

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI

\*\*\*\*\*

Un peuple - Un but - Une foi

UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES ET DES  
TECHNOLOGIES DE BAMAKO



U.S.T.T.B.

FACULTE DE PHARMACIE



Année universitaire 2019-2020

N°...../

**Prévalence des mutations sur le gène  
*Kelch 13* de *Plasmodium falciparum* à  
Dioro et Sélingué, au Mali**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le 31/10/ 2020 à la faculté de pharmacie  
pour l'obtention du grade de docteur en pharmacie (diplome d'état)

par

**Béatrice TOGO**

**JURY**

**Président** : Professeur Mouctar DIALLO

**Membres** : Docteur Moussa BM CISSÉ;

Professeur Mamadou WÉLÉ

**Co-directeur de thèse** : Professeur Lansana SANGARÉ

**Directeur de thèse** : Professeur Ousmane KOITA

# LISTES DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE ANNÉE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

## ➤ ADMINISTRATION

**DOYEN** : Boubacar TRAORE, Professeur

**VICE-DOYEN** : Sékou BAH, Maître de Conférence

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

**AGENT COMPTABLE** : Ismaël CISSE, Contrôleur des Finances.

## ➤ PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Mahamadou	CISSE	Biologie
4	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
5	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
6	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
7	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
8	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
9	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
10	Alou A.	KEÏTA	Galénique
11	Mamadou	KONE	Physiologie
12	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
13	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
14	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
15	Saïbou	MAÏGA	Législation
16	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
17	Sékou Fatamady	TRAORE	Zoologie

➤ **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	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie – Mycologie
7	Amagana	DOLO	Parasitologie – Mycologie
8	Akory Ag	IKNANE	Santé publique / Nutrition
9	Ousmane	KOITA	Biologie moléculaire
10	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

**2. MAÎTRES DE CONFERENCES/MAÎTRES DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
2	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/Bio-Statistique
3	Bourèma	KOURIBA	Immunologie <b>Chef de DER</b>
4	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
5	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
6	Ousmane	TOURE	Santé publique/ Santé environnement

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

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique
6	Antoine	DARA	Biologie moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie- Mycologie
8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie microbienne
10	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie clinique
11	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOÏTA	Biochimie clinique
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé publique
16	Almoustapha Issiaka	MAIGA	Bactériologie-Virologie
17	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
18	Fanta	SANGHO	Santé publique/Santé communautaire
19	Oumar	SANGARE	Epidémiologie

#### 4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Falaye	KEÏTA	Santé publique/Santé environnement
6	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
7	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
8	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

#### ➤ DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

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

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

##### 2. MAÎTRES DE CONFERENCES/MAÎTRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

##### 3. MAÎTRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

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

#### 4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

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

#### ➤ DER : SCIENCES DU MÉDICAMENT

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

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie analytique
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

##### 2. MAÎTRES DE CONFERENCES/MAÎTRES DE RECHERCHE

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

##### 3. MAÎTRES ASSISTANTS/CHARGÉS 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	Madani	MARIKO	Chimie analytique
6	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

#### 4. ASSISTANTS/ATTACHÉS DE RECHERCHE

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

#### ➤ DER : SCIENCES FONDAMENTALES

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

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
2	Mahamadou	TRAORE	Génétique

##### 2. MAÎTRES DE CONFÉRENCES/MAÎTRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée

##### 3. MAÎTRES ASSISTANTS/CHARGÉS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mamadou lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
2	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
3	Boureima	KELLY	Physiologie médicale

##### 4. ASSISTANTS/ATTACHÉS 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

➤ **CHARGÉS DE COURS (VACATAIRES)**

<b>N°</b>	<b>PRENOMS</b>	<b>NOM</b>	<b>SPECIALITE</b>
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba	COULIBALY	Droit commercial
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Moussa I	DIARRA	Biophysique
7	Babacar	DIOP	Chimie organique
8	Aboubakary	MAÏGA	Chimie organique
9	Massambou	SACKO	SCMP/SIM
10	Modibo	SANGARE	Anglais
11	Satigui	SIDIBE	Pharmacie vétérinaire
12	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
13	Fana	TANGARA	Mathématiques
14	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
15	Mamadou B	TRAORE	Physiologie
16	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

# **DEDICACE**

Je dédie cette thèse à ma maman Yatimé Salomé TOGO.

# REMERCIEMENTS

## À Dieu

Je ne pourrai jamais remercier assez Dieu pour tout ce qu'il a fait pour moi : Il m'a guidée, protégée et aidée chaque jour de ma vie.

## À mon père Ankougnon Théodore TOGO

Tu as été un grand *Dede* (papa en dogon) et un bon exemple à suivre. Considérant que les études et le travail constituent le chemin vers la réussite, tu ne cesses de nous rappeler les phrases de Jean de la Fontaine : « Travaillez, prenez de la peine : c'est le fonds qui manque le moins ».

Merci pour ton soutien, tes conseils et pour l'éducation reçue. Pour finir, je te souhaite une longue vie, une bonne santé sous la protection du Seigneur.

## À ma mère Yatimé Salomé TOGO

Mère très attentionnée, tout comme notre père, tu considères les études très importantes et tu n'as jamais cessé de nous encourager. Merci pour ton amour et ta patience.

## À ma sœur Brigitte, à mes frères Bruno et Iguéré Serge et à mon oncle Abbé Amadou Kizito TOGO

Avec vous je ne me suis jamais sentie seule. Vous m'avez toujours soutenu. Merci pour tout.

## À mes cousins et cousines

Merci pour le soutien.

## À mes amis de la Faculté de pharmacie et de médecine

Chantal DENA; Fatoumata SININTA; Noëllie DIARRA; Moctar Alpha Baba ALDJOUBARKOYE; Salimata DEMBELE; Fanta SANOGO et Salifou TRAORE

Merci pour les moments de joie et d'entre-aide.

## À mon aîné Docteur Marcel TEMBELY

Merci pour ton accompagnement durant mon cycle universitaire.

## À Docteur Lassina DOUMBIA et Ibrahim KEÏTA

Merci de nous avoir aidé dans l'analyse des données et l'élaboration du document.

## À tout le personnel du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA)

Vous avez été des mentors et une aide précieuse. Cette thèse est la vôtre; merci pour tout.

## À tous mes collègues de la 10<sup>ème</sup> promotion et en particulier celles présentes au LBMA

Merci pour le soutien dans le travail et les moments passés au laboratoire.

## **HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY**

### **À notre Maître et Président du Jury**

**Professeur Mouctar DIALLO**

- **Titulaire d'un Doctorat (PhD) en parasitologie entomologie médicale;**
- **Professeur de parasitologie/mycologie à la Faculté de Pharmacie (FAPH);**
- **Responsable de l'Unité de diagnostic parasitaire au Malaria Research and Training Center (MRTC) à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (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 admiré vos qualités scientifiques, pédagogiques et humaines tout au long de notre formation.

Veillez accepter l'expression de notre profonde reconnaissance.

## **À notre Maître et juge**

**Docteur Moussa BM CISSÉ**

- **Maître de conférences;**
- **Entomologiste Enseignant/Chercheur à l'Institut Polytechnique Rural de Formation et de Recherche Appliquée de Katibougou;**
- **Chef de l'Unité d'Entomologie du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) de l'Université des Sciences Techniques et des Technologies de Bamako.**

Cher Maître, nous sommes honorés que vous ayez accepté de juger ce travail.

Vous nous avez montré par votre savoir faire que toutes les générations ont leur place dans la recherche, et cela nous motive davantage.

Nous vous souhaitons une longue et fructueuse carrière professionnelle.

## **À notre Maître et juge**

**Professeur Mamadou WÉLÉ**

- **Professeur de Biochimie/ Biologie moléculaire;**
- **Enseignant à l'Institut des Sciences Appliquées (ISA);**
- **Enseignant à la Faculté de Médecine;**
- **Directeur de l'ISA;**
- **Directeur du Centre africain d'Excellence en bio-informatique.**

Cher Maître, du haut de votre grande taille et, en tant que directeur et enseignant, vous m'avez impressionnée lors de mon premier contact avec vous à l'ISA dans le cadre de cette thèse. C'est un honneur pour moi que vous ayez accepté de juger ce travail.

## **À notre Maître et Co-directeur de thèse**

**Professeur Lansana SANGARÉ**

- **Maître de conférences en Parasitologie à la Faculté des Sciences et Technique (FST);**
- **Chargé des cours de biologie moléculaire au département de biologie à la FST;**
- **Chef de l'unité de Parasitologie au LBMA.**

Cher Maître, permettez-nous de vous remercier pour le travail accompli durant cette thèse. Votre disponibilité, votre modestie et votre ouverture au monde des apprenants vous procurent respect et considération.

## **À 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 FAPH;**
- **Ancien Directeur-Adjoint du SEREFO;**
- **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Appliquée de la FST.**

Cher Maître, nous avons été séduits par votre approche scientifique, pédagogique et humaine. Vous avez été ouvert aux étudiants, à la formation et à la recherche. Merci pour votre accompagnement.

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES .....	xvi
LISTE DES TABLEAUX .....	xvii
ABRÉVIATIONS .....	xviii
Introduction .....	1
1. Objectifs .....	3
1.1 Objectif général .....	3
1.2 Objectifs spécifiques.....	3
2. Généralité .....	4
2.1 L'évolution et la typologie du paludisme .....	4
2.2 Le vecteur du paludisme .....	9
2.3 Le parasite.....	11
2.3.1 Le <i>Plasmodium</i> comme agent causal du paludisme.....	11
2.3.2 Les espèces Plasmodiales responsables du paludisme chez l'homme.....	12
2.3.3 Le cycle biologique de <i>Plasmodium</i> .....	14
2.4 Les moyens de lutte contre le paludisme .....	17
2.5 La classification des antipaludiques selon leur mode d'action .....	18
2.5.1 Les schizonticides sanguins .....	18
2.5.2 Les inhibiteurs des acides nucléiques .....	18
2.6 Les cibles plasmodiales et le mécanisme d'action des antipaludiques.....	19
2.6.1 Les cibles plasmodiales des antipaludiques .....	20
2.6.2 Le mécanisme d'action des antipaludiques.....	20
2.7 La résistance aux antipaludiques .....	22
2.8 Le support génétique de la résistance de <i>Plasmodium</i> .....	23
2.9 Les différents types de mutations .....	25
2.10 Les moyens de détection des mutations.....	26
2.11 La relation entre la mutation sur le gène <i>K13</i> de <i>P. falciparum</i> et la résistance à l'artémisinine.....	28
2.12 La clairance parasitaire de <i>P. falciparum</i> .....	30
2.13 Les marqueurs moléculaires associés à la résistance à l'artémisinine .....	31
3. Méthodologie.....	32
3.1 Le contexte de l'étude.....	32
3.2 Le type et la période d'étude .....	33
3.3 La description des sites de l'étude .....	33
3.4 La collecte des échantillons .....	35

3.5 Les critères de sélection des échantillons .....	35
3.6 La technique au laboratoire .....	36
3.6.1 L'extraction de l'ADN de <i>P. falciparum</i> .....	36
3.6.2 La PCR.....	36
3.6.3 Le séquençage du gène <i>PfK13</i> .....	37
3.7 L'analyse des séquences .....	37
3.8 La gestion et l'analyse des données.....	38
3.9 Les considérations éthiques et déontologiques.....	38
4. Résultats .....	39
4.1 Les échantillons de J0 à J3.....	40
4.2 Les échantillons de J7 à J42.....	45
4.3 Les échantillons de J0 à J42.....	46
5. Commentaires et discussion .....	48
6. Conclusion et recommandations .....	50
6.1 Conclusion .....	50
6.2 Recommandations.....	50
7. Références bibliographiques .....	51
8. Annexes.....	60
9. Fiche signalétique et résumé .....	66
❖ Fiche signalétique.....	66
❖ Résumé en français .....	66
10. Serment de Galien .....	68

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Distribution spatiale de <i>P. falciparum</i> .....	5
Figure 2. Prévalence moyenne parasitaire chez les enfants âgés de 2 à 10 ans ( <i>PfPR</i> <sub>2-10</sub> ) dans les districts de santé au Mali .....	8
Figure 3. Structure de mérozoïte de <i>P. falciparum</i> .....	11
Figure 4. Cycle biologique de <i>P. falciparum</i> .....	15
Figure 5. Cibles plasmodiales des antipaludiques .....	19
Figure 6. Apparition des premiers cas de résistance aux antipaludiques .....	22
Figure 7. Représentation schématique et structurale de <i>PfK13</i> et sa fonction putative d'adaptateur de substrat .....	29
Figure 8. Localisation de Dioro et Sélingué sur la carte du Mali .....	35
Figure 9. Répartitions des échantillons analysés en fonction de la quantité de l'ADN pour le séquençage .....	37
Figure 10. Répartition des échantillons en fonction du profil muté et sauvage du gène <i>PfK13</i> .....	40
Figure 11. Courbe de Kaplan-Meier pour le TCP des participants avec une goutte épaisse positive après le traitement avec AA versus AL .....	42
Figure 12. Courbe de Kaplan-Meier pour le TCF des participants après le traitement avec la combinaison AI et AA .....	44
Figure 13. Répartition des échantillons en fonction des sites de l'étude .....	46

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Faciès de transmission du paludisme au Mali .....	9
Tableau II : Taxonomie du vecteur de paludisme .....	10
Tableau III : Taxonomie de <i>Plasmodium</i> .....	12
Tableau IV : Marqueurs moléculaires de résistance des antipaludiques et cibles d'action [56][16] .....	25
Tableau V : Plan de suivi des enfants au cours des deux projets (ICEMR et PIM).....	32
Tableau VI : Les mutations identifiées sur le gène <i>PfK13</i> et les acides aminés correspondants .....	39
Tableau VII : Répartition des échantillons en fonction des mutations identifiées sur le gène <i>PfK13</i> .....	40
Tableau VIII : Répartition des mutations en fonction des sites de l'étude .....	41
Tableau IX : Répartition des mutations en fonction du temps de clairance parasitaire .....	41
Tableau X : Répartition des mutations en fonction du temps de clairance de la fièvre .....	43
Tableau XI : Répartitions des mutations en fonction des sites de l'étude .....	45
Tableau XII : Répartition des mutations en fonction de la molécule administrée .....	45
Tableau XIII : Répartition des mutations en fonction des sites de l'étude .....	46
Tableau XIV : Répartition des mutations en fonction des mutations signalées par l'OMS ....	47
Tableau XV : Composition du mélange réactionnel de la 1 <sup>ère</sup> réaction .....	61
Tableau XVI : Composition du mélange réactionnel de la 2 <sup>ème</sup> réaction .....	62
Tableau XVII : Mélange réactionnel d'ExoSAP .....	63
Tableau XVIII : Composition du mélange réactionnel du séquençage.....	63

## **ABRÉVIATIONS**

**AA** : Artésunate-amodiaquine

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AL** : Artéméther-lumefantrine

**An.** : *Anopheles*

**ASACO** : Association de Santé Communautaire

**CDC** : Centers for Disease Control and Prevention (Centre pour le Contrôle et la Prévention des Maladies)

**CSCoM** : Centre de Santé Communautaire

**CTA** : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine

**DDNTP** : Didésoxyribonucléotides

**DHA** : Dihydroartémisinine

**DNTP** : Désoxyribonucléotides

**DRO** : Dérivé Réactif de l'Oxygène

**EDTA** : Ethylènediaminetétraacétique

**EXO** : Exonuclease

**GE** : Goutte Epaisse

**GWAS** : Genome-Wide Association Study (Etude d'association pangénomique)

**HGMD** : Human Gene Mutation Database (Base de données de mutations génétiques humaines)

**HRM** : High Resolution Melting (courbes de Fusion à haute résolution)

**ICEMR** : International Center of Excellence for Malaria Research (Centres Internationaux d'Excellence pour la Recherche sur le Paludisme)

**INSP** : Institut National de la Santé Publique

**IP** : Indice Plasmodique

**J** : Jour

**KREP** : Hélice à Répétition Kelch C-terminal

**K13R1** : K13 1<sup>ère</sup> Réaction

**K13R2** : K13 2<sup>ème</sup> Réaction

**LBMA** : Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée

**NGS** : Nouvelle Génération de Séquençage

**ODRS** : Office de Développement Rural de Sélingué

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**P.** : *Plasmodium*

**P** : Pourcentage

**PCR** : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)

**PH** : potentiel hydrogène

***Pfcr1*** : *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter

***Pfcytb*** : *Plasmodium falciparum* cytochrome *b*

***Pfdhfr*** : *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase

***Pfdhps*** : *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase

***PfK13*** : *Plasmodium falciparum* Kelch 13

***Pfmdr1*** : *Plasmodium falciparum* multi-drug resistance 1

***Pfnhe-1*** : *Plasmodium falciparum* sodium/hydrogen exchanger gene

***Pfserca*** : *Plasmodium falciparum* sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase

**PMI** : President's Malaria Initiative (Initiative du Président américain contre le paludisme)

**PNLP** : Programme National de Lutte contre le Paludisme

**SNP** : Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme d'un seul nucléotide)

**RPM**: Revolution Per Minute (Le tour par minute)

**RSA** : Ring-stage Survival Assay

**SAP** : Shrimp Alkaline Phosphatase

**TCF** : Temps de Clairance de la Fièvre

**TCP** : Temps de Clairance Parasitaire

**USA** : United States of America (États-Unis d'Amérique)

**USAID** : United States Agency for International Development (Agence des États-Unis pour le développement international)

**μL** : Microlitre.

# INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie fébrile due à un parasite du genre *Plasmodium* et qui se transmet habituellement par la piqûre du moustique (anophèles femelles infectées) [1]. Selon le rapport mondial 2018 sur le paludisme de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 219 000 000 cas de paludisme ont été rapportés dans le monde en 2017, avec 435 000 cas de décès global associés. Quinze (15) pays de l'Afrique subsaharienne et l'Inde ont eu 80 % de cas palustre. Les enfants de moins de 5 ans ont représenté 61 % de décès associés au paludisme. *P. falciparum* était l'espèce ayant causé le plus fort taux de mortalité en Afrique soit 99,7 % de cas rapportés [2]. La prévalence chez les enfants de 2 à 10 ans était de 16 % en 2015 dans les régions endémiques d'Afrique. Le paludisme reste l'une des principales causes de mortalité infantile, surtout en Afrique subsaharienne, tuant un enfant toutes les deux minutes [3].

Au Mali, selon le rapport d'activité de 2018 de la surveillance épidémiologique du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), 3 355 388 cas suspects ont été déclarés, 94 % ont pu être testés et 67 % ont été confirmés positifs à l'infection par le parasite. La morbidité et la mortalité attribuables chez les enfants de 0 à 5 ans étaient de 26,55 %. Les régions de Sikasso et de Ségou étaient les plus touchées par le paludisme [4].

Les moyens de lutte utilisés dans le monde contre le paludisme sont: la lutte anti-vectorielle, la chimio-prévention chez les enfants et les femmes enceintes, et le traitement curatif [3]. Toutefois, les progrès de lutte contre le paludisme sont menacés par la présence de certaines mutations qui ont été décrites comme étant responsables de la résistance du parasite à plusieurs médicaments antipaludiques [5][6] et plus récemment à l'artémisinine [6]. Le gène du domaine *propeller Kelch* de *Plasmodium falciparum* (*PfK13*) est le gène responsable de la résistance à l'artémisinine [7]. C'est un gène qui est situé sur le chromosome 13 de *P. falciparum*. Il code pour une protéine de 726 acides aminés constituée d'une région N-terminale spécifique à *Apicomplexa* et de trois domaines, dont le domaine de l'hélice à répétition Kelch C-terminal, qui abrite presque tous les allèles *PfK13* associés à la résistance à l'artémisinine [8]. Des mutations synonymes et non synonymes ont été observées sur le gène *PfK13* en Afrique [9] et en Asie. Les mutations R539T, I543T, Y493H, F446I, C580Y observées en Asie du Sud Est ont été associées à la résistance du parasite à l'artémisinine [10]. Si une résistance à l'artémisinine est apparue, on peut s'attendre à ce qu'elle suive les schémas historiques de résistance aux antipaludiques et se propage à l'échelle mondiale au

prix d'un immense coût pour la vie humaine [11] .

