amplification du codon 86 du gène *Pfmdr1*.

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

▪ **La digestion du produit de la deuxième amplification :**

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

Ensuite nous avons ensuite ajoutée 5µl du produit de la deuxième amplification dans le tube correspondant ce qui fait un volume total de total 20 µl.

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

Tableau X: Composition du mélange réactionnel pour la digestion du codon 86 du gène

Réactifs	Concentrations Finales	Volume par réaction en µl
H2O	-	12,55
10X Buffer N°3	1X	2
100xBSA	1X	0,2
Enzyme (AFLIII 1) 10000U /ml	2,5U	0,25
ADN	-	5
TOTAL		20 µl

Pfmdr1.

• **Interprétation de la photo :**

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

Les échantillons dont les bandes étaient au même niveau que la bande du témoin positif sauvage (3D7 : 521bp), étaient considérés comme souches sauvages.

Les échantillons dont les bandes étaient au même niveau que la bande du témoin positif mutant (Dd2 :200bp) étaient considérés comme souches mutantes. En revanche, les échantillons qui avaient trois bandes l'une au niveau du témoin positif sauvage et deux autres

au niveau du témoin positif mutant étaient considérés comme mixtes ; c'est-à-dire présentent à la fois des souches avec allèle sauvage et des souches avec allèle mutant.

4.6. Détermination de la résistance parasitaire à partir de la prévalence moléculaire :

Selon le modèle mathématique décrit dans les publications de DJIMDE A et *al.*, en 2001 [23], le GRI et le GFI tous les deux variaient entre 1,6 et 2,8. Ces variations étaient fonction de l'âge ; comme nous ne nous sommes pas intéressés à l'âge de la population dans laquelle ces échantillons biologiques ont été tirés car les bases de données démographiques de certaines de ces études antérieures ne sont plus disponibles. Nous avons donc utilisé la moyenne des index qui correspondait à 2,2. La résistance parasitaire a donc été estimée en divisant les prévalences de *PfCRT* par 2,2.

4.7. Analyses statistiques :

Les données ont été saisies sur le logiciel Excel et analysées sur R version 3.5.1. Le test de χ^2 a été utilisé pour comparer les proportions. Le seuil de signification statistique a été fixé à 5%.

4.8. Considérations éthiques :

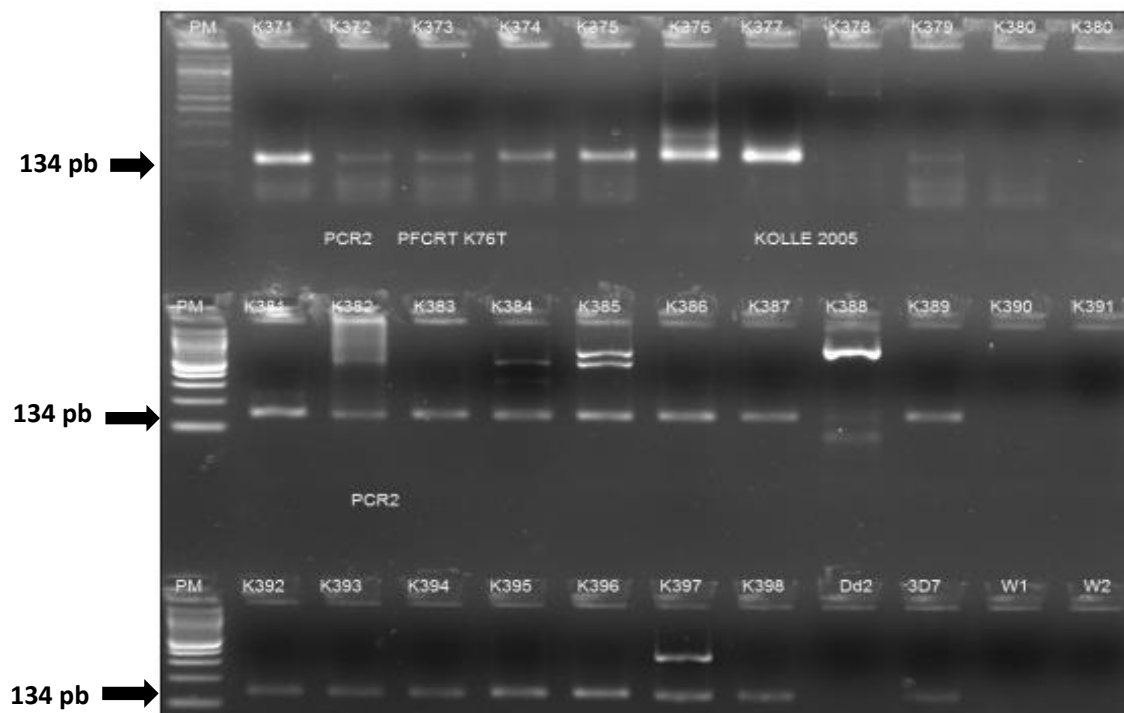
L'étude mère a été soumise à l'approbation du comité d'éthique de la FMPOS. Tous les participants ont donné leur consentement éclairé et volontaire avant leur inclusion dans l'étude.

RESULTATS

5. RESULTATS :

Au total, 652 échantillons ont été analysés, qui ont été répartis sur les 12 ans d'étude en fonction de la disponibilité des prélèvements.

