

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple-Un But-Une Foi





**UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO**

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2018-2019

N° _____ /

**Etude comparative des mutations sur les gènes *dhfr* et *dhps* de
Plasmodium falciparum après les campagnes de chimioprévention
saisonnière 2016-2017 au Niger et au Mali**

THESE

**Présentée et soutenue publiquement le 17/10/2019 devant la faculté de
pharmacie pour l'obtention du grade de**

DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)

Par

Rabiatou MAMANE IDE

JURY

Président du jury : Professeur Ababacar I. MAIGA

Membres : Professeur Mouctar DIALLO

Professeur Lansana SANGARE

Co-directeur de thèse : Docteur Ibrahim Maman LAMINOU

Directeur de thèse : Professeur Ousmane KOITA

LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2018-2019

ADMINISTRATION

Doyen: Boubacar TRAORE, Professeur

Vice-doyen: Ababacar I. MAÏGA, Professeur

Secrétaire principal: Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable: Famalé DIONSAN, Inspecteur des finances.

PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
2	Mahamadou	CISSE	Biologie
3	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
4	Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
5	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
6	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
7	Boukassoum	HADARA	Législation
8	Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
9	Alou A.	KEITA	Galénique
10	Mamadou	KONE	Physiologie
11	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
12	Bréhima	KOUMARE	Bactériologie-Virologie
13	Abdrmane S.	MAÏGA	Parasitologie
14	Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER: SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS /DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique
6	Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
7	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
8	Ousmane	KOITA	Biologie Moléculaire
9	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCE/MAITRES DE RECHERCHE

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

3. MAITRES ASSISTANTS /CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAÏKA	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biochimie Clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie Clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
6	Antoine	DARA	Biologie moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
8	DjénébaKoumba	DABITAO	Biologie moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie microbienne
10	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
11	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
13	Ibrehima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
14	Kassoum	KAYENTAO	Santé Publique/ Biostatistiques
15	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
16	BiramaApho	LY	Santé publique
17	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
18	Issaka	SAGARA	Santé publique/Biostatistiques
19	Samba Adama	SANGARE	Bactériologie-Virologie
20	Fanta	SANGHO	Santé publique/Santé communautaire

21 Mahamadou Soumana SISSOKO Santé publique/Biostatistiques

4. ASSISTANTS /ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
4	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
5	Merepen dite Agnès	GUINDO	Immunologie
6	Oumar	GUINDO	Epidémiologie
7	Falaye	KEÏTA	Santé publique /Santé Environ.
8	N'DeyeLallah Nina	KOITE	Nutrition
9	Yacouba	MAÏGA	Biostatistiques
10	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
11	Oumar	SANGHO	Epidémiologie
12	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Saïbou	MAÏGA	Législation

3 Rokia SANOGO Pharmacognosie **chef de DER**

2. MAÎTRES DE CONFERENCES/MAÎTRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

3. MAÎTRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

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

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie

4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
5	Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
6	Assitan	KALOGA	Législation
7	Ahmed	MAÏGA	Législation
8	Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
9	Aboubacar	SANGHO	Législation
10	Bourama	TRAORE	Législation
11	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
12	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
13	Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
14	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

DER: SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEURS/ DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

2. MAÎTRES DE CONFERENCES /MAÎTRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie chef de DER

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

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

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

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

DER: SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

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

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

3. MAÎTRES ASSISTANTS /CHARCHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
2	Boureïma	KELLY	Physiologie Médicale

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique

3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

CHARGES DE COURS (VACCATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
4	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Modibo	DIARRA	Nutrition
7	Moussa I.	DIARRA	Biophysique
8	Babacar	DIOP	Chimie
9	Atimé	DJIMDE	Bromatologie
10	Yaya	KANE	Galénique
11	Boubacar	KANTE	Galénique
12	Aboubakary	MAÏGA	Chimie Organique
13	Massambou	SACKO	SCMP/SIMR
14	Modibo	SANGARE	Anglais
15	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
16	Fatoumata	SOKONA	Hygiène du milieu

17	Fana	TANGARA	Maths
18	Abdel Kader	TRAORE	Pathologies Médicales
19	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et pathologie Médicale
20	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

**DEDICACES ET
REMERCIEMENTS**

DEDICACES

Au nom d'ALLAH le Miséricordieux, le très Miséricordieux. << Gloire à toi ! Nous n'avons de savoir que ce que tu nous a appris. Certes c'est toi l'Omniscient, le sage >> Sourate 2, Verset 32(le Saint Coran)

Louange et gloire à Dieu le Tout Puisant qui m'a permis de mener bien ce travail.

Je dédie ce travail :

♥ A mon père : **feu MAMANE IDE**

<< Les morts ne sont pas morts, ils sont parmi nous >> a dit le Poète. Ce n'est pas sans émotion que j'évoque ici ta mémoire. En nous quittant pour toujours, tu nous as laissé un peu trop tôt. De ton vivant tu as toujours œuvré pour notre réussite et voilà que tu ne peux pas assister à ce grand jour, fruit de tes efforts. Aujourd'hui nous te pleurons encore, dans notre cœur, l'oubli n'a pas de place pour toi, Cher père.

Que ton âme repose en paix.

♥ A ma mère : **ADIZA MAIGA WABANAIZE**

Je ne pourrais te remercier assez pour tes sacrifices, tes souffrances et tes privations à notre égard. Cela témoigne le réel amour que tu as placé en nous. Puisse ce travail te donne toute satisfaction et le couronnement d'une mission accomplie. Que Dieu, le Tout Puissant te bénisse et te garde le plus longtemps possible à nos côtés.

♥ Mon mari : **AMINOU MOUSSA**

Toi qui m'as offert ton cœur et toute ta tendresse dans les moments difficiles. Ton soutien moral et ton affection ont été cruciaux à la réussite de ce travail. Retrouve ici mon amour profond et ma profonde reconnaissance.

♥ A ma fille : **MAIRA AMINOU**

Qui a souffert de mon absence, qui m'a procuré la joie, le courage, et l'amour nécessaire de poursuivre mes études. Tu es mon bonheur pour la vie, je te souhaite la même chance pour tes études afin que tu sois une relève pour moi et pour tous.

Remerciements

ALLAH, je Te rends grâce et Te remercie de m'avoir donné la faculté d'accomplir cette œuvre selon ta volonté.

J'adresse mes sincères remerciements.

A ma maman : **IMANATOU MAMOUDA**

Tu as été pour nous une mère tendre, attentive et toujours disponible nous t'en serons toujours reconnaissants, Seul Dieu peut te récompenser pour ce que tu as fait pour nous.

A mes frères et sœurs : **AICHATOU, BIBA, SANI, NANARE, RAKIATOU, BOUBACAR, OUMOULHAIRE, DJAMILA, FAYCAL, YASSER, BINTA, KADER, RABIOU, SHAMSSIA, IDRISSE, MASSAOUDOU**

Je déplore le manque de mots adéquats pour vous témoigner mon amour et mon attachement. Sachez que nous partageons les peines et les joies et que rien au monde ne pourra nous séparer. Ensemble, œuvrons dans l'esprit de fraternité et de solidarité afin de pérenniser l'unité de la famille.

A ma tante : **RAMATOU BOULI MAIGA**

Tu as été d'un incondionnel et tu nous (mes frères, mes sœurs et moi) as assisté en toute circonstance. Ton esprit de discernement n'a guère altéré ta grande sensibilité. Tu mérites respect et considération.

A mes neveux et nièces:

Que ce travail soit un exemple pour vous.

A mes cousins et cousines

Je ne citerai pas de noms au risque d'en oublier certains. Retrouvez dans ce travail toute ma sympathie pour vous.

A mes beaux-frères et belles sœurs ainsi qu'à leurs familles Tout mon respect et profond attachement.

A ma belle-famille : Merci pour votre soutien.

A notre aîné **Dr Youssouf DIARRA** de m'avoir aidé tout au long de ce travail. Je vous souhaite une longue et heureuse vie.

A mes amis du groupe d'exercice : **KOUDEIDIA CAMARA, MARIAM TRAORE (MT), NOUHOUM KONE**

Vous êtes et vous resterez mes fidèles compagnons. Que Dieu le tout puissant puisse raffermir nos liens, merci pour tout.

A toute la communauté **Nigérienne, Malienne, Ivoirienne, Béninoise, Togolaise, Camerounaise, Burkinabé**

A mes amies et collègues maliennes du groupe *les dames de fer* : **KOUDEIDIA, MT, KASSE, ZEINAB, SITAN, FANTA, LARI, INA, SARAN, AISSATA**

Veillez accepter l'expression de ma reconnaissance, ma profonde gratitude pour votre amitié sans faille, compréhension et encouragements. Merci pour votre amitié fraternelle. Vous étiez toujours là aux moments difficiles comme aux moments de joie pour me soutenir, m'aider et m'écouter. Que Dieu vous protège et vous procure joie et bonheur et que notre amitié reste à jamais. Amen !

A tous mes amis et voisins du Village du Point G et à tous mes camarades de 10^{ème}

Promotion du NUMERUS CLAUSUS , le groupe ***DR.FISCALLL*** **MARIKO,BALLA, SOPEUL, DIOP, IBRAHIM, ALMADANE, RACHIDA, KOUDEIDIA, SAMBA, MARIAM(MT), MARCEL, ABLO, DRISSA, KASSE, ASTOU** vous avez été des compagnons formidables, des amis fantastiques et des conseillers pleins de ressources, votre soutien et votre solidarité ne m'ont jamais fait défaut tant dans les difficultés que dans la joie, nous avons partagé de moments merveilleusement inoubliables, merci pour tant de bonheur !

A tout le personnel du **LBMA** (laboratoire biologie moléculaire appliquée de Bamako) et du **CERMES** (centre de recherche médical et sanitaire de Niamey) qui a contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Aux thésards mes camarades de LBMA: **Mariam Traoré, Béatrice Togo, MoustafOulalé, Bakari Coulibaly, Tahirou Traoré, Amadou Diakité, Amadou Guitteye, Boubacar Macalou**

Hommages aux membres
du jury

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du Jury

Professeur Ababacar I. MAIGA

- **Professeur titulaire de Toxicologie à la faculté de Pharmacie ;**
- **Vice-Doyen de la Faculté de Pharmacie ;**
- **Ancien Directeur Adjoint de la Direction de Pharmacie et du Médicament.**

Permettez-nous de vous remercier pour l'honneur que vous nous faites, en acceptant de présider notre jury de thèse.

Nous avons admiré vos qualités scientifiques, pédagogiques et humaines tout le long de notre formation.

Votre modestie et votre caractère scientifique élevé font de vous un maître exemplaire.

Veuillez accepter Cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance.

Que Dieu vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maître et membre du Jury

Professeur Mouctar Diallo

- **PhD en Parasitologie Entomologie médicale ;**
- **Professeur Titulaire de parasitologie/mycologie à la FAPH ;**
- **Responsable de l'Unité de Diagnostic Parasitaire au MRTC/FMPOS ;**
- **Chef de D.E.R des Sciences Fondamentales de la FAPH ;**
- **Président de l'association des biologistes techniciens de laboratoire du Mali.**

Cher maître, nous avons apprécié votre simplicité, votre courtoisie, vos qualités intellectuelles et humaines. Vos suggestions ont été d'un apport inestimable dans la réalisation de ce document. Veuillez accepter cher maître, l'expression de notre grande admiration.

A notre Maître et membre du Jury

Professeur Lansana SANGARE

- **Maitre de conférences en Parasitologie à la FST ;**
- **Chargé des cours de biologie moléculaire au département de biologie à la FST**
- **Chef de l'unité de Parasitologie au LBMA.**

Cher maître, c'est un honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Votre rigueur scientifique et votre intérêt pour le travail bien fait en général font de vous un Maître à admirer. Soyez rassuré de notre profonde reconnaissance.

Que Dieu vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maître et co-directeur de thèse

Docteur Ibrahim Maman LAMINOU

- **Docteur d'état en médecine vétérinaire**
- **Docteur es sciences en Biologie Moléculaire**
- **Chargé de recherche : CAMES/RIIP unité de paludologie et Entomologie Médicale du centre de recherche médicale et sanitaire de Niamey-Niger**

Cher Maître,

Permettez-nous de vous adresser nos remerciements les plus sincères.

Vous nous aviez été accessible, du début de ce travail jusqu'à la fin.

Votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre souci du travail bien fait et votre faculté d'écoute ont forcé notre admiration. Vous nous avez reçu avec beaucoup d'amabilité. Soyez rassuré honorable maître de notre reconnaissance.

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Ousmane KOITA

- **Pharmacien Biologiste ;**
- **Professeur en parasitologie moléculaire ;**
- **Chargé de cours de biologie moléculaire appliquée à la FST et de biologie animale à la faculté de Pharmacie ;**
- **Ancien Directeur-Adjoint du SEREFO ;**
- **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Appliquée de la FST.**

Cher Maître,

Nous avons été très séduits par votre conviction pour la recherche, votre disponibilité et la qualité de votre enseignement.

Vous avez été toujours ouvert aux étudiants et vous nous avez toujours appris que « pour un étudiant rien ne valait une formation de qualité »

Vous nous avez accueilli à bras ouvert au LBMA, nous initié dans la recherche et fini par diriger les activités de notre thèse, ce qui fait de ce travail, le vôtre !!!

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

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Composition des mélanges réactionnels.....	46
Tableau 2 : Les composants des mélanges réactionnels	47
Tableau 3 : Concentration des amorces utilisées lors du HRM	50
Tableau 4 : Composition du mix lors du HRM.....	50
Tableau 5 : Répartition des échantillons de TDR positifs dans les deux localités du Niger	57
Tableau 6 : Taux de positivité de TDR par la PCR.....	57
Tableau 7 : répartition des échantillons positif par la goutte épaisse	58
Tableau 8 : Taux de positivité de la goutte épaisse par la PCR	58
Tableau 9 : Echantillonnage.....	59
Tableau 10 : Répartition des patients selon le site d'étude.....	60
Tableau 11 : Répartition des patients par tranche d'âge.....	61
Tableau 12 : Répartition des allotypes par pays.....	64
Tableau 13 : Répartition de la multiplicité de l'infection par pays	64
Tableau 14 : Répartition des échantillons selon les allèles à la position 51 du gène <i>Pfdhfr</i>	66
Tableau 15 : Répartition des échantillons selon les allèles à la position 59 du gène <i>Pfdhfr</i>	67
Tableau 16 : Répartition des échantillons selon les allèles à la position 436 du gène <i>Pfdhps</i> ..	68
Tableau 17 : Répartition des échantillons selon les allèles à la position 437 du gène <i>Pfdhps</i> ..	69
Tableau 18 : Corrélation entre l'âge et les mutations sur les gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i>	69
Tableau 19 : circulation des doubles mutations sur le gène <i>dhfr</i> et <i>dhps</i> au Mali et au Niger .	70
Tableau 20 : circulation des triples mutations les deux gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i> au Mali et Niger	70
Tableau 21 : Circulation des quadruples mutations sur les gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i> au Mali et au Niger	71

Liste des figures :

Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde OMS 2016	7
Figure 2 : Répartition des quintuples mutations des gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i> dans le monde ...	10
Figure 3 : Répartition des quintuples mutations des gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i> au Niger et au Mali	11
Figure 4: Femelle Anophèle se gorgeant de sang(26).	12
Figure 5 : carte de la mise en œuvre de la CPS(31)	21
Figure 6 : Mécanisme d'action des antipaludiques	24
Figure 7 : Structure chimique de la sulfadoxine	25
Figure 8 : structure chimique de la pyriméthamine.....	26
Figure 9 : Séquences des acides aminés K1(38)	30
Figure 10 : Séquences des acides aminés de MAD20(38).....	30
Figure 11 :Séquences des acides aminés RO33(38).....	31
Figure 12:Mécanismes de résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine pyriméthamine(42)	32
Figure 13 : Mutations sur le gène <i>Pfdhfr</i> associées à la résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> à la pyriméthamine (42).....	33
Figure 14 : Les mutations sur les gènes <i>dhps</i> associées à la résistance de <i>P.falciparum</i> à la sulfadoxine(42).....	33
Figure 15 : Carte de la république du Mali	35
Figure 16 : Carte de la république du Niger	36
Figure 17 : Casette d'un TDR découpée	42
Figure 18 : Principe du HRM.....	52
Figure 19 : Principe de tracée des courbes de fusion	52
Figure 20 : Courbe de fusion d'un ADN normal et d'un ADN muté.....	53
Figure 21 : Dispositif du HRM au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de l'USTTB	53
Figure 22 : La température de fusion en fonction de la fluorescence au HRM	54
Figure 23 : Les courbes de fusion normalisées au HRM.....	54
Figure 24 : Pics de fusion au HRM	55
Figure 25 : Schéma à suivre pour la détection des mutations par HRM	55
Figure 26 : Répartition des échantillons par pays	59
Figure 27 : Répartition des patients selon le genre	60

Figure 28 : image labélisée des bandes des allotypes à la <i>msp1</i> au Mali	62
Figure 29 : image labélisée des bandes des allotypes à la <i>msp1</i> au Niger	62
Figure 30 : Fréquence des allotypes de la <i>msp1</i> par pays	63
Figure 31 : Pics de fusion de nos différentes souches du Mali après amplification du gène <i>Pfdhfr</i> (51 et 59)	65
Figure 32 : Pics de fusion de nos différentes souches du Niger après amplification du gène <i>Pfdhfr</i> (51,59)	66
Figure 33 : Pics de fusion de nos différentes souches du Mali après amplification du gène <i>dhps</i> (436,437)	67
Figure 34 : Pics de fusion de différentes souches du Niger après amplification du gène <i>dhps</i> (436,437)	68

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AL	Artémether-Luméfantrine
AMD	Amodiaquine
An. arabiensis	<i>Anophèlesarabiensis</i>
An. gambiae	<i>Anophèlesgambiae</i>
ARS	Artesunate
ART	Artémisinine
CPS	Chimiothérapie du Paludisme Saisonnier
CQ	Chloroquine
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
CERMES	Centre des recherches médical et sanitaire
ELISA	Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)
FIT	Front intertropical
FDC	Fixed dose combination
HRM	Hight Resolution Melting
HRP2	Histidin Rich Protein 2 (Proteine Riche en Histidine 2)
IFI	ImmunoFluorescence Indirecte
IP	Indice Plasmodique
LBMA	Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
LUM	Luméfantrine
MFQ	Méfloquine
MOI	Multiplicité de l'infection
MSP-1	Merozoite Surface Protein-1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	Odds ratio
OCCGE	Organisation de coordination et de coopération pour la lutte contre les grandes endémies
PABA	Acide para aminobenzoïque
Pan-LDH	Malaria pan Lactate Déshydrogénase
PBS	Phosphate Buffer Saline

PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
<i>P.f</i>	<i>Plasmodiumfalciparum</i>
<i>Pfprt</i>	<i>Plasmodiumfalciparum</i> Chloroquine transporter
<i>Pfdhfr</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolatereductase
<i>Pfdhps</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydropteroate synthase
<i>Pfmdr1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> multi-drugresistance
PID	Pulvérisation intra-domiciliaire
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
PYR	Pyriméthamine
QBC	Quantitative Buffy-Coat
QN	Quinine
SP	SulfadoxinePyriméthamine
TBE	Tris Borate EDTA
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TPI	Traitement Préventif Intermittent
TPIe	Traitement Préventif Intermittent de l'enfant
TPIg	Traitement Préventif Intermittent pendant la grossesse
TPIIn	Traitement Préventif Intermittent du nourrisson
THF	Tétrahydrofolique
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des matières :

1. INTRODUCTION.....	3
2. OBJECTIFS.....	5
2.1. Objectif général.....	5
2.2. Objectifs spécifiques.....	5
3. GENERALITES.....	4
3.1. Paludisme.....	4
3.1.1. Définition.....	4
3.1.2. Historique.....	5
3.1.3. Répartition géographique.....	6
3.1.4. Les marqueurs moléculaires de résistance.....	9
3.1.5. Vecteurs du paludisme.....	11
3.1.6. Agents pathogènes [28].....	14
3.1.7. Cycle parasitaire [30].....	15
3.1.8. Diagnostic Biologique.....	17
3.1.9. Manifestations du paludisme.....	19
3.1.10. Campagne de chimioprévention du Paludisme Saisonnier : CPS.....	20
3.1.11. Classification des antipaludiques [36] :.....	24
3.1.12. Modes d'action des antipaludiques [37]:.....	28
3.1.13. Génétique des populations de <i>P. falciparum</i> à travers le gène <i>mssl</i>	30
3.1.14. Résistance du Plasmodium aux antipaludiques.....	31
4. METHODOLOGIE.....	34
4.1. Choix du site d'étude :.....	34
4.2. Population d'étude :.....	36
4.3. Période d'étude.....	36
4.4. Type d'étude :.....	36
4.5. Echantillonnage :.....	37
4.5.1. Critères d'inclusion :.....	37
4.5.2. Critères de non inclusion dans l'étude :.....	37
4.6. Description et mode opérationnelle de TDR: Exemple SD-BIOLINE.....	37
4.6.1. Conservation.....	37
4.6.2. Matériel requis.....	37
4.6.3. Mode opératoire.....	38
4.7. Analyse moléculaire :.....	41
4.7.1. Echantillonnage de fragments pour les TDR :.....	41

4.7.2.	Extraction de l'ADN de <i>P. falciparum</i> au Chelex-100 à partir des TDR :.....	42
4.7.2.1.	Matériels :.....	42
4.7.2.2.	Mode opératoire :.....	42
4.7.3.	Extraction de l'ADN à partir des papiers confettis.....	43
4.7.3.1.	Protocole.....	43
4.7.3.2.	Procédure.....	44
4.8.	Amplification des séquences spécifiques de <i>P. falciparum</i> :.....	45
4.8.1.	Réaction de polymérase en chaîne (PCR) :.....	45
4.8.2.	Analyse des produits de la PCR nichée :.....	48
4.9.	Recherche des marqueurs de résistance.....	49
4.9.1.	Réactifs du HRM et matériels :.....	49
4.9.2.	PCR :.....	49
4.9.3.	High Resolution Melting HRM : Fusion à Haute Résolution :.....	51
4.10.	Saisies et analyses des données.....	56
4.11.	Aspect éthique.....	56
5.	RESULTATS.....	57
5.1.	Collecte des échantillons de sang au Niger.....	57
5.2.	Collecte des échantillons de sang au Mali.....	58
5.3.	Caractéristiques sociodémographiques :.....	59
5.4.	Résultat du génotypage par PCR nichée de la <i>msp1</i>	61
5.5.	Mutations des gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i>	65
5.5.1.	Gènes <i>Pfdhfr</i>	65
5.5.2.	Gène <i>Pfdhps</i>	67
5.6.	Circulation des multiples mutations.....	70
5.6.1.	Circulation des doubles mutations sur le gène <i>Pfdhps</i> et <i>Pfdhfr</i>	70
5.6.2.	Circulation des triples mutations sur le gène <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i>	70
5.6.3.	Circulation des quadruples mutations sur les gènes <i>Pfdhps</i> et <i>Pfdhfr</i>	71
6.	COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	73
6.1.	Méthodes :.....	73
6.1.1.	Prélèvement des échantillons :.....	73
6.1.2.	Extraction de l'ADN de <i>Plasmodium falciparum</i>	73
6.1.3.	Utilisation du HRM pour la détection des mutations sur le matériel génétique de <i>Plasmodium falciparum</i>	74
6.1.4.	Typage allélique de <i>Plasmodiumfalciparummsp1</i>	75
6.2.	Résultats.....	75
7.	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	79

7.1. CONCLUSION	79
7.2. RECOMMANDATIONS.....	79
8. References	81

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Le paludisme est causé par des parasites du genre *Plasmodium* qui sont transmis aux humains par les piqûres de moustiques vecteurs infectés appartenant à l'espèce *Anophèles*. Parmi les 5 espèces de parasites causant le paludisme chez l'être humain, *Plasmodium falciparum* est le plus dangereux[1].

Selon le rapport 2018 de l'OMS sur le paludisme, le nombre de cas estimé dans le monde en 2017 était de 219 millions. Les données concernant la période 2015-2017 ne révèlent aucun progrès significatif vers une diminution du nombre de cas de paludisme dans le monde. Le onzième Rapport mondial sur le paludisme de l'OMS confirme le fait que les deux objectifs essentiels de la Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030 qu'est de réduire les cas et les décès dus au paludisme d'au moins 40 % d'ici à 2020, ne seront pas atteints [2].

Au niveau mondial, l'incidence du paludisme a reculé entre 2010 et 2017, passant de 72 cas pour 1000 habitants exposés au risque de paludisme à 59 pour 1000. Même si ces chiffres représentent une baisse de 18 % sur la période, le nombre de cas pour 1000 habitants exposés au risque de paludisme a stagné ces trois dernières années[2]. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituent le groupe le plus vulnérable pour cette maladie. Selon les estimations, en 2017, 266000 enfants sont morts du paludisme avant leur cinquième anniversaire, ce qui représente 61% des décès dus au paludisme dans le monde [1].

Le continent africain paie un lourd tribut au paludisme. En effet, près de 80 % des décès dus au paludisme dans le monde en 2017 ont été concentrés dans 17 pays de la région Afrique de l'OMS et en Inde[2]. *P. falciparum* est le parasite du paludisme le plus prévalent dans la région Afrique de l'OMS; il est à l'origine de 99,7 % des cas de paludisme estimés en 2017, tout comme dans les régions Asie du Sud-Est (62,8 %), Méditerranée orientale (69 %) et Pacifique occidental (71,9 %) [2].

Au Mali le paludisme est la première cause de consultation et d'hospitalisation et de mortalité dans les formations sanitaires selon l'enquête sur les indicateurs du paludisme au Mali en 2015[3]. Les enfants de moins de 5ans et les femmes enceintes paient chaque année le plus lourd tribut à cette maladie[3]. Le nombre de cas confirmés de paludisme en 2018 s'élève à plus de deux million sept cent mille (2.700.000) personnes dont 1778 décès. Selon les données de l'Enquête Démographique et de Santé du ministère de la santé, le taux de prévalence du paludisme est de 19% au Mali [4].

Au Niger, le paludisme est toujours au premier rang des motifs de consultation, d'hospitalisation, de décès et d'absentéisme tant scolaire que professionnel[5].

Le rapport mondial 2018 sur le paludisme classe le Niger parmi les 11 Pays qui enregistrent à eux seuls 70% des cas et décès dus au paludisme au niveau Mondial. Le paludisme demeure par conséquent un problème de santé publique dans le pays. Selon la revue annuelle 2018 du Ministère de la Santé Publique du Niger, 2825329 cas confirmés et 4106 décès dus au paludisme ont été enregistrés dans les formations sanitaires du Pays. L'incidence de la maladie est passée de 115 cas pour 1 000 en 2017 à 128 cas pour 1 000 en 2018. Le taux de létalité qui était de 1,94% en 2017 est passé à 1,89% en 2018 [6].

En termes de traitement du paludisme, l'OMS recommande actuellement les CTAs pour la prise en charge des cas de paludisme simple [7]. Parmi les moyens de prévention médicamenteux du paludisme, depuis Mars 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié une recommandation de politique de santé en faveur d'une nouvelle intervention contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* dénommée la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS)[7]. Cette recommandation est destinée au pays à forte transmission saisonnière du paludisme dont les pays de toute la sous-région du Sahel parmi lesquels le Mali et le Niger. La CPS cible les femmes enceintes et les enfants de moins de cinq ans.

Cette approche utilise des molécules anciennes telles que l'Amodiaquine, la Sulfadoxine, la Pyriméthamine qui sont sur les marchés depuis plusieurs années. Considérant que, l'impact de leurs utilisation à grande échelle dans le cadre de la CPS pourrait conduire à la sélection des parasites résistants, nous avons mené une étude comparative entre le Mali et le Niger afin d'identifier les mutations associées aux gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* à partir des papiers confettis collectés et des cassettes de TDR respectivement au Mali et au Niger.

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif général

- ✓ Examiner le polymorphisme génétique de *Pfmsp1*, *Pfdhfr*, et de *Pfdhps* à partir des papiers confettis au Mali et des cassettes du test de diagnostic rapide du paludisme au Niger

2.2. Objectifsspécifiques

- ✓ Examiner la diversité génétique de la population de *plasmodiumfalciparum* au Mali et au Niger par la technique de PCR avec le marqueur de *msh1* ;
- ✓ Estimer la prévalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* au Mali et au Niger par la technique du HRM ;
- ✓ Comparer les prévalences des mutations *Pfdhfr* et *Pfdhps* au Mali et au Niger et la multiplicité de l'infection.

GENERALITES

3. GENERALITES

3.1. Paludisme

3.1.1. Définition

Le paludisme connu aussi sous le nom de malaria (un mot italien qui veut dire mauvais air) est une érythrocytopathie provoquée par le développement dans les hématies d'un parasite hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la piqure infectante d'un moustique (l'anophèle femelle).

La chimioprévention du paludisme saisonnier consiste en une administration intermittente de protocoles thérapeutiques complets d'antipaludiques aux enfants pendant la saison du paludisme dans des zones où la transmission a un caractère fortement saisonnier [8].

L'objectif est de prévenir l'infection palustre en conservant des taux sanguins thérapeutiques pendant la période où le risque de transmission est plus élevé. L'OMS recommande le recours à la CPS à l'aide de la sulfadoxinepyriméthamine et de l'amodiaquine dans les zones où la transmission du paludisme est fortement saisonnière comme la sous-région du sahel de l'Afrique sub-saharienne, où *Plasmodiumfalciparum* est sensible aux deux antipaludiques [8].

La CPS est aussi d'un rapport coût-efficacité et sans danger et peut être administrée par des agents de santé communautaires. Dans les zones où la celle-ci est mise en œuvre, les traitements préventifs intermittents des nourrissons (TPIIn) ne doivent pas être déployés [8].

