
ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TITRE

92-20

**EPIDEMIOLOGIE DE LA
CHLOROQUINORESISTANCE AU MALI:
INTERET D'UN TEST RAPIDE DE DETECTION DES
SOUCHES CHLOROQUINORESISTANTES DE
PLASMODIUM FALCIPARUM PAR L'UTILISATION
DE L'HYDROGENE TRITIE(³H) ET LE VERAPAMIL.**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le.....1993 devant
l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali

Par **Bourèma KOURIBA**

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

Jury

Président: M.le Professeur Boubacar S. CISSE

Membres: M.le Professeur Amadou DIALLO
M. le Professeur Eric PICHARD
M. le Docteur Philippe DEMBELE
M. le Professeur Ogobara DOUMBO Directeur de Thèse

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

ANNEE UNIVERSITAIRE 1992-1993

LISTE DES PROFESSEURS

Professeur Issa TRAORE	Doyen
Professeur Boubacar S. CISSE	Premier Assesseur
Professeur Amadou DOLO	Deuxième Assesseur
Docteur Bernard CHANFREAU	Conseiller Technique

D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Pr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale Chef de D.E.R.
Pr Mamadou Lamine TRAORE	Chirurgie Générale
Pr Aliou BA	Ophthalmologie
Pr Bocar SAÏL	Ortho.- Traumatolo.- Secourisme
Pr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Pr Abdou Alassane TOURE	Ortho.-Traumatologie.
Pr Amadou DOLO	Gynéco.-Obstétrique
Pr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Dr Mme SY Aida SOW	Gynéco.-Obstétrique
Dr Kalilou OUATTARA	Urologie
Dr Mamadou L. DOMBANA	Odonto.-Stomatologie
Dr Salif DIAKITE	Gynéco.-Obstétrique
Dr Abdoulaye DIALLO	Ophthalmologie
Dr Alhousseïni Ag Mohamed	O.R.L.
Dr Mme DIANE F. S. DIABATE	Gynéco.-Obstétrique
Dr Abdoulaye DIALLO	Anesth.-Réanimation
Dr Sidi Yaya TOURE	Anesth.-Réanimation
Dr Gangaly DIALLO	Chirurgie Générale
Dr Sékou SIDIBE	Ortho.-Traumatologie
Dr Abdel Kader TRAORE dit DIOP	Chirurgie Générale

D.E.R. de SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Pr Bréhima KOUMARE	Microbiologie
Pr Siné BAYO	Anatomie-Pathologie
Pr Gaoussou KANOUTE	Chimie Analytique
Pr Yaya FOFANA	Hématologie
Pr Ogobara DOUMBO	Parasitologie

2. DOCTEURS D'ETAT

Pr Yéya Tiémoko TOURE	Biologie
Pr Amadou DIALLO	Biologie Chef de D.E.R.
Pr Yénimégué A. DEMBELE	Chimie Organique

3. DOCTEURS 3^e CYCLE

Pr Moussa ARAMA	Chimie Organique
Pr Massa SANOGO	Chimie Analytique
Pr Bakary M. CISSE	Biochimie
Pr Mahamadou CISSE	Biologie
Pr Sékou F.M. TRAORE	Entomologie Médicale
Pr Abdoulaye DABO	Malacologie, Biologie Animale
Pr N'yenigue S. KOITA	Chimie Organique

4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Dr Abderhamane S. MAIGA	Parasitologie
Dr Anatole TOUNKARA	Immunologie
Dr Amadou TOURE	Histo.-Embryologie

5. MAITRES ASSISTANTS

Dr Abdrahamane TOUNKARA	Biochimie
Dr Flabou BOUGOUDOGO	Bactériologie

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne Chef de D.E.R.
· Souleymane SANGARE	Pneumo.-Phtisiologie
· Aly GUINDO	Gastro-enterologie
· Mamadou K. TOURE	Cardiologie
· Mahamane MAIGA	Néphrologie
r Ali Nouhoum DIALLO	Médecine Interne
r Baba KOUMARE	Psychiatrie
r Moussa TRAORE	Neurologie
r Issa TRAORE	Radiologie
r Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
r Eric PICHARD	Médecine Interne
r Toumani SIDIBE	Pédiatrie

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Dr Abdel Kader TRAORE	Médecine Interne
Dr Moussa Y. MAIGA	Gastro-enterologie
Dr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Dr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Dr Dapa Ali DIALLO	Hématologie-Méd. Interne
Dr Somita KEITA	Dermatologie-Leprologie
Dr Bah KEITA	Pneumo.-Phtisiologie
Dr Hamar A. TRAORE	Médecine Interne

D.E.R. DE SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS AGREGES

Pr Boubacar CISSE	Toxicologie
Pr Arouna KEITA	Matières Médicales

2. MAITRES ASSISTANTS

Dr Boukassoum HAIDARA	Législ. Gest. Pharm.
Dr Elimane MARIKO	Pharmacodynamie

D.E.R. de SANTE PUBLIQUE1. PROFESSEURS AGREGES

Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique Chef de D.E.R.
Moussa A. MAIGA	Santé Publique
Hubert BALIQUE	Santé Publi. Maitre de conf.agrégé

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

r Bernard CHANFREAU	Santé Publique
r Jean Michel MOURILLE	Santé Publique
r Bocar G. TOURE	Santé Publique
r Sory I. KABA	Santé Publique
r Sanoussi KONATE	Santé Publique

CHARGES DE COURS

r Mme CISSE A. GAKOU	Galénique
r N'Golo DIARRA	Botanique
r Boubou DIARRA	Bactériologie
r Salikou SANOGO	Physique
r Daouda DIALLO	Chimie Générale et Miner.
r Bakary I. SACKO	Biochimie
r Yoro DIAKITE	Maths
r Sidiki DIABATE	Bibliographie
Dr Aliou KEITA	Galénique
Dr Boubacar KANTE	Galénique
Dr Souleymane GUINDO	Gestion
Dr Mme Sira DIALLO	Maths
M Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu

3.ASSISTANTS

r Nouhoum ONGOIBA	Chirurgie Générale
r Saharé FONGORO	Néphrologie
r Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
r Benoît KOUMARE	Chimie Analytique
r Ababacar I. MAIGA	Toxicologie
r Mamadou DEMBELE	Médecine Interne
r Sadio YENA	Chirurgie Générale
r Ibrahim ALWATA	Ortho.-Traumatologie
r Adama D. KEITA	Radiologie
r Tatiana KEITA	Pédiatrie
r Massambou SACKO	Santé Publique

C.E.S.

Dr Georges YAYA(RCA)	Ophthalmologie
Dr Abdou ISSA(Niger)	Ophthalmologie
Dr Amadou DIALLO(Sénégal)	Ophthalmologie
Dr Askia MOHAMED(Niger)	Ophthalmologie
Dr Oumar BORE	Ophthalmologie
Dr N'DJIKAM Jonas(Cameroun)	Ophthalmologie
Dr DEZOUNBE Djoro(Tchad)	Ophthalmologie
Dr Aboubacrine A. MAIGA	Santé Publique
Dr Dababou SIMPARA	Chirurgie Générale
Dr Mahamane TRAORE	Chirurgie Générale
Dr Mohamed Ag BENDECH	Santé Publique
Dr Mamadou MAIGA	Dermatologie
Dr Toungo DOUMBIA	Chirurgie Générale
Dr Salimata KONATE	Ophthalmologie
Dr Lamine TRAORE	Ophthalmologie
Dr Ousmane C. FAYE	Dermatologie
Dr Mme N'DIAYE Hawa THIAM	Dermatologie
Dr Idrissa A. CISSE	Dermatologie

r Akory Ag IKNANE	Santé Publique
r Hamadoun SANGHO	Santé Publique
r Mahamadou MAIGA	Santé Publique
r Adama DIAWARA	Santé Publique
r Mahamadou THERA	Santé Publique
r Nkok Luc LOIC (Cameroun)	Ophtalmologie

PROFESSEURS MISSIONNAIRES

r P. HAVLCK	Biophysique
r F. ROUX	Biophysique
r G. FARNARIER	Physiologie
r G. GRAS	Hydrologie
r E.A. YAPO	Biochimie
r Babacar FAYE	Pharmacodynamie
r Mamadou BADIANE	Pharmacie Chimique
r Issa LO	Législation

PERSONNELS RESSOURCES

Dr Madani TOURE	H.G.T.
Dr Tahirou BA	H.G.T.
Dr Amadou MARIKO	H.G.T.
Dr Badi KEITA	H.G.T.
Dr Antoine Niantao	H.G.T.
Dr Kassim SANOGO	H.G.T.
Dr Yéya I. MAIGA	I.N.R.S.P.
Dr Chompere KONE	I.N.R.S.P.
Dr BA Marie P. DIALLO	I.N.R.S.P.
Dr Almahady DICKO	P.M.I.Sogoninko
Dr Mohamed TRAORE	Kati
Dr Arkia DIALLO	P.M.I. Centrale
Dr Reznikoff	I.O.T.A.
Dr TRAORE J. Thomas	I.O.T.A.

r P. BOBIN

I. MACHOUX

r A. DELAYE

H.P.G.

r N'DIAYE F. N'DIAYE

I.O.T.A.

r Hamidou B. SACKO

H.G.T.

Je dedie ce travail

A feu mon ami **Moustapha DANTE**

Tu as été brutalement arraché à notre affection en pleine préparation de thèse. J'aurais aimé partager avec toi ce moment, mais la volonté divine en a été autre. `

De ton vivant tu m'as honoré de ton amitié et encouragé dans le choix de ce travail. En cet instant solennel toute ma pensée va vers toi. Puisse le tout puissant t'accorder sa miséricorde.

Repose en paix cher ami.

A tous les habitants de nos villages d'étude particulièrement aux enfants.

A mon oncle **Sana KOURIBA** et à mes tantes **Hawa KOURIBA** et **Djénéba YALCOUYE**

toute mon affection.

A mon frère **Aly KOURIBA**

tu m'as accordé une attention toute particulière, ce qui m'a permis atteindre ce résultat.

A ma belle soeur **Fatoumata Ouologuem**

épouse exemplaire, toute ma reconnaissance et mon admiration.

A **Amadou** et **Fatou KODJO** à Mopti

A **Moise** et **Ami KODJO** à Bamako

A **Ondiè KODJO** et Famille au Canada

A **Assama DARA** et Famille à Bamako

toute ma reconnaissance

A **Samba GUINDO** et Famille à Bamako

merci pour les sages conseils

A **Tonton TELLY**, **Tanti Oumou** et **Tanti Fati**

merci pour votre gentillesse et vos sages conseils

A Kadiana BAGAYOGO et son épouse Ami TELLY à Mopti

toute ma reconnaissance

A mes amis Alimatou DIALLO, Bakoroba GOUNDOUROU, Garibou BAMIA, Harouna YALCOUYE, Loséni BENGALY, Moriba SIDIBE, Djibril KEITA, Mama KOUMARE.

trouvez ici l'expression de mon attachement profond pour une amitié durable.

A tous mes camarades de promotion, particulièrement à Lowé Simo CHRISTINE paix à son âme. Nous avons passé des moments durs ensemble pour aboutir à ce résultat. Je souhaite vivement que le Tout Puissant accorde à chacun de nous une longue vie et assez de force pour affronter les autres épreuves de notre existence.

Nos remerciements vont

A tous nos maîtres du Premier Cycle , du Second Cycle de Ningari , du Lycée Public de Sévaré .

A tous le corps professoral de l'Ecole Nationale de Medecine et de Pharmacie particulièrement aux Professeurs **Moussa ARAMA, Massa SANOGO, Gaoussou KANOUTE , Abdrahamane TOUNKARA, Aly Nouhoum DIALLO et Boukary CISSE.**

Au personnel de la Direction et de la Bibliothèque de l'ENMP.

A tout le personnel de l'Officine "SOUCKOULE"

A tous les camarades et amis du "Grin de Bellotte" à Médinacoura.

A tous les camarades du comité de sport et à tous les sportifs de L'ENMP.

A tous les Amis du Club de l'U.N.E.S.C.O. pour la Santé(C.A.U.SAN.).

A toute l'équipe du Programme National de Lutte Contre la Schistosomiase particulièrement au Docteur **Abdoulaye DIARRA.**

A nos collègues et amis **Mahamadou DIAKITE et Guy Albert KODJO** toute ma sympathie, bon courage et plein succès . Je souhaite bon courage et plein succès également à **ALassane A. DICKO, Hawa DEMBELE, Zénab YATTARA, Youssouf COULIBALY et Kôrô Siona TRAORE.**

A Madame **COULIBALY ASSAN** et à Monsieur **Denzélé COULIBALY**, aux chauffeurs **Abdoulaye DJIGUIBA et Zoumana DIAKITE** pour votre grande disponibilité et votre compréhension.

A nos aînés les Docteurs **Abdoulaye TOURE, Faoussouby CAMARA** pour votre disponibilité et vos conseils.

A **Mouctar DIALLO et Frédérique ROUSTANT** pour votre bonne collaboration et votre sympathie.

Au Docteur **Seydou DOUMBIA** vous nous avez beaucoup aidé dans le traitement des données et appris l'utilisation de l'outil informatique. Nous avons toujours bénéficié de votre disponibilité et de vos critiques.

Au Docteur **Amagana DOLO** pour votre grande disponibilité et votre gentillesse.

Au Docteur **Ousmane KOITA** pour toutes les techniques de laboratoire que vous nous aviez apprises. Vous avez encadré ce travail depuis sa conception et nous avons bénéficié de votre entière disponibilité. Votre exemple nous inspire et nous ne saurions le passer sous silence. Nous vous souhaitons plein succès dans ce que vous avez entrepris. Toute notre admiration.

A notre Maître le Docteur **Abdoulaye DABO** en reconnaissance des enseignements reçus.

A tous le personnel du Laboratoire Malaria Research and Training Center pour leur sympathie.

A notre Maître et Président de Jury

Monsieur le Professeur Boubacar Sidiki CISSE

Vous nous faites l'honneur de présider le jury de notre Thèse. Nous avons suivi avec intérêt vos cours de toxicologie et de Phytopharmacie dont les qualités sont reconnues de tous les étudiants . Votre souci permanent d'améliorer la qualité de l'enseignement en Pharmacie, vos hautes qualités humaines et vos connaissances scientifiques font de vous un homme respecté de tous. Veuillez agréer cher Maître nos sentiments distingués.

A notre Maître et Juge

Monsieur le Professeur Amadou DIALLO

Nous sommes très honorés par votre présence dans ce jury. Nous avons eu le privilège de bénéficier de votre enseignement au cours de nos études et au laboratoire. Vous avez également apporté votre contribution à la réalisation de ce travail par vos critiques et suggestions. Permettez nous de vous adresser notre vive reconnaissance.

A notre Maître et Juge

Monsieur le professeur Eric PICHARD

C'est un grand honneur pour nous que vous acceptiez de siéger dans ce jury. Votre enseignement clair et votre compétence sont cités en exemple dans cette Faculté. Nous avons pu bénéficier de vos critiques et suggestions dans la rédaction de cette thèse. Veuillez accepter nos sincères remerciements et nos sentiments distingués.

Au Docteur **Philippe DEMBELE**

Vous avez accepté de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations, nous vous prions de recevoir notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Directeur de Thèse

Monsieur le Professeur Ogobara DOUMBO

Vous avez initié et supervisé ce travail; nous sommes très heureux d'avoir eu votre confiance pour sa réalisation. Pendant près de trois ans nous avons su apprécier vos hautes qualités humaines et intellectuelles et bénéficié de votre disponibilité constante. Nous avons eu la chance de travailler dans l'équipe que vous avez formée et nous souhaitons vivement continuer. Trouvez par ces quelques mots cher Maître l'expression de notre grande admiration et de notre profond attachement.

SOMMAIRE

	Pages
- INTRODUCTION	1
- OBJECTIFS	4
2.1-Objectifs généraux	4
2.2-Objectifs spécifiques	4
- RAPPELS SUR LA CHIMIORESISTANCE	5
3.1-Définition de la Chimiorésistance	5
3.2-Mécanisme de la Résistance	6
3.3-Techniques d'évaluation	12
3.4-Méthodes de recherche et de dosage de la chloroquine	14
3.5-Evolution de la chloroquinorésistance	15
- ANTIPALUDIQUES UTILISES AU MALI	18
4.1-Les sels de quinine	18
4.2-Les Amino 4-quinoleines	18
4.3-L'association Sulfadoxine(500mg)+ Pyriméthamine (25mg)	19
4.4-Les Amino-Alcools	19
4.5-Le Proguanil	19
4.6-La triple association Sulfadoxine(500mg)+ Pyriméthamine(25mg)+Méfloquine	20
4.7-Le dérivé du Qinghaosu	20
4.8-Le Malarial 5	20
4.9-Les produits de substitution	21
5-MATERIEL ET METHODES	22
5.1-Lieux d'étude	22
5.2-Période d'étude	27
5.3-Type d'Enquête	27
5.4-Echantillonnage	27
5.5-Techniques de recherche	28
5-RESULTATS	49
6.1- Résultats globaux	49
6.2- Résultats descriptifs	50
7-COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS	73
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	79
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80
RESUME	
FICHE ANNEXE	

1-INTRODUCTION

Le paludisme ou malaria est une érythrocytopathie fébrile et hémolytique. Il est dû au développement et à la multiplication d'abord dans le foie puis dans les globules rouges d'un sporozoite appartenant au genre *Plasmodium*. Il est transmis par la piqûre infectante de la femelle d'un moustique du genre Anopheles. Quatre espèces plasmodiales sont infectées à l'homme: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*. *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus dangereuse parce qu'elle est responsable de la forme grave, souvent létale du paludisme. Cette hémosporeidiose constitue une redoutable endémie dans les zones intertropicales où elle pose un problème majeur de santé publique. On estime actuellement qu'environ 2073 millions de personnes (soit plus de 40% de la population mondiale) sont exposées au risque de l'infection palustre. Sur ce total 270 millions d'individus sont effectivement parasités, dont 90 millions en Afrique intertropicale. Pour l'ensemble du monde intertropical, le nombre de décès par paludisme est estimé à environ un million par an (42).

Au Mali les statistiques nationales estiment que la malaria est la première cause de mortalité (13%) et de morbidité (15,6%) dans la population générale(12). La mortalité spécifique, liée au paludisme dans la population des enfants de moins de 5 ans est d'environ 25 à 35% de la mortalité infanto-juvénile globale (11). Le paludisme a un impact morbide sur l'évolution des grossesses en zone d'endémie, en provoquant des anémies, des avortements spontanés, des petits poids à la naissance et des morts-nés (26,45). Il occupait la 3ème place des affections fébriles avec 12,8% en Médecine interne à l'hôpital du Point "G" en 1989(21). Aussi la morbidité due au paludisme est invalidante et a un impact certain sur le progrès socio-économique dans les pays d'endémie. Au Mali plusieurs millions de journées de travail sont perdus par an dans la population active des adultes, à cause des accès palustres (9,11).

Depuis l'utilisation de l'écorce de *Quinquina* à nos jours les recherches se sont multipliées dans la chimiothérapie du paludisme. La découverte d'insecticides de contact à effet rémanent tel le DDT a suscité de grands espoirs. L'éradication du paludisme paraissait alors possible et, la 8ème assemblée générale de l'organisation mondiale de la Santé (O.M.S.) recommandait en 1955 une campagne d'éradication mondiale (36) . Ce programme trop ambitieux basé sur la lutte antivectorielle par l'utilisation d'insecticides de contact n'a pas atteint les résultats escomptés. Très vite la résistance des vecteurs aux insecticides apparut (37).

En 1968 le programme fut redéfini dans le but de contrôler la morbidité et la mortalité de la maladie plutôt qu'à l'éradiquer . Ce nouveau programme utilisa comme arme la chimioprophylaxie de masse et la chimiothérapie systématique des accès fébriles. L'espoir a été fondé sur l'usage des amino 4-quinoléines, particulièrement la chloroquine qui était l'antipaludique idéal, peu cher et dénué de toxicité, efficace (38). Malheureusement en 1960 YOUNG et MOORE signalèrent l'échec de la chloroquine dans le traitement d'une infestation à *Plasmodium falciparum* en Colombie. Des cas similaires furent rapportés du Venezuela et du Brésil (44).

Cet échec relatif du médicament idéal dans le traitement et la prévention du paludisme fut d'autant plus mal ressenti, que s'évanouissait au même moment le dernier espoir d'éradication mondiale du paludisme.

Dans les années suivantes , la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine n'a cessé d'augmenter en fréquence et en étendu. *Plasmodium vivax* était également impliqué de plus en plus souvent, surtout dans les zones de polychimiorésistance, mais avec un rétentissement moindre (1). De l'Amérique du sud cette résistance s'est propagée en Asie du Sud-Est et en Océanie vers les années 1970. Elle s'est ensuite diffusée en Afrique, de l'Est (1978), du centre (1980-82) , puis de l'Ouest (1984). En Afrique de l'Oues, le centre de référence de chimiorésistance du paludisme de l'Organisation Commune de lutte Contre les Grandes Endémies(O.C.C.G.E.), estimait que les souches plasmodiales chloroquinorésistantes y circulaient en 1987 avec un niveau de prévalence en dessous de 30% (19).

Au Mali les études menées par l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP), la Division de l'Epidémiologie (DE) et le Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) n'avaient pas mis en évidence la circulation de souches chloroquinorésistantes jusqu'en 1989 (32,35). Par contre depuis 1987 RINGWALD et LE BRAS ont isolé des souches de *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistantes chez les expatriés français ayant séjourné au Mali (47).

L'extension de cette chloroquinorésistance pose de sérieux problèmes thérapeutiques, prophylactiques et préoccupe les autorités sanitaires de nos pays. En effet elle crée une psychose dans le monde médical et la tentation est actuellement grande d'utiliser de nouveaux antipaludiques de réserve Halofanthrine, Méfloquine, et la triple association Sulfamide-Pyrimétamine-Méfloquine . Vu la gravité du phénomène, l'O.M.S. s'attache à collecter toutes les informations disponibles sur le sujet et fixe les critères objectifs pour son identification par des techniques standardisées. L'O.M.S. a mis au point deux séries d'épreuves (tests standards *in vivo* et *in vitro*) pour l'évaluation de la réponse de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques. Mais les résultats de ces tests sont extrêmement variables d'un sujet à un autre. Ceci est dû à l'interférence des phénomènes de défense de l'hôte. A cela s'ajoute la durée de l'interprétation des résultats (variant de 36 heures à 28 jours). En plus, les critères d'inclusion et d'exclusion sont drastiques et difficilement réalisables sur le terrain .

Toutes ces difficultés réduisent d'une manière significative l'intérêt clinique et épidémiologique de ces tests OMS. D'où la nécessité de disposer de tests opérationnels, simples, permettant de déceler rapidement la présence de souches de *P. falciparum* chloroquinorésistantes dans le sang d'un individu infecté. Le test rapide du Docteur KROGSTAD(17) répond à ces impératifs. Dans le cadre d'un accord de collaboration entre l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie (E.N.M.P.) du Mali et le "National Institute of Health" (N.I.H.) des Etats Unis d'Amérique, notre laboratoire a bénéficié de la première opportunité d'évaluer les valeurs diagnostiques de cette méthode du Docteur KROGSTAD sur le terrain, au Mali.

2- OBJECTIFS

1- OBJECTIFS GENERAUX .

- Evaluer le niveau de sensibilité à la chloroquine des souches de *Plasmodium falciparum* dans différents faciès épidémiologiques de transmission du paludisme au Mali;

- Etudier la faisabilité pratique sur le terrain et les qualités intrinsèques du test rapide pour la mise en évidence des souches de *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistantes, par rapport aux tests standards de l'O.M.S.

.2- OBJECTIFS SPECIFIQUES

- Dépister et quantifier dans une population d'enfants de moins de 10 ans, de différents faciès de transmission du paludisme au Mali, les manifestations monospécifiques à *Plasmodium falciparum*;

- Tester la réponse des souches locales de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine en utilisant les tests standards O.M.S. (*in vitro* et *in vivo*) et le test rapide du Dr KROGSTAD;

- Dépister systématiquement chez les sujets inclus dans le protocole l'excrétion urinaire de la chloroquine par le test de DILL et GLAZKO;

- Tester en parallèle les valeurs diagnostiques (sensibilité et spécificité et indices de concordance) du test rapide du Dr KROGSTAD, en le comparant aux tests standards *in vivo* et *in vitro* de l'O.M.S.;

- Etablir à partir de ces données la carte de répartition épidémiologique de la chloroquinorésistance au Mali.