5.1. La prévalence des allèles du gène *Pfprt* de 2001 à 2015 :



*Figure 5 : photo du gel d'électrophorèse du produit de la deuxième PCR du gène *Pfprt* K76T. (source MEDRU/MRTC/Bassirou)*

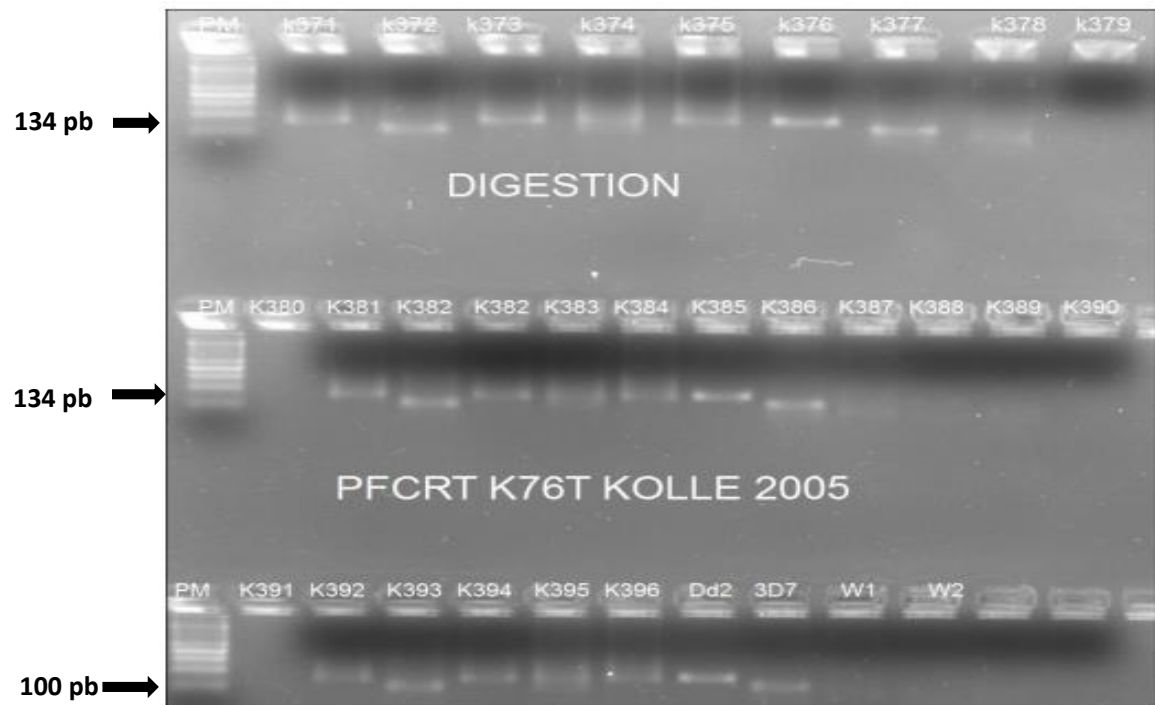


Figure 6 : Photo du gel d'électrophorèse du produit de la digestion PCR du gène *Pfcrt K76T*. (source : MEDRU/MRTC/Bassirou DIAKITE)

- **Interprétation de la photo :**

La taille attendue 2^{ème} amplifications est de 134 pb. L'enzyme ne coupe que les souches de génotypes sauvages. Les bandes de la même taille que le témoin sauvage (100pb) correspondent aux souches sauvages. En revanche celles qui ont la même taille que Dd2(134pb) correspondent aux souches mutantes. Les échantillons présentant à la fois les deux bandes (sauvage et mutante) correspondent aux souches mixtes

Tableau XI: Prévalences des allèles du gène *Pfcr*t par année à Kollé :

<i>Pfcr</i> t K76T				
Année	Sauvages n (%)	Mixte n (%)	Mutants n (%)	Total
2001	18 (31)	2 (3,5)	38 (65,5)	58
2002	15 (26,8)	2 (3,6)	39 (69,6)	56
2003	6 (16,7)	2 (5,6)	28 (77,8)	36
2004	14 (25)	3 (5,4)	39 (69,6)	56
2005	14 (26,4)	2 (3,8)	37 (69,8)	53
2007	14 (26,4)	0 (0,0)	30 (68,2)	44
2008	14 (22,2)	0 (0,0)	49 (77,8)	63
2010	16 (23,5)	3 (4,4)	49 (72,1)	68
2012	19 (31,7)	6 (10)	35 (58,3)	60
2013	8 (12,9)	1 (1,6)	53 (85,5)	62
2014	3 (6,8)	2 (4,5)	39 (88,6)	44
2015	5 (17,2)	3 (10,3)	21 (72,4)	29
Total	146 (23,2)	26 (4,1)	457 (72,7)	629

La prévalence de l'allèle mutant du codon 76 de *Pfcr*t variait entre 58,3 % et 88,6 % pendant les 12 ans. La différence n'était pas statistiquement significative ($p = 0,05$), Chi2.

5.2. La prévalence des allèles du gène *Pfmdr1* de 2001 à 2015 à Kollé :

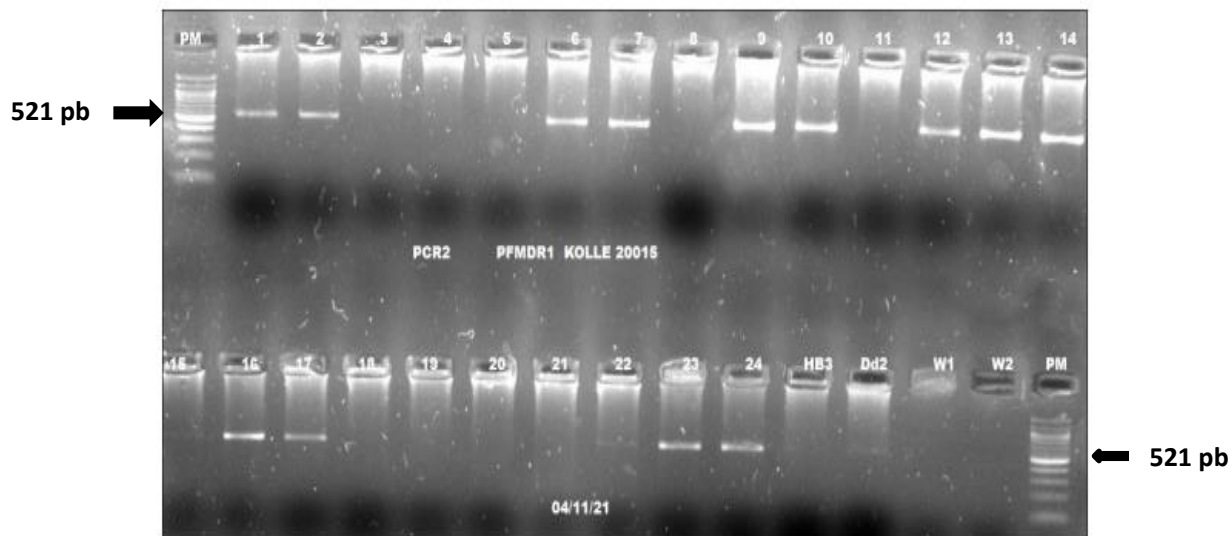


Figure 7 : photo du gel d'électrophorèse du produit de la deuxième PCR du gène *Pfprt K76T* (Source MEDRU/MRTC/Bassirou DIAKITE).