L'OMS a publié ses recommandations sur la chimioprévention du paludisme saisonnier mars 2012. Avant cette date, la CPS était citée dans la littérature de recherche tant que traitement préventif intermittent des enfants (TPIe). En décembre 2012, l'OMS a publié un guide de mise en œuvre pour assister le pays dans l'adoption et la mise en œuvre de cette nouvelle intervention [8].

Chez *P. falciparum*, la résistance à la Sulfadoxine–Pyriméthamine est essentiellement acquise à la suite de mutations ponctuelles successives au niveau de *dhfr* parasite, c'est à dire du gène codant pour la dihydrofolate réductase (*dhfr*), qui constitue l'enzyme cible, ainsi que par d'autres mutations du *dhps*, gène qui code pour une autre enzyme la dihydroptéroate synthase (*dhps*) [9].

Des mutations sur ces gènes ont été largement identifiées dans certains pays d'Afrique tels que : le Burkina Faso, le Niger, le Sénégal et la Tanzanie.

3.1.2. Historique

Le paludisme est une parasitose décrite par les plus vieilles civilisations: les Egyptiens, les Indiens, les Chinois et Hippocrate dans son traité de médecine. L'agent pathogène du paludisme (le Plasmodium) est découvert en 1880 par Laveran à Constantine. Ross en 1898 découvre la transmission vectorielle (l'anophèle femelle). De 1930-1945 ; la chloroquine, premier antipaludique de synthèse fut obtenu ouvrant la voie aux dérivés amino-4 quinoléines. En 1942 l'activité insecticide du DDT (Dichloro-Diéthyl-Trichloroéthane) est découverte. La décision d'éradiquer le paludisme est prise par l'OMS en 1955 lors de sa 8ème assemblée. En 1960 apparaissent les premières souches de *Plasmodiumfalciparum* résistantes aux amino-4-quinoléines en Colombie puis en Asie du sud-est. En 1968 : le programme d'éradication est transformé en un programme de lutte visant à contrôler les effets de la maladie et en 1983 sont effectuées les premières tentatives de vaccination[10].

En 1992 la firme Rhône-Poulenc aujourd'hui Aventisen accord avec l'OMS et l'usine pharmaceutique de Kunming produisirent de l'artémether injectable [11].

En 2001 : en Asie du Sud-est, la résistance du plasmodium à l'artémisinine est suspectée [12]. En 2006 : au Cambodge, la résistance du *Plasmodium* à l'Artémisinine a été identifiée pour la première fois[12].

Le paludisme a sans doute accompagné l'homme au cours de son expansion à la surface de la terre. Cependant la plupart des antipaludiques utilisés de nos jours l'ont été de façon empirique. Ainsi la date de naissance exacte de ces molécules est difficile à préciser. Les antifolates ne constituent pas une classe chimique homogène. Ils se caractérisent par un même mode d'action : inhibition de la synthèse de l'acide folique. La découverte de l'activité antibactérienne des sulfamides en 1936 par G. DOGMAGK et des sulfones par 2 équipes indépendantes en 1937, a été le point de départ des antifolates. En effet, en 1937 Diaz De Léon a été le 1er à signaler l'activité des sulfamides dans le traitement du paludisme, mais ils n'ont été reconnus en thérapeutique qu'en 1943 comme inhibiteur compétitif de l'acide para amino benzoïque (PABA)[13]. Certains dérivés, inhibiteurs non spécifiques de la dihydrofolate réductase (DHFR)(Aminoptérine, methotrexate) ont vu le jour mais ils n'ont été utilisés qu'exceptionnellement dans le traitement du paludisme. En 1951, FERONE démontre que les 2,4 diaminopyridine et le cycloguanil, ont le même site d'action sur l'inhibition de la dihydrofolate réductase (DHFR). Les sulfonamides agissent en amont de la chaîne de la synthèse de l'acide folique par inhibition de la dihydroptéroate-synthetase (DHPS).

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

La surveillance des marqueurs de résistances aux différents antipaludiques est d'actualité et occupe de nombreux laboratoires de recherche notamment avec les techniques de biologie moléculaire. Ce monitoring continu est une recommandation de l'OMS en particulier dans les zones d'endémie palustre [14].

3.1.3. Répartition géographique

3.1.3.1. Dans le monde

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. Il est au premier rang des priorités de l'OMS de par ses ravages directs et ses conséquences socio-économiques. Selon l'OMS près de la moitié de la population mondiale est exposée au paludisme.

Les premiers cas de résistance à la chloroquine ont été rapportés en plusieurs points du monde entre 1957 et 1960 (Colombie et Venezuela, Cambodge et Thaïlande, Papouasie NouvelleGuinée, Philippines)[15]. La résistance s'est progressivement propagée dans les zones endémiques.

La chloroquine est présentement retirée de la liste des médicaments pour la prise en charge du paludisme à *P.falciparum*. Elle a été remplacée progressivement par la Sulfadoxine et la Pyriméthamine qui ont été également remplacés par les dérivés de l'artémisinine pour la prise en charge du paludisme simple. Ainsi, de 2006 jusqu'à ce jour (2018) les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) constituent le traitement de première ligne du paludisme simple.

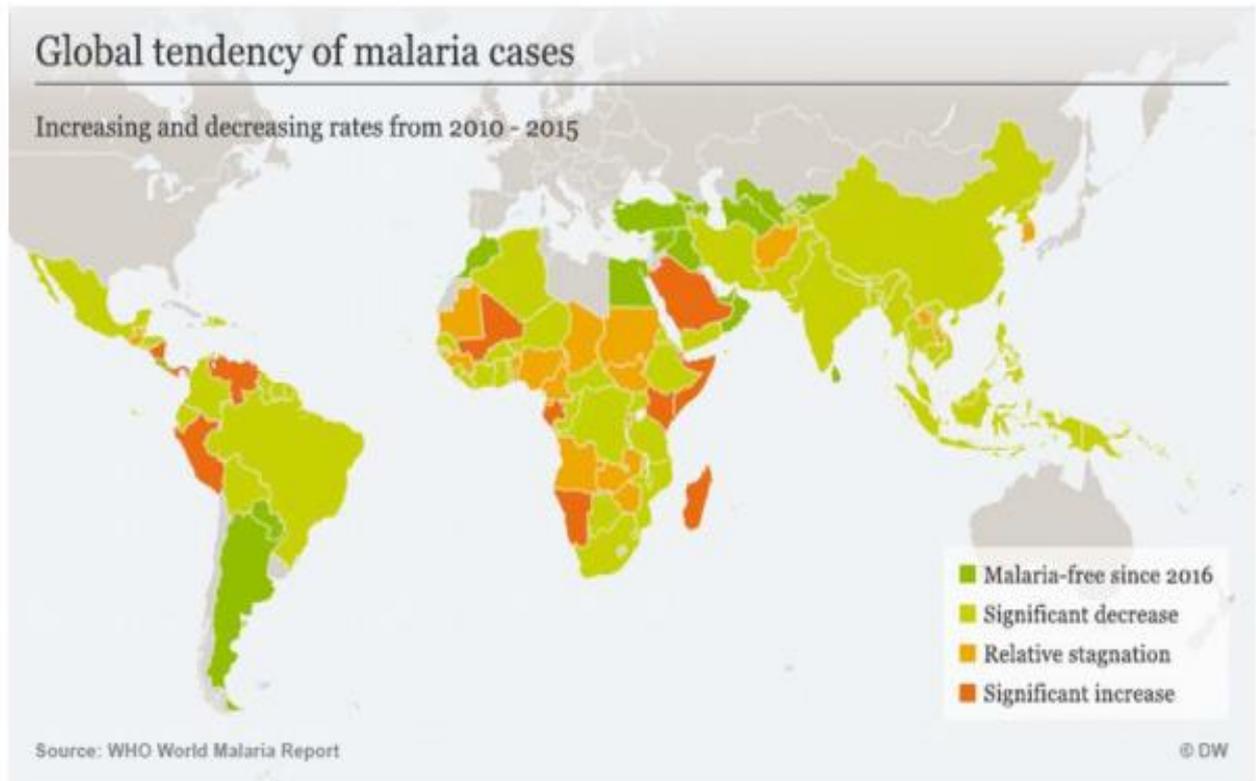


Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde OMS 2016

Source: https://www.google.com/search?q=carte+paludisme+2017&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=HY5AfInG4hc3IM%253A%252CLVn dXxADcioM%252C &usg=__uqLYO3vun FI1SrP

[YXJMwABAPeo%3D&sa=X&ved=0ahUKEwj80ayurcraAhUMPBQKHR39CMoQ9QEIKD AA#imgsrc=AnAQxPntQa2r9M](https://www.google.com/search?q=carte+paludisme+2017&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=HY5AfInG4hc3IM%253A%252CLVn dXxADcioM%252C &usg=__uqLYO3vun FI1SrP)

3.1.3.2. En Afrique

Le paludisme est largement répandu dans toute l'Afrique subsaharienne où coexistent *P. falciparum* (nettement prédominant), *P. ovale* et de manière plus sporadique *P. malariae*. Le *Plasmodium vivax* peut être retrouvé en Afrique de l'Est. Il existe une transmission, faible, en Afrique du Nord (Algérie), essentiellement due à *P. vivax*, ainsi qu'au Cap-Vert et à l'Ile Maurice. L'Ile de la Réunion est indemne. En revanche, la transmission est bien présente aux Comores, dont Mayotte, et à Madagascar où coexistent quatre espèces [16].

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne [17]. La résistance du *Plasmodium* à la monothérapie de la chloroquine et à la

sulfadoxine-pyriméthamine continue d'évoluer en Afrique de l'Est, du Sud et Centrale. Cette résistance est beaucoup plus faible en Afrique de l'Ouest.

Actuellement, aucun cas de résistance à l'Artémisinine et ses dérivés n'a été confirmé en Afrique[18]. Cependant, une réduction de la sensibilité à l'Artémisinine est présente dans certaines zones endémiques en Afrique [19]. Les résultats des différentes études menées montrent que les CTAs sont encore efficaces en Afrique[14]. La SP reste recommandée pour le traitement préventif intermittent du paludisme chez les femmesenceintes.

Elle est également recommandée pour la chimioprévention du paludisme saisonnier chez les enfants âgés de 3 à 59 mois dans la zone du Sahel[20]. Dans ce dernier cas, l'amodiaquine est associée à la SP. La SP+AQ sont efficaces à cet effet.

3.1.3.3. Au Mali[21]

Au Mali, le paludisme est endémique à transmission saisonnière, avec cinq faciès épidémiologiques

- Une zone soudano-guinéenne a transmission saisonnière longue de 4 à 6 mois. Le paludisme y est holoendémique avec un indice plasmodique (IP) d'environ 85% de Juin à Novembre. La pluviométrie varie de 1300 à 1500 mm d'eau par an. La prémunition est acquise autour de 5 ans;
- Une zone de transmission saisonnière courte de 3 à 4 mois correspondant à la zone nord soudanienne et au Sahel. Le paludisme y est hyper endémique avec un indice plasmodique (IP) variant entre 50 et 75%. La prémunition est atteinte autour de 9 ans. La pluviométrie varie de 700 à 1300 mm d'eau par an;
- Une zone de transmission sporadique voire épidémique correspondant au Sahara. L'indice plasmodique (IP) est inférieur à 5%, toute la population est exposée au risque de paludisme grave et compliqué;
- Des zones de transmission plurimodale comprenant le delta intérieur du fleuve Niger et les zones de barrage: Sélingué, Markala et Manantali. Le paludisme y est méso endémique. L'indice plasmodique (IP) est inférieur à 40%. La prévalence de l'anémie palustre est très élevée dans la tranche d'âges de moins de 9 ans;
- Les zones peu propices à l'impaludation: les milieux urbains (Bamako, Mopti). Le paludisme y est hypo endémique avec un IP < 10%.

3.1.3.4. Au Niger[22]

Les infections par *P. falciparum* prédominent largement au Niger, parfois associé à *P. malariae* ou *P. ovale*. Les prévalences parasitaires peuvent être très contrastées suivant les zones, ayant permis la distinction de trois strates épidémiologiques :

- Une zone hyper-endémique au sud, près de la frontière béninoise et le long du fleuve Niger, où la prévalence parasitaire est importante, pouvant dépasser 50% chez les enfants (1-9 ans) y compris pendant les saisons sèches, témoignant d'une transmission permanente ;
- Une zone méso-endémique dans les savanes soudano-sahéliennes centrales, où la parasitémie persiste pendant la saison sèche à des niveaux variables, mais où la recrudescence en saison des pluies est nette ;
- Une zone hypo-endémique dans la vaste région saharienne, où les parasitémies sont très faibles à nulles, avec une forte disparité spatiale, saisonnière et interannuelle. C'est également la zone à plus fort risque épidémique.

3.1.4. Les marqueurs moléculaires de résistance

Il s'agit d'un ensemble de marqueurs impliqués dans les mécanismes moléculaires de résistance. Pertinents et spécifiques pour prédire le niveau de résistance d'une population parasitaire aux antipaludiques, ils ont une place de choix dans la surveillance de l'activité de tel ou tel antipaludique.

La recommandation d'un seuil de prévalence de la mutation 540 du gène *Pfdhps* égal ou supérieur à 50% au-delà duquel l'utilisation du TPI n'est pas recommandée se fonde sur les éléments suivants :

- La présence de mutations sur les codons 437 et 540 du gène *Pfdhps*, associée à une triple mutation du gène *Pfdhfr* (quintuple mutation) est un facteur prédictif significatif d'échec du traitement à la SP[23].
- Le mutant *Pfdhps* 540 est un marqueur épidémiologique utile de la quintuple mutation en Afrique[24].
- Un essai mené dans une zone de prévalence de la mutation 540 du gène *Pfdhps* d'environ 90% n'a pas mis en évidence d'effet protecteur démontrable du TPI-SP [9].

Des mutations dans les gènes de *Plasmodiumfalciparum* *Pfdhfr* et *Pfdhps* ont rendu la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) inefficace pour le traitement du paludisme dans la plupart

des régions du monde. Pourtant, la SP est efficace en tant que traitement préventif intermittent chez les femmes enceintes (IPTp) et chez les nourrissons (IPTi) et en tant que moyen de contrôle du paludisme saisonnier chez les enfants (SMC). Le SP-IPTp est largement mis en œuvre en Afrique subsaharienne. La SP-IPTi est recommandée lorsque la prévalence des parasites du paludisme résistants à la SP est faible, tandis que la CPS est recommandée dans les zones de transmission saisonnière intense du paludisme. Le succès continu de ces interventions dépend en grande partie de la prévalence des mutations de résistance à *Pfdhfr* et *Pfdhps* dans la population cible.

Dans la plupart des pays d'Afrique de l'Ouest, l'allèle *pf dhps* avec le seul mutant, 437G, est commun, mais les parasites avec le triple mutant *pf dhfr* et les substitutions clés 437G / 540E sont encore rares (voir WWARN SP Surveyor). Dans la plus grande partie de l'Afrique de l'Ouest, il s'agit probablement de la propagation de parasites qui portent l'allèle importé de *Pfdhfr* de l'Asie du Sud-Est, provenant de sources Est-africaines[25].



Figure 2 : Répartition des quintuples mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* dans le monde

Source : <http://www.wwarn.org/dhfr-dhps-surveyor/#0>

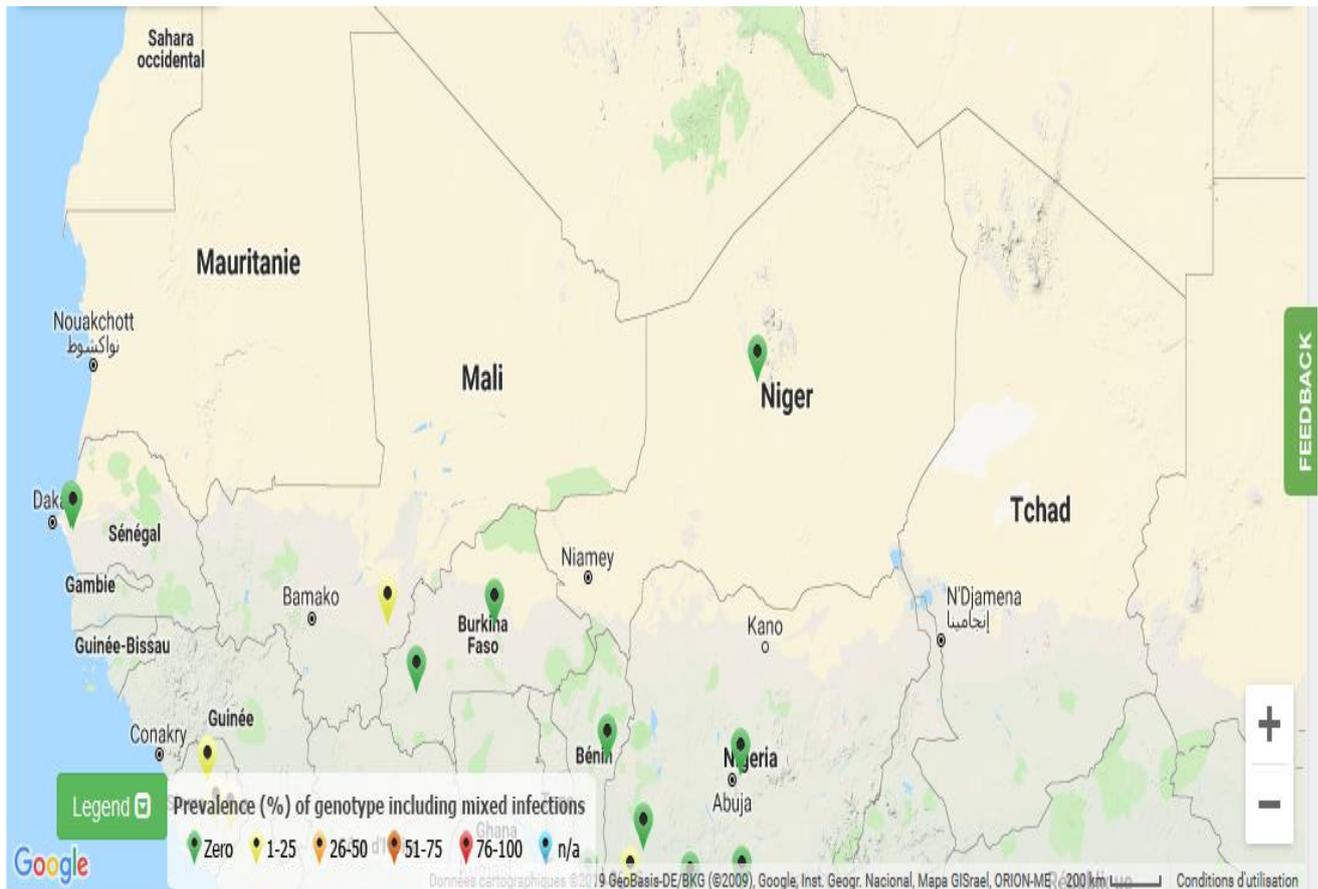


Figure 3 : Répartition des quintuples mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* au Niger et au Mali

Source : <http://www.wwarn.org/dhfr-dhps-surveyor/#0>

3.1.5. Vecteurs du paludisme

Les moustiques sont les vecteurs exclusifs du paludisme. Il existe 3500 espèces de moustiques actuellement recensées dans le monde. Seule une soixantaine d'espèces, appartenant toutes au genre *Anophèles* sont capables de transmettre les plasmodies (ou parasites) responsables de paludisme humain. Et parmi celles-ci, moins d'une dizaine seulement sont responsables de plus de 99% de la transmission au niveau mondial. Les anophèles ne sont pas des insectes invasifs, et chaque continent héberge sa propre biodiversité d'*Anophèles*. En Afrique, les espèces du complexe *Anophèles gambiae* et *Anophèles funestus* sont les vecteurs majeurs. Seules les femelles transmettent le paludisme. Ces deux espèces d'anophèles sont anthropophiles ; elles piquent préférentiellement l'homme plutôt que l'animal. Ces moustiques piquent la nuit et suivent l'homme jusqu'à l'intérieur des habitations. A l'origine essentiellement rurales, certaines de ces espèces de moustiques colonisent aujourd'hui les

périphéries des grandes métropoles africaines, s'implantant jusqu'au cœur des villes, dans des environnements pollués d'où elles étaient traditionnellement absentes. Il est donc maintenant observé des anophèles urbains, diurnes et piquants à l'extérieur.

Ces anophèles, développent des résistances contre la plupart des insecticides utilisés.



Figure 4: Femelle Anophèle se gorgeant de sang[26].

Au Mali : les principaux vecteurs du paludisme au Mali sont les complexes *Anophèlesgambiae*(*An. gambiaes.l.*) et *Anophèlesfunestus*(*An. funestuss.l.*). Le complexe *An.gambiae*est composé d'*An.arabiensis*et d'*An.gambiae sensu stricto*. Ce dernier est composé de trois formes chromosomiques (Bamako, Mopti et Savane) regroupées en deux formes moléculaires (formes M & S). Le complexe *An.funestus*n'a pas fait l'objet d'étude approfondie. Il y a des variations spatiales et temporelles dans la distribution des vecteurs du paludisme. Du point de vue variations saisonnières, les fréquences d'*arabiensis*et la forme Mopti prédominent avant et après la saison des pluies tandis que celles des formes Bamako et Savane prédominent pendant la saison des pluies.

Compte tenu de ces variations le Programme National de Lutte contre le Paludisme a sélectionné en 2007, treize sites sentinelles en fonction du profil de transmission pour la surveillance épidémiologique. Il ressort également des études que les densités d'*An.gambiaes.l.*sont généralement faibles en saison sèche dans les localités éloignées des cours d'eau. Par contre, ces densités restent relativement élevées le long des cours d'eau

permettant de maintenir la transmission pendant la même période. Toutes ces espèces sont d'excellents vecteurs de la transmission du paludisme au Mali et réalisent une transmission « dite en relais » dans les zones de sympatrie où ces espèces cohabitent[27].

Au Niger : les premières études entomologiques menées notamment par l'Organisation de Coopération et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies (OCCGE) dans les années 1960 ont été complétées ponctuellement. Les prospections entomologiques menées durant les années 1990 ont identifiées 19 espèces d'anophèles sur le territoire nigérien. Les vecteurs majeurs sont *An.gambiaes.l.* retrouvé dans la majeure partie des savanes soudaniennes et sahéliennes, et *An.funestus* dans la région du fleuve ainsi qu'à proximité de Zinder. Cependant, *An.funestusa* disparu de la zone sahélienne du Niger suite à des sécheresses prononcées survenues en 1972, 1983 et 1991-92, et n'était toujours pas retrouvé en 1995 malgré des pluies abondantes. Il faudra attendre 2003 pour noter à nouveau la présence d'*An.funestus* dans le sahel Nigérien. *An.gambiaes.s.* et *An.arabiensis* sont les deux seules espèces du complexe gambiae rencontrées au Niger. Des études cytogénétiques ont montré la présence d'*An.gambiaes.s.* dans le sud, depuis la zone du fleuve Niger à l'ouest, jusqu'au centre-est du pays. *An.arabiensis* a été retrouvé en sympatrie avec *An.gambiaes.s.* dans le sud, en différentes proportions selon les zones et saisons, mais est la seule espèce présente dans les régions les plus arides au nord du pays. La présence d'*An.gambiaes.l.* est conditionnée par la présence de collections d'eau pluviale nécessaire à la ponte et au développement larvaire. Suivant les années et le régime de pluie, la limite nord de l'aire d'extension d'*An.Arabiensis* est donc très fluctuante.

Dans la plus grande partie du pays, excepté au sud, la plupart des eaux de surface disparaissent en saison sèche et *An.Gambiaes.l.* est très peu abondant pendant une partie plus ou moins longue de l'année. La stratégie de survie de l'espèce durant la saison sèche n'est pas connue. Une estivation, avec dissociation gonotrophique a été décrite au Soudan durant la saison sèche, mais ce phénomène n'a jamais été confirmé.

D'autre part, plusieurs études ont observé *An.gambiaes.l.* au niveau de points d'eau permanents en zone sahélienne, notamment des puits, à partir desquels il semble se disperser durant la saison des pluies. Le vent de mousson, qui accompagne la montée du front intertropical (FIT) joue probablement un rôle dans cette dispersion. Cette hypothèse pourrait expliquer qu'*An.gambiae* ait été retrouvé dans plusieurs endroits de la zone saharienne, notamment dans le massif de l'Aïr, dans des oasis au Tchad et peut-être à Bilma au Niger où

s'est produite une épidémie de paludisme en 1991. Ces situations méritent d'être mentionnées, mais elles sont tout de même relativement rares, et *An.gambiae* ne peut pas s'implanter durablement dans ces environnements, même s'il a pu y accomplir quelques cycles.

D'autres espèces, vecteurs locaux ou accidentels, ont été identifiées, dont *An.nilidans* la région traversée par le fleuve Niger, à Ayorou et Niamey, *An.pharoensis* dans l'ouest et le centre et *An.ziemanni* à l'est, dans la région de Zinder. De plus, *An.hervyi*, espèce uniquement retrouvée dans la zone de Guidimouni, près de Zinder, a été récemment décrite après avoir été confondue avec *An.salbaii*, espèce exploitant des gîtes d'eau salée. Les déterminants environnementaux de cette aire de répartition limitée sont inconnus, d'autant plus que le stade larvaire de l'espèce n'est pas encore décrit. D'autre part, des espèces paléarctiques peu ou pas vectrices telles qu'*An.multicoloret An.hispaniola*, principalement présentes dans les pays d'Afrique du Nord, ont été sporadiquement capturées dans le nord du Niger [22].

3.1.6. Agents pathogènes [28]

Les *Plasmodiums* sont des protozoaires appartenant à l'embranchement des Api complexa. Cet embranchement est caractérisé par la présence d'un complexe apical généralement constitué d'un conoïde, qui aide à la pénétration dans la cellule hôte, d'un anneau polaire et de rhoptries, qui probablement sécrètent une enzyme protéolytique ainsi que des microtubules sous membranaires, qui assurent la mobilité de la cellule.

Sa taxonomie est la suivante :

- Embranchement : APICOMPLEXA,
- Classe : SPOROZOEIA,
- Sous-classe : COCCIDIA,
- Ordre : EUCCOCIDIA,
- Sous-ordre : HAEMOSPORINA,
- Famille : PLASMODIDAE,
- Genre : Plasmodium

Les espèces plasmodiales [29]

Plasmodium falciparum

- la plus fréquente (90% des accès), la plus largement répandue
- Chimiorésistance+++.
- Fièvre tierce maligne
- Incubation : 7 à 15 jours.

- La longévité : **3 à 6** mois.

Plasmodium vivax(P. v.)

- 2ème espèce
- Zones sub-tropicales et tempérées chaudes
- Rare en Afrique noire (Duffy -)
- Fièvre tierce bénigne.
- Incubation chez l'homme : 15 jours (9 mois ou plus).
- Longévité : 3 à 5 ans.
- Evolution par des rechutes (accès de reviviscence tardifs).

Plasmodium ovale (P. o)

- Longtemps confondue avec *P.vivax*.
- Remplace *P. vivax* en **Afrique tropicale et subtropicale**(Afrique de l'Ouest)
- Fièvre tierce bénigne.
- Incubation : 15 jours (jusqu'à 4 ans).
- Longévité : 3-5 ans.
- Les rechutes tardives sont possibles (5ans).

Plasmodium malariae(P. m)

- Plus rare
- Foyers localisés en zone tropicale, subtropicale (surtout en Afrique).
- Fièvre quarte
- Incubation plus longue, environ 3 semaines.
- Longévité : très grande (même 50 ans ou plus).
- Les reviviscences : très tardives.

Plasmodium knwolesi (P. k.)

- Espèce récente
- Sud-est asiatique (sur l'île de Bornéo).
- A fièvre quarte
- Evolution potentiellement grave : elle doit être traitée comme *P. falciparum*.
- Aspect microscopique proche de *P. malariae*.
- Cycle: 24 h.

3.1.7. Cycle parasitaire[30]

La contamination se fait par inoculation de sporozoïtes qui pénètrent dans le foie (30min) où ils se multiplient pendant 10-15 jours et forment des schizontes (30-40µm). Pour les espèces

Plasmodiumvivax et *Plasmodiumovale*, il y a formation d'hypnozoïtes qui restent quiescents et seront responsables des accès de reviviscence.

A maturité, les schizontes se lisent et libèrent des mérozoïtes qui passent dans le sang et infectent les hématies. La phase intra-hépatique représente **le cycle exo-érythrocytaire schizogonique.**

Dans l'hématie, le mérozoïte donne un trophozoïte qui mature et forme un schizonteendo-érythrocytaire. A maturation le schizonte se lyse, libère des trophozoïtes qui vont infecter d'autres hématies : c'est le **cycle endo-érythrocytaire schizogonique.**

Le cycle érythrocytaire dure 48H pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, et 72H chez *P.malariae*. C'est la lyse concomitante des hématies qui est responsable de l'accès fébrile.

Les trophozoïtes peuvent au sein de l'hématie donner des formes sexuées (gamétocytes) : **cycle érythrocytaire gamogonique**

Lors de son repas sanguin, l'anophèle ingère les formes sexuées qui libèrent des gamètes mâles et femelles qui se conjuguent, forment un ookinète qui se transforme dans la paroi de l'estomac en oocyste puis sporocyste. Le sporocyste éclate, libère des sporozoïtes qui migrent jusqu'aux glandes salivaires du moustique et qui seront injectés à un nouvel individu lors de la prochaine piqûre.

