

Ministère de l'Enseignement Supérieur
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

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020-2021

N° _____ /

THESE

Etude de la prévalence de *Plasmodium malariae* et
de sa susceptibilité *ex-vivo* aux molécules à activité
antiplasmodiale à Faladjé, Mali.

Présentée et soutenue publiquement le 04/12/2021 devant le jury
de la Faculté de Pharmacie

Par : Mme SOGORE Fanta

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

JURY

Président : Pr Abdoulaye DABO
Membres : Dr Souleymane DAMA
Dr Seidina A. S. DIAKITE
Co-Directeur : Dr Laurent DEMBELE
Directeur : Pr Abdoulaye A. DJIMDE

DEDICACES

Je rend grâce à Dieu le Tout puissant, le Clément et le Miséricordieux. Tout commence par Lui et tout finit par Lui. Je Lui rend grâce de m'avoir donné la vie, le courage et la santé sans quoi ce travail n'aurait pas eu lieu.

Au prophète Mohamed (PSL).

A mon papa Seydou et A ma mère Taïbatou Bamba

Vous m'avez donné la vie, vous êtes mes modèles de vie pour toujours.

Ça n'a pas été toujours facile, mais la graine a germé.

Je prie le bon Dieu qu'il vous accorde une bonne santé et une longue vie. Amen !

A mon époux Adama Goïta

Ta compagnie m'a été d'un grand réconfort lors des circonstances pénibles ; à toi je renouvelle mon sincère amour. Que Dieu nous unisse pour l'éternité. Amen !

A mon fils Dramane Goïta

Ta présence dans ma vie a été un grand soulagement et un réconfort. Que Dieu te donne une longue vie. Amen !

A Mon oncle feu Youssouf Traoré

Cher oncle sans toi je ne serais pas là aujourd'hui, plus qu'un oncle tu l'as été mais tout ce que Dieu fait est bon.

Repose en paix cher oncle.

A mes cher(e) s oncles et tantes merci pour vos conseils et affection à mon égard. Trouvez dans cette œuvre l'expression de ma profonde gratitude et de toute ma reconnaissance.

A mes frères et sœurs Sokolo, Djéneba, Soundjata, Samory, Noumouké, Manby, Bakary, Mahamoud : je vous "adore" au-delà des liens du sang et à jamais, rien ne peut nous séparer, pas même les frontières du temps. Que Dieu renforce nos liens de fraternité.

A mes grands-parents Mariam et Mahamoud Bamba merci pour vos encouragements et vos prières. Que le Tout Puissant vous accorde une bonne santé et une longue vie. Amen

Remerciements

- A la famille Sogoré, Goïta, Traoré, Sangaré, Macalou
- A mes amis et grandes sœurs Fatoumata Diabi, Sirantou Sissoko, Nana Wangara
- A toute la population de Faladjé, grand merci
- Au Doyen de la Faculté de Pharmacie Professeur Boubacar Traoré
- Au corps professoral de la Faculté de Pharmacie, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu.
- Au personnel du MRTC/DEAP, pour votre disponibilité et votre franche collaboration.
- A nos maîtres du MRTC/DEAP, pour votre engagement et votre souci constant de formation de qualité.
- A l'équipe de l'unité de chimiorésistance du MRTC/DEAP: Particulièrement au Professeur Abdoulaye DJIMDE, aux Docteurs, Mamadou TEKETE, Dinkorma OUOLOGUEM, Aminatou KONE, Souleymane DAMA, Nouhoum DIALLO, Hamidou NIANGALY, Bakary FOFANA, Nianwalou DARA, Amadou BAMADIO, Aliou TRAORE, Bakary SIDIBE, Cheick Papa Oumar SANGARE, Aboubecrin HAIDARA, Fatoumata I Ballo, Diagassan DOUMBIA, Sékou Sissoko, Bilal Traoré, Bintou Diarra, Diakité Ousmaela, Mohamed Maïga , aux internes, Nany Yacouba Barré , Amadou Daou ,Diakité Bassirou , Djéneba Diallo, Souleymane Koné, Bakoroba Diarra , Fatoumata Cissé , Boï Koné.

Aux personnels de MRTC/DEAP/MEDRU : Mme SISSOKO Daoulé DIALLO, Mme BATHILY Yaye dite Nah SISSOKO, Mlle Adama Guindo, Mme OUEDRAOGO Mariam Kouyaté, Mr Ibrahim Kamaté, Mr Youssouf Fané.

Merci pour le soutien dont vous avez fait preuve tout le long des travaux de cette thèse. Elle est la vôtre.

Hommage à feu Professeur Ogobara K Doumbo

Cher Professeur vous avez laissé un grand vide et malheureusement nous n'avons pas pu bénéficier directement de votre formation mais nul ne peut contre la volonté du bon Dieu et je sais que de là ou vous êtes, vous veillerez sur l'équipe.

Dors en paix Cher Maître

Amine

A notre Maître et président du jury

Professeur Abdoulaye DABO

- Professeur Titulaire de parasitologie à la FAPH
- Directeur Général du Centre National de la Recherche Scientifique et Technologie (CNRST)
- Enseignant-Chercheur à la FAPH

Cher Maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Auprès de vous nous avons pu bénéficier d'un enseignement de qualité. Nous avons admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques. C'est un immense honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Recevez ici Cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et juge

Docteur Souleymane DAMA

- Maître-assistant en Parasitologie-Mycologie à la FAPH
- Spécialiste en Pharmacologie préclinique et clinique
- Enseignant-Chercheur à la FAPH

Cher Maître, c'est un grand honneur et un réel plaisir que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Nous ne pourrions soumettre ce travail sans reconnaître votre rigueur scientifique et toute l'attention que vous portez à ce travail. Nous vous assurons notre profond attachement.

A notre Maître et juge

Docteur Seidina A S DIAKITE

- Maître -Assistant en immunologie à la Faculté de Pharmacie/ USTTB
- Docteur en Pharmacie, PhD en immunologie
- Enseignant-Chercheur à la FAPH

Cher Maître

Nous avons eu l'honneur de vous associer à ce travail. Votre calme, votre simplicité, votre disponibilité font de vous un Maître aux qualités recherchées.

Veillez recevoir, chère maitre, l'expression de nos sincères remerciements.

A notre Maître et co-Directeur de thèse

Docteur Laurent Dembélé

- Maître-Assistant à l'Université des Sciences, des Techniques et de Technologies de Bamako (USTTB), Faculté de pharmacie
- Docteur en biotechnologie, génie microbiologie
- Chercheur au MRTC Parasitologie

Cher Maître, de ce temps passé à vos côtés nous avons beaucoup appris de vos valeurs humaines et scientifiques. Votre courage et votre disponibilité nous ont été d'un grand atout pour la réalisation de ce travail. Nous ne saurions être assez reconnaissants pour tout l'intérêt et toute la considération que vous avez porté à ce travail.

Qu'ALLAH vous donne santé et longévité afin que plusieurs générations d'apprenants puissent bénéficier la qualité de votre enseignement. Amen !

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Abdoulaye A. DJIMDE

- Professeur Titulaire de Parasitologie -Mycologie à la FAPH
- Directeur du MRTC Parasitologie
- Chef de l'Unité d'Épidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance (MEDRU/MRTC)
- Directeur du Programme DELGEME
- Membre de l'Académie Africaine des Sciences

Cher Maître, permettez-nous de vous témoigner notre satisfaction pour l'honneur et le privilège que vous nous avez accordé en acceptant d'encadrer cette thèse. Vos qualités humaines et scientifiques nous ont beaucoup émus tout le long de ce travail.

Vous avez cultivé en nous, le sens du travail bien fait et la rigueur scientifique. Malgré vos multiples occupations vous n'avez pas hésité à donner le meilleur de vous-même pour la réalisation de ce travail. Trouvez ici, cher Maître l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible attachement.