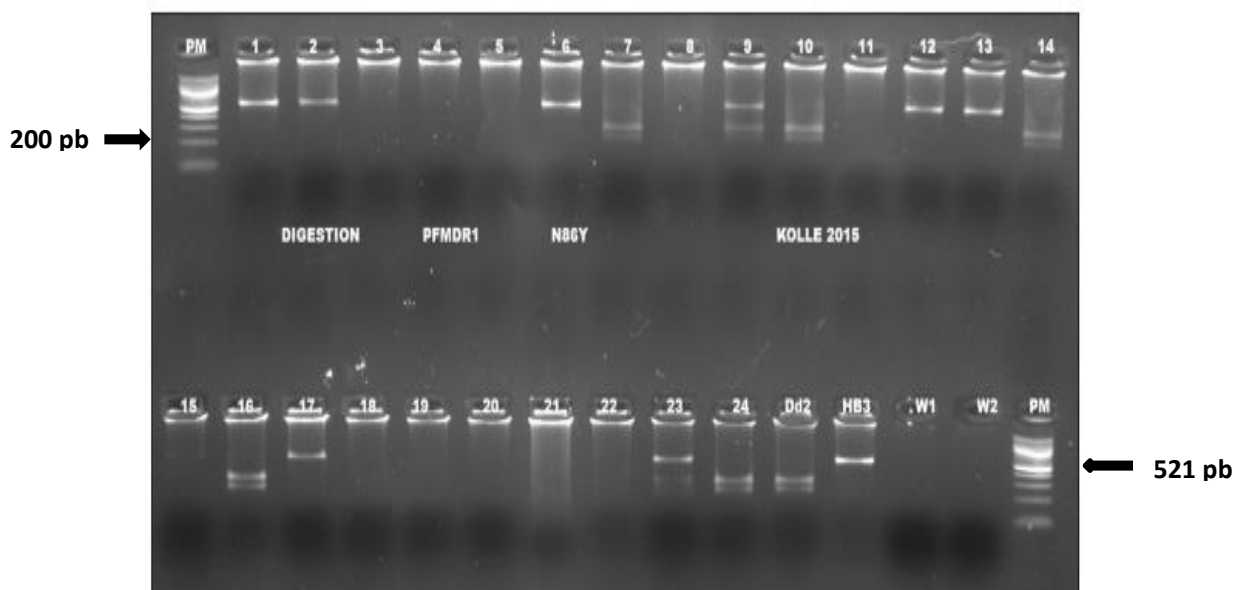


Figure 8 : Photo du gel d'électrophorèse du produit de la digestion PCR du gène *Pfmdr1 N86Y* (Source MEDRU/MRTC/Bassirou DIAKITE).

- **Interprétation de la photo :**

Les échantillons dont les bandes étaient au même niveau que la bande du témoin positif sauvage (HB3 : 521bp), étaient considérés comme souches sauvages.

Les échantillons dont les bandes étaient au même niveau que la bande du témoin positif mutant (Dd2 :200bp) étaient considérés comme souches mutantes. En revanche, les

échantillons qui avaient trois bandes l'une au niveau du témoin positif sauvage et deux autres au niveau du témoin positif mutant étaient considérés comme mixtes ; c'est-à-dire présentent à la fois des souches avec allèle sauvage et des souches avec allèle mutant.

Tableau XII: prévalence des allèles du gène *Pfmdr1* par année à Kollé.

<i>Pfmdr1</i> N86Y				
Année	Sauvages n (%)	Mixtes n (%)	Mutants n (%)	Total
2001	53 (81,5)	3 (4,6)	9 (13,8)	65
2002	23 (60,5)	9 (23,7)	6 (39,5)	38
2003	32 (64,0)	5 (10)	13 (26)	50
2004	41 (70,7)	6 (10,3)	11 (19)	58
2005	36 (62,1)	8 (13,8)	14 (24,1)	58
2007	28 (68,3)	3 (7,3)	10 (24,4)	41
2008	51 (78,5)	5 (7,7)	9 (13,3)	65
2010	53 (70,7)	3 (4,0)	19 (25,3)	75
2012	42 (73,7)	3 (5,3)	12 (21,1)	57
2013	42 (80,8)	0 (0,0)	10 (19,2)	52
2014	49 (76,6)	5 (7,8)	10 (15,6)	64
2015	17 (63)	4 (14,8)	6 (22,2)	27
Total	469 (71,9)	54 (8,3)	129 (19,8)	652

Les prévalences de l'allèle mutant du codon 86 de *Pfmdr1* variait entre 13,8 % et 39,5 % pendant les 12 ans dans notre population d'étude avec une prévalence globale de **19,9** %. La différence n'était pas statistiquement significative au cours des années (**p = 0,08**), Chi2.

La proportion des allèles mutant du codon 76 du gène *Pfcrf* était élevée et quasiment constante sur les 12 ans. L'allèle mutant du *Pfmdr1* évoluait très peu et était maintenu à une proportion relativement faible (figure 9).