Au Mali, après le retrait de la chloroquine du à la chloroquinorésistance, les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine ont été adoptées en 2006 dans le traitement du paludisme simple. L'utilisation des CTA au niveau mondial dans les cas de paludisme simple était une recommandation de l'OMS. Aussi, dans le souci d'une meilleure utilisation et le maintien de leur efficacité thérapeutiques, l'OMS demande une surveillance des CTA afin de diminuer les risques d'apparitions de mutations qui pourraient être une cause de résistance du parasite surtout dans les régions exposées à l'infection palustre. Dioro et Sélingué sont deux localités riveraines du fleuve Niger au Mali. Elles comptent plusieurs cas d'infection palustre dans leur population respective. Les adultes et surtout les enfants sont les plus exposés au paludisme; cette transmission est favorisée par la présence de barrage et des aménagements hydro-agricoles.

Dans l'optique de faire une surveillance des médicaments antipaludiques, nous avons voulu examiner les mutations ponctuelles du gène *PfK13* qui seraient associées à un retard de clairance parasitaire dans deux sites au Mali.

# **1. OBJECTIFS**

## **1.1 Objectif général**

L'objectif général est d'évaluer la prévalence des mutations sur le gène *Kelch 13* de *P. falciparum* et leur association au temps de clairance parasitaire.

## **1.2 Objectifs spécifiques**

Les objectifs spécifiques sont :

- 1) Déterminer le temps de clairance parasitaire à Dioro et Sélingué
- 2) Déterminer la prévalence des mutations sur le gène *PfK13* à Dioro et Sélingué
- 3) Rechercher les mutations sur le gène *PfK13* associées à un retard de clairance parasitaire à Dioro et Sélingué

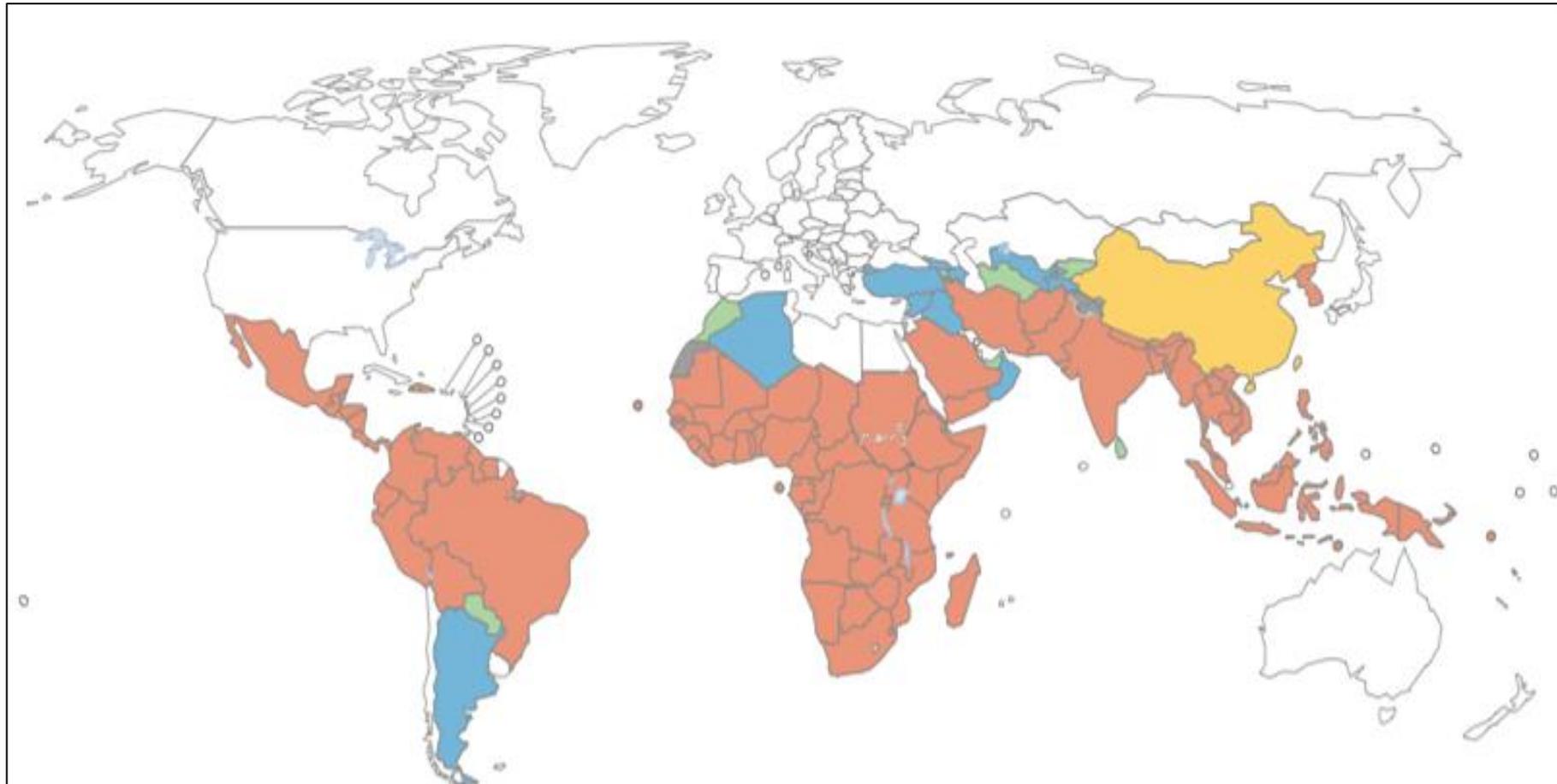
## 2. GENERALITE

### 2.1 L'évolution et la typologie du paludisme dans le monde

Le paludisme est une infection causée chez l'homme par des parasites eucaryotes unicellulaires du genre *Plasmodium* [12]. Cinq (5) espèces de *Plasmodium* humain (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malaria*, *P. vivax* et *P. knowlesi*) se transmettent d'une personne à une autre via la piqûre de moustiques femelles du genre *Anopheles* [13]. *P. knowlesi* était à l'origine une maladie zoonotique responsable du paludisme chez les macaques [14]. En 1965, il a été diagnostiqué chez un soldat américain affecté en Malaisie [15]. Récemment, *P. Cynomolgie* retrouvé chez les macaques (*Macaca fascicularis*), a été diagnostiqué chez une femme [14].

La résistance aux antipaludiques a fait son apparition pour la première fois avec la résistance du *Plasmodium* à la chloroquine en 1945 [16]. La résistance s'est étendue en touchant d'autres molécules antipaludiques tels que l'amodiaquine [17], la sulfadoxine, pyriméthamine [18], l'artémisinine [19]. Selon l'OMS, la résistance à l'artémisinine se traduit par une clairance lente du parasite *in vivo* (au sein de l'organisme) associée à la présence de mutations majeures dans le domaine *Kelch 13* de *P. falciparum* validé par les tests *in vitro* (en dehors de l'organisme) [20].

➤ La situation du paludisme dans le monde



Organisation mondiale de la santé

 Un ou plusieurs cas en 2017	 Zéro cas en 2017	 Zéro cas (≥3 ans) en 2017
 Certifié sans paludisme depuis 2000	 Pas de paludisme	 Non applicable

Figure 1. Distribution spatiale de *P. falciparum* [2].

En 2017, deux cent dix-neuf millions (219 000 000) cas de paludisme ont été rapportés au niveau mondial, soit une augmentation de trois millions (3 000 000) par rapport à 2016. Le nombre de décès associés avait atteint 435 000 cas [2]. L'Afrique demeure le continent avec le plus fort taux de mortalité lié au paludisme dans le monde soit 93 % [2]. Malgré les efforts de lutte, le taux de morbidité lié au paludisme était de 5 % dans la région d'Asie du Sud-Est et 2 % dans la région de la Méditerranée orientale [2] (**figure 1**).

D'après plusieurs études de recherche, un ensemble de 66 mutations non synonymes a été retrouvées par les auteurs dans la région de l'hélice contre 18 localisées à l'extérieure en Asie du Sud-Est. Les mutations non synonymes survenues en Afrique subsaharienne étaient au nombre de 22 parmi lesquels les mutations **K123R**, **N137S**, **T149S** ont été localisées en dehors du domaine propeller de **K13**. La mutation **K189T** a été trouvée en Afrique subsaharienne et en Inde [21]. les mutations **F446I** et **P574L** ont été fréquemment rapportées en Chine [22][21]. La résistance à l'artémisinine a été observée au Cambodge en Thaïlande et à Myanmar [7].

### ➤ **La situation du paludisme en Afrique**

L'Afrique est le continent le plus touché par le paludisme avec un taux global d'infection palustre le plus élevé dans le monde soit 92 % [23]. Cinq (5) pays en Afrique représentaient 49 % des décès associés dont le Nigéria (19 %), la République Démocratique du Congo (11 %), le Burkina Faso (6 %), la République-unie de Tanzanie (5 %), la Sierra Leone (4 %), et le Niger (4 %) en 2017. L'espèce *P. falciparum* est la plus répandue et infecte jusqu'à 99,7 % en Afrique [2]. Des cas de *P. vivax* ont été observés en Éthiopie [23].

Le continent africain observe plusieurs résistances aux antipaludiques tels que la résistance aux antifolates [24]; à l'amodiaquine; à la chloroquine [25]. Aucune des études réalisées au Burkina [26]; Congo [20]; Nigeria [27]; Togo [28]; Mali [29] n'ont aperçu de mutation associées à la résistance à l'artémisinine. Les CTA sont toujours efficaces dans les zones d'endémie palustre d'Afrique [2].

La mutation **V520A** du gène *PfK13* a été observée à Luzizila et Mweka dans une étude faite par Dieudonné Makaba Mvumbi *et al.* en 2014, aussi par Taylor *et al.* en 2015 en République Démocratique du Congo. Il semblerait que cette mutation soit fréquente chez les parasites africains dont la présence a été signalée en Gambie, au Mali, au Burkina Faso, au

Kenya, en Malawi [30]. Deux mutations P574L et A675V ont été observées au sud du Rwanda en 2015; ces mutations étaient plusieurs fois observées en Asie du Sud-Est et tous deux associées à une clairance parasitaire retardée [30].

➤ **La situation du paludisme au Mali**

*P. falciparum* est la première espèce responsable du paludisme au Mali, suivi de *P. malaria* et *P. Ovale*. Seul un cas de *P. vivax* a été décrit au Nord [31]. De nombreux efforts ont été employés à travers divers programmes de lutte contre le paludisme dans toutes les régions du Mali. Cependant, le paludisme simple demeure la première cause de consultation au Mali [32]. En 2017, sur 1 508 433 (64,2 %) cas confirmés au paludisme, les cas positifs survenus chez les enfants de moins de 5 ans était 36,94 % [4], ce qui démontre une infection élevée chez les enfants.

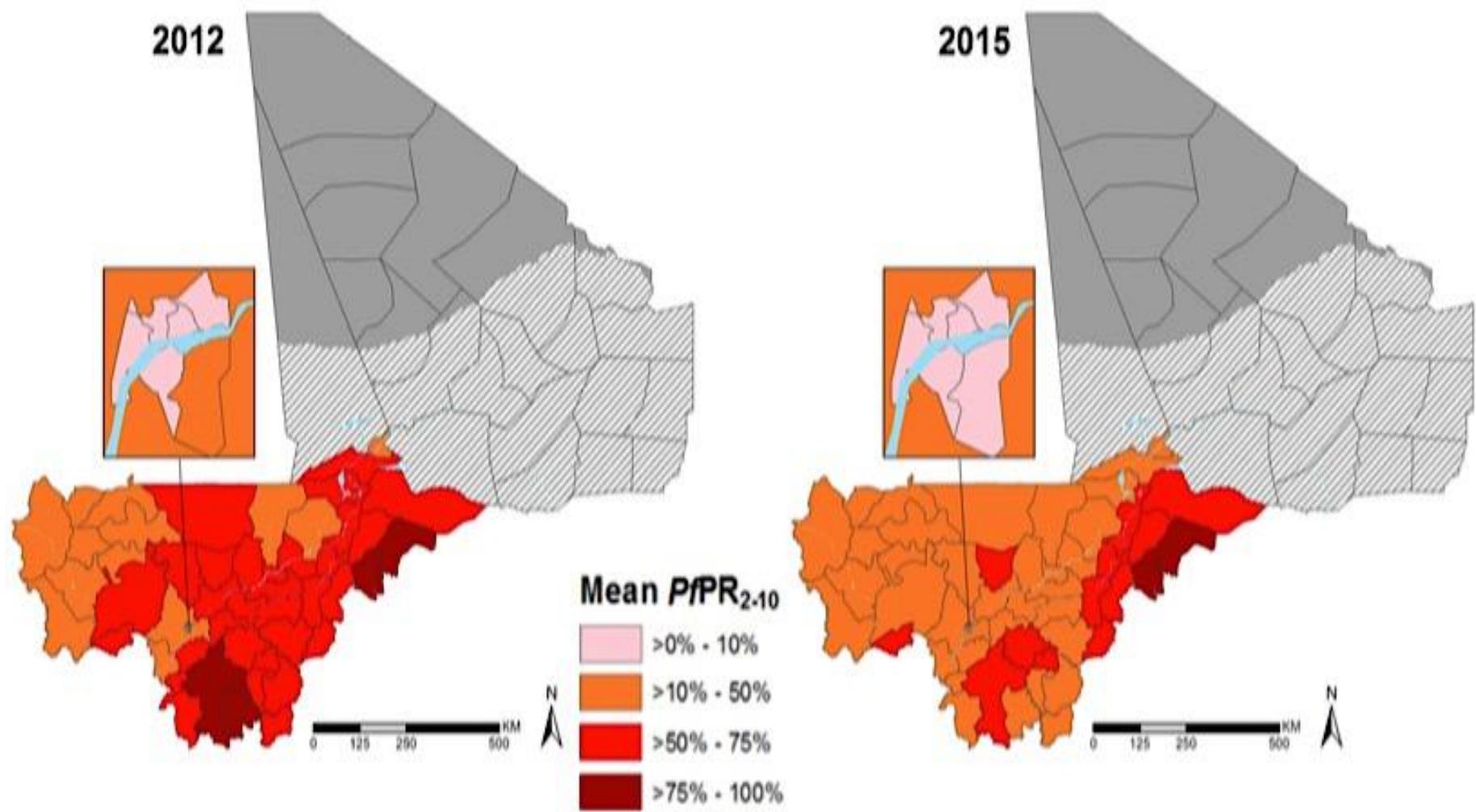


Figure 2. Prévalence moyenne parasitaire chez les enfants âgés de 2 à 10 ans ( $PfPR_{2-10}$ ) dans les districts de santé au Mali [33].

La transmission du paludisme au Mali est soumise à des variations extrêmes dues aux conditions éco-climatiques, surtout dans les régions du nord et du sud. Dans le désert saharien du nord, la transmission dépend des précipitations et est d'avantage sujette à des épidémies en raison de contraintes de conditions arides, toutes les classes d'âge étant considérées à risque de paludisme grave [33] (**figure 2**).

**Tableau I** : Faciès de transmission du paludisme au Mali [31]

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

Le Mali regroupe cinq (5) faciès de transmission du paludisme.

## 2.2 Le vecteur du paludisme

Les moustiques du genre *Anopheles* assurent la transmission du paludisme. Sur 490 espèces d'anophèles recensées, 60 à 70 espèces sont capables de transmettre le paludisme [34]. Sur le plan biologique, les femelles anophèles ne s'accouplent en général qu'une seule fois et conservent les spermés dans des spermathèques durant leur vie pour féconder les lots d'œufs. Elles piquent à la tombée de la nuit afin d'assurer le développement des œufs à travers le repas sanguin [35]. Les moustiques ont une vie aquatique au stade larvaire et une vie aérienne au stade adulte [35].

Le complexe *An. gambiae* et le groupe *An. funestus* sont les principaux vecteurs du paludisme au Mali [34]. L'espèce *An. gambiae* s.s est de 3 formes chromosomiques nommé Bamako, Savane et Mopti. La forme Mopti se rencontre dans les zones d'inondation du fleuve Niger; on trouve de même la forme Bamako dans les régions humides du Sud [31].

**Tableau II :** Taxonomie du vecteur de paludisme [36]

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

L'*Anopheles* est le vecteur du paludisme appartenant à la famille des culicidés (Culicidae). Les culicidés comptent environ 3 500 espèces reconnues [37].

## 2.3 Le parasite

### 2.3.1 Le *Plasmodium* comme agent causal du paludisme

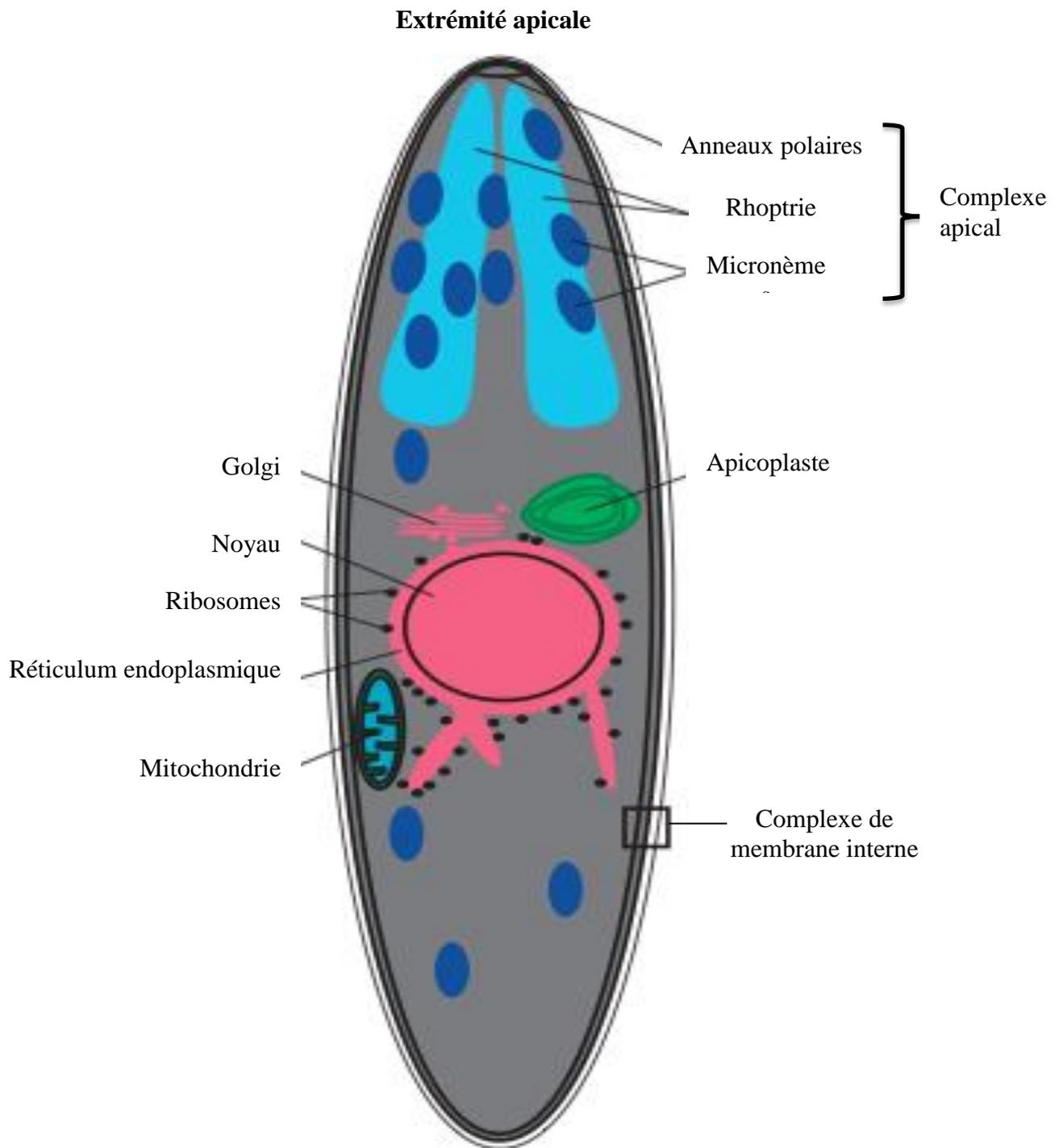


Figure 3. Structure de mérozoïte de *P. falciparum* [38].