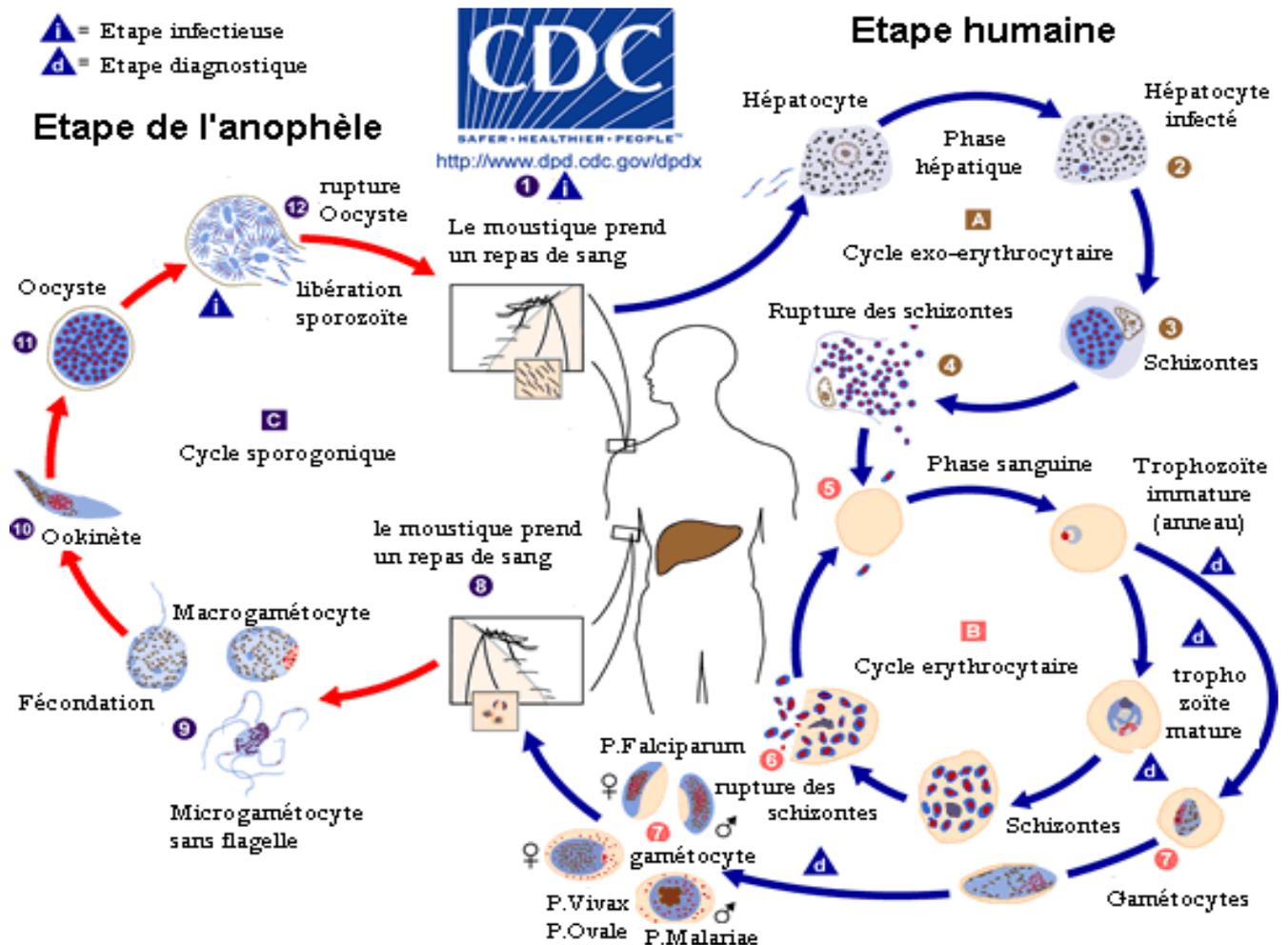


Figure 3:Cycle évolutif du Plasmodium

Source : http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/47/Malaria_LifeCYcle%28French_version%29.GIF

3.1.8. Diagnostic Biologique

3.1.8.1. Diagnostic de présomption

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

Le principe d'IFI consiste à mettre en contact, un antigène figuré de parasite sur goutte épaisse et/ou sur frottis sanguin, et un sérum animal ou humain. Si ce sérum contient des anticorps spécifiques contre cet antigène le complexe immun persistera après le lavage, et sera fluorescent en lumière ultra-violet grâce au fluorochrome associé aux anticorps.

Quant au principe d'ELISA, il consiste à fixer sur un support solide des éléments contenus dans le liquide biologique. Ensuite, les antigènes solubles sont détectés à l'aide d'un complexe immun marqué par l'enzyme, et sera révélé par addition d'un substrat spécifique de l'enzyme. Ces techniques apportent des informations précieuses qui permettent de confirmer le paludisme, lorsque la parasitémie a été réduite par exemple par un traitement anti palustre. Elles permettent également de suivre la guérison par la décroissance du taux des anticorps, et ont aussi un intérêt en zone d'endémie.

Le diagnostic immunologique ne peut remplacer le diagnostic parasitologique direct, du fait que les anticorps apparaissent avec un retard de plusieurs jours sur la parasitémie et disparaissent plus tard. Ne peuvent être utilisés pour un diagnostic de routine, mais surtout plus à des fins de recherches

3.1.8.2. Les tests de diagnostics rapides : TDR

Les tests diagnostiques rapides du paludisme, parfois appelés " bandelettes réactives " ou " systèmes de diagnostic rapide " détectent les antigènes spécifiques (protéines) présents dans le sang des personnes infectées, et produits par les parasites.

Plusieurs tests de diagnostic rapide (TDR) par immunochromatographie sont disponibles. Ils sont classés en fonction du nombre d'antigènes détectés. La plupart, à l'exception de la série OptiMalt, permettent la mise en évidence de l'HRP2 (*Histidin Rich Protein 2*), spécifique de *P. falciparum* ; certains permettent la mise en évidence de la PLDH (*Plasmodium lactate déshydrogénase*) : *P. f* pour *P. falciparum*, *P. v* pour *P. vivax*; Pan-LDH commune aux quatre espèces plasmodiales. La sensibilité et la spécificité revendiquées par les constructeurs de ces tests sont comparables.

La forme la plus simple est celle d'une bandelette qui est placée dans des puits contenant du sang et/ou une solution tampon. La bandelette de nitrocellulose peut être placée dans une cassette en plastique ou sur une carte. Les tests rapides antigéniques sont simples d'utilisation, rapides et d'un apport précieux en poste isolé. Cependant, les tests rapides ont des limites :

- Les faux négatifs sont dus à une faible parasitémie de l'ordre de 100 parasites par μL , soit 0,002% d'hématies infectées. Or, il est fréquent de mettre en évidence en pathologie d'importation ou chez le voyageur non immun en zone d'endémie sous chimioprophylaxie non ou mal adaptée des parasitémies très faibles. Le résultat des TDR peut donc être faussement négatif.
- Les faux positifs, moins bien connus, sont dus à une lecture trop tardive après le dépôt des réactifs, à la présence d'auto anticorps ou de facteur rhumatoïde à des taux élevés.

De plus, la persistance de la circulation de l'HRP2 après disparition des parasites du sang circulant est trouvée jusqu'à 15 jours après négativité des tests microscopiques.

Ces tests ne doivent pas être employés seuls.

3.1.8.3. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

C'est une technique de biologie moléculaire, basée sur la sélection puis l'amplification d'un gène spécifique du parasite à partir d'amorces spécifiques de ce gène. Elle a l'avantage de pouvoir détecter une souche spécifique du parasite par des gènes spécifiques ou après digestion du produit de PCR avec des enzymes de restriction spécifiques. Elle permet la détection des parasitémies très faibles.

Elle est utilisée pour le diagnostic du paludisme et en enquête de masse. Cependant, si son utilisation ne nécessite pas une ponction veineuse, elle n'est réalisable que dans des laboratoires spécialisés et son coût est très élevé

3.1.9. Manifestations du paludisme

Les formes classiques

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

- **Accès pernicieux :**

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

- **Fièvre bilieuse hémoglobinurique :**

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

- **Rechute :**

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

3.1.10. Campagne de chimioprévention du Paludisme Saisonnier : CPS

3.1.10.1. Définition (23)

« La chimioprévention du paludisme saisonnier est définie comme « l'administration intermittente d'un traitement complet par un médicament antipaludique pendant la saison de haute transmission du paludisme pour éviter la maladie, l'objectif étant de maintenir des concentrations thérapeutiques de médicament antipaludique dans le sang pendant la période où le risque de contracter le paludisme est plus élevé. »

3.1.10.2. Zones géographiques recommandées

La CPS est recommandée dans les zones de forte transmission saisonnière dans toute la sous-région du Sahel. Un cycle de traitement complet par de la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et de l'amodiaquine (AQ) doit être administré à des enfants âgés de 3 à 59 mois à intervalles d'un mois, à partir du début de la saison de transmission, jusqu'à un maximum de quatre cycles pendant la saison de haute transmission du paludisme (à condition que les deux médicaments conservent une efficacité antipaludique suffisante). Les régions cibles pour la mise en œuvre sont celles dans lesquelles la transmission du paludisme et la majorité (> 60 %) des cas cliniques surviennent sur une courte période d'environ quatre mois, où l'incidence du paludisme dépasse 0,1 cas par saison de transmission dans la classe d'âges cible et où SP + AQ restent efficaces (efficacité > 90 %) [20].

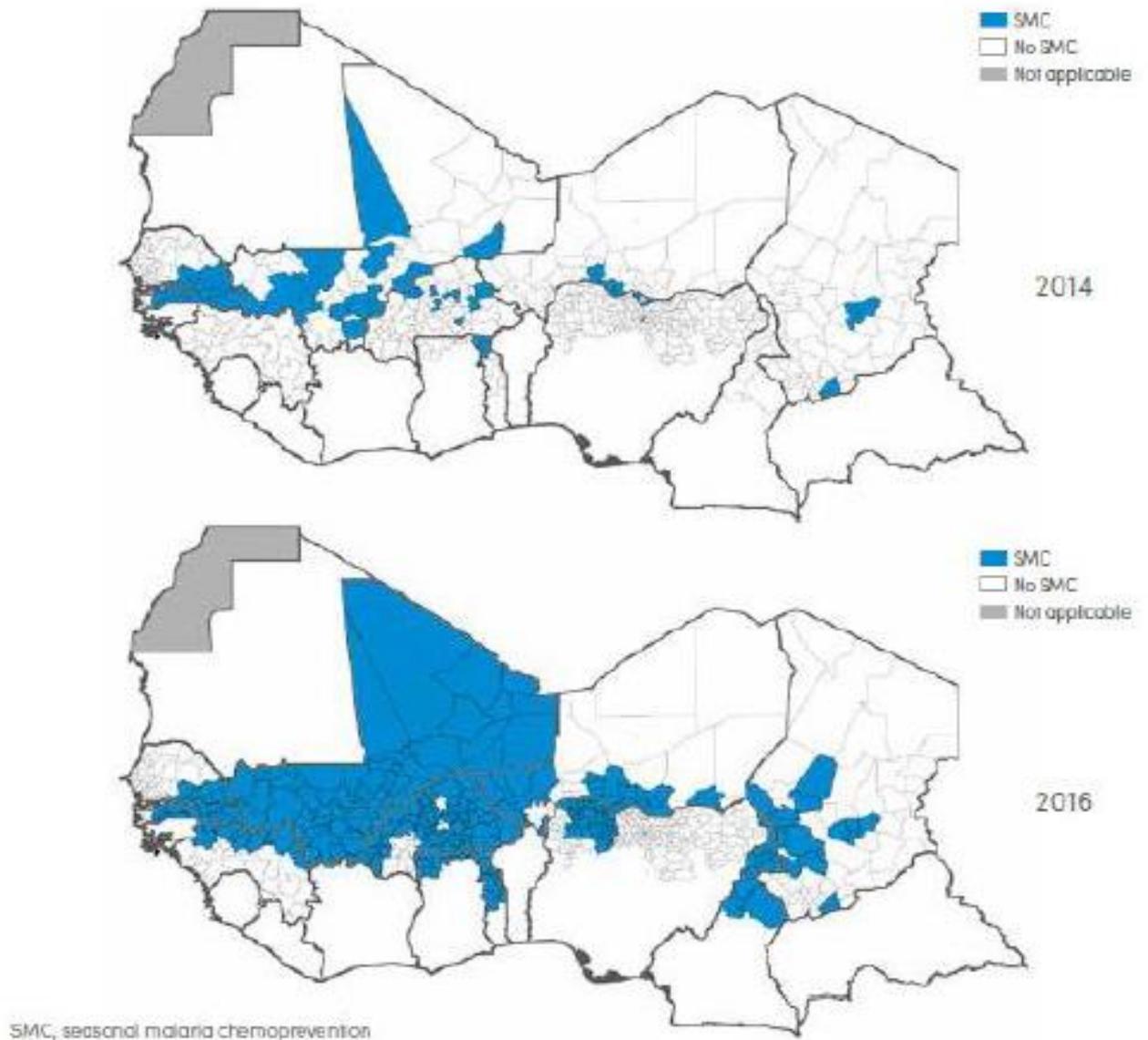


Figure 5 : carte de la mise en œuvre de la CPS [31]

3.1.10.3. Posologie et fréquence d'administration recommandées en fonction de l'âge (23)

- Nourrissons de 3-11 mois : un demi-comprimé de 153 mg d'AQ une fois par jour pendant trois jours et une dose unique d'un demi-comprimé de 500/25 mg de SP ; et
- Enfants de 12-59 mois : un comprimé entier de 153 mg d'AQ une fois par jour pendant trois jours et une dose unique d'un comprimé entier de 500/25 mg de SP. La dose unique de SP est administrée seulement le premier jour, avec la première dose d'AQ.

3.1.10.4. Contre-indications [20]

La CPS ne doit pas être administrée à :

- un enfant souffrant d'une maladie fébrile aiguë ou d'une maladie grave, incapable de prendre des médicaments par voie orale ;
- un enfant séropositif pour le VIH et recevant du cotrimoxazole en traitement préventif
- un enfant qui a reçu une dose de SP ou d'AQ au cours du mois précédent ;
- un enfant allergique à la SP ou à l'AQ ;
- Les cas de crise de paludisme (confirmé) survenant au cours de la période d'administration de la CPS ne doivent pas être traités par des schémas thérapeutiques faisant intervenir SP ou AQ.

Le Mali et le Niger ont adhéré à cette recommandation de l'OMS à travers le PNLN en 2013. Et depuis, la Chimioprévention du Paludisme Saisonnier (CPS) chez les enfants de 3 à 59 mois fait partie de la stratégie nationale et cadre avec la vision du Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique.

3.1.10.5. Chimioprévention

3.1.10.5.1. Traitement préventif intermittent chez les femmes enceintes

L'OMS recommande un calendrier d'au moins quatre consultations prénatales lors de la grossesse. Tous les efforts possibles doivent être déployés pour améliorer l'accès au TPIp-SP dans toutes les régions d'Afrique ayant un niveau d'endémicité de paludisme modéré à fort en commençant le plus tôt possible au cours du second trimestre. Le TPIp-SP est recommandé pour toutes les femmes enceintes lors de chaque consultation prénatale programmée jusqu'au moment de l'accouchement, à condition que les doses soient administrées à au moins un mois d'intervalle. La SP ne doit pas être administrée lors du premier trimestre de grossesse. Toutefois, la dernière dose de TPIp-SP peut être administrée jusqu'au moment de l'accouchement sans que cela représente un problème de sécurité. Le TPIp-SP doit, de préférence, être administré en observation directe sous forme de trois comprimés de sulfadoxine-pyriméthamine (chaque comprimé contenant 500 mg/25 mg de SP), pour un dosage requis total de 1 500 mg/75 mg de SP[32].

En effet le TPIp-SP prévient les conséquences indésirables du paludisme sur l'issue de la grossesse pour la mère et le fœtus, telles que les infections placentaires, le paludisme clinique, l'anémie maternelle, l'anémie fœtale, le faible poids la naissance et la mortalité néonatale [27].

Il a récemment été démontré que le TPIp-SP est très économique, que ce soit en ce qui concerne la prévention du paludisme maternel et la réduction de la mortalité néonatale dans les régions où le niveau d'endémicité du paludisme est modéré à élevé[33].

En dépit de la propagation à la résistance à la SP, le TPIp-SP continue à procurer des avantages considérables, ce qui se reflète par une protection contre la mortalité néonatale (efficacité protectrice de 18 %) et le faible poids à la naissance (réduction de 21 % des cas de faible poids à la naissance) dans des conditions de programme de routine [34].

3.1.10.5.2. Chimio prévention du paludisme saisonnier

Autrefois appelée « traitement préventif intermittent du paludisme chez les enfants », est définie comme« l'administration intermittente d'un traitement complet par un médicament antipaludique pendant la saison de haute transmission du paludisme pour éviter la maladie, l'objectif étant de maintenir des concentrations thérapeutiques de médicament antipaludique dans le sang pendant la période où le risque de contracter le paludisme est plus élevé ». La stratégie de la CPS consiste à administrer un maximum de quatre cycles de traitement de SP + AQ à intervalles d'un mois à des enfants âgés de 3 à 59 mois dans les régions de forte transmission saisonnière du paludisme [35].La CPS devrait être mise en œuvre pendant la période de forte transmission du paludisme, lorsque l'incidence de la maladie est importante. Elle devrait être administrée à des enfants âgés de 3 à 59 mois à intervalles de 1 mois (cycle de CPS) jusqu'à un maximum de quatre cycles par an (campagne de CPS). La CPS avec SP + AQ procure un degré élevé de protection jusqu'à quatre semaines, ensuite la protection diminue rapidement. Il est par conséquent important de respecter un intervalle d'un mois entre les cycles de CPS afin d'obtenir un niveau de protection élevé et de minimiser l'apparition de parasites du paludisme résistants à SP + AQ. La période d'administration de la CPS devrait être définie de manière à cibler la période durant laquelle le risque de contracter le paludisme est le plus élevé pour les enfants.

3.1.10.5.3. Pulvérisation intra domiciliaire

Elle consiste à pulvériser une dose efficace d'insecticide, en général une ou deux fois par an, sur les surfaces intérieures des murs où les vecteurs du paludisme sont susceptibles de se poser après leur repas sanguin. La PID est l'une des principales méthodes qui ont été utilisées pour lutter contre le paludisme sur une grande échelle. Elle a contribué à

éliminer le paludisme dans des vastes zones en Asie, en Russie, en Europe et en Amérique latine. Des programmes de PID ont également été réalisés avec succès dans certaines parties de l'Afrique. Cette stratégie réduit la transmission du paludisme en réduisant le temps de survie des moustiques qui pénètrent dans les habitations et plus particulièrement les chambres à coucher. Il s'agit d'une méthode de protection communautaire qui demande, pour produire tous ses effets, un taux de couverture élevé dans l'espace et dans le temps. On estime que 5% de la population à risque dans le monde est protégée par cette méthode.

3.1.11. Classification des antipaludiques[36] :

Selon leur mode d'action, ils peuvent être classés en deux grandes catégories. Les schizonticides électifs et les inhibiteurs des acides nucléiques.

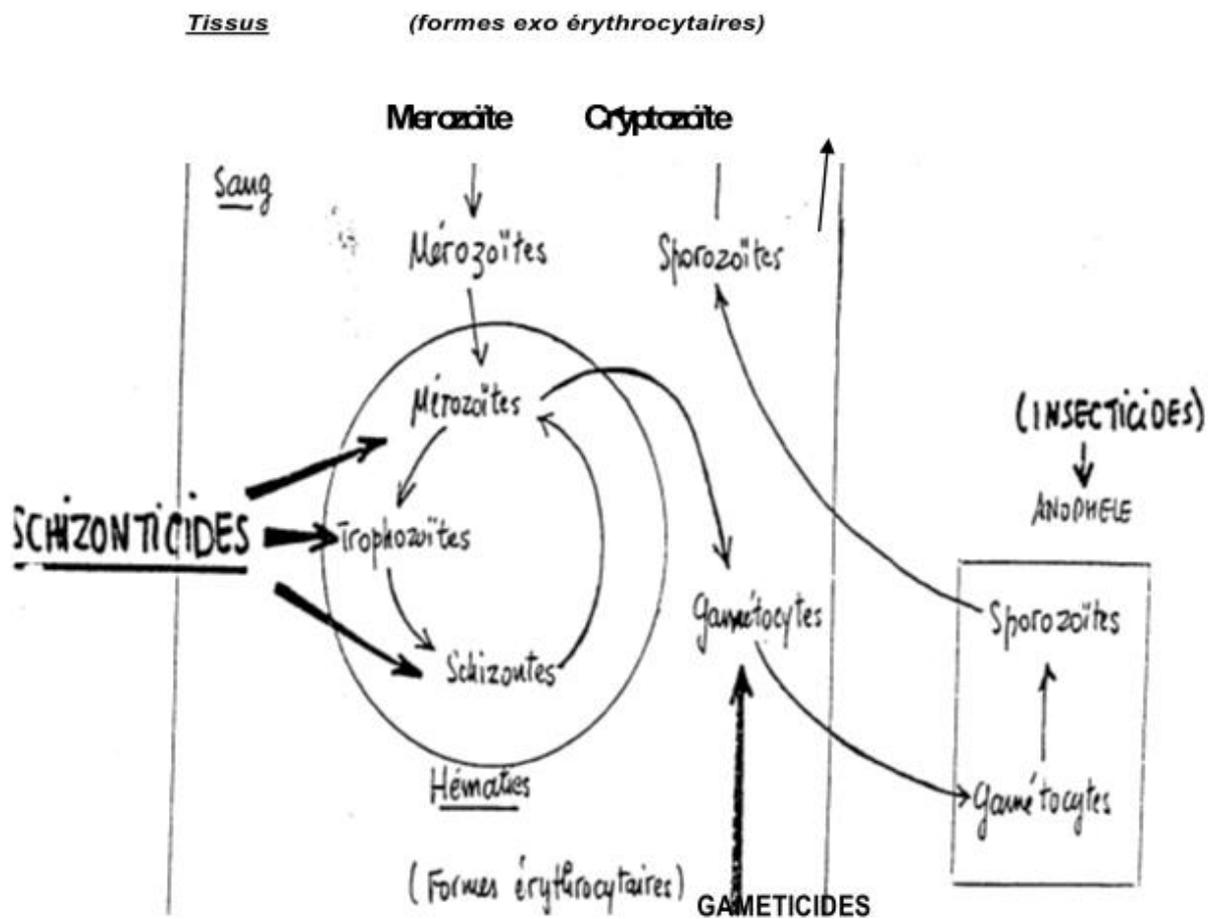


Figure 6 : Mécanisme d'action des antipaludiques

3.1.11.1. Les schizonticides :

Actives sur les endoérythrocytaires asexués, on peut les classer en 4 catégories selon leur origine.

3.1.11.1.1. Les schizontocides de synthèse

➤ Les sulfonamides : sulfadoxine :

– Structure

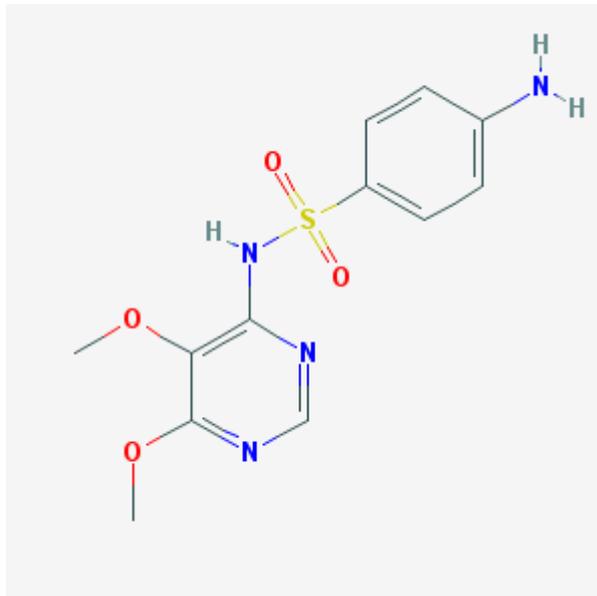


Figure 7 : Structure chimique de la sulfadoxine

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

– Élément de pharmacologie

Actuellement les sulfamides à longue demi-vie (sulfadoxine dans FANAZIL et sulfalène dans KELFINE) sont les plus utilisés, surtout associé à un antifolique. La sulfadoxine a une bonne absorption, une demi-vie d'élimination plasmatique de 7 à 8 jours. Les sulfamides retard sont presque totalement absorbés puis ils se fixent partiellement sur les protéines plasmatiques. Une prise orale de 1500mg, donne au bout de 3 heures un taux plasmatique de 15 à 20mg. Ce taux décroît lentement avec une demi-vie de 120 à 180 heures pour la sulfadoxine. Ce taux sérique est maintenu pendant une semaine, cependant on note des variations individuelles qui paraissent dépendre de l'acétylation rapide ou lente. L'élimination se fait après acétylation hépatique par les urines, en grande partie (80%) sous forme libre et le reste sous forme acétylée ou glucuroconjuguée. Son activité sur les schizontes érythrocytaires de

Plasmodiumfalciparum est bonne, quelques fois peu lente, mais nulle sur *Plasmodiumovale* et *Plasmodiumvivax*. La tolérance est bonne, cependant elle détermine des allergies cutanées limitées à un simple érythème dans la plupart des cas, mais parfois s'étendant aux toxidermies bulleuses graves (syndrome de Lyell ou de Stevens Jonson) engageant le pronostic vital. Les manifestations graves surviennent un cas pour 5000 traitements après prises répétées et on déplore 1 mort pour 20000 lors d'utilisation prophylactique.

Autres familles : les sulfones (Promine, Dapsone).

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

➤ Les diaminopyrimidiques : la Pyriméthamine

– Structure

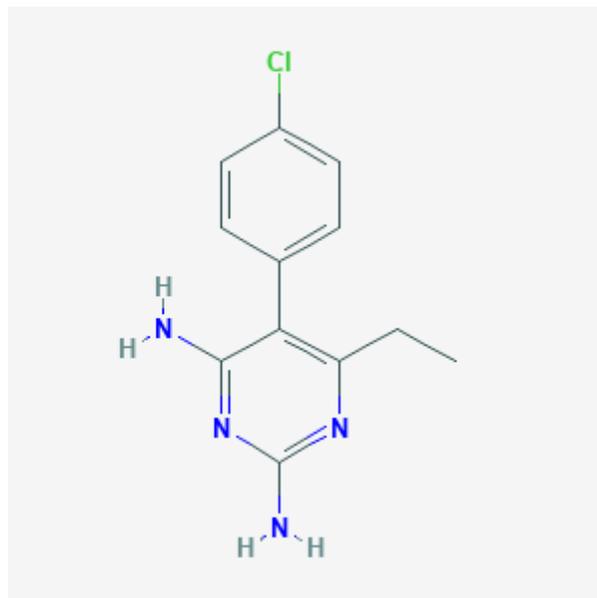


Figure 8 : structure chimique de la pyriméthamine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4993#section=2D-Structure>

– Eléments pharmacologiques :

La pyriméthamine est un schizontocide sanguin d'action lente et un sporotocide. Mais elle est sans action sur les formes intra-hepatiques. Cependant son activité schizonticide est plus marquée que celle du proguanil, parce qu'il agit directement et non par l'intermédiaire d'un métabolite. Elle est active également sur *Toxoplasma gondii* et *Pneumocystis carinii*. A la différence du triméthoprime elle n'a pas de propriétés antibactériennes. Une prise unique de 100mg donne un taux plasmatique d'environ 0,60ng/ml à la 24ème heure et des traces 30

jours après. Elle est bien absorbée avec un pic plasmatique obtenu 2 à 3 heures après l'administration une demi-vie longue de 4 à 5 jours. Son efficacité sur les schizontes érythrocytaires des plasmodies est lente mais bonne. Le taux plasmatique efficace sur les souches sensibles est de 10ug/ml. Cette concentration est présente dans le sérum pendant environ 15 jours. Elle a une cinétique voisine de celle des sulfamides retard, il apparaît donc licite de les associer. La pyriméthamine est généralement bien tolérée aux doses préconisées en prophylaxie en raison de 25 à 50mg par semaine chez l'adulte. Cependant lors de l'administration prolongée, chez les enfants malnutris, des anémies mégalo-blastiques peuvent être observées. Chez la femme enceinte le risque d'anémie est très important. L'élimination très prolongée se fait par voie urinaire et fécale sous forme métabolisée. La pyriméthamine passe dans le lait maternel et traverse la barrière placentaire. Les dérivés les plus intéressants sont la METOPRIME et TRIMETHOPRIME qui sont plutôt des antibactériens que des antimalariques.

Autres familles : les quinazolines : WR158122, les triazines : cycloguanil

- Amino 4-Quinoleine : chloroquine et Amodiaquine
- Arylamino alcools : Luméfantrine, Mefloquine et Halofantrine

3.1.11.1.2. Les schizontocideshémissynthétique :

- Artémether :
- Artésunate :
- Artémether :

3.1.11.1.3. Les schizontocides naturels

- Alcaloïdes du quinquina : Quinine
- Sesquiterpènes lactoniquesdeArtemisiaannua : Artémésinine

3.1.11.1.4. Les schizontocides Antibiotiques :

- Macrolides : Erythromycine, Spiramycine et la Clindamycine
- Cyclines : Doxycycline et la Tétracyclines

3.1.11.2. Les Gamétocytocides

Actifs sur les formes sexuées et hépatocytaires.