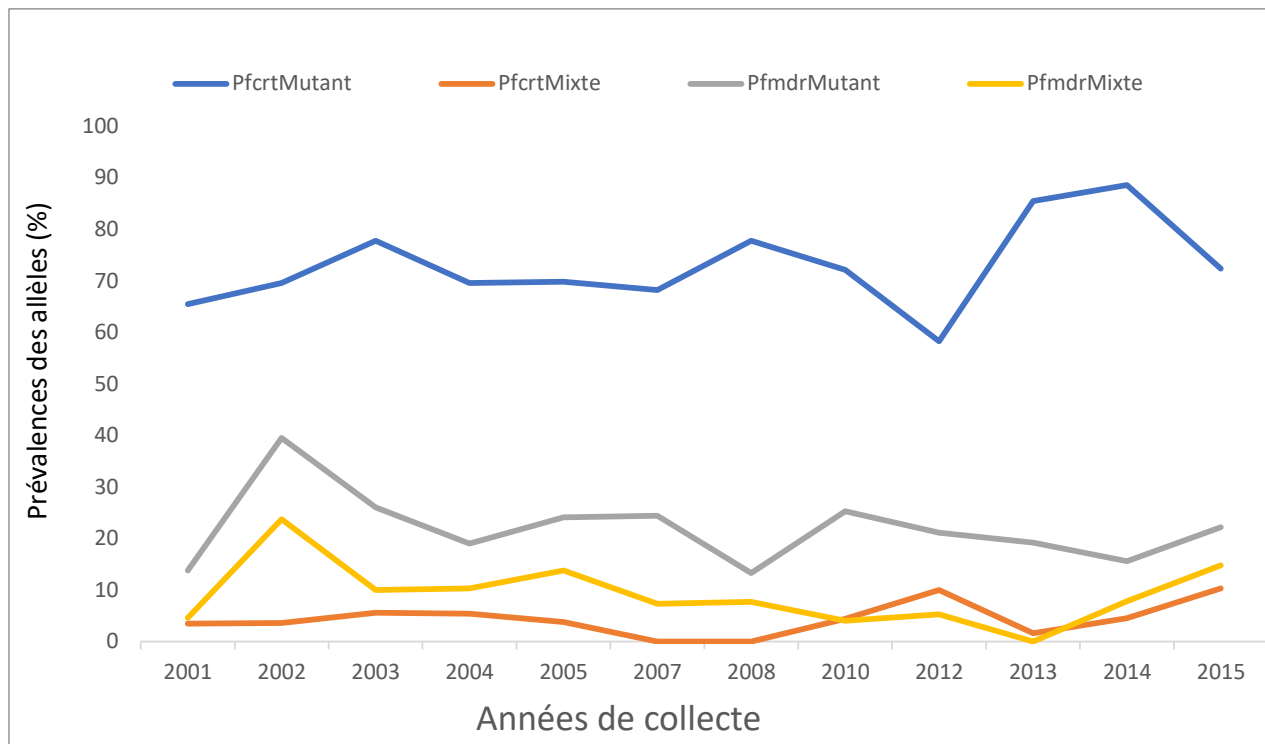


FIGURE 9 : Dynamique des allèles des codons 76 et 86 des gènes *Pfcrf* et *Pfmdr1* par année.

5.3. La résistance *in vivo* à la chloroquine par le modèle d'Index de Résistance

Génotypique (GRI)[23] :

Tableau XIII: L'estimation de la résistance *in vivo* à la chloroquine à partir du ratio de la prévalence moléculaire *PfCRT76T* et l'index moyen de résistance génotypique 2,2 [23].

Année	Prévalence <i>PfCRT76T</i> %	Résistance <i>in vivo</i> %
2001	69	31,36
2002	73,2	33,27
2003	83,4	37,9
2004	75	34,1
2005	73,6	33,45
2007	68,2	31
2008	77,8	35,36
2010	76,5	34,77
2012	68,3	31,05
2013	87,1	39,59
2014	93,1	42,31
2015	82,7	37,59
Moyenne	77,32	35,1

La prévalence de la résistance *in vivo* est restée élevée tout au long des années d'étude avec une moyenne de **35,1%**. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les niveaux de résistance *in vivo* au cours des années (**p > 0,05**), **Chi2**.

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION :

L'analyse a porté sur 652 échantillons collectés dans le village de Kollé de 2001 à 2015 au cours des essais cliniques antérieures. Il était convenu de rechercher et analyser 50 échantillons par an, mais en fonction de la disponibilité des échantillons, il y a une fluctuation, ce qui explique la variation du nombre de confettis analysés par an. Pour certaines années, le nombre a dépassé 50 et pour d'autres années le nombre était inférieur à 50.

Ce travail a porté d'une part, sur la détermination et la comparaison par année des différents allèles des deux marqueurs moléculaires utilisés dans le cadre de la surveillance de la chloroquinorésistance de *P. falciparum* et d'autre part, de déterminer la résistance *in vivo* de la chloroquine par le modèle d'Index de Résistance Génotypique (GRI) à Kollé. Ces marqueurs moléculaires étaient constitués de *Pfcrtr* K76T et de *Pfmdr1* N86Y.

La PCR-RFLP a été utilisée pour le gétypage de ces deux marqueurs.

6.1. Prévalence de l'allèle mutant *Pfcrtr* K76T :

Dans cette étude, la prévalence globale des allèles mutants *Pfcrtr* K76T était de **72,7%**. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative ($p = 0,05$). Cette prévalence élevée et constante de l'allèle mutant au cours des années pourrait s'expliquer par le fait que la prévalence de la mutation était déjà très élevée au moment de l'arrêt de la chloroquine mais aussi certaines molécules utilisées telles que l'amodiaquine et la pipéraquline en combinaison post arrêt auraient contribué à garder la pression de sélection.

Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par SRIMUANG K *et al.* soit un taux de mutation à 98.2% en Asie du sud-est en 2015 [74].

Ces résultats sont comparables à ceux observés par DJIMDE A. *et al.*, en 2003 au Mali [11].

Ces résultats sont comparables à ceux observés par RETENG P. *et al.*, soit un taux de mutation à 74,5% en Indonésie en 2017 [75].

TEKETE. M *et al.*, avait également obtenu une prévalence de 70% des allèles mutants *Pfcrtr* K76T en 2009 dans la même localité [76].

La prévalence globale observée dans notre étude est similaire à celle obtenue par LY O. *et al.*, en 2012 à Pikine au Sénégal, qui ont trouvé une prévalence de l'allèle mutant *Pfcrtr*K76T de près de 72,4 % [77].

Les résultats obtenus dans notre étude sont comparables à ceux de ATROOSH W.M *et al.* en Malaisie en 2012 avec une prévalence de mutation de 77% de *Pfcrtr*K76T [78].

Ces résultats sont plus élevés que ceux obtenus par APINJOH T *et al.*, au Cameroun en 2017 soit une prévalence de 47,3% de mutants [79].