Le *Plasmodium* est le parasite responsable du paludisme dans le monde. C'est un protozoaire parasite appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa*. Cet embranchement se caractérise par la présence d'un complexe apical généralement constitué d'un conoïde facilitant à la pénétration dans la cellule hôte, d'un anneau polaire et de rhoptries [39] (**figure 3**).

**Tableau III** : Taxonomie de *Plasmodium* [36]

Embranchement	Apicomplexa
Classe	Sporozoea
Sous-classe	Coccidia
Ordre	Eucoccida
Sous-ordre	Haemosporina
Famille	Plasmodidae
Genre	<i>Plasmodium</i>

*Haemosporina* représentent les parasites qui vivent dans le sang.

### 2.3.2 Les espèces Plasmodiales responsables du paludisme chez l'homme

#### ➤ *P. falciparum*

*P. falciparum* est l'espèce la plus répandue [3] en Afrique avec 99,7 % d'infections reporté par l'OMS en 2018 [2]. C'est l'espèce la plus meurtrière.

Au cours du stade sanguin de l'infection, *P. falciparum* possède une habilité à se fixer à l'endothélium en faisant une claustration des organes y compris le cerveau [40]. La maturation des gamétocytes durent environ 10 jours et devient par la suite infectieux pour les moustiques vecteurs [41].

Sur frottis sanguin mince coloré, les gamétocytes ont la forme de saucisse. Le nombre de mérozoïtes dans des shizontes érythrocytaires est de 8 à 24. Chez l'hôte la forme du parasite est ronde et souvent crénelé avec la tâche de Mauer. Toutes les cellules de l'hôte peuvent être infectées [42].

➤ ***P. ovale***

Stephens l'a décrit ovale comme indiquait sa morphologie. Le nombre de mérozoïtes supposés observés était 12 [43]. La parasitémie maximale atteignait rarement des niveaux suffisants pour induire des crises cliniques (< 800 parasites/ $\mu$ L) [44].

Sur frottis sanguin mince coloré, les érythrocytes infectés sont visibles avec granulation de Schüffner. Toutes les formes de parasites sont présentes au niveau du sang périphérique de l'hôte. Les anneaux sont larges. Le nombre de mérozoïtes dans un schizonte érythrocytaire est de 8 à 12 [42].

➤ ***P. malaria***

Le paludisme à *P. malaria* est plus courant dans les pays d'Afrique subsaharienne et dans le sud-ouest du Pacifique [44]. Il a été classé en Amérique du Sud dans les infections zoonotiques car génétiquement identique à *P. brasilianum* qui se trouve être un parasite de singe du nouveau monde [45]. *P. malaria* est considéré comme bénin. Il peut engendrer un syndrome néphrotique avec un échec thérapeutique entraînant un taux élevé de mortalité [44].

Sur frottis sanguin mince coloré, toutes les formes de parasites sont présentes dans le sang périphérique de l'hôte. Les anneaux du parasite sont larges. Le nombre de mérozoïtes dans un schizonte érythrocytaire est de 6 à 12. Il a une forme ronde et rarement plus de 1 % des cellules sont infectées [42]

➤ ***P. vivax***

Rarement mortel, *P. vivax* peut entraîner occasionnellement de graves complications [46]. Le parasite à un cycle érythrocytaire de 42 à 48 heures similaire à celui de *P. falciparum*. Sa période d'incubation est plus grande que *P. falciparum* et il produit moins de mérozoïtes par schizonte [47]. Au stade sommeil appelé hypnozoïte, l'espèce peut induire de nouvelles infections sanguines avec des possibilités de transmission ultérieure [48]. En dehors de l'Afrique, *P. vivax* représente 74,1 % cas de paludisme dans la région Amérique [2].

Sur frottis sanguin mince coloré, les érythrocytes infectés sont visibles avec granulation de Schüffner. Les Trophozoïtes de *P. vivax* ressemblent aux amiboïdes. Toutes les formes de parasites sont présentes dans le sang périphérique de l'hôte. Les anneaux du parasite sont larges. Le nombre de mérozoïtes dans un schizonte érythrocytaire est de 12 à 24. Seules les

cellules jeunes sont infectées [42].

➤ ***P. knowlesi***

Sur le plan morphologique, les trophozoïtes précoces de *P. knowlesi* avaient été observés sous formes d'anneaux [15]. *P. knowlesi* a été classé parmi les zoonoses, et les macaques comme hôte du réservoir selon une étude menée à Sarawak [49]. Le paludisme à *P. knowlesi* a été plus noté en Malaisie avec un nombre croissant d'infection humaine [50]. Cependant, les antipaludiques tels que la chloroquine, la méfloquine, la quinine, l'autovaquone-pragnil, la sulfadoxine-pyriméthamine ont eu des succès thérapeutiques dans le traitement des infections à *P. knowlesi* [51].

### **2.3.3 Le cycle biologique de *Plasmodium***

Le cycle biologique des espèces *Plasmodiales* nécessite la présence de deux hôtes : l'anophèle femelle (comme hôte définitif de l'hématozoaire) et l'homme (comme hôte intermédiaires dans le cycle répliatif).

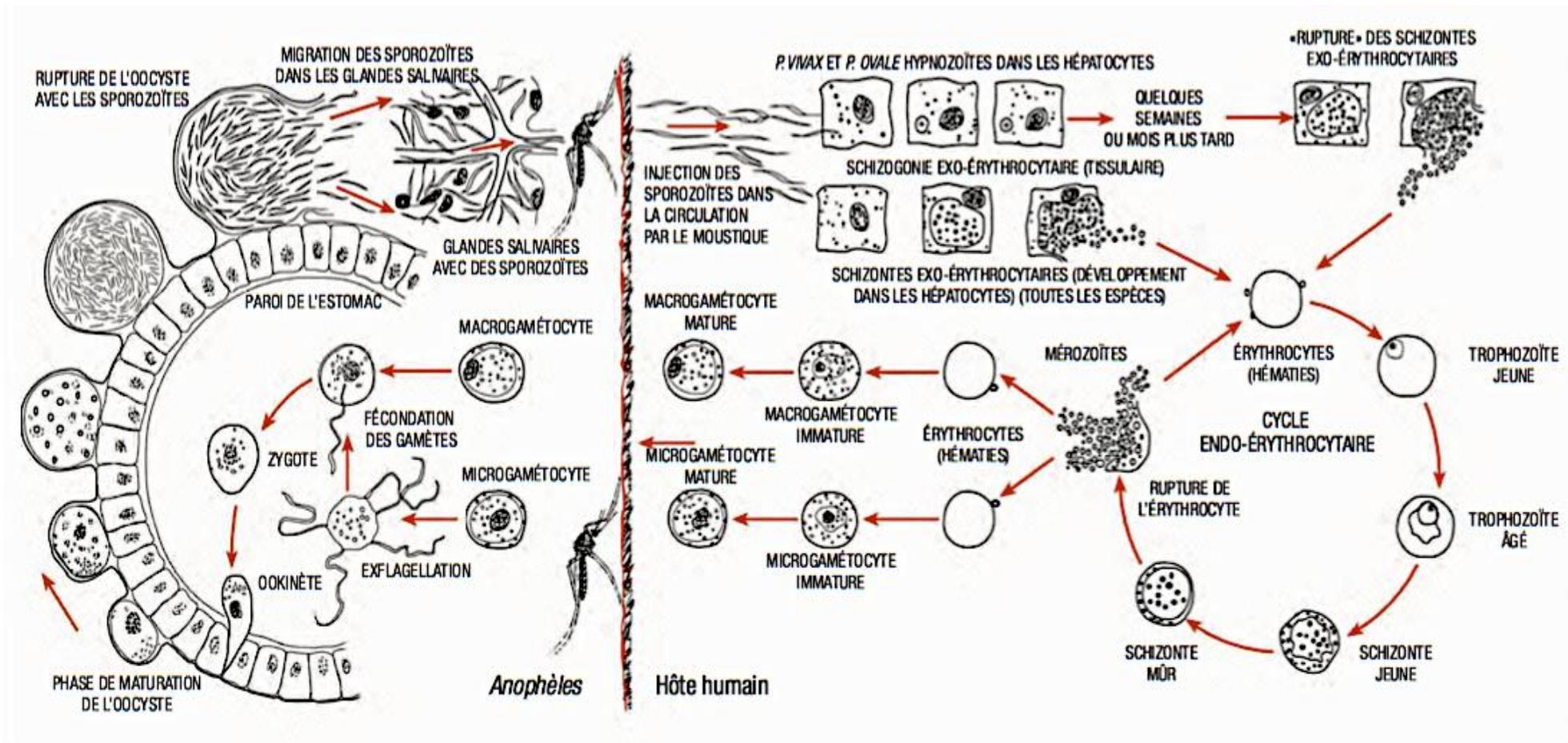


Figure 4. Cycle biologique de *P. falciparum* [52].

### 2.3.3.1 Chez le vecteur (du paludisme)

Lors d'un repas sanguin, les moustiques ingèrent les gamétocytes (mâles et femelle) chez un hôte infecté [40]. A l'intérieur du tube digestif du moustique, les globules rouges infectés éclatent en libérant des gamétocytes. Ces gamétocytes se développent en gamètes (stade sexuel mature) [34]. Les gamétocytes, gamètes mâle et femelle vont fusionner pour former des zygotes, qui se transforment ensuite en ookinètes invasifs. Les ookinètes parviennent à l'espace situé entre l'épithélium de l'intestin moyen et la lame basale du moustique, ou ils se modifient en oocystes. A partir des oocystes multinuclées se développent des milliers de sporozoïtes qui vont être relâchés dans l'hémolymphe. Ils envahissent les glandes salivaires des moustiques, ils y restent viables mais ne se reproduisent pas [40].

### 2.3.3.2 Chez l'homme

Chez l'homme le cycle biologique du *Plasmodium* se divise en deux phases : la phase hépatique (phase d'incubation) et la phase sanguine.

#### ➤ *La phase hépatique*

Au cours d'un repas sanguin, l'anophèle femelle injecte chez l'homme les sporozoïtes déjà incorporés à sa salive. Les sporozoïtes pénètrent dans la circulation sanguine, puis sont acheminés vers le foie où ils envahissent les hépatocytes [38]. A l'intérieur des hépatocytes, les sporozoïtes subissent une série de mitoses et forment une masse multinucléée appelée schizonte. A maturité, le schizonte est composé de milliers de mérozoïtes. La multiplication se poursuit pendant une période de 7 à 12 jours pour *P. falciparum*, 15 jours à 9 mois pour *P. vivax*, 15 jours à 10 mois pour *P. ovale* et de 3 semaines pour *P. malariae* [53] jusqu'à éclatement des hépatocytes infectés où ils vont être libérés dans la circulation.

Une partie des sporozoïtes chez *P. vivax* et *P. ovale* ne se développent pas directement dans les hépatocytes envahis. Par contre, ils restent dans un état de sommeil dans le foie, sous forme d'hypnozoïte, suivant une longue période avant de se développer et de causer une infection récurrente [47].

### ➤ **La phase sanguine**

La phase sanguine correspond à la phase symptomatique de la maladie. Les mérozoïtes libérés dans la circulation infectent les érythrocytes. La phase d'invasion est précédée d'une phase pré-invasion qui se définit lorsque le mérozoïte entre en contact avec la membrane plasmique des globules rouges, déclenchant une vague de déformation du site de contact [54]. Les mérozoïtes se différencient en anneaux puis en trophozoïtes à l'intérieur du globule rouge suivis d'une multiplication asexuée (schizogonie érythrocytaire) pour former un schizonte érythrocytaire. Le schizonte se rompt en libérant plusieurs nouveaux mérozoïtes qui vont à leur tour infecter d'autres globules rouges [53]. L'éclatement des schizontes au bout de 24 heures à 72 heures correspond à l'accès fébrile. Certains trophozoïtes se transforment en gamétocytes femelles et mâles via la gamétogénèse [55].

## **2.4 Les moyens de lutte contre le paludisme**

### ➤ **La lutte anti-vectorielle**

La lutte anti-vectorielle emploie les méthodes et stratégies contre le paludisme dans le but de diminuer la transmission du paludisme du vecteur à l'homme. Deux méthodes de lutte sont employées : la méthode de réduction de la densité des moustiques (la Pulvérisation Intra Domiciliaire) et la méthode de réduction du contact homme vecteur (Moustiquaire Imprégné d'Insecticide) [35].

### ➤ **Le traitement préventif**

L'OMS recommande le traitement préventif intermittent par la sulfadoxine-pyriméthamine chez les femmes enceintes vivant dans des zones de transmission modérée à élevée en Afrique [23].

### ➤ **Le traitement curatif**

Selon l'espèce en cause, la région du monde ou la gravités de l'infection, le traitement du paludisme est fait selon deux groupes d'antipaludique : les schizonticides sanguins et les inhibiteurs des acides nucleiques [56]. Il faut aussi prendre en compte dans les régions d'Afrique le recours aux plantes utilisées en médecine traditionnelle comme moyen de traitement du paludisme comme par exemple : *Vernonia nigritiana*, *Vernonia colorata*, *Tapinanthus bangwensis* et autres [57].

## 2.5 La classification des antipaludiques selon leur mode d'action

Les principaux antipaludiques peuvent être classés en deux catégories selon leur mode d'action :

### 2.5.1 Les schizonticides sanguins [56]

Les molécules de cette classe d'antipaludiques se caractérisent par la présence d'un noyau quinoléine :

#### ➤ *Les dérivés quinoléines*

- les amino-4-quinoléines : chloroquine, amodiaquine;
- les aryl-amino-alcools : quinine, halofantrine, méfloquine.

#### ➤ *Les dérivés de l'artémisinine*

En plus de l'action schizonticide ils ont une action gamétocytochrome et sont composés par :

- l'artésunate;
- l'artémether.

### 2.5.2 Les inhibiteurs des acides nucléiques

Ce groupe d'antipaludiques inhibe la division du noyau de l'hématozoaire :

#### ➤ *Les antifolates*

- les antifoliques : sulfamide (sulfadoxine), sulfones (dapsone);
- les antifoliniques : proguanil, pyriméthamine.

#### ➤ *Les naphthoquinones*

- l'atovaquone

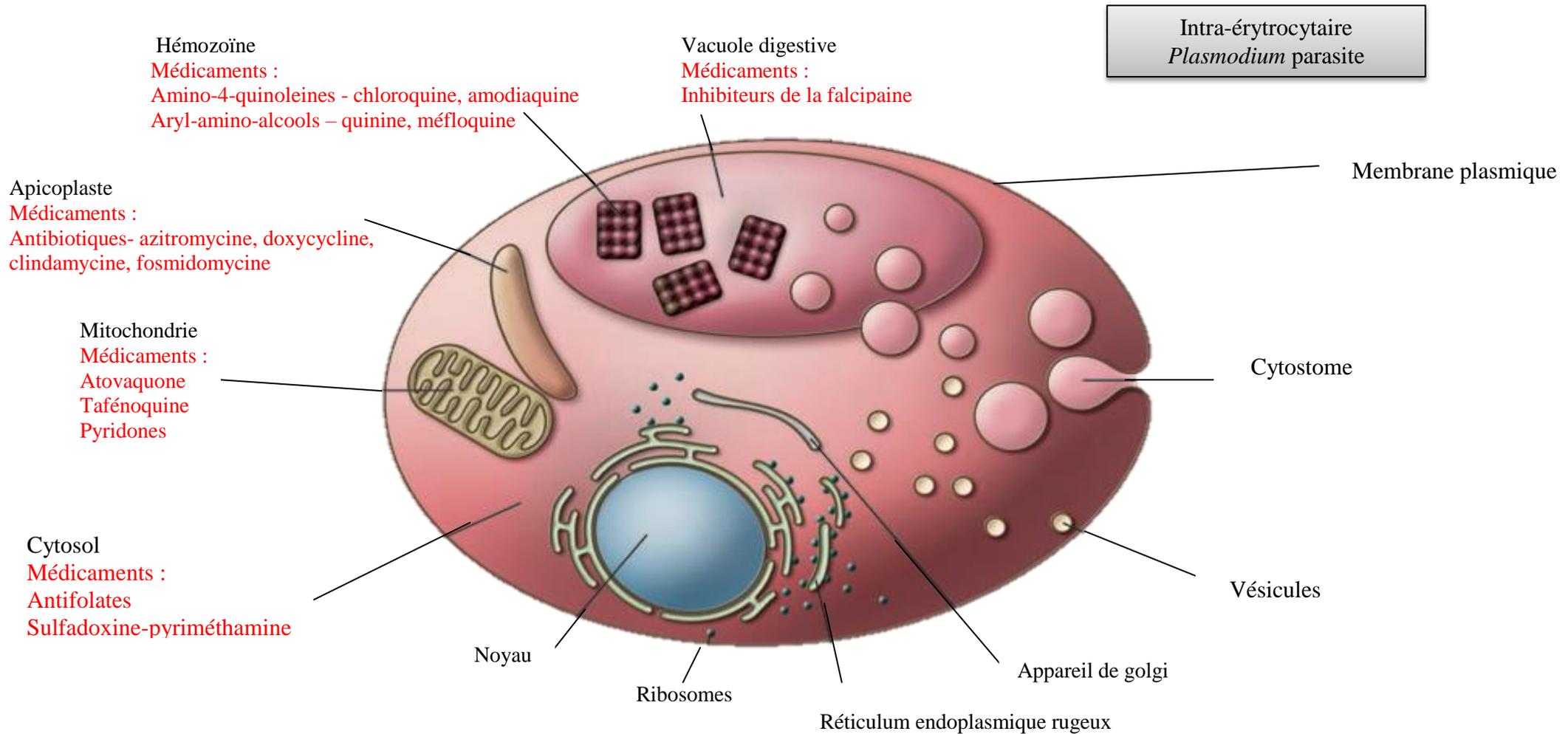
#### ➤ *Les antibiotiques*

- la ciprofloxacine;
- la doxycycline;
- les macrolides : érythromycine, spiramycine, clindamycine.

#### ➤ *Les gamétocytocides*

- amino-8-quinoléine : primaquine.

## 2.6 Les cibles plasmodiales et le mécanisme d'action des antipaludiques



**Figure 5. Cibles plasmodiales des antipaludiques [40] .**

Les antipaludiques sont des médicaments qui agissent sur différentes cibles chez le parasite du paludisme afin d'exercer son action.

### 2.6.1 Les cibles plasmodiales des antipaludiques

Le *Plasmodium* dispose pour son développement intra-érythrocytaire d'un métabolisme et de moyens de défense spécifiques qui constituent autant de cibles aux antipaludiques.