Liste des sigles et abréviations :

ACD	Acid-Citrate-Dextrose
ADN	Acide désoxyribo- nucléique
AL	Artéméther-Luméfantrine
av.J.C	Avant Jésus christ
BB	Bleu de Bromophénol
°C	Degré Celsius
CPS	Chimio prévention du Paludisme Saisonnier
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
DEAP	Département d'Épidémiologie des Affections Parasitaires
DHA	Dihydroartémisinine
DHFR	Dihydrofolate Réductase
DHPS	DihydroPtéroate Synthétase
dl	Décilitre
DNTPs	Désoxy Nucléotide Triphosphate
FM	Frottis Mince
FAPH	Faculté de Pharmacie
FBS	Fœtal Bovine Serum
G	Gramme
G6PD	Glucose-6 Phosphate –Déshydrogénase
GNF	Genomic Novartis Fondation
GE	Goutte Épaisse
GTS	Global technical strategy for malaria
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IRBC	Infected Red Blood Cell
Kg	Kilogramme
LAMP	Loop-mediated isothermal Amplification
LAV	Lutte Anti Vectorielle
LDH	Lactate Déshydrogénase
MEDRU	Molecular Epidemiology and Drug Resistance Unit
mg	Milligramme
Mg ²⁺	Ion Magnésium

MgCl ₂	Chlorure de Magnésium
ml	Mililitre
Mm	Milli Molaire
MmHg	Millimètre de mercure
Mmol	Millimol
MRTC	Malaria Research and Training Center
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	Paire de base
PCR	Polymérase Chain Reaction
<i>Pfmdr-1</i>	<i>Plasmodium falciparum multidrug resistance-1</i>
<i>P. f</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PI4K	Phosphatidylinositol 4 phosphate
PKG	Protéine kinase G
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. o. curtisi</i>	<i>Plasmodium ovale curtisi</i>
<i>P. o. wallikeri</i>	<i>Plasmodium ovale wallikeri</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
PM	Poids Moléculaire
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
QBC	Quantitative Buffy Coat
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RPM:	Revolution per Minute
RBC	Red Blood Cell
RT	Room Temperature
SDRA	Syndrome de Détresse Respiratoire Aigue
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
USTTB	Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako
UV	Ultra-Violet
μl	Microlitre

Table des matières :

1.INTRODUCTION :	1
2. OBJECTIFS :	3
2.1. Objectif général :	3
2.2. Objectifs spécifiques :	3
3. GENERALITES :	4
3.1. Historique :	4
3.2. Épidémiologie du paludisme :	5
3.3. Différentes espèces de <i>Plasmodium</i> :	5
3.4. Cycle biologique :	8
3.4.1. Phase asexuée chez l’homme :.....	8
3.4.2. Sporogonie ou multiplication sexuée (chez le moustique) :.....	9
3.5. Manifestations cliniques :	11
3.5.1. Paludisme non compliqué :.....	11
3.5.2. Paludisme viscéral évolutif :.....	11
3.5.3. La fièvre bilieuse hémoglobinurique :.....	11
3.5.4. Le neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées :.....	12
3.6. Diagnostic biologique du paludisme :	13
3.6.1. Diagnostic direct :.....	13
3.6.2. Diagnostic indirect :.....	14
3.6.3. Diagnostic différentiel de l’espèce <i>Plasmodium malariae</i> :.....	14
3.7. Culture de <i>Plasmodium</i> :	18
3.8. Cytométrie en flux :	19
3.9. Les stratégies de lutte contre le paludisme :	21
3.9.1. Traitement curatif :.....	21
3.9.2. Les mesures préventives :.....	21
3.9.3. Les antipaludiques :.....	23
3.10. La chimiorésistance :	38
3.10.1. Définition de la chimiorésistance :.....	38
3.10.2. La résistance aux antipaludiques et gènes moléculaires associés : Notion de marqueurs moléculaires de resistance.....	38
3.10.3. Méthode d’évaluation de la chimiorésistance :.....	44
3.11. Molécules antiplasmodiales en développement clinique.....	46

4. MATRIELS ET MÉTHODES :	49
4.1. Lieu d'étude :	49
4.1.1. Climat et végétation :.....	49
4.1.2. Population :.....	49
4.1.3. Infrastructures socio-sanitaires :	49
4.2. Le choix du lieu d'étude :	51
4.3. Type d'étude :	51
4.4. Période d'étude :	51
4.5. Population d'étude :	51
4.6. Considérations éthiques et déontologiques :	51
4.7. Critères d'inclusion et de non-inclusion :	51
4.8. Traitement antipaludique administré :	52
4.9. Méthodes de collecte des données :	53
4.9.1. Collecte des données cliniques :	53
4.9.2. Collecte des données Biologiques :	53
4.10. Test <i>ex- vivo</i> de l'efficacité des médicaments antipaludiques courants et médicaments candidats sur les espèces de <i>Plasmodium</i> :	61
5. RESULTATS	65
5.1. Microscopie des cas d'infections symptomatique et asymptomatique du paludisme à Faladjé :	65
5.2. Détection moléculaire d'isolats cliniques des espèces plasmodiales :	73
5.3. Prévalence et fréquence moléculaire des espèces plasmodiales :	76
5.4. Mise au point de la culture <i>ex-vivo</i> de <i>Plasmodium malariae</i> par cytométrie <i>en flux</i> :	77
5.5. Adaptation à la culture <i>ex-vivo</i> d'isolats cliniques de <i>P. malariae</i>.....	79
5.6. Mise au point d'une méthode <i>ex-vivo</i> d'évaluation d'antipaludiques contre les isolats cliniques de <i>P. malariae</i> :	80
5.7. Concentrations inhibitrices 50 % (CI₅₀) des molécules testées <i>ex-vivo</i> contre les stades sanguins asexués d'isolats cliniques de <i>P. malariae</i> :	84
5.8. Comparaison de la sensibilité <i>ex-vivo</i> aux médicaments d'isolats cliniques de <i>P. malariae</i> à celle d'isolats cliniques de <i>P. falciparum</i> et de la souche de laboratoire 7G8 :	85
5.9. Évaluation <i>ex-vivo</i> de la sensibilité de <i>P. malariae</i> et <i>P. falciparum</i> aux molécules antipaludiques en développement clinique :	89
6. DISCUSSION :	93
9. REFERENCES :	100

10. ANNEXES :111

Liste des Tableaux

Tableau I: Résumé des classes d'antipaludiques, leurs cibles et les gènes de résistance.....	43
Tableau II: Préparation du mélange réactionnel pour un échantillon.....	57
Tableau III: Programme de la première amplification.....	57
Tableau IV: Préparation du mélange réactionnel pour un échantillon.....	58
Tableau V: Programme de la deuxième amplification.....	58
Tableau VI: Préparation du mélange réactionnel pour un échantillon.....	60
Tableau VII: Programme d'amplification pour le diagnostic de l'espèce.....	60
Tableau VIII: Série de dilution des médicaments dans des plaques de 96 puits.....	62
Tableau IX: Répartition mensuelle des cas d'infections symptomatiques selon les espèces Plasmodiales observés à la microscopie à Faladjé.....	66
Tableau X : Répartition mensuelle des cas d'infections asymptomatiques selon les espèces Plasmodiales observés à la microscopie à Faladjé.....	66
Tableau XI : Répartition des espèces Plasmodiales observée à la biologie moléculaire.....	75
Tableau XII : Prévalence moléculaire des espèces de <i>Plasmodium</i> chez les Symptomatiques et asymptomatiques sur le site de Faladjé, Mali.....	76
Tableau XIII : Concentrations inhibitrices 50 % (CI ₅₀) des molécules testées <i>ex-vivo</i> contre les stades sanguins asexués d'isolats cliniques de <i>P. malariae</i>	84
Tableau XIV : IC ₅₀ des médicaments de références d'isolats cliniques de <i>P. malariae</i> à celle d'isolats cliniques de <i>P. falciparum</i> et de la souche de laboratoire 7G8. X = répliquât non testé.....	91
Tableau XV : C ₅₀ des molécules antiplasmodiales en développement clinique d'isolats cliniques de <i>P. malariae</i> à celle d'isolats cliniques de <i>P. falciparum</i> et de la souche de laboratoire 7G8. X = répliquât non testé.....	92