- Dérivés de l'Artémisinine: DHA, Artésunate, Artémether,
- Amino-8-quinoléines : Primaquine, Tafénoquine (en cours de développement)

3.1.11.3. Associations d'antipaludiques à effet synergique schizonticide

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

Certaines de ces associations sont déjà anciennes :

- Quinine + tétracyclines en zones de quininorésistance (forêts d'Asie du sud-est et Amazonie) ;
- Sulfadoxine + pyriméthamine (Fansidar®)
- Méfloquine + sulfadoxine + pyriméthamine (Fansimef®, utilisé en Asie du sud-est),
- Chloroquine + proguanil (Savarine®, utilisée en chimioprophylaxie seulement),

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

- soit en associations libres (2 sortes de comprimés) : artésunate + sulfadoxine/pyriméthamine (Arsudar®), artésunate + amodiaquine (Arsucam®), artésunate + méfloquine (Artequin®) ;
- soit en associations fixes (FDC : fixed dose combination) : atovaquone + proguanil (Malarone®), chlorproguanil + dapsonne (Lapdap®), artéméter + luméfantrine (Coartem®/Riametâ), artésunate + amodiaquine (AS/AQ®, Coarsucam®), artésunate + méfloquine (AS/MQ®).

3.1.12. Modes d'action des antipaludiques[37]:

3.1.12.1. Blocage de la fabrication des acides nucléiques

- Cytochrome bc → baisse d'ATP : atovaquone
- **Inhibition de la *dhps*** : sulfadoxine, dapsonne (antifoliques)

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

➤ **Inhibition de la *dhfr*** : pyriméthamine, cycloguanil (antifoliniques)

C'est un schizontocide sanguin avec un mode d'action antimétabolique. La pyriméthamine a une action gaméticide vis à vis de *Plasmodium vivax*. Elle s'est montrée la plus intéressante parmi toutes les Diaminopyrimidines utilisées. Elle est la plus efficace des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase utilisable. Un produit voisin, le triméthoprime s'est révélé surtout être un antibactérien et n'est pas retenu comme un antipaludique.

3.1.12.2. Inhibition de la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive du plasmodium

- Chloroquine, amodiaquine, pipéraquine
- Quinine, méfloquine, halofantrine, luméfantrine

3.1.12.3. Alkylation des métabolites de l'hémoglobine, production de radicaux libres :

- artémisinines et dérivés

3.1.12.4. Intérêt de l'utilisation de la sulfadoxine en association avec la pyriméthamine

La sulfadoxine est utilisée en association avec la pyriméthamine. L'association a une activité schizontocide en inhibant le métabolisme de l'acide folique (elle bloque la déhydrofolate réductase) dont l'hématozoaire a besoin pour sa croissance. L'association sulfadoxine-pyriméthamine se montre efficace vis-à-vis de souches de *Plasmodium* résistantes à d'autres antipaludiques. Toutefois, il existe des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à cette association. Les sulfamides sont peu efficaces sur *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*. La Sulfadoxine (dosée à 500mg) a un temps de vie $T_{1/2} \approx 8$ jours qui est plus long que celui de la Pyriméthamine (dosée à 25 mg) qui a $T_{1/2} \approx 4$ jours. La Sulfadoxine agit par inhibition de la dihydroptéroate synthétase (*dhps*). La pyriméthamine agit par inhibition de la dihydrofolate réductase (*dhfr*). Ces temps de demi-vie leur confèrent des propriétés préventives contre le paludisme pendant une longue période pouvant atteindre un mois. L'action concomitante de la Sulfadoxine et de la Pyriméthamine sur les enzymes de la chaîne de synthèse de l'acide tétrahydrofolique (THF) dans les parasites minimise les risques de mutations enzymatiques ponctuelles et favorise leur efficacité contre *Plasmodium falciparum*.

3.1.13. Génétique des populations de *P. falciparum* à travers le gène *msp1*

L'intérêt du gène de la *msp1* dans la distinction des souches de *Plasmodium falciparum* réside dans son polymorphisme notamment au niveau du block 2. Trois allèles y sont le plus souvent étudiés. Il s'agit de K1, MAD20 et RO33. Ces allèles sont constitués des séquences d'acides aminés différents. Les images ci-dessous montrent le polymorphisme des allotypes K1 et MAD20.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
CAMP, FUP	SAQ	SGT	SAQ	SGT	SGT	SAQ	SGT	SGT	SAQ	SGT	SGT	SGT	SGT						
3D7	SAQ	SGA	SAT	SAQ	SGP	SGT	SAP	SG		SGT									
B358	SAQ	GS	SGP	SGT	P	SGT	SGP	SGT	SGP	SGT	SGP	SGT	SGP	SGT					
NF7	SAQ	SGA	SAQ	SGA	SAQ	SGA	SAQ	SGT	SGP	SGP	SGT								
814A, 841A, 841B, 946	SAQ	SGT	SGP	SGP	SGT														
K1, 834B	SAQ	SGT	SGT	SGT	SGP	SGP	SGT												
844	SAQ	SGT	SGT	SGP	SGP	SGT													
B608	SAQ	SGT	SGT	SGP	SGT														

Figure 9 : Séquences des acides aminés K1[38]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
BANDIA	SKG	SVA	SGG	SGG	SVA	SGG	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG
WELLCOME, 806, 808 822B, 827, 837	SKG	SVA	SGG	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SGG
807, 815, 835B	SGG	SVT	SGG	SVT	SGG	SVT	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SGG
828	SKG	SVT	SGG	SVT	SGG	SVT	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SGG
836	SGG	SVT	SGG	SVT	SGG	SVT	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SGA
834A	SGG	SVT	SGG	SVT	SGG	SGG	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SGG
947	SGG	SVT	SGG	SVT	SGG	SVT	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SGG
B439	SSG	SVA	SGG	SVA	SVA	SGG	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG
MAD20, FC27	SSG	SVT	SGG	SVA	SVA	SVA	SGG	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SGG
PA	SKG	SGA	SGG	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SGG
SGE2, 835A, 842	SGG	SVT	SGG	SGG	SVA	SVA	SGG	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SGG
822A	SSG	SVT	SGG	SGG	SVA	SVA	SGA	SGG					
HOND1, HB3	SKG	SVA	SGG	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SGG
843	SKG	SVA	SSG	SVA	SGG								

Figure 10 : Séquences des acides aminés de MAD20[38].

	A A G G A T G G A	LYS ASP GLY
1	<u>G C A A A T A C T</u>	ALA ASN THR
2	<u>C A A G T T G T T</u>	GLN VAL VAL
3	<u>G C A A A G C C T</u> [*]	ALA LYS PRO
4	<u>G C^{3*}A G^{3*}A^{3*}T G C T</u>	ALA ASP ALA
5	G T A A G T A C T	VAL SER THR
6	C A A A G T G C T	GLN SER ALA
7	A A A A A T C C T	LYS ASN PRO
8	C C A G G T G C T	PRO GLY ALA
9	A C A G T A C C T	THR VAL PRO
10	T C A G G T A C T	SER GLY THR
11	<u>G C A A A G T A C T</u>	ALA SER THR
12	<u>A A A G G T G C T</u>	LYS GLY ALA
13	A T A A G A T C T	ILE ARG SER
14	C C A G G T G C T	PRO GLY ALA
15	<u>G C A A A T C C T</u>	ALA ASN PRO
	T C A G A T G A T	SER ASP ASP
	T C A	SER

Figure 11 : Séquences des acides aminés RO33[38].

3.1.14. Résistance du Plasmodium aux antipaludiques

La résistance du Plasmodium aux médicaments est en grande partie expliquée par sa capacité à développer des gènes de résistances. En 1996, un consortium a été formé pour séquencer le génome de *Plasmodium falciparum* qui renferme 14 chromosomes[39]. Ce consortium comprenait le centre de Sanger (qui était en charge des chromosomes 1, 3 à 9 et 13), l'université de Stanford (qui était en charge du chromosome 12) et l'institut pour la recherche de génomique et le programme de malaria du centre naval de recherches médicales (qui était en charge des chromosomes 2, 10, 11 et 14). Le consortium a présenté le génome en 2002. Le nombre de gènes situés sur ces 14 chromosomes est estimé à 5314 [39]. Notre étude concerne le gène *Pfdhfr* qui est situé sur le chromosome 4 et le gène *Pfdhps* situé sur le chromosome 8.

3.1.14.1. Les aminoquinoléines : la chloroquine

Le gène de la résistance à la chloroquine a été identifié en 2000. La substitution de la Lysine par la Thréonine en position 76 du gène *Pfcrf* conduit à la mutation qui joue un grand rôle dans ce mécanisme de résistance à la chloroquine [40]. Ce gène est dénommé le *P. falciparum* chloroquine transporter (*Pfcrf*). Il est situé sur le chromosome 7 et code pour un transporteur membranaire de la vacuole digestive. La mutation sur le codon 76 (K→T),

associée à sept autres points de mutation, permet au parasite de limiter l'accumulation de chloroquine dans sa vacuole digestive, où elle exerce son action inhibitrice. *Pfcr* est également impliqué dans la baisse de sensibilité du parasite à l'amodiaquine et à la quinine. Dans les zones où les allèles de résistance ne sont pas fixés, on observe une augmentation de la fréquence de l'allèle sauvage après abandon de la chloroquine. L'analyse de ce locus renseigne sur la pression médicamenteuse exercée au sein des populations.

3.1.14.2. Les antimétabolites : résistance de *P. falciparum* à la SP

La résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine, une thérapie contre le paludisme largement utilisée notamment à la suite de l'échec de la chloroquine, a pris naissance dans la même région d'Asie du Sud-Est et se propage encore vers l'Afrique subsaharienne [41].

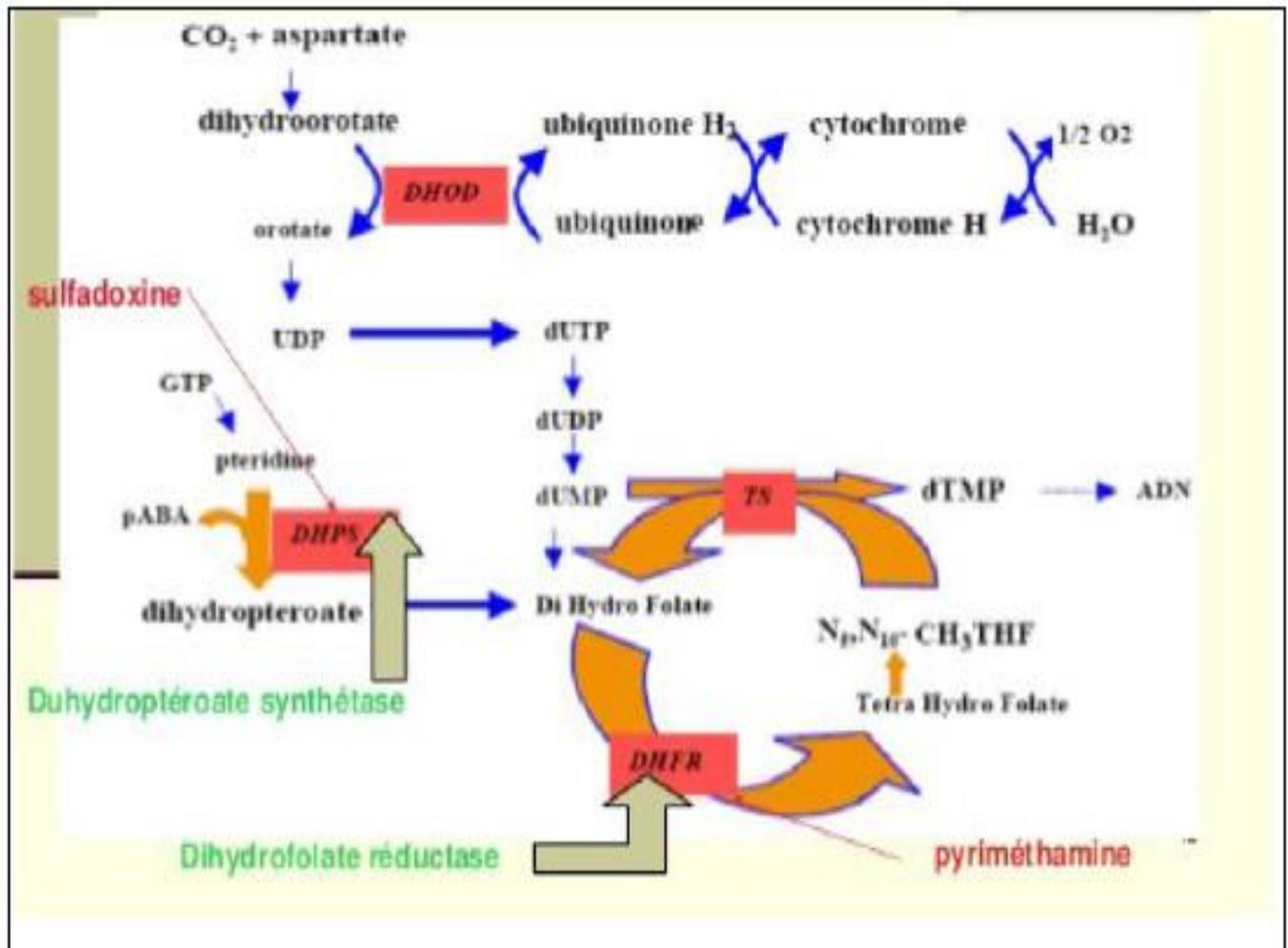


Figure 12: Mécanismes de résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxinepyriméthamine[42].

3.1.14.2.1. Positions sur lesquelles les mutations sont reconnues comme associées à la résistance de *P. falciparum* à la pyriméthamine

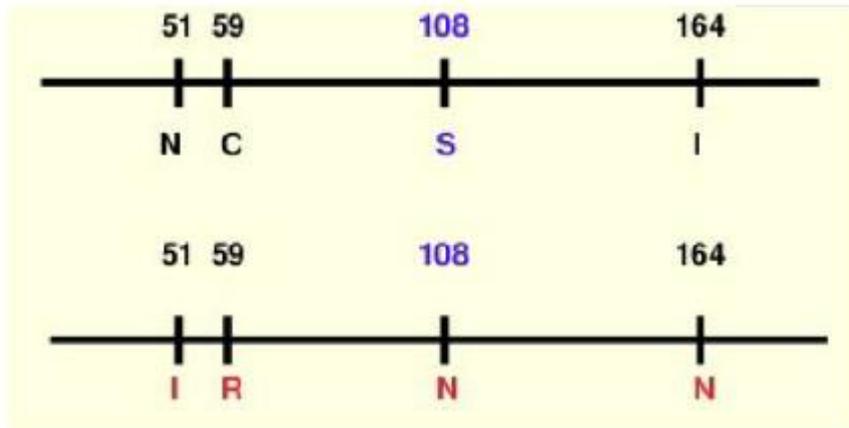


Figure 13 : Mutations sur le gène *Pfdhfr* associées à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la pyriméthamine[42].

Sur le gène *Pfdhfr*, la mutation à la position 108 est la plus fréquente et majeure, les positions 51 et 59 augmentent la résistance et la position 164 est rare en Afrique[43].

3.1.14.2.2. Positions sur lesquelles les mutations sont reconnues comme associées à la résistance du *P. falciparum* à la sulfadoxine

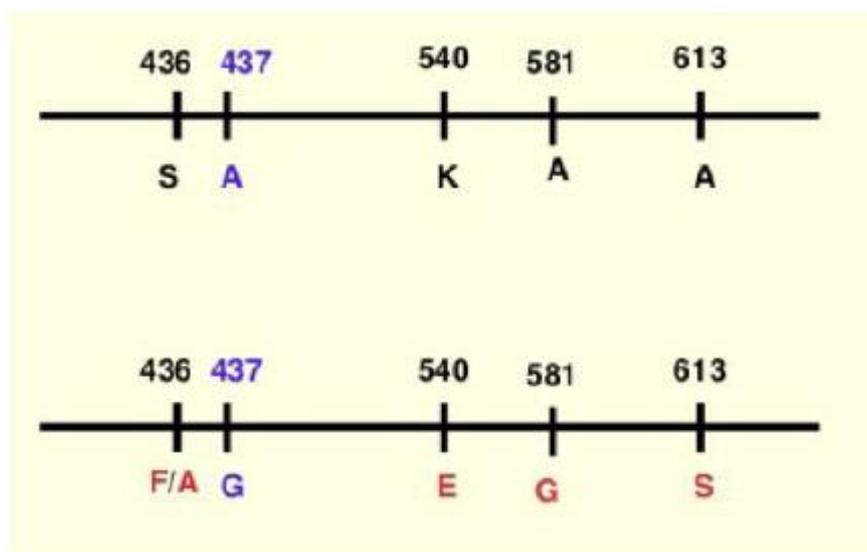


Figure 14 : Les mutations sur les gènes *dhps* associées à la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine[42].

Les mutations aux positions 437 et 540 sont majoritairement celles qui modifient la configuration de la *dhps*[43], les autres constituent des facteurs favorisant la résistance.

3.1.14.3. Les CTAs : résistance de *Plasmodium falciparum*

Au cours des dernières années, le nombre de personnes infectées par le paludisme, ou qui en sont mortes, a diminué de manière significative[31]. Ce succès est attribué à un accroissement de l'investissement dans la prévention et dans les mesures de traitement, notamment les moustiquaires de lit imprégnées d'insecticide et l'utilisation des thérapies combinées à base d'artémisinine qui se sont avérées très efficaces.

Toutefois, ces gains récents en vies sauvées sont menacés par l'apparition de la résistance à l'artémisinine et sa propagation dans de nombreuses régions d'Asie du Sud-Est [44]. La résistance aux thérapies couramment utilisées à base d'artémisinine a été fermement établie dans l'ouest du Cambodge, la Thaïlande, le Vietnam, la Birmanie orientale et dans le nord du Cambodge, tandis que des signes de résistance émergente ont été observés dans le centre de la Birmanie, le Sud du Laos et le Nord-Est du Cambodge.

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

METHODOLOGIE

4. METHODOLOGIE

4.1. Choix du site d'étude :

Le Mali est un pays enclavé d'Afrique de l'Ouest situé entre les 10^e et 25^e degrés de latitude nord et entre le 4^e degré de longitude est et le 12^e de longitude ouest et couvre une superficie de 1241238 km²

Situé au Nord-ouest de l'Afrique, le Mali est enclavé entre l'Algérie au nord-est, le Niger au sud-est, le Burkina Faso, la Côte d'Ivoire et la Guinée au sud, et le Sénégal et la Mauritanie à l'ouest. La majeure partie du pays est constituée de plaines de faible altitude qu'interrompent par endroits des collines rocheuses. Le Sahara couvre le tiers nord du pays. Trois zones climatiques se succèdent du nord au sud: le Nord appartient à la zone saharienne; le delta intérieur du Niger s'étend dans la zone sahélienne semi-aride, où s'opère la transition entre le désert et la savane arborée; enfin, le Sud connaît un climat soudanien. Le climat du Mali en dehors des régions sahariennes est chaud et sec avec des températures moyennes comprises entre 24 et 32°C dans le Sud, qui s'élèvent au fur et à mesure que l'on progresse vers le nord. Les précipitations annuelles d'environ 1400 mm dans le Sud tombent à quelque 1120 mm à Bamako et à moins de 127 mm dans le Nord.

Notre étude s'est déroulée d'une part dans la commune rurale de Sélingué qui relève du cercle de Yanfolila région de SIKASSO et représentatif de l'un des faciès épidémiologiques du paludisme au Mali et d'autre part dans le village de Missira : le second site d'étude, faisant partie de la sous-préfecture de Kolokani. Il est situé sur la rive droite de la rivière Baoulé qui marque la limite entre les préfectures de Kolokani et de Kita. En fait, la zone de Missira est située dans l'entité géographique nommée « Boucle du Baoulé ».

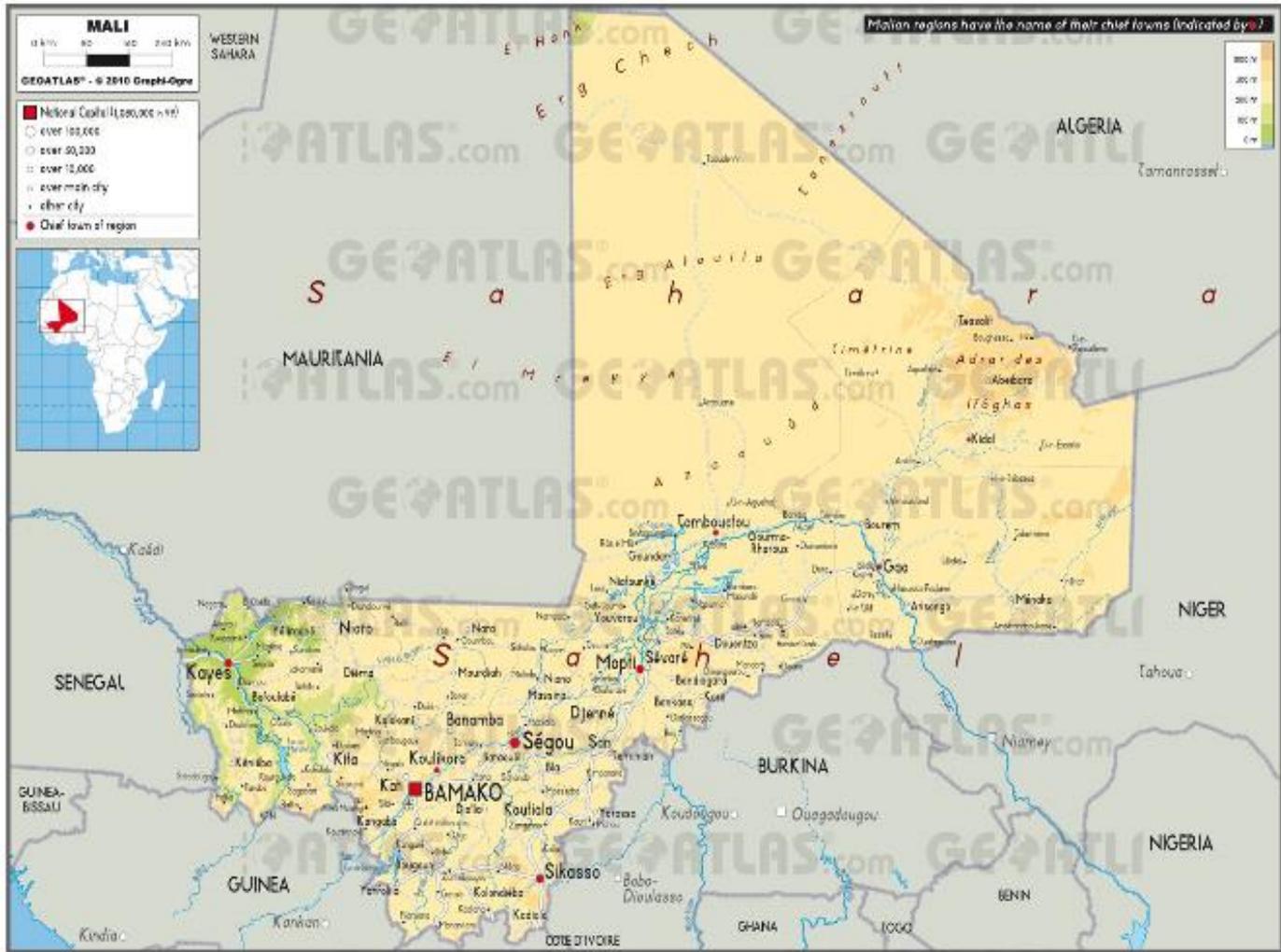


Figure 15 : Carte de la république du Mali

Le Niger, pays situé en Afrique occidentale entre les parallèles $11^{\circ} 37'$ et $23^{\circ} 33'$ de latitude nord d'une part, et les méridiens 16° de longitude est et $0^{\circ} 10'$ de longitude ouest.

Le Niger s'étend sur 1 267 000 km². Il est le plus vaste pays de l'Afrique occidentale en se classant 6^e à l'échelle continentale (après l'Algérie, le Congo, le Soudan, la Libye et le Tchad), avec une population atteignant, à la date du 17 décembre 2012 environ 17 129 076 habitants soient 8 461 444 hommes (49,4%) et 8 667 632 femmes (50,6%) et dont 4 nigériens sur 5 vivent dans les zones rurales. Le pays est limité par le Burkina Faso et le Mali à l'ouest, l'Algérie et la Libye au nord, le Tchad à l'est, le Nigeria et le Bénin au sud.

Au Niger le paludisme est endémique avec une recrudescence en saison des pluies (juillet-octobre). Les principales cibles du paludisme sont les enfants de moins de cinq ans, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées. Cette étude s'est déroulée au niveau de

deux sites au Niger il s'agit :de Aguié un département de 3001 km² de la région de Maradi où le paludisme est méso endémique et Ertcharna un département de la région de Tahoua où le paludisme est hypo endémique.

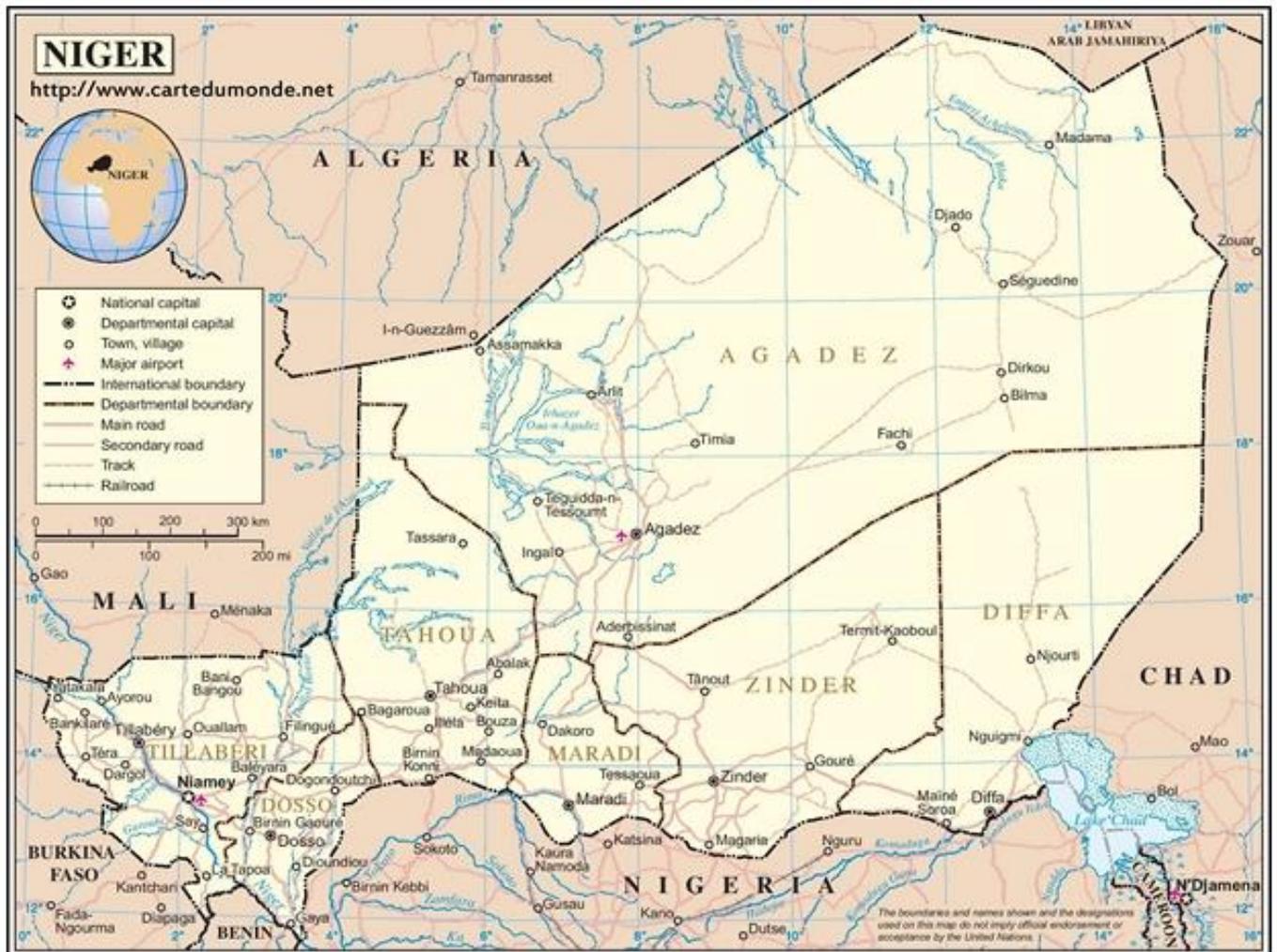


Figure 16 : Carte de la république du Niger

4.2. Population d'étude :

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

4.3. Période d'étude

Notre étude s'est déroulée de Janvier 2017 à Aout 2019

4.4. Type d'étude :

Nous avons fait une étude comparative entre deux zones d'endémie palustre au Niger et au Mali.

4.5. Echantillonnage :

Environ 201 échantillons dont 111 cassettes de TDR provenant du Niger et 90 papiers de confettis provenant du Mali étaient collectés pour examiner les mutations associées à la résistance desulfadoxine et pyriméthamine.

4.5.1. Critères d'inclusion :

Ont été inclus dans cette étude tout enfant :

- Agé de 3 à 59 mois ;
- Ayant un paludisme simple à *Plasmodiumfalciparum* ;
- Ayant reçu les doses de SP/AQ durant la campagne de CPS.

4.5.2. Critères de non inclusion dans l'étude :

N'étaient pas inclus dans cette étude tout enfant :

- De moins de 3 mois ou plus de 59 mois ;
- Ayant un paludisme dû à des espèces autres que *Plasmodium falciparum* ;
- Ayant le paludisme mais n'a jamais reçu de doses de CPS en 2017.
- Ayant un paludisme grave

4.6. Description et mode opérationnelle de TDR: Exemple SD-BIOLINE

4.6.1. Conservation

- ✓ Entre 4° et 45°C.
- ✓ Ne pas congeler

4.6.2. Matériel requis

- ✓ Le coffret (kit) du test SD-BIOLINE
- ✓ Gants
- ✓ Montre ou pendule
- ✓ Marqueur indélébile
- ✓ Coton ou gaz sec et propre





Description du test



A : puits d'échantillon B : puits de réactif. C : fenêtre de contrôle. T : fenêtre de test.