#### ➤ La vacuole digestive

Elle est le siège de la digestion de l'hémoglobine, de la cristallisation de l'hème. Ce compartiment contient des moyens de défense contre le stress oxydant [56].

#### ➤ Le cytoplasme

Le cytoplasme contient deux organites essentiels : *le système mitochondrial*, siège du transfert d'électron et les processus enzymatiques essentiels à la glycolyse et la production d'énergie; l'**apicoplaste** qui fournit les composants essentiels à l'invasion et ou l'instauration de la vacuole parasitophore dans l'hôte, est le siège de la réplication de l'ADN [58] et certains autres composés inhibent le transfert d'électron.

#### ➤ La membrane

La membrane est constituée de phospholipide, de canaux calciques et parasitophore. Elle siège un trafic nutritionnel et dispose de protéines kinases intervenant dans la transduction du signal [56].

### 2.6.2 Le mécanisme d'action des antipaludiques

#### ➤ Les dérivés quinoléines

Les dérivés quinoléines (chloroquine, amodiaquine, quinine, méfloquine) sont actifs au niveau de la vacuole digestive du parasite. Les molécules de ce groupe d'antipaludiques s'accumulent dans la vacuole; ils empêchent la transformation de l'hème sous la forme de cristaux insolubles appelée hémozoïne. L'hème non cristallisé est toxique [56].

#### ➤ Les dérivés de l'artémisinine

Ces lactones sesquiterpéniques (l'artésunate, l'artémether) détruisent *P. falciparum* en inhibant l'activité de la phosphatidylinositol-3-kinase par la libération de radicaux libres [59]. Le Dihydroartémisinine (DHA) métabolite actif de l'artémisinine agit sur les globules rouges infectés en favorisant la production du dérivé réactif de l'oxygène (DRO) qui génère des métabolites oxydants et de lipides oxydés. Le stress oxydatif provoqué entraîne la

polyubiquitination des protéines endommagées, qui sont par la suite dégradées par le protéasome [60]. Deux voies d'activation de l'artémisinine ont été proposées : la voie mitochondriale impliquée dans la cytotoxicité induite par la peroxydation lipidique et la voie de la vacuole digestive où l'artémisinine est activée par un modèle de scission réductrice et un modèle de peroxyde ouvert impliqués à la génération d'un radical centré sur le carbone actif [61].

#### ➤ **Les antifolates**

Les antifolates (sulfadoxine, pyriméthamine) sont des antipaludiques qui perturbent la voie de synthèse de l'ADN du parasite. Les deux principales cibles des thérapies des antifolates sont la dihydroptéroate synthase et la dihydrofolate réductase. Le blocage de la voie de synthèse du folate entraîne une diminution de la synthèse des pyrimidines et par conséquent, l'arrêt de la réplication de l'ADN, une diminution de la synthèse de la méthionine et une conversion réduite de la glycine en sérine. Leur faible présence au niveau de la cellule provoque l'arrêt du cycle cellulaire et par finir la mort cellulaire [62].

#### ➤ **Les naphthoquinones**

L'atovaquone est un antipaludique qui inhibe la chaîne de transfert d'électrons en bloquant la liaison ubiquinone (une protéine mitochondriale) cytochrome bc1 (complexe III) au niveau du domaine cytochrome Q<sub>0</sub> [63].

#### ➤ **Les antibiotiques**

Les antibiotiques agissent sur le parasite en bloquant certaines fonctions de l'apicoplaste tels que la transcription des apicoplastes (rifampicine), la réplication du génome de l'apicoplaste (ciprofloxacine) ou le blocage des systèmes de traduction procaryotes (doxycycline, spiramycine, clindamycine) [64].

## 2.7 La résistance aux antipaludiques

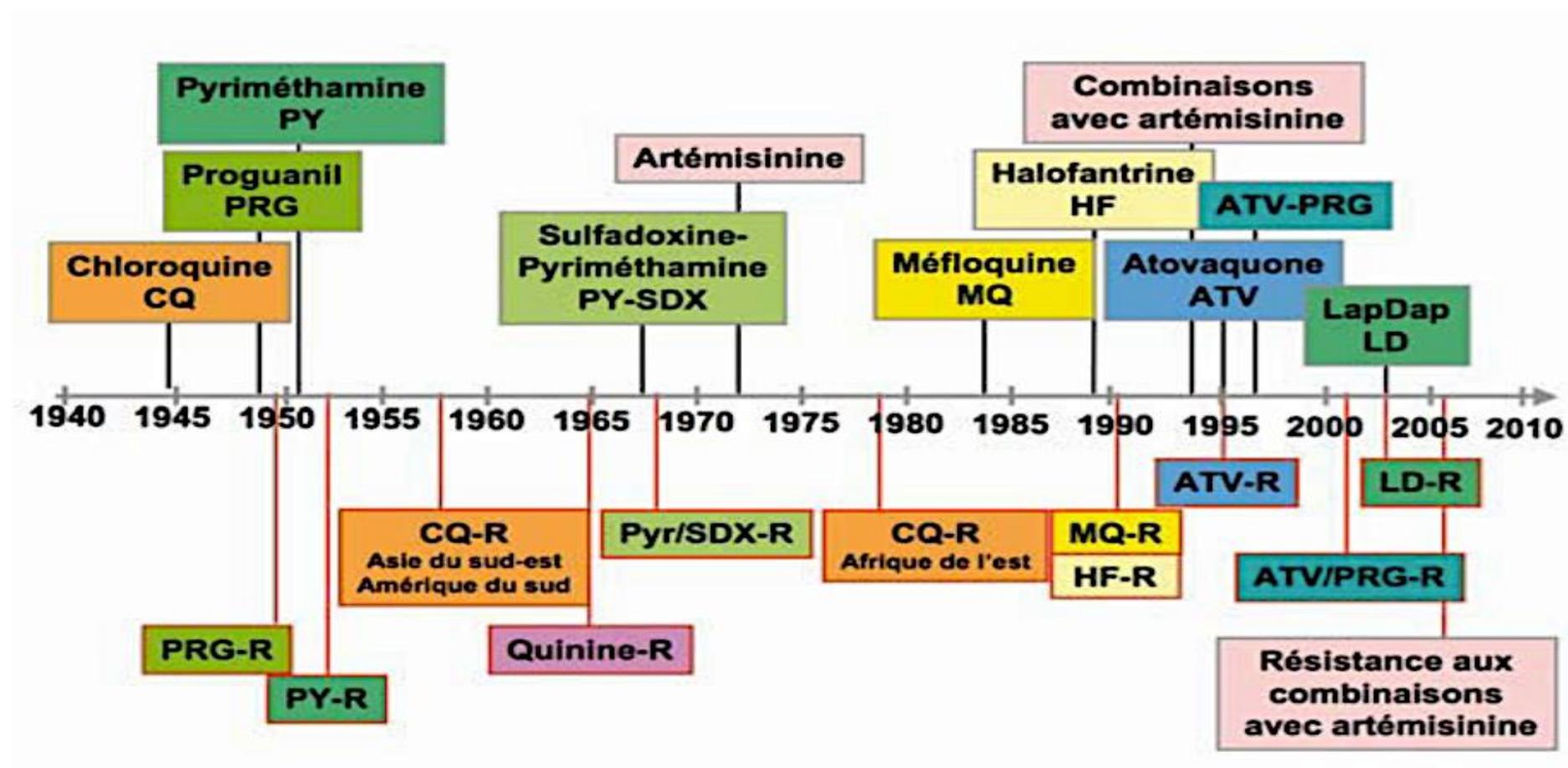


Figure 6. Apparition des premiers cas de résistance aux antipaludiques [16].

L'apparition et la diffusion de parasites résistants aux antipaludiques ont eu des conséquences désastreuses en santé publique dans la seconde moitié du XX<sup>e</sup> siècle. Elles ont alourdi le coût économique du paludisme et ont mis à mal les progrès obtenus lors de la campagne mondiale d'éradication lancée dans les années 1950 [10]. La gravité de la maladie dépend largement du statut immunitaire de la personne infectée [16] (**figure 6**).

La résistance des parasites contre les antipaludiques peut être induite par :

- le polymorphisme génétique de *P. falciparum* due à un taux élevé de mutation dans son génome;
- un taux important de parasite présent chez les individus;
- la sélection par la pression médicamenteuse des parasites résistants;
- les erreurs de réplication de l'ADN dans les cellules [16].

## 2.8 Le support génétique de la résistance de *Plasmodium*

### ➤ *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*Pfcr*)

Le gène *Pfcr* code une protéine transmembranaire qui se trouve à l'intérieur de la membrane de la vacuole digestive [65]. C'est un gène qui est localisé sur le chromosome 7 et code pour une protéine de 49 kDa [66]. La position 76 a été associée à la résistance du parasite à la chloroquine liée par le remplacement de la lysine par la thréonine (K76T) [66].

### ➤ *P. falciparum* multi-drug resistance 1 (*Pfmdr1*)

Le gène *Pfmdr1* est situé sur le chromosome 5 et code pour un transporteur de type ABC [68]. *Pfmdr1* est constitué de moitiés homologues [68]. La protéine *PfMDR1* est impliquée dans la résistance des antipaludiques tels que la chloroquine, la méfloquine, les CTA [69]. Cinq (5) mutations N86Y, Y184F, S1034C, N1042D et D1246Y ont été identifiées au niveau mondial [67]. L'augmentation du nombre de copies du gène (86N) augmente la résistance à la méfloquine et à l'inverse accroît la sensibilité à la chloroquine [10].

### ➤ *P. falciparum* dihydropteroate synthase (*Pfdhps*)

Ce gène code une enzyme le dihydropteroate synthase cofacteur de la synthèse des folates et cible des sulfamides [19]. Les mutations des codons K437G, K540E, A581G et A613S/T du gène *dhps* conféraient une résistance à la sulfadoxine [70].

➤ *P. falciparum* dihydrofolate réductase (*Pfdhfr*)

Le gène est situé sur le chromosome 4 de *P. falciparum*. Ce gène code le dihydrofolate réductase une enzyme appartenant à la voie de synthèse des folates qui est nécessaire à la réplication de l'ADN du parasite et constitue la cible des antifoliques (pyriméthamine) [10]. Plusieurs mutations ponctuelles des codons 50, 51, 59, 108 et 164 du gène *dhfr* conféraient une résistance à la pyriméthamine [70].

➤ *P. falciparum* cytochrome b (*Pfcytb*)

Chargé du transport du flux d'électron, le cytochrome b est une protéine codée par l'ADN mitochondrial possédant une longueur de 6 kDa [71]. Le cytochrome b est la cible de l'atovaquone et l'association atovaquone/proguanil [72]. Une mutation ponctuelle observée sur le codon 268 du gène *Pfcytb* conférait une forte diminution de la sensibilité du parasite à l'atovaquone en empêchant toute synergie d'action avec le proguanil sur le potentiel de membrane mitochondrial [19].

➤ *P. falciparum* Kelch 13 (*PfK13*)

Le gène *PfK13* code pour une protéine de 726 acides aminés constitués d'une région N-terminal d'apicomplexa mal conservé et de trois domaines hautement conservés : CCC (bobine spiralée) BTB (complexe large, tramway et bric-à-brac) et KREP (hélice à répétition de Kelch C-terminal) [8]. La fonction exacte de *PfK13* n'a encore été totalement élucidée cependant elle est proposée comme une analogue de la protéine humaine Keap1 [73].

Le domaine de Kelch est le siège de plusieurs interactions entre protéines [8] parmi lesquelles, le stress oxydatif résultant de l'action inhibitrice de la protéine Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) sur la protéine de nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) qui joue un rôle de protecteur contre le stress oxydatif [8]. On s'attend à ce que le domaine BTB se lie à une protéine cullin en échafaudage, par ailleurs, KREP se lie probablement à la ou aux molécules de substrats lesquels sont ubiquitinées et dégradées par protéasome. Le gène *K13* semblerait être essentiel pour la croissance intra-érythrocytaire des parasites asexués de *P. falciparum* [8].

**Tableau IV** : Marqueurs moléculaires de résistance des antipaludiques et cibles d'action [56][16]

Les antipaludiques	Cible	Gène de résistance
Chloroquine	Formation de l'hémozoïne	<i>Pfcr1</i>
		<i>Pfmdr1</i>
Amodiaquine		<i>Pfmdr1</i>
		<i>Pfmrp</i>
méfloquine		<i>Pfmdr1</i>
Quinine		<i>Pfnhe-1</i>
		<i>Pfmdr1</i>
Arthemether	Digestion de l'hémoglobine, cristallisation de l'hème	<i>Kelch 13</i>
		<i>Pfmdr1</i>
Artéméther		<i>Pfserca</i>
Sulfadoxine	Dihydropteroate synthétase	<i>Pfdhps</i>
Pyriméthamine	Dihydrofolate réductase	<i>Pfdhfr</i>
Luméfantrine	Formation d'hemozoïne	<i>Pfmdr1</i>
Proguanil	Dihydrofolate réductase	<i>Pfdhfr</i>
Atovaquone	Fonction mitochondriale	<i>Pfcytb</i>

Les marqueurs moléculaires de résistances sont des outils qui permettent la mise en évidence de modification du gène de parasite impliqué dans la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques [16].

## 2.9 Les différents types de mutations

La mutation est définie comme étant un processus par lequel un gène subit un changement de structure [74]. Il existe trois (3) grandes classes de mutations (les substitutions

nucléotidiques, les insertions ou délétions nucléotidiques, les réarrangements génomiques) et d'autre type de mutation tel que les mutations dynamiques.

➤ **Les substitutions nucléotidiques**

Elles résultent soit à un remplacement d'une base pyrimidique (C ou T) ou purique par une autre base de même nature appelée **mutations de transitions** où soit par le remplacement d'une base pyrimidique à une autre base purique ou inversement appelé **mutations de transversions**. Les substitutions sont les résultats des agents environnementaux mutagènes (substances chimiques, rayonnement et autre), ou par le métabolisme [75].

➤ **Les insertions ou délétions nucléotidiques**

Les insertions ou délétions nucléotidiques sont respectivement l'ajout ou la suppression d'un ou de plusieurs nucléotides. Ils représentent près de 25 % des anomalies répertoriées dans la base de données HGMD (Human Gene Mutation Database) [75].

➤ **Les mutations dynamiques**

Les mutations dynamiques impliquent des répétitions importantes de certains triplets au niveau de l'ADN.

➤ **Les réarrangements génomiques : délétion, duplications, inversion et translocations**

Les réarrangements génomiques résultent en général, mais non obligatoirement, d'évènements de recombinaison homologue non allélique (NAHR, *non allelic homologous recombination*) intra- ou extrachromosomique, impliquant des séquences très semblables mais non nécessairement identiques [75].

## 2.10 Les moyens de détection des mutations

➤ **Les courbes de fusion à haute résolution ou HRM**

Introduite en 1997 [76], la fusion à haute résolution est une technique basée sur la détermination des changements de fluorescence, résultant de la fusion de produit de PCR double brin en réponse à des étapes d'augmentation de température [77]. La température de dissociation et les caractères distinctifs de la courbe de fusion des produits amplifiés

dépendent de la séquence des nucléotides. La substitution d'une seule base peut apporter des changements au niveau de la température de fusion ( $T_m$ ) [77]. Les hétérozygotes ont une forme différente de celle des homozygotes dans la région de bas point de fusion de transition. Toute la région située sous la sonde est prise en compte lors de l'analyse de la courbe de fusion [76].

### ➤ **Le séquençage**

Le séquençage de l'ADN est une méthode qui a pour but d'identifier la succession linéaire des bases nucléiques adénine (A), cytosine (C), guanine (G) et thymine (T) prenant part à la structure de l'ADN. Il existe deux générations de séquençage : la première génération de séquençage (la méthode de Maxam Gilbert et de Sanger) et la nouvelle génération de séquençage (NGS) [78].

#### ▪ **La méthode de Sanger**

En 1977, Frederick Sanger invente une méthode de séquençage de l'ADN par la synthèse enzymatique. La méthode de Sanger est basée sur l'analyse des spectres d'émission spécifique émise par les didésoxyribonucléotide-triphosphate (ddNTP) obtenus sur les fragments de tailles différentes [78]. Les fragments sont alignés pour reconstituer la séquence complète.

Le mélange réactionnel de la réaction d'amplification par la méthode de Sanger est composé du produit de PCR préalablement purifié issue d'une première réaction d'amplification, de l'amorce sens ( $5'-3'$ ) ou anti-sens ( $3'-5'$ ), de l'ADN polymérase permettant de synthétiser le brin complémentaire à partir de l'amorce, d'un mélange de désoxyribonucléotide-triphosphate (**dNTP**) et du didésoxyribonucléotide-triphosphate (**ddNTP**) qui est de l'ordre de 1 :10. Le groupe ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) est dépourvu de groupement 3'-hydroxyle [78]. Chaque ddNTP est marqué par un fluorophore spécifique. Au cours de la réaction de séquençage, après dénaturation de l'ADN, l'ADN polymérase effectue la synthèse du brin complémentaire à partir de l'amorce en y incorporant soit des dNTP complémentaires et de façon aléatoire et constante des ddNTP. L'incorporation d'un ddNTP empêche la formation d'une nouvelle liaison phosphodiester en position 3' provoquant ainsi l'arrêt de l'élongation [78]. Le produit de la réaction de la séquence purifiée est ensuite fractionné par électrophorèse sur gel d'acrylamide en condition dénaturante. Les groupes de bandes obtenus pourront être analysés à travers l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique émise par le ddNTP ce qui permettra d'assigner la base correspondante et de déterminer la séquence nucléotidique [79].

### ▪ Les nouvelles générations de séquençage

La seconde génération de méthode de séquençage (NGS) a été développée en 2007. Le terme seconde fait référence à l'évolution des technologies de séquençage depuis la méthode de Sanger [80]. Elle utilise les techniques **de pyroséquençage**, le séquençage à **l'aide de terminateurs réversibles** et le séquençage par **ligation** [80]. La NGS opte pour des technologies qui possèdent une grande capacité de séquencer des millions de modèles d'AND. Elles sont moins coûteuses, rapides et possèdent une grande sensibilité.

### ➤ L'étude d'association pangénomique ou GWAS

L'analyse par GWAS portée sur le polymorphisme nucléotidique (SNP) chez plusieurs d'individus permet d'identifier de manière reproductible les associations de variantes génétiques [81]. Une première investigation a été menée dans le cadre du *Plasmodium* GWAS sur les isolats d'Afrique, d'Asie, d'Amérique et de Papouasie-Nouvelle-Guinée [82].

L'étude d'association pangénomique porte sur 3 étapes :

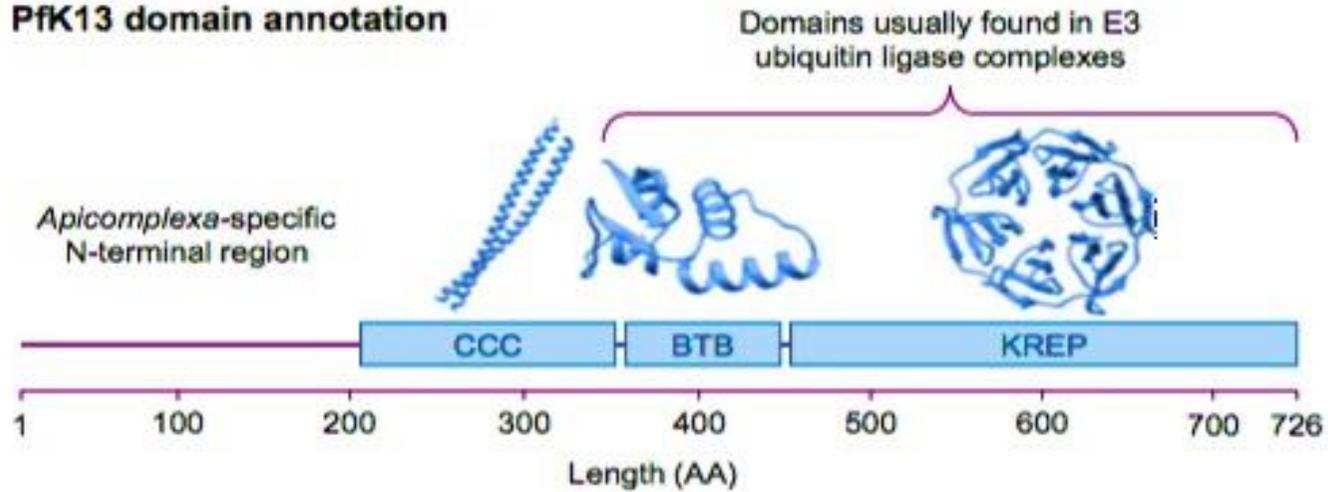
- la sélection de nombreux SNP dans le génome;
- la reproduction des signaux d'associations;
- l'identification des variantes causal [83].