Listes des Figures :

Figure 1: Cycle de développement de <i>Plasmodium</i>	10
Figure 2 : Illustration des espèces plasmodiales	15
Figure 3 : Illustration de l'interprétation d'un résultat d'analyse de cytométrie en flux	20
Figure 4 : Structure de l'amodiaquine	23
Figure 5 : Structure de la quinine	24
Figure 6 : Structure de la méfloquine	25
Figure 7: Structure de la luméfantine	26
Figure 8 : Structure du proguanil	27
Figure 9: Structure de la pyriméthamine	29
Figure 10: Structure de la sulfadoxine	30
Figure 11: Structure de la pipéraquline	31
Figure 12: Structure de la pyronaridine	32
Figure 13: Structure de l'artéméther	33
Figure 14: Structure de l'artésunate	33
Figure 15: Structure de la dihydroartémisinine	34
Figure 16: Structure de la primaquine	36
Figure 17 : Structure chimique général du KDU691	47
Figure 18 : Structure du GNF179	48
Figure 19: Présentation du site (Faladjé)	50
Figure 20 : Schéma d'analyse d'un résultat de cytométrie en flux	64
Figure 21: Nombre de participants symptomatiques et asymptomatiques inclus dans l'étude selon le mois à Faladjé	65
Figure 22 : Photographie des champs microscopiques d'un frottis sanguin	67
Figure 23: Répartition des infections à <i>P. falciparum</i> chez les volontaires symptomatiques et asymptomatiques selon le mois à Faladjé	68
Figure 24 : Photographie des champs microscopiques d'un frottis sanguin	69
Figure 25 : Répartition des infections à <i>P. malariae</i> chez les volontaires symptomatiques et asymptomatiques selon le mois à Faladjé	70
Figure 26: Photographie des champs microscopique d'un frottis sanguin	71
Figure 27: Répartition des infections à <i>P. ovale</i> chez les volontaires symptomatiques et asymptomatiques selon le mois à Faladjé	72
Figure 28 : Photo de gel du diagnostic moléculaire des espèces plasmodiales	74

Figure 33 : Surveillance de la croissance de <i>P. malariae</i> en culture <i>ex-vivo</i> par cytométrie en flux.	77
Figure 34: Développement de 19 isolats cliniques de <i>P. malariae</i> mesuré toutes les 24 heures à la cytométrie de flux pendant 72 heures.....	79
Figure 35: Sensibilité <i>ex-vivo</i> de cinq isolats de <i>P. malariae</i> aux différentes concentrations d'Artéméther	80
Figure 36: Sensibilité <i>ex-vivo</i> de cinq isolats de <i>P. malariae</i> aux différentes concentrations de la Luméfantrine.	81
Figure 37: Sensibilité <i>ex-vivo</i> de cinq isolats de <i>P. malariae</i> aux différentes concentrations de la Chloroquine.	82
Figure 38: Sensibilité <i>ex-vivo</i> de cinq isolats de <i>P. malariae</i> aux différentes concentrations de la Quinine.	83
Figure 39: Comparaison de la sensibilité à l'Artéméther d'isolats cliniques de <i>P. malariae</i> à	85
Figure 40 : Comparaison de la sensibilité à la Luméfantrine d'isolats cliniques de <i>P. malariae</i> à celle d'isolats cliniques de <i>P. falciparum</i> et de la souche de laboratoire 7G8.....	86
Figure 41 : Comparaison de la sensibilité à la chloroquine d'isolats cliniques de <i>P. malariae</i> à celle d'isolats cliniques de <i>P. falciparum</i> et de la souche de laboratoire 7G8.....	87
Figure 42 : Comparaison de la sensibilité à la Pipéraquline d'isolats de <i>P. malariae</i> collectés sur le terrain à celle d'isolats de <i>P. falciparum</i>	88
Figure 43: Comparaison de la sensibilité au médicament candidat KDU691 d'isolats de <i>P. malariae</i> et de <i>P. falciparum</i> collectés sur le terrain à celle de la souche 7G8.....	89
Figure 44: Comparaison de la sensibilité au médicament candidat GNF179 d'isolats de <i>P. malariae</i> et de <i>P. falciparum</i> collectés sur le terrain à celle de la souche 7G8.....	90

1.INTRODUCTION :

Le paludisme ou malaria est une érythrocytopathie fébrile, hémolysante, due au développement et à la multiplication d'abord dans le foie puis dans le sang d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Il est essentiellement transmis à l'homme par la piqûre infestante d'un moustique du genre *Anopheles* au moment de son repas sanguin. Seule la femelle, hématophage, transmet la maladie. Par ailleurs, il existe d'autres voies plus rares d'infestations telles que la voie sanguine (transfusion sanguine) et fœto-maternelle(1).

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a rapporté en 2019, 229 millions de cas de paludisme dans le monde avec 409.000 décès au niveau mondial (2).L'Afrique seule a enregistré près de 93,8% des cas et 69,4% (384000 cas) des décès dus au paludisme.

Au Mali, selon les données de 2019 de l'Enquête Démographique et de Santé du ministère de la santé, le taux de prévalence parasitaire du paludisme était de 19% chez les enfants de moins de 5 ans. Selon le même document, les régions les plus touchées par cette maladie sont Sikasso avec 30 %, Ségou 26 % et Mopti 25 %. Cependant, des excès de nombre de cas voire des épidémies ont été rapportés dans la région de Kidal, dans l'extrême Nord du pays en 2020. La lutte contre le paludisme est une approche globale comprenant, la prévention, le diagnostic précoce et la prise en charge rapide des cas de paludisme confirmés par des antipaludiques efficaces principalement les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine.

Au cours de la dernière décennie, l'intensification des efforts de lutte contre le paludisme a principalement été dirigée contre *Plasmodium falciparum* en Afrique. Cette stratégie sélective suscite d'importantes questions, notamment :

- L'élimination ciblée de *P. falciparum* favoriserait-elle la sélection et l'émergence des autres espèces de *Plasmodium* ?
- Les pressions médicamenteuses contre *P. falciparum* qui coexiste avec les autres espèces favoriserait-elle la sélection de parasites autres que *P. falciparum* résistants ?
- Est-ce que les espèces autres que *P. falciparum* sont-elles susceptibles aux médicaments actuels utilisés contre le paludisme ?
- Les médicaments candidats en cours de développement seront-ils actifs contre les espèces autres que *P. falciparum* et pourront-ils relever les défis d'élimination du paludisme ?

Toutes ces questions révèlent la grande importance à accorder à ces espèces parasitaires du paludisme autres que *P. falciparum*.

En effet, les autres espèces de *Plasmodium* infectant l'Homme sont très peu étudiées. Bien que les prévalences des infections à *P. malariae* et *P. ovale* soient inférieures à celles de *P. falciparum* (1 à 2 % de cas de paludisme)(3) , l'incidence des cas cliniques de *P. malariae* et les épisodes du paludisme à *P. ovale* pourraient augmenter dans les années à venir avec la disparition progressive de *P. falciparum* . Des infections à *P. malariae* ont été associées à des syndromes néphrotiques et d'anémie sévère(4). Aussi, des cas d'infection à *P. ovale*, associés à l'ictère, la détresse respiratoire, une thrombopénie sévère et une hypotension ont été rapportés (5).