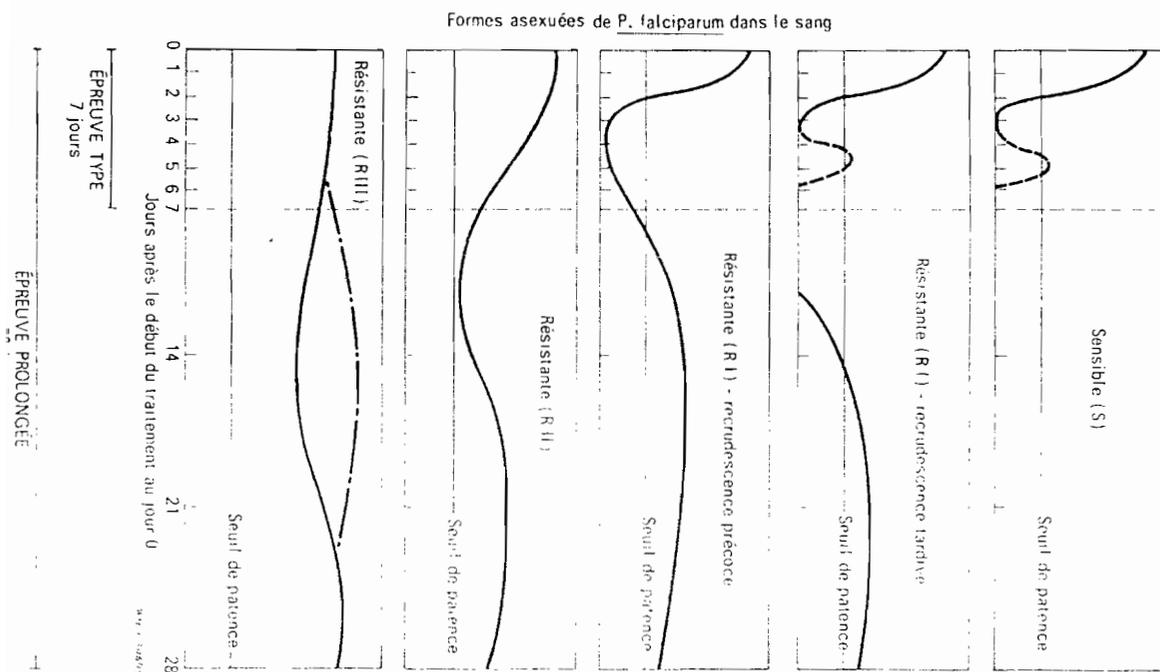
3-RAPPELS SUR LA CHIMIORESISTANCE

.1-DEFINITION DE LA CHIMIORESISTANCE

La résistance médicamenteuse est la capacité qu'a un parasite à se multiplier ou à survivre en présence d'une concentration de substance qui normalement, détruit les parasites de la même espèce ou empêche leur multiplication. Cette résistance peut être partielle (amenant à augmenter les doses de médicament tolérées par l'hôte) ou complète (dépassant les doses maximales tolérées par l'hôte) (55).

Actuellement, *P. falciparum* et *P. vivax* sont les deux espèces plasmodiales qui donnent des souches résistantes à la chloroquine (1). La réponse des formes asexuées de *P. falciparum* à la chloroquine a été graduée en quatre catégories: Sensibilité (S), Résistances: RI, RII, RIII.(fig1 39).

figure1:Types de réponse à l'épreuve pratique de sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine.D'après OMS., Séries de Rapports Techniques, N°529,1973.



2- MECANISMES DE LA RESISTANCE DE *PLASMODIUM*

FALCIPARUM AUX AMINO 4-QUINOLEINES

2.1- Mode d'Action des Amino 4-Quinoleines:

Les Amino -4-Quinoleines sont des schizontocides de la phase endoérythrocytaire. Leurs mécanismes d'action selon les hypothèses actuelles sont les suivants:

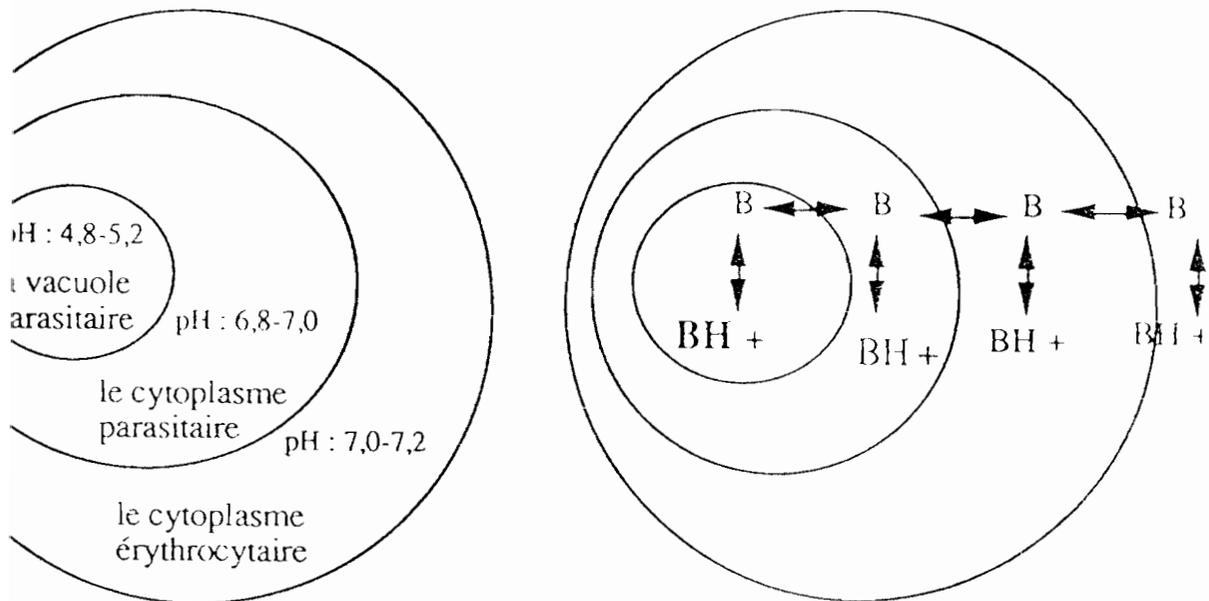
Il y a un gradient de pH de l'espace extracellulaire à l'espace intracellulaire. Ce gradient s'accroît lorsque l'hématie est parasitée à cause d'une production d'acide lactique par glycolyse plasmodiale.

Le pH est très acide à l'intérieur de la vacuole parasitophore du *Plasmodium* (fig 2a) (29).

Le parasite se nourrit en digérant l'hémoglobine de l'hématie. L'oxydation de l'hème donne la ferriprotoporphyrine IX (fpIX). Cette fpIX (à priori toxique membranolytique) selon l'hypothèse de WARHURST D.C. est sequestrée par une protéine probablement synthétisée par le parasite et diversement appelée "haem binding protein" ou "haem binder" pour former un complexe inerte désigné sous le nom d'hémozoïne de façon à éviter que la membrane de la plasmodie ne soit lysée (2,41).

La chloroquine (CQ) est lipophile (liposoluble) et peut traverser les membranes de l'hématie et du parasite. Selon KROGSTAD (28) elle pénètre par diffusion simple dans les 3 compartiments de l'hématie parasitée (fig 2b); une fois à l'intérieur de la vacuole parasitophore dont le pH est maintenu par une pompe à protons dépendante d'ATP, la Chloroquine subit une protonation ($CQ-H^+$) qui la rend 100 à 1000 fois moins diffusible. Ce qui explique l'accumulation des Amino-4 -Quinoléines dans la vacuole parasitophore(28).

Figure 2: Modifications ultrastructurales de *P. falciparum* sous l'effet de la chloroquine. Source: Paludisme UREF/1991(31),

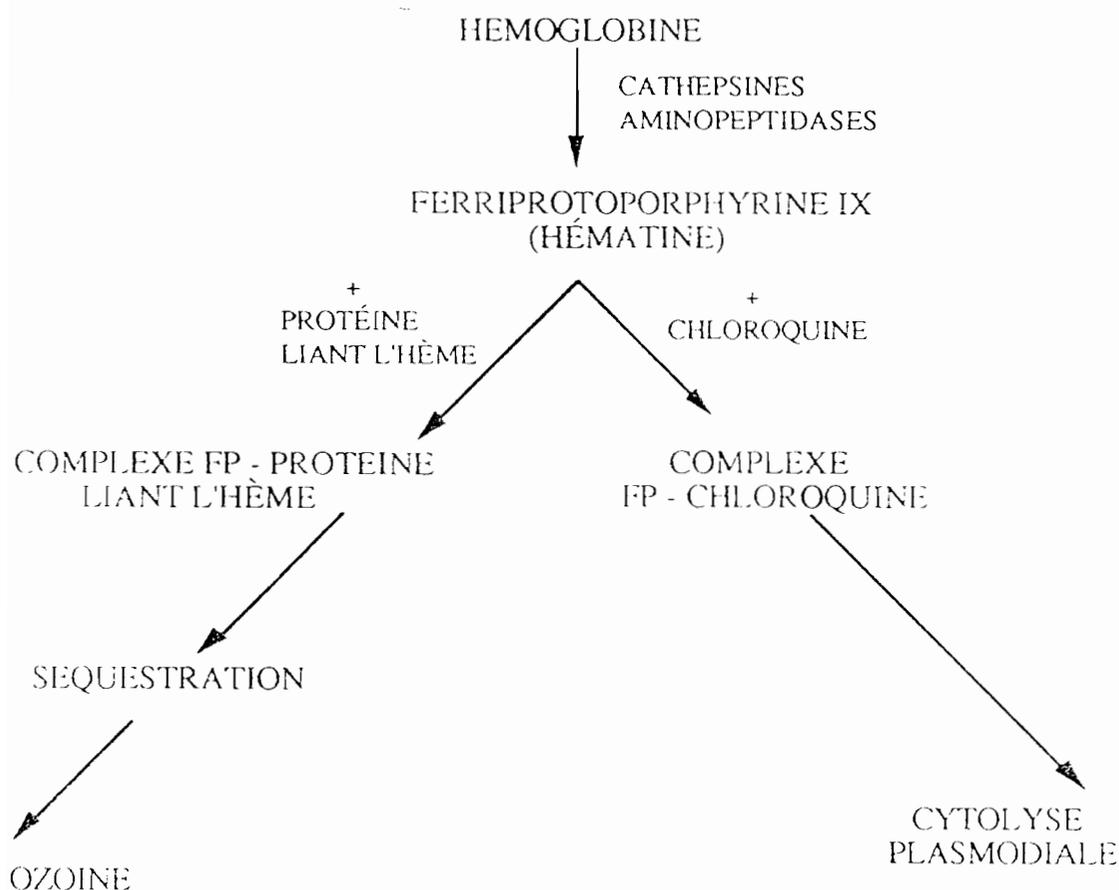


Leurs moyennes du pH dans les compartiments déterminés par les chercheurs

La forme neutre des bases faibles, représentée par B, diffuse librement à travers les membranes... Leurs concentrations dans tous les compartiments sont égales. Par contre, la forme représentée par BH⁺ est peu diffusible. Sa concentration atteint le maximum dans la vacuole, le compartiment le plus acide.

La ferriprotoporphyrine IX a une forte affinité et spécificité pour les Amino-4 -Quinoléines(53). En présence de la Chloroquine, il y aura une compétition entre l'antipaludique et la protéine "haem binder " au bénéfice de la Chloroquine pour former un complexe fp-CQ. Ce complexe lytique provoque une fuite potassique au niveau de la membrane du parasite et entraîne sa destruction (fig3)(15).

Figure 3: Mécanisme d'action des amino-4 quinoléines et des amino-alcools roposés par FITCH. Source Paludisme UREF 1991(28).



3.2.2- Mécanisme de la résistance des plasmodies

A partir des mécanismes d'action des amino-4-quinoléines on peut expliquer les mécanismes de la chimiorésistance par :

- l'altération des mécanismes de concentration de la molécule dans l'hématie et dans la vacuole parasitophore du *plasmodium* résistant;
- la présence chez le parasite résistant d'une protéine ayant une plus forte affinité pour la ferriprotoporphyrine IX que n'a la chloroquine et entre en compétition avec celle-ci.

Ces mécanismes peuvent coexister dans les cas de résistance.

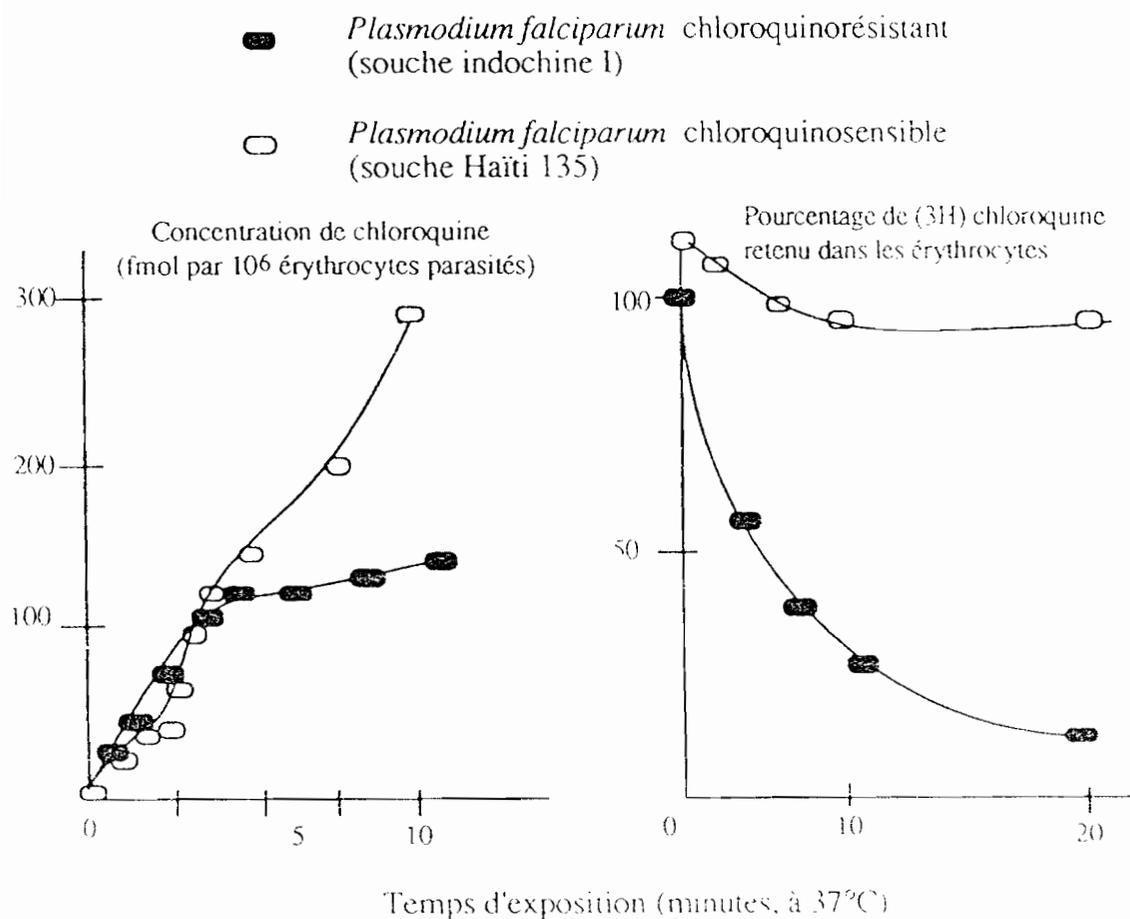
L'altération des mécanismes de concentration de la molécule dans l'hématie et dans la vacuole du parasite résistant est basée selon KROGSTAD sur l'exocytose de la chloroquine(27) .

accumulation initiale de la chloroquine est presque identique chez les deux types de souches . Mais à l'état d'équilibre la chloroquine s'accumule significativement plus chez *Plasmodium falciparum* sensible que chez *Plasmodium falciparum* résistant (fig4).

La cinétique de l'efflux a mis en évidence la sortie rapide de la chloroquine chez les souches chloroquinorésistantes et lente chez les souches sensibles . C'est pourquoi ces dernières gardent 40 à 50 fois plus de chloroquine à l'équilibre (27).

Figure 4: Observation de l'efflux de la chloroquine par KROGSTAD.

Source Paludisme UREF 1991(31).



à gauche
 Accumulation de la chloroquine
 la vitesse initiale de l'accumulation (au cours des 4 premières minutes)
P. falciparum chloroquino-sensible
 $28,6 \pm 1,5 \text{ fmol}/10^6 \text{ érythrocytes parasités}$
P. falciparum chloroquino-résistant
 $29,1 \pm 3,8 \text{ fmol}/10^6 \text{ érythrocytes parasités}$
 à l'état d'équilibre :
P. falciparum chloroquino-sensible
 $10,027 \text{ fmol}/10^6 \text{ érythrocytes parasités}$
P. falciparum chloroquino-résistants
 $234 \text{ fmol}/10^6 \text{ érythrocytes parasités}$

À droite
 Efflux de la chloroquine
P. falciparum chloroquine-R
 $T_{1/2} = 2,2 \pm 0,4 \text{ minutes}$
P. falciparum chloroquine-S
 $T_{1/2} = 85 \text{ minutes}$

2.3. Cas de fausses résistances

Des facteurs humains individuels peuvent être responsables de fausses résistances:

- troubles d'absorption médicamenteuse,
- rejet immédiat du médicament par vomissements ou diarrhées incoercibles avec élimination presque totale du médicament,
- troubles du métabolisme du médicament dus aux déficiences enzymatiques du sujet, ne permettant pas au produit d'être sous sa forme de métabolite actif dans le plasma.

2.4. Hypothèse de la reversion de la résistance

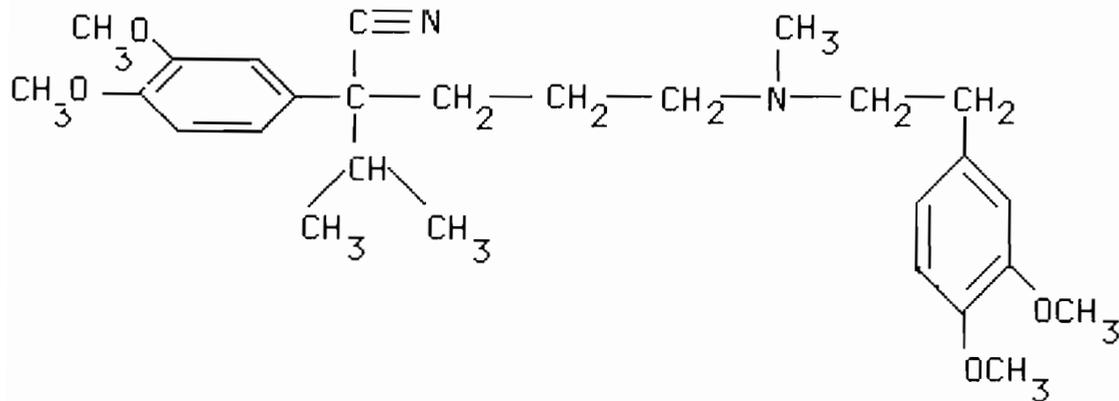
Cette hypothèse est issue du rapprochement des mécanismes de résistance de cellules cancéreuses et de *Plasmodium falciparum*. Certaines cellules humaines cancéreuses deviennent résistantes au composé sélectionné, mais également à des agents chimiques dont les mécanismes d'action sont différents. Une pompe ATP dépendante située dans la membrane plasmique est à l'origine de l'efflux des agents anticancéreux(23,54).

Divers composés peuvent supprimer la multirésistance des cellules cancéreuses . C'est le cas des bloqueurs du canal calcique(16,33,48), les antidépresseurs tricycliques (5) et les antihistaminiques(52).

MARTIN et coll. ont démontré que le Vérapamil (inhibiteur calcique) supprime la chloroquinorésistance de *Plasmodium falciparum* à la même concentration qui inhibe l'efflux des agents anticancéreux des cellules résistantes . Cette synergie vérapamil-chloroquine n'est pas observée avec des souches chloroquinosensibles (33).

.2.5. Le Vérapamil: structure, propriété physique, pharmacologie(14).

) Structure



Bis (dimethoxy -3,4 phenyl)-1,7 méthyl-5 isopropyl-1 cyano-1 aza -(5) heptane) .

Introduit en thérapeutique dans le traitement de l'angor, le vérapamil s'est révélé, en outre, un anti-arythmique efficace et original. Il semble donc que se soit surtout dans cet axe qu'il importe de le situer. Il est également de plus en plus utilisé en psychiatrie dans le traitement des troubles de l'humeur.

b) Propriétés physico-chimiques

Le Vérapamil a un poids moléculaire de 491,1 grammes. Il se présente sous forme de poudre à peu près blanche, presque sans odeur. Son point de fusion est compris entre 141 et 144 °C; sa solubilité est de 1/20 dans l'eau, son pH est de l'ordre de 4,5 à 6,5. Il est important de protéger la solution de la lumière.

c) Présentation

le Vérapamil est commercialisé en France sous forme de comprimés : ISOPTINE[®], sous forme d'ampoule injectable de 5mg.

d) Propriétés pharmacologiques.

Mode d'action : le Vérapamil est un antagoniste des flux transmembranaires du calcium ou calcium-bloquant .

Son effet prédominant est d'inhiber le courant calcique lent entrant dans la cellule, de façon proportionnelle à la dose utilisée.

es effets sont hœmodynamiques systémiques par dépression de la fonction inotrope et artériodilatateur .

ur la circulation coronaire par l'abaissement des résistances artériolaires sans que la veineuse ne soit modifiée . Les effets électrophysiologiques sont dus à la dépression de l'automatisme sinusal et l'allongement du temps de récupération sinusale.

3-TECHNIQUES D' EVALUATION DE LA CHIMIOSENSIBILITE

L'évaluation de la réponse de *Plasmodium falciparum* aux médicaments se fait par des tests *in vivo* et *in vitro* .

3.3.1. Les tests *in vivo*

Ces tests consistent à administrer une dose de Chloroquine base par kilogramme de poids corporel et à suivre l'évolution de la parasitémie pendant une période variant de 7 jours à 28 jours.

Trois types de tests *in vivo* sont actuellement utilisés . Ce sont: le test standard O.M.S.(39), le test standard OMS simplifié(35) et le test simplifié du C.R.C.P./O.C.C.G.E (19).

Le test standard O.M.S.: elle consiste à administrer 25mg de chloroquine base par kg de poids corporel durant trois jours avec une période d'observation de sept jours (Epreuve de sept jours) ou de 28 jours (Epreuve prolongée).

Le test standard simplifié: c'est le test O.M.S. de 7 jours simplifié, les contrôles se faisant à J₂ et J₇.

Le test simplifié du C.R.C.P./O.C.C.G.E.: Il consiste en la réalisation, juste avant administration d'un traitement standard de (25 ou 10 mg/kg de chloroquine à J₀) et d'un frottis, avec un seul contrôle à J₇.

3.3.2. Les tests *in vitro*.

Ce sont des tests pour l'évaluation *in vitro* de la sensibilité de *P. falciparum* à des schizontocides divers. Une première épreuve a été mise au point sur le terrain par RIECKMANN et al. en 1968(4). C'est la macrotechnique de RIECKMANN.

fais s'inspirant du système avec cloche à bougie utilisé dans la culture continue *in vitro* de *P. falciparum* (TRAGGER et JENSEN 1976), RIECKMANN et al. ont décrit une microtechnique qui présente des avantages sur la macrotechnique(46). Cette dernière est adoptée par l'O.M.S. sous le nom de microtest MARK II (43). Un kit spécial pour la mise en œuvre pratique du test est fourni par l'organisation mondiale de la santé.

Une troisième technique est aussi utilisée; c'est le semi-microtest isotopique de DELERON et LE BRAS(30).