4.6.3. Mode opératoire

- Toujours porter des gants pour tester
- Porter le contenu du coffret SD-BIOLINE à la température ambiante avant d procéder au test à l'air libre (si conservé au réfrigérateur) et vérifier la date de péremption. La prévalence du paludisme à travers le test de diagnostic rapide chez les patients fébriles
- Ouvrir le sachet et retirer l'appareil. Une fois le sachet ouvert, l'appareil doit être utilisé immédiatement. Mais avant l'utilisation vérifier la couleur du dessiccateur. Ce dernier doit être de couleur bleue. S'il est devenu incolore ou bleu pale, jeter le et utiliser un autre.
- Noter sur le cadre plastique du test : le nom ou code du patient, la date et l'heure exacte : heures et minutes,



- nettoyer la partie choisie, soit le doigt (face palmaire du bout du 3ème ou 4^{ème} doigt gauche de préférence), soit le gros orteil ou le talon chez le nourrisson avec un tampon de coton imbibé d'antiseptique. Puis le laisser sécher quelques secondes (ou nettoyer avec du tampon sec).



- Avec la main gauche appuyer fermement la partie proximale du doigt nettoyé pour stimuler la circulation et à l'aide un vaccinstyle stérile, piquer la partie choisie, d'un mouvement rapide et contrôlé.



- D'une main presser le doigt pour faire sourdre une goutte de sang. De l'autre main, tenir la pipette de prélèvement en son milieu et mettre en contact la pipette avec la surface de la goutte de sang : la quantité adéquate de sang (environ 5 μ l) sera collecté par l'action de tension de surface,



- Transférer le sang ainsi collecté sur le tampon test, dans le port d'échantillonnage "A" Un échantillon de sang total de 5 μ l peut ainsi être obtenu. Ou une micropipette peut également être utilisée pour transférer 5 μ l de l'échantillon anti-coagulé ou obtenu par piqûre digitale sur le tampon test, dans le port d'échantillonnage "A".
- si l'échantillon provient du prélèvement veineux, homogénéiser l'échantillon de sang anti-coagulé en le mélangeant doucement. Mettre la boucle d'échantillonnage en contact avec la surface de l'échantillon de sang contenu dans le récipient. **NOTE:** s'assurer que le sang provenant de la boucle d'échantillonnage est entièrement absorbé par le tampon test.
- Déposer six gouttes (300 μ l) de tampon de lavage dans le port d'échantillonnage 'B' en maintenant verticalement le compte - gouttes en plastique.



- Au bout de 15 minutes, lire les résultats comme suit:



Remarque importante

A la fin des 15 minutes le fond du test doit être légèrement rose ou blanc. Si le fond est rouge ou rouge foncé, trop de sang a été collecté et des résultats faiblement positifs peuvent être manqués

- Noter le résultat sur le cadre plastique du test au marqueur indélébile : **négatif ou Pf ou Invalide**

Interprétation du test

Quel est le rôle du contrôle?

Le contrôle permet de voir si le test (condition de conservation) et la procédure (luminosité pour la lecture, quantité suffisante de solution tampon) sont corrects

- Une seule bande colorée rose apparaît dans la fenêtre de contrôle "C": Test **NEGATIF** pour *P.falciparum*



- Une bande colorée rose apparaît dans la fenêtre de contrôle "C" et une bande distincte colorée rose apparaît également dans la fenêtre de test T : Test **POSITIF** pour *P. falciparum*.



- Aucune bande colorée rose n'apparaît dans la fenêtre de contrôle « C » : Test **INVALIDE**. Le test doit être répété. Le rôle du contrôle est de voir si le test est correct et que les procédures (bonne quantité de solution tampon, bonne luminosité pour lire etc..) sont respectées.



4.7. Analyse moléculaire :

4.7.1. Echantillonnage de fragments pour les TDR :

4.7.1.1. Matériels :

- Ciseaux
- Gants
- Alcool 70° à 100%
- Eau distillée
- Tubes 1,5ml
- coton
- Portoirs de tubes 1,5ml

4.7.1.2. Mode opératoire :

Les tubes et les colonnes sont rangés par ordre en fonction des numéros d'échantillon. Chaque colonne correspond au tube qui porte le même numéro d'échantillon. Lors du découpage pour passer d'un échantillon à un autre, le ciseau doit être trempé dans la solution d'alcool puis dans de l'eau distillée ensuite nettoyé avec le coton.

Il faut s'assurer que le ciseau est débarrassé de toute la trace d'alcool. Pour le SD-BIOLINE, on ouvre la cassette latéralement et on fait sortir la bande. Le tampon est soulevé et découpé en deux morceaux d'environ 3mm. En outre trois morceaux de 2mm de la partie proximale de la bande de nitrocellulose jusqu'à la première ligne de test sont échantillonnés.

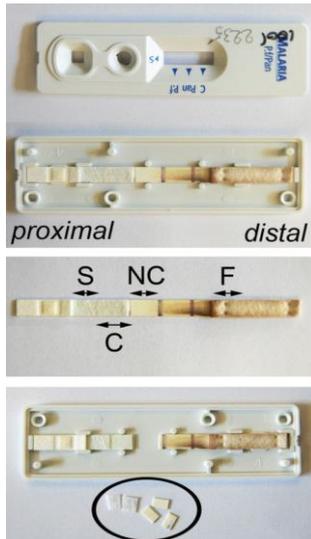


Figure 17 : Cassette d'un TDR découpé

NC=bande de nitrocellulose (membrane de nitrocellulose, support plastique), F=fragment de papier filtre du tampon d'absorption, S=tampon d'échantillon, C=tampon de conjugué.

4.7.2. Extraction de l'ADN de *P.falciparum* au Chelex-100 à partir des TDR :

4.7.2.1. Matériels :

- Plaque chauffante (100°C)
- Bain- marie (56°C)
- Centrifugeuse
- Vortex
- Minuterie
- Portoirs
- Tubes 1,5ml
- Pipettes de 200µl et 1000µl
- Embouts à bout élargi
- Gants
- Poubelle
- Saponine (1%) de Sigma, chelex-100 (5%) de BioRad, eau distillée et du PBS 1X

4.7.2.2. Mode opératoire :

- Couper la membrane du TDR
 - Placer dans un tube de 1,5ml

- Ajouter 1ml de saponine 1%
 - Laisser incuber à 4°C pendant la nuit (au minimum 12heures d’incubation). La saponine permet la lyse des membranes érythrocytaires et parasitaires avec la libération de l’hémoglobine et des enzymes, telles que la DNase dans le tube de 1,5 ml qui sont inactivés à 4 °C.
 - Centrifuger à 12000g pendant 3mn puis rejeter le surnageant
 - Laver le papier avec la solution de PBS1X à Ph 7,2 trois fois. Le lavage permet d’enlever l’hémoglobine qui est un inhibiteur de la réaction PCR.
 - Ajouter 200µl 5% chelex-100 en utilisant un embout à bout élargi.
- Chauffer à 56°C pendant 15mn et triturer avec le bout de l’embout jusqu’à ce que le papier devienne mou ;
 - Bouillir à 100°C pendant 8mn
 - Presser le papier contre la paroi du tube pour extraire toute la suspension de chelex-100 et rejeter le papier ;
 - Centrifuger à 12000g pendant 3mn
 - Transférer le surnageant qui contient l’ADN dans un autre tube ;
 - Conserver à -20° la suspension d’ADN jusqu’à son utilisation.

4.7.3. Extraction de l’ADN à partir des papiers confettis

Le matériel génétique des souches de *P. falciparum* a été extrait à partir des papiers confettis avec le kit commercial Qiagen (QIAGEN GmbH, QIAGEN Strosse 1, 40724 Hilden, GERMANY)

4.7.3.1. Protocole

Il faut disposer de : au moins 3 bains-Marie, portoir de tube 1.5ml, portoir de tube 1.5ml pour le bain-Marie, vortex, Ethanol 96-100%, pipettes de [20, 200,1000µL], centrifugeuse de tube 1,5mL .Toutes les étapes de centrifugation doivent se faire à la température ambiante (15-20°C).

Avant de commencer, s’assurer que :

- Mettre le buffer AE ou l’eau distillée à la température ambiante pour l’élution, l’étape 10,
- S’assurer que les buffers AW1 et AW2 ont été préparés avec l’alcool comme indiqué dans le guide du kit d’extraction,

- S'assurer que les buffers AL et ATL ne contiennent pas de précipités, sinon les faire dissoudre en les incubant à 56°C.

4.7.3.2. Procédure

- Dans les tubes de 1.5mL contenant les 3 spots de sang déjà découpés, ajouter 180µL de buffer ATL,
- Incuber à 85°C pendant 10 minutes puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,
- Ajouter 20µL de Protéinase K de la solution de stock. Vortexer, puis incuber à 56°C pendant 1 heure. Centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube. À noter que l'ajout de la protéinase K est essentiel.
- Ajouter 200µL de buffer AL aux échantillons. Centrifuger bien, et incuber à 70°C pendant 10 minutes puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube. Pour assurer une bonne lyse, il est essentiel d'ajouter le buffer AL et vortexer immédiatement. Il ne faut pas ajouter la protéinase K directement au buffer AL. Après l'ajout du buffer AL, il est possible que des précipités blancs se forment. Dans la plupart des cas, ces précipités disparaissent après l'incubation.
- Ajouter 200µL d'éthanol (96-100%) aux échantillons, bien vortexer puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube. Il est essentiel que l'éthanol et les échantillons soient bien vortexés.
- Soigneusement transférer la solution de l'étape 5 dans les colonnes. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1 minute. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat. Bien fermer les colonnes pour éviter la formation des aérosols lors de la centrifugation.
- Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500µL du buffer AW1. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1 minute. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat.
- Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500µL du buffer AW2. Fermer les colonnes puis centrifuger à 14000rpm pendant 3 minutes.

- **Recommandé :** Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat puis centrifuger à haute vitesse pendant 1 minute. Cette étape aide à éliminer le restant de la solution du buffer AW2 restant après l'étape précédente.
- Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes 1.5mL stériles puis jeter les tubes de collection qui peuvent contenir encore du filtrat. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 150µL du buffer AE ou d'eau distillée. Incuber à la température ambiante (15-20°C) pendant 1 minute puis centrifuger à 8000rpm pendant 1 minute. Le volume d'ADN dissout utilisé lors de la PCR ne doit pas excéder les 10%, par exemple pour une PCR de 50µL, il ne faut pas ajouter plus de 5µL d'ADN. L'ADN ainsi obtenu est conservé à -20°C.

4.8. Amplification des séquences spécifiques de *P.falciparum* :

4.8.1. Réaction de polymérase en chaîne (PCR) :

4.8.1.1. Définition

La PCR ou implication génique est une technique qui utilise les propriétés que possède l'ADN. Celui-ci est composé de deux brins complémentaires d'orientation inverse et appariés deux à deux. Elle consiste à repérer le fragment d'ADN ou de gène, d'intérêt et l'amplifier d'une manière exponentielle.

✓ **Amplification du gène *msp1***

Première réaction d'amplification

Amplification avec les amorces spécifiques conservées pour les blocs 1 et 3 du gène de *msp1*, et dont l'amplicon sera utilisé pour amplifier la deuxième PCR.

Pour la première PCR nous avons utilisé la liste d'amorce suivante

Amorces

Amorce sens M1-OF: 5'- CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG -3'

Amorce anti-sens M1-OR : 5'- CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA -3'

Les composants des mélanges réactionnels de ce gène sont présentés dans le tableau ci-dessous:

Tableau 1 : Composition des mélanges réactionnels

Réactifs	Volume (µl)	Concentration initiale	Concentration finale
DdH ₂ O	10,0	–	–
Buffer	5,0	5X	1X
Mgcl ₂	1,5	50Mm	3mM
DNTPs	1,0	10mM	0,4mM
Amorce aller <i>msp1</i> bloc 1-3	1,0	10µM	0,4µM
Amorce retour <i>msp1</i> bloc 1-3	1,0	10µM	0,4µM
Taq Pol	0,5	5U	0,1U
ADN	5,0	–	–
Total	25,0	–	–

Deuxième réaction d'amplification

Amplification avec les amorces internes spécifiques pour les allotypes K1, MAD20 et RO33. Pour la deuxième PCR les amorces KF/KR, MF/MR, RF/RR ont été respectivement utilisées pour amplifier KI, Mad20, et Ro33

La liste suivante des amorces a été utilisée ;

Amorces Les amorces suivantes ont été utilisées pour amplification de la deuxième réaction

- Amorces sens M1-KF: 5'- AAATGAAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC -3'
- Amorces sens M1-MF: 5'- AAATGAAGGAACAAGTGGAACAGCTGTTAC -3'
- Amorces sens M1-RF: 5'- TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG -3'
- Amorces anti-sens M1-KR: 5'- GCTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGA -3'
- Amorces anti-sens M1-MR: 5'- ATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATTACC3'
- Amorces anti-sens M1-RR: 5'- CATCTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGATC 3'

Les composants et les volumes du mélange réactionnel sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Les composants des mélanges réactionnels

Réactifs	Volume (µl)	Concentration initiale	Concentration finale
H2O	10,0	–	–
Buffer	5,0	5X	1X
MgCL2	1,5	50Mm	3mM
DNTPs	1,0	10mM	0,4mM
Forward Primer	1,0	10µM	0,4µM
Reverse Primer	1,0	10µM	0,4µM
Taq Pol	0,5	5U	0,1U
ADN	5,0	–	–
Total	25,0	–	–

Pour la première réaction

Programme

Une dénaturation initiale de 95°C, pendant 5min

Une dénaturation de 95°C, pendant 1min

Un appariement à 59°C, pendant 2min

Une extension à 72°C, pendant 2min

Extension finale après les 40 cycles à 72°C, pendant 10min.

Et la conservation se fait à 4°C.

Pour la deuxième réaction

Programme

Une dénaturation initiale de 95°C, pendant 5min suivi

Une dénaturation de 95°C, pendant 1min

Un appariement de 59°C, pendant 2min

Une extension de 72°C, pendant 2min

Une extension finale de 72°C, pendant 10min

Et la conservation à 4°C.

4.8.2. Analyse des produits de la PCR nichée :

Les produits obtenus après la PCR nichée (séquences nucléotidiques amplifiées) sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % contenant 30µl de bromure d'éthidium (5-éthyl-3,8-diamino-6-phényl-phénanthidine). Le gel est déposé dans une cuve électrophorèse contenant un tampon TBE1X. Cinq (5)µl de chaque produit de la PCR nichée sont déposés dans un puits du gel d'Agarose. Le produit de la PCR n'est pas mélangé à du bleu de charge car le tampon (Flexi Buffer) que nous avons utilisé est un tampon coloré qui a la propriété de maintenir l'ADN au fond du puits. L'électrophorèse est réalisée à une intensité de 400mA sous une tension de 180volts pendant 45mn. Le bromure d'éthidium a la propriété de s'intercaler entre les fragments d'une molécule d'ADN et quand il est excité aux rayons ultra-violet, il émet une fluorescence à 622nm permettant ainsi de localiser les fragments d'ADN après électrophorèse. Sous illumination ultra-violet, les fragments d'ADN apparaissent sous forme de bandes à différentes position sur le gel.

4.8.2.1. Visualisation des bandes amplifiées

Les bandes rendues fluorescentes par le bromure d'éthidium étaient photographiées sous la lumière Ultra-Violette du transilluminateur (Fisher) ensuite l'image du gel était téléchargée à l'aide de la caméra du système UVP® sur l'ordinateur. La présence d'une bande de taille spécifique sur le gel d'agarose traduit la présence d'un allotype de *P. falciparum*. La présence de plus d'une bande pour un même échantillon signifie que la personne est infectée par plus d'un parasite. Ensuite, les bandes identifiées pour chaque paire d'amorces étaient enregistrées dans le tableur Excel. Le programme UVP® nous permet d'estimer la taille de chacun des fragments amplifiés afin de mettre en évidence aussi bien le polymorphisme de taille que celui de séquence au niveau des différents allotypes utilisés.

4.8.2.2. Détermination de la taille des bandes

Elle se faisait par l'introduction d'un marqueur de taille (ou de poids moléculaire) comme standard qui migre en même temps que les échantillons à tester.

4.9. Recherche des marqueurs de résistance

Nous avons fait la recherche des marqueurs de résistance de la SP par High Résolution Melting (HRM). Cette méthode nous donne les résultats sous forme de courbe en fonction de la température. Le remplacement d'un acide aminé par un autre au niveau des différentes positions des gènes *dhps* et *dhfr* est interprété par la machine sous forme de pic de fusion.

- Le remplacement de la serine (S) par : l'alanine (A), phénylalanine (F) confère une résistance à la position 436 du gène *dhps*.
- Le remplacement de l'alanine (A) par la glycine (G) confère une résistance à la position 437 du gène *dhps*.
- Le remplacement de : l'asparagine (N) par isoleucine (I), de la cystéine (C) par l'arginine (R) et de la serine (S) par l'asparagine (N) confèrent une résistance respectivement à la position 51, 59 du gène *dhfr*.

Nous avons utilisé comme souches de références 3D7 (souches sauvages) et Dd2 (souches mutées). Les températures de fusion de ces 2 souches étant connues, elles nous servaient donc de guide pour différencier les profils sauvages des profils mutés de nos échantillons. Il est de fois possible qu'une même souche présente les 2 profils qu'on appelle profils mixtes.

4.9.1. Réactifs du HRM et matériels :

- 2,5X LightScannerMasterMix ;
- H₂O pour la PCR ;
- Amorces ;
- Sonde ;
- ADN ;
- Plaques blanches ;
- AdhesiveSeal ;
- Huile minérale.

4.9.2. PCR :

La PCR est lancée en tenant compte du fait que le 2,5X LightScannerMasterMix contient déjà le Buffer, les dNTPs, la Taq polymérase et le MgCl₂ nécessaires. En plus des amorces de *Pfdhfr* et *Pfdhps*, une sonde est ajoutée pour la spécification de la recherche de mutation.

Les séquences des amorces que nous avons utilisées sont :

S436/A437 Forward: GAATGTTTGAAATGATAAATGAAG

Reverse: CAGGAAACAGCTATGACGAAATAATTGTAATACAGGTACTACTAAATCTCT

Probe : ATCCTCTGGTCCTTTTGTATACC-block

N51/C59 Forward: ACATTTAGAGGTCTAGGAAATAAAGGAGT

Reverse: ATATTTACATCTCTTATATTTCAATTTTTCATATTT TGATTCATTCAC

Probe : AAATGTAATCCCTAGATATGAAATATTTTTGTG CAG-block

On commence par préparer un mix (10X Primer Probe) à partir des amorces et la sonde.

Tableau 3 : Concentration des amorces utilisées lors du HRM

Concentration initiale	Amorces	Volume en μ l	Concentration finale
50 μ M	Forward	1	0,5 μ M
50 μ M	Reverse	5	2,5 μ M
100 μ M	Sonde	2	0,2 μ M

Ce mix nous sert de solution de travail pour la PCR.

Le volume réactionnel pour la PCR est constitué comme suit :

Tableau 4 : Composition du mix lors du HRM

Concentration initiale	Réactifs	Volume en μ l	Concentration finale
–	H2O	10	–
2,5X	LightScanner Mix	10	2,5X
10X	Primer Probe	2,5	10X
–	ADN	2,5	–

Quant au PCR proprement dite, après la composition du volume réactionnel dans la plaque blanche, 30µL d'huile minérale sont ajoutés dans chaque puits de la plaque pour empêcher les échantillons de s'évaporer lors de la PCR.

La plaque est ensuite couverte avec l'Adhesiveseal puis centrifugée à 2500 rpm pendant cinq (05) minutes. La centrifugation permettra au mix de se retrouver sous l'huile minérale.

La plaque est par la suite introduite dans le thermocycler pour PCR selon le protocole suivant :

1. Dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes ;
2. Dénaturation à 94°C pendant 15 secondes ;
3. Appariement pendant 30 secondes ;
 - 63°C pour *le dhfr51, dhfr59, dhps 436 et dhps437*
4. Extension à 60°C pendant 1 minute.

Après la PCR, la plaque est de nouveau centrifugée, puis on passe au High ResolutionMelting.

4.9.3. High ResolutionMelting HRM : Fusion à Haute Résolution :

Résolution

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

Principe

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

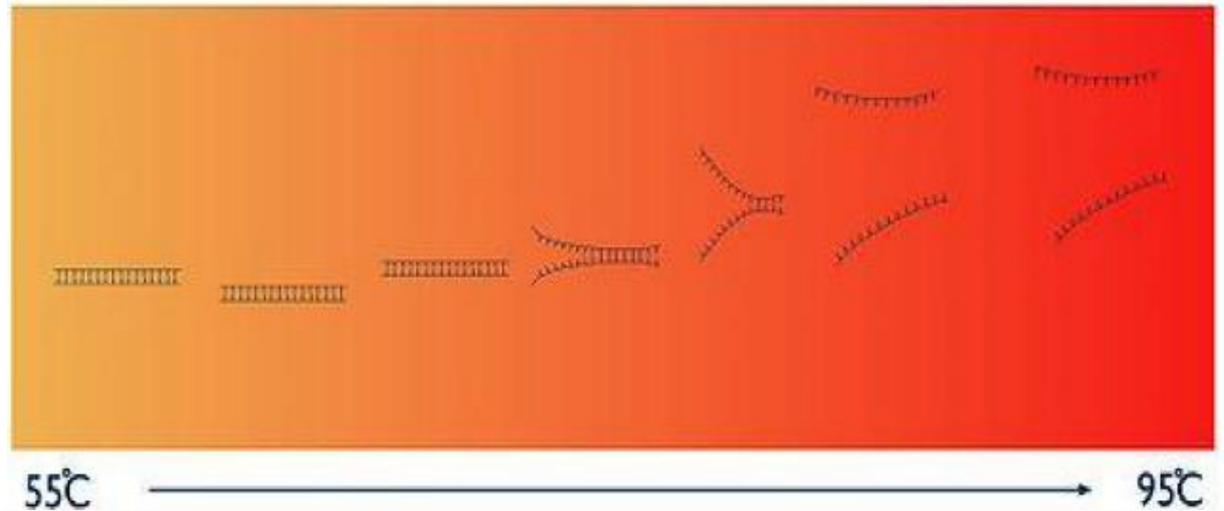


Figure 18 : Principe du HRM

Cela est possible grâce à des composés particuliers, appelés colorants intercalant, qui ont la propriété de devenir plus fluorescents lorsqu'ils sont fixés à de l'ADN double brin. En l'absence de double brin, ils ne peuvent pas se fixer et leur niveau de fluorescence est très faible. Au début de l'analyse HRM, à la plus basse température, l'intensité de fluorescence est très importante, car l'ensemble de l'amplicon est présent sous forme double brin. Mais, au fur et à mesure que la température augmente et que les brins se séparent, la fluorescence diminue. L'enregistrement de l'intensité de fluorescence en fonction de la température est appelé courbe de fusion.

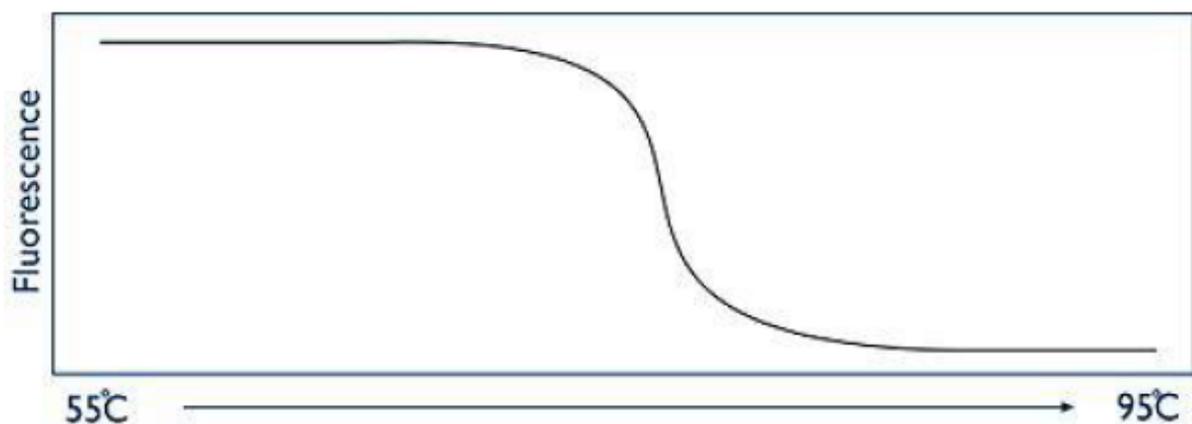


Figure 19 : Principe de tracée des courbes de fusion

Un changement, même mineur, dans la séquence de l'ADN conduit à une variation de la cinétique de fusion, qui peut être détectée grâce à la haute résolution utilisée.

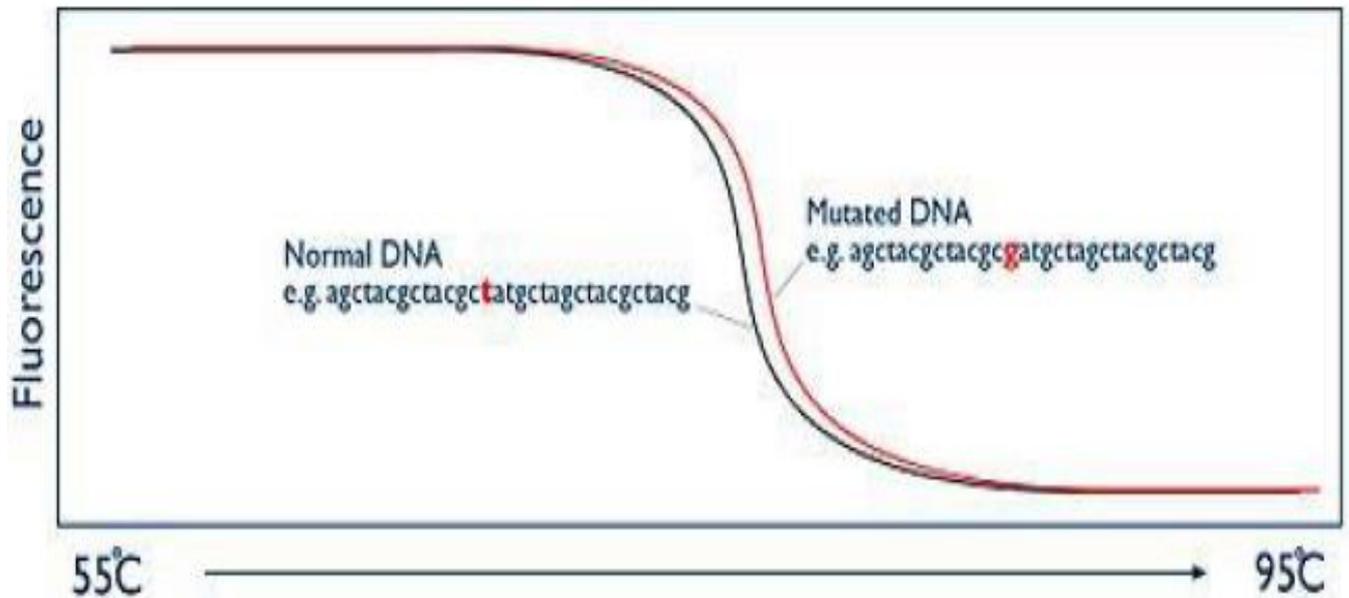


Figure 20 : Courbe de fusion d'un ADN normal et d'un ADN muté

Description du dispositif :

Le dispositif du HRM est composé d'un LightScanner-96 (Idaho Technologies, Inc., Salt Lake City, UT) muni d'une caméra reliée à un ordinateur. Ce dispositif est conçu pour la recherche des mutations dans différents génomes.



Figure 21 : Dispositif du HRM au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de l'USTTB

- La plaque est introduite dans le LightScanner-96 (Idaho Technologies, Inc., Salt Lake City, UT) et on fait varier la température de 40°C à 95°C. Au bout de 10 minutes, on obtient une courbe de fusion qui est fonction de la fluorescence de la solution grâce au LCGreenPlus, agent intercalant fluorescent.