En outre, la culture continue *in vitro* des différents stades du parasite n'a pu être établie avec succès que pour *P. falciparum* depuis 1976 par Trager et Jensen(6). Ceci constitue le meilleur outil permettant de mieux comprendre la biologie du parasite y compris les mécanismes d'invasion des érythrocytes, la susceptibilité ou la résistance aux médicaments antipaludiques déjà sur le marché et en cours de développement. Toutefois, l'absence de cette approche pour les autres espèces pourrait être palliée par l'établissement d'une culture *ex-vivo* des isolats de terrain.

C'est ainsi que nous proposons d'étudier la prévalence de *P. malariae* et sa susceptibilité *ex-vivo* aux antipaludiques actuels utilisés contre le paludisme au Mali et à des molécules antipaludiques candidats pour le développement clinique.

2. OBJECTIFS :

2.1. Objectif général :

Évaluer la prévalence de *Plasmodium malariae*, les conditions de sa culture *ex-vivo* et la susceptibilité *ex-vivo* de ses isolats cliniques aux molécules à activité antiplasmodiale à Faladjé, Mali

2.2. Objectifs spécifiques :

- Déterminer la prévalence de l'infection à *P. malariae* à Faladjé ;
- Développer une méthode de culture *ex-vivo* d'isolats cliniques de *P. malariae* ;
- Déterminer la susceptibilité *ex-vivo* d'isolats cliniques de *P. malariae* et de *P. falciparum* à un panel de médicaments de référence utilisés contre le paludisme (Chloroquine, Quinine, Pipéraquline, Artéméther, Luméfantrine) ;
- Déterminer la susceptibilité *ex-vivo* d'isolats cliniques de *P. malariae* et de *P. falciparum* à des molécules à activité antiplasmodiales (KDU691 et GNF179).

3. GENERALITES :

3.1. Historique :

L'histoire des épidémies de paludisme remonterait au début de la civilisation. Le paludisme est la parasitose la plus répandue qui ôte de nombreuses vies humaines.

Les premières descriptions du paludisme se trouvent dans les anciens dossiers médicaux chinois datant de 2700 ans avant J.C. et 1200 ans plus tard dans le papyrus d'Ebers. Le chef militaire Alexandre le Grand serait mort du paludisme (13 juin 323 av.J.C).

Ceci indique que cette maladie touche toutes les couches de la société y compris les grandes personnalités comme Christopher Colomb, Albrecht Dürer, Cesare Borgia et George Washington en ont tous souffert.

Jadis, la fièvre chez les patients présentant des symptômes qui sont de nos jours associés au paludisme était attribuée à diverses forces surnaturelles et à des divinités en colère. Cartwright et Biddis affirment que le paludisme est considéré comme la maladie africaine la plus répandue. En 1717, Giovanni Lancisi attribuait la cause de cette maladie aux émanations nocives des marais, d'où le nom malaria, de l'italien « malaria » ou air vicié. Toutefois, au cours du siècle qui a suivi, l'agent pathogène du paludisme a été découvert et classé par la suite parmi les protozoaires du genre *Plasmodium*, qui comprend plusieurs espèces de nos jours(7). En 1880, Docteur Alphonse Laveran, un médecin de l'armée française, observe l'exflagellation d'un gamétocyte mâle au microscope dans des échantillons de sang des patients impaludés (8). Deux ans plus tard, précisément en 1882, l'hypothèse de la transmission du paludisme par le moustique fut émise. Cette hypothèse fut confirmée en 1897 par Ronald Ross qui a découvert l'importance du moustique dans le cycle de vie du paludisme aviaire et décrit des kystes paludéens dans les parois de l'estomac d'*Anophèles*(9). En 1898, Grassi décrit le cycle complet de la transmission du parasite et démontra que le paludisme observé chez l'homme est transmis par des moustiques du genre *Anopheles*(10). La nomenclature des différents stades de développement du parasite sera publiée en 1900 par Schaudinn(9). L'agent pathogène a d'abord été nommé *Oscillare malariae* puis *Heamatoeba malaria*(11). Successivement, les espèces de *Plasmodium* infectant l'Homme ont été découvertes, notamment, *P. falciparum* (Charles Alphonse Laveran ,1880)(12); *P. malariae* (Golgi, 1886)(13); *P. vivax* (Grassi et Feletti, 1890)(12) et *P. ovale* (Stephens, 1922) (13). Enfin, une cinquième espèce, *P. knowlesi* découverte par Knowles en 1932 a été décrite pour la première fois chez l'homme en 1956 avec une plus grande expansion d'infection humaine observée depuis 2004 en Asie du Sud-Est (14).

Les premiers travaux détaillés de Golgi en 1886 ont démontré que chez certains patients, il y avait une relation entre le cycle de vie de 72 heures du développement des parasites et une périodicité similaire du paroxysme, alors que chez d'autres patients, il existait des cycles de développement de 48 heures. Il est arrivé à la conclusion qu'il doit y avoir plus d'une espèce de parasite du paludisme responsable de ces différentes formes d'infection cyclique. Ainsi, la fièvre tierce fut décrite dans les infections causées par *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, et une périodicité de recrudescence fébrile tous les quatre jours (fièvre quarte) a été observée au cours du paludisme à *P. malariae* (15). Également, des fièvres quotidiennes avec une courte intermittence ont été décrites au cours du paludisme à *P. knowlesi*.

3.2. Épidémiologie du paludisme :

Selon le rapport 2020 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de cas de paludisme a été estimé à 239 millions en 2019.

En 2019, environ 3 milliards de dollars (US \$) ont été investis dans le cadre de la lutte contre le paludisme. Ce fond a connu toutefois une baisse par rapport aux 3,2 milliards (US \$) investis en 2017 d'une part et bien inférieur aux estimations de 5 milliards de dollars (US \$) qui étaient nécessaires à l'échelle mondiale pour rester sur la voie des objectifs du Global Technical Strategy for malaria (GTS).

Le paludisme est transmis à l'homme par des piqûres de moustiques *Anophèles* femelles infectés, appelés « vecteurs du paludisme ». Il existe 6 espèces appartenant au genre *Plasmodium* responsables du paludisme chez l'homme.

3.3. Différentes espèces de *Plasmodium* :

Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (plus de 140), touchant diverses espèces animales mais seulement six de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine.

Il s'agit de :

- *Plasmodium falciparum*
- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium ovale curtisi*
- *Plasmodium ovale wallikeri*
- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium knowlesi*

Les six plasmodies appartiennent à l'embranchement des Apicomplexa, classe des sporozoaires ou sporozoasida, ordre des Eucoccidies, sous-ordre des Haemosporina, famille des Plasmodidae

(16). Les six espèces diffèrent par des critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques.

□ ***Plasmodium falciparum*** : est l'espèce prédominante en Afrique Subsaharienne où elle est à l'origine du taux élevé de mortalité (16). *P. falciparum* est l'espèce la plus dangereuse et la plus mortelle qui développe plus de résistance aux antipaludiques. *P. falciparum* est responsable des formes cliniques graves, notamment le neuropaludisme. Elle est également présente dans les zones tropicales d'Afrique, d'Amérique Latine et d'Asie. En 2019, sur les 239 millions de cas de paludisme dans le monde, 65 millions étaient dus à *P. falciparum*(2). Dans les régions équatoriales, elle est transmise toute l'année avec cependant des pics saisonniers. Dans les régions sub-tropicales, la transmission ne survient qu'en période chaude et humide. La transmission s'interrompt lorsque la température tombe en dessous de 18°C. L'évolution se fait d'un seul tenant après une incubation de 7 à 12 jours. Aucun cas de rechute tardive n'a été documenté de nos jours.