## 2.11 La relation entre la mutation sur le gène *K13* de *P. falciparum* et la résistance à l'artémisinine

La résistance de *Plasmodium* à l'artémisinine serait provoqué par une sensibilité réduite du médicament durant la quiescence qui a lieu au stade du jeune anneau. L'arrêt du développement au stade de l'anneau permet aux parasites de survivre pendant la période relativement courte de concentration élevée en artémisinine. Cette capacité est conférée par les mutations d'un gène appelé *PfK13*. Un stress oxydatif faible est plus gérable chez le parasite, surtout ceux possédant une mutation sur le gène *K13* [73].

Les mutations dans les domaines de Kelch diminuent la liaison au substrat, l'ubiquitylation et le ciblage des protéasomes : l'effet net est une augmentation des niveaux d'accumulation de substrat [84].

**a PfK13 domain annotation**



**b Putative WT PfK13 model**

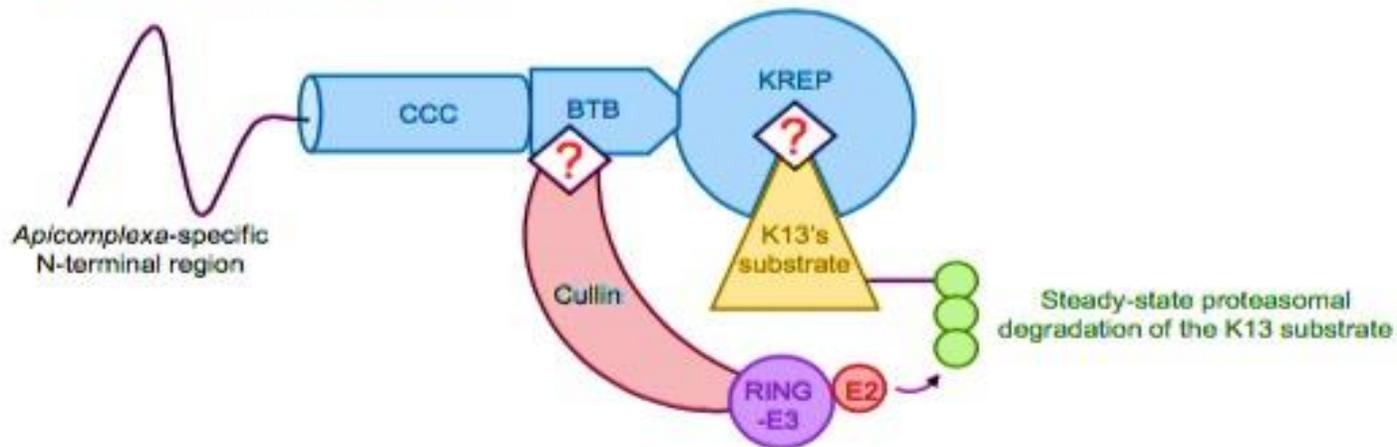


Figure 7. Représentation schématique et structurale de *PfK13* et sa fonction putative d'adaptateur de substrat [8].

**(a) Annotation de domaine *PfK13*.** Trois domaines de *PfK13* sont annotés dans les bases de données : contenant des bobines enroulées (CCC), BTB et hélice à répétition Kelch (KREP). Le domaine N-terminal spécifique à *Apicomplexa* devrait présenter une conformation de bobine aléatoire. Les domaines BTB et KREP avec la structure cristalline; le domaine CCC former de deux hélices s'enroulant ensemble.

**(b) Modèle simplifié proposé du complexe protéique contenant *PfK13*,** basé sur l'annotation de domaine *PfK13* et les expériences de co-immunoprécipitation. On s'attend à ce que le domaine BTB de *PfK13* se lie à une protéine Cullin d'échafaudage, tandis que le domaine KREP se lie probablement à la ou aux molécules de substrat d'avantage ubiquitinés et éventuellement dégradées par protéasome. Surtout, les régions et les sites de *PfK13* impliqués dans la liaison sont inconnus (représentés par le symbole rouge «?» Sur la figure). Pour faciliter la représentation, *PfK13* a été montré comme un monomère bien que la structure cristalline de *PfK13* BTB-KREP ait été résolue comme un dimère [8] (**figure 7**).

La mutation sur le gène *K13* n'est considérée comme marqueur de résistance que si la mutation a été corrélée à un retard de clairance dans les études cliniques jointes à une diminution de la sensibilité au médicament *in vitro* (ring-stage survival assay RSA-3h) réalisées sur isolats frais [85]. Les mutations associées à une clairance lente au cours des essais cliniques mais non validées par les données *in vitro* sont des candidats associés. Certaines mutations peuvent présenter des génotypes de passants en l'absence de preuve de la sélection du génotype *K13* du mutant. La présence du parasite au jour 3 est un indicateur de choix de la surveillance dans le but d'identifier une résistance partielle suspectées à l'artémisinine chez *P. falciparum*. La proportion d'échecs thérapeutiques au 28<sup>ème</sup> ou au 42<sup>ème</sup> jour (les jours de suivi) sont déterminés en fonction de la demi-vie du médicament partenaire CTA [85].

## **2.12 La clairance parasitaire de *P. falciparum***

Les médicaments antipaludiques exercent une action plus centrée contre les trophozoïtes matures, le stade le plus actif du développement du parasite asexué qui précède la réplication de l'ADN. Les parasites morts et endommagés dans les érythrocytes en circulation sont éliminés principalement par la rate, bien que le foie, la moelle osseuse et d'autres tissus lymphoïdes jouent un rôle secondaire important dans la clairance parasitaire des érythrocytes [86].

Le DHA métabolite actif de toutes les artémisinine à une demi-vie courte allant de 2 à 5 heures [85] dans le plasma; par conséquent, les médicaments partenaires à demi-vie plus longue (environ 7 à 21 jours) sont nécessaires pour éliminer les parasites résiduels [88]. La demi-vie de l'artésunate est inférieure à une (1) heure et compte 2 heures à 4 heures pour l'arthémether [85]. La clairance de la fièvre associée aux artémisinines est de 32 heures contrairement à d'autres agents qui sont de 2 à 3 heures. Les médicaments sont évalués suivants les événements survenus au cours des jours de traitements au jour 3; 7; 14; 28; et récemment au jour 42 [89].

### **2.13 Les marqueurs moléculaires associés à la résistance à l'artémisinine**

La première découverte de résistance du parasite à l'artémisinine a été observée au Cambodge à la position 580 mutation non synonyme qui a entraîné le remplacement de l'acide aminé Cystéine en Tyrosine du gène *PfK13* [7] en 2008 [59]. Les mutations N458Y, Y493H, I543T, R539T, C580Y, R561H, F446I et la mutation M476I ont été associées à la résistance entraînant un retard de clairance *in vivo* du parasite et un échec thérapeutique *in vitro* de *P. falciparum* par RSA-3h. [85][9]. Les polymorphismes moléculaires d'autres gènes dans *pfcr*, *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1*, *pfmrp1* et *pfneh-1* ont été associés à la pharmacorésistance du médicament partenaire [7].

### 3. METHODOLOGIE

#### 3.1 Le contexte de l'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la surveillance des mutations sur le gène *PfK13* au cours de l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine. Elle a porté sur les échantillons du projet International Center of Excellence for Malaria Research (ICEMR) à Dioro et du projet President's Malaria Initiative (PMI) à Sélingué. Les dépistages du paludisme étaient passifs et volontaires. Les échantillons étaient collectés par prélèvements sanguins sur papier confettis (un minimum de trois (3) spots par confetti et par patient). Les enfants étaient âgés de 0 à 59 mois dans le projet PMI et 24 à 180 mois dans le projet ICEMR. Les enfants inclus dans ces études étaient diagnostiqués avec un accès palustre simple, une goutte épaisse positive allant de 2000 à 199 999 trophozoïtes/  $\mu$ L de sang. Chaque enfant participant à ces études recevait des doses d'artémether-luméfantrine pendant 3 jours consécutifs allant des jours 0 à 2 pour le projet ICEMR et l'artésunate-amodiaquine ou l'artémether-luméfantrine pour le projet PMI. Les enfants étaient suivis comme indiqué dans le tableau V.

**Tableau V** : Plan de suivi des enfants au cours des deux projets (ICEMR et PIM)

Visites	J0	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42
Examen Clinique	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Prise de température	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Goutte épaisse	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Taux d'hémoglobine (ICEMR)	X							X		
Taux d'hémoglobine (PIM)	X									X
Traitement pat ART+LUM	X	X	X							
Traitement par ARTS+AQ	X	X	X							
Confettis	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TDR	X	X								

### ➤ ICEMR

ICEMR est un réseau mondial de centre de recherche indépendants dans le contextes d'endémie palustre, mise en place par le National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) pour fournir les connaissances, les outils et les stratégies observables essentielles à la compréhension, au contrôle et, finalement, à la prévention du paludisme.

L'objectif de ICEMR est d'étudier l'efficacité des interventions de lutte antipaludique et leur impact sur les interactions entre les parasites du paludisme (génotypes, réponse aux traitements médicamenteux), le vecteur (écologie, comportements et réponse aux insecticides) et l'hôte humain (réponse immunitaire et génétique de l'hôte) dans trois contextes écologiques différents de l'Afrique de l'Ouest.

### ➤ PMI

PMI est un programme du gouvernement fédéral des Etats Unis pour lutter contre le paludisme à travers la prévention et le contrôle. Il a pour but de réduire la mortalité et la morbidité lié au paludisme, ainsi, que l'élimination du paludisme.

## 3.2 Le type et la période d'étude

Il s'agit d'une étude transversale rétrospective qui s'est déroulée de novembre 2017 à août 2019. Les prélèvements de sang étaient collectés auprès des enfants atteints de paludisme simple à *P. falciparum* à Dioro et Sélingué.

## 3.3 La description des sites de l'étude

### ➤ Dioro

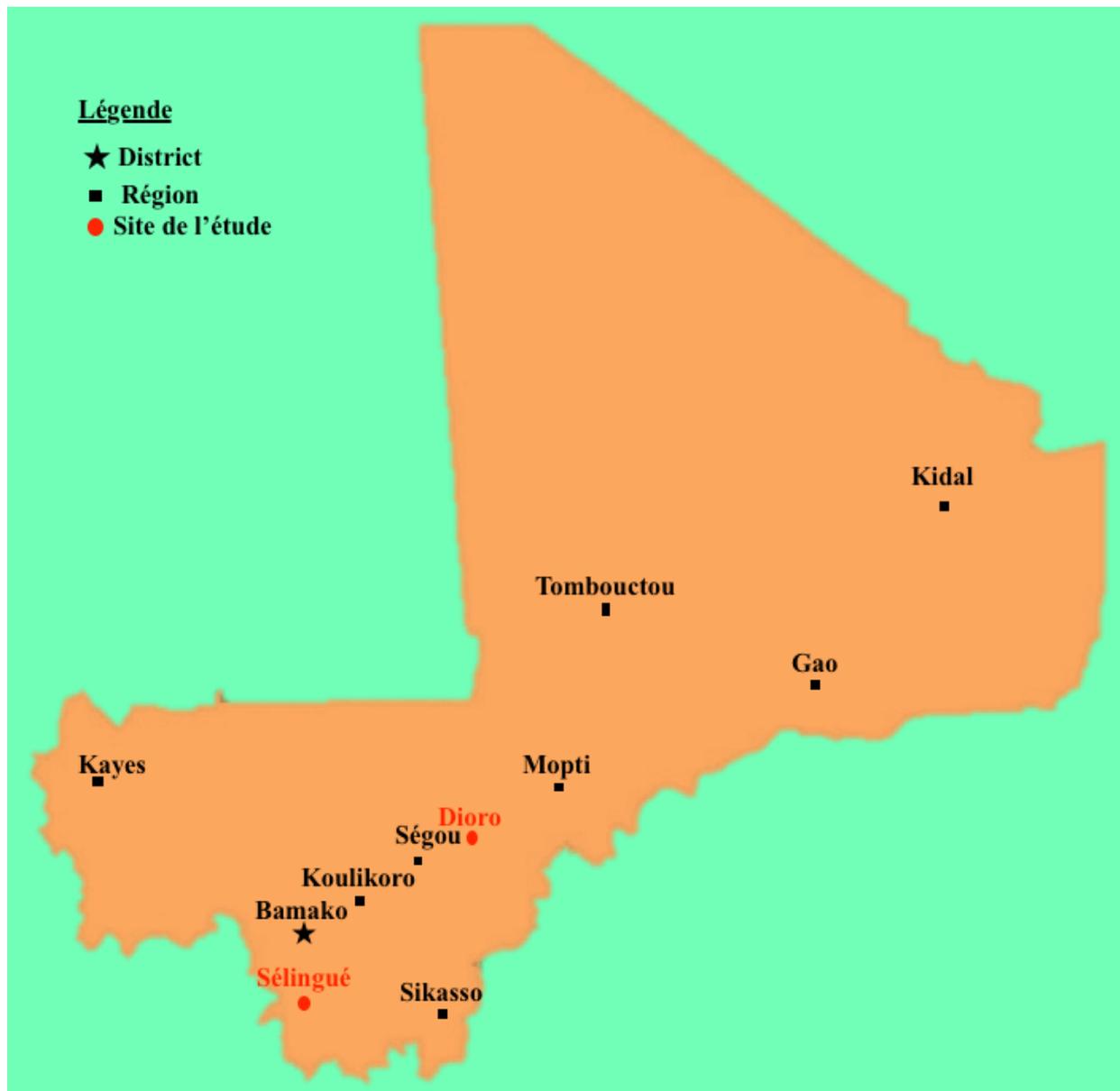
La commune de Dioro est au Nord-Est de Ségou. Limitée au nord par le fleuve Niger, sa situation géographique est un facteur qui favorise la transmission du paludisme. En période pluvial, plusieurs cas de paludisme sont à déplorer au sein de la population de Dioro. Presque toutes les couches de la société sont atteintes et plus particulièrement les enfants qui sont les plus touchés pour multiples raisons.

Dioro relève du district sanitaire de Markala et dispose d' un Centre de Santé Communautaire bien établi (en ressources matérielles et humaines) accessible pour tous les villages environnants.

➤ **Sélingué**

Sélingué est au Nord-Ouest de Sikasso. C'est une localité endémique où la transmission du paludisme est favorisée par deux phénomènes : le barrage de Sélingué et la pluviométrie. Sélingué est aussi représentatif de l'un des faciès épidémiologiques au Mali.

Le district sanitaire de Sélingué regroupe un Centre de Santé de Référence et onze (11) aires de santé organisées en centres de santé communautaires (CSCoM) et gérées par des associations de santé communautaire (ASACO).



**Figure 8. Localisation de Dioro et Sélingué sur la carte du Mali**

### **3.4 La collecte des échantillons**

Les échantillons étaient collectés dans les sites des deux projets conformément au protocole de ces projets à Dioro et Sélingué puis envoyés au LBMA. Nous avons procédé à un inventaire des échantillons puis vérifié le nombre de spot de sang par confetti. Chaque échantillon a été divisé en deux lots, un lot est resté au LBMA et le deuxième lot est envoyé au CDC, Atlanta. Un total de 410 échantillons a été collecté allant du premier jour de visite au 42<sup>ème</sup> jour.

### **3.5 Les critères de sélection des échantillons**

- Tous les échantillons de sang recueillis sur papier confettis des deux projets (ICEMR et PMI), qui étaient disponibles au LBMA au moment de l'envoi des échantillons au CDC en Atlanta;
- Tous les échantillons de sang sur confettis ayant au moins deux spots de sang.

### 3.6 La technique au laboratoire

Les travaux moléculaires ont été réalisés au LBMA en collaboration avec le CDC (Atlanta, Georgia, USA). Le gène d'intérêt a concerné le gène *PfK13*.

#### 3.6.1 L'extraction de l'ADN de *P. falciparum*

L'extraction de l'ADN de *P. falciparum* a été réalisée avec le kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA USA). Un minimum de trois (3) spots de sang (séché) recueillis sur du papier confetti pour chaque échantillon de l'étude a servi pour extraire l'ADN de *P. falciparum* conformément aux instructions du fabricant.

#### 3.6.2 La PCR

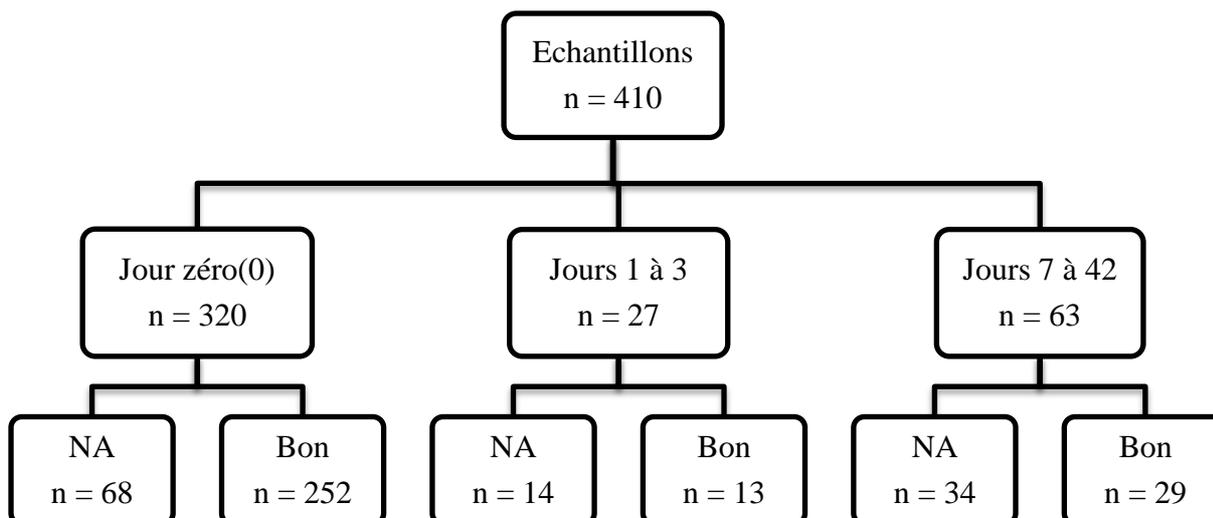
Nous avons utilisé un protocole de PCR nichée pour l'amplification du domaine propeller du gène *PfK13* en utilisant des amorces oligonucléotidiques suivant :

- les amorces de la 1<sup>ère</sup> réaction de PCR :
  - **K13R1 5'-GGGAATCTGGTGGTAACAGC- 3'** et
  - **K13R1 5'-CGGAGTGACCAAATCTGGGA- 3'**
- les amorces de la 2<sup>ème</sup> réaction de PCR :
  - **K13R2 5'- GTAAAGTGAAGCCTTGTTG -3'** et
  - **K13R2 5'- TTCATTTGTATCTGGTGAAAAG -3'**.