3.3.3-Analyse critique des épreuves d'évaluation de la chimiosensibilité.

La résistance *in vitro* apparaît avant celle *in vivo*, mais le test *in vitro* demande beaucoup de matériels, un équipement sophistiqué et un personnel qualifié .

Les échecs liés aux conditions de culture constituent un problème majeur. Les critères d'inclusion, les phénomènes liés à l'immunité sont également des facteurs limitant la réussite du test *in vitro*.

Les problèmes liés à l'infestation mixte à *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium malariae* font que dans les régions où se trouvent ces deux espèces, les résultats obtenus avec l'épreuve *in vitro* doivent être interprétés avec prudence. Des jeunes formes annulaires "non identifiée" de *P. malariae* (faciles à confondre avec des formes annulaires plus mûres de *P. falciparum*) peuvent évoluer en schizontes à des concentrations de chloroquine qui empêchent invariablement la schizogonie chez *P. falciparum* chloroquinosensible.

La réalisation du test *in vivo* est plus aisée (réalisable par des agents de santé de base). Contrairement au test *in vitro* le test *in vivo* permet d'identifier le niveau de la résistance. L'automédication en vue d'atténuer ou de prévenir les symptômes attribués au paludisme constitue un obstacle sérieux à l'exécution des épreuves *in vivo* dans certaines régions; et les cas de fausses résistances peuvent entraîner un biais dans l'interprétation des résultats.

n zone d'endémie palustre le test prolongé (28jours) est perturbé par les éinfestations.

Les épreuves ne s'excluent pas, elles sont au contraire complémentaires. L'absence de méthodes simples pour l'estimation sur le terrain des concentrations d'antipaludiques dans les liquides biologiques empêche de comprendre pleinement les résultats des épreuves *in vivo* et de les corréler convenablement avec les résultats des épreuves *in vitro*.

3.4-METHODES DE RECHERCHE ET DE DOSAGE DE LA CHLOROQUINE DANS LES URINES .

Les méthodes utilisées pour la recherche et le dosage des antimalariques dans les urines sont multiples: méthodes de WILSON et EDISON, de HASKIN, de DILL et GLAZKO (4,22) et BERGQVIST (3,22).

Le Test de WILSON et EDISON utilise le réactif de TANRET (solution aqueuse de chlorure mercurique et d'iodure de Potassium). cette technique est très simple vis à vis de la chloroquine (4mg/l) mais n'a aucune spécificité.

Le Test de HASKINS permet de mettre en évidence les antimalariques par le méthyl orange. Il est sensible pour la chloroquine (2mg/l) mais de mise en évidence délicate sur le terrain et n'a aucune spécificité.

La méthode de DILL et GLAZKO

Principe : l'extrait chloroformique de l'urine est additionné d'un mélange d'éosine et d'acide chlorhydrique . En présence d' amino 4-quinoléïnes et de quinine on obtient une coloration violette.

Le test de DILL et GLAZKO est simple mais sa sensibilité est médiocre. Cette technique bien que recommandée par l'O.M.S. manque à la fois de spécificité et de sensibilité et conduit à de faux résultats positifs ou négatifs inexplicables (4).

a méthode de BERQVIST .

Principe : formation d'une paire d'ions entre les amino 4-quinoléines, la quinine, le proguanil et le bleu de bromothymol. On obtient une coloration lue à 410nm après extraction de cette paire d'ions par le dichlorométhane.

La technique de BERQVIST paraît actuellement la mieux adaptée des techniques simples de dépistage des antimalariques dans les urines (4).

Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP): la CLHP

permet une détection très sensible et le dosage des antimalariques.

Cette technique constitue la méthode de référence car elle permet une détection pharmacocinétique des antimalariques et apporte également une augmentation de la sélectivité. C'est une technique chère nécessitant un matériel lourd non praticable sur le terrain(22).

Une technique ELISA utilisant un antisérum monoclonal et polyclonal a été mise au point mais reste encore non opérationnelle sur le terrain(49).

3.5- EVOLUTION DE LA CHLOROQUINOESISTANCE (fig 5).

C'est en 1960 que les premiers cas de résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine ont été observés en Colombie. Mais elle avait été déjà soupçonnée en 1957 en Thaïland. A la même période, l'existence de souches de *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistantes a été signalée au Venezuela, au Brésil, en Thaïlande, en Malaisie et dans d'autres pays du Sud-Est Asiatique. Au sud du Vietnam un nombre élevé de cas ont été observés chez les militaires américains (41).

En Amérique du sud les résistances se sont étendues entre 1975 et 1980 à toute l' Amazonie (41).

En Amérique centrale, elles n'avaient été signalées qu'au Panama(41).

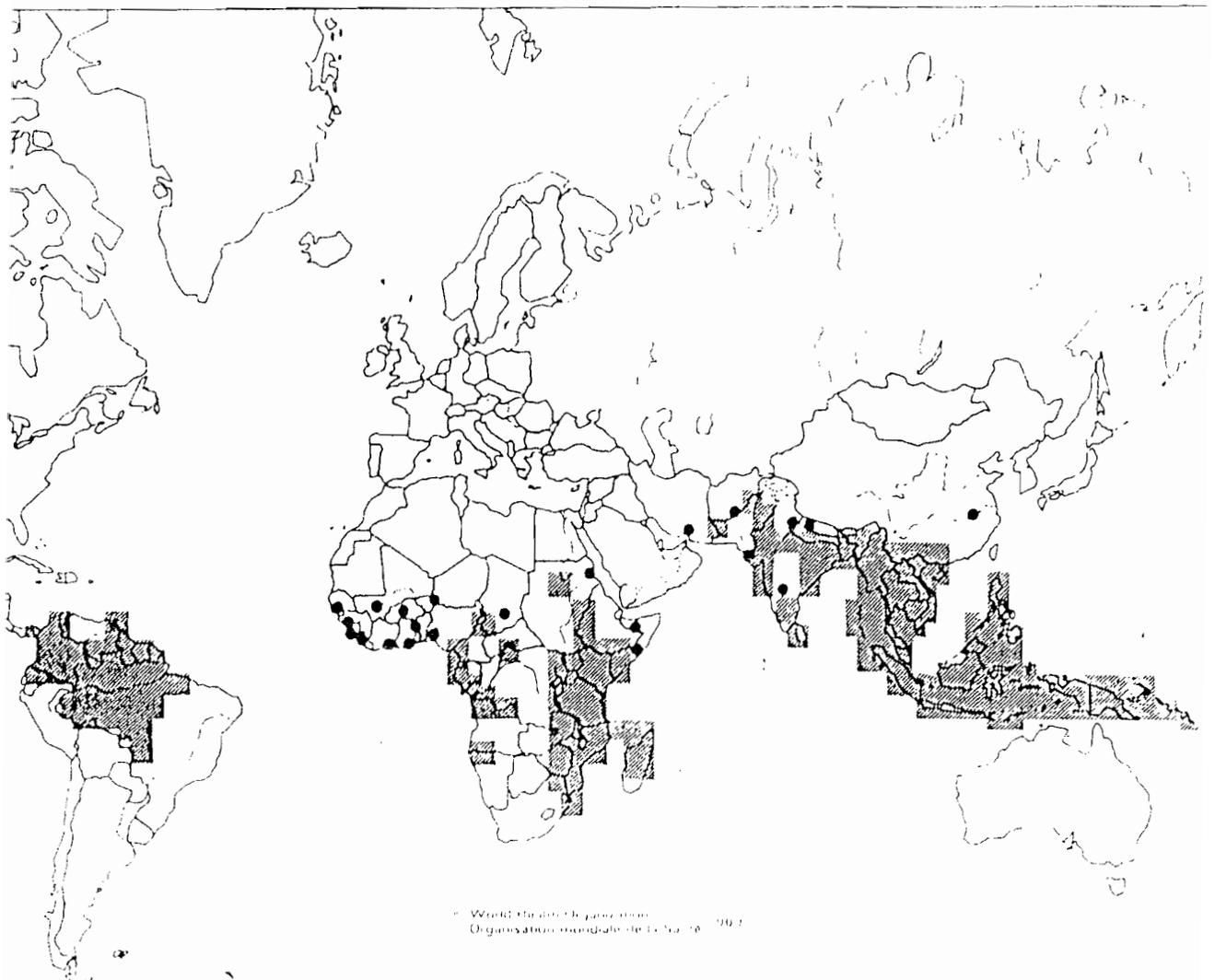
Dans le Sud-Est asiatique la diffusion s'est faite rapidement entre 1975 et 1980 dans les nombreuses populations de Chine du sud, de Malaisie, d'Indonésie, des Philippines.

ne étude faite en 1990 par le DEAP/ENMP* a montré l'existence de foyers locaux de *P.falciparum* chloroquinorésistance. L'étude a été faite à Koudougou, village situé en zone de savane nord soudanienne.

Les données des résistances de niveaux R1 et R2 ont été observées avec un taux global de 29,03% de souches résistantes à la chloroquine.

50 sujets ont été examinés dont 119 porteurs d'une infestation à *Plasmodium falciparum* (6).

Figure 5: Zones dans lesquelles une résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine a été enregistrée. Source OMS 1989.



*D.E.A.P./E.N.M.P.: Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires/
Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie.

ans le sous continent indien, l'extention s'est faite par contiguité au
engladesh et dans les régions Est et Nord de l'Inde jusqu'au Népal.
ongtemps limitée aux continents américain et asiatique , la chloroquino-
ésistance n'a cessé de s'étendre depuis 1978 sur le continent africain.
n 1986 elle avait été signalée dans 25 pays d'Afrique subsahararienne(40).
lle n'épargne actuellement que peu de pays et est en perpétuelle
iffusion(41). La résistance de *Plasmodium falciparum* était suspectée en
972 en Ethiopie et sur la côte Est de Madagascar et en 1975 au
mozambique. En 1978 quelques cas sporadiques ont été décrits aux Iles
omores et à Madagascar. Au Kenya et en Tanzanie elle était confirmée en
ulture *in vitro* . L'hypothèse d' une introduction des souches résistantes en
rovenance de l' Asie du Sud-Est ou de l'Inde, régions touchées depuis 1960
t 1973 est hautement probable.

lle était signalée en 1982 au Soudan et en 1983 au Malawi, Botswana,
l'imbabwe, Zambie et Mozambique.

En 1984 l'extension était notable en Afrique centrale par le Rwanda, le
Burundi, le Zaïre. La côte ouest africaine était atteinte en 1985 (Caméroun,
Guinée équatoriale, Gabon, Congo). La progression vers le Nord -Ouest a
ensuite concerné le Bénin (1986, le Togo, le Ghana, le Nigéria et la Côte
d'Ivoire (1987) puis le Burkina Faso et le Sénégal (1988). Elle est notée au
Niger en 1989 et au Mali en 1990. Seule la Mauritanie semblerait encore
épargnée (19).

Depuis 1987 des cas de chloroquinorésistance importés du Mali
ont été décrits par le conseil supérieur d'hygiène publique de France chez
des sujets non immuns (européens et maliens) (47). Quelques études
effectuées dans différentes localités depuis 1985 sur la sensibilité de *P.*
falciparum à la chloroquine avaient montré que d'une manière générale les
réponses *in vitro* et *in vivo* dans la zone urbaine et péri- urbaine de
Bamako étaient satisfaisantes. Ces études n'avaient pas mis en évidence de
souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine dans la population
autochtone (32,35).

4 -ANTIPALUDIQUES UTILISES AU MALI

Un inventaire exhaustif systématique dans les lieux d'étude a permis de dresser une liste des antipaludiques rencontrés au Mali (13).

4.1- Les sels de Quinine

Le plus utilisé est le dichlorhydrate de Quinine-Resorcine associé à 1,9% de sels de Quinidine, Cinchonine, Cinchonidine, commercialisé sous le nom de QUINIMAX®. Il se présente en comprimés dosés à 100 mg de sels base, et en ampoules injectables de 1, 2 et 4ml dosées respectivement à 100, 200 et 400mg de sels base.

- Le formiate basique de Quinine: QUINOFORME® est commercialisé en ampoules de 2ml dosées à 500mg de sels.

- Le sel de Quinine fabriqué par l'Usine Malienne de Produits Pharmaceutiques (U.M.P.P.) est commercialisé sous le nom de SUMAQUINE®. Il est présenté en ampoules de 1, 2 et 4ml dosées respectivement à 100, 200 et 400mg de sels.

4.2- Les Amino-4-Quinoléines.

Deux sont couramment utilisés au Mali. Il s'agit de la Chloroquine et de l'Amodiaquine.

- La Chloroquine est la plus utilisée sous forme de comprimés de sulfate de chloroquin: NIVAQUINE® dosés à 100 et 300 mg de base de diphosphate de chloroquine, ou de RESORCHIN®, ARALEN®, dosés à 150mg de base. On trouve le sirop de diphosphate de chloroquine pour enfant dosé 25mg par cuillère-mesure.

Signalons que la plus grosse quantité de chloroquine consommée au Mali est conditionnée à l'U.M.P.P. (comprimés et sirop). La Chloroquine en ampoule injectable de 5ml, dosée à 100mg de base, "Don" d'Organismes Non Gouvernementaux (O.N.G.) ou de délégués médicaux est souvent rencontrée dans les hôpitaux et certains centres de santé.

Le dichlororhydrate d'Amodiaquine est commercialisé en comprimés sous nom de CAMOQUIN[®] (200mg de base) et de FLAVOQUINE[®] (152mg de base). Depuis 1988 dans les familles nanties maliennes et chez les expatriés, le sirop de chloroquine est remplacé par la poudre aromatisée dosée à 100mg pour 5ml de FLAVOQUINE[®] (ou de suspension buvable de CAMOQUIN[®]).

3- L'association Sulfadoxine (500mg) + Pyriméthamine(25mg)

Commercialisé au Mali sous le nom de FANSIDAR[®] en comprimés, et en ampoules injectables de 2ml (400mg de sulfadoxine + 20mg de pyriméthamine). Elle est surtout prescrite en ville à Bamako. Son introduction au Mali semble plus ancienne (probablement vers les années 1972)(13).

4. Les Amino-Alcools:

Le chlorhydrate de Méfloquine, LARIAM[®] en comprimés de 250mg de base est utilisé au Mali depuis 1986 par les expatriés, les touristes et d'une manière occasionnelle par les villageois qui ont des parents en France, ou des villages jumelés à une ville occidentale. Il est très courant de trouver quelques comprimés de ce médicament dans une famille, offerts amicalement par un touriste en fin de séjour. Les prescripteurs maliens connaissent très peu la Méfloquine et sa prescription est peu courante actuellement dans les formations sanitaires.

Le chlorhydrate d'Halofantrine HALFAN[®] n'a été introduit au Mali qu'à partir de 1988. Les cliniques privées bamakoises prescrivent actuellement ce produit à une clientèle privilégiée. Il est commercialisé en comprimés de 250mg de base. Sa diffusion dans le monde médical devient de plus en plus grande .

4.5. Le Proguanil : PALUDRINE[®] n'a été introduit au Mali qu'à partir de 1989 dans le cadre d'une nouvelle stratégie de chimioprophylaxie qui l'associe à la Chloroquine. Son utilisation reste très limitée dans le petit cercle de population sentinelle expatriée. Il se présente en comprimés dosés à 100mg de base.

6. La triple association Sulfadoxine (500mg) + Pyriméthamine (25mg) + Méfloquine (250mg) : FANSIMEF® est présente sur le marché malien en comprimés.

Sous la pression des délégués médicaux, ce produit commence depuis 1989 à être prescrit en deuxième intention, souvent même en première intention, par les praticiens urbains devant toute suspicion de fièvre.

7. Le dérivé du Qinghaosu (*Artemisia annua* L.).

Ce produit est utilisé par les médecins de l'assistance médicale chinoise sous forme de comprimés dosés à 250mg d'artémisinine. Ils ne l'utilisent que dans la population chinoise expatriée et seulement en cas de non réponse à la chloroquine et aux sels de quinine. Récemment en 1992, un stock important de ce médicament a été découvert dans les pharmacies de l'Initiative de Bamako à Sikasso (13).

Son utilisation est donc extrêmement limitée au Mali. Il semble que son introduction au Mali date de 1990.

8. Le MALARIAL 5® est une poudre de trois plantes de la pharmacopée traditionnelle malienne (*Cassia occidentalis*, *Lippia chevelieria* et *Spilanthes olecraceae*), utilisée en décoction. Les tradipraticiens locaux l'utilisent depuis des millénaires comme fébrifuge. Il est actuellement conditionné en sachets de 5g par la Division Médecine Traditionnelle

(D.M.T.). Cette présentation fait l'objet d'essais cliniques randomisés et de tests *in vitro* depuis 1986 (20,24) et est commercialisée comme antipaludique traditionnelle depuis 1989 au Mali.

Ce produit est largement prescrit actuellement à cause de son efficacité symptomatique sur les syndrômes grippaux et pseudo-palustres

1.9- Les produits de substitution

1.9.1- Les Sulfones

La Diaphénylsulfone: Dapsone = D.D.S., est utilisée classiquement dans la chimiothérapie de la lèpre au Mali.

Ces lépreux ayant constaté qu'ils faisaient moins d'accès palustres sous ce produit, le proposent comme antipaludéen dans les villages reculés où la circulation de la chloroquine est très limitée. Cette constatation accidentelle isolée dans une seule région du Mali) mérite d'être étudiée sur le plan national, car elle compromet dangereusement l'avenir de l'association Dapson-Pyriméthamine (MALOPRIM®) au Mali .

1.9.2- Les Antibiotiques

Ces produits ne sont pas utilisés intentionnellement au Mali comme antipaludéens, car l'activité schizontocide de certaines familles d'antibiotiques (Macrolides, Tétracyclines, etc ...) est peu connue des prescripteurs au Mali (sauf en milieu spécialisé). Mais il est courant de voir les gélules de Tétracyclines (Oxytétracycline , Doxycycline) connues sous le nom local de "*Kgun bleni* " vendues par de simples étalagistes. Ces produits initialement utilisés par la population contre les maladies sexuellement transmissibles (M.S.T.), connaissent d'autres indications tel que le syndrome du "*Palu Chronique Malien* ".

Cette longue liste de produits antipaludiques utilisés au Mali traduit un manque de politique médicamenteuse cohérente, coordonnée et structurée au tour du Programme National de Lutte Contre le Paludisme, avec une stratégie efficace de surveillance épidémiologique de la chimiorésistance. Malgré la liste officielle de médicaments essentiels dressée lors de la réunion des Ministres de la Santé de la zone I O.M.S. à Bamako en 1987 et connue sous le nom de " l'Initiative de Bamako ", la prescription de nouveaux antipaludéens devient une vogue entretenue par les délégués médicaux (13).

5-MATERIELS ET METHODES

5.1 LIEUX DE L'ETUDE .

Plusieurs écosystèmes ont été choisis à travers les différents faciès épidémiologiques du paludisme pour l'étude. Il s'agit de:

* trois villages en savane nord soudanienne: TIENEGUEBOUGOU, KAMBILA et SAFO, où le Laboratoire d'Epidémiologie des Affections Parasitaires dispose des données de base sur l'épidémiologie du paludisme sur une dizaine d'années;

* un village en zone de savane sud soudanienne: DIALAKORO, zone du barrage de Sélingué où les mouvements de population sont importants;

* une ville à attrait touristique: MOPTI, située au confluent du Niger et du Bani au cœur du sahel malien.

* deux villages en zone peri-urbaine de BAMAKO: SOTUBA ET KALABANCORO.

5.1.1- TIENEGUEBOUGOU - KAMBILA - SAFO.

Tiénéguebougou et Kambila sont deux villages de l'Arrondissement central de Kati. Safo est un chef lieu de secteur de l'Arrondissement de Kalabankoro.

Ces trois villages situés dans le Cercle de Kati, sont d'un même cadre géographique. Ils sont en zone nord soudanienne et présentent des caractéristiques écoclimatiques identiques.

a) Relief: à Tiénéguebougou et Kambila , il est peu accidenté avec des plaines argilo-gravillonneuses et des formations meubles . Il présente deux grandes surélévations : la colline de Banambakoulou et celle du Kouloubléni culminant respectivement à 400m et 500m. A Safo les terrains sont souvent couverts de cuirasses ferrugineuses et des formations meubles contenant des gravillons latéritiques. Il est constitué essentiellement par les collines du Dienfakoulou, de Kouloudian et de Torodokoulouni.

Ces terrains présentent par endroits des traces d'embourbement de véhicules qui constituent de véritables gîtes larvaires pour les culicidae.

b) Végétation: la végétation est constituée par la savane arborée avec un tapis herbacé dominé surtout par le karité Vitellaria paradoxa et quelques caïcédrats Khaya senegalensis. Cette végétation est soumise à une destruction massive par une exploitation abusive du bois.

c) Faune: elle est pauvre; on y rencontre des lièvres à oreille de lapin Lepus orawshayi, et des pintades sauvages Niumida meleagris, des chats sauvages Felis sylvestris lybica, des singes rouges Erythrocebus patas, des phacochères .

d) Climat: il est caractérisé par deux saisons: une saison pluvieuse qui va du mois de Juin au mois d'Octobre, et une saison sèche de Novembre à Mai. Cette saison sèche est divisée en deux périodes bien distinctes: une période froide du mois de Novembre au mois de Janvier et une période de chaleur de Février à Mai.

e) Hydrographie: Il n'existe pas de cours d'eau permanent dans ces villages. Pendant l'"hivernage" se forment des marigots alimentés par des ruisseaux qui drainent les eaux de pluies. Ces marigots constituent en certains endroits des gîtes potentiels pour les Anophèles.

A Kambila c'est le Kambiladla qui traverse le village d'Est en Ouest.

A Tiénéguébougou c'est le Bamadla situé au nord et coulant d'Ouest vers l'Est.

Le village de Safo est essentiellement arrosé par trois cours d'eau qui sont le Trono, le Niamadoko et le N'golonogoni.

f) Population: la population est essentiellement composée de Bambara et compte 216 habitants à Tiénéguébougou, 719 habitants à Kambila et 1500 habitants à Safo. Elle est entièrement musulmane à Tiénéguébougou, à 95% à Kambila et majoritairement animiste à Safo.

L'habitat comprend trois types de construction: des cases rondes avec toit de chaumes conique , des cases rondes ou rectangulaires avec toit en terrasse et des maisons rectangulaires avec toit de tôle qui sont rares. Les murs de ces constructions en banco présentent des fentes de retrait qui sont d'excellents lieux de repos pour les moustiques ainsi que les toits en chaume et en terrasses.

g) Activites économiques: l'agriculture constitue le potentiel de l'économie et occupe 99% de la population active. Les cultures maraîchères y sont également très développées.

L'élevage est une activité pratiquée surtout par la minorité Peulh .

5.1.2- DIALACORO: Le village de Dialacoro est situé à 3 km en aval du barrage de Sélingué , dans le périmètre agricole.

Le relief présente des plateaux tabulaires aux bords abrupts dont l'altitude excède rarement 400 m. De nombreuses vallées sinueuses plus ou moins encaissées , constituent les réseaux hydrographiques de la zone.

Le climat est de type soudano-guinéen avec une saison sèche de 6mois de Novembre à Avril et une saison pluvieuse de Mai à Octobre. La pluviométrie est supérieure à 1200mm par an Les températures maximales se situent généralement en Avril (40,2°C).

La population est estimée à 3000 habitants. Ce village n'a pas été déplacé pendant la mise en eau du barrage.

Il existe dans le village une école et un dispensaire-maternité assez fonctionnels.

5.1.3- MOPTI: La ville de Mopti est la capitale régionale de la 5ème région administrative du Mali. Elle est située en zone sahélienne , dans le delta intérieur de fleuve Niger. La ville est une presque île entourée par les différents affluents du Niger. Sa population est estimée à 55000 habitants (recensement de 1990). La densité humaine est la plus élevée des villes maliennes. Le système d'évacuation des eaux usées est presque inexistant. Mopti est entourée d'eau et de rizières. Il existe un hôpital régional un centre de santé de cercle et des dispensaires dans chaque quartier.