Au Sénégal, FALL B et *al.*, ont trouvé une prévalence de *Pfcr*76T de 50% en 2015 [80]. Cette constance dans la dynamique de la prévalence de la chloroquinorésistance est un phénomène rencontré partout en Afrique ; elle pourrait s'expliquer par la pression de l'usage des médicaments partenaires de certaines CTAs et des médicaments de la CPS qui ont une action analogue entraînant une sélection croisée des marqueurs moléculaires de la résistance. Cependant, nos résultats sont différents de ceux observés par DARA A et *al.*, en 2008 au Mali dans la localité de Pongonon [81] et par SONDO P et *al.*, en 2020 à Bobo Dioulasso au Burkina Faso [22], qui avaient trouvé respectivement 33,3% et 20,6% de prévalence d'allèles mutants du gène *Pfcr*. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence des faciès épidémiologiques ou par l'absence probable de la pression médicamenteuse liée à des molécules antipaludiques sélectionnant le gène *Pfcr* mutant dans la localité de Pongonon. Cependant nos résultats étaient différents de ceux de LAUFER MK et *al.*, qui ont trouvé au Malawi une décroissance de l'allèle mutant *Pfcr* K76T de 15,3% en 1998 à 9,2% en 2005 [13]. Cette différence pourrait s'expliquer par l'arrêt de la chloroquine dans cette zone. Mwanza S et *al.*, ont décrit l'absence de circulation de *Pfcr* 76T Zambie en 2016 [14]. Cette différence avec l'étude de la Zambie pourrait s'expliquer par l'absence d'utilisation des médicaments analogues pouvant entraîner une sélection croisée des allèles mutants *Pfcr*.

6.2. Prévalence de l'allèle mutant *Pfmdr1* :

La prévalence globale de l'allèle mutant 86Y de *Pfmdr1* était de **19,8** % par la PCR-RFLP à Kollé au Mali sur 12 ans. La dynamique de la prévalence de ce marqueur n'a pas varié tout au long de la période d'étude (**p = 0,08**).

Ces résultats sont comparables à ceux observés par FIGUEIREDO P et *al.*, en 2008 en Angola, qui ont trouvé une prévalence identique de 19,8% [82] et de TRAORE B et *al.*, au Tchad qui ont trouvé une prévalence de 20,6% en 2020 [83].

Ces résultats sont comparables à ceux observés par Wurtz N et *al.*, en 2012 au Sénégal qui ont trouvé une prévalence de l'allèle mutant *Pfmdr1* 86Y de 16% [84].

Ces résultats de prévalence de l'allèle mutant *Pfmdr1* 86Y sont légèrement en hausse par rapport à ceux obtenus par SONDO.P et *al.*, en 2020 à Bobo Dioulasso au Burkina Faso qui ont trouvé 10,1% [22].

En revanche nos résultats sont inférieurs à ceux observés par DJIMDE A et *al.*, en 2001 et TEKETE M. et *al.*, en 2009 au Mali soit une prévalence de *Pfmdr1* 86Y à 50% et 63,6% [85, 76]. Cette différence pourrai par la pression due à la luméfantine qui a commencé dans les années 2006 qui sélectionne l'allèle sauvage et diminue la fréquence des mutants et aussi

l'étude de DJIMDE A et *al.*, a été menée à Bandiagara et Mopti tandis que cette présente étude a été menée à Kollé [85].

6.3. Prévalence de la résistance *in vivo* :

Les résultats de cette étude ont montré une prévalence moyenne de la résistance *in vivo* de *P. falciparum* à la chloroquine de 35,15% au cours des 12 années de collecte d'échantillons. Cette prévalence *in vivo* estimée à partir de la prévalence de l'allèle mutant *Pfcr*t 76T était comparable à celle trouvée par DJIMDE A et *al.*, en 2001 [23] et par TEKETE M et *al.*, en 2009 dans la même zone [76]. Malgré l'arrêt de la chloroquine, la prévalence de l'allèle mutant de *Pfcr*t K76T reste constante depuis 2001. Ce taux de résistance *in vivo* à la chloroquine de 35,1% est supérieur au seuil de 25% établi par l'OMS [23], au-dessus duquel l'antipaludique en monothérapie n'est plus efficace et doit être retiré dans le traitement du paludisme.

Ceci démontre qu'il est très peu probable d'utiliser la chloroquine pour le traitement du paludisme dans un future proche.

6.4. Limites de l'étude :

Les échantillons de trois années n'étaient pas disponibles.

Vu que les bases de données démographiques de toutes les études auxquelles appartiennent ces échantillons n'étaient plus disponibles, nous n'avons pas pu catégoriser les participants par âge et appliquer le GRI spécifique, qui peut varier légèrement en fonction de l'âge.

CONCLUSION

7. CONCLUSION :

Au terme de notre étude la prévalence de l'allèle mutant du gène *Pfcrt* était élevée et constante au cours des années à Kollé de 2001 à 2015 et une prévalence relativement faible de l'allèle mutant du gène *Pfmdr1*.

RECOMMANDATIONS

8. RECOMMANDATIONS :

Aux termes de notre étude nous formulons les recommandations suivantes :

Aux autorités administratives et politiques de santé,

De soutenir des études multicentriques sur les sites sentinelles du PNLN ou sur les sites des medecins de campagne pour suivre l'évolution du niveau de la chloroquinorésistance.

Aux chercheurs

De continuer à surveiller la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine dans les zones d'endémie palustre afin de fournir des informations mises à jour au PNLN.