Le volume du mélange réactionnel était de 19 µL auquel a été ajouté 1 µL d'extrait d'ADN pour la 1<sup>ère</sup> réaction de PCR. Nous avons pris un volume de 19 µL de Master Mix pour la seconde réaction de PCR auquel nous avons ajouté 1 µL du produit de fin PCR de la 1<sup>ère</sup> réaction d'amplification. Chacune des deux réactions de PCR faisaient 30 cycles. Les protocoles du mélange réactionnel et les conditions des cycles de PCR dans le thermocycleur (qui va de la dénaturation initiale, la dénaturation, l'hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, l'élongation et une étape finale de maintien à 4 °C) ont été énumérées dans la partie annexe 3.

### 3.6.3 Le séquençage du gène *PfK13*

Les amplicons de la 2<sup>ème</sup> réaction de PCR ont été séquencés selon la méthode de séquençage de Sanger. Nous avons recherché après séquençage les mutations du gène *PfK13* qui ont été signalées par l'OMS (mutations énumérées dans la partie annexe 2).



**Figure 9. Répartitions des échantillons analysés en fonction de la quantité de l'ADN pour le séquençage**

**NA** : Non Applicable, pas d'amplification / qualité d'ADN faible pour l'analyse.

**Bon** : Amplification / quantité d'ADN suffisante pour l'analyse.

### 3.7 L'analyse des séquences

Au cours de cette étude, la souche *P. falciparum* MRA1236 a été utilisée comme souche sauvage et la souche MRA 1239 comme souche mutée pour le gène *PfK13*.

Après importation des données brutes dans le logiciel, toutes les séquences dont la qualité des données est inférieure à 40 % ont été exclues de l'analyse au même titre que les extrémités des séquences qui comportent très souvent des données de faible qualité. Les séquences ont été alignées et analysées avec le logiciel Geneious R11 pour rechercher les mutations.

### **3.8 La gestion et l'analyse des données**

Les données ont été saisies et enregistrées sur le logiciel Excel 2011. L'analyse des données a été faite avec le logiciel **SPSS IBM version 20** et **Microsoft office Word et Excel 2011**. Nous avons utilisé chi2 avec  $\alpha = 5 \%$  pour vérifier s'il y a une différence entre les proportions trouvées. Les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel **Geneious R11**.

### **3.9 Les considérations éthiques et déontologiques**

Les protocoles de recherches des deux projets ont été approuvés par le comité d'éthique de l'INRSP actuel INSP (Ministère de la Santé Publique). Les protocoles ont été revus et approuvés par le comité institutionnel de Tulane University (Nouvelle Orléans, Louisiane, États-Unis d'Amérique) et du NIAID/NIH et du CDC, Atlanta, Georgia, États-Unis d'Amérique.

## 4. RESULTATS

Nous avons sélectionné 410 échantillons au départ, 116 ont été retiré à cause de la faible quantité de l'ADN pour l'analyse. Le séquençage a porté sur les extraits d'ADN de 294 échantillons, soit 265 échantillons allant du jour de l'enroulement du malade (Jour 0) au 3<sup>ème</sup> jour (Jour 3), plus 29 échantillons de recrudescences parasitaires (les échantillons de J7 à J42) suivant le calendrier de suivi des extraits de souches de *P. falciparum*.

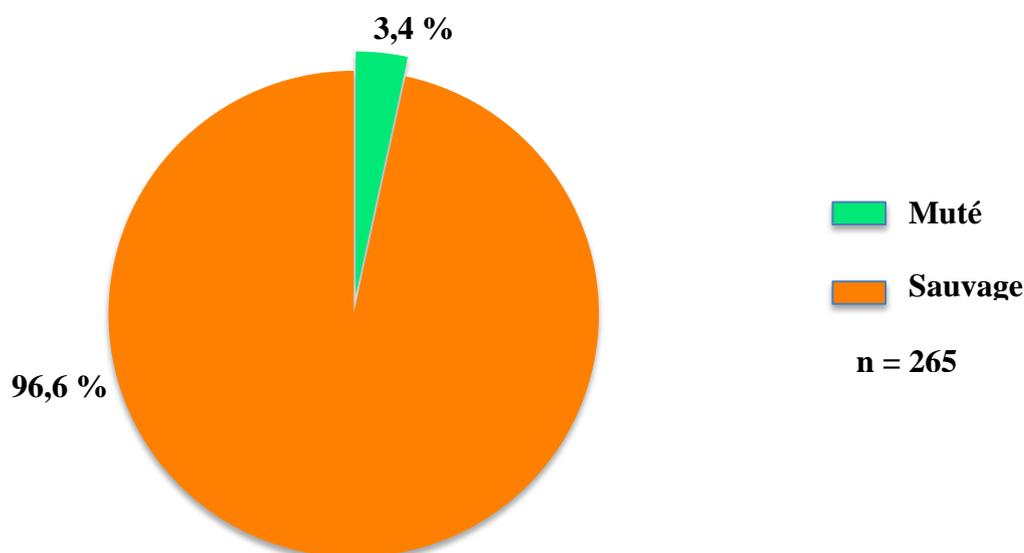
**Tableau VI :** Les mutations identifiées sur le gène *PfK13* et les acides aminés correspondants

Numéro d'identifiant de l'échantillon	Acide aminé correspondant	Modification de nucléotide	Acide aminé modifié correspondant
SL188J0	C469	TGC -> TGT	469C
SL303J0	C469	TGC -> TGT	469C
SL112J0	K503	AAG -> AAA	503K
SL136J0	Q613	CAA -> CAG	613Q
SL146J0	T478	WT/ACC -> ACG	478T
SL168J0	Y493	TAC -> TAT	493Y
3KB050J0	P413	CCG -> CCA	413P
SL026J1	Y493	TAC -> TAT/WT	493Y
SL026J2	Y493	TAC -> TAT	493Y
SL052J21	Q613	CAA -> CAG	613Q

Les mutations observées étaient des mutations synonymes, identifiées à la positions 469 (cystéine → **cystéine**); 503 (lysine → **lysine**); 413 (proline → **proline**); 613 (glutamine → **glutamine**); 478 (thréonine → **thréonine**) et 493 (tyrosine → **tyrosine**).

#### 4.1 Les échantillons de J0 à J3

Suivant le calendrier de réévaluation clinique nous avons analysé 265 échantillons de J0 à J3 des extraits de souches de *P. falciparum*.



**Figure 10.** Répartition des échantillons en fonction du profil muté et sauvage du gène *PfK13*

Le profil muté représentait **3,4 %** (9/265) et le profil sauvage représentait **96,6 %** (256/265) des échantillons (**figure 10**).

**Tableau VII :** Répartition des échantillons en fonction des mutations identifiées sur le gène *PfK13*

Mutation identifiée sur le gène <i>PfK13</i> jours 0 à 3	Effectif	Pourcentage
C469C	2	0,8
K503K	1	0,4
P413P	1	0,4
Q613Q	1	0,4
T478T	1	0,4
Y493Y	3	1,1
WT (sauvage)	256	96,6
Total	265	100

La mutation Y493Y était la plus représentée avec une fréquence de **1,1 %** (3/265), suivi de la mutation C469C soit **0,8 %** (2/265).

**Tableau VIII : Répartition des mutations en fonction des sites de l'étude**

Mutation jours 0 à 3	Site		Total
	Dioro	Sélingué	
C469C	0	2	2
K503K	0	1	1
P413P	1	0	1
Q613Q	0	1	1
T478T	0	1	1
Y493Y	0	3	3
WT (sauvage)	11	245	256
Total	12	253	265

Les mutations observées représentaient respectivement :

**8,3 %** (1/12)= la mutation P413P observée à Dioro,

**3,1 %** (8/253)=les mutations C469C+K503K+Q613Q+T478T+Y493Y étaient observées à Sélingué.

**Tableau IX : Répartition des mutations en fonction du temps de clairance parasitaire**

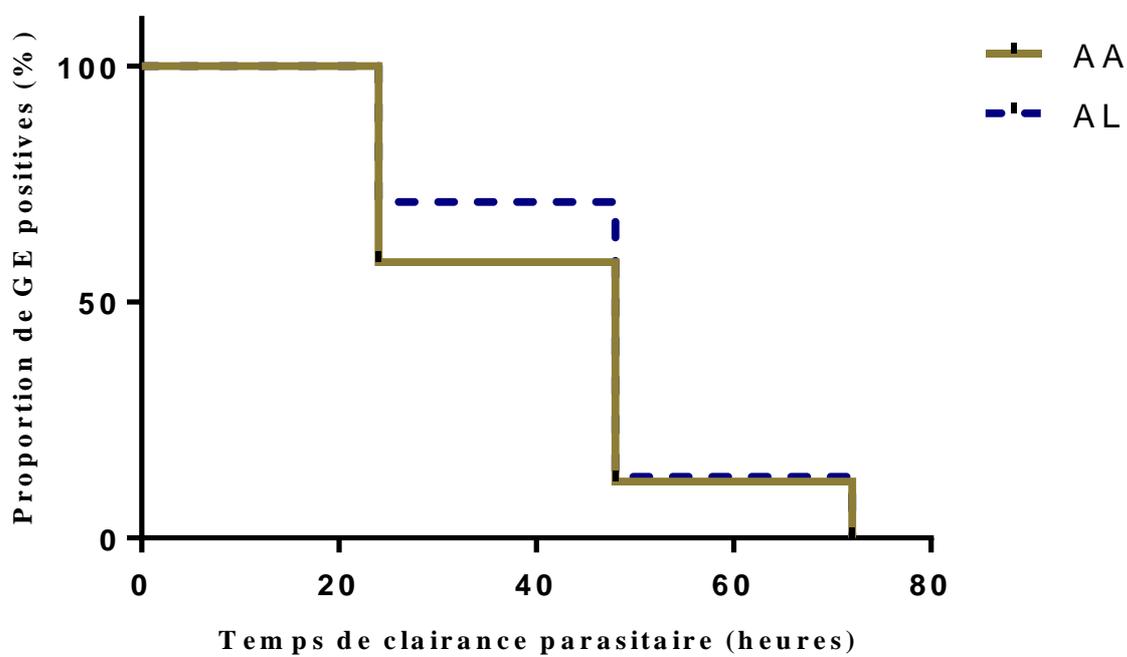
Mutation jours 0 à 3	Temps de clairance parasitaire			Total
	24 heures	48 heures	72 heures	
C469C	1	1	0	2
K503K	1	0	0	1
P413P	0	1	0	1
Q613Q	0	1	0	1
T478T	0	1	0	1
Y493Y	0	1	1	2
WT (sauvage)	96	116	17	229
Total	98	121	18	237

Pearson chi2 (12) = 10.0797 P = 0.609

Seule la mutation Y493Y était associée à un retard de clairance parasitaire soit **0,42 %** (1/237). Les mutations C469C, P413P, Q613Q, T478T, Y493Y étaient associées à un temps de clairance parasitaire de **48 heures**, elles représentaient **2,11 %** (5/237) cas.

## Le temps de clairance parasitaire après l'administration des antipaludiques entre 24 heures et 72 heures.

Pour chaque combinaison administrée, nous avons estimé la moyenne nécessaire pour la clairance des parasites sur 72 heures (à partir du temps d'administration).



**Figure 11. Courbe de Kaplan-Meier pour le TCP des participants avec une goutte épaisse positive après le traitement avec AA versus AL.**

La clairance parasitaire avec le bras AA était comparable au bras AL, Hazard Ratio = 1,519 IC 95 % (0,9596 à 2,404),  $p = 0,0745$ . En 24 heures environ 54,08 % (53/98) des parasites étaient éliminés avec AA contre 45,92 % (45/98) avec AL. En 48 heures, près de 42,15 % (51/121) des parasites étaient éliminés avec AA contre 57,85 % (70/121) avec AL. En 72 heures, les proportions d'élimination des parasites étaient respectivement de 38,89 % (7/18) avec AA et 61,11 % avec la molécule AL. La différence n'était pas statistiquement significative,  $p = 0,166$  (**figure 11**).

**Tableau X** : Répartition des mutations en fonction du temps de clairance de la fièvre

Mutation Jours 0 à 3	Temps de clairance de la fièvre				Total
	0 heure	24 heures	48 heures	72 heures	
C469C	1	1	0	0	2
K503K	0	1	0	0	1
P413P	1	0	0	0	1
Q613Q	0	0	1	0	1
T478T	1	0	0	0	1
Y493Y	1	1	0	0	2
WT (sauvage)	113	103	18	3	237
Total	117	106	19	3	245

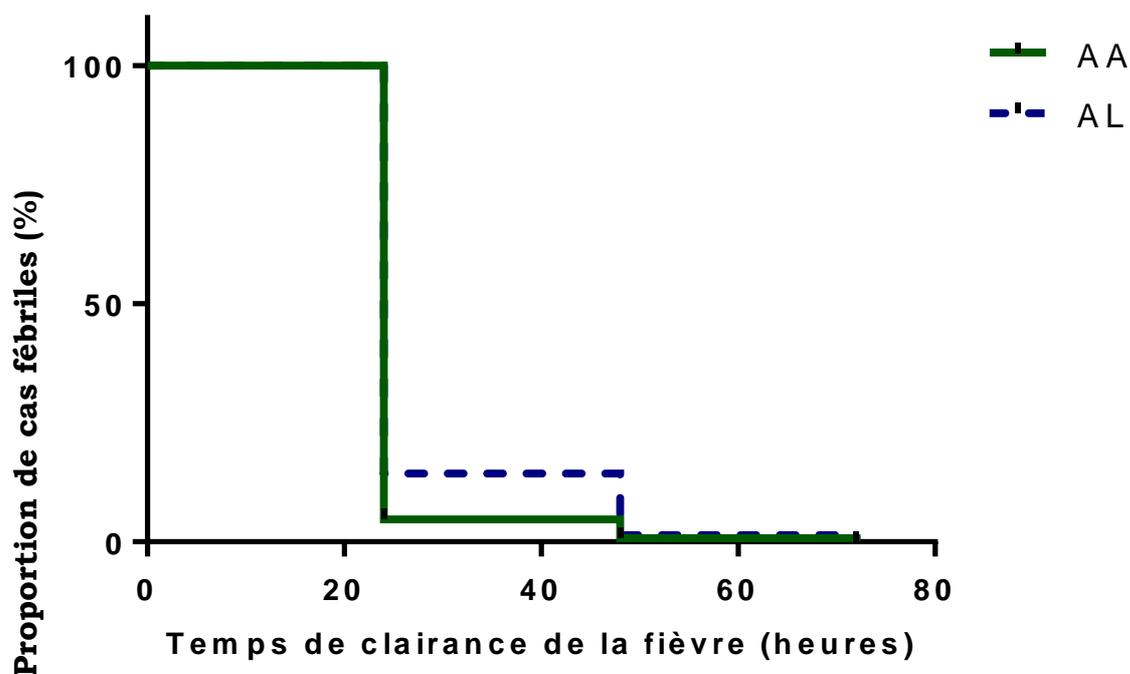
Pearson chi2 (18) = 15.8129 P = 0.606

**47,75 %** (117/245) des patients n'avaient pas fait d'épisode de fièvre, par ailleurs aucune mutation n'étaient associées à un retard de clairance de la fièvre.

La mutation **Q613Q** était associée à un temps de clairance la fièvre de 48 heures.

## Le temps de clairance de la fièvre après l'administration des antipaludiques entre 24 heures et 72 heures.

Pour chaque combinaison administrée, nous avons estimé la moyenne nécessaire pour la clairance de la fièvre sur 72 heures (à partir du temps d'administration).



**Figure 12. Courbe de Kaplan-Meier pour le TCF des participants après le traitement avec la combinaison AL et AA.**

Parmi les 245 participants évalués pour la fièvre, 47,76 % (117/245), n'ont pas fait d'épisode de fièvre au cours de leur traitement. Ce taux était de 48,72 % (57/117) et 51,28 % (60/117) respectivement dans le bras AL et AA ( $p = 0,054$ ).

La médiane de la clairance de la fièvre était de 24 heures dans les 2 bras. La fièvre était rapidement plus éliminée avec AA qu'avec AL. En 24 heures, plus de 54,72 % (58/106) n'avait plus de fièvre dans le bras AA contre 45,28 % (48/106) dans le bras AL ( $p = 0,012$ ). Après 48 heures, la différence du temps de clairance de la fièvre était remarquable 78,95 % (4/19) avec AL contre 21,05 % (15/19) dans le bras AA ( $\chi^2 = 5,82$ ;  $p = 0,015$ ). Le temps de clairance de la fièvre variait significativement entre 24, 48 et 72 heures ( $p = 0,012$ ).

Seuls 3 participants avaient fait la clairance en 72 heures dont 1 en AA et 2 en AL (**figure 12**).

## 4.2 Les échantillons de J7 à J42

**Tableau XI :** Répartitions des mutations en fonction des sites de l'étude

Mutation jours 7 à 42	Site		Total
	Dioro	Sélingué	
Q613Q	0	1	1
WT (sauvage)	10	18	28
Total	10	19	29

La mutation Q613Q était associée à une recrudescence parasitaire de *P. falciparum*.

**Tableau XII :** Répartition des mutations en fonction de la molécule administrée

Mutation jours 7 à 42	AA	AL	Total
Q613Q	0	1	1
WT (sauvage)	8	20	28
Total	8	21	29

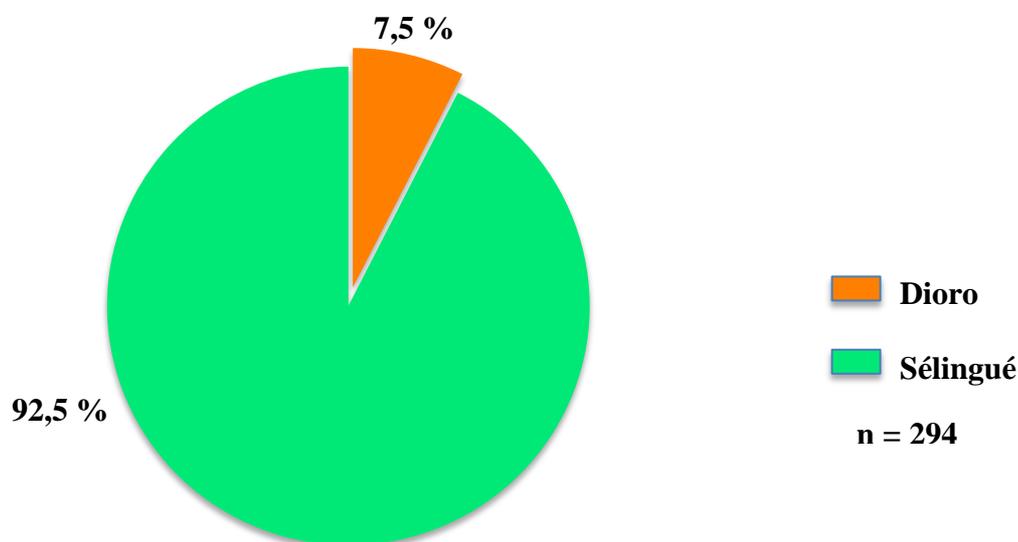
**AL :** Artémether-Luméfanthrine; **AA :** Artésunate-Amodiaquine.

La combinaison artémether-luméfanthrine était associée à la mutation Q613Q du gène *PfK13*. Cette mutation n'était pas associée à un retard de clairance parasitaire.

### 4.3 Les échantillons de J0 à J42

294- 265= 29; 29 correspond aux échantillons de recrudescences.

Un total de 294 échantillons dont la qualité de l'ADN était suffisante pour l'analyse a été amplifié, parmi lesquels se trouvaient 29 échantillons de recrudescence.