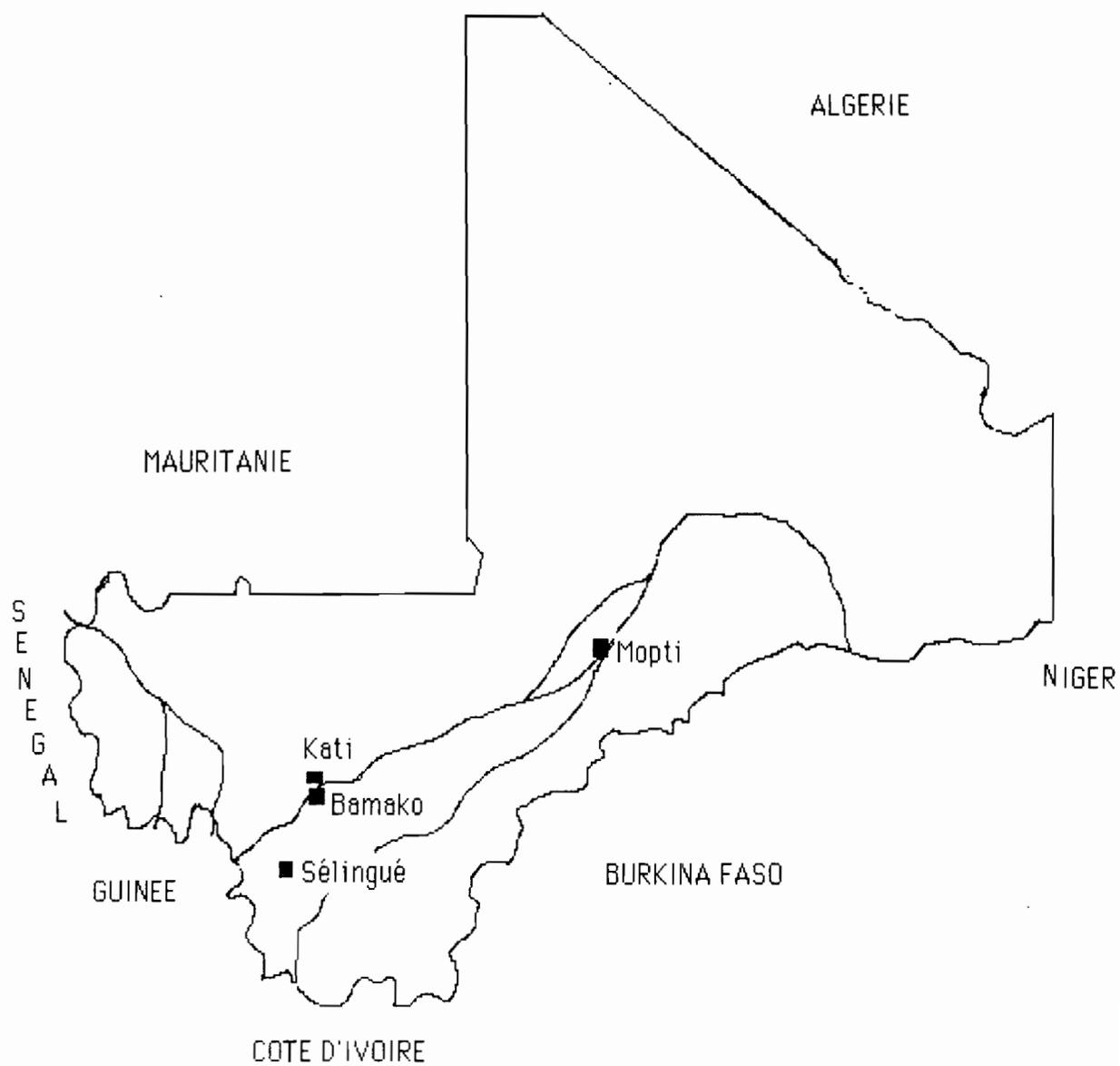
La ville accueille de nombreux voyageurs qui sont soit en partance pour Gao et Tombouctou ou venus visiter les sites touristiques de la région (Mopti , Djénné , Sangha) .

5.1.4- SOTUBA ET KALABANCORO:

Sotuba est un quartier périphérique de la ville de Bamako situé à l'Est de la ville sur le territoire du Centre de Recherche Zootechnique (C.R.Z.). Ce village était à l'origine un camp d'hébergement des manoeuvres travaillant au C.R.Z. et compte aujourd'hui environ 1500 habitants. Il est situé à environ un kilomètre du lit du fleuve Niger. L'habitat comprend les types de cases rondes ou rectangulaires en banco avec toit en chaumes conique et en tôle.

Kalabancoro est un chef lieu d'Arrondissement du Cercle de Kati . Il est situé au sud et en peripherie de Bamako près du fleuve Niger . La population qui était d'environ 2000 habitants est sans cesse grandissante du faite de la distribution de nouveaux lots d'habitation . On y retrouve des maisons en banco avec toit en tôle et des maisons en dur. Le climat dans ces zones est un climat de type nord soudanien.

Figure5: Lieux de notre étude.



Echelle: 1: 15 000 000

5.2- PERIODE D'ETUDE

Nous avons travaillé durant deux saisons de transmission du paludisme au Mali; du mois d'Août au mois d'Octobre en 1991 et du mois de Juin au mois de Septembre en 1992.

5.3- TYPE D'ENQUETE

Notre étude est de type transversale, prospective.

5.4 - ECHANTILLONNAGE

Notre choix a porté sur les enfants de 1an^r à 9ans . Nous avons systématiquement recruté tous les enfants de ce groupe d'âge dans chaque village.

Critères d'inclusion :

- être âgé de 1 à 9 ans ,
- avoir une infection monospécifique à *Plasmodium falciparum* ,
- avoir une densité parasitaire supérieure ou égale à 1000 et inférieure ou égale à 80000 parasites asexués par mm³ de sang ,
- n'avoir pris aucun antipaludéen récemment(test de Dill et Glazko négatif) .

Critères d'exclusion :

- avoir une chloroquinurie positive ,
- avoir vomi immédiatement après l'ingestion de chloroquine ,
- être allergique à la chloroquine.

Après une sensibilisation de la population notre équipe procédait à un recensement systématique de la population cible. Chaque unité statistique était identifiée par un numéro à 4 chiffres (n° de famille, n° d'individu).

L'étude a également concerné des échantillons provenant des hôpitaux du Point "G" et de Gabriel Touré pour la recherche de *Plasmodium*.

5.5 - Techniques de recherche

Les techniques de la goutte épaisse et du frottis mince ont été utilisées pour dépister les infections monospécifiques à *Plasmodium falciparum*; l'une pour le suivi parasitologique, l'autre pour le screening

Le test de DILL et GLASKO a été utilisé pour la détection de la chloroquine dans les urines.

Les tests *in vivo* O.M.S. de 7 jours et de 28 jours, le microtest *in vitro* O.M.S et le test rapide (2 à 3 heures) de KROGSTAD ont été utilisés pour tester la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine.

5.4. 1- Goutte épaisse et Frottis mince :

Materiel

- Lames porte -objet
- Lancettes stériles
- Tampon d'alcool
- Eprouvette de 10 cc , 500 cc et 1l
- Pipettes
- giemsa solution pure
- Huile d' immersion
- Comprimé tampon (Buffer tablet pH 7,2; un comprimé tampon pour un litre d' eau distillée)
- Bacs de coloration pour 10 et 100 lames
- Boîtes de collection OMS
- Eau distillée
- Methanol pur (100%)
- Eosine
- Vert de Malachite
- Formaldéhyde

- Phosphate dibasique de sodium
- Bleu de Méthylène
- Azure de Sodium
- Minuterie
- Ratelier.

Mode opératoire

Nous avons fait une goutte épaisse et un frottis mince sur chaque individu inclus dans le protocole.

Le troisième doigt de la main était désinfecté au tampon d'alcool. À l'aide d'une lancette stérile une ponction capillaire était faite. La première goutte était éliminée avec du coton sec. La seconde était destinée à la confection du frottis. Une troisième goutte plus importante était déposée au centre d'une lame; grâce à l'angle d'une autre lame nous effectuons la défibrinisation mécanique par un mouvement circulaire de façon à étaler le sang en un cercle d'environ 1cm de diamètre.

Les lames marquées au crayon indélébile étaient mises à plat dans des boîtes de collection (type O.M.S.) à l'abri de la poussière et des mouches et sont ensuite séchées.

Coloration des lames

a) Gouttes épaisses: La technique de coloration au giemsa 3% à un seul temps (45mn) a été choisie. Les lames étaient rangées une à une dans le bac de coloration. La solution de giemsa était versée dans le bac en prenant soin d'immerger toutes les lames. Le couvercle était ensuite mis. 45 mn après, la fine pellicule de colorant était chassée avec l'eau tamponnée (pH 7,2). Les lames étaient ensuite rincées à l'eau de robinet en imprimant au bac de légers mouvements de translation. Elles étaient enfin exposées sur le râtelier pour le séchage. Les lames ainsi séchées sont mises par paquets de 50 et scellées avec du scotch et étiquetées.

b) Frottis minces : nous avons utilisé une technique rapide (1 mn) de coloration des frottis: C'est la technique de LEUCOSTAT STAIN.

Réactifs utilisés

* **Solution A** : solution pure de méthanol (100%) plus du vert malachite à la concentration de 2mg/l.

NB: Ne pas préparer un litre, si on n'a pas beaucoup de lames à colorer en même temps, si non le vert malachite se décolore avec le temps.

* **Solution B** :

Eosine Y 100mg pour 100ml de solution de coloration B,
Formaldéhyde 100µl pour 100ml de solution de coloration B si le formaldéhyde est pur 100%, si non utiliser 300µl pour 100ml s'il est à 37%,

Sodium phosphate dibasique 400mg pour 100ml ,
Sodium phosphate monobasique 500mg pour 100 ml (dans l'eau).

* **Solution C** :

Bleu de méthylène 47mg pour 100ml,
Azur A 44mg pour 100ml,
Sodium phosphate dibasique 400mg pour 100ml,
Sodium phosphate monobasique 500mg pour 100ml (dans l'eau).

Protocole opératoire

Laisser sécher les frottis à l'air tout en les protégeant mouches et de la poussière,

plonger le frottis dans la solution A trois fois une seconde chacune, égoutter l'excédent de solution à l'aide de papier buvard,

plonger trois fois une seconde dans la solution B,

rincer le frottis dans une solution d'eau et égoutter,

plonger 6 fois une seconde dans la solution C,

rincer dans l'eau et sécher; la lame est ainsi prête pour la lecture.

Résultats

Le noyau de Plasmodium se colore en bleu clair (ou foncé en fonction du temps de coloration dans la solution C).

Les hématies sont roses pâles, les tâches de Maurer et les granulations de Schuffner sont aisément identifiées.

Le diagnostic d'espèce plasmodiale est très facile avec cette coloration.

Examen microscopique et résultats

Les frottis étaient immédiatement observés sur le terrain avec des microscopes binoculaires (LEITZ , NIKON) au grossissement 10x100 (objectif d'immersion 100 et oculaire 10). Une lame n'était considérée négative qu'après examen de tout le frottis. La parasitémie était établie après examen de 100 champs (environ 20 000 hématies). Le résultat exprimé en nombre de croix, en fonction des hématies parasitées par mm^3 de sang (HP/ mm^3) et sur la base de 4 millions d'hématies comme moyenne du nombre érythrocytaire. L'identification parasitaire était faite à partir du frottis.

De 1000 à 5000 TPf/ mm^3 le résultat s'exprime par une croix (+).

De 5001 à 20 000 TPf/ mm^3 le résultat s'exprime par deux croix (++).

$\geq 20\ 000$ TPf/ mm^3 on note trois croix (+++).

Les gouttes épaisses ont été examinées au laboratoire du D.E.A.P., avec les mêmes microscopes. La densité parasitaire a été établie par comptage des parasites pour 300 leucocytes et le résultat exprimé en nombre de parasites par mm^3 de sang sur la base de 6500 leucocytes comme moyenne du nombre leucocytaire .

Mode de calcul :

Soient X le nombre de parasites comptés au microscope et Y le nombre de leucocytes correspondant comptés =300

$$\text{La parasitémie } N = \frac{X}{Y} \times 6500 \quad \text{P}/\text{mm}^3$$

5.5.2- Les tests *in vivo* de l'O.M.S.

Le test de 7jours a été appliqué pour Dialakoro, Sotuba et Kalabancoro, celui de 28jours pour Tiénéguébougou kambila et Safo.

La chloroquine 100mg de base en comprimés sécables des laboratoires Pharmamed Ltd fournie par l'OMS a été utilisée.

Mode opératoire

Nous avons administré 25mg de chloroquine base par Kg de poids corporel repartis sur 3jours, aux enfants sélectionnés pour le test *in vivo*. Le suivi a été fait selon le schéma suivant:

Jour 0:- première dose de 10mg/kg de poids corporel en prise unique,

- une goutte épaisse et un frottis mince
- un prélèvement d'urine pour recherche de chloroquine.

Jour 1:- deuxième dose de 10mg/kg de poids corporel en une prise unique,

- prélèvement d'urine pour recherche de chloroquine.

Jour 2:- troisième et dernière dose de 5mg/kg de poids corporel en prise unique,

- goutte épaisse pour contrôle de la parasitémie,
- prélèvement d'urine pour recherche de chloroquine,

Jour 5:- goutte épaisse pour contrôle de la parasitémie,

- prélèvement d'urine pour recherche de chloroquine.

Jour 7:- goutte épaisse pour contrôle de la parasitémie,

- prélèvement d'urine pour recherche de chloroquine.

Jour14:- goutte épaisse pour contrôle de la parasitémie.

Jour21:- goutte épaisse pour contrôle de la parasitémie.

Jour28:- goutte épaisse pour contrôle de la parasitémie.

Mode d'utilisation de la chloroquine

Les comprimés étaient administrés per os aux enfants; la prise effective se faisant devant le personnel, après le prélèvement de sang et des urines. Nous prenions le soin de garder les enfants en observation, pendant 45 minutes pour déceler d'éventuels vomissements.

Le poids était estimé sur une balance pèse personne standardisée.

5.5.3. Le microtest *in vitro* de l'O.M.S.

Deux modifications ont été apportées au test standard .Les prélèvements de sang veineux ont été effectués par le système vacutainer à la place des microtubes fournis dans le kit. Aussi 100µl de sang dilué au lieu de 50 du test standard ont été mis dans les godets témoins. les cultures ont été incubées parfois jusqu'à 48 heures et les étalements épais de sang après culture colorés par la technique de " Leucostat Stain ".

Les plaques de microculture en polystyrène rigide FALCON[®] de BECTON DIKISON et le milieu de culture RPMI 1640 LPLF de GIBCO Ltd nous ont été fournis par l'O.M.S.

Materiel:

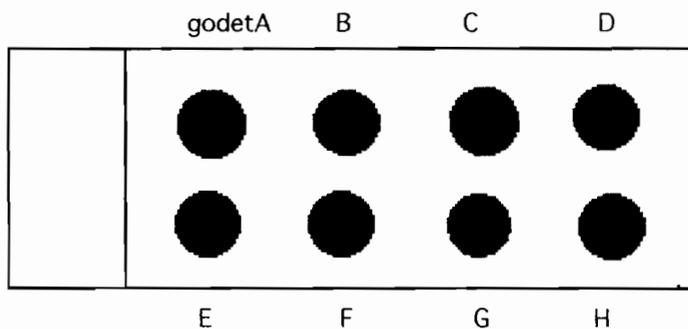
- RPMI 1640 LPLF
- tampon d'alcool à 90°
- Tube hépariné aiguille de prélèvement 22G1/2
- Corps de pompe
- Tubes FALCON[®] en plastique de 6ml
- Seringue de 1ml
- Microplaque de culture FALCON[®] contenant la chloroquine
- Pipette EPPENDORF[®]
- Feutre indélébile
- Incubateur G.Q.F. MFG CO. USA
- Cloche à bougie de paraffine
- Micropipette de 50µl muni d'aspirateur KIMBLE[®]
- Scapel
- Pincés
- Bec de flamme.

Mode opératoire

Nous avons prélevé pour chaque enfant inclu dans le protocole environ 5ml de sang sur anticoagulant. Ce sang a été acheminé directement au laboratoire pour le test in vitro selon le schéma suivant:

- opérer sous une hotte en présence d'un bec de flamme;
- prélever à l'aide de la seringue stérile de 1ml, 0,2ml de sang (le reste de sang est soigneusement gardé pour le test rapide);
- porter sur chaque seringue le numéro du sang correspondant;
- prélever deux fois 0,9ml soit 1,8ml de milieu de culture RPMI au moyen de la seringue stérile de 1ml;
- introduire les 1,8ml de RPMI dans le tube de 5ml stérile et fermer;
- transvaser les 0,2ml de sang préalablement prélevé dans le tube contenant les 1,8ml de RPMI;
- agiter doucement pour mettre les cellules sanguines en suspension;
- placer sur le portoir;
- retirer à l'aide du scapel et de la pince la feuille de plastique scellant la ou les colonnes voulues de la plaque de culture;
- Mettre 100 μ l du mélange sang/RPMI au moyen de la pipette Eppendorf dans le godet témoin(godetA) et 50ml dans les autres godets de la colonne correspondante suivant l'ordre B,C,D,E,F,G,H;
- on changera d'embout chaque fois que l'on commencera une nouvelle colonne pour éviter d'introduire le médicament dans le godet témoin; tout en versant le mélange sang/RPMI agiter le doucement pour toujours le maintenir homogène;
- placer le couvercle de la plaque et inscrire le numéro du malade au moyen d'un feutre au dessus de la colonne correspondant;
- remuer doucement la plaque de culture pendant quelques secondes pour dissoudre le médicament déposé dans les godets;
- placer la plaque de culture dans la cloche à bougie de paraffine;

- allumer la bougie et placer le couvercle de la cloche au moment où la flamme va s'éteindre;
- mettre la cloche dans l'incubateur à 37°C
- effectuer un contrôle au bout de 24 heures par étalement d'une petite quantité du contenu du godet témoin; si la maturation des parasites est satisfaisante ,alors sortir la plaque en vue de l'étalement de son contenu; au cas contraire attendre 48heures pour enfin sortir la plaque de l'étuve
- au terme de l'incubation préparer deux étalements à partir du contenu de chaque godet après avoir enlevé la plus grande quantité possible de surnageant au moyen de la micropipette équipée d'aspirateur, comme indiqué ci-dessous:



- laisser sécher à l'abri des mouches pendant 24 heures;
- colorer les étalements par la technique de leucostat stain
- procéder à la numération.

Examen des étalements de sang après culture

Les étalements correspondant à chaque concentration de chloroquine sont minutieusement examinés.

Méthode de dénombrement des schizontes

La base de la numération est :

le nombre de schizontes avec trois noyaux
ou plus pour 200 parasites asexués (c'est à dire
trophozoïtes et schizontes).

Pour qu'une épreuve soit acceptable, la maturation des schizontes doit être d'au moins 10% (c'est à dire 20 schizontes avec trois noyaux ou plus pour 200 parasites asexués) .

Cette numération peut alors être exprimée en pourcentage par rapport au témoin comme dans l'exemple suivant :

Temoin	Medicament testé	
Nombre de schizontes c'est à dire avec 3 noyaux ou plus pour 200 parasites après incubation	Nombre de schizontes à repeter pour chaque godet d'épreuve	
Temoin 98	Nombre de schizontes pour 200 parasites après incubation 49	% de schizontes par rapport à l'échantillon temoin (temoin=100%) 49 : 98 x100 = 50%

Interprétation des résultats

Si :

- le développement du témoin est satisfaisant (c'est à dire qu'il y a au moins 20 schizontes possédant 3 noyaux ou plus pour 200 parasites asexués) ;
- l'isolement d'origine ne contient pas plus de 80 000 parasites par μl de sang ;
- l'infection est monospécifique à *Plasmodium falciparum* , on peut conclure .

Médicament : Réponses satisfaisantes : Indice d'une résistance

d'épreuve : _____ :

: Inhibition totale des : Développement des schizontes

: schizontes :

: à : à

: :

Chloroquine : 4 pmols ou moins : 8 pmols ou moins

on obtient des données plus significatives en regroupant les résultats d'une série d'épreuve (au minimum 10 et de préférence 30 au plus).

Ces données regroupées peuvent être simplement obtenues en ajoutant les nombres de schizontes obtenus pour les témoins et pour chaque concentration, puis en divisant par le nombre d'épreuve, de façon à obtenir des nombres moyens de schizontes, qu'on exprime ensuite en pourcentages par rapport aux témoins. Les chiffres obtenus représentent les taux de maturation des schizontes. Si on les rétranche de 100, les résultats représentent les pourcentages d'inhibition de la maturation des schizontes.

Les résultats sont enregistrés sur des fiches fournies à cet effet par l'OMS (voir fiche annexe).

5.4.4 - Recherche de chloroquine dans les urines

Nous avons utilisé le test standard de DILL et GLAZKO . La recherche de chloroquine a été faite systématiquement dans les urines des sujets inclus aux jours 0 ,1 , 2 , 5 et 7.

- Réactif

éosine.....50mg
acide chlorhydrique.....1ml
chloroforme..... 100ml

- Matériel

balance de précision
mortier et pilon (en verre)
entonnoir (en verre)
papier filtre
éprouvette graduée 100ml
pipettes GILSON P100 et 1000
embouts bleus et jaunes
tubes à hémolyse en verre
tubes FALCON de 50ml

- Préparation du réactif :

- . peser 50mg d'éosine et le mettre dans le mortier en verre ;
- . mesurer exactement 100ml de chloroforme et 1ml d'acide chlorhydrique une fois normale et les verser dans le mortier en triturant avec le pilon en verre ,
- . filtrer .

On obtient une solution jaune qui constitue le réactif qu'on met dans un flacon en verre pour le stockage au frais .

- Mode opératoire

Les urines sont prélevées dans des tubes FALCON de 50ml jamais utilisés . Sur 1000 μ l d'urine , prélevées pour chaque échantillon dans un tube à hémolyse , 100 μ l de réactif sont ajoutés .

L'observation du fond du tube à l'œil nu , montre à l'agitation un précipité rose en cas de réaction positive .

5.4.5- Le test rapide du Dr D. KROGSTAD .

Principe

Ce test est basé sur la capacité du vérapamil (inhibiteur calcique) à bloquer l'excrétion et l'exocytose de la chloroquine de la vacuole parasitophore des souches chloroquinorésistantes de *Plasmodium falciparum*. Les souches plasmodiales du malade sont incubées dans une solution de chloroquine marquée à l'hydrogène tritiée (^3H), avec et sans vérapamil. La radioactivité des deux échantillons est comptée dans un bêta compteur à scintillation liquide. La différence de DPM* entre les deux échantillons permet d'affirmer la sensibilité ou non d'une souche de *P. falciparum* en deux heures et de déterminer le niveau (R_I ou R_{III}).

*DPM = Désintégration Par Minute

Réactifs et matériels .

RPMI 1640

RPG+ avec vérapamil

RPG+ sans vérapamil

RPG+ à diluer

Vérapamil

Protosol

Ethanol

Eau oxygéné

Huile de silicone

Acide chlorhydrique 1N

Chloroquine marquée au tritium(CQ-3H)

Cocktail de scintillation liquide

Pipettes GILSON 10, 20 , 200 , 1000

Pipettes PASTEUR

Embouts jaunes et bleus

Tubes EPPENDORF

Microtubes EPPENDORF

Tubes héparinés

Aiguilles pour vacutainer 21 GI^{1/2} et 22 GI^{1/2}

Corps de pompe

Flacon de scintillation (standard)

Portoir pour microtubes

Portoir pour incubation

Portoir pour flacon de scintillation

Poire pour pipette PASTEUR

Papier aluminium

Pissettes

Thermomètres

Papier pour imprimante

Gants en polyvinyle

Ruban pour imprimante

Scotch pour marquage

Papier hygiénique

Pinces

Ciseaux

Lames de rasoir

Marquers indélébiles

Incubateur portatif

Transformateurs

Vortex SI BECKMAN

Microcentrifugeuse BECKMAN

Stabilisateur BECTON

Sparadras

Compresse stériles

Système à scintillation liquide LS 6000TA BECKMAN

Tampon d'alcool préfabriqué KINDALL

Matériel de comptage de la radioactivité.