REFERENCES

9. REFERENCES :

- [1] RAJAONARIVELO V et *al.*, Les anophèles et la transmission du paludisme à Ambohimena, village de la marge occidentale des Hautes-Terres Malgaches, *Parasite*, vol. 11, no. 1, pp. 75–82, 2004.
- [2] SCHINDLER T et *al.*, Molecular monitoring of the diversity of human pathogenic malaria species in blood donations on Bioko Island, Equatorial Guinea, *Malar. J.*, vol. 18, no 1, pp. 9. 2019.
- [3] VÁSQUEZ A.M et *al.*, Malaria in pregnancy in endemic Regions of Colombia: High Frequency of Asymptomatic and Peri-Urban Infections in Pregnant Women with Malaria, *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, vol. 2020, pp. 1-10, 2020.
- [4] METELO E et *al.*, Détermination des paramètres bioécologiques et entomologiques d’*Anopheles gambiae* sl dans la transmission du paludisme à Bandundu-ville, République Démocratique de Congo , *Pan Afr. Med. J.*, vol. 22, 2015.
- [5] OMS., Paludisme dans le monde. Rapport 2021. Available from: www.who.int/malaria no. 266 000, pp. 1–24, 2021.
- [6] OMS., Paludisme dans le monde. Rapport 2020. Available from: www.who.int/malaria no. 266 000, pp. 1–30, 2020.
- [7] PNLP du Mali., directif national pour la prise en charge des cas de paludisme au Mali. Juin 2016. pp.1-32.
- [8] Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), Institut National de la Statistique (INSTAT), INFO-STAT, Institut National de la Recherche en Santé Publique (INRSP) et ICF International, 2016. Enquête sur les Indicateurs du Paludisme au Mali (EIPM) 2015. Rockville, Maryland, USA : INSTAT, INFO-STAT et ICF International.
- [9] Enquête sur les Indicateurs du Paludisme (EIPM) 2015, “République du mali,” Juillet 2016. Bamako, Mali, p.180.
- [10] Roll Back Malaria Progress report1 WHO releve épidémiologique hebdomadaire, Ed OMS, Geneva, 2000 No11, 2001.
- [11] DJIMDE A et *al.*, A molecular map of chloroquino resistance in Mali », *FEMS Immunol Med Microbiol.* no 223, p.10, 2010.
- [12] ARIEY F et *al.*, A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*, *Nature*, vol. 505, no. 7481, pp. 50–55, 2016.
- [13] LAUFER M. K et *al.*, Return of chloroquine-susceptible, *Plasmodium falciparum* in Malawi Was a Reexpansion of Diverse Susceptible Parasites, *J. Infect. Dis.*, vol. 202, no 5, p. 801-808, 2010.

- [14] MWANZA S et al., The return of chloroquine-susceptible *Plasmodium falciparum* malaria in Zambia, *Malar. J.*, vol. 15, no 1, p. 584. 2016.
- [15] MIGLIANI R. et al., Histoire de la lutte contre le paludisme dans l'armée française : de l'Algérie à l'Armée d'Orient pendant la Première Guerre mondiale, *Medecine et Santé Tropicales* 2014 ; 24 : 349-361.
- [16] GISSOT Mathieu., Etude de la régulation transcriptionnelle des gènes lors du cycle érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI. Vol 3. p. 211. 14 Fev 2005.
- [17] FRANCIS E. C., History of the discovery of the malaria parasites and their vectors, *Parasit. Vectors*, vol. 3, n° 1, pp. 5, 2010.
- [18] GRASSI B: Malariology centenary. Parasitologia. A zoologist for malaria , *Contrib. Sci.*, vol. 3, no 2, p. 187-195, 2006.
- [19] TIBÚRCIO F et al., Specific expression and export of the *Plasmodium falciparum* Gametocyte exported Protein-5 marks the gametocyte ring stage, *Malar. J.*, vol. 14, no 1, p. 334, 2015.
- [20] CHARMOT G., Laveran and the discovery of the Malaria Parasite, *CDC Malaria website*, vol. 1841. p. 1-5, 2012.
- [21] MARY C et al., information Dimorphism in genes encoding sexual-stage proteins of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri*», Sutherland. 2015 Jun; 45(7):449-54.
- [22] SONDO P et al., Polymorphisme de *Plasmodium falciparum* et mutations des gènes de résistance *PfCRT* et *PfMDR1* dans la zone de Nanoro, Burkina Faso, *Pan Afr. Med. J.*, vol. 39, 2021.
- [23] DJIMDE A et al., Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant *falciparum malaria*, *Lancet*, vol. 358, no. 9285, pp. 890–891, 2001.
- [24] DJAMAN Allico Joseph., Evaluation De la Chimiorésistance De *Plasmodium falciparum* Aux Différents Antipaludiques (chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine, quinine) Et Profil Génétique des Isolats Correspondants. p.114-136. Vol. Thèse, *Pharm*, Paris, 2003.
- [25] MOTA M. et al., Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 291, 141-144, 2001.
- [26] SIAU A et al., Temperature shift and host cell contact up-regulate sporozoite expression of *Plasmodium falciparum* genes involved in hepatocyte infection, *PLoS Pathog.*, vol. 4, no.

8, 2008.

[27] FREVERT U et al., *Plasmodium* sporozoite passage across the sinusoidal cell layer. (D. S.-F. Barbara A Burleigh, Éd.) *Molecular mechanism of parasite invasion*, pp. 183-197, 2008.

[28] ROBER V et al., Biologie de la transmission homme - moustique du *Plasmodium*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 96, 6-20, 2003.

[29] STURN A et al., Manipulation of host hepatocytes by malaria parasites for delivery into sinusoids. *Science*, 313, 1287-1290, 2006.

[30] MURPHY J. R et al., Continuation of chloroquine-susceptible *Plasmodium falciparum* parasitemia in volunteers receiving chloroquine therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.* vol. 34, no. 4, pp. 676–679, 1990.

[31] ROBERT V et al., Biologie de la transmission homme - moustique du *Plasmodium*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 96, 6-20, 2003.

[32] BANNISTER L.H et al., A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology Today*, 16, 427- 433, 2000.

[33] DAY K.P et al., The biology of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Parasitology*, 116 Suppl, S95-109, 1998.

[34] TALMAN A. M et al., Gametocytogenesis: The puberty of *Plasmodium falciparum*, *Malar. J.*, vol. 3, pp. 1–14, 2004.

[35] SINDEN R.E et al., The development of *Plasmodium* ookinetes *in vitro*: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology*, 91 : 227-244, 1985.

[36] SIDEN-KIAMOS I et al., Interactions between malaria parasite and their mosquito hosts in the midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34 : 679-685, 2004.