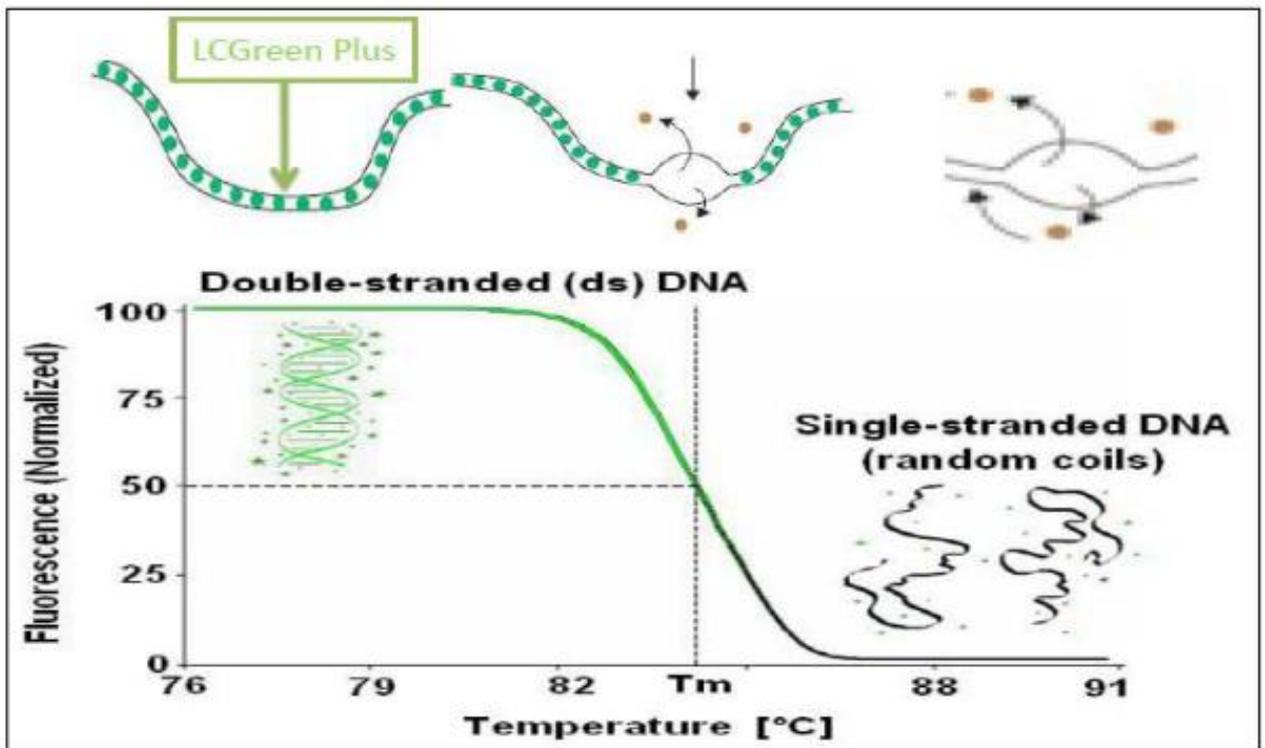


Figure 22 : La température de fusion en fonction de la fluorescence au HRM

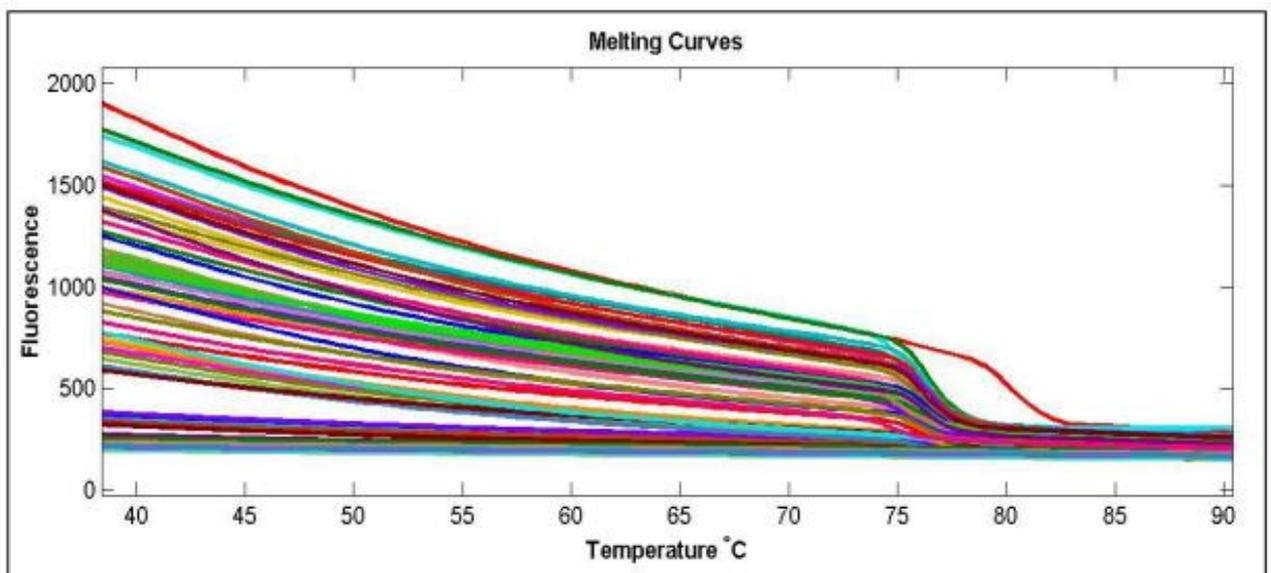


Figure 23 : Les courbes de fusion normalisées au HRM

Les courbes sont ensuite normalisées. Après la normalisation, les courbes peuvent être visualisées sous forme de pics.

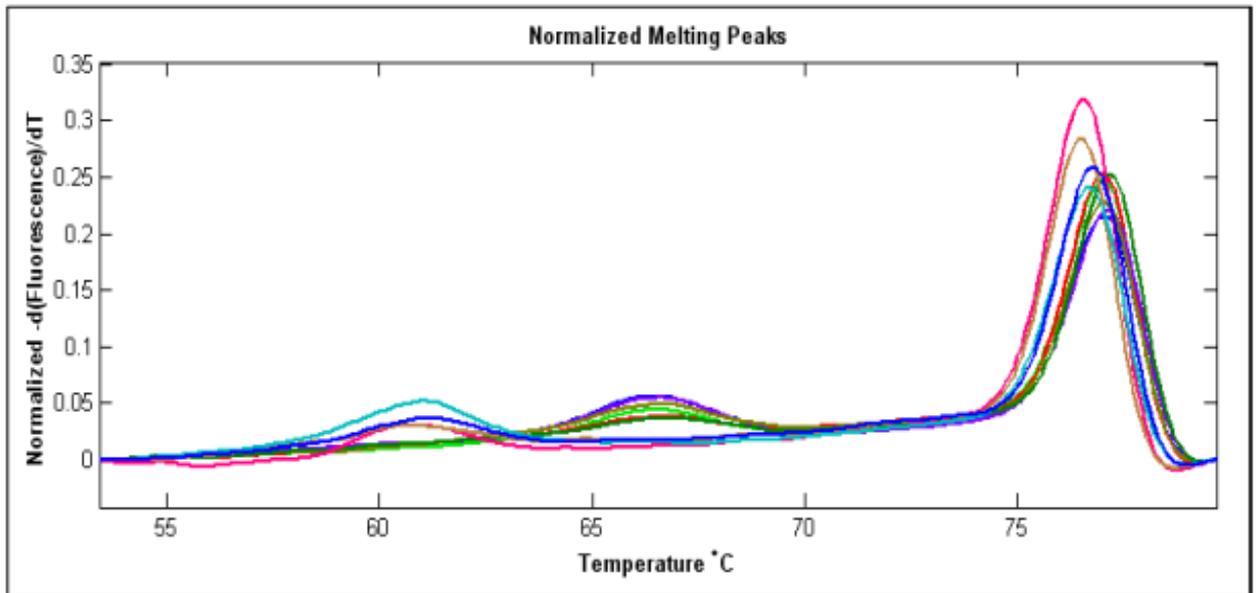


Figure 24 : Pics de fusion au HRM

Procédure de détection des mutations par HRM :

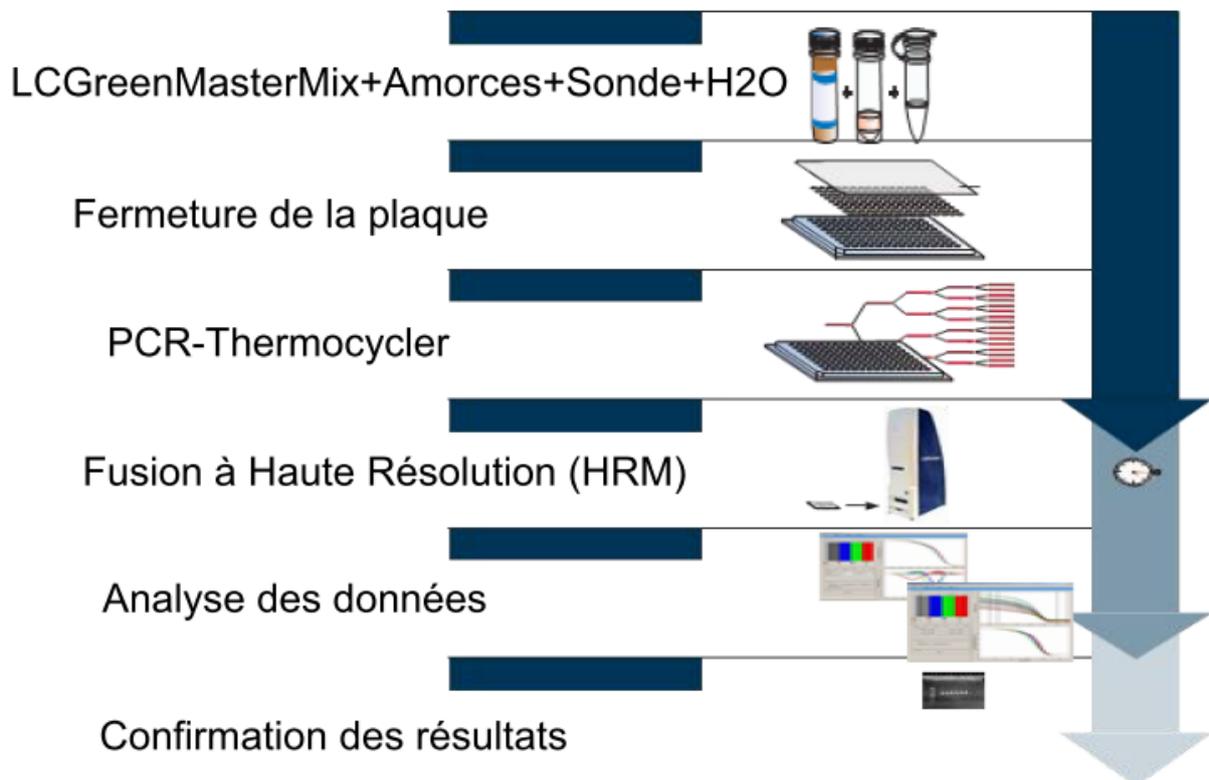


Figure 25 : Schéma à suivre pour la détection des mutations par HRM

4.10. Saisies et analyses des données

Pour les saisies et analyses des données, nous avons utilisé Microsoft® Office Excel 2010, IBM SPSS® STATISTIQUE VERSION 20, GraphPadPrism version 6.00 (GraphPad Software, La JollaCalifornia USA).

Les tests statistiques les plus utilisés ont été Odds ratio et le Khi deux. Les tests ont été réalisés avec GraphPadPrism version 6.00 (GraphPad Software, La JollaCalifornia USA).

Le risque relatif utilisé était $\alpha = 5\%$.

4.11. Aspect éthique

A l'admission, on explique le contenu de l'étude aux parents et/ou accompagnants des enfants malades et que toutes réponses seront confidentielles. Ainsi les malades sont inclus après un consentement éclairé de ces derniers.

RESULTATS

5. RESULTATS

5.1. Collecte des échantillons de sang au Niger

Au Niger, des échantillons de sang obtenus de bout de doigt ont été testés par la technique d'immuno-capture en utilisant les tests diagnostiques rapides (TDR) de 2016-2017 par l'équipe des centres de santé de deux localités (Aguie et Ertcharna) sous la supervision du centre de recherche médical et sanitaire (CERMES) de Niamey.

Tableau 5 : Répartition des échantillons positifs par le test de diagnostic rapide

TDR	Niger				Total n (%)	
	Aguie n (%)		Ertcharna n (%)			
Positif	55	(49,5)	56	(50,45)	111	(55,5)
Négatif	45	(50,5)	44	(49,44)	89	(44,5)
Total	100	(50)	100	(50)	200	(100)

Nous avons au total 200 échantillons de cassettes de TDR dont 111 échantillons de TDR (55 échantillons d'Aguie et 56 échantillons d'Ertcharna) sont positifs, ces derniers étaient utilisés pour l'analyse moléculaire.

Tableau 6 : Répartition des échantillons positifs selon les différentes techniques par sites

Pays	Site	TDR positif	MSP-1 PCR positif	HRM positif	Fragment de membrane de TDR utilisé
Niger	Aguie	55	15	12	1/3
	Ertcharna	56	30	29	1/3
Total		111	45	41	-

Sur les 55 échantillons positif par le TDR, 15 était positif par la PCR pour MSP-1 soit 15/55 (27,27%) à Aguié. Tandis que à Ertcharna 56 testé par TDR 30 était positif par la PCR pour MSP-1 soit (30/56) 53,57%.

5.2. Collecte des échantillons de sang au Mali

Les enfants qui se présentaient au centre de santé de Sélingué et Missira avec le symptôme du paludisme ont fourni leur sang capillaire pour l'identification de *plasmodiumfalciparum* par microscopie et la technique moléculaire.

Tableau 7 : répartition des échantillons positif par la goutte épaisse

Goutte épaisse	Mali				Total n (%)	
	Sélingué n (%)		Missira n (%)			
Positif	54	(60)	36	(40)	90	(45)
Négatif	46	(40)	64	(60)	110	(55)
Total	100	(100)	100	(100)	200	(100)

Nous avons au total 200 échantillons dont 90 échantillons (54 échantillons de Sélingué et 36 échantillons de Missira) sont positifs pour la goutte épaisse, ces derniers étaient utilisés pour l'analyse moléculaire.

Tableau 8 : Répartition des échantillons positifs selon les différentes techniques par sites

Pays	Site	Goutte épaisse positif	MSP-1 PCR positif	HRM positif	Parti de papier confetti utilisé
Mali	Missira	36	36	36	Spot de sang
	Sélingué	54	54	54	Spot de sang
Total		90	90	90	–

Sur les 36 échantillons positifs par la goutte épaisse, les 36 étaient positifs par la PCR pour MSP-1 soit 36/90 (40%) à Missira ; tandis qu'à Sélingué 54 testé par goutte épaisse étaient tous positifs par la PCR soit (54/90) 60%.

5.3. Caractéristiques sociodémographiques :

Tableau 9 : Répartition des échantillons extraits par pays

Pays	Echantillons extraits	MSP-1 PCR positif	Echantillons de la PCR pour MSP-1 et HRM
Mali	90	90	90
Niger	111	45	45
Total	201	135	135

Nous avons extrait 201 échantillons dont 135 échantillons étaient positifs pour la *mSP1* avec la PCR puis sélectionnés pour le HRM pour les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*.

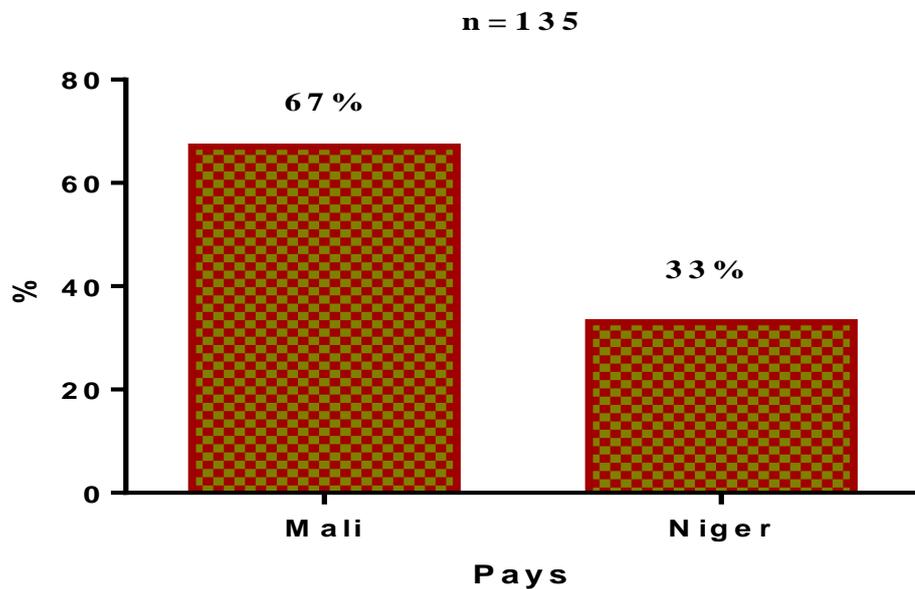


Figure 26 : Répartition des échantillons par pays

La majorité de nos patients était du Mali soit 67% de l'échantillon.

Tableau 10 : Répartition des patients selon le site d'étude

Pays	Site d'étude	Effectifs	%
Mali	Missira	36	26,7
	Sélingué	54	40,0
Niger	Aguie	15	11,1
	Ertcharna	30	22,2
Total		135	100,0

40% des patients étaient de Sélingué.

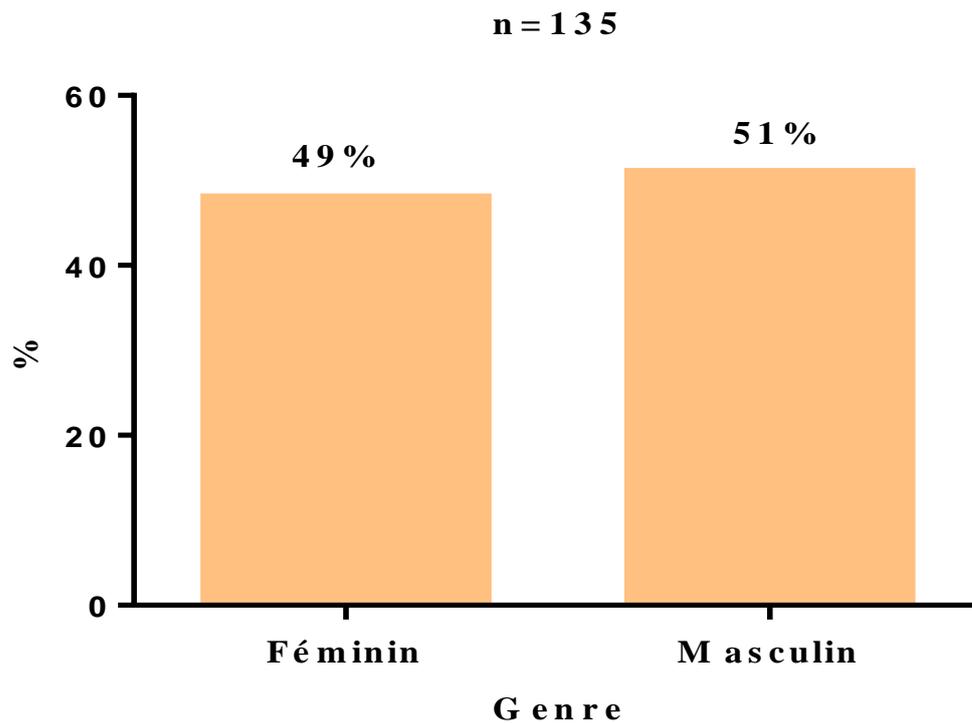


Figure 27 : Répartition des patients selon le genre

Le Sexe Ratio était de 1,15 (69/66) et était en faveur du genre masculin.

Tableau 11 : Répartition des patients par tranche d'âge

Pays	Sites	Tranche d'Age (mois)					Total
		(1-12) n(%)	(13-24) n(%)	(25-36) n(%)	(37-48) n(%)	(49-60) n(%)	
Mali	Missira	1 (2,78)	11 (30,56)	22 (61,11)	0 (00)	2 (5,56)	36 (100)
	Sélingué	1 (1,85)	13 (24,07)	29 (53,70)	4 (7,40)	7 (12,96)	54 (100)
Niger	Aguié	6 (40)	5 (33,33)	1 (6,67)	1 (6,67)	2 (13,33)	15 (100)
	Ertcharna	4 (13,33)	7 (23,33)	13 (43,33)	3 (10)	3 (10)	30 (100)

La tranche d'âge (25-36) mois était plus représentée (53,70%) à Sélingué que dans les autres localités. La tranche d'âge (1-12) mois était plus représentée au Niger qu'au Mali avec un pourcentage de 28,60%.

5.4. Résultat du génotypage par PCR nichée de la *mSP1*

En utilisant le marqueur polymorphique de *mSP1*, nous avons examiné la multiplicité de l'infection des 135 échantillons afin de calculer le nombre moyen de génotype de *mSP1* de chaque échantillon au niveau de deux pays. Nous avons estimé la prévalence des allèles de résistance des souches de *P.falciparum* à la SP par la technique de HRM (High ResolutionMelting)



Figure 28 : image labélisée des bandes des allotypes à la *msp1* au Mali

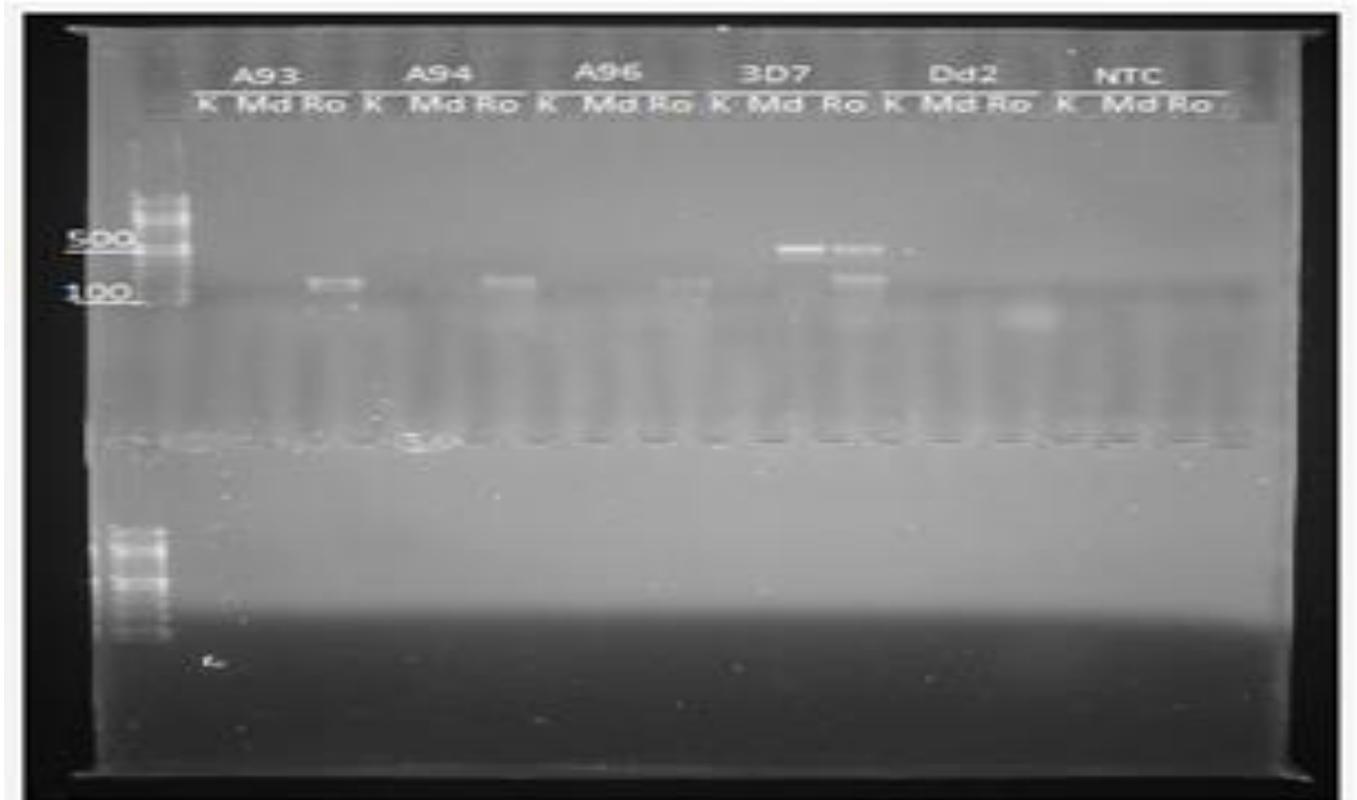


Figure 29 : image labélisée des bandes des allotypes à la *msp1* au Niger

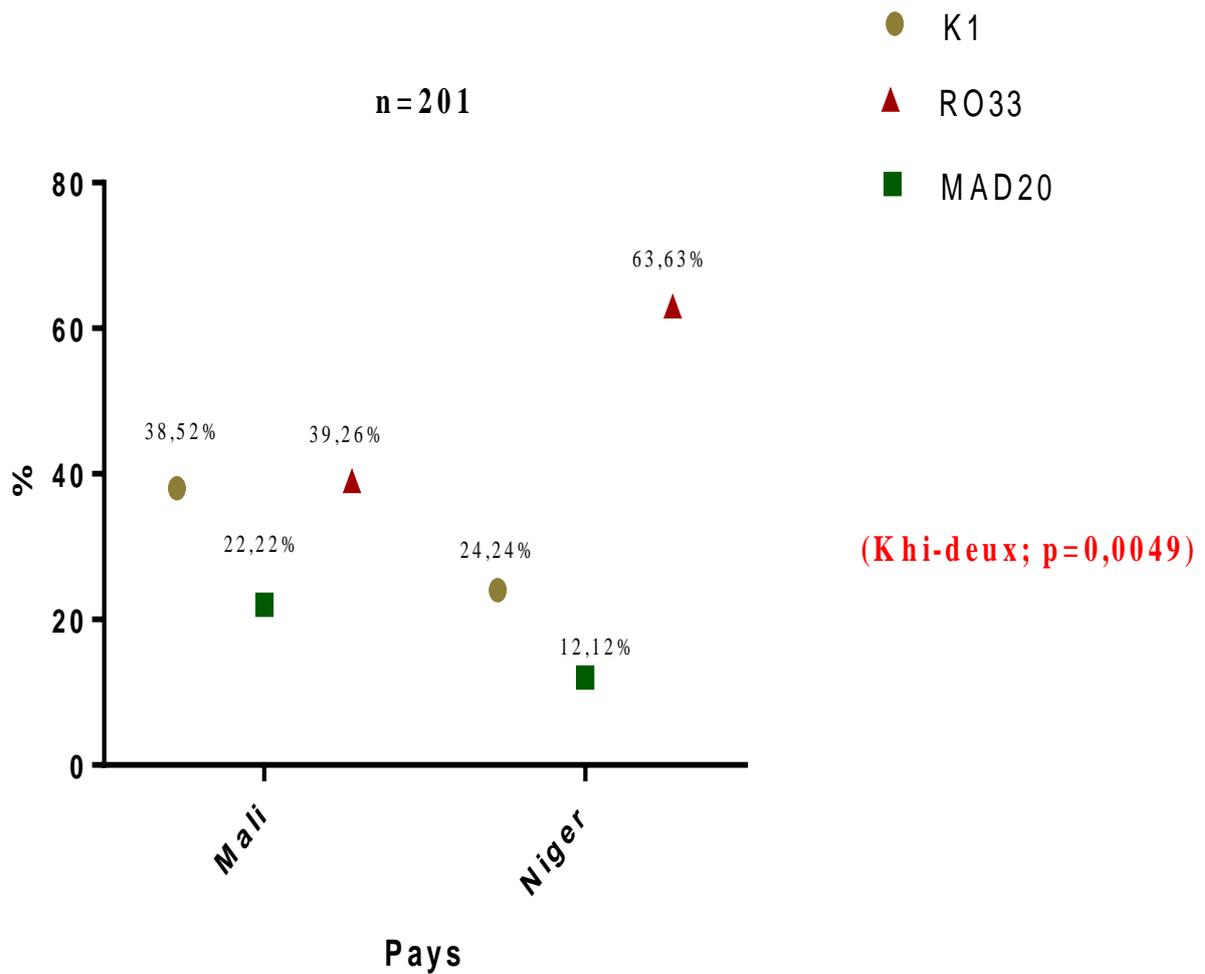


Figure 30 : Fréquence des allotypes de la *msp1* par pays

Après génotypage de nos échantillons nous avons eu 201 allotypes au total soit 68 pour K1 ;38 pour MAD20 ; et 95 pour RO33. L'allotype K1 était statistiquement plus représenté au Mali (38,52%) ; OR = 1,958 ; IC=95% (1,011 à 3,793) qu'au Niger (24,24%) ; p=0,0566. L'allotype MAD20 était statistiquement plus représenté au Mali (22,22%) ; OR =2,071 ; IC=95% (0,8912 à 4,815) qu'au Niger (12,12%) p=0,1239. L'allotype RO33 était plus représenté au Niger avec un taux de 63,63% contre 39,26% au Mali ; OR =0,3696 ; IC = 95% (0,2009 à 0,6791) ; p=0,0015.

Tableau 12 : Répartition des allotypes par pays

Pays	Allotypes			MOI
	K1 n(%)	MAD20 n(%)	RO33 n(%)	
Mali	52 (38,52)	30 (22,22)	53 (39,26)	2
Niger	16 (24,24)	8 (12,12)	42 (63,63)	1
Total	68 (33,83)	38 (18,90)	95 (47,26)	–

La multiplicité de l'infection était d'environ 2 allotypes par patient au Mali contre 1 allotype par patient au Niger.

Tableau 13 : Répartition de la multiplicité de l'infection par pays

Pays	Multiplicité de l'infection			Total n(%)
	1 n(%)	2 n(%)	3 n(%)	
Mali	49 (54,44)	37 (41,11)	4 (4,44)	90 (100)
Niger	28 (62,22)	12 (26,67)	5 (11,11)	45 (100)
Total	77 (57,03)	49 (36,30)	9 (6,67)	135 (100)

57,03% de nos patients avait 1 allotype de *Plasmodiumfalciparum*. Cependant 36,30% et 6,67% des patients étaient respectivement infectés par deux et trois allotypes de *Plasmodiumfalciparum* en même temps.

La proportion de 2 allotypes de *Plasmodiumfalciparum* par patient était statistiquement plus élevée au Mali (41,11%), OR =2,907 ; IC à 95% (1,298 - 6,512) qu'au Niger (26,67%) ; p = 0,0120. La proportion des patients ayant 1 allotype ou 3 allotypes au Mali était comparable à celle du Niger (p>0,05). Cependant la multiplicité de l'infection chez les patients du Mali est plus élevée par rapport à celle du Niger.

5.5. Mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*

L'étude des marqueurs de résistance à la SP en position (436, 437) et (51, 59) ont permis de faire la distinction entre les génotypes sauvages et mutés. Selon le gène, nous avons réparti les patients en trois groupes : ceux qui portent la souche sauvage, la souche mutée et les profils mixtes (circulation des 2 génotypes simultanément dans le sang du patient).