Le comptage de la radioactivité des échantillons a été fait par le système à scintillation liquide de la série LS 6000TA de BECKMAN. C'est un appareil conçu pour assurer avec haute précision le comptage automatisé du degré de radioactivité d'échantillons à marquage radioactif. Sur ordre de l'utilisateur l'appareil de mesure peut réaliser divers calculs à partir des données obtenues par comptage.

Description générale

Le système à scintillation liquide de la série LS 6000TA de BECKMAN est un spectromètre de paillasse microprocessorisé à trois voies permettant la mesure des noyaux radioactifs. L'appareil enregistre les comptages par minute (CPM), la forme la plus commune de résultat en analyse par scintillation liquide.

Toute fois, les résultats peuvent également être exprimés en désintégration par minute (DPM), unité plus fiable puisqu'elle tient compte de divers facteurs de distorsion des résultats en CPM. En configuration standard, la correction de l'affaiblissement se fait par le nombre IC. Les autres options comprennent la normalisation des données, la soustraction des fonds et le calcul des pourcentages de référence.

L'appareil de mesure a une capacité maximale de 336 flacons standards ou de 648 miniflacons. Il peut être réglé pour répondre aux exigences optimales du comptage sur scintillateur liquide.

Vingt programmes utilisateurs peuvent être mis en mémoire pour assurer le traitement d'échantillons simples ou en lot.

L'appareil permet le comptage de différents racks d'échantillons suivant des programmes utilisateurs ne demandant aucune intervention de la part de l'opérateur. Le mode automatique peut être interrompu pour permettre le traitement en urgence d'échantillons, la modification d'un programme utilisateur.

Un détecteur de haute radioactivité rejette automatiquement les échantillons trop radioactifs; un éliminateur d'électricité statique permet de réduire les parasites.

Sont fournis en option:

- un écran cathodique présentant un système de convivialité, y compris diverses aides à l'utilisateur;
- une imprimante 80 colonnes offrant une option de sortie des données;
- un port RS 232 qui permet d'envoyer directement les données à un ordinateur ou à un autre terminal;
- des porte-flacons VERSA-RACK™, qui permettent de compter des flacons de toutes tailles (standard , mini et biovital™) sans changer de système;
- 30 autres programmes utilisateurs;
- un mode de calcul de pourcentage de référence pour le comptage du taux de désintégration par minute en simple, double ou triple marquage avec une "bibliothèque" DPM;

Toute fois, les résultats peuvent également être exprimés en désintégration par minute (DPM), unité plus fiable puisqu'elle tient compte de divers facteurs de distorsion des résultats en CPM. En configuration standard, la correction de l'affaiblissement se fait par le nombre IC. Les autres options comprennent la normalisation des données, la soustraction des fonds et le calcul des pourcentages de référence.

L'appareil de mesure a une capacité maximale de 336 flacons standards ou de 648 miniflacons. Il peut être réglé pour répondre aux exigences optimales du comptage sur scintillateur liquide.

Vingt programmes utilisateurs peuvent être mis en mémoire pour assurer le traitement d'échantillons simples ou en lot.

L'appareil permet le comptage de différents racks d'échantillons suivant des programmes utilisateurs ne demandant aucune intervention de la part de l'opérateur. Le mode automatique peut être interrompu pour permettre le traitement en urgence d'échantillons, la modification d'un programme utilisateur.

Un détecteur de haute radioactivité rejette automatiquement les échantillons trop radioactifs; un éliminateur d'électricité statique permet de réduire les parasites.

Sont fournis en option:

- un écran cathodique présentant un système de convivialité, y compris diverses aides à l'utilisateur;
- une imprimante 80 colonnes offrant une option de sortie des données;
- un port RS 232 qui permet d'envoyer directement les données à un ordinateur ou à un autre terminal;
- des porte-flacons VERSA-RACK™, qui permettent de compter des flacons de toutes tailles (standard , mini et biovital™) sans changer de système;
- 30 autres programmes utilisateurs;
- un mode de calcul de pourcentage de référence pour le comptage du taux de désintégration par minute en simple, double ou triple marquage avec une "bibliothèque" DPM;

- un détecteur à simple photon utilisé pour les analyses de luminescence.
- un thermostat.

Principes de fonctionnement.

La scintillation liquide est une méthode de détection et de comptage de la décroissance radioactive . L'échantillon radioactif est mélangé au cocktail de scintillation. La désintégration d'un radionucléide produit une particule ionisante. Une partie de l'énergie cinétique de cette particule est transférée au "scintillateur" qui la convertit en énergie lumineuse, laquelle est détectée par le système à scintillation liquide. Le nombre de photons produits par une particule ionisante est proportionnel à l'énergie cinétique de celle-ci. Tous les photons émis par une particule ionisante le sont par voie isotropique en l'espace de quelques nanosécondes.

Les instruments optiques collecteurs du système à scintillation liquide dirigent les photons émis vers l'un des deux tubes photomultiplicateurs. Si les deux tubes photomultiplicateurs sont activés par la même impulsion de photons, une activité de décroissance radioactive est comptée et convertie en une impulsion électrique mesurable. L'impulsion de tension produite par les tubes photomultiplicateurs est proportionnelle au nombre de photons. Par conséquent, la hauteur d'impulsion à la sortie des tubes est proportionnelle à l'énergie de la particule.

Les impulsions produites par les tubes photomultiplicateurs sont analysées, converties sous forme numérique et stockées dans le canal de l'analyseur multicanaux qui correspond à l'énergie cinétique de la particule. Les données cumulées dans l'analyseur multicanaux pendant la durée de comptage de l'échantillon sont utilisées pour déterminer l'énergie des particules composant l'échantillon.

Le CPM est égal au nombre total d'impulsions se trouvant dans l'analyseur multicanaux divisé par le temps total en minutes qu'il a fallu pour obtenir les comptages .

Exploitation de l'appareil de mesure .

Les échantillons sont d'abord déposés dans des flacons avec cocktail de scintillation. les flacons sont placés dans les racks fournis . En bas de chaque rack sont indiqués en relief les numéros de position des flacons. De l'autre côté du rack se trouvent deux fentes, où l'on insère respectivement la carte de commande et une carte de numéro de rack les racks ainsi chargés sont déposés dans le chargeur déchantillon de l'appareil (fig5) . Durant le comptage , le changeur déplace les racks dans le sens inverse des aiguilles d'une montre Lorsque'un rack arrive en position arrière droite, chaque flacon du rack est avancé en position de traitement. Un élévateur soulève les flacons à tour de rôle à l'intérieur de la chambre où ils sont comptés.

Les consignes de traitement ainsi que les commandes de fonctionnement et de système sont introduits à partir du clavier placé à l'avant de l'appareil.

Le processus de configuration des programmes utilisés par le système est facilité par des menus affichés à l'écran. Durant le traitement l'écran renseigne l'utilisateur sur la progression du comptage. Pour finir, les résultats sortent sur une imprimante ou bien sont envoyés sur le port RS 232 .

Les commandes de l'appareil sont groupées à l'avant de l'appareil en deux endroits différents:

- un clavier alphanumérique, pour l'introduction de caractères;
- un bloc de touches pour la commande de l'appareil et la modification des programmes par l'opérateur.

Protocole opératoire

Nous avons identifié 10 étapes successives.

1) Prélever 5 à 10 cc de sang veineux dans un tube hépariné (manipuler avec toutes les conditions de stérilité);

2) Diluer le sang du malade dans un milieu de culture RPMI (sans NaHCO_3 et de sérum) en fonction de la densité parasitaire:

- au 1/14 (30 μl de sang total dans 420 μl de RPMI pH 7,4) pour les

parasitémies $\geq 20\ 000$ trophozoïtes/ mm^3 ,

- au 6/10 (180 μl de sang total dans 300 μl de RPMI pH 7,4) pour les

parasitémies ≥ 1000 trophozoïtes/ mm^3 et $\leq 19\ 000$ trophozoïtes/ mm^3 ;

3) Pour rendre le test performant, ajouter 150 μl de sang (précédemment dilué) dans un tube EPPENDORF (microfuge) de 1,5 ml contenant 150 μl de RPMI ($\pm 25\ \mu\text{M}$ de vérapamil);

Puis ajouter 75 μl de RPMI contenant 5x ^3H -chloroquine (250 nm de ^3H -chloroquine) qui donne une concentration finale de 50 nM de ^3H -chloroquine à l'incubation pour un volume total dans le tube de 375 μl .

N.B. A ce stade chaque malade a donc deux échantillons dans deux tubes: un avec du vérapamil + ^3H -chloroquine et le second sans vérapamil mais seulement de la chloroquine tritiée.

4) Remettre les hématies en suspension au vortex doux (5-10 secondes) et incuber les deux tubes pendant une heure au bain-marie à 37°C. A la fin de la période d'incubation remettre ensuite les hématies en suspension au vortex doux (5-10 secondes).

Préparer 6 microtubes de 400 μl contenant déjà 200 μl de silicon oil.

Ajouter 100 μl de chaque suspension d'hématies dans trois microtubes précédemment préparés avec du silicon oil. Chaque malade a donc 6 microtubes de 400 μl à ce stade.

Centrifuger dans la microcentrifugeuse les 6 tubes pendant 30 secondes.

Le culot d'hématies sédimente au fond en petit bouton de la grosseur d'une tête d'épingle.

5) Couper délicatement (avec une lame de rasoir) la palette d'hématies au fond des tubes et les transférer dans un tube vide de 1,5 ml, en veillant à ce que les numéros soient identiques.

6) Ajouter 75 μ l d'un mélange de protosol + éthanol (1/2), bien boucher et passer au vortex jusqu'à la lyse totale de toutes les hématies. Incuber dans un bain-marie à 56°C pendant 60 mn.

7) Ajouter 25 μ l de H₂O₂ (30%) dans chaque tube, passer au vortex et ajouter ensuite 25 μ l d'HCL (1N) et bien mélanger au vortex. Si les manipulations techniques ont été correctes, le mélange dans les tubes dévient "blanc opalescent".

8) Numéroter des flacons en verre de 20 ml (pour comptage à scintillation liquide). Couper le bouchon de chaque microtube (avec des lames de rasoir) et mettre le tout dans un de ces flacons en verre de 20ml avec le numéro correspondant.

9) Ajouter dans chacun de ces flacons un volume constant de 8 ml de fluide pour scintillation liquide (Universol cocktail) et passer au vortex (5-10 secondes) pour homogénéiser le contenu.

10) Placer les flacons bien identifiés par malade et par ordre (en commençant par ceux ne contenant pas le vérapamil) dans le "ß counter", fermer et attendre 30mn dans l'obscurité. Tester l'appareil avec des solutions de contrôle et démarrer le comptage. Les résultats sont imprimés directement sur papier.

N.B. Toutes ces manipulations doivent être faites dans une pièce close, avec des gants. Tout le matériel radioactif est récupéré dans un seau plastique hermétiquement fermé. A la fin de la journée le contenu du seau est vidé dans un puits protégé pour déchets radioactifs.

Expression des résultats

Pour chaque échantillon l'appareil donne le nombre de scintillations (D.P.M.) et le coefficient de variation de chacun des deux lots de tubes (moyenne et coefficient de variation des tubes répétés avec vérapamil, et des tubes répétés sans vérapamil).

Le résultat est exprimé en **pourcentage d'échange**

Pour cela on soustrait la moyenne du nombre de scintillations (DPM) avec vérapamil de la moyenne du nombre de scintillation sans vérapamil.

Ensuite on divise cette différence par la moyenne du nombre de scintillations sans vérapamil. Enfin convertir ce résultat en pourcentage.

$$\text{Pourcentage d'échange} = \frac{\text{D.P.M. sans vérp} - \text{D.P.M. avec vérp}}{\text{DPM sans vérp}}$$

Si l'accumulation de la chloroquine c'est à dire la moyenne du nombre de scintillation (en DPM) du lot des trois tubes avec vérapamil est plus grande, le pourcentage d'échange est positif (+). Si au contraire cette valeur est plus faible avec le vérapamil alors le signe du pourcentage d'échange est négatif (-).

Rémarques: La validation de la technique se fait par l' observation du coefficient de variation de chacun des lots des trois tubes répétés par malade. Ce coefficient pourrait être inférieur ou égal à 2% . Si après vérification le coefficient est supérieur ou égal à 10%, le test est inacceptable et cela veut dire qu'une des trois valeurs du nombre de scintillations du lot concerné est écartée des deux autres. Dans ce cas on élimine cette valeur et on refait le calcul de moyenne avec les deux valeurs les plus rapprochées.

Interprétation des résultats

Le vérapamil augmente l'accumulation de la chloroquine dans le parasite résistant. Un pourcentage d'échange positif (+) suggère la présence de souches chloroquinorésistantes de *P. falciparum*. Ainsi les résultats préliminaires permettent de situer les niveaux de résistance suivants:

- de 0 à 10%, présence de souches résistantes avec un bas niveau RI;
- $\geq 30\%$, Présence de souches résistantes avec un niveau élevé RIII;
- entre 10 et 30% présence de souches résistantes mais le niveau est encore mal défini (à l'état actuel de nos données).

6-RESULTATS

6.1-RESULTATS GLOBAUX

979 sujets en 1991 et 1361 sujets en 1992 ont été examinés pour le dépistage du paludisme. Parmi ces sujets, 516 en 1991 et 771 en 1992 étaient porteurs de *Plasmodium*, soit respectivement un Indice Plasmodique de 52,71% et 56,65% ($P > 0,05$).

TableauI: Répartition des tests de chimiosensibilité par année.

Tests	Années	
	1991	1992
Test <i>in vivo</i>	155	140
Test <i>in vitro</i>	68	65
Test Rapide	159	129

Nous avons effectué en 1991, 155 tests *in vivo*, 68 tests *in vitro* et 159 tests rapides de KROGSTAD. En 1992, nous avons réalisé 140 tests *in vivo*, 65 tests *in vitro*, 129 tests rapides.

La résistance globale à la chloroquine des souches de *P. falciparum* testées était de 18,30% en 1991, et de 11,76% en 1992 par le test *in vivo*. Elle était de 2,94% en 1991 et de 3,95% en 1992 par le test *in vitro*. Le test rapide de KROGSTAD nous donnait une prévalence globale des souches chloroquinorésistantes de *P. falciparum* de 14,46% en 1991 et de 17,05% en 1992 .

6.2-RESULTATS DESCRIPTIFS

Tableau II : Répartition de la population en fonction des localités étudiées en 1991.

Localités	TIENEG.	KAMBILA	SAFO	DIALAK.	MOPTI	TOTAL
Effectifs	108	262	101	239	269	979
%	11,03	26,76	10,32	24,41	27,48	100

TIENEG.= TIENEGUEBOUGOU

DIALAK.= DIALAKORO

Les 269 sujets de Mopti correspondant à 27,48% de notre échantillon en 1991 étaient constitués essentiellement d'élèves de deux écoles . Les 710 soit 73,52% répartis entre Tiénéguebougou, Kambila, Safo, et Dialakoro étaient constitués d'enfants de 6mois à 12ans recrutés systématiquement dans chacun des villages.

Tableau III : Répartition de la population étudiée en fonction des localités en 1992.

Localités	SAFO	DIALAK.	SOTUBA	KALABAN.	TOTAL
Effectifs	161	309	428	463	1361
%	11,83	22,70	31,45	34,02	100

DIALAK.= DIALAKORO

KALABAN. = KALABANCORO

Les 470 sujets soit 34,53% de notre échantillons en 1992 étaient des enfants de 6mois à 12ans des villages de Safo et de Dialakoro en zone rurale; et les 891 sujets soit 65,47% étaient des enfants de la même tranche d'âges de Sotuba et Kalabancoro en zone péri-urbaine.

Tableau IV : Répartition de l'Indice Plasmodique (IP) dans la population étudiée par localité en 1991.

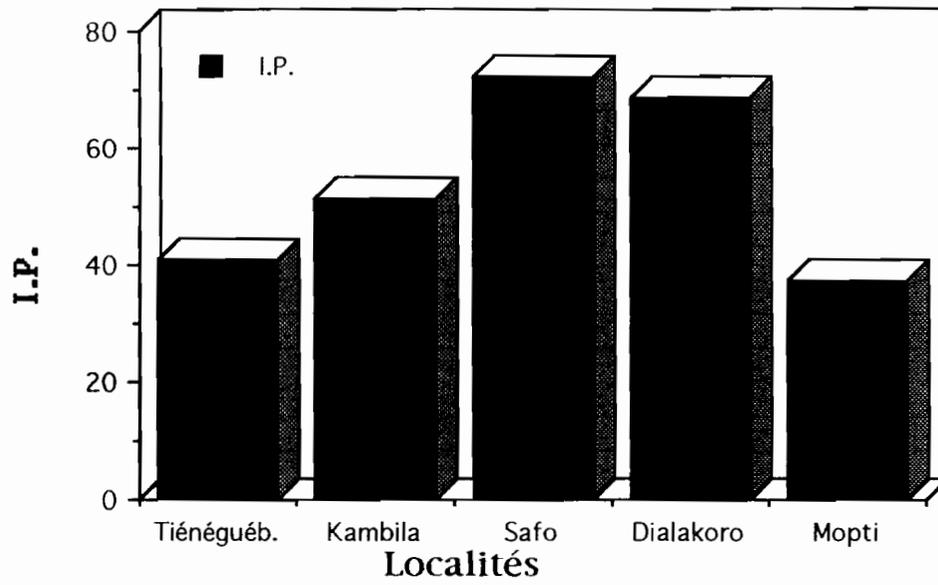
Localités	Positifs	Négatifs	Total	I.P.
TIENEGUEBOUGOU	44	64	108	40,70
KAMBILA	135	127	269	51,52
SAFO	73	28	101	72,28
DIALAKORO	164	75	239	68,62
MOPTI	100	169	269	37,17
Total	516	463	979	52,16

I.P. = Indice Plasmodique

Chi 2 =72,18, ddl =4, $P < 10^{-3}$

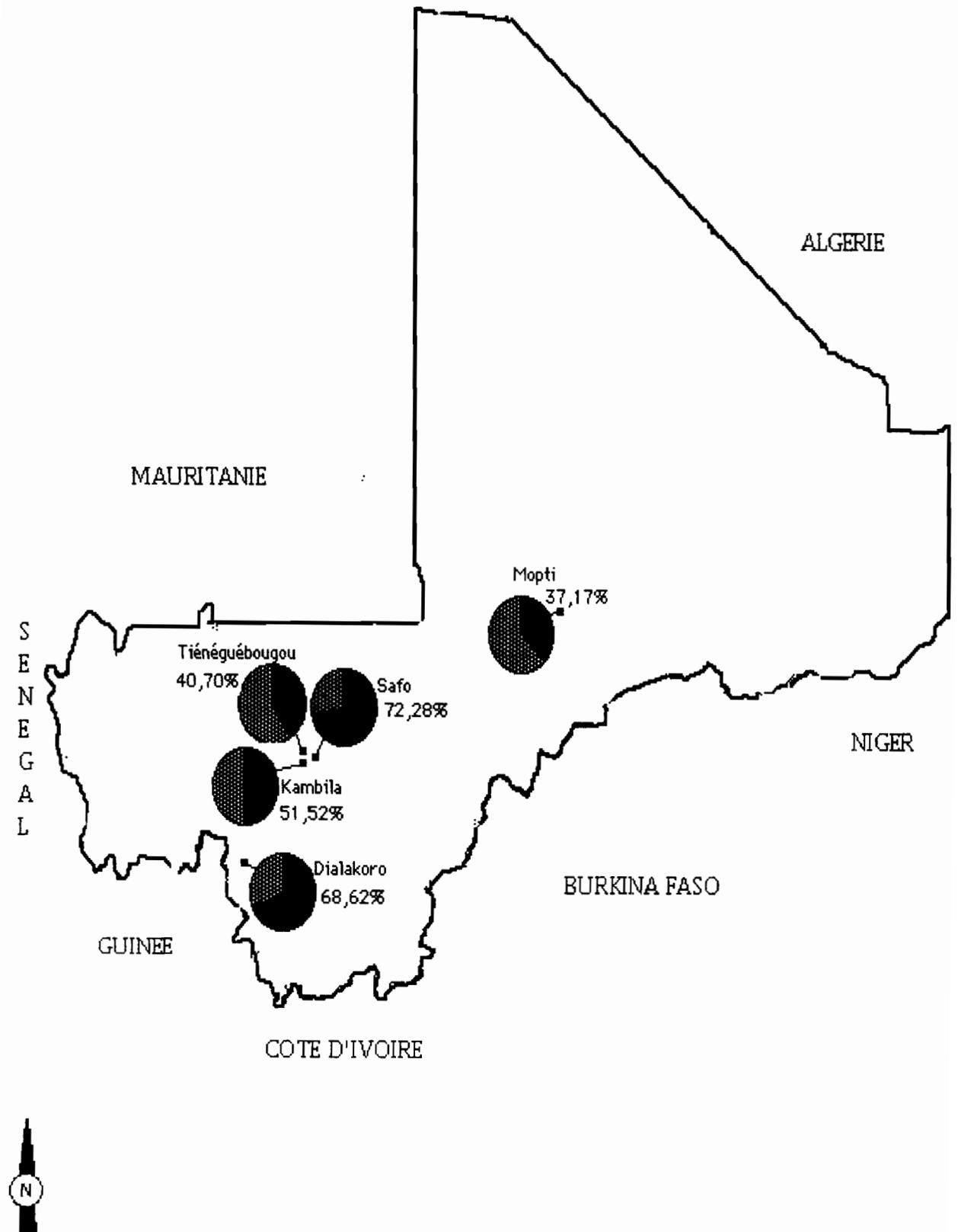
Nous avons trouvé moins de porteurs de *Plasmodium* à Mopti (IP = 37,17%) et plus de porteurs à Safo (IP = 72,27%) en 1991. Il existe une liaison statistique entre les différentes localités.

Figure6: Répartition de l'Indice Plasmodique par localité en 1991.



(Cf tableau IV)

Figure 7: Carte de répartition de l'Indice Plasmodique par localité en 1991.



Echelle: 1: 10 000 000

Tableau V : Répartition de l'Indice Plasmodique (IP) dans la population étudiée par localité en 1992 .