□ ***Plasmodium vivax*** : est l'espèce la plus répandue dans le monde, particulièrement en Amérique du Sud et en Asie et beaucoup plus rare en Afrique. En 2019, 51,7 % des cas de paludisme était dus à *P. vivax* en Asie du Sud-Est et seulement 0,3% en Afrique Subsaharienne (2). Cette espèce fut longtemps considérée comme absente en Afrique de l'Ouest et du Centre compte tenu de la forte prédominance des populations du groupe sanguin Duffy négatif ne possédant pas le récepteur membranaire (Duffy) à la surface des érythrocytes nécessaires à l'infection par *P. vivax*. Cependant, des infections à *P. vivax* chez des sujets du groupe sanguin Duffy-négatif ont été décrites récemment (17). La période d'incubation est de 11 à 13 jours avec des rechutes (accès de reviviscence) qui peuvent survenir jusqu'à 3 à 4 ans plus tard. Ces rechutes sont causées par l'activation des formes dormantes (hypnozoïtes) de ce parasite dans le foie. L'infection par *P. vivax* était traditionnellement considérée comme bénigne (fièvre tierce bénigne : cycle érythrocytaire de 48 heures). En revanche, en zone d'endémie il peut avoir des répercussions graves sur l'état de santé des populations, notamment l'anémie chez les enfants et les formes cliniques graves. De plus, des cas de résistances médicamenteuses de *P. vivax* à la chloroquine ont été rapportés (16).

□ ***Plasmodium ovale*** : Cette espèce est beaucoup plus rencontrée en Afrique intertropicale du Centre et de l'Ouest, et dans certaines régions du Pacifique. Tout comme *P. vivax*, elle provoque une fièvre tierce bénigne. Son incubation est de 15 jours au minimum, mais peut aller à plusieurs semaines. *P. ovale* peut causer des rechutes tardives 4 à 5 ans après comme celles observées avec *P. vivax* par la réactivation des hypnozoïtes. *P. ovale* serait géographiquement distribuée dans des zones où *P. vivax* est absente(16).

Des études ont révélé que l'espèce *Plasmodium ovale* était représentée par deux sous espèces. Le sous type classique nommé *Plasmodium ovale curtisi* et le sous type variant appelé *Plasmodium ovale wallikeri*. Ces deux sous espèces ont été caractérisées grâce aux séquences des gènes suivants ; la cystéine protéase, la protéine de surface de l'ookinète et le cytochrome b(18)(19).

Une étude plus récente a montré que ces deux sous espèces constituent deux nouvelles espèces plasmodiales non recombinante et sympatrique. Elles seraient responsable de plus de 15 millions de cas annuel de paludisme en Afrique au Sud du Sahara (20).

□ ***Plasmodium malariae* : Espèce** décrite pour la première fois comme une maladie infectieuse de l'homme par Golgi en 1886. Il a une distribution mondiale, mais de manière beaucoup plus sporadique. Il se différencie des autres espèces par une incubation plus longue (15 à 21 jours), une périodicité différente de la fièvre (cycle érythrocytaire de 72 heures responsable d'une fièvre quarte) et surtout par sa capacité à entraîner des reviviscences très tardives, jusqu'à 20 ans après la primo infection (16). Les mécanismes physiopathologiques responsables de ces reviviscences tardives ne sont pas totalement élucidés bien que certains évoquent la présence de mérozoïtes latents dans les voies lymphatiques. L'infection est considérée comme bénigne en général. Cependant, *P. malariae* peut parfois entraîner des complications rénales. En général, la répartition de *P. malariae* coïncide avec celle de *P. falciparum*. Dans les zones d'endémie en Afrique, *P. malariae* est dans la grande majorité retrouvé en co-infection avec *P. falciparum*(15). Les infections causées par *P. malariae* sont plus fréquentes en Afrique subsaharienne et dans le sud-ouest du Pacifique et moins fréquentes en Asie, au Moyen-Orient, en Amérique centrale et du Sud(12) . La prévalence de *P. malariae* varie de moins de 1% à 30-40% dans les zones focales de l'Afrique de l'Ouest et de l'Indonésie sur la base de la détection à la microscopie. Dans les communautés endémiques, *P. malariae* est une cause fréquente de morbidité avec l'incidence la plus élevée d'épisodes fébriles chez les enfants de moins de 10 ans(21).

□ ***Plasmodium knowlesi* : Espèce** décrite par Knowles en 1932, sa distribution s'étend en zone forestière d'Asie du Sud-Est (particulièrement en Malaisie, à Bornéo). C'est un parasite habituel des singes (macaques), genres *Presbytis* et *Macaca* (*M. mulata*, *M. fascicularis*, *M. nemestrina*) vivant dans la canopée. Des études récentes ont décrit des cas de paludisme à *P. knowlesi* chez l'Homme et son expansion de plus en plus en Asie du Sud-Est(22). Il est transmis par un moustique *Anophèles* de forêt : *A. leucosphyrus*. Ce vecteur pique surtout le singe, mais peut aussi prendre son repas sanguin chez l'homme. *Plasmodium knowlesi* est morphologiquement proche de *P. malariae*. Il se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24

heures responsable d'une fièvre quotidienne. Il existe de rares formes graves, voire mortelles, avec de fortes parasitémies. A ce jour aucune chimiorésistance n'a été observée pour cette espèce (16).

3.4. Cycle biologique (figure 1) :

Ce n'est qu'à partir de 1948 que toutes les phases du cycle de développement du parasite ont été élucidées. Cependant, le rôle clé du moustique anophèle dans la transmission du paludisme était connu.

Le cycle est caractérisé par :

- Une phase de multiplication asexuée ou schizogonie (comportant une phase hépatique ou exo-érythrocytaire et une phase érythrocytaire) se déroulant chez l'homme,
- Une phase de multiplication sexuée, appelée sporogonie chez le moustique.

3.4.1. Phase asexuée chez l'homme :

3.4.1.1. Phase hépatique exo-érythrocytaire :

La schizogonie commence chez l'homme après l'injection sous-cutanée des sporozoïtes contenus dans la glande salivaire de l'anophèle femelle. L'injection des sporozoïtes a lieu lors du repas sanguin du moustique nécessaire à la maturation des œufs. Sur les milliers de sporozoïtes injectés, seul un petit nombre parviendra à s'échapper du système immunitaire de l'hôte pour gagner le foie après un séjour d'environ 30 mn dans le sang (23). Ces sporozoïtes seraient capables de migrer à travers plusieurs hépatocytes avant de rester finalement dans l'un d'eux où se passe sa multiplication(24). Ils se transforment en trophozoïtes, qui forment à leur tour des schizontes hépatiques ou <<corps bleu>>. Après 12 jours environ, le schizonte éclate et libère des mérozoïtes. La lyse de l'hépatocyte libère plusieurs milliers de mérozoïtes (10000 pour *P. vivax*, 40000 à 50000 pour *P. falciparum* plus de 15000 pour *P. ovale* et 7.500 pour *P. malariae*) qui tombent dans la circulation sanguine pour infecter les hématies amorçant ainsi la phase érythrocytaire. Certains sporozoïtes de *P. ovale* et *P. vivax*, restent sous forme quiescente uninucléée appelées hypnozoïtes dans les hépatocytes. Ces hypnozoïtes se réactivent plus tard pour causer des rechutes après quelques semaines à plusieurs mois.