5.5.1. Courbes des gènes *Pfdhfr*

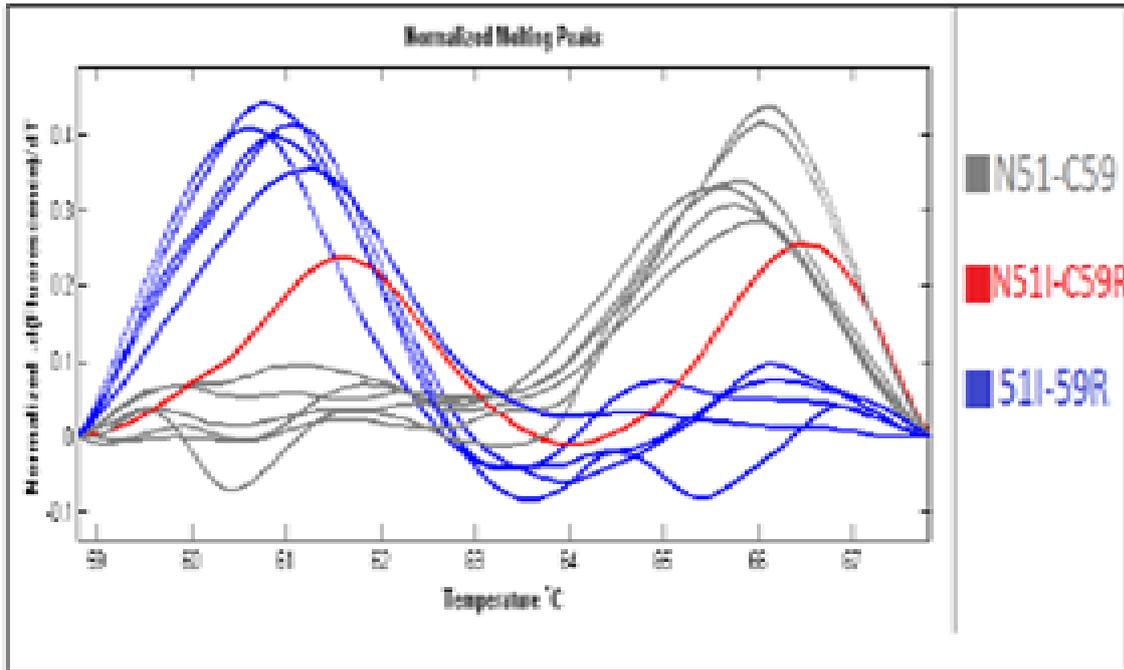


Figure 31 : Pics de fusion de nos différentes souches du Mali après amplification du gène *Pfdhfr* (51 et 59)

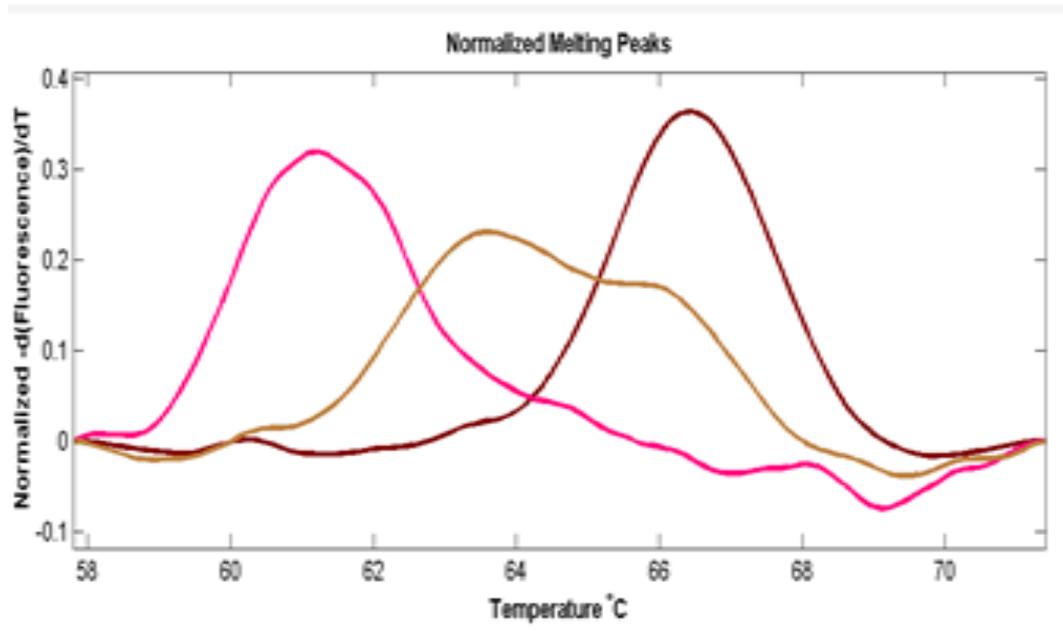


Figure 32 : Pics de fusion de nos différentes souches du Niger après amplification du gène *Pfdhfr* (51,59)

La température de fusion de la souche sauvage (3D7) utilisée pour repérer les souches sauvages était de 67,5°C et celle de la souche mutée (Dd2) était de 62,8°C.

Tableau 14 : Répartition des échantillons selon les allèles à la position 51 du gène *Pfdhfr*

Pays	<i>Pfdhfr</i> N51I			Total n(%)
	N n(%)	I n(%)	N/I n(%)	
Mali	29 (32,95)	51 (57,95)	8 (9,10)	88 (100)
Niger	11 (28,20)	21 (53,84)	7 (17,95)	39 (100)
Total	40 (31,49)	72 (56,70)	15 (11,81)	127 (100)

Sur la position 51 du gène *Pfdhfr* il y'avait au total 87 mutations contre 40 sauvages.

Nous n'avons pas trouvé une différence statistiquement significative entre les allèles mutés (51I et 51N/I) de Mali et du Niger, OR =0,7993 ; IC=95% (0,3494 à 1,828) ;P=0,6812.

Tableau 15 : Répartition des échantillons selon les allèles à la position 59 du gène *Pfdhfr*.

Pays	<i>Pfdhfr</i> C59R			Total n(%)
	C n(%)	R n(%)	C/R n(%)	
Mali	35 (39,77)	52 (59,10)	1 (1,13)	88 (100)
Niger	11 (28,20)	21 (53,84)	7 (17,95)	39 (100)
Total	46 (36,22)	73 (57,48)	8 (6,30)	127 (100)

A la position 59 il y'avait 81 mutations contre 46. La majorité des mutations était des échantillons du Mali.

Il n'y avait pas une différence statistiquement significative entre les prévalences des allèles mutés (59R et 59C/R) de Mali et du Niger ; OR =0,5949 ; IC=95% (0,2626 à 1,348) ; p=0,2356.

5.5.2. Courbes des gène *Pfdhps*

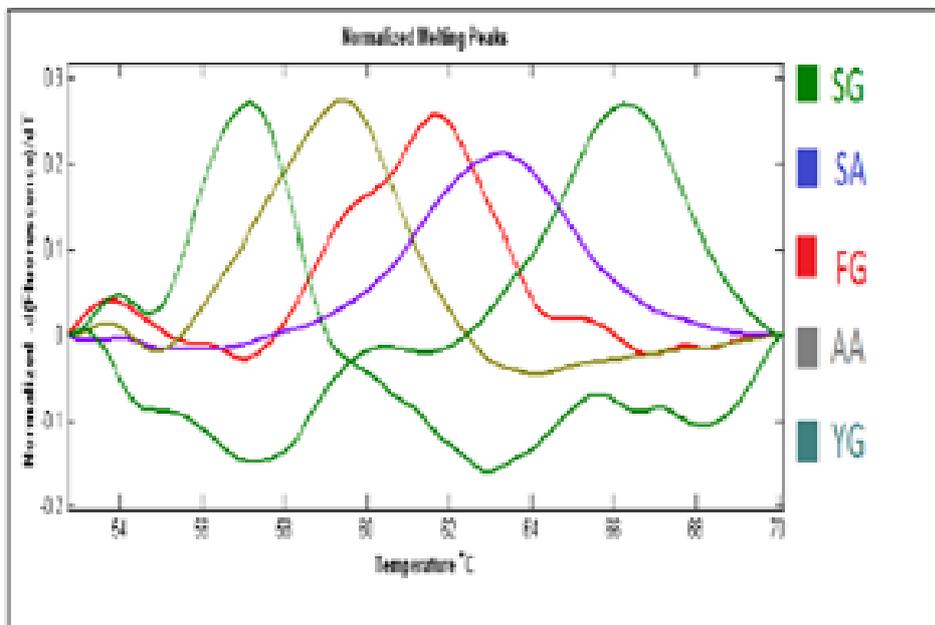


Figure 33 : Pics de fusion de nos différentes souches du Mali après amplification du gène *dhps*(436,437)

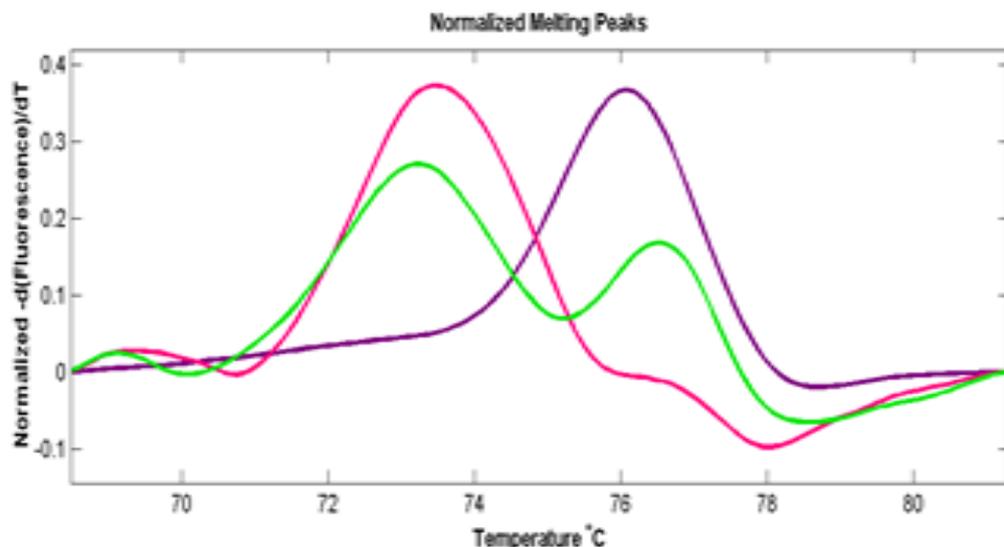


Figure 34 : Pics de fusion de différentes souches du Niger après amplification du gène *dhps*(436,437)

Tous les échantillons qui ont à peu près la même température de fusion que 3D7 (63,8°C) sont des souches sauvages, c'est à dire des souches sensibles à la SP, de même, ceux qui ont la même température de fusion que Dd2 (56,0°C) sont des souches mutées liées à la résistance.

Tableau 16 : Répartition des échantillons selon les allèles à la position 436 du gène *Pfdhps*

Pays	<i>Pfdhps</i> S436F				Total n(%)
	S n(%)	F n(%)	A n(%)	S/A n(%)	
Mali	65 (76,47)	14 (16,47)	6 (7,06)	0 (0)	85 (100)
Niger	22 (62,85)	2 (5,71)	8 (22,85)	3 (8,57)	35 (100)
Total	87 (72,5)	16 (13,33)	14 (11,67)	3 (2,5)	120 (100)

Au total, à la position 436, le HRM a détecté 33 mutations contre 87 sauvages. Trois échantillons portant l'allèle mixte (436S/A) a été trouvé au Niger.

Il n'y a pas de différence statistiquement significative dans la distribution des mutations à la position 436 entre les deux pays Mali et Niger ; OR =0,5207 ; IC=95% (0,2227 à 1,218) ; p=0,1765.

Tableau 17 : Répartition des échantillons selon les allèles à la position 437 du gène *Pfdhps*

Pays	<i>Pfdhps</i> A437G			Total n(%)
	A n(%)	G n(%)	A/G n(%)	
Mali	37 (43,52)	47 (55,29)	1 (1,17)	85 (100)
Niger	18 (51,42)	12 (34,30)	5 (14,28)	35 (100)
Total	55 (45,83)	59 (49,17)	6 (5)	120 (100)

A la position 437 du gène *Pfdhps*, le total des mutations était de 65 contre 55 sauvages.

Nous avons constaté une différence statistiquement significative dans la répartition des allèles mutés (437G et 437A/G) du gène *dhps* entre Mali et Niger ; OR =1,374 ; IC=95% (0,6236 à 3,026) ; p=0,5458.

Tableau 18 : Corrélation entre l'âge et les mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*

Tranche d'âge (mois)	Mutations				Total n(%)
	<i>Pfdhfr</i> 51 n (%)	<i>Pfdhfr</i> 59 n (%)	<i>Pfdhps</i> 436 n (%)	<i>Pfdhps</i> 437 n (%)	
(1-12)	8 (30,77)	9 (34,61)	5 (19,23)	4 (15,40)	26 (100)
(13-24)	26 (31,32)	27 (32,53)	13 (15,66)	17 (20,48)	83 (100)
(25-36)	36 (31,03)	31 (26,72)	12 (10,34)	37 (31,90)	116 (100)
(37-48)	8 (42,10)	6 (31,58)	2 (10,52)	3 (15,80)	19 (100)
(49-60)	9 (40,90)	8 (36,36)	1 (4,54)	4 (18,20)	22 (100)
Total n(%)	87 (32,71)	81 (30,45)	33 (12,40)	65 (24,44)	266 (100)

Les mutations étaient également réparties entre les tranches d'âge. Nous n'avons pas donc pas trouvé une corrélation entre l'âge et l'apparition des mutations sur le gène *Pfdhfr* et *Pfdhps* aux différentes positions.

5.6. Circulation des multiples mutations

On parle de multiple mutation lorsqu'un même parasite présente simultanément des variations génétiques sur différentes positions d'un même gène. Le nombre de positions détermine l'appellation de la multiple mutation.

5.6.1. Circulation des doubles mutations sur le gène *Pfdhps* et *Pfdhfr*

Tableau 19 : circulation des doubles mutations sur le gène *dhfr* et *dhps* au Mali et au Niger

Pays	Double mutations	
	<i>Pfdhfr</i> (51-59) n (%)	<i>Pfdhps</i> (436-437) n (%)
Mali	46/88 (52,27)	13/85 (15,29)
Niger	28/39 (71,79)	5/36 (13,89)
Total	74/127 (58,26)	18/121 (14,87)

Les doubles mutations sur le gène *dhfr* aux positions (51,59) et le gène *dhps* aux positions (436,437) ont été respectivement retrouvées chez 74 patients avec un taux de 58,26% et 18 patients avec une fréquence de 14,87%. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les doubles mutations détectées au Mali et au Niger sur les gènes *Pfdhfr* (51,59) et *Pfdhps* (436,437) ; (P= 0,2776).

5.6.2. Circulation des triples mutations sur le gène *Pfdhfr* et *Pfdhps*

Tableau 20 : circulation des triples mutations les deux gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* au Mali et Niger

Pays	Triple mutations	
	<i>Pfdhfr</i> (51,59) <i>Pfdhps</i> (436) n(%)	<i>Pfdhps</i> (437) <i>Pfdhfr</i> (51,59) n(%)
Mali	12/83 (14,45)	24/83 (28,91)
Niger	9/33 (27,30)	11/33 (33,33)
Total n(%)	21/116 (18,10)	35/116 (30,17)

Les triples mutations ont été retrouvées chez 21 patients avec une fréquence de 18,10% aux positions (51,59 ,436) du gène *dhfr* chez 35 patients avec une fréquence de 30,17% aux positions (51, 59,437) du gène *dhps*. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les deux pays (P = 0,2369).

5.6.3. Circulation des quadruples mutations sur les gènes *Pfdhps* et *Pfdhfr*

Tableau 21 : Circulation des quadruples mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* au Mali et au Niger

Pays	Quadruple mutations
	<i>Pfdhfr</i> (51-59) <i>Pfdhps</i> (436-437) n(%)
Mali	6/84 (7,14)
Niger	3/33 (9,09)
Total n(%)	9/117 (7,69)

De nos échantillons qui ont été traités avec succès au HRM, 9 patients portaient les mutations sur les gènes *Pfdhps* et *Pfdhfr* respectivement aux positions (436, 437) et (51, 59), soit un pourcentage de 7,69%.

**COMMENTAIRES
ET DISCUSSION**

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Nous avons effectué une étude de type comparatif, allant de février 2016 à Décembre 2017. Elle a porté sur un échantillon de 201 patients dans les localités de Missira et Sélingué au Mali et les localités d'Aguie et Ertcharna au Niger.

Le but de notre étude était de comparer et d'évaluer la résistance moléculaire des mutations de la Dihydrofolate Réductase et de la Dihydroptéroate Synthase de *Plasmodiumfalciparum* qui sont associées à la résistance aux médicaments anti-folates (antifoliques et antifoliniques) notamment la sulfadoxine-pyriméthamine (SP).

6.1. Méthodes :

6.1.1. Prélèvement des échantillons :

Au Mali, des échantillons des papiers confettis ont été collectés à Sélingué et à Missira. Au Niger, des échantillons de TDR ont été prélevés dans les localités d'Aguie et d'Ertcharna, où le paludisme est respectivement méso endémique et hypo endémique. Les TDR positifs pour le *Plasmodiumfalciparum* ont été stockés à la température ambiante.

La lecture de lames de gouttes épaisses et de frottis mince se faisait d'abord par un technicien de laboratoire, puis une deuxième fois par un pharmacien biologiste et en fin une dernière lecture par un parasitologue si besoin était de départager les deux premiers lecteurs.

L'OMS recommande que tous les cas suspects de paludisme soient confirmés par les TDR. Les TDR facilitent le diagnostic du paludisme en fournissant des preuves de la présence d'antigènes spécifiques de *Plasmodium* dans le sang humain sans nécessiter d'électricité ni de formation avancée en microscopie. Les TDR étaient tous utilisables de par leur date de péremption et leur apparence.

Les résultats des TDR ont été tous confirmés par la lecture des gouttes épaisses en ce qui concerne le Mali.

6.1.2. Extraction de l'ADN de *Plasmodiumfalciparum*

Au Mali des papiers confettis étaient utilisés pour l'extraction de l'ADN par la méthode de kit Qiagen. Ce kit permet d'avoir de l'ADN purifié, débarrassé de toutes impuretés comme l'hémoglobine pouvant entraîner des interférences lors de la PCR. Ce kit a aussi l'avantage de pouvoir extraire de l'ADN génomique de qualité.

Au Niger, l'ADN de *Plasmodiumfalciparum* était extrait à partir des TDR (Test de diagnostic rapide) avec la méthode de CHELEX-100. Cette méthode est relativement peu coûteuse. La sensibilité plus élevée observée avec l'extraction de Chelex-100 indique que cette méthode est particulièrement adaptée à la parasitémie de faible densité dans les environnements peu endémiques. Cependant, la méthode Chelex-100 nécessite une main-d'œuvre moyenne et l'ADN peut être de qualité inférieure à celle de l'ADN extrait avec des kits d'extraction sur colonne disponibles dans le commerce[45]. Le tiers proximal de la membrane de nitrocellulose a été choisi pour l'extraction de l'ADN. Des études antérieures ont montré qu'il est possible d'extraire l'ADN de Plasmodium à partir de TDR [46,47,48]. Malgré les réalités de terrain, la méthodologie décrite par **Cnops et al.**[46] était appliquée sur le terrain sous forme globale, les TDR représentent une méthode rentable pour la conservation, le transport et le stockage des échantillons d'ADN.

6.1.3. Utilisation du HRM pour la détection des mutations sur le matériel génétique de *Plasmodium falciparum*

La recherche des marqueurs de résistance s'est faite par HRM. La fusion à haute résolution de l'ADN est connue pour sa sensibilité dans la détection des mutations ponctuelles [49]. Dans une étude menée par **Rachel F Daniel et al.** en 2012, le HRM a été décrit comme une méthode efficace pour la détection des mutations ponctuelles mais aussi la différenciation des haplotypes[49]. D'autres études ont toutefois utilisé la PCR-RLFP [50,51]. La méthode de séquençage reste tout de même la méthode la plus sensible, spécialement le NGS (terme anglo-saxon :Next Génération Sequencing) [52]. Toutefois, lors d'une étude menée en 2014 par **Michaela Angelika et al.** sur la comparaison entre le HRM, le pyrosequencing, le NGS avec le Sanger sequencing, le HRM a été trouvé aussi sensible que le séquençage par la méthode de Sanger [52]. La méthode de détection des mutations à l'aide du HRM que nous avons utilisé, a été utilisée avec succès au Mali pour la première fois en 2016 par **Diarra Y**[53]. Les positions que nous avons étudiées lors de cette étude sont aussi utilisées actuellement dans la plupart des études portant sur la résistance de la SP. Les positions 51 et 59 du gène *Pfdhfr* ainsi que 436 et 437 du gène *Pfdhps* sont connues pour leur association dans la résistance de *Plasmodiumfalciparum* à la Pyriméthamine et la Sulfadoxine[54]. La résistance de *P. falciparum* à la pyriméthamine nécessite très souvent l'étude des positions 108 et 613. Aussi, la position 540 du gène *Pfdhps* est très connue pour son implication dans la résistance à la Sulfadoxine. Notre étude n'a pas inclus l'étude de ces dernières, ceci constitue une limite.

Nous avons utilisé les souches 3D7, 7G8 et IndoChina (Dd2) comme références. Les souches 3D7 et Dd2 sont respectivement sensible et résistante à la SP et ne comporte donc pas les mêmes acides aminés aux positions étudiées. Ces souches ont été utilisées comme références dans beaucoup d'études de recherche des mutations notamment par **RachelsF_Daniels etcoll. [49]**.

Nous avons remarqué que l'ADN de la souche mutée (Dd2) fond avant celui de la souche sensible 3D7.

6.1.4. Typage allélique de *Plasmodiumfalciparummsp1*

La Multiplicité de l'Infection (MOI) était examinée par la PCR nichée sur le gène *msp1*. Cette technique de la PCR est largement utilisée à cet effet par le monde scientifique [55]. La *msp1* est très connue pour son polymorphisme et constitue une des recommandations majeures de l'OMS en termes de détermination de la multiplicité de l'infection [56]. La *msp1* est une protéine localisée sur le chromosome 9 de *Plasmodiumfalciparum*. Elle est composée de 17 blocks dont le plus variable est le block 2. Celui-ci, par sa variabilité permet de distinguer les clones de *Plasmodiumfalciparum*. Ledit block 2 comprend les allèles K1, MAD20 et RO33. La PCR nichée de la *msp1* est largement utilisée pour la détermination de la multiplicité de l'infection (MOI) palustre. Avec les amorces de bloc conservé et des allotypes K1, MAD20 et RO33, nous avons fait la PCR nichée qui nous a permis de déterminer les fréquences des différents allotypes de la *msp1*.

La région polymorphe (bloc 2 de *msp1*) était amplifiée. Toutes les réactions de PCR étaient réalisées dans un volume total de 25 µl contenant 0,5 µl de Taqpolymerase, 1µl de chaque amorce et 10µl d'eau de qualité réactif. Lors de la première réaction (n°1), 5µl d'ADN génomique était ajouté en tant que matrice. Dans la deuxième réaction, 5µl du produit de PCR nichée 1 était utilisé comme matrice d'ADN.

6.2. Résultats

Notre étude s'est portée sur une population de 201 enfants, tous âgés de moins de 5ans. Cette tranche d'âge se trouve comprise dans les différentes tranches d'âge sur lesquelles d'autres chercheurs se sont focalisé pour des tests d'efficacité des antipaludiques. **Lynda Woi-Messé et al.** ont mené leur étude sur des échantillons qui provenaient des enfants de moins de 5 ans pour la détection des mêmes mutations [57]. **YayeDié Ndiaye et al.** [58] ont mené leur étude sur des patients de 2 à 20 ans pour la détection des mutations sur certains gènes codant pour la

résistance aux antipaludiques. La majorité des enfants de notre étude était de la tranche d'âge de (25-36) mois soit 61,11% de la population.

Le sexe ratio 1,04(69/66) était en faveur du sexe masculin. Ce résultat est comparable au sexe ratio de 1,04 en faveur du sexe masculin trouvé au Mali par la Banque Mondiale en 2015 chez les enfants de moins de cinq ans [59].

La multiplicité de l'infection (MOI) que nous avons, était 2 (135/90) au Mali elle était similaire à celle (MOI=2) trouvée à S.broum au Niger en 2017 par **Ibrahim Arzika et al.**[60] et était comparable à celles rapportées en 2016 par **Yavo et al.** (1,66 en Côte d'Ivoire et 1,58 au Gabon) [55].La multiplicité de l'infection était de 1 (66/45) au Niger, elle concorde à la multiplicité de l'infection palustre (1,37) trouvée en Malaisie en 2011 par **Atrosh et al.**[61]cette dernière était aussi inférieure à la MOI 2(135/90) de notre étude au Mali. La multiplicité de l'infection de notre étude trouvée au Mali et au Niger était inférieure à celles trouvées (3,11 entre 2006 et 2007) par **Huang Bo et al.** dans la grande Ile des Comores[62].La multiplicité de l'infection d'environ 2 génotypes par patient témoigne qu'il y a une forte transmission du paludisme dans les localités où s'est tenue cette étude.

Les prévalences des allèles de la *msp1* que nous avons trouvés étaient 34% pour K1, 19% pour l'allèle MAD20 et 47% pour RO33. Bien que toutes les familles *msp1* (K1, Mad20 et RO33) étaient retrouvées chez des enfants infectés des deux pays (Mali et Niger), la famille allélique de RO33 était plus fréquente chez les enfants infectés du paludisme. Cette prédominance de l'allèle RO33 que nous avons trouvés, était également trouvée en Malaisie par **Atrosh et al.** mais le taux de RO33 (80%) double celui de notre étude[61]. La même prédominance de RO33 était confirmée par une étude de **Huang Bo et al.** dans la Grande Ile des Comores de 2006 à 2007 (84,8% de RO33) et entre 2013 et 2016 (63,4% de RO33) [62]. Cependant, la prédominance de RO33 est contredite par une étude menée par **Mohammed et al.** qui trouve une prédominance de l'allèle K1 (33,9%) en Ethiopie en 2015[63]. Ainsi que par une étude de **Mawili-Mboumba et al.** au Gabon en 2015 qui rapporte également une prédominance de l'allèle K1 (65,5%) [64]. Nous avons une différence dans la distribution des allèles de la *msp1* entre les sites des deux pays le Mali et le Niger contrairement à **Mawili-Mboumba et al.** qui n'ont pas trouvé de différence entre Oyem et Owendo au Gabon [64]. La prévalence de K1 (34%) que nous avons rencontrés était inférieure à celles trouvées en Côte d'Ivoire (64,6%) et au Gabon (56,6%) par **Yavo et al.** en 2016 [55].

Le génotypage des gènes *dhps* et *dhfr* a été effectué pour 135 échantillons (n=90 pour Mali et n=45 pour Niger). Pour les codons *dhfr*(51, 59), 88/90 échantillons du Mali et 39/45 échantillons du Niger ont donné un résultat de génotypage réussi par contre le codons *dhps*(436, 437) 85 échantillons du Mali et 35 échantillons du Niger ont réussi. Cette légère différence du taux de réussite pourrait s'expliquer par le fait que l'extraction de l'ADN de *plasmodiumfalciparum* au Mali était faite à partir de papier confettis et celle du Niger à partir de cassette de TDR.

L'estimation des mutations à la position 51 du gène *Pfdhfr* 42,05%(37/88) que nous avons au Mali et Niger 46% (18/39) était supérieure au taux de 28,2% trouvé sur la même position en 2008 par **DjimdeM** à Koro dans la région de Mopti au Mali [65]. Nos résultats des deux pays étaient cependant plus bas que celui (83,5%) obtenu au Sénégal par **Wurtz et al.** en 2012[66]. La prévalence des mutations à la position 51 trouvée au Niger (46%) était inférieure au taux (62,5%) trouvé sur la même position en 2012-2013 à Grande Comore dont l'extraction de l'ADN était faite à partir des cassettes de TDR par **Nasserdine Papa Mze et al.**[67].

La prévalence des mutations à la position 59 du gène *Pfdhfr* était de 60,25% (53/88) au Mali et 72% (28/39) au Niger lors de notre étude. Ces prévalences des mutations trouvées dans les deux pays (Mali et Niger) étaient supérieures à celle d'une étude menée à Koro par **DjimdeM** en 2008 où il a été trouvé un taux de 35% [65]. La prévalence des mutations obtenue au Mali (60,25%) lors de notre étude concorde au (60,8%) qui a été trouvé au Niger par **Woï L et al.** en 2017 [57]. Le taux (72%) obtenu au Niger concorde à celle de **Nasserdine Papa Mze et al.** avec un taux de (69,8%) entre 2012-2013 à Grande Comore[67] et était similaire au taux de 72,3% obtenu en Chine par **Huang F et al.** en 2012 [68]. Cependant le taux des mutations (60,25%) au Mali et (72%) au Niger à la position 59 était supérieur au (51%) obtenu au Mali en 2010 par **Alassane Dicko et al.**[69] et était inférieure au 81,2% rapporté dans l'étude de **Diawara et al.** en 2017 au Mali[70].