[37] KAISER K et al., Differential transcriptome profiling identifies *Plasmodium* genes encoding pre-erythrocytic stage specific proteins. *Molecular Microbiology*, 51: 1221-1232, 2004.

[38] GOLVAN J.Y et al., *Eléments de parasitologie médicale* : Paris : 4ère Ed, Flammarion, 571p, 1983.

[39] DJIBO A et al., Black water fever in adults with sickle cell anemia. Two fatal cases. *Med Trop* 2000; 60:156-68.

[40] WHO., Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg ed.* 84 Suppl 2:1-65.2000.

[41] DELLICOUR S et al., The safety of artemisinins during pregnancy: a pressing question. *Malar J.* 2007 Feb 14;6:15.

- [42] DELAUNAY C et al., Frottis sanguin Goutte épaisse Tests antigéniques. Vol. 38 - N° S2 p. 121-123. Janvier 2008.
- [43] KOITA O.A., et al., False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the *hrp2* gene. *Am J Trop Med Hyg*, 2012. 86(2): p. 194-8.
- [44] AMBROISE T.P et al., Le diagnostic du paludisme: Le diagnostic du paludisme: actualités et perspectives. *Cahiers Santé*, 1993,3 : 280-284.
- [45] CHOU AC et al., Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Bio-chemistry* 1980; 19:1543-9;
- [46] DORN A et al. An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:727-3).
- [47] ZHANG J et al., The fate of ferriprotoporphyrin IX in malaria infected erythrocytes in conjunction with the mode of action of antimalarial drugs. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 99:129-4)
- [48] PAYNE D., (1987). Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology today*, 3(8), 241-246.
- [49] WELLEMS TE et al., (2001). Chloroquine-resistant malaria. *The Journal of infectious diseases*, 184(6), 770-776.
- [50] WELLEMS T. E., (2002). *Plasmodium* chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug. *Science*, 298(5591), 124-126.
- [51] DURAISINGH MT et al., Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology* 1997; 114:205-211.
- [52] BASCO LK et al., Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. III. Analysis of chloroquine resistance and point mutations in the multidrug resistance 1 (*Pfmdr1*) gene of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:577-581.
- [53] BHATTACHARYA PR., Alleles of the *Plasmodium falciparum Pfmdr1* gene appear not to be associated with chloroquine resistance in India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:454-455.
- [54] FIDOCK DA et al., Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000;6:861-871).
- [55] LAKSHMANAN V et al., (A critical role for *Pfprt* K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance) *The EMBO Journal* vol 24 | NO 13 | 2005.

- [56] OLLIARO P et al. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol Ther* 2001; 89(2): 207-19.
- [57] MITA T et al., Role of *Pfmdr1* mutations on chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates with *pfprt* K76T from Papua New Guinea, *acta trop May*, 2006.
- [58] BOROWSKI E et al., Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. In *Acta Biochimica Polonica*. Volume 52; 2005:609–627.
- [59] DURAISINGH MT et al., Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *Pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology*, 1997; 177:1429-1433.
- [60] VENKATESAN M et al., Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and multidrug resistance 1 genes: Parasite risk factors that affect treatment outcomes for *P. falciparum* malaria after artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 91, no. 4, pp. 833–843, 2014.
- [61] SONDO P et al., Artesunate-Amodiaquine and Artemether-Lumefantrine Therapies and Selection of *Pfprt* and *Pfmdr1* Alleles in Nanoro, Burkina Faso, *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0151565, 2016.
- [62] MILLET J et al., Polymorphism in *Plasmodium falciparum* Drug Transporter Proteins and Reversal of *In Vitro* Chloroquine Resistance by a 9 , 10- Dihydroethanoanthracene Derivative, vol. 48, no. 12, pp. 4869–4872, 2004.
- [63] 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.
- [64] TINTO H., et al., Chloroquine-resistance molecular markers (*Pfprt* T76 and *Pfmdr1* Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop Med Int Health*, 2008. 13(2): p. 238-40. 145.
- [65] SANNER Alexandre., *L'artémisinine et ses dérivés: apports de la médecine traditionnelle chinoise dans la lutte contre le paludisme chimiorésistant et perspectives contemporaines*. Thèse de doctorat. UHP-Université Henri Poincaré. p. 187, 2008, France.
- [66] LAKSHMANAN V et al., (A critical role for *Pfprt* K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance) *The EMBO Journal* vol 24 | NO 13 | 2005.
- [67] BEYENE H. B et al., Efficacy of chloroquine for the treatment of vivax malaria in northwest Ethiopia. *Journal pone*, vol. 11, n° 8, p. 1-14, 2016.

- [68] DURRAND V *et al.*, Variations in the sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*Pfcr*) and their relationship to chloroquine resistance *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 136(2): 273-85.
- [69] WHO., Scientific group on the chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. Geneva, 17-24, October 1972).
- [70] Organisation mondiale de la santé., Evaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques pour le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* dans les régions à transmission élevée. Genève, *Trop Med*, 1996. WHO/MAL/96.1077.
- [71] W. H. O., monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria (WHO/HTM/RBM/2003.50). Geneva: World Health Organization . 50-67 P, 2003.
- [72] MULLIS K *et al.*, Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Vol. 51. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.
- [73] AIR GM, *et al.*, DNA-dependent RNA polymerase from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*. *FEBS Lett*. 1974 Jan ,15;38(3):277-81.
- [74] SRIMUANG K *et al.* "Analysis of anti-malarial resistance markers in *pfmdr1* and *pfcr* across Southeast Asia in the Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration." *Malaria journal* 15.1(2016): 1-12.
- [75] RETENG P. *et al.*, Genetic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance genes, *pfcr* and *pfmdr1*, in North Sulawesi, Indonesia. *BMC Res Notes* **10**, 147 (2017).
- [76] TEKETE M *et al.*, "Efficacy of chloroquine, amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria: revisiting molecular markers in an area of emerging AQ and SP resistance in Mali." *Malaria Journal* 8.1 (2009): 1-8.
- [77] LY O *et al.*, Evolution of the *pfcr* T76 and *pfmdr1* Y86 markers and chloroquine susceptibility 8 years after cessation of chloroquine use in Pikine, Senegal *Parasitology Research* volume 111, pp 1541–1546, 2012.
- [78] ATROOSH, W.M *et al.* The detection of *pfcr* and *pfmdr1* point mutations as molecular markers of chloroquine drug resistance, Pahang, Malaysia. *Malar J* ;11, 251 (2012)
- [79] APINJOH T. O *et al.*, Molecular markers for artemisinin and partner drug resistance in natural *Plasmodium falciparum* populations following increased insecticide treated net

coverage along the slope of mount Cameroon: *Infect. Dis. Poverty*, vol. 6, no. 1, p. 1– 10, 2017.