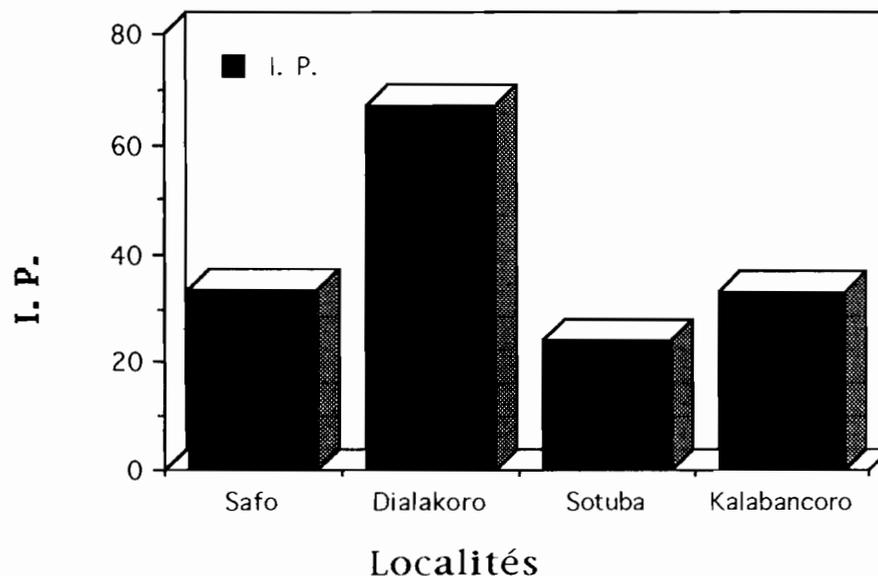
Localités	Positifs	Négatifs	Total	I.P.
SAFO	54	107	161	33,54
DIALAKORO	207	102	309	66,99
SOTUBA	104	324	428	24,29
KALABANCORO	155	308	463	33,48
TOTAL	520	841	1361	38,21

I.P.= Indice Plasmodique

Chi 2=149,36, ddl=3, $P < 10^{-5}$

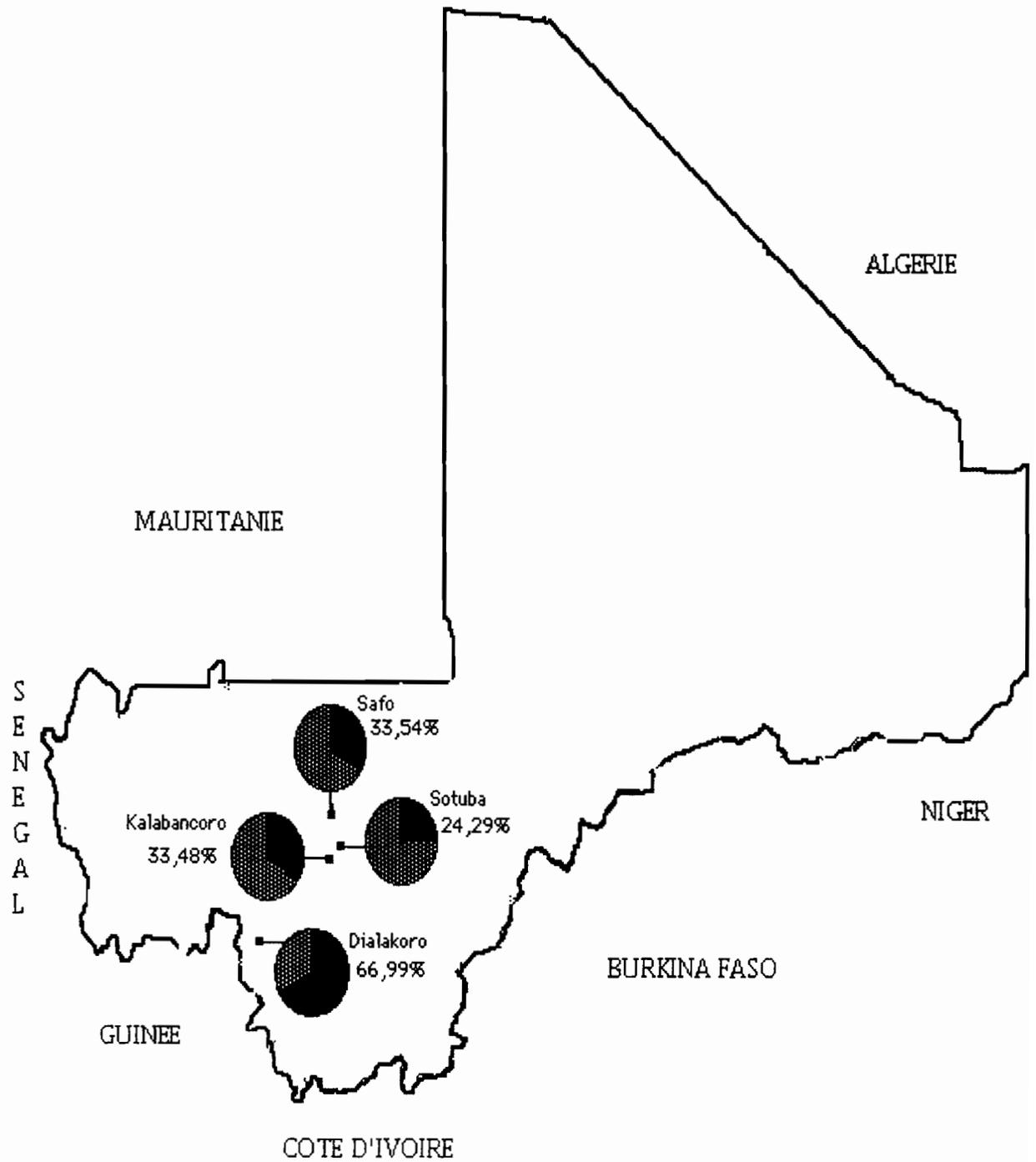
L'analyse de ce tableau montre qu'il existe une liaison statistique hautement significative entre les localités étudiées et l'Indice Plasmodique. L'Indice Plasmodique le plus bas a été retrouvé à Sotuba (IP=24,29%) et le plus élevé à Dialakoro (IP=66,99).

Figure8: Répartition de l'Indice Plasmodique par localité en 1992.



(Cf tableau V)

Figure9: Carte de répartition de l'Indice Plasmodique par localité en 1992.



Echelle: 1: 10 000 000

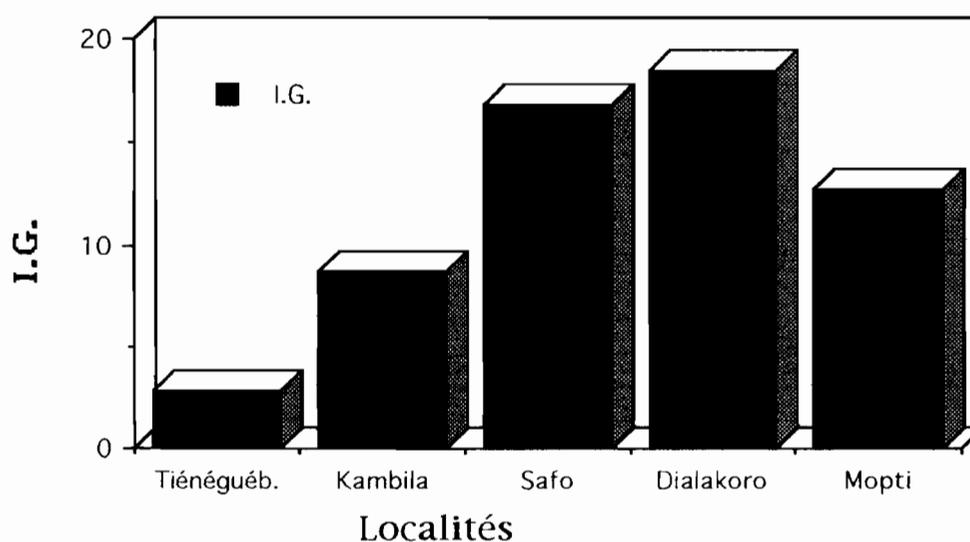
Tableau VI : Répartition de l'Indice Gaméocytaire (IG) dans la population étudiée par localité en 1991.

Localités	Positifs	Négatifs	Total	I. G.
TIENEGUEBOUGOU	3	105	108	2,77
KAMBILA	23	239	262	8,77
SAFO	17	84	101	16,83
DIALAKORO	44	195	239	18,41
MOPTI	34	235	269	12,64
TOTAL	121	858	979	12,36

I.G.=Indice Gaméocytaire

L'Indice Gaméocytaire le plus faible se retrouvait à Tiénuébougou (IG = 2,77%) et le plus élevé à Dialakoro (IG = 18,41%). Il existe une liaison statistique hautement significative entre les localités (Chi carré =22,22 pour ddl =4, P =0,00018) et l'Indice Gaméocytaire.

Figure10 : Répartition de l'Indice Gaméocytaire par localité en 1991.



(Cf tableau VI)

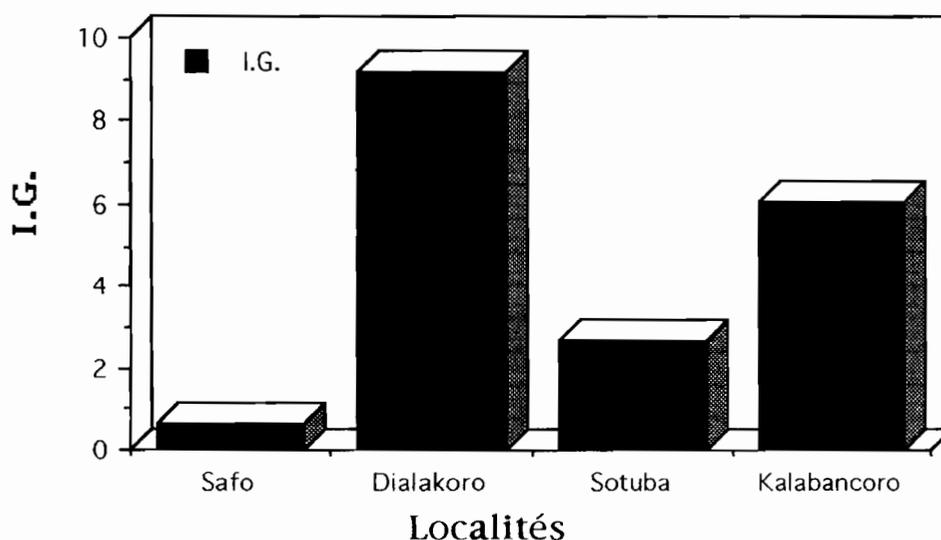
Tableau VII : Répartition de l'Indice Gamétocyte dans la population étudiée par localité en 1992.

Localités	Positifs	Négatifs	Total	I.G.
SAFO	1	160	161	0,62
DIALAKORO	3	306	309	9,18
SOTUBA	9	419	428	2,10
KALABANCORO	28	435	463	6,05
TOTAL	41	1 320	1 361	3,01

I.G.=Indice Gametocyte

L'indice le plus faible se retrouve à SAFO (IG =0,62%) et le plus élevé à DIALAKORO (IG =9,18%) . Il existe une liaison statistique hautement significative entre les différentes localités (Chi carré =23,37 pour ddl =3, P =0,00003) quant à leurs Indices Gamétocytiques.

Figure11 : Répartition de l'Indice Gamétocyte par localité en 1992.



(Cf tableau VII)

Tableau VIII : Répartition de la moyenne d'âges des sujets inclus en fonction des villages en 1991.

Localités	M.A.	I.C.	E.T.	M.W.
TIENEGUEBOUGOU	5,54	3,47/7,60	3,79	4,45
KAMBILA	5,95	4,74/7,15	3,73	4,86
SAFO	5,22	4,05/6,39	3,10	4,53
DIALAKORO	3,53	2,89/4,17	1,78	3,23
MOPTI	7,17	6,72/7,60	1,80	7,06

M.A.= Moyenne Arithmétique

M.W.= Moyenne de WILLIAM

I.C.= Intervalle de Confiance

E.C.= Ecart Type

Les enfants de Mopti sont en moyenne les plus âgés (Moyenne géométrique de WILLIAM =7,06) et ceux de Dialakoro les plus jeunes (Moyenne géométrique de WILLIAM =3,23), $P < 0,01$ au test de Fisher.

Tableau IX : Répartition de la moyenne d'âges des sujets inclus en fonction des villages en 1992.

Localités	M.A.	I.C.	E.T.	M.W.
SAFO	7,37	6,60/8,14	1,57	7,23
DIALAKORO	4,39	3,77/5,00	2,12	3,93
SOTUBA	5,18	4,27/6,08	2,16	4,76
KALABANCORO	4,59	3,95/5,24	1,99	4,22

M.A.= Moyenne Arithmetique

M.W.= Moyenne de WILLIAM

I.C.= Intervalle de Confiance

E.T.= Ecart Type

Les enfants de safo sont en moyenne plus âgés (Moyenne Arithmétique =7,37) ceux de Dialakoro plus jeunes (M.A.= 4,39), ($P < 0,05$ au test de Fisher).

Tableau X : Répartition de la charge parasitaire en moyenne géométrique à J0 des sujets inclus par village en 1991.

Localités	M. A.	I. C.	E. T.	M. W.
TIENEGUEOUGOU	19028,69	1609,39/39666,77	37965,13	4936,19
KAMBILA	14904,87	6996,62/22813,11	24542,84	6642,70
SAFO	20338,52	6968,51/33708,52	35445,18	7441,63
DIALAKORO	24896,17	16926,25/32866,08	22271,95	16305,76
MOPTI	20082,92	12718,23/27447,61	22544,98	10883,07

M.A.= Moyenne Arithmétique

M.W.= Moyenne de WILLIAM

I.C.= Intervalle de Confiance

E.T.= Ecart Type

En moyenne la charge parasitaire est plus élevée chez les sujets de Dialakoro (Moyenne de WILLIAM =16305,76) et plus faible chez ceux de Tiéniégou (Moyenne de WILLIAM =4936,19) ($P < 0,01$ au test de Fisher).

Tableau XI: Répartition de la charge parasitaire exprimée en moyenne géométrique à J0 des sujets inclus par village en 1992.

Localités	M.A.	I.C.	E.T.	M.W.
SAFO	1966,25	887,12/3045,38	2462,26	847,31
DIALAKORO	14887,83	7747,10/22028,55	24709,56	7282,638
SOTUBA	56105,69	31170,77/81040,6	59670,97	27064,35
KALABANCORO	19720,13	9603,60/29836,64	32644,12	7998,01

M.A.= Moyenne Arithmétique

M.W.= Moyenne de WILLIAM

I.C.= Intervalle de Confiance

E.T.= Ecart Type

La charge moyenne la plus élevée était retrouvée à Sotuba (Moyenne de WILLIAM=27064,35) et la plus faible se retrouvait à Safo(Moyenne de WILLIAM=847,31). La comparaison deux à deux des localités montre qu'il existe une différence significative entre: Safo et Dialakoro (test de Student =2,32, P =0,03334) ; Safo et Sotuba (test de Student =12,72, P <0,01) ; Safo et Kalabancoro (test de Student=2,41, P=0,01875); Dialakoro et Sotuba (test de Student =6,90); Sotuba et Kalabancoro (test de Student =4,79, P =0,00001). Par contre il n'existe pas de différence significative entre Dialakoro et Kalabancoro(test de Student =0,77, P =0,43777).

Tableau XII : Répartition des tests de sensibilité à la chloroquine par localité en 1991.

Localités	Test <i>in vivo</i>	Test <i>in vitro</i>	Test Rapide de KROGSTAD
TIENEGUEBOUGOU	13	0	14
KAMBILA	37	7	36
SAFO	27	29	27
DIALAKORO	30	18	30
MOPTI	36	9	31
HOPITAUX	12	5	21
TOTAL	155	68	159

Ce tableau montre que nous n'avons réussi aucun test *in vitro* à Tiéniégou .

Il y a eu plus de tests *in vivo* et de tests rapides que de tests *in vitro* .

Tableau XIII : Répartition des tests de sensibilité à la chloroquine par localité en 1992.

Localités	Test <i>in vivo</i>	Test <i>in vitro</i>	Test Rapide de KROGSTAD
SAFO	23	11	25
DIALAKORO	46	17	31
SOTUBA	22	10	21
KALABANCORO	49	9	28
HOPITAUX	/	18	24
TOTAL	140	65	129

Ce tableau montre qu'aucun test *in vivo* n'a été réalisé chez les sujets en provenance des hôpitaux. Il ya toujours plus de tests *in vivo* et de tests rapides que de tests *in vitro* comme en 1991.

Tableau XIV : Résultats du test de sensibilité *in vivo* à la chloroquine par localité en 1991.

Localités	Sensibles	Résistants			Total
		R1	R2	R3	
TIENEGUEBOUGOU	10	3	0	0	13
KAMBILA	28	6	3	0	37
SAFO	18	7	2	0	27
DIALAKORO	29	0	1	0	30
MOPTI	32	2	2	0	36
HOPITAL POINT G	8	1	1	0	10
TOTAL	125	19	9	0	153

R1= Résistance de niveau 1
R2= Résistance de niveau 2
R3= Résistance de niveau 3

A Tiénéguébougou 3 cas de résistance ont été trouvés (tous des résistances RI) soit 23,08%.

A Kambila 9 cas de résistance globale soit 24,32% ont été trouvés et se présentent comme suit : 6 cas de RI (16,21%), 3 cas de RII (8,10%).

A Safo 7 cas de RI soit 25,92% et 2 cas de RII soit 7,40% ont été trouvés. Le taux global de résistance est de 33,33% (9cas).

A Dialakoro 1cas de résistance soit 3,33% a été trouvé; c'est une résistance de type I (RI).

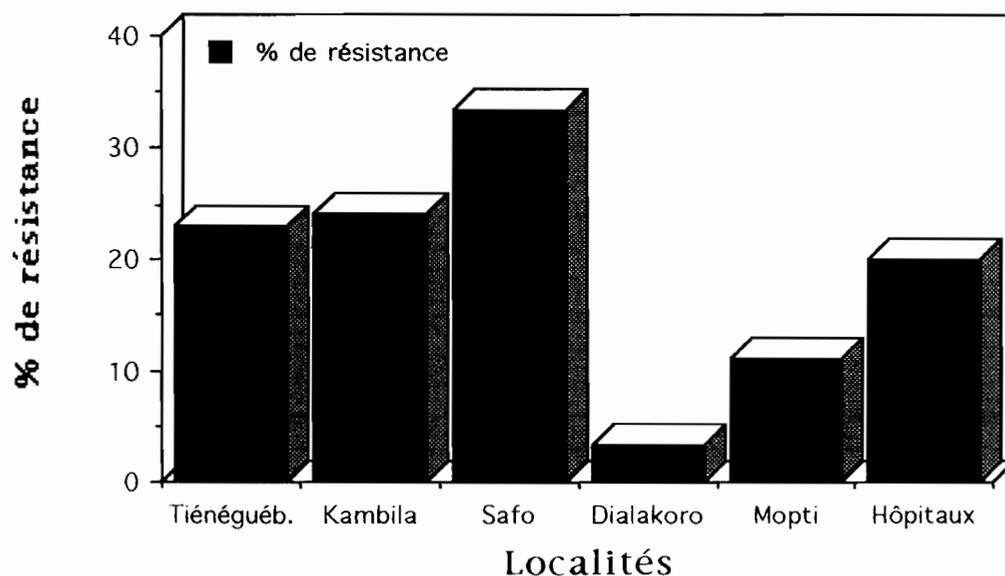
A Mopti nous avons trouvé 4cas de résistance soit 11,11% il y a 2 RI et 2 RII .

Les hôpitaux donnaient 2cas de résistance soit 20% avec 1cas de RI et 1cas de RII.

Aucun cas de RIII n'a été détecté par le test *in vivo* en 1991.

Il existe une liaison statistique significative entre les localités (Chi carré =10,94 pour ddl=5, P <0,05) et le niveau de résistance .

Figure12 : Répartition de la chloroquinorésistance par le test *in vivo* selon les localités en 1991.



(Cf tableau XIV)

Tableau XV : Résultats du test de sensibilité *in vivo* à la chloroquine par localité en 1992.

Localités	Sensibles	Résistants			Total
		R1	R2	R3	
SAFO	21	1	0	0	22
DIALAKORO	35	8	3	0	46
SOTUBA	21	1	0	1	22
KALABANCORO	46	3	0	0	49
TOTAL	159	13	3	0	159

R1= Résistant de niveau 1

R2= Résistant de niveau 2

R3= Résistant de niveau 3

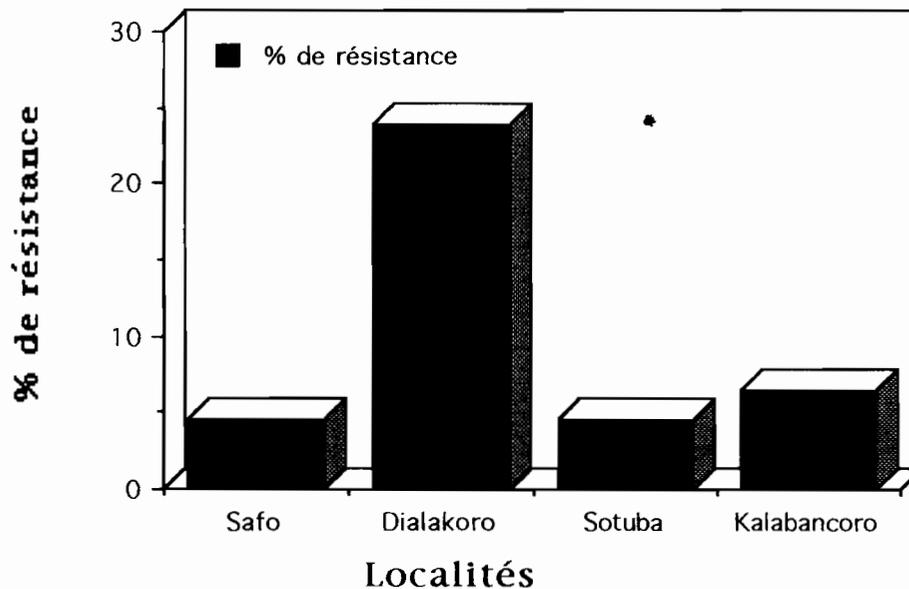
En 1992 nous avons trouvé à Safo 1 cas de résistance soit 4,55% et qui était de type RI .

A Dialakoro 11 cas de résistance soit 23,91% ont été trouvés, ils se décomposaient en 8 cas de RI (soit 17,39%) et 3 cas de RII (soit 6,32%).

Nous avons trouvé 2 cas de résistance (soit 9,10%) à Sotuba 1 cas de RI et 1 cas de RIII, et 3 cas de résistance soit (6,52%) à Kalabancoro tous de niveau RI.

Il y'a eu 1 cas de résistance RIII en 1992 par le test *in vivo* .

Figure13: Répartition de la chloroquinorésistance par le test *in vivo* selon localités en 1992.



(Cf tableau XV)

Tableau XVI : Résultats du microtest *in vitro* de sensibilité à la chloroquine par localité en 1991.

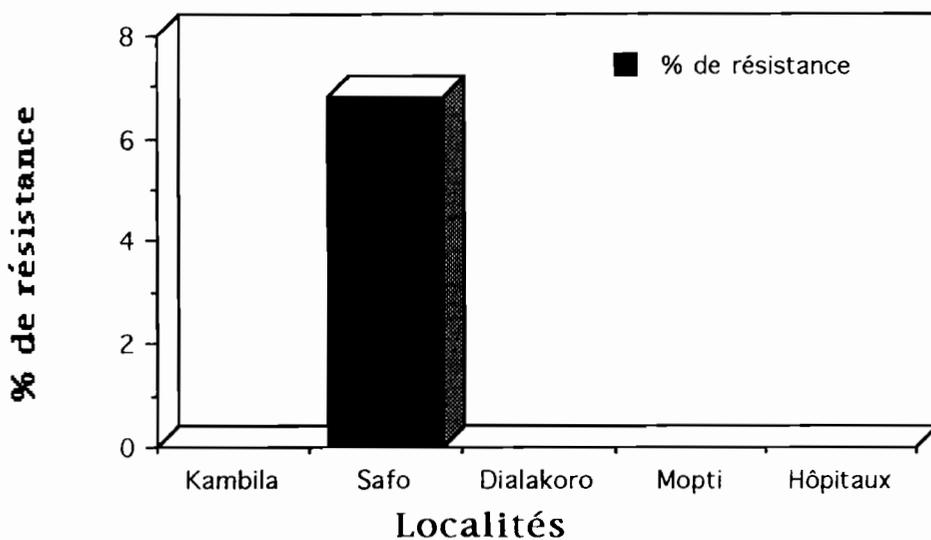
Localités	Sensibles	Résistants		Total
		N	%	
TIENEGUEBOUGOU	-	-	-	-
KAMBILA	7	0	0	7
SAFO	27	2	6,83	29
DIALAKORO	18	0	0	18
MOPTI	9	0	0	9
HOPITAUX	5	0	0	5
TOTAL	66	2	2,94	68

N= Nombre

A Tiéniégouougou aucun test n'a réussi techniquement.

La résistance *in vitro* a été détectée seulement à Safo en 1991 avec 2 cas soit 6,83%.

Figure 14: Répartition de la chloroquinorésistance par le microtest *in vitro* selon les localités en 1991.