3.4.1.2. Phase érythrocytaire :

Cette phase commence par l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes hépatiques libérés dans le sang par un mécanisme complexe. Après l'invasion, chaque mérozoïte évolue au sein de l'érythrocyte au stade de jeune trophozoïtes (anneau ou ring) qui se transforme en trophozoïte mature. Le trophozoïte se transforme en schizonte par la multiplication de son noyau. Le schizonte mature (stade en rosette) éclate en provoquant la rupture de la membrane

de l'hématie pour libérer entre 8 à 32 mérozoïtes dans le sang. Ces mérozoïtes infectent de nouvelles hématies (dans un délai de 15 à 30 mn) réalisant ainsi un nouveau cycle schizogonique érythrocytaire (qui dure 48 heures chez *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax*, et 72 heures chez *P. malariae*). Les symptômes de la maladie ne se manifestent qu'au cours de la schizogonie érythrocytaire. En effet, l'éclatement des globules rouges contenant les schizontes matures libère outre les mérozoïtes, de l'hémozoïne (pigment malarique provenant de la dégradation de l'hémoglobine) et des substances toxiques inductrices des accès fébriles caractéristiques de la maladie. Après quelques schizogonies érythrocytaires, certains mérozoïtes arrêtent leur prolifération asexuée et initient une différenciation sexuée pour devenir des gamétocytes femelles et mâles. Les gamétocytes de *P. falciparum* ne sont produits qu'au bout de 7 à 15 jours après le premier cycle érythrocytaires (25).

3.4.2. Sporogonie ou multiplication sexuée (chez le moustique) :

Lors de son repas sanguin chez un sujet infecté, le moustique ingère les gamétocytes mâles et femelles de *Plasmodium sp.* Tous les autres stades du parasite sont digérés chez le moustique sauf les gamétocytes. Dans l'intestin du moustique, le gamétocyte male se différencie rapidement en microgamètes mâles par exflagellation et le gamétocyte femelle se transforme en une macro gamète femelle. La fertilisation de la macro gamète femelle par un microgamète mâle donne un zygote au bout de quinze minutes. Ce zygote évolue en ookinète, œuf mobile qui traverse la paroi de l'estomac du moustique et forme sur sa face externe un oocyste. Ce dernier se développe en quelques jours et donne des nombreux sporozoïtes. Ces sporozoïtes migrent alors jusqu'à la cavité sécrétoire et, finalement, au conduit salivaire(26). Ils sont alors prêts à être injectés à l'homme au prochain repas sanguin.

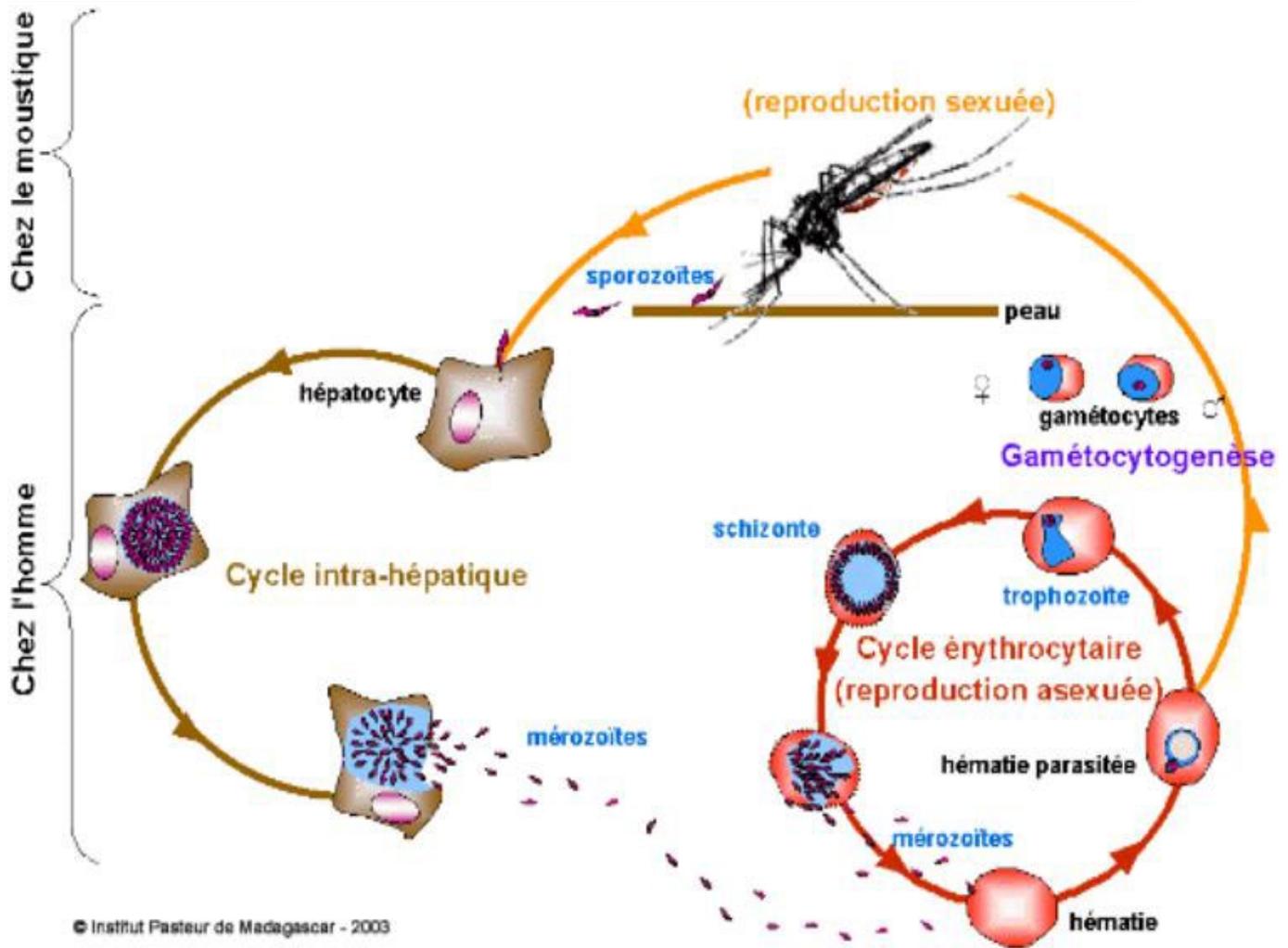


Figure 1: Cycle de développement de *Plasmodium*

Source : Institut Pasteur Paris-France (2011)

3.5. Manifestations cliniques :

Les manifestations cliniques du paludisme sont exclusivement liées à la schizogonie endo-érythrocytaire. Les principaux signes comprennent la fièvre, l'anémie et le sub-ictère sont dus à l'éclatement des hématies et des rosaces avec libération du pigment malarique. L'expression et la gravité de la maladie varient selon l'espèce et l'état de prémunition de l'individu. Les différentes formes cliniques sont notamment, le paludisme simple y compris la primo-invasion et l'accès de reviviscence, le paludisme grave (l'accès pernicieux ou neuropaludisme, l'anémie sévère...), le paludisme viscéral évolutif et la fièvre bilieuse hémoglobinurique.

3.5.1. Paludisme non compliqué :

- L'accès de primo-invasion :

Il est caractérisé par une fièvre allant de 39°C à 40°C, des frissons et sueurs qui s'accompagnent de myalgie et de céphalée brutale. Cette fièvre diminue d'intensité après quelque temps. Ces signes sont souvent associés à des troubles digestifs de type « embarras gastrique » (nausées, vomissements et/ou diarrhées). Les signes traduisant l'hémolyse apparaissent souvent de façon différée : pâleur, sub-ictère, hépato-splénomégalie.

- Accès de reviviscence :

Les rechutes sont dues à la réactivation des formes dormantes hépatique appelées hypnozoïtes. Ce phénomène est observé avec *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*.

3.5.2. Paludisme viscéral évolutif :

Il survient chez les sujets jeunes vivant en zone endémique, peu ou non prémunis. La splénomégalie en est le signe majeur associée à une hépatomégalie. Les signes généraux (fébricule intermittente, asthénie, amaigrissement) et d'anémie (pâleur, ictère) sont très variables, allant d'une forme pauci symptomatique à une forme qui pourrait se confondre avec une leucémie.