**Figure 13. Répartition des échantillons en fonction des sites de l'étude**

92,5 % (272/294) des échantillons analysés étaient en provenance de Sélingué et 7,5 % (22/294) des échantillons provenaient de Dioro sur un total de 294 échantillons (**figure 13**).

**Tableau XIII : Répartition des mutations en fonction des sites de l'étude**

Mutation en général	Site		Total
	Dioro	Sélingué	
C469C	0	2	2
K503K	0	1	1
P413P	1	0	1
Q613Q	0	2	2
T478T	0	1	1
Y493Y	0	3	3
WT (sauvage)	21	263	284
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>272</b>	<b>294</b>

Sur l'ensemble des échantillons traités, les mutations observées représentaient **3,4 %** (10/294), soient respectivement : **0,34 %** (1/294) et **3,06 %** (9/294) à Dioro et Sélingué.

**Tableau XIV : Répartition des mutations en fonction des mutations signalées par l’OMS**

<b>Mutation</b>	<b>Non signalée par l'OMS</b>	<b>Signalée par l'OMS</b>	<b>Total</b>
C469C	2	0	2
K503K	1	0	1
P413P	1	0	1
Q613Q	1	0	1
T478T	1	0	1
Y493Y	3	0	3
Total	9	0	9

Toutes les mutations observées sur le gène *Pfk13* à Dioro et Sélingué ne faisaient pas parties des mutations signalées par l’OMS.

## 5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Les échantillons ont été collectés dans les deux sites d'études suivant une période de suivi, qui va du jour où le malade reçoit sa première dose de médicament appelé jour 0 et les périodes de réévaluations cliniques qui ont été effectuées aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 et 42. Au total nous avons sélectionnés pour cette étude 410 échantillons en provenance de Dioro et Sélingué. Ce nombre était en rapport avec les échantillons disponibles au LBMA au moment de la sélection des échantillons. Sur les 410 échantillons sélectionnés, 116 n'ont pas été amplifiés à cause de la faible quantité de l'ADN pour l'analyse. La majorité des échantillons de l'étude qui ont été analysés provenait de Sélingué (272 échantillons de Sélingué et 22 échantillons de Dioro). Aussi, les données relatives à la parasitemie et la température corporelle des échantillons de J0 à J3 de certains participants à l'étude, ne nous étaient pas disponibles au moment de l'analyse des données.

La méthode de Sanger a été utilisée dans la recherche des mutations sur le gène *PfK13*. C'est une méthode qui reste largement appliquée comme principale méthode de validation de la présence des variants [90]. Après analyse des séquences du gène *PfK13*, six (6) mutations synonymes ont été identifiées; soit une prévalence globale de 3,4 % (0,34 % des mutations identifiées étaient de Dioro et 3,06 % des mutations identifiées étaient de Sélingué) ce qui indique une diversité génétique plus élevée à Sélingué. Les mutations observées étaient respectivement C469C; K503K; P413P; Q613Q; T478T et Y493Y. Des mutations similaires ont été observées par Edwin Kamau *et al.* en 2015, au cours de leur étude sur le polymorphisme de *PfK13* sur les échantillons en provenance de 12 pays de l'Afrique subsaharienne : la mutation C469C (Ghana), la mutation T478T (Côte d'Ivoire, Kenya), la mutation Y493Y (République Démocratique du Congo, Ghana, Tanzanie) [9]. Dans cette même étude, au Mali, c'est la mutation A578S avec une prévalence de 1,1 % qui a été observée [9] et que nous n'avons pas retrouvée dans notre étude. Cette mutation a été signalée par Bjorkman *et al.* à Bougoula-Hameau et Bandiagara un autre site du Mali [29]; et par d'autres études faites par Conrad *et al.* en Ouganda en 2006 et Muwanguzi *et al.* au Kenya en 2009 [91][92].

Les mutations de types sauvages étaient prédominantes et la mutation synonyme Y493Y avec une fréquence de 1,1 % étaient la plus représentée. Cette mutation (Y493Y)

soit 0,42 % cas était associée à un retard de clairance parasitaire. Cependant, elle ne faisait pas partie des échantillons ayant une recrudescence parasitaire. Seule la mutation **Q613Q** retrouvé sur un échantillon traité avec la combinaison AL était associée à une recrudescence parasitaire. Nous n'avons pas trouvé d'association entre la mutation **Q613Q** et le retard de clairance parasitaire. Une étude faite par Miotto *et al.* en 2013, ont suggéré que la résistance à l'artémisinine est peut-être due à une action combinée des mutations sur l'hélice *K13* ajouté par d'autres facteurs génétiques ou non génétiques [93].

Nous notons deux faits marquants, le premier est relatif à la présence de la mutation ponctuelle **Y493Y** associée à un retard de clairance parasitaire, le patient n'arrive pas à éliminer dans les 48 heures les parasites après la prise de AL. Ce qui a été expliqué par les auteurs, qui suggèrent que cette mutation signe l'éminence de l'apparition de la mutation 580 qui est associée à la résistance en Asie du Sud-Est.

Les mutations que nous avons identifiées sur le gène *PfK13* à Dioro et Sélingué n'ont pas entraîné de changement d'acide aminé. Ces mutations sont classées comme silencieuses car elles n'ont quasiment pas d'impact significatif sur la fonction protéique de *P. falciparum*. Souleymane Dama *et al.* en 2017 avaient observés des mutations différentes à celle observées à Dioro et Sélingué, au cours de leur étude sur « la Réduction de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* après un traitement oral artéméther-luméfantine au Mali ». Ils ont identifié trois (3) mutations non synonymes (**A522C**; **A578S** et **G638R**) sur les échantillons collectés à Sotuba et à Kollé avant traitement [94]. Après traitement à AL, les trois mutations n'ont pas été observées [94].

Les mutations **C469C**; **K503K**; **P413P**; **Q613Q**; **T478T**; **Y493Y** que nous avons observées dans cette étude étaient des mutations synonymes qui ne faisait pas partie des marqueurs de résistance validés ou candidats/associés signalés par l'OMS [85]. Les origines de ces souches seront plutôt asiatiques, il s'agit d'une perspectives d'évaluer la sensibilité/resistance de ces souches *in vitro* par la technique Ring Survival Assay [85].

Les résultats de cette étude montrent une multitude de mutation au niveau du domaine *propeller Kelch 13* de *P. falciparum* dans les deux sites de l'étude (Dioro et Sélingué). La seconde remarque est liée à la mutation **Q613Q** associée à une recrudescence avec la combinaison AL. Une étude plus poussé pourrait élucidée cette relation.

## 6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

### 6.1 Conclusion

La méthode de Sanger et l'analyse des séquences nous ont permis d'identifier six (6) mutations aux positions : 469; 503; 413; 613; 478 et 493 dans le domaine du gène *propeller Kelch 13* avec une prévalence globale de 3,4 %. Seule la mutation Y493Y était associée à un retard de clairance parasitaire avec une fréquence de 0,42 %, par contre cette mutation n'a pas été observée sur les échantillons de recrudescences parasitaires. Seule la mutation Q613Q a été observée sur un échantillon de recrudescence parasitaires.

Nous avons observé un polymorphisme sur le gène *PfK13* et démontre une grande flexibilité de ce gène qui doit nous pousser à renforcer le monitoring de l'émergence de la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine.

### 6.2 Recommandations

Nous recommandons :

#### ➤ Au LBMA

- de continuer les investigations sur les gènes responsables de la résistance à l'artémisinine et les médicaments antipaludiques partenaires;
- de mener des études similaires en partenariat avec d'autres structures de recherche dans d'autres localités de forte endémicité palustre.

#### ➤ Au PNLP

- de continuer à surveiller la prise correcte des CTA dans les différentes structures de santé;
- de continuer à appuyer le LBMA dans le monitoring de l'émergence de la résistance des CTA à *P. falciparum*.

#### ➤ À l'USAID

- de continuer à financer les études d'efficacité thérapeutiques au Mali en étendant l'étude à plusieurs sites.

## 7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique, Programme National de Lutte contre le Paludisme. Directives Nationales pour la prise en charge des cas de paludisme au Mali. 2016.
2. Organisation mondiale de la santé. World malaria report 2018. 2018.
3. World Health Organization. World Malaria Report 2015. [Internet]. World Health Organization; 2016 [cité 3 sept 2018]. Disponible sur: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4778804>
4. Programme National de Lutte contre le Paludisme. Canevas de synthèse des rapports d'activités 2017 et de programmation 2019 pour les journées d'évaluation des structures centrales. Mali, 2018.
5. Cheruiyot J, Ingasia LA, Omondi AA, Juma DW, Opot BH, Ndegwa JM, et al. Polymorphisms in *Pfmdr1*, *Pfprt*, and *Pfnhe1* genes are associated with reduced in vitro activities of quinine in *Plasmodium falciparum* isolates from western Kenya. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2014;58(7):3737- 43.
6. Zeng W, Bai Y, Wang M, Wang Z, Deng S, Ruan Y, et al. Significant Divergence in Sensitivity to Antimalarial Drugs between Neighboring *Plasmodium falciparum* Populations along the Eastern Border of Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(2).
7. Wang Z, Wang Y, Cabrera M, Zhang Y, Gupta B, Wu Y, et al. Artemisinin Resistance at the China-Myanmar Border and Association with Mutations in the K13 Propeller Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2015;59(11):6952- 9.
8. Coppée R, Jeffares DC, Miteva MA, Sabbagh A, Clain J. Comparative structural and evolutionary analyses predict functional sites in the artemisinin resistance malaria protein K13. *Scientific Reports* [Internet]. déc 2019 [cité 4 janv 2020];9(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-47034-6>
9. Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, et al. K13-Propeller Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* Parasites From Sub-Saharan Africa. *Journal of Infectious Diseases.* 2 nov 2014;jiu608.
10. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, et al. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *N Engl J Med.* 23 2016;374(25):2453- 64.
11. Schmoltdt A, Benthe HF, Haberland G. Digitoxin metabolism by rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 1 sept 1975;24(17):1639- 41.

12. Guggisberg AM, Frasse PM, Jezewski AJ, Kafai NM, Gandhi AY, Erlinger SJ, et al. Suppression of Drug Resistance Reveals a Genetic Mechanism of Metabolic Plasticity in Malaria Parasites. Wellems TE, éditeur. *mBio* [Internet]. 13 nov 2018 [cité 27 oct 2019];9(6). Disponible sur: <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.01193-18>
13. Scholar E. Malaria. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* [Internet]. Elsevier; 2007 [cité 5 nov 2019]. p. 1- 5. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080552323609328>
14. IMWONG, Mallika, MADMANEE, Wanassanan, SUWANNASIN, Kanokon, et al. Asymptomatic natural human infections with the simian malaria parasites *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium knowlesi*. *The Journal of infectious diseases*, 2018, vol. 219, no 5, p. 695-702.
15. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 27 mars 2004;363(9414):1017- 24.
16. Pradines B, Dormoi J, Briolant S, Bogreau H, Rogier C. La résistance aux antipaludiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. mai 2010;2010(422):51- 62.
17. Maghendji-Nzondo S, Kouna L-C, Mourembou G, Boundenga L, Imboumy-Limoukou R-K, Matsiegui P-B, et al. Malaria in urban, semi-urban and rural areas of southern of Gabon: comparison of the *Pfmdr 1* and *Pfcrt* genotypes from symptomatic children. *Malaria Journal* [Internet]. déc 2016 [cité 28 oct 2018];15(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-016-1469-1>
18. Desai M, Gutman J, Taylor SM, Wiegand RE, Khairallah C, Kayentao K, et al. Impact of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance on Effectiveness of Intermittent Preventive Therapy for Malaria in Pregnancy at Clearing Infections and Preventing Low Birth Weight. *Clinical Infectious Diseases*. 1 févr 2016;62(3):323- 33.
19. Le Bras J, Musset L, Clain J. Les résistances aux médicaments antipaludiques. *Médecine et Maladies Infectieuses*. août 2006;36(8):401- 5.
20. Mayengue PI, Niama RF, Kouhounina Batsimba D, Malonga-Massanga A, Louzolo I, Loukabou Bongolo NC, et al. No polymorphisms in K13-propeller gene associated with artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* isolated from Brazzaville, Republic of Congo. *BMC Infectious Diseases* [Internet]. déc 2018 [cité 21 juill 2019];18(1). Disponible sur: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3453-6>
21. Ocan M, Akena D, Nsohya S, Kanya MR, Senono R, Kinengyere AA, et al. K13-propeller gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasite population in malaria

- affected countries: a systematic review of prevalence and risk factors. *Malaria Journal* [Internet]. déc 2019 [cité 9 janv 2020];18(1). Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-019-2701-6>
22. Pacheco MA, Kadakia ER, Chaudhary Z, Perkins DJ, Kelley J, Ravishankar S, et al. Evolution and Genetic Diversity of the k13 Gene Associated with Artemisinin Delayed Parasite Clearance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(8).
  23. World Health Organization, Global Malaria Programme. World malaria report 2017. 2017.
  24. Alker AP, Kazadi WM, Kutelemani AK, Bloland PB, Tshefu AK, Meshnick SR. dhfr and dhps genotype and sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure in children with *falciparum malaria* in the Democratic Republic of Congo. *Trop Med Int Health*. nov 2008;13(11):1384- 91.
  25. Baraka V, Tinto H, Valea I, Fitzhenry R, Delgado-Ratto C, Mbonye MK, et al. In vivo selection of *Plasmodium falciparum Pfcr* and *Pfmdr1* variants by artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 2015;59(1):734- 7.
  26. Somé AF, Sorgho H, Zongo I, Bazié T, Nikiéma F, Sawadogo A, et al. Polymorphisms in K13, *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, and *pfdhps* in parasites isolated from symptomatic malaria patients in Burkina Faso. *Parasite*. 2016;23:60.
  27. Igbasi U, Oyibo W, Omilabu S, Quan H, Chen S, Shen H, et al. Kelch 13 propeller gene polymorphism among *Plasmodium falciparum* isolates in Lagos, Nigeria: Molecular Epidemiologic Study. *Tropical Medicine & International Health* [Internet]. 27 mai 2019 [cité 21 juill 2019]; Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tmi.13273>
  28. Dorkenoo AM, Yehadji D, Agbo YM, Layibo Y, Agbeko F, Adjeloh P, et al. Therapeutic efficacy trial of artemisinin-based combination therapy for the treatment of uncomplicated malaria and investigation of mutations in k13 propeller domain in Togo, 2012–2013. *Malar J*. déc 2016;15(1):331.
  29. Bjorkman A, Kone A, Adams M, Diallo N, Dara A, Maiga AW, et al. Polymorphisms in the K13-Propeller Gene in Artemisinin-Susceptible *Plasmodium falciparum* Parasites from Bougoula-Hameau and Bandiagara, Mali. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 3 juin 2015;92(6):1202- 6.
  30. Tacoli C, Gai PP, Bayingana C, Sift K, Geus D, Ndoli J, et al. Artemisinin Resistance-Associated K13 Polymorphisms of *Plasmodium falciparum* in Southern Rwanda, 2010-2015. *Am J Trop Med Hyg*. 2 nov 2016;95(5):1090- 3.

31. SAADE, Oumou H. Le paludisme au mali: Bilan de dix huit années d'Activités de recherche et de lutte. 2005. Thèse de doctorat: thèse de médecine. Bamako: Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako, 2005.
32. Direction Nationale de la Santé. Annuaire SLIS 2016. 2016.
33. Programme national de lutte contre le paludisme, le Centre de recherche et de formation sur le paludisme, KEMRI-Wellcome Research Trust et la London School of Hygiene & Tropical Medicine (2018). Mali : Un profil de la lutte contre le paludisme et de l'épidémiologie. Ministère de la santé du Mali.
34. Organisation mondiale de la santé. Entomologie du paludisme et lutte antivectorielle. 2014.
35. Pages F, Orlandipradines E, Corbel V. Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. Médecine et Maladies Infectieuses. mars 2007;37(3):153- 61.
36. DIALLO, Salimata. Surveillance de la résistance de *Plasmodium falciparum* a la chloroquine, Sélingué.Thèse de doctorat: thèse de pharmacie. Bamako: Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako, 2018.
37. Taylor C, Touré YT, Carnahan J, Norris DE, Dolo G, Traoré SF, et al. Gene flow among populations of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, in Mali, West Africa. Genetics. févr 2001;157(2):743- 50.
38. Kappe SHI, Buscaglia CA, Nussenzweig V. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:29- 59.
39. DIALLO, Abdoul Karim. Test d'efficacité de la Combinaison Thérapeutique Artémether plus Luméfantrine dans la Commune Rurale de Dioro : Prévalence des mutations sur les gènes *Pfmdr1* et *PfK13* chez les parasites isolés lors des échecs thérapeutiques. Doctorat de thèse : thèse de pharmacie. Bamako : Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako, 2018.
40. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. J Clin Invest. 1 avr 2008;118(4):1266- 76.
41. Alano P. *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. Mol Microbiol. oct 2007;66(2):291- 302.
42. Trudel L, Couillard M, Laboratoire de santé publique du Québec. Identification morphologique des parasites de la malaria cahier de stage [Internet]. Montréal, Qué.: Laboratoire de santé publique du Québec; 2005 [cité 6 nov 2019]. Disponible sur:

<http://ra.ocls.ca/ra/login.aspx?inst=centennial&url=https://www.deslibris.ca/ID/201312>

43. Stephens JWW. A New Malaria Parasite of Man. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 30 déc 1922;16(4):383- 8.
44. Rutledge GG, Böhme U, Sanders M, Reid AJ, Cotton JA, Maiga-Ascofare O, et al. *Plasmodium malariae* and *P. ovale* genomes provide insights into malaria parasite evolution. *Nature*. 2 févr 2017;542(7639):101- 4.
45. Ayala FJ, Escalante AA, Rich SM. Evolution of *Plasmodium* and the recent origin of the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia*. sept 1999;41(1- 3):55- 68.
46. Miri-Moghaddam E, Bameri Z, Mohamadi M. Duffy blood group genotypes among malaria *Plasmodium vivax* patients of Baoulch population in southeastern Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. mars 2014;7(3):206- 7.
47. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. *Vivax malaria*: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg*. déc 2007;77(6 Suppl):79- 87.
48. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28 déc 2016;95(6 Suppl):15- 34.
49. Assefa S, Lim C, Preston MD, Duffy CW, Nair MB, Adroub SA, et al. Population genomic structure and adaptation in the zoonotic malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 20 oct 2015;112(42):13027- 32.
50. Ahmed MA, Lau YL, Quan F-S. Diversity and natural selection on the thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) gene of *Plasmodium knowlesi* in Malaysia. *Malar J*. déc 2018;17(1):274.
51. Hôpital d'instruction des années Bégin, service de maladies infectieuses et tropiatles, 69, avenue de Paris, FRA, Hôpital d'instruction des années Bégin, laboratoire de biologie, 69, avenue de Paris, FRA, A S, C R, H D, C B, et al. *Plasmodium knowlesi*: une espèce émergente chez l'homme . 2012;22(4):417- 21.
52. World Health Organization. Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme: guide du stagiaire. Place of publication not identified: World Health Organization; 2015.
53. KHIM, Nimol. Approche génomique et bioinformatique de l'émergence et de la diffusion des résistances chez *Plasmodium* au Cambodge. 2014. Thèse de doctorat.
54. Gilson PR, Crabb BS. Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *International Journal for Parasitology*. janv 2009;39(1):91- 6.