(Cf tableau XVI)

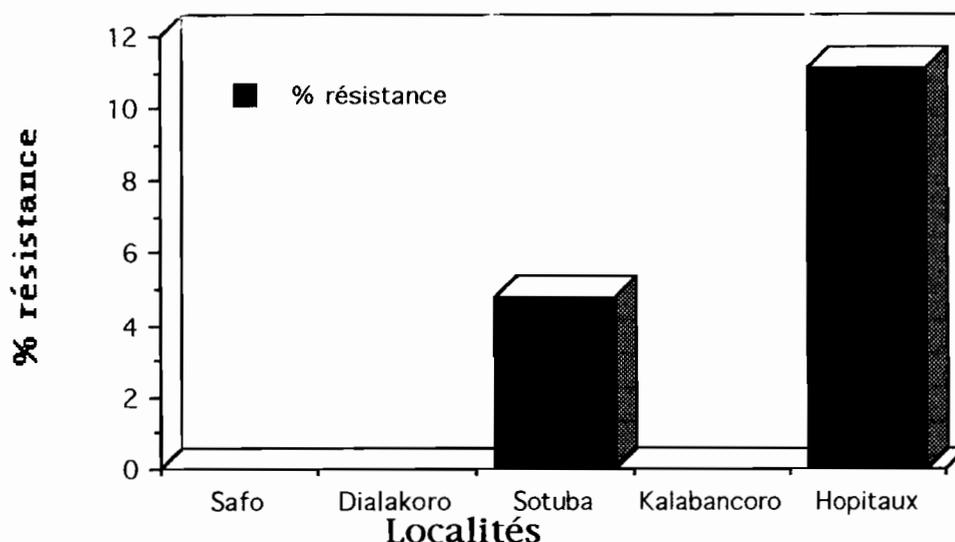
Tableau XVII : Résultats du microtest *in vitro* de sensibilité à la chloroquine par localité en 1992.

Localités	Sensibles	Résistants		Total
		N	%	
SAFO	11	0	0	11
DIALAKORO	17	0	0	17
SOTUBA	20	1	4,76	21
KALABANCORO	9	0	0	9
HOPITAUX	16	2	11,11	18
TOTAL	73	3	3,39	76

N= Nombre

Ce tableau montre que 1 cas de résistance *in vitro* a été détecté à Sotuba (soit 4,76%) et 2 cas dans les hopitaux (soit 11,11%).

Figure15: Répartition de la chloroquinorésistance par le microtest *in vitro* selon les localités en 1992.



(Cf tableau XVII)

Tableau XVIII: Résultats du test rapide KROGSTAD par localité en 1991.

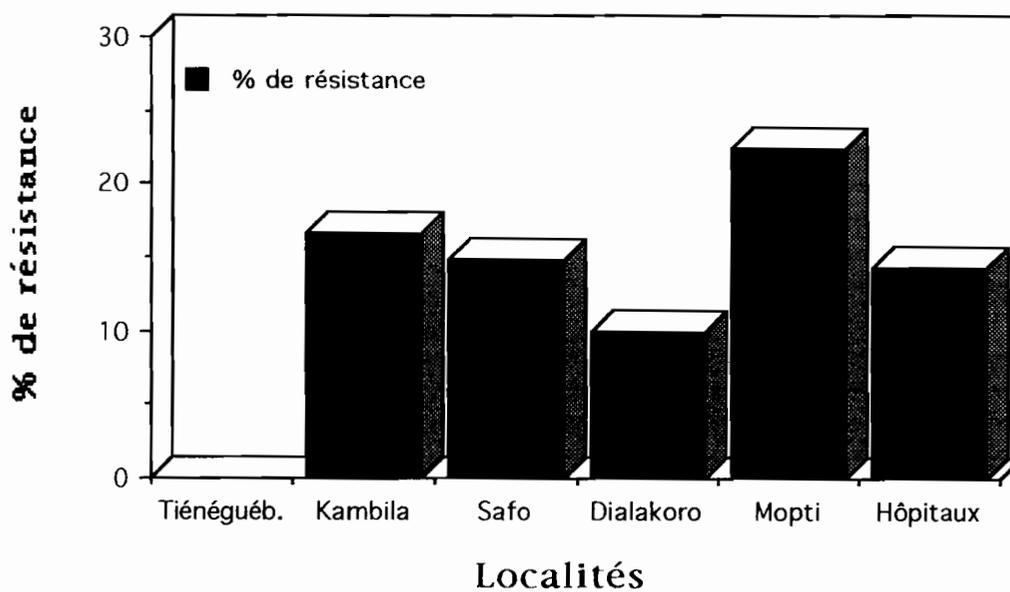
Localités	Sensibles	Résistants		Total
		N	%	
TIENEGUEBOUGOU	14	0	0	14
KAMBILA	30	6	16,67	36
SAFO	23	4	14,81	27
DIALAKORO	27	3	10	30
MOPTI	24	7	22,58	31
HOPITAUX	18	3	14,29	21
TOTAL	139	23	14,47	159

N=Nombre

Le test rapide n'a détecté aucun cas de résistance à Tiénéguebougou. Par contre il a détecté 6 cas de résistance (soit 16,67%) à Kambila tous de niveau RI; 4 cas de résistance à Safo (soit 14,81%) avec 2 cas de niveau RIII et 2 cas de niveau RI; 3 cas à Dialakoro (soit 10%) tous de niveau RI.

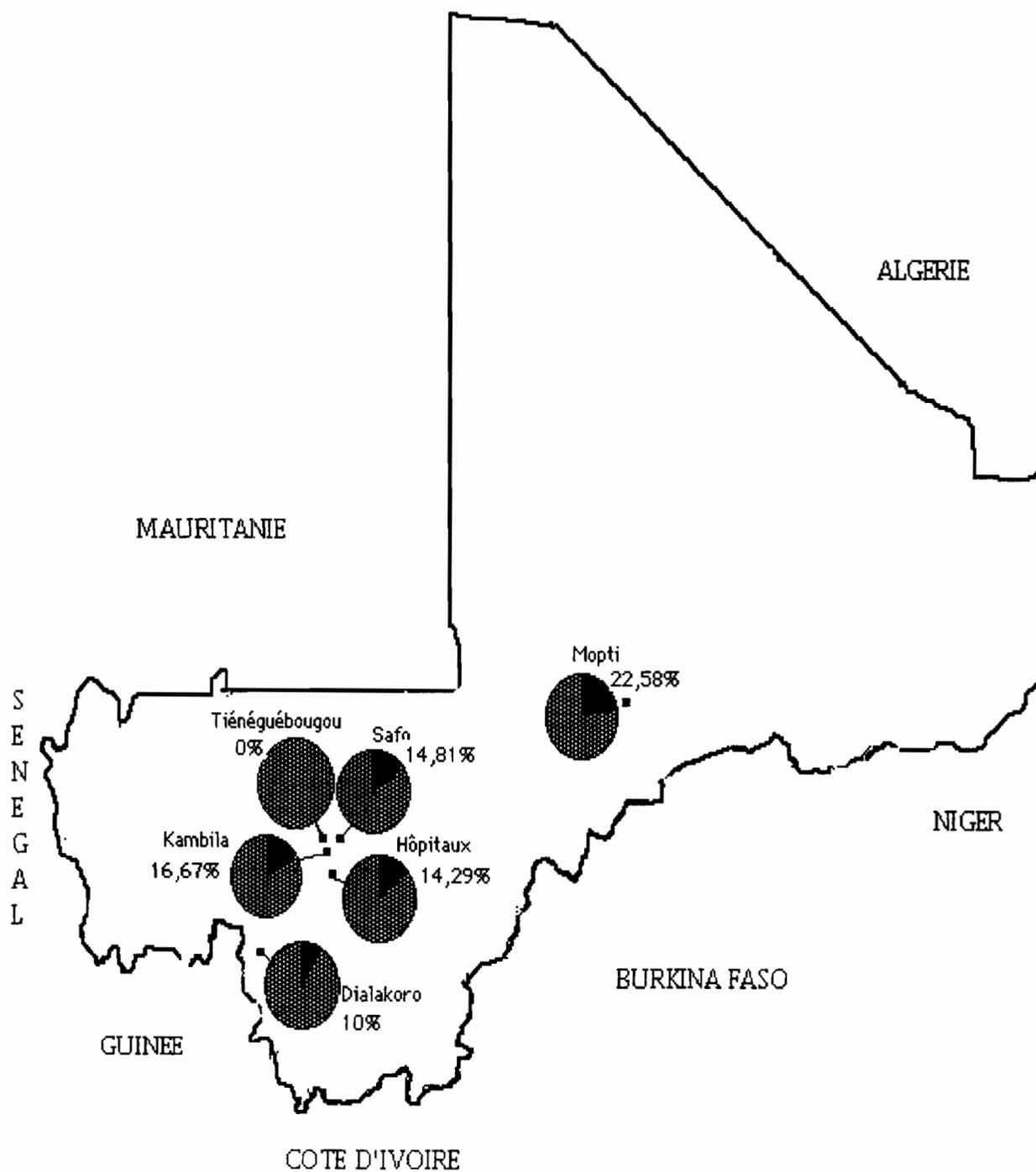
A Mopti nous avons eu 7 cas (soit 22,50%) de résistance repartis en 3 cas (soit 9,70%) de niveau RIII et 4 cas (soit 12,90%) de niveau RI.
 Au niveau des hôpitaux il a été détecté 3 cas de résistance de niveau RI (soit 14,29%).

Figure16: Répartition de la chloroquinorésistance par le test rapide de KROGSTAD selon les localités en 1991.



(Cf tableau XVIII)

Figure 17: Carte de répartition de chloroquinorésistance par localité en 1991; résultats du test rapide de KROGSTAD.



Echelle: 1: 10 000 000

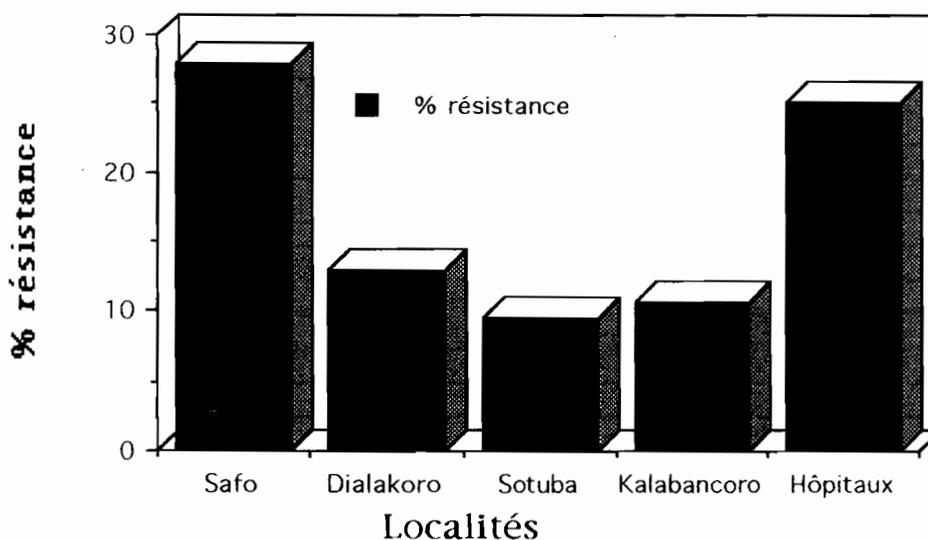
Tableau XIX : Résultats du test rapide de KROGSTAD par localité en 1992 .

Localités	Sensibles	Résistants		Total
		N	%	
SAFO	18	7	28	25
DIALAKORO	27	4	12,90	31
SOTUBA	19	2	9,50	21
KALABANCORO	25	3	10,71	28
HOPITAUX	18	6	25	24
TOTAL	107	22	17,05	129

N=Nombre

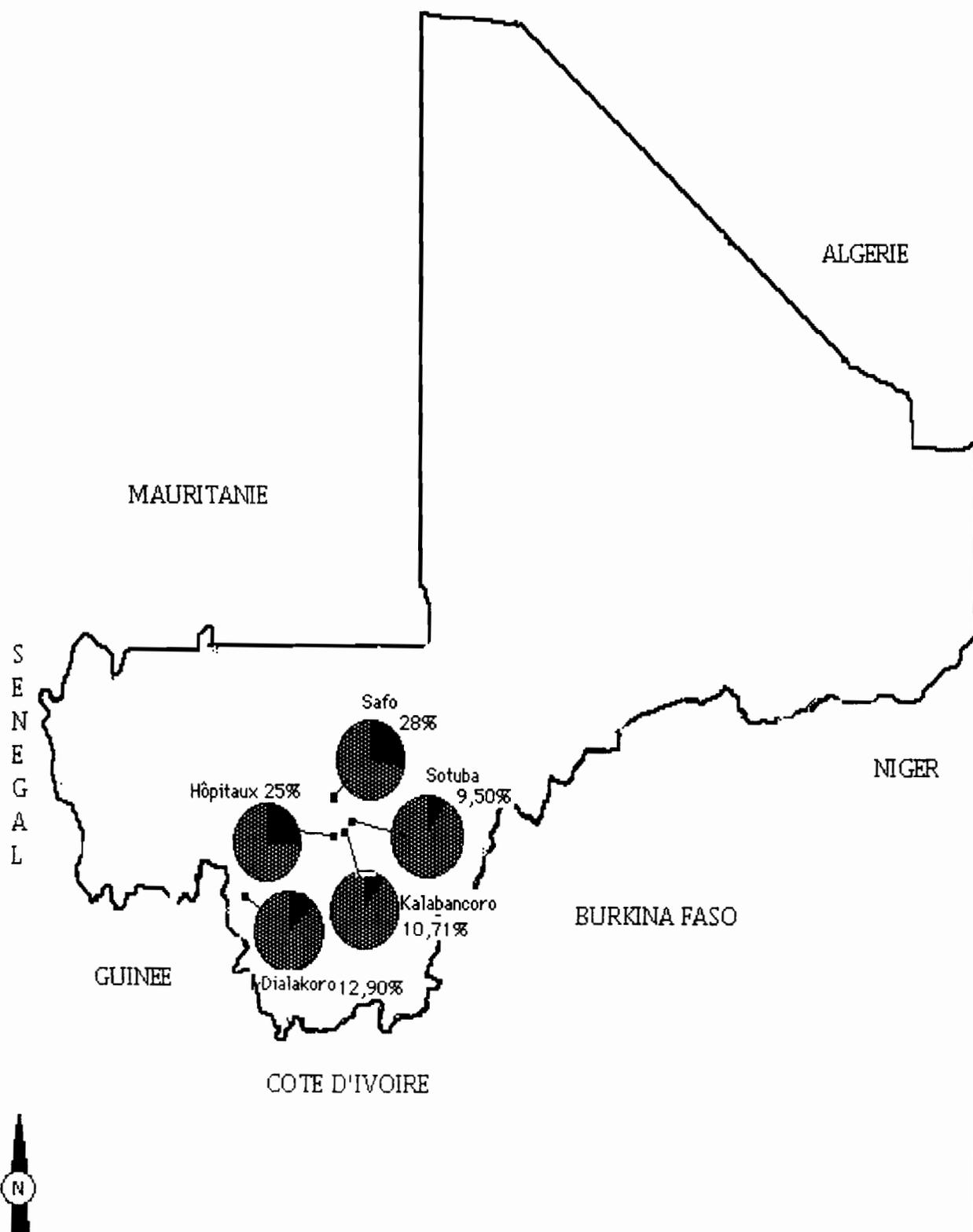
En 1992 le test rapide de KROGSTAD a détecté 7 cas de résistance à Safo (soit 28%) , ces cas sont tous de niveau RI; 4 cas à Dialakoro(soit 12,90%) tous de niveau également RI ; 2 cas à Sotuba (soit 9,5%)de niveau RI, 3 à Kalabancoro (soit 10,71%) avec 1cas de niveau RIII (3,57%) et 2 de niveau RI (soit 7,1%). Dans les hôpitaux nous avons observé 6 cas de résistance(soit 25%) dont 2 de niveau RIII(soit 8,33%) 4 de niveau RI(soit 16,67).

Figure18: Répartition de la chloroquinorésistance selon le test rapide de KROGSTAD et par localité en 1992.



(Cf. Tableau XIX)

Figure19: Carte de répartition de chloroquinorésistance par localité en 1992; résultats du test rapide de KROGSTAD.



Echelle: 1: 10 000 000

Tableau XX:Concordances et discordances entre le test rapide de KROGSTAD et le test *in vivo* réalisés simultanément chez les mêmes malades toutes les localités et années confondues.

		Test <i>in vivo</i>		
		Résistants	Sensibles	Total
T e s t R a p i d e	Résistants	3	7	10
	Sensibles	4	40	44
	Total	7	47	54

Le Test de KROGSTAD a détecté plus de cas de résistance que le Test *in vivo* (10cas contre 7). Les deux tests ont détecté simultanément 3 cas de résistance. La sensibilité du test rapide de KROGSTAD par rapport au Test *in vivo* est de 42,86% et sa spécificité de 85,11%. La valeur prédictive positive (VPP) est de 30% et la valeur prédictive négative (VPN) de 90,91%. La statistique "Kappa" indiquant le pourcentage de concordance entre les deux tests est égale à 0,26.

Tableau XXI: Concordance et discordance entre le test rapide de KROGSTAD et le test *in vitro* réalisé simultanément chez le même malade toutes les localités et années confondues .`

		Test <i>in vitro</i>		
		Résistants	Sensibles	Total
T e s t R a p i d e	Résistants	3	7	10
	Sensibles	0	44	44
	Total	3	51	54

3 cas de résistance ont été détectés simultanément par le test *in vitro* et le test rapide de KROGSTAD. Nous avons 10 cas de résistance au test rapide de KROGSTAD contre 3 pour le test *in vitro*. La sensibilité du test rapide par rapport au test *in vitro* est de 100%. Sa spécificité est de 86,27%. La valeur prédictive positive (VPP) du test rapide est de 30% et la valeur prédictive négative (VPN) est de 86,27%. le degré de concordance entre le test *in vitro* et le test rapide par la statistique "Kappa est égale à 0,43.

7-COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

Après la mise en évidence de la circulation de souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la chloroquine au Mali par CAMARA (6) en 1990, nous avons étudié l'épidémiologie de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine à travers différents faciès de transmission de 1991 à 1992. Nous avons par la même occasion testé pour la première fois, la faisabilité et les valeurs intrinsèques du Test rapide de KROGSTAD sur le terrain, par rapport aux techniques standards de l'OMS (tests, *in vivo* et *in vitro*). Cette étude menée sur deux années consécutives permet plusieurs constatations.

-Au plan des résultats parasitologiques: le paludisme était hyperendémique en 1991 à Tiéguébougou, Kambila et Dialakoro avec des Indices Plasmodiques respectifs de 51,52%, 72,28% et 68,62%. A la même période il était par contre mésoendémique à Safo (IP= 40,70%) et à Mopti (IP =37,17%). En 1992 les deux localités situées en zone péri-urbaine Sotuba et Kalabancoro présentaient les Indices Plasmodiques respectifs de 24,29% et 33,48%. Le paludisme était mésoendémique à Sotuba et à Kalabancoro en 1992. Nous avons trouvé un Indice Plasmodique de 33,54% à Safo et de 66,99% à Dialakoro en 1992. Le résultat de Dialakoro concorde avec celui observé en 1991. Dans cette localité aucune mesure de lutte n'a été entreprise entre 1991 et 1992. Par contre les 33,54% de Safo pourrait s'expliquer par la pression médicale, traitement systématique des cas de fièvre depuis notre premier passage et d'un effet de cohorte. En effet les enfants de Safo sont suivis par notre équipe depuis 1989. Il a donc une augmentation progressive du niveau de la médicalisation dans ce village. Par ailleurs, en accord avec le contrat social qui nous lie avec la communauté villageoise, nous avons aidé à la mise en place d'une pharmacie villageoise à Safo. la chloroquine est depuis lors, un médicament très consommé.

DEMBELE (8) avait trouvé en Juillet 1989 à Tiénuéoungou un I.P. égal à 41,20% et à Kambila 55,10%.

CAMARA (6) avait obtenu un Indice Plasmodique de 29,03% à Safo en Mars 1990 et N'DIAYE (34) 43% en Juillet 1988.

Nos résultats épidémiologiques concordent bien avec la description des différents faciès de transmission du paludisme au Mali (16).

Quant à l'Indice Gamétocyte, il était en 1991 de 2,77% à Tiénuéoungou, de 8,77% à Kambila, de 16,83% à Safo, de 18,41% à Dialakoro et de 12,64% à Mopti. En 1992 il était de 0,62% à Safo, 9,18% à Dialakoro 2,10% à Sotuba et 6,05% à Kalabancoro.

Nos résultats de ce indice qui traduit le pouvoir infectieux de la population, vis à vis des Anophèles, sont superposables avec ceux de DEMBELE qui avait trouvé en Juillet 1989 des I.G. respectifs de 5,1% et 10,30% à Tiénuéoungou et Kambila. La différence n'est pas statistiquement significative ($p > 0,05$). Ces taux indiquent que la transmission était faible en 1991 à Tiénuéoungou et Kambila, villages soumis depuis 1989 à l'usage des rideaux imprégnés de perméthrine. En 1991 la transmission était forte à Safo mais par contre elle était hypoendémique en 1992. Cela pourrait s'expliquer par le fait que notre passage de 1991 ait été effectué au mois d'août et celui de 1992 au mois de Juin. Par contre N'DIAYE avait trouvé un I.G. de 0% à Safo en juillet 1988.

Dialakoro, et Mopti ont présenté en 1991 des I.G. élevés (respectivement 18,41% et 12,64%). Ces deux localités sont situées dans des zones d'irrigation où les conditions éoclimatiques sont très favorables à la prolifération des Anophèles.

Les taux de 2,10% et 6,05% comme I.G. respectivement à Sotuba et à Kalabancoro montrent que cet indice est toujours plus faible en zone péri-uraine qu'en zone rurale.

-Au plan de la chimiosensibilité: la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine était présente dans les différents faciès du paludisme mais avec des niveaux variables (Tableaux, XIV, XV). Ceci rend non objective et rigoureuse la classification actuelle des pays par groupe (Zones I, II, III) selon le niveau de chimiosensibilité (51). Les niveaux variant d'un faciès à l'autre il ne sera pas juste de classer tout un pays dans un groupe.

Le niveau de résistance *in vivo* est globalement faible 18,30% en 1991 et 11,76% en 1992. Aucun cas de résistance RIII n'a été dépisté en 1991 au Mali. CAMARA en 1990 n'avait pas aussi mis en évidence des souches plasmodiales résistantes de niveau RIII à Safo. Par contre, dans le village de Sotuba, une souche résistante de niveau RIII a été dépistée en 1992. Nous n'avons aucune information antérieure sur le niveau de sensibilité des souches plasmodiales à Sotuba. Ce qui fait que nous n'avons pas assez d'éléments pour expliquer ce cas. Sotuba étant un village péri-urbain, avec une circulation libre de la chloroquine, l'hypothèse d'une pression médicamenteuse (et sélection de souches résistantes) dans une zone de transmission paludéenne périurbaine pourrait être évoquée.

Les résultats de différentes enquêtes par le tests *in vivo* menées dans les états de L'O.C.C.G.E. et présentés en Mars 1991 (19) sont les suivantes:

- à Cotonou au Bénin le taux de résistance observé était de 53%(34/65) en février 1987 contre 4%(2/44) à Sokodé au Togo et 8%(1/12) à Abidjan à la même période;
- il était de 8%(8/52) à Ouagadougou, 26%(12/46) à Banfora et 5%(1/20) à Fada, au Burkina faso en Novembre 1988; à Dakar et Pikin au Sénégal ce taux était respectivement de 6%(2/32) et 8%(3/37) à la même période;
- en Novembre 1989 à Tillabéry et à Gaya au Niger, les taux respectifs de 9%(2/22) et 67%(24/36) ont été observés.

Nous constatons à travers nos résultats, comparés aux études jusque là menées au Mali, qu'il ya une évolution (vers l'augmentation du niveau de résistance) dans le temps de la chimiorésistance par le test *in vivo*.

Jusqu'en 1989 aucun cas de résistance *in vivo* autochtone n'avait été mise en évidence (32,35) au Mali. C'est à partir de la saison de transmission 1990, que des souches chloroquinorésistantes de *Plasmodium falciparum* ont été isolées dans le village de Safo.

KONE et Coll. trouvaient à Abidjan en 1990, 29,60% de cas de résistance *in vivo* chez des enfants de 5 à 9 ans(25). DELMONT et Coll. ont observé chez des enfants centrafricains des pourcentages de chimiorésistance nuls ou faibles, n'atteignant des valeurs légèrement supérieures à 10% que dans la ville de Bangasso(7). TURAMAN et Coll. ont observé chez des 64 enfants semi-immuns de Kouroussa en Guinée 27% de résistance *in vivo* par le test simplifié de Mars à Août 1991.