3.5.3. La fièvre bilieuse hémoglobinurique :

La fièvre bilieuse hémoglobinurique est une réaction immuno-allergique grave qui survient chez les sujets qui se soumettent irrégulièrement à des traitements ou probablement une prophylaxie aux sels de quinine (27)(21). En outre, la fièvre bilieuse hémoglobinurique a été rapportée après l'administration de l'halofantrine (28)(29)(30). Le début est brutal avec une hémolyse massive intra vasculaire chez le patient après un traitement aux sels de quinine. La symptomatologie est essentiellement rénale et allergique. La douleur est très intense en barre autour de la ceinture pelvienne. Les rares urines émises sont particulièrement rouges et foncées. Cette forme nécessite une réanimation avec un pronostic vitale engagé.

3.5.4. Le neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées :

C'est le paludisme des sujets non immun (nourrisson, femme enceinte, jeune enfant, les migrants venant d'une zone non impaludée et les sujets neufs). Ces formes sont majoritairement causées par *P. falciparum*, toutefois, les formes sévères du paludisme à *P. vivax* ont été rapportées. A l'absence d'un traitement adéquat, ces formes graves peuvent conduire à la mort au bout de 72 heures.

L'OMS a établi des critères qui, isolés ou associés, font poser le diagnostic du paludisme grave (48).

Il s'agit de la présence des formes asexuées de *Plasmodium sp.* dans le sang associé à l'un des signes suivants :

- Neuropaludisme : Score de Blantyre ≤ 2 ou score de Glasgow ≤ 9 .
- Troubles de la conscience : Score de Blantyre < 5 et > 2 ou score de Glasgow < 15 ou > 9 .
- Convulsions répétées > 1 /24 heures.
- Prostration : extrême faiblesse (incapacité de se tenir droit).
- Vomissements itératifs.
- Syndrome de détresse respiratoire.
- Ictère clinique.
- Acidose métabolique : bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/L.
- Lactatémie ≥ 5 mmol/L.
- Anémie grave (Hb < 5 g/dl, Ht $< 15\%$).
- Hyperparasitémie $\geq 4\%$ chez le sujet non immun, ou $\geq 20\%$ chez le sujet immun.
- Hypoglycémie (glycémie $< 2,2$ mmol/L).
- Hémoglobinurie macroscopique.
- Insuffisance rénale : diurèse < 400 ml/ 24h ou créatinémie $> 265\mu\text{M}$ chez l'adulte ; diurèse < 12 ml/ kg/ 24h ou créatinémie élevée pour l'âge chez l'enfant.
- Collapsus circulatoire : Tension Artérielle Systolique < 50 mmHg avant 5 ans, TAS < 80 mmHg après 5 ans.
- Hémorragie anormale.
- Œdème pulmonaire (radiologique).

3.6. Diagnostic biologique du paludisme :

Le diagnostic biologique du paludisme passe par la mise en évidence **direct** du parasite et **indirect** des éléments du parasite dans le sang. La confirmation du diagnostic clinique par un examen biologique permet de réduire l'utilisation des antipaludiques dans le traitement non justifié pour des fièvres non palustres (31). En effet la mise en œuvre des programmes de lutte contre le paludisme intègre la recherche d'un diagnostic précoce et d'un traitement efficace. Le diagnostic du paludisme comprend les techniques **de diagnostic indirect et direct** :

3.6.1. Diagnostic direct :

Le diagnostic direct repose sur l'identification du *Plasmodium* dans le prélèvement sanguin par la microscopie, notamment par les techniques de la goutte épaisse (GE) et du frottis mince (FM) (32).

- **La goutte épaisse** : est la technique de référence (33) pour le diagnostic biologique du paludisme. Elle est une technique de concentration qui consiste à étaler environ 10ul de sang dans un diamètre d'environ 1 cm au milieu d'une lame porte objet. Après séchage, la lame est colorée avec une solution du GIEMSA à 3% ou 10% pendant 45 minutes ou 20 minutes respectivement. La lecture est faite au microscope optique à l'objectif 100. Ainsi le noyau du *Plasmodium* est coloré au rouge vif et le cytoplasme en bleu. Elle a une sensibilité de 10 à 20 parasites / ul de sang.

- **Le frottis mince** : consiste à faire un étalement fin d'une goutte d'environ 5ul de sang sur une lame porte objet. Le frottis est ensuite fixé au méthanol, séché et coloré avec une solution de May-Grunwald-Giemsa ou de Giemsa. Après la coloration, la lame est séchée et la lecture se fait à l'objectif 100 en immersion. La technique du FM permet d'observer les parasites à l'intérieur des globules rouges infectés.

Le FM a une sensibilité de 100 à 200 parasites/ul de sang ([campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/...](http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/)).

Il permet d'établir le diagnostic d'espèce du *Plasmodium*.

- **Le Quantitative Buffy Coat (QBC)** (34) : le QBC est une technique qui utilise un fluorochrome (acridine orange) dans un tube capillaire (comme le tube hématocrite) dans lequel 55-110ul d'échantillon de sang à tester est ajouté. L'acridine orange s'attache aux acides nucléiques du parasite et colore le noyau en vert (ADN) et le cytoplasme en orange (ARN). Après centrifugation pendant cinq minutes, la lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les différents stades du parasite sont visibles dans la couche plaquettaire (gamétocytes) et la partie supérieure du culot globulaire (Schizontes, trophozoïtes et

mérozoïtes). Le QBC est 5,5 fois plus sensible que la goutte épaisse et est à mesure de détecter précocement une infection à un seuil de 1 parasite/ ul de sang. Toutefois, compte tenu de sa lourdeur, cette technique est plus en plus abandonnée pour le diagnostic de routine. Elle ne permet pas de faire le diagnostic d'espèce de *Plasmodium*.

• **Autres techniques de diagnostic :**

Les tests de diagnostic rapide (TDR) : les TDRs sont des techniques immunochromatographiques qui ont comme principe la détection des protéines spécifiques des parasites (antigènes tel que HRP2, HRP3, ou enzymes telle que l'aldolase, la pLDH...) par chromatographie sur support solide. Certains tests permettent d'affirmer l'espèce de *Plasmodium*. Leur conservation et leur utilisation est facile. Ils sont très utiles dans les zones où le diagnostic microscopique n'est pas disponible. Ils ont une sensibilité de 200 parasites/ul de sang.

Les méthodes moléculaires :

Le diagnostic du paludisme est de plus en plus révolutionné par diverses techniques moléculaires. Il s'agit notamment de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui permet de détecter une infection à *Plasmodium sp* avec une sensibilité et une spécificité d'environ 100%. En plus de la PCR conventionnelle et la PCR quantitative à temps réel (qPCR), la technique LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) permet d'établir le diagnostic du paludisme de façon précise et plus rapide.

3.6.2. Diagnostic indirect :

Les techniques de diagnostic indirect consistent à rechercher les anticorps dirigés contre les antigènes du *Plasmodium* dans le sérum de l'hôte. Elles sont indicatives d'une infection antérieure (persistance des anticorps même après l'infection) et sont par conséquent sans valeur diagnostique réelle dans les zones d'endémie palustre. Parmi ces techniques on peut citer : l'immunofluorescence indirecte, l'hémagglutination passive et le test Elisa (35)(36).

3.6.3. Diagnostic différentiel de l'espèce *Plasmodium malariae* :

Le diagnostic des espèces de *Plasmodium* peut s'établir avec certitude par la microscopie du frottis mince et la méthode moléculaire.

- Diagnostic de *P. malariae* à la microscopie :

A la microscopie du frottis mince les trophozoïtes de *P. malariae* remplissent le globule rouge qu'ils infectent sans le déformer. Les granulations sont absentes sauf en cas d'une coloration intense et se présentent parfois sous forme de bande équatoriale dans l'hématie (37). Les trophozoïtes apparaissent compacts avec un cytoplasme régulier dense contenant des pigments

abondants de nuance jaune (pigments malariques) chez les formes âgées. Le schizonte mature avec un reflet jaune dû au pigment malarique contient 6 à 12 noyaux qui s'individualisent en mérozoïtes chacun. Il est souvent difficile de distinguer les gamétocytes matures des trophozoïtes âgés. Les gamétocytes matures ont une forme ronde avec des pigments dispersés en gros grains très souvent répartis à la périphérie (figure 2, colonne 3).