55. GUINDO, Cheick Oumar. Clairance parasitaire de l'artésunate+ sulfadoxine-pyriméthamine versus artéméther-luméfántrine chez les patients souffrant de paludisme non compliqué à Banambani, au Mali. 2015.
56. TOUZE, J. E., FOURCADE, L., PRADINES, B., et al. Les modes d'action des antipaludiques Intérêt de l'association atovaquone–proguanil. *Medecine tropicale*, 2002, vol. 62, no 3, p. 219.
57. TOUNKARA, Boubacar. Efficacité de l'Artésunate-Amodiaquine en chimio-prévention du paludisme saisonnier en milieu scolaire périurbain de Bamako, à Sirakoro-Meguetana, Thèse de doctorat: thèse de médecine. Bamako: Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako, 2015.
58. Ralph SA, D'Ombraïn MC, McFadden GI. The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resistance Updates*. juin 2001;4(3):145- 51.
59. Dong Y, Wang J, Sun A, Deng Y, Chen M, Xu Y, et al. Genetic association between the *Pfk13* gene mutation and artemisinin resistance phenotype in *Plasmodium falciparum* isolates from Yunnan Province, China. *Malar J*. déc 2018;17(1):478.
60. Bridgford JL, Xie SC, Cobbold SA, Pasaje CFA, Herrmann S, Yang T, et al. Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nature Communications* [Internet]. déc 2018 [cité 27 août 2019];9(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-06221-1>
61. Muangphrom P, Seki H, Fukushima EO, Muranaka T. Artemisinin-based antimalarial research: application of biotechnology to the production of artemisinin, its mode of action, and the mechanism of resistance of *Plasmodium* parasites. *Journal of Natural Medicines*. juill 2016;70(3):318- 34.
62. Foote SJ, Cowman AF. The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. *Acta Tropica*. mars 1994;56(2- 3):157- 71.
63. Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic Agent Atovaquone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 mai 2002;46(5):1163- 73.
64. Ralph SA, D'Ombraïn MC, McFadden GI. The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resistance Updates*. juin 2001;4(3):145- 51.
65. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, et al. A Molecular Marker for Chloroquine-Resistant *Falciparum* Malaria. *New England Journal of Medicine*. 25 janv 2001;344(4):257- 63.
66. Thomé R, Lopes SCP, Costa FTM, Verinaud L. Chloroquine: Modes of action of an undervalued drug. *Immunology Letters*. juin 2013;153(1- 2):50- 7.

67. Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnädig N, Uhlemann A-C, et al. Globally prevalent *PfMDR1* mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nature Communications* [Internet]. déc 2016 [cité 7 déc 2018];7(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ncomms11553>
68. Cowman AF. The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*: Are they involved in chloroquine resistance? *Parasitology Today*. janv 1991;7(4):70- 6.
69. Duraisingh MT, Cowman AF. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop*. juin 2005;94(3):181- 90.
70. Ndiaye D, Dieye B, Ndiaye YD, Van Tyne D, Daniels R, Bei AK, et al. Polymorphism in *dhfr/dhps* genes, parasite density and ex vivo response to pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria parasites in Thies, Senegal. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. déc 2013;3:135- 42.
71. Vaidya AB, Mather MW. Atovaquone resistance in malaria parasites. *Drug Resistance Updates*. oct 2000;3(5):283- 7.
72. McKeage K, Scott LJ. Atovaquone/Proguanil: A Review of its Use for the Prophylaxis of *Plasmodium falciparum* Malaria. *Drugs*. 2003;63(6):597- 623.
73. PALOQUE, Lucie, RAMADANI, Arba P., MERCEREAU-PUIJALON, Odile, et al. *Plasmodium falciparum*: multifaceted resistance to artemisinins. *Malaria journal*, 2016, vol. 15, no 1, p. 149.
74. Cotton RG, Scriver CR. Proof of « disease causing » mutation. *Hum Mutat*. 1998;12(1):1- 3.
75. Hanna N, Parfait B, Vidaud D, Vidaud M. Mécanismes et conséquences des mutations. *médecine/sciences*. nov 2005;21(11):969- 80.
76. Wittwer CT. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry*. 1 juin 2003;49(6):853- 60.
77. Senapin S, Molthathong S, Phiwsaiya K, Jaengsanong C, Chuchird N. Application of high resolution melt (HRM) analysis for duplex detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in shrimp. *Molecular and Cellular Probes*. oct 2010;24(5):291- 7.
78. Lamoril J, Ameziane N, Deybach J-C, Bouizegarène P, Bogard M. Les techniques de séquençage de l'ADN: une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. oct 2008;23(5):260- 79.
79. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 déc 1977;74(12):5463- 7.

80. Ilie M, Long É, Hofman V, Lespinet V, Bordone O, Washetine K, et al. Les méthodes de séquençage de « nouvelle génération » (NGS) et le cancer broncho-pulmonaire: principales technologies, applications et limites actuelles en pathologie. *Revue Francophone des Laboratoires*. janv 2014;2014(458):51- 8.
81. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 juin 2009;106(23):9362- 7.
82. Penman B, Buckee C, Gupta S, Nee S. Genome-wide association studies in *Plasmodium* species. *BMC Biol*. 13 juill 2010;8:90.
83. Wellcome Trust Case Control Consortium, Malaria Genomic Epidemiology Network, Jallow M, Teo YY, Small KS, Rockett KA, et al. Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. *Nat Genet*. juin 2009;41(6):657- 65.
84. Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in *Plasmodium*. *Nature Reviews Microbiology*. mars 2018;16(3):156- 70.
85. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy: status report. World Health Organization, 2018.
86. White NJ. Malaria parasite clearance. *Malaria Journal* [Internet]. déc 2017 [cité 2 sept 2019];16(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-1731-1>
87. Aweeka FT, German PI. Clinical Pharmacology of Artemisinin-Based Combination Therapies. *Clinical Pharmacokinetics*. 2008;47(2):91- 102.
88. Lopera-Mesa TM, Doumbia S, Chiang S, Zeituni AE, Konate DS, Doumbouya M, et al. *Plasmodium falciparum* Clearance Rates in Response to Artesunate in Malian Children With Malaria: Effect of Acquired Immunity. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 juin 2013;207(11):1655- 63.
89. Michael OS, Gbotosho GO, Folarin OA, Okuboyejo T, Sowunmi A, Oduola AM, et al. Early variations in *Plasmodium falciparum* dynamics in Nigerian children after treatment with two artemisinin-based combinations: implications on delayed parasite clearance. *Malaria Journal*. 2010;9(1):335.
90. Elsensohn MH, Leblay N, Dimassi S, Campan-Fourn A, Labalme A, Roucher-Boulez F, et al. Méthode statistique pour la comparaison de pipelines utilisés dans le séquençage à haut débit. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*. mai 2016;64:S128.
91. Conrad MD, Bigira V, Kapisi J, Muhindo M, Kanya MR, Havlir DV, et al. Polymorphisms in K13 and falcipain-2 associated with artemisinin resistance are not

prevalent in *Plasmodium falciparum* isolated from Ugandan children. PLoS ONE. 2014;9(8):e105690.

92. Muwanguzi J, Henriques G, Sawa P, Bousema T, Sutherland CJ, Beshir KB. Lack of K13 mutations in *Plasmodium falciparum* persisting after artemisinin combination therapy treatment of Kenyan children. Malaria Journal [Internet]. déc 2016 [cité 7 mars 2020];15(1). Disponible sur: <http://www.malariajournal.com/content/15/1/36>

93. Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, Macinnis B, Campino S, Rockett KA, et al. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. Nat Genet. juin 2013;45(6):648- 55.

94. DAMA, Souleymane, NIANGALY, Hamidou, OUATTARA, Amed, et al. Reduced ex vivo susceptibility of *Plasmodium falciparum* after oral artemether–lumefantrine treatment in Mali. Malaria journal, 2017, vol. 16, no 1, p. 59.

95. Cambray G, Mazel D. Synonymous Genes Explore Different Evolutionary Landscapes. Malik HS, éditeur. PLoS Genetics. 14 nov 2008;4(11):e1000256.

## 8. ANNEXES

### Annexe 1: Les codes génétiques standards [95]

TTT	<i>Phe</i>	TCT	<i>Ser</i>	TAT	<i>Tyr</i>	TGT	<u><i>Cys</i></u>
TTC		TCC		TAC		TGC	
TTA	<i>Leu</i>	TCA		Stop	TAA	TGA	Stop
TTG		TCG			TAG	TGG	<u><i>Trp</i></u>
CTT		CCT	<i>Pro</i>	CAT	<u><i>His</i></u>	CGT	<i>Arg</i>
CUC	<i>Leu</i>	CCC		CAC		CGC	
CTA		CCA		CAA	<u><i>Gln</i></u>	CGA	
CTG	CCG	CAG		CGG			
ATT	<i>Ile</i>	ACT	<i>Thr</i>	AAT	<i>Asn</i>	AGT	<u><i>Ser</i></u>
ATC		ACC		AAC		AGC	
ATA		ACA		AAA	<i>Lys</i>	AGA	<i>Arg</i>
ATG	<i>Met</i>	ACG		AAG		AGG	
GTT	<i>Val</i>	GCT	<i>Ala</i>	GAT	<i>Asp</i>	GGT	<i>Gly</i>
GTC		GCC		GAC		GGC	
GTA		GCA		GAA	<i>Glu</i>	GGA	
GTG		GCG		GAG		GGG	

### Annexe 2 : Critères de classification des mutations de résistance à l'artémisinine selon l'OMS (*PfKelch 13*) [86]

Classifications de mutation de résistance à l'artémisinine du gène K13 (OMS 2018)	
Validées	Corrélée avec la clairance parasitaire retardée dans les études cliniques et validée par des données in vitro.
Candidats/associées	Corrélée avec une clairance parasitaire retardée mais n'a pas été validée par les données in vitro.
Associées / (pas d'importance statistique)	Variante moins fréquentes associées à une clairance parasitaire retardée mais sans signification statistique en raison du faible nombre de cas.
Pas associées	Variante fréquentes mais non-associées à une résistance clinique ou in vitro.
Non classées par l'OMS	Mutation non synonyme ou synonyme observée dans cette étude qui n'est pas incluse dans les classifications de l'OMS

## Les mutations validées et candidats/associées signalées par l’OMS

VALIDATED		CANDIDATES/ASSOCIATED	
F446I	P553L	P441L	G538V
N458Y	R561H	G449A	V568G
M476I	C580Y	C469F	P574L
Y493H		A481V	F673I
R539T		P527H	A675V
I543T		N537I	

Les mutations de résistance validées et candidates associées à la résistance dans le domaine K13 BtB / PoZ et l'hélice [86].

### Annexe 3 : Les procédures opératoires standardisées du séquençage réalisées au laboratoire

- Les conditions de la PCR nichée

**Tableau XV** : Composition du mélange réactionnel de la 1<sup>ère</sup> réaction

Réactifs	Concentration initiale	Pour 20,0 µL de réaction	Concentration finale
ddH <sub>2</sub> O	-----	12,4 µL	---
HF Tampon	5X	4,0 µL	1X
1° Amorce allé	10 µM	1,0 µL	0,5 µM
1° Amorce retour	10 µM	1,0 µL	0,5 µM
DNTP	10mM	0,4 µL	0,2 µM
HF Phusion Taq	5U/µL	0,2 µL	1U
Matrice d’ADN	-----	1,0 µL	---
TOTAL		20,0 µL	

Diluer le produit de PCR de la 1<sup>ère</sup> réaction au 1 :10.

**Tableau XVI** : Composition du mélange réactionnel de la 2<sup>ème</sup> réaction

Réactifs	Concentration initiale	Pour 20,0 µL de réaction	Concentration finale
ddH <sub>2</sub> O	---	12,4 µL	---
HF Tampon	5X	4,0 µL	1X
1° Amorce allé	10 µM	1,0 µL	0,5 µM
1° Amorce retour	10 µM	1,0 µL	0,5 µM
DNTP	10mM	0,4 µL	0,2 µM
HF Phusion Taq	5U/µL	0,2 µL	1U
Diluat (1 :10)1°RxN	---	1,0 µL	---
TOTAL		20,0 µL	

➤ **Les conditions du cycle de la PCR nichée**

1<sup>ère</sup> Réaction

98 °C 2 : 00 min	} 30X
98 °C 0 : 10 min	
48 °C 0 : 30 min	
68 °C 2 : 30 min	
68 °C 10: 30 min	
4 °C ∞	

2<sup>e</sup> réaction

98 °C 2 : 00 min	} 30X
98 °C 0 : 10 min	
54 °C 0 : 30 min	
68 °C 2 : 30 min	
68 °C 10: 00 min	
4 °C ∞	

Le produit de PCR de la deuxième réaction contient des fragments d'ADN amplifiés de la séquence du gène *PfK13*.

**NB** : En cas de besoin, le protocole peut être stoppé à ce niveau et garder l'amplicon entre 2-8 °C pour une semaine.

▪ **Le lavage avec ExoSAP** (Purification de l'amplicon)

Cette étape a pour objectif le nettoyage enzymatique des produits de PCR permettant l'élimination de l'ADN simple brin, les dNTP et les amorces non incorporés rester en fin PCR.

**Tableau XVII** : Mélange réactionnel d'ExoSAP

Réactifs	Volumes
Exonuclease I	2,5 µL
TSAP	3,0 µL
DdH <sub>2</sub> O	494,5 µL
TOTAL	500,0 µL

➤ **Purification de l'amplicon étape par étape :**

- Préparer le mélange réactionnel selon le schéma précédent;
- ajouter 5 µL du mélange à chaque échantillon de 20 µL de la deuxième réaction;
- placer les tubes dans le thermocycleur puis lancer le cycle de purification

comme illustré ci-dessous.

**Les conditions du cycle de purification par ExoSAP**

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

▪ **Le cycle de séquençage**

Cette étape doit être lancée dans une plaque de 96 puits.

**Tableau XVIII** : Composition du mélange réactionnel du séquençage

Réactifs	Pour 10,0 µL de réaction
DdH <sub>2</sub> O	5,5 µL
Big dye Buffer	2,0 µL
Big Dye	1,0 µL
2° For ou Rev	0,5 µL
Diluat (1 :5) 2°RxN	1,0 µL
TOTAL	10,0 µL

## Les conditions des cycles de séquençage

96 °C	1 : 00 min	} 25X
96 °C	0 : 10 min	
50 °C	0 : 05 min	
60 °C	4 : 00 min	
4 °C	∞	

**NB :** En cas de besoin, le protocole peut être stoppé à ce niveau et garder l'amplicon entre 2-8 °C pour une semaine.

### ▪ La précipitation

Il faut disposer de :

- EDTA 0,125M pH= 8,0
- Sodium Acetate 3M pH= 5,2
- Ethanol 70 % et 100 % tous froids
- HiDi Formamide congelé
- Kimwipes
- Seal pour fermer les plaques
- Centrifugeuses avec portoirs de plaques

### ➤ La procédure de précipitation

1. Ajouter 2,0 µL d'EDTA 0,125M pH= 8 dans chaque puits de la plaque contenant un échantillon;
2. ajouter 2,0 µL de sodium acétate pH= 5,2 dans chaque puits;
3. ajouter 30,0 µL d'éthanol 100 % froid dans chaque puits de la plaque contenant un échantillon puis mélanger avec la pipette;
4. couvrir la plaque de seal et l'incuber à la température ambiante pendant 15-20 minutes;
5. centrifuger à 3200 rpm pendant 30 minutes à la température de 20,0 °C;
6. enlever le seal et couvrir la plaque de kimwipes puis l'inverser, ensuite centrifuger à

- 1000 rpm pendant 5 minutes;
7. ajouter 30,0  $\mu\text{L}$  d'éthanol 70 % froid dans chaque puits de la plaque contenant un échantillon puis mélanger avec la pipette;
  8. couvrir la plaque de seal, puis centrifuger a 3200 rpm pendant 15 minutes;
  9. enlever le seal et couvrir la plaque de kimwipes puis l'inverser, ensuite centrifuger à 1000 rpm pendant 5 minutes;
  10. laisser sécher la plaque dans la température ambiante pendant 30 minutes à 1 heure;
  11. ajouter 10,0  $\mu\text{L}$  de HiDi Formamide dans chaque puits de la plaque, couvrir la plaque et passer au séquençage proprement dit. Pour les puits qui ne contiennent pas d'échantillon, on peut mettre de l'eau distillée.

## 9. FICHE SIGNALÉTIQUE ET RESUME

### ❖ Fiche signalétique

**Auteur :** Béatrice TOGO

**Tel :** (00223) 76 82 39 96

**E-mail :** [togobea6@gmail.com](mailto:togobea6@gmail.com)

**Titre :** Prévalence des mutations sur le gène *Kelch 13* de *Plasmodium falciparum* à Dioro et Sélingué, au Mali

**Nationalité :** Malienne

**Année Universitaire :** 2019-2020

**Ville de soutenance :** Bamako-Mali

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

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

---

### ❖ Résumé en français

L'émergence de la résistance à l'artémisinine est une préoccupation dans les progrès de lutte contre le paludisme dans le monde et une réelle menace pour les régions d'Afrique endémique palustre. Nous avons fait une étude rétrospective de novembre 2017 à août 2019 sur les échantillons de Dioro et Sélingué qui sont situés respectivement dans les régions de Ségou et Sikasso, au Mali, afin d'étudier la prévalence des mutations dans le domaine propeller *Kelch 13* de *Plasmodium falciparum*. Dioro et Sélingué sont des localités où la transmission du paludisme est favorisée par la présence de barrage et des aménagements hydro-agricoles.

Les prélèvements de sang sur papiers confettis ont servi à faire l'extraction de l'ADN de *Plasmodium falciparum* à partir du kit Qiagen conformément aux indications du fabricant. Les extraits d'ADN de 294 échantillons ont permis le génotypage par la méthode de Sanger. Après l'analyse des séquences, 6 mutations synonymes ont été identifiées avec une prévalence de 3,4 %. La mutation Y493Y avec une fréquence de 0,42 %, était la seule mutation associée à un retard de clairance parasitaire.

Les résultats de l'étude ont montré un polymorphisme sur le gène *PfK13* et démontre une grande flexibilité de ce gène qui doit nous pousser à renforcer le monitoring de l'émergence de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux dérivés de l'artémisinine.

**Mots clés :** Prévalence; mutations; *Plasmodium falciparum*; *PfK13*; clairance parasitaire.

## Identification sheet

**Author :** Béatrice TOGO

**Tel :** 00223) 76 82 39 96

**E-mail:** [togobea6@gmail.com](mailto:togobea6@gmail.com)

**Title :** Prevalence of mutations in the *Kelch 13* gene of *Plasmodium falciparum* in Dioro and Sélingué, Mali

**Academic Year :** 2019-2020      **City of defense :** Bamako-Mali

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

**Focus area :** Molecular Parasitology, Public Health, Pharmacology

---

## Abstract

The emergence of artemisinin resistance is a concern in progress in the fight against malaria worldwide and a real threat to regions of malaria-endemic Africa. We carried out a retrospective study from November 2017 to August 2019 on the samples of Dioro and Selingue, which are located respectively in the regions of Segou and Sikasso, in Mali, in order to study the prevalence of mutations in the propeller *Kelch 13* gene in domain of *Plasmodium falciparum*. Dioro and Selingue are localities where the transmission of malaria is favored by the presence of dams and hydro-agricultural facilities.

Blood samples from confetti were used to extract *Plasmodium falciparum* DNA from the Qiagen kit according to the manufacturer's directions. DNA extracts from 294 samples enabled genotyping by the Sanger method. After sequence analysis, 6 synonymous mutations were identified with a prevalence of 3.4 %. The Y493Y mutation with a frequency of 0.42 % was the only mutation associated with a delay in parasite clearance.

The results of the study showed a polymorphism on the *PfK13* gene and demonstrate a great flexibility of this gene, which should push us to strengthen the monitoring of the emergence of resistance of *Plasmodium falciparum* to artemisinin derivatives.

**Keywords :** Prevalence; mutations; *Plasmodium falciparum*; *PfK13*; parasitic cleara.

## **10. 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(e) 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(e) d'opprobres et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Je le jure !