Par contre GUERET et Coll. ont trouvé un taux élevé de résistance *in vivo* à la chloroquine à Mouana au Gabon, jusqu'à 62% aux de Mars et Avril 1987 et 56% en Novembre-Décembre 1989; 24 sujets en 1987 et 34 en 1989 ont été examinés par le test *in vivo* de 7jours(18).

La résistance *in vitro* n' a été détectée à Safo qu'en 1991. Elle a été décrite à Sotuba et dans les hôpitaux en 1992. Ces résultats pourrait s'expliquer par le fait que un nombre assez important de souches plasmodiales ("sauvages"), n'est pas cultivable *in vitro*, rendant ininterprétable une quantité importante de tests *in vitro*. C'est le cas de la souche RO33, quant au polymorphisme de la protéine gp190. Cette souche a été décrite à Safo en 1990 (12). Par exemple sur 14 tests effectués en 1991 à Tiénéguébougou aucun n'a été interprétable.

Pour les cas de résistances *in vitro* détectés, il n'y a eu inhibition de la maturation des schizontes qu'à 16 pmols. Il est aussi difficile en enquête de masse de respecter tous les critères d'exclusion, pour la bonne réussite des tests *in vitro* de l'OMS.

Le Test rapide a détecté des cas de résistance dans chaque localité étudiée en 1991 et 1992 sauf à Tiénéguébougou en 1991 où toutes les souches étaient sensibles.

Le test rapide présente un avantage certain sur le test *in vitro* de l'OMS. Sa sensibilité et sa spécificité sont de 100% par rapport au test *in vitro*. Par contre, si on prend comme référence le test rapide, beaucoup de souches résistantes dépistées par celui-ci, ne le sont pas par le test *in vitro* de l'OMS. Ce qui expliquerait le pourcentage de concordance moyen (Statistique "Kappa"=0,43) entre le test *in vitro* et le test rapide de KROGSTAD, en dehors de toute chance selon la classification de LANDIS et KOCH.

Par rapport au test *in vivo* le test de KROGSTAD a une sensibilité moyenne de 42,86%, mais une bonne spécificité de 85,11%. Le pourcentage de concordance entre ces deux tests est médiocre (Kappa=0,26).

Ces résultats montrent clairement la difficulté de comparer ces 3 techniques qui explorent des mécanismes probablement différents. En effet dans le test *in vivo*, de nombreux facteurs liés à l'hôte interviennent:

- biodisponibilité de la chloroquine (variable d'un individu à un autre),
- état de l'appareil digestif: vomissement, diarrhée...,
- système immunitaire, complétant l'effet du médicament.

Tous ces facteurs font qu'il faudrait distinguer la résistance parasitologique de la résistance clinique.

D'autre part le test *in vivo* de 28 jours de l'O.M.S. est difficilement applicable telle qu'il est décrit en zone d'endémie, le risque d'une nouvelle inoculation de sporozoïte au sujet inclus dans le protocole étant élevé.

Le test *in vitro* de l'O.M.S. nécessite des conditions de culture rigoureuses, difficilement réalisables sur le terrain (contamination). L'effet des anticorps qui interfère avec celui de la chloroquine est difficile à éliminer parce que nous travaillons sur du sang total. D'autre part certaines souches sauvages se cultivent très mal en laboratoire (RO 33).

Le taux de succès du test *in vitro* sur le terrain, ne dépasse guère 40%, quelque soit les équipes (CDC 1991, Institut Pasteur DAKAR 1991).

Quant au test rapide, il n'a pratiquement pas de contre indication. Le travail est fait sur les hématies sans interférence des anticorps.

Il est le seul qui teste réellement l'effet spécifique du médicament sur le parasite. Toutes les étapes dans sa mise en oeuvre peuvent être réalisées sur le terrain, seule la lecture automatique est faite au laboratoire.

Le test rapide exploite un des mécanismes de la chloroquinorésistance basé sur la fuite de chloroquine de la vacuole parasitophore.

L'utilisation du vérapamil un inhibiteur calcique oblige les souches chloroquinorésistantes à garder la chloroquine tritiée de la vacuole parasitophore. Son seul inconvénient est l'utilisation d'un matériel lourd, disponible que dans les centres spécialisés. Son avantage est d'être automatisable et de pouvoir traiter des centaines de souches à la fois. Il est le seul utile pour le clinicien car il permet de lui donner devant un malade une réponse rapide en 2-3 heures.

Toutes ces constatations entre ces trois tests font qu'il est difficile pour nous de choisir un des tests comme référence. Cette absence de référence explique les faibles valeurs de la statistique "Kappa". Il se dégage d'après notre expérience que ce nouveau test rapide constituerait un appoint important dans le dépistage de la chloroquinorésistance. A l'état actuel de nos données, nous pensons que ces 3 tests sont complémentaires.

Avec l'amélioration des équipements de culture dans notre laboratoire, ce travail sera poursuivi dans les conditions optimales pour l'évaluation des valeurs intrinsèques de ces trois tests.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Au terme de cette étude nous pouvons affirmer qu'au Mali l'épidémiologie de la chloroquinorésistance des souches de *Plasmodium falciparum* est variable et voisine de celui des autres pays de l'Afrique de l'Ouest. Les niveaux de résistance sont faibles ne dépassant que rarement 30%. Les résistances sont de types RI et RII, exceptionnellement RIII. Le test rapide du Dr KROGSTAD est applicable sur le terrain et serait d'une grande utilité pour les cliniciens et les autorités sanitaires, soit pour la mise en évidence d'un échec thérapeutique où pour avoir une évaluation rapide de la chimiosensibilité à la chloroquine. Mais il mérite une évaluation plus large et dans des conditions de terrain.

Ces résultats nous permettent de formuler les recommandations suivantes:

- Poursuivre ce travail en testant beaucoup plus de souches plasmodiales et en incluant la zone de transmission soudano-guinéenne et les zones touristiques de Sangha, Djénné et Tombouctou.
- Mettre en place une politique cohérent d'utilisation des antipaludiques au Mali, en accord avec le programme national de lutte contre le paludisme au Mali.
- Elaborer une stratégie efficace et décentralisée de surveillance épidémiologique de la chimiorésistance.
- la chloroquine demeure toujours le médicament de choix de l'accès palustre simple en l'absence de vomissement et d'intolérance, au Mali.

Références bibliographiques

- 1-AMBROISE T.P., CARNEVALE P., FELIX H., MOUCHET J. : Le paludisme. Encyclopédie médico-chirurgical (Paris),1984, 8089A: 10-9.
- 2- ASHONG J.O., BLENCH I.P. and WARHURST D.C.: The composition of haemozoin from *Plasmodium falciparum*. Trans. Roy. Soc. Trop. Méd. Hyg. 1989, 83: 167-172.
- 3- BERQVIST Y., HED C., FUNDING L., SUTHER A. : Determination of chloroquine in urine, a field method based on ion pair extraction. Bull. WHO, 1985, 63: 893-898.
- 4- BRUCE-CHWATT J.L., BLACK H.R., CANFIELD J. C., CLYDE D.F., PETERS W., WERNSDORFER W.H.: Chimiothérapie du paludisme. O.M.S. Serie de monographies 1984, 27: 207-239.
- 5 -BITONTI J. A., SJOERDSMA A., MC CANN P. P., KYLE E. D., ODUOLA J.M.A.,ROSSAN N.R., MILHOUSE K.W., DAVIDSON E.D. : Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desimipramine. Science 1988, 242: 1301-1303.
- 6-CAMARA F. : Evolution de la chimiosensibilité des souches maliennes de *Plasmodium falciparum* aux amino-4-quinoléines de 1985 à 1990. Thèse médecine Bamako 1991, n°41,.
- 7- DELMONT J., SIOPATHIS R.M., TESTA J., ROUNGOU J.B., MONGES P., YAYA MAMADOU F.: Evaluation de la chimioresistance de *Plasmodium Falciparum* à la chloroquine chez des enfants centrafricains: bilan de cinq années (1984-1988) d'étude par tests *in vivo*. Méd. Afr. Noire 1990,37 (7):369-371.
- 8- DEMBELE M.: Evaluation entomologique, parasitologique et clinique de l'efficacité des rideaux et couvertures imprégnés de perméthrine dans la stratégie de contrôle du paludisme. Thèse Médecine Bamako, 1989, N°39.
- 9- DIANI F.: Evaluation de la situation sanitaire au Mali. Thèse Pharmacie Bamako, 1985, N° 1.
- 10-DIAWARA F.N., SIDIBE T., KEITA M.N., MAIGA S., TOSTYKN L.: Aspects épidémiologiques des convulsions fébriles du nourrisson et de l'enfant dans le service de pediatrie de l'hôpital Gabriel Touré(Bamako). Méd. Afr. Noire, 1991,38(2):124-126.

- 11-DOUMBIA O. : Le paludisme au Mali : passé, présent, avenir.
Thèse médecine Bamako, 1977, n°21.
- 12-DOUMBO O., SANGARE O., TOURE Y : Le paludisme dans le sahel,
l'exemple du Mali. Mal. Trop. Trans. Ed. AUPELF-UREF; John Libbey
Eurotex. Paris, 1989, 11-32.
- 13- DOUMBO O. : Epidemiologie du paludisme au Mali. Etude de la
chloroquinorésistance. Essai de stratégie de contrôle basée sur
l'utilisation des rideaux imprégnés de perméthrine associée au
traitement systématique des accès fébriles.
Thèse de Doctorat Sciences Biologiques(Parasitologie, Pathologie,
Ecologie), Montpellier, 1992.
- 14- DUCHENE-MARULLAZ P., BERDEAUX A.: Les médicaments de
l'angine de poitrine pp 408-499 in GIROUD J.-P., MATHE G., MEYNIEL G.:
Pharmacologie clinique, bases de la thérapeutique.
Exp. Sci. Française 1978, 1: 408-499.
- 15-FITCH D.C.: Mode of action of antimalarial drugs. In : Malaria and
the red cell. Ciba Foundation Symposium 94.,London, Pitman Ed., 1984,
222-232.
- 16-GINSBURG H.: Effet of calcium antagonists on malaria suceptibility to
chloroquine. Parasitology today 1988, 4(8): 209-211.
- 17-GLUZMAN Y.I., KROGSTAD J. D., ORJIH U. A., NKANGINEME K.,
WELLEMS E.T., MARTIN T.J. and SHLESINGER H. P. : A rapide in vitro
test for chloroquine-résistant *Plasmodium falciparum* . Am. J. Trop. Méd.
Hyg. 1990, 42 (6): 31-34.
- 18-GUERET D., MIGOT F., RINGWALD P., THIBAUT P. et LE BRAS J.:
Stabilité de résistance de P. falciparum à la chloroquine entre 1987 et
1989 à Mouana, Gabon. Bull. of WHO 1992, 70(4), 621-627.
- 19 -GUIGUEMDE T.R., GBARY A.R., OUEDRAOGO B.J.,
LAMIZANA L., MAIGA S.A.,BOUREIMA S.H., COMLANVI C.E., FAYE
O. et NIANG D.S. :
Point actuel sur la chimiorésistance du paludisme des sujets
autochtones dans les états de l'OCCGE (Afrique de l'ouest).
Ann. Soc. Belge Méd. Trop. 1991, 71: 199-207.
- 20 -GUINDO M.: Contribution à l'étude du traitement traditionnel du
paludisme. Thèse Pharmacie Bamako 1988, n°15.

- 21-HAIDARA A.Y.: Place du paludisme dans les syndrômes fébriles en médecine interne à l'hôpital du Point G.
Thèse Médecine Bamako 1989,N°19
- 22-HASSELOT N., KEUNDJIAN A., ABDOULAYE J : Méthodes de détection et de dosage des antimalariques dans les liquides biologiques. Enquêtes épidémiologiques sur la surveillance du paludisme.
Pharm. Afr. 1991,56: 21-24.
- 23-HERWALDT L. B., SCHLESIINDER H. P., and KROGSTAD J. D.: Accumulation of chloroquine by membrane preparations from *Plasmodium falciparum*.
Mol. and Bioch. Parasit. 1990, 42: 257-268.
- 24-KEITA A., DOUMBO O., KOITA N., DIALLO D., GUINDO M., TRAORE A.K.: Etude préliminaire sur la faisabilité d'un protocole d'essai clinique. Bull. Méd. Trad. Pharm., 1990,2(4): 136-146.
- 25-KONE M., PENALI L.K., HOUDIER M., ASSOUMOU A. et COULIBALY A.: Evaluation in vivo de la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine à Abidjan. Bull. Soc. Path. Ex., 1990, 83, 187-192.
- 26-KOUMA D.: Contribution à l'étude de l'association paludisme et grossesse dans le centre de santé de la commune II.
Thèse Médecine,1992, N°11.
- 27-KROGSTAD J. D., GLUZMAN Y. I., KYLE E. D., ODUOLA J.M.A, MARTIN K. S., MULHOUS K. W., SCHLESINGER H.P.. : Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. Science 1987, 238: 1283-1285.
- 28-KROGSTAD J. D., SCHLESINGER H. P. : Acid-vesicale fonction, intracellular pathogens, and the action of chloroquine against *Plasmodium falciparum*.
N. Engl. J. of Med. 1987, 317: 542-549.
- 29-KROGSTAD J. D., SCHLESINGER P.H.: The basic of antimalarial action: non weak base effects of chloroquine on acid vesical pH.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987, 36: 213-220.
- 30- LE BRAS J. and DELORON P.: In vitro study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-microtest. Am. J. Trop. Méd. Hyg. 1983, 32: 50-54.

31-LE BRAS J., BASCO K.L.: Chimiorésistance des plasmodies.
in Médecine Tropicale Paludisme UREF éd.1991, 146-162.

32-MAIGA S.A., BOUGOUDOGO F., COULIBALY B., OUATTARA B.,
MAIGA A.: Etude de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la
chloroquine par les épreuves in vivo et in vitro dans une zone rurale de
savane au Mali. Méd. Afr. Noire 1991, 38(2): 116-123.

33-MARTIN K. S., ODUOLA J. M. A., MILHOUS K. W.. Reserval of
chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil.
Sciences 1987, 235: 899-901.

34- N'DIAYE M.: Contribution à l'étude des anticorps naturels anti P190:
antigène majeur de la surface du mérozoïte de *Plasmodium falciparum*
(Welch 1897). Thèse Pharmacie Bamako, 1989, N°16.

35-OUEDRAOGO J. B. , GBARY A. R., GUIIGUEMDE T. R.. Enquête
sur la chimiosensibilité du paludisme et formation d'une équipe
nationale aux tests de chimiosensibilité au Mali (Bamako).
Doc. Techn. OCCGE 9. 180/87.

36- OMS: Comite d'Experts du Paludisme.
Series de Rapports Techniques N°123, 1957.

37- OMS: Comité d'Experts du Paludisme.
Series de Rapports Techniques N° 205, 1961.

38- OMS: Comité d'Experts du Paludisme.
Series de Rapports Techniques N° 382, 1968.

39- OMS: Chimiothérapie du Paludisme et résistance aux antipaludiques.
Series de Rapports Techniques N° 529, 1973.

40- OMS: Comité d'Experts du Paludisme.
Series de Rapports Techniques N° 735, 1986.

41- OMS: Biologie des Plasmodie.
Series de Rapports Techniques N° 743, 1987.

42- OMS: Pratique de la Chimiothérapie du Paludisme.
Series de Rapports Techniques N° 805, 1990.

43-O.M.S.: In vitro micro-test (MARK II) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to Chloroquine, Méfloquine, Quinine, Sulfadoxine/Pyriméthamine and Amodiaquine. Instructions for use of the in vitro micro-test kit (MARK II) and for completing the record form. Document non publié MAP/87.2.

44-PETER W.. Chemotherapy and drug resistance in malaria. Londre, Academic Press,éd. 1970.

45- PENE P. et DELMONT J. : Exposé de synthèse sur l'épidémiologie et le traitement du paludisme de la femme en enceinte et de l'enfant en Afrique subsaharienne . Bull. Soc. Patho. Ex. 1991, 84(5 et 5bis): 492-496.

46- RIECKMANN K. H. CAMPBELL G.H., SAX L.T. and MREMA J.E.: Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An in vitro microtechnique. Lancet,1978, i: 22-23.

47-RINGWALD P., LE BRAS J., DOURY J.C.. Chimiosensibilité du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* en France en 1989. B.E.H. 25, 1990,107-109.

48-SCHEIBEL W.L., COLOMBANI M.P., HESS D.A., AIKAWA M., ATKINSON T.C. and MILHOUS K.W.. Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*) : implications for drug design. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84: 7310-7314.

49-SHENTON F.C., BOTS M., EGGEITE T.A., DE WIT M., GREENWOOD B.M.: An ELISA test for detecting chloroquine in urine. Trans. Roy. Soc. Trop. Méd. Hyg.1988, 82: 216-220.

50- SODSRI THAITHONG: Clones of different sensitivities in drug-resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. Bull. of W.H.O. 1983, 61(4): 709-712.

51-TOLOSA D., PEGGINS J.O., ODUOLA A.M. and BREWER T.G.: Effet of reversing agent Chlorpromazine on Chloroquine disposition in the isolated perfused rat liver. Supplement to Am. J.Trop. Méd. Hyg. 1992, 4 (4): 172.

52-TURAMAN C., BASCO L.K. and LE BRAS J.: Evaluating the efficacy of chloroquine in fébrile Guinean children infected with *Plasmodium falciparum* by a simplified in vivo test. Bull. of W.H.O., 1992, 70(4): 477-480.

53- WARHURST D.C.: Antimalarial interaction with ferriprotoporphyrine IX monomer and its relationship to activity of the blood schizonticides. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1987, 81(1): 65-67.

54-WELLEMS E.T., PANTON J.L., GLUZMAN Y.I., DOROSARIO E. V., GWADZ W.R., JONAH-WALKER A. and KROGSTAD J.D.: Chloroquine resistance no linked to mdr-like gene in *Plasmodium falciparum* cross. Nature 1990,345, (6272): 253-255.

55- WHO.: Terminologie of malaria eradication. Technical Report Series 243, 1963.

Nom: KOURIBA

Prénom: Bourèma

Titre de la Thèse: EPIDEMIOLOGIE DE LA CHLOROQUINORESISTANCE AU MALI: INTERET D'UN TEST RAPIDE DE DETECTION DES SOUCHES CHLOROQUINORESISTANTES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*, PAR L'UTILISATION DE L'HYDROGENE TRITIE (³H) ET LE VERAPAMIL.

Année: 1992-1993.

Ville de soutenance: Bamako

Pays d'origine: Mali

Lieu de dépôt: Bibliothèque, Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali.

Secteur d'intérêt: Parasitologie (Paludisme).

RESUME

Nous avons étudié de 1991 à 1992 l'épidémiologie de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine dans différents faciès de transmission du paludisme au Mali. Par la même occasion nous avons testé la faisabilité sur le terrain et les valeurs intrinsèques du test rapide du Docteur KROGSTAD, test utilisant le vérapamil et la chloroquine tritiée.

Nous avons effectué en 1991, 155 tests *in vivo* OMS, 68 tests *in vitro* OMS et 159 tests rapides ; en 1992, 140 tests *in vivo* OMS, 65 tests *in vitro* OMS et 129 tests rapides.

La résistance globale à la chloroquine des souches de *P. falciparum* testées était de 14,46% en 1991 et de 17,05% en 1992 par le test rapide de KROGSTAD. La répartition de la chloroquinorésistance était variable suivant les faciès de transmission et les niveaux de résistances étaient en général bas.

Il apparaît au terme de cette étude qu'il y a une évolution de la résistance des souches de *P. falciparum* au Mali, vers une discrète augmentation.

Il ressort également que le test rapide est d'un apport important pour le dépistage de la chloroquinorésistance dans le cadre de la surveillance épidémiologique. Toutes les étapes de sa mise en œuvre sont réalisables sur le terrain, seule la lecture est faite au laboratoire.

Mots clés: *Plasmodium falciparum*, Chloroquinorésistance, Test rapide de KROGSTAD, Valeurs intrinsèques, Mali.

Summary

We have studied from 1991 to 1992 the epidemiology of *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance in different facies of malaria transmission in MALI.

We have also tested the practicability and intrinsic values of KROGSTAD's rapid test (using verapamil and chloroquine marked by tritium) on the field.

We have done 155 *in vivo* WHO tests, 68 *in vitro* WHO tests and 159 Krogstad's rapid tests during 1991's transmission season. In 1992, 140 *in vivo* WHO tests, 65 *in vitro* WHO tests and 129 KROGSTAD's rapid tests was practiced.

The global resistance of *P. falciparum* strains tested to chloroquin was 14,46% in 1991; and 17,05% in 1992 by the rapid test. The level of the chloroquine-resistance strains of *P. falciparum* malaria was variable (0% to 28%) and strongly correlate to transmission's facies and resistance levels were generally low, in the both season (1991 to 1992).

The *P. falciparum* strains resistance to chloroquine is increasing in Mali. It send out that the rapid test is most important for screening of the chloroquine-resistance; all the step of it's realisation are possible on the field, only spectrometer BECKMAN reading is done in laboratory.

Key words: *Plasmodium falciparum*, Chloroquine-resistance, KROGSTAD's rapid test, Intrinsic Values, Mali.

AND AMODIAQUINE (IN VITRO-TEST)

hat the drug concentrations of the test plates used match those given below in Section K)

Revision 1987

AND PLACE OF TEST

No _____

City/Town _____

Country _____

District/County _____

Serial No.: 1

Country Code: 5

Institution: 8

AND PLACE INFECTION PROBABLY CONTRACTED

Country Code 10 Prov Code:

Lat in box 15 N = 1 S = 2 deg min

Long. in box 20 E = 1 W = 2 deg min

Locality _____

TIME BLOOD TAKEN

26 day month year hour min

ON TIME

Date _____ Duration (hours) _____

Started: Terminated:

36 hour min hour min

Age: years

Sex: MF Less than 1 year = 00

44

FOR SCREENING

1 = General pop 2 = School 3 = Labour force 4 = Outpatient 5 = Inpatient 6 = Migrant labour 7 = Other

1 = Resist. in area of origin 2 = Resist. in area of orig. (abroad) 3 = Resist. in adjacent area 4 = Resist. in other rel. area 5 = Resist. in area of origin 6 = Routine monitoring 7 = Other

8 = Collateral case of resist. or suspect. resist. case 9 = Other

46

1 = General pop 2 = School 3 = Labour force 4 = Outpatient 5 = Inpatient 6 = Migrant labour 7 = Other

47

KEN DURING WEEKS

HISTORY: Any animal. drug taken? 1 = Yes 2 = No 3 = ? (box 48)

If "Yes" specify drug(s): _____ (box 49)

URINE-TEST 1 = pos. 2 = neg. 3 = Doubtful 4 = Not done

(box 50-53) 48 49

50 CHL MEF QNN SDX

PRE SLIDE EXAM.

ASEXUAL P. FALCIPARUM

small medium large

No. counted: _____

total WBC counted

54 59

OF MICRO-TEST

	Control	1	2	4	8	16	32	64	Test plate batch No.
IE p mol/well f./200 paras.									87 <input type="text"/>
		%	%	%	%	%	%	%	
IE p mol/well f./200 paras.									114 <input type="text"/>
		%	%	%	%	%	%	%	
IE p mol/well f./200 paras.									141 <input type="text"/>
		%	%	%	%	%	%	%	
R p mol/well DNT with 8 normal 200 paras		10 (SDX)	30 (SDX)	100 (SDX)	300 (SDX)	1000 (SDX)	3000 (SDX)	10000 (SDX)	168 <input type="text"/>
		%	%	%	%	%	%	%	
IE p mol/well f./200 paras									195 <input type="text"/>
		%	%	%	%	%	%	%	
									198 <input type="text"/>

RPMI 1640 LPLF medium BATCH No. _____

Slides referred for checking ? yes = 1 no = 2

200

patient travelled and where (during the last 12 months)?

201

1: _____

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers
de l'Ordre des Pharmaciens et des Condisciples :

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

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

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

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

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

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