[80] FALL B, et al., *Plasmodium falciparum* susceptibility to standard and potential anti-malarial drugs in Dakar, Senegal, during the 2013–2014 malaria season. *Malar J.* 2015; 14:60.

[81] DARA Antoine., Comparaison de deux techniques moléculaires de surveillance de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* au Mali ; P.129, Vol. Thèse, Pharm, Bamako, 2008.

[82] FIGUEIREDO P et al., Prevalence of *Pfmdr1*, *Pfcrt*, *Pfdhfr* and *Pfdhps* mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola, *Malar. J.*, vol. 7, pp. 1–7, 2008.

[83] Bilaly TRAORE., Epidémiologie moléculaire de la résistance de *plasmodium falciparum* aux antipaludiques en république du Tchad. 2020, p.184. Vol. Thèse, Pharm, Bamako

[84] WURTZ et al., Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Dakar, Senegal, *Malaria Journal* 2012, 11:197.

[85] DJIMDE A et al., "A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria." *New England journal of medicine* 344.4 (2001): 257-263.

Fiche signalétique :

Nom : DIAKITE

Prénom : Bassirou

Pays d'origine : MALI

Email : bassiroudiakite102@gmail.com

Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie de Bamako/MALI

Tel : 00223 79040539 / 00223 98307645

Année universitaire : 2021-2022

Ville de soutenance : Bamako

Dépôt légal : Bibliothèque de la FMOS/FAPH de Bamako

Source d'intérêt : santé publique, épidémiologie, parasitologie.

Titre : DYNAMIQUE DES MARQUEURS MOLECULAIRES DE RESISTANCE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* A LA CHLOROQUINE *PfCRT K76T, PfMDR1 N86Y* DE 2001 A 2015 A KOLLE, MALI.

Résumé :

Introduction : la chloroquine a été abandonnée à cause du taux de résistance élevé de *Plasmodium falciparum* à cette molécule. De nos jours, les médicaments recommandés pour le traitement du paludisme non compliqué sont les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). Les études récentes ont montré que les parasites deviennent résistants à ces CTA dans les pays d'Asie. Il y a très peu d'antipaludique en cours de développement.

Le but de cette thèse était d'étudier la dynamique des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine afin de déterminer la prévalence *in vivo* à la chloroquinorésistance à Kollé.

Méthodologie : Nous avons analysé des échantillons collectés des études antérieures menées à Kollé sur une période de 2001 à 2015. L'analyse moléculaire a été faite par PCR-RFLP. Il s'agissait de rechercher les allèles *PfCRT K76T* et *PfMDR-1 N86Y*.

Résultats : Au total, 652 échantillons ont été analysés. La prévalence globale des allèles mutants *PfCRT K76T* et de *PfMDR-1 N86Y* étaient respectivement de 72,7% et 19,8% dans cette étude. Ces prévalences sont restées constantes sur les 12 années ($p > 0.05$). La résistance *in vivo* estimée par le GRI était de 35,1%.

Conclusion : Au terme de notre étude la tendance de la prévalence de l'allèle mutant du gène *PfCRT* était élevée et constante au cours des années à Kollé de 2001 à 2015 cependant la prévalence de l'allèle mutant du gène *PfMDR1* était relativement durant cette même période.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, marqueurs moléculaires, *PfCRT*, *PfMDR*, Kollé, Mali.

Last Name: DIAKITE

First Name: Bassirou

Mail: bassiroudiakite102@gmail.com

Faculty of Medicine and Odonto-Stomatologie of Bamako/MALI

Tel: 00223 79040539 / 00223 98307645

Year: 2021-2022

Defense city: Bamako

Country of origin: Mali

Place of deposit: Library of the Faculty of Medicine, and Odonto-stomatology.

Area of interest: public health, epidemiology, parasitology, therapy

Title: DYNAMICS OF MOLECULAR RESISTANCE MARKERS OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* TO LACHLOROQUINE *Pfcr* K76T, *Pfmdr1* N86Y FROM 2001 TO 2015 IN KOLLE, MALI.

Abstract:

Background: chloroquine has been abandoned because of the high resistance rate of *Plasmodium falciparum* to this molecule. Today, the drugs recommended for the treatment of uncomplicated malaria are artemisinin-based combination therapy (ACT). Recent studies have shown that parasites of *P. falciparum* are becoming resistant to these ACTs in Asian countries. There are very few antimalarials in development.

The aim of this thesis was to study the dynamics of molecular markers of chloroquine resistance in order to determine the *in vivo* prevalence of chloroquine resistance in Kollé.

Method: We analyzed samples collected from previous studies carried out in Kollé over a period from 2001 to 2015. Molecular analysis was done by PCR-RFLP. This involved looking for the *Pfcr* K76T and *Pfmdr1* N86Y alleles.

Results: A total of 652 samples were analyzed. The overall prevalence of *Pfcr* K76T and *Pfmdr1* N86Y mutant alleles were 72.7% and 19.8%, respectively, in this study. These prevalences remained constant over the 12 years ($p > 0.05$). The *in vivo* resistance estimated by the GRI was 35.1%.

Conclusion: At the end of our study the trend in the prevalence of the mutant allele of the *Pfcr* gene was high and constant over the years in Kollé from 2001 to 2015 however, the prevalence of the mutant allele of the *Pfmdr1* gene was relatively during the same period.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, molecular markers, *Pfcr*, *Pfmdr*, Kollé, Mali.

Serment d'Hippocrate :

En présence des maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Etre Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au -dessus de mon travail.

Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui se passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti politique ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

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

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

Je le jure !