La prévalence des mutations sur le gène *Pfdhps* à la position 436 était de 23,5%(20/85) au Mali et 37% (13/35) au Niger lors de notre étude. Ce pourcentage des mutations à la position 436 était nettement inférieur aux 60,2% trouvés au Niger par **Woï L et al.** en 2017[57]. Ce taux des mutations des deux pays (Mali et Niger) est cependant supérieur à ceux d'**Amor et al.** au Sénégal 12,3% entre 2002 et 2005 et 0% entre 2008 et 2010[71]. Cependant les 23,5% de mutations détectés à la position 436 au Mali dans notre étude étaient similaires au 23%

des mêmes mutations trouvées par **Gama et al.** en Angola en 2011 [72]. La prévalence des mutations 37% (13/35) au Niger était nettement supérieure au taux (12%) obtenu lors d'une même étude menée à Thiès au Sénégal par **Nasserdine Papa Mze et al.**[67].

A la position 437 du gène *Pfdhps*, nous avons une prévalence de 56,5% (48/85) au Mali et 48,5%(17/35) au Niger qui était respectivement supérieure et concorde au 45% obtenu par **Djimde M** en 2008 à Koro au Mali[65]. Cependant leur taux des mutations était inférieur à celui (80%) trouvé à la même position au Niger par **Woï L et al.** en 2017[57]. La prévalence des mutations (48,5%) trouvée au Niger était inférieure au (53,9%) obtenu lors d'une même étude menée à Thiès au Sénégal par **Nasserdine Papa Mze et al.**[67]. La prévalence des mutations (56,5%) au Mali était similaire à une étude menée entre 2012 et 2017 dans la commune rurale de Dioroau Mali par **M.Telly Modibo**[11] dont la prévalence de la mutation à la position 437 était de (57%). Les mutations à la position 437 obtenues (56,46%) au Mali et (48,5%) au Niger de notre étude étaient supérieures au taux (40,2%) dans une étude menée au Sénégal par **Wurtz et al.** en 2012 [66].

Nous avons confronté les multiples mutations rencontrées dans notre étude aux résultats d'une étude similaire à la nôtre en terme de population cible menée au Niger par **Woï L et al.** en 2017[57]. Il ressort que, les 58,26 % des doubles mutations sur le gène *Pfdhfr* aux positions 51 et 59 que nous avons, étaient similaires des 58,3% trouvés par **Woï L et al.** dans cette dernière étude [57]. Le taux de doubles mutations (14,87%) que nous avons sur le gène *Pfdhps* aux positions 436 et 437 était nettement inférieur au taux de 49,5% trouvé au Niger par **Woï L et al.** .

RECOMENDATIONS ET CONCLUSION

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1 CONCLUSION

Cette étude nous a permis de comparer les mutations des gènes *Pfdhps* et *Pfdhfr* d'examiner les polymorphismes génétiques *Pfm.sp1* à partir des cassettes de TDR dans les deux pays.

Un ADN extrait du TDR peut être source utile d'ADN pour les études épidémiologiques génétiques.

Nous avons observé qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative dans la distribution des mutations des différentes positions 51,59 et 436 entre les deux pays sauf à la position 437 du gène *Pfdhps*. On remarque aussi une forte prévalence des mutations sur le gène *Pfdhfr* aussi bien que le gène *Pfdhps* aux positions 51,59 et 437 soit respectivement 64,4%, 60% et 48,1%. Cependant, la prévalence était moins élevée à la position 436 du gène *Pfdhps* soit 27,5%. Cette position du gène *Pfdhps*, c'est néanmoins révélée très polymorphe. Ces mutations témoignent encore de la pression médicamenteuse que crée la CPS ou l'utilisation continue de la SP. Les données de cette étude nous montrent qu'il faut continuer le suivi des marqueurs de résistance aux antipaludiques surtout dans les zones d'endémie palustre où la prévalence du paludisme est élevée.

7.2 RECOMMANDATIONS

Au terme de notre étude, nous recommandons :

➤ **Aux centres de santé**

De donner le maximum d'information aux populations sur les méthodes de prévention de lutte contre le paludisme.

De continuer à veiller à la bonne dispensation des SP lors de la CPS et CPN.

Renforcer les équipes de la CPS pour mener une bonne communication et atteindre toutes les cibles.

➤ **Au LBMA et au CERMES**

De continuer cette étude en incluant la position 108 de *Pfdhfr* et la position 540 de *Pfdhps*.

De continuer la surveillance des mutations associées à la résistance à la SP régulièrement.

➤ **Au programme national de lutte contre le paludisme PNL**

De mener et soutenir des études de ce genre pour une meilleure prise en charge du paludisme chez les enfants et les femmes enceintes hautement à risque dans nos pays.

REFERENCES

8. Références

1. Rapport OMS 2018 [Internet]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/facts-in-pictures/detail/malaria>
2. RAPPORT OMS 2018 [Internet]. Disponible sur: <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/fr/>
3. Enquete sur les indicateurs du paludisme 2015 [Internet]. Disponible sur: <https://www.dhsprogram.com>
4. Paludisme au Mali 2018 [Internet]. Disponible sur: <https://www.studiotamani.org/index.php/themes/societe/19768-paludisme-au-mali-des-avancees-enregistrees-dans-la-lutte-contre-la-maladie>
5. Paludisme au Niger [Internet]. Disponible sur: http://www.aho.afro.who.int/profiles_information/index.php/Niger:Malaria/fr
6. OMS Paludisme au Niger 2018 [Internet]. Disponible sur: https://www.afro.who.int/sites/default/files/2019-06/Rapport%20annuel%202018_21JUN2019.pdf
7. Contexte Le partenariat ACCESS-SMC - Malaria Consortium [Internet]. Disponible sur: https://www.malariaconsortium.org/media-downloads/499/ACCESS-SMC%20Project%20Brochure_French
8. OMS. chimioprevention du paludisme saisonnier (CPS) [Internet]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/areas/children>
9. OMS. Traitement préventif intermittent du nourisson à la sulfadoxine-pyriméthamine (TPIIn-SP) pour lutter contre le paludisme en Afrique: GUIDE DE LA MISE EN OEUVRE SUR LE TERRAIN [Internet]. OMS; [cité 18 avr 2018]. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70807/WHO_IVB_11.07_fre.pdf;jsessionid=01F8706132821D92CCE79B22AFF2BE2A?sequence=1

10. Gentilini M. Médecine tropicale : in paludisme. 5ème édition, Paris. Flammarion. Médecine-Sciences 1993: pp91-122. Médecine tropicale : in paludisme. 5ème édition, Paris. Flammarion. Médecine-Sciences 1993: pp91-122.
11. MODIBO T. La prevalence des mutations sur les gènes *pfdhfr* et *pfdhps* dans la commune rurale de Dioro. [Pharmacie]. [Bamako]: université de Bamako; 2018.
12. OMS. status-rep-artemisinin-act-resistance [Internet]. Disponible sur: www.who.int/malaria/publication/atoz/status-rep-artemisinin-act-resistance-sept2015.pdf?ua=1
13. DEAP/malaria Research and training center; projet palu urbain. Impact des supports imprégnés de perméthrine sur l'anémie de la grossesse et morbidité palustre chez les enfants en milieu périurbain ENMP 1996.
14. OMS. status-rep-artemisinin-act-resistance-sept2015.pdf [Internet]. Genève; 2015 [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/status-rep-artemisinin-act-resistance-sept2015.pdf?ua=1>
15. OMS. METHODS FOR SURVEILLANCE OF ANTIMALARIAL DRUG EFFICACY [Internet]. 2009 [cité 6 juin 2018]. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44048/9789241597531_eng.pdf?sequence=1
16. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. Parasitologie médicale. Généralités et définitions. 2014 [cité 9 juin 2018]; (POLYCOPIE NATIONAL 2014):411. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/poly-parasitologie.pdf>
17. Koita OA, Sangaré L, Sango HA, Dao S, Keita N, Maiga M, Mounkoro M, Fané Z, Maiga AS, Traoré K, Diallo A, Krogstad DJ. Effect of Seasonality and Ecological Factors on the Prevalence of the Four Malaria Parasite Species in Northern Mali. Journal of Tropical Medicine [Internet]. 2012 [cité 30 mai 2018]; 2012:1-9. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: <http://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/367160/>

18. Djimdé AA, Fofana B, Sagara I, Sidibe B, Toure S, Dembele D, Dama S, Ouologuem D, Dicko A, Doumbo OK. Efficacy, Safety, and Selection of Molecular Markers of Drug Resistance by Two ACTs in Mali. 2008 [cité 6 juin 2018];7. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur:
<http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/78/3/0780455.pdf?expires=1528335159&id=id&accname=guest&checksum=9E43B1E0A987D6F494EF2ABF0D0EDFB1>
19. Mitigating the threat of artemisinin resistance in Africa: improvement of drug-resistance surveillance and response systems. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23099083>
20. OMS. Chimioprévention du paludisme saisonnier par administration de sulfadoxine-pyriméthamine et d'amodiaquine aux enfants: guide de terrain [Internet]. 2013 [cité 7 juin 2018]. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur:
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85727/9789242504736_fre.pdf?sequence=1
21. COULYBALY B. Paludisme de l'enfant de moins de 5ans dans le service de pédiatrie du centre de santé le référence de la commune1 du district de Bamako. [Thèse de doctorat Médecine]. [Bamako]: Université de Bamako; 2012.
22. CZEHER C. Distribution national des moustiquaires imprégnés d'insecticide au Niger : effets sur les anophèles vecteurs. [Thèse de doctorat (Biologie)]. [Versailles]: université de Versailles Saint-Quentin-EN-YVELLINES; 2010.
23. A-Elbasit IE, Alifrangis M, Khalil IF, Bygbjerg IC, Masuadi EM, Elbashir MI, et al. The implication of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase gene mutations in modification of Plasmodium falciparum characteristics. Malar J [Internet]. 2007 [cité 18 avr 2018];6(1):108. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur:
<http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-6-108>
24. Organización Mundial de la Salud. OMS. World Malaria Report [Internet]. Ginebra (Suiza): World Health Organization; 2009 [cité 11 mars 2017]. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur:

<https://www.google.com/search?q=World+Health+Organization%3B+2009.&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab>

25. Grais RF, Laminou IM, Woi-Messe L, Makarimi R, Bouriema SH, Langendorf C, Amambua-Ngwa A, D'Alessandro U, Guérin PJ, Fandeur T, Sibley CH. Molecular markers of resistance to amodiaquine plus sulfadoxine–pyrimethamine in an area with seasonal malaria chemoprevention in south central Niger [Internet]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5830055/>
26. Poreko Diallo ML. Etudiants subsahariens à Toulouse et prévention du paludisme d'importation. [thèse de doctorat Médecine]. [TOULOUSE]: université Toulouse 3-Paul SABATIER;
27. Menéndez et al. Malaria Prevention with IPTp during pregnancy reduces neonatal mortality [Internet]. 2010. Disponible sur: mail.Chon.Santé.gov.ml»docs
28. 3-systemes_vectoriels.pdf[Internet] [Internet]. 2015. Disponible sur: Disponible sur: http://www.suds-en-ligne.ird.fr/paludisme/pdf/3-systemes_vectoriels.pdf
29. Paludisme [Internet]. 2012. Disponible sur: <http://www.infectiologie.org.tn»cmi>
30. Paludisme : cycle - MemoBio [Internet]. Disponible sur: http://www.memobio.fr/html/para/pa_pa_cy.html
31. OMS. RAPPORT SUR LE PALUDISME DANS LE MONDE 2016 [Internet]. Genève; 2017 [cité 7 juin 2018]. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/malaria-report-response/fr/>
32. WHO (2012). Intermittent Preventive Treatment of malaria in pregnancy (IPTp) with Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP). WHO Headquarters Geneva: World Health Organization, 2012.; 2012 juill.
33. Sicuri E. et al.(2010). Cost-effectiveness of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy in southern Mozambique.
34. Eiele TP. et al.(2012). Malaria prevention in pregnancy, birth weight, and neonatal mortality: a meta-analysis of 32 national cross-sectional datasets in Africa. 2012.

35. WHO (2011). World Malaria Report 2011. Geneva: World Health Organization.;
36. Professeur Pierre Aubry, Docteur Bernard, -, Alex Gaüzère. Medecine Tropicale : Paludisme [Internet]. 2017 [cité 10 déc 2017]. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: www.medecinetropicale.com
37. Pr. E. Pichard. Semaine thématique paludisme IFMT Vientiane Laos [Internet]. Faculté de Médecine d'Angers; 2003 [cité 10 janv 2018]. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: <http://docplayer.fr/21375046-Antipaludiques-semaine-thematique-paludisme-ifmt-vientiane-laos-8-12-decembre-2003-pr-e-pichard-faculte-de-medecine-d-angers.html>
38. Jongwutiwes S, Tanabe K, Nakazawa S, Yanagi T, Kanbara H. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in P190 (MSA-1) of Plasmodium falciparum from field isolates. Molecular and Biochemical Parasitology [Internet]. mars 1992 [cité 6 juin 2018];51(1):81-9. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016668519290203V>
39. Institut Pasteur de Madagascar. Séquence complète du génome de Plasmodium falciparum: intérêts pour l... [Internet]. Santé & Médecine présenté à; 07:30:41 UTC [cité 25 juin 2018]. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: <https://fr.slideshare.net/atelier-paludisme/app-2007-safious2>
40. Gan LSH, Loh JP. . Rapid identification of chloroquine and atovaquone drug resistance in Plasmodium falciparum using high-resolution melt polymerase chain reaction. 2010;5. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881075/>
41. Le Bras J, Musset L, Clain J. . Les résistances aux médicaments antipaludiques. Médecine et Maladies Infectieuses [Internet]. 1 août 2006 [cité 12 juin 2018];36(8):401-5. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X06001314>
42. Institut Pasteur de Madagascar. Mécanismes de résistance des plasmodies aux antipaludiques [Internet]. Santé & Médecine présenté à; 01:48:28 UTC [cité 15 juin

- 2018]; Madagascar. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: https://fr.slideshare.net/atelier-paludisme/app-2007-abdallis5?next_slideshow=1
43. Institut Pasteur de Madagascar. Mécanismes de résistance de Plasmodium aux antifolates [Internet]. Santé & Médecine présenté à; 2011 [cité 15 juin 2018]; Madagascar. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: https://fr.slideshare.net/atelier-paludisme/app-2011s2-noromalalanoelisoa?next_slideshow=2
44. WORLDWIDE ANTIMALARIAL RESISTANCE NETWORK. Résistance aux médicaments antipaludiques : Vue d'ensemble | WorldWide Antimalarial Resistance Network [Internet]. [cité 9 juin 2018]. Disponible sur: [Internet]. Disponible sur: <http://www.wwarn.org/fr/propos-de-nous/resistance-aux-medicaments-antipaludiques-vue-densemble>
45. Hwang J, Jaroensuk J, Leimanis ML, Russell B, McGready R, Day N, Snounou G, Nosten F, Imwong M: Long-term storage limits PCR-based analyses of malaria parasites in archival dried blood spots. *Malar J.* 2012, 11: 339-10.1186/1475-2875-11-339.
46. Cnops L, Boderie M, Gillet P, Van Esbroeck M, Jacobs J. Rapid diagnostic tests as a source of DNA for Plasmodium species-specific real-time PCR. *Malar J.* 2011;10:67.
47. Ishengoma DS, Lwitiho S, Madebe RA, Nyagonde N, Persson O, Vestergaard LS, et al. Using rapid diagnostic tests as source of malaria parasite DNA for molecular analyses in the era of declining malaria prevalence. *Malar J.* 2011;10:6.
48. Veron V, Carme B. Recovery and use of Plasmodium DNA from malaria rapid diagnostic tests. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:941-3.
49. Daniels R, Ndiaye D, Wall M, McKinney J, Séné PD, Sabeti PC, Volkman SK, Mboup S, Wirth DF. Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with drug resistance in Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. juin 2012 [cité 6 juin 2018];56(6):2976-86. Disponible sur: Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430961>
50. Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC. Plasmodium falciparum: Detection of Polymorphisms in the Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthetase Genes by PCR and Restriction Digestion. *Experimental Parasitology* [Internet]. 1 mai 1998 [cité 4

juin2018];89(1):1-8.Disponible sur: Disponible sur:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489498942746>

51. High prevalence of mutation in the *Plasmodium falciparum* *dhfr* and *dhps* genes in field isolates from Sabah, Northern Borneo | *Malaria Journal* | Full Text [Internet]. [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: Disponible sur:
<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-198>
52. Ihle MA, Fassunke J, König K, Grünewald I, Schlaak M, Kreuzberg N, Tietze L, Schildhaus H-U, Büttner R, Merkelbach-Bruse S. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer* [Internet]. 10 janv 2014 [cité 4 juin 2018];14:13. Disponible sur: Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-13>
53. Diarra Y. Etude d'efficacité des antipaludiques : cas de l'artemether-lumefantrine et la chloroquine dans la commune rurale de Dioro [Internet] [[thèse de pharmacie]. [Mali]: 2016]. USTTB/Faculté de Pharmacie; Disponible sur:
<http://www.keneya.net/fmpos/theses/2016/pharma/pdf/16P05.pdf>
54. Cisse M, Awandare GA, Soulama A, Tinto H, Hayette M-P, Guiguemdé RT. Recent uptake of intermittent preventive treatment during pregnancy with sulfadoxine–pyrimethamine is associated with increased prevalence of *Pfdhfr* mutations in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Malaria Journal* [Internet]. 23 janv 2017 [cité 5 juin 2018];16:38. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1695-1>
55. Yavo W, Konaté A, Mawili-Mboumba DP, Kassi FK, Mbuyi T, L M, Angora EK, Menan EIH, Bouyou-Akotet MK. Genetic Polymorphism of *msp1* and *msp2* in *Plasmodium falciparum* Isolates from Côte d'Ivoire versus Gabon [Internet]. *Journal of Parasitology Research*. 2016 [cité 5 juin 2018]. Disponible sur:
<https://www.hindawi.com/journals/jpr/2016/3074803/>
56. OMS. Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. [Internet]. Genève: World Health Organization; 2008 [cité 6 juin 2018]. [Internet]. Disponible sur:

http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43824/9789241596305_eng.pdf?sequence=1.

57. Woï L, Amambua NA, Laouali MM, Grais RF. Evaluation de la résistance moléculaire de *plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine chez les enfants de moins de 5 ans, Madarounfa, région de Maradi au Niger. [cité 12 déc 2017];1. Disponible sur: <https://www.google.com/search?q=Evaluation+de+la+r%C3%A9sistance+mol%C3%A9culaire+de+plasmodium+falciparum+%C3%A0+la+sulfadoxine+E2%80%90pyrim%C3%A9thamine+chez+les+enfants+de+moins+de+5+ans%2C+Madarounfa%2C+r%C3%A9gion+de+Maradi+au+Niger.+%3A&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab>
58. Ndiaye YD, Diédhiou CK, Bei AK, Dieye B, Mbaye A, Mze NP, et al. High resolution melting: a useful field-deployable method to measure *dhfr* and *dhps* drug resistance in both highly and lowly endemic *Plasmodium* populations. *Malar J* [Internet]. déc 2017 [cité 19 avr 2018];16(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-1811-2>
59. Pyramide des âges -Mali - [Internet]. [cité 4 juin 2018] [Internet]. Disponible sur: <http://perspective.usherbrooke.ca/bilan/servlet/BMPPagePyramide?codePays=MLI&annee=2015>
60. Ibrahim Arzika; Mahamane Moustapha Lamine ; Aboubacar Mahamadou; HALIMA Zamanka ; Ibrahim Maman Laminou. ETUDE DU POLYMORPHISME GENETIQUE DES SOUCHES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* AUNIGER *Revue CAMES SANTE*. cité juillet 2017. Disponible sur: <https://www.researchgate.net/publication/320101005>
61. Atroosh WM, Al-Mekhlafi HM, Mahdy MA, Saif-Ali R, Al-Mekhlafi AM, Surin J. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates from Pahang, Malaysia based on *MSP-1* and *MSP-2* genes. *Parasit Vectors* [Internet]. 13 déc 2011 [cité 4 juin 2018];4:233. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3264521/>
62. Huang B, Tuo F, Liang Y, Wu W, Wu G, Huang S, Zhong Q, Su X, Zhang H, Li M, Bacar A, Abdallah KS, Mliva AMSA, Wang Q, Yang Z, Zheng S, Xu Q, Song J, Deng C. Temporal changes in genetic diversity of *msh-1*, *msh-2*, and *msh-3* in *Plasmodium falciparum* isolates from Grande Comore Island after introduction of ACT. *Malaria*

- Journal [Internet]. déc 2018[cité5juin2018];17(1). Disponible sur:
<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-018-2227-3>
63. Mohammed H, Mindaye T, Belayneh M, Kassa M, Assefa A, Tadesse M, Woyessa A, Mengesha T, Kebede A. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates based on MSP-1 and MSP-2 genes from Kolla-Shele area, Arbaminch Zuria District, southwest Ethiopia. *Malar J* [Internet]. 14 févr 2015;14:73. Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889847>
64. Mawili-Mboumba DP, Mbondoukwe N, Adande E, Bouyou-Akotet MK. Allelic Diversity of MSP1 Gene in *Plasmodium falciparum* from Rural and Urban Areas of Gabon. *Korean J Parasitol.* août 2015;53(4):413-9.
65. Djimde M. Efficacité in vivo de trois antipaludiques (Sulfadoxine-Pyriméthamine, Méfloquine et Artéméther-Luméfantrine) dans le traitement du paludisme non compliqué chez les enfants de 6 – 59 mois à Koro (Mopti) [Internet] [thèse de medecine]. FMPOS; 2008 [cité 21 avr 2018]; Disponible sur:
<http://www.keneya.net/fmpos/theses/2008/med/pdf/08M258.pdf>
66. Wurtz N, Fall B, Pascual A, Diawara S, Sow K, Baret E, Diatta B, Fall KB, Mbaye PS, Fall F, Diémé Y, Rogier C, Bercion R, Briolant S, Wade B, Pradines B. Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Dakar, Senegal. *Malaria Journal* [Internet]. 2012 [cité 5 juin 2018];11(1):197. Disponible sur:
<http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-197>
67. Nasserline Papa Mze Yaye Die NdiayeCyrille K. DiedhiouSilai RahamatouBaba DieyeRachel F. Daniels. RDTs as a source of DNA to study *Plasmodium falciparum* drug resistance in isolates from Senegal and the Comoros Islands 2012-2013.[29 sept. 2015 ; INTERNET]
68. Huang F, Tang L, Yang H, Zhou S, Liu H, Li J, Guo S. Molecular epidemiology of drug resistance markers of *Plasmodium falciparum* in Yunnan Province, China. *Malaria Journal* [Internet]. 2012 [cité 4 juin 2018];11(1):243. Disponible sur:
<http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-243>

69. Alassane Dicko, Issaka Sagara, Abdoulaye A Djimdé, Sidy O Touré, Mariam Traore, Souleymane Dama ,Abdoulbaki I Diallo , Amadou Barry , Mohamed Dicko , Oumar M Coulibaly, Christophe Rogier, Alexandra de Sousa, Ogobara K Doumbo. Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine one year after implementation of intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/40906840_Molecular_markers_of_resistance_to_sulfadoxinepyrimethamine_one_year_after_implementation_of_intermittent_preventive_treatment_of_malaria_in_infants_in_Mali [INTERNET]Jan. 10, 2010
70. Diawara F, Steinhardt LC, Mahamar A, Traore T, Kone DT, Diawara H, Kamate B, Kone D, Diallo M, Sadou A, Mihigo J, Sagara I, Djimde AA, Eckert E, Dicko A. Measuring the impact of seasonal malaria chemoprevention as part of routine malaria control in Kita, Mali. *Malar J.* 10 août 2017;16(1):325.
71. Amor A, Toro C, Fernández-Martínez A, Baquero M, Benito A, Berzosa P. Molecular markers in *Plasmodium falciparum* linked to resistance to anti-malarial drugs in samples imported from Africa over an eight-year period (2002-2010): impact of the introduction of artemisinin combination therapy. *Malaria Journal* [Internet]. 2012 [cité 5 juin 2018];11(1):100. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-100>
72. Gama BE, Pereira-Carvalho GA, Lutucuta Kosi FJ, Almeida de Oliveira NK, Fortes F, Rosenthal PJ, do Rosário VE, Daniel-Ribeiro C, Fátima Ferreira-da-Cruz M. Molecular markers of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Luanda, Angola. *Malaria Journal* [Internet]. 2011 [cité 5 juin 2018];10(1):248. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-10-248>

ANNEXES

FICHE SIGNALETIQUE

Nom : MAMANE IDE

Prénom : Rabiadou

Tel : (00227) 92901266 E-mail : rabiamaira1.4@gmail.com

Titre de la thèse : Etude comparative des mutations sur les gènes *dhfr* et *dhps* de *Plasmodiumfalciparum* après les campagnes de chimioprévention saisonnière 2016-2017 au Niger et au Mali.

Nationalité : Nigérienne

Année Universitaire : 2018-2019

Ville de soutenance : Bamako-Mali

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

Secteur d'intérêt : Parasitologie Moléculaire, Santé publique, Pharmacologie.

RESUME

L'administration massive et continue de la SP crée une pression médicamenteuse qui peut engendrer l'apparition des mutations sur les *Pfdhfr* et *Pfdhps*. D'où la recommandation par l'OMS de procéder à la surveillance des molécules inscrites dans le traitement du paludisme dans les zones d'endémies palustres. Nous avons mené une étude comparative de la distribution des mutations sur les gènes *Pfdhfr* 51/59 et *Pfdhps* 436/437 dans les localités de Missira et de Sélingué au Mali et les localités d'Aguie et Ertcharna au Niger en 2016-2017. L'étude s'est déroulée durant la période des campagnes de chimioprévention du paludisme saisonnier en 2016-2017 chez des enfants de moins de 5 ans ayant reçu les doses d'amodiaquine plus la sulfadoxine-pyriméthamine. Tous les patients se présentant au centre de santé et appartenant à cette cohorte ont été dépistés par goutte épaisse et par test rapide de diagnostic à la recherche d'éventuels cas de paludisme. Pour les cas positifs à la goutte épaisse, un prélèvement veineux a été effectué et conservé à -80°C pour les tests *in vitro* puis sur papiers confettis et pour les tests de diagnostic rapide (TDR) des échantillons de sang obtenus de bout de doigt ont été testés par la technique d'immuno-capture. L'ADN du parasite

a été extrait à partir du papier confettis et des cassettes de TDR. La multiplicité de l'infection a été estimée en utilisant le marqueur polymorphique *msp1* et la recherche des marqueurs de résistance a été faite par HRM. Sur un total de 201 échantillons dont 90 provenant du Mali et 111 provenant du Niger. L'allotype RO33 était le plus représenté avec un pourcentage de (47%) suivi de l'allotype K1 (34%) et l'allotype MAD20 (19%). La multiplicité de l'infection a été estimée à environ 2 génotypes par patient au Mali et 1 génotype par patient au Niger. La prévalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* aux positions 51, 59 et 436, 437 étaient respectivement 64,4% ; 60% ; 24,5% et 48,1%. Cependant les mutations multiples avaient une prévalence faible inférieure à 20% sauf la triple mutation sur le gène *Pfdhps* (30,17%). Cette étude nous montre un nombre élevé de mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*, ce qui suggère aux acteurs de la santé un suivi continu de l'efficacité de ces molécules utilisées par le Programme national dans la prévention du paludisme au Mali et au Niger.

Mots clés : Prévalence, mutations, HRM, *Pfdhfr* et *Pfdhps*

IDENTIFICATION SHEET

Last Name:MAMANE IDE

First Name:Rabiatou

TEL : (00227) 92901266 E-mail: rabiamaira1.4@gmail.com

Title:Etude comparative des mutations sur les gènes *dhfr* et *dhps* de *Plasmodium falciparum* après les campagnes de chimioprévention saisonnière 2016-2017 au Niger et au Mali.

Academic Year: 2018-2019

City of defense: Bamako-Mali

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

Focus area:Molecular Parasitology, Public Health, and Pharmacology.

ABSTRACT

The massive and continuous administration of SP creates a drug pressure that can lead to the observation of mutations on *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes. Hence, it is recommended by WHO to continue drugs resistance monitoring for the molecules listed in the treatment of malaria cases in endemic areas. We conducted a prospective study of the distribution of mutations on the *Pfdhfr* 51/59 and *Pfdhps* 436/437 genes in the localities of Missira and Sélingué in Mali and the localities of Aguié and Ertcharna in Niger in 2016-2017. The study was conducted during the period of the Seasonal malaria chemoprevention campaigns in 2017 within children less than 60 months of age who received doses of amodiaquine and sulphadoxin-pyrimethamine. Children from 3 to 59 months were identified prior to SMC. All patients presenting to the health center and belonging to this cohort were screened by a thick smear and rapid diagnostic test for possible malaria cases. For positive smear cases, a venous sample was taken and stored at -80°C for in vitro tests and then dried blood spots are made using filter papers. Parasite DNA was extracted from filter paper using Qiagen® and for rapid diagnostic test of fingertip blood samples were tested by immuno-capture technique. The multiplicity of infection has been estimated using the *msp1* polymorphic marker and samples have been scanned for resistance mutations using the HRM method. Out of a total of 201 samples including 90 from Mali and 111 from Niger participated in this study. The RO33 allotype was the most frequent with 47% followed by the K1 allotype with 34% then the MAD20 allotype with 19%. The

multiplicity of infection has been estimated at about 2 genotypes per patient in Mali and 1 genotypes per patient in Niger. The prevalence of mutations on the *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes at positions 51, 59 and 436, 437 were respectively 64, 4% ; 60% then 24,5% and 48,1%. However, the multiple mutations had a low prevalence of less than 20% except for the triple mutation on the *Pfdhfr* gene 30, 17%. This study showed us a high number of mutations on the *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes, which suggests to the actors of the health a continuous follow-up of the effectiveness of these molecules used by the National Program in the prevention of Malaria in Mali and in Niger.

Key words: Prevalence, mutations, HRM, Pfdhfr and Pfdhps

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens, et de mes condisciples :

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

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

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

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

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

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

Je le jure!