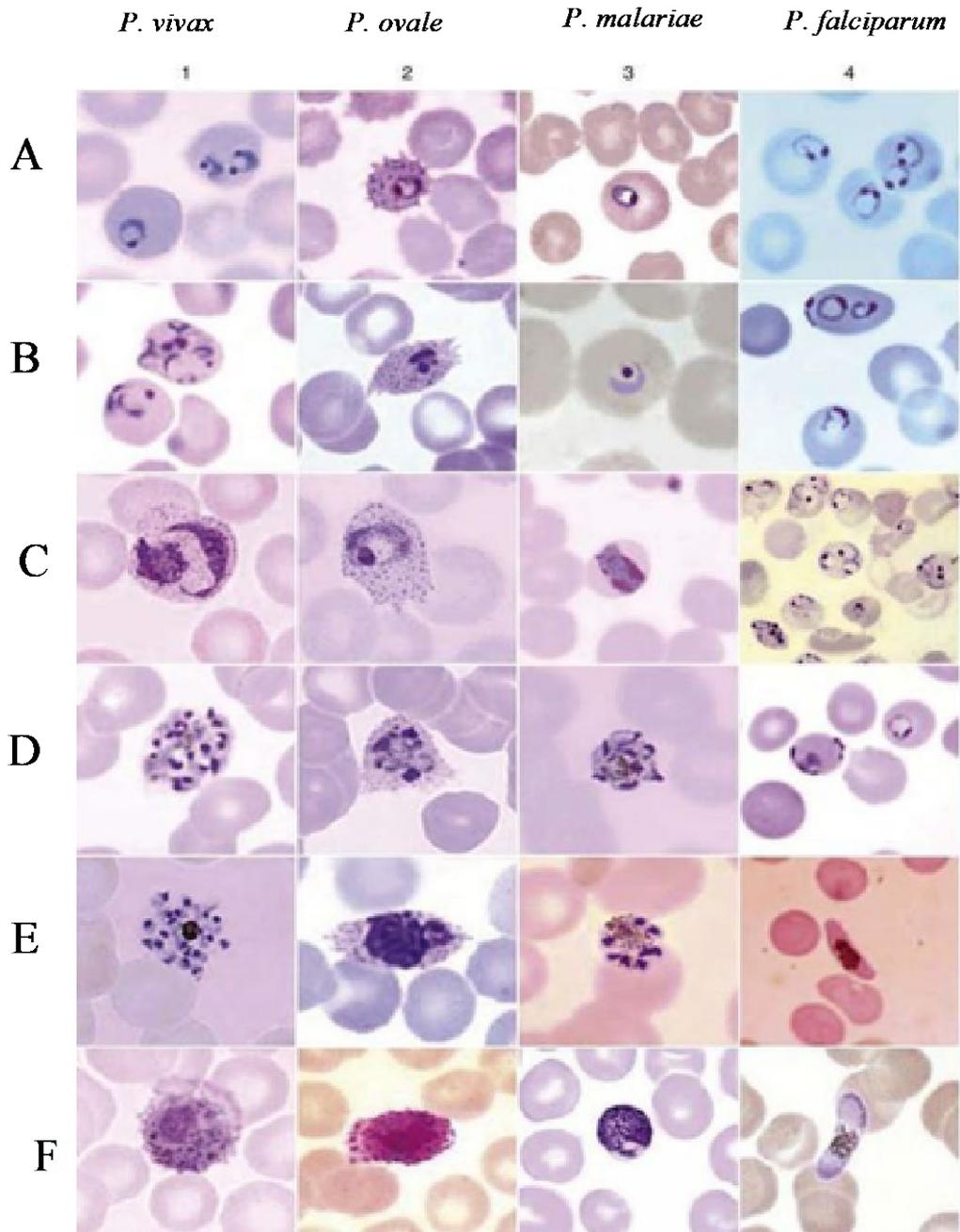


Figure 2 : Illustration des espèces plasmodiales

Source : Garcia LS : *Malaria Clin Lab. Med* 30 :93-129, 2010, with permission. Colum 5 courtesy CDC.

Légende de la figure 2 :

Colonne 1 : *Plasmodium vivax* (les globules rouges infectés sont élargis).

A : Trophozoïte précoce ayant la forme d'un anneau l'anneau (Notez qu'un globule rouge contient 2 anneaux, ce n'est pas si rare) ;

B : Trophozoïtes âgées, ayant une forme amiboïde ;

C : Trophozoïte tardif avec des granulations de Schüffner (globule rouge élargi) ;

D : Développement d'un schizonte ;

E : Schizonte mature avec 18 mérozoïtes et un pigment aggloméré ;

F : Microgamétocytes avec une chromatine dispersée.

Colonne 2 : *Plasmodium ovale* (les globules rouges infectés sont élargis).

A : Trophozoïte précoce (en forme d'anneau) avec des points de Schüffner (RBC a des bords frangés) ;

B : Trophozoïte précoce (noter les globules rouges hypertrophiés, les points de Schüffner et la forme ovale des globules rouges) ;

C : Trophozoïte tardif présent au niveau des globules rouges qui présentent des bords frangés ;

D : Développement d'un schizonte avec des globules rouges de forme irrégulière ;

E : Schizonte mature avec 8 mérozoïtes arrangés irrégulièrement ;

F : Microgamétocytes avec chromatine dispersée.

Colonne 3 : *Plasmodium malariae* (les globules rouges infectés sont normaux ou plus petits que la normale).

A : Trophozoïte précoce (forme de l'anneau) ;

B : Trophozoïte précoce ayant un cytoplasme épais ;

C : Trophozoïte tardif (forme de bande) ;

D : Développement d'un schizonte ;

E : Schizonte mature avec 9 mérozoïtes disposés en rosette ;

F : Microgamétocytes avec chromatine compacte.

Colonne 4 : *Plasmodium falciparum*.

A : trophozoïtes précoces (les anneaux sont dans la configuration d'un casque avec des doubles points de chromatine) ;

B : Trophozoïte précoce (forme accolé ou appliqué) ;

C : Trophozoïtes précoces (notez les multiples anneaux par cellule) ;

D : Trophozoïte tardif a la forme d'un anneau plus grand (forme accolé ou appliqué) ;

E : Gamétocyte en forme de croissant ;

F : Gamétocyte en forme de croissant.

-Diagnostic moléculaire de *P. malariae* :

Le diagnostic moléculaire de *P. malariae* peut s'établir de façon spécifique et très précise par la PCR conventionnelle ou la qPCR. Les méthodes moléculaires permettent d'identifier les espèces plasmodiales avec une sensibilité de 100% (38).

Elle est réalisée à l'aide des amorces décrites par Fuehrer et collaborateurs utilisant la méthode de double PCR pour le diagnostic du genre suivi d'une simple PCR spécifique à l'espèce *P. malariae*.

3.7. Culture de *Plasmodium* :

Elle consiste à maintenir les globules rouge parasités et non parasités dans un milieu propice à la croissance et à la multiplication du parasite.

La culture continue de *P. falciparum* est souvent considérée comme un moyen de parvenir à une fin, cette fin étant de sonder la biologie du parasite en question, et finalement la découverte de médicaments contre le paludisme. La culture est une exigence fondamentale pour la recherche sur le paludisme lorsque les objectifs principaux utilisent des parasites à des stades viables du cycle de vie. six espèces de parasites du paludisme : *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. vivax*, *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*, et *P. malariae* peuvent infecter les humains, cependant *P. falciparum* est la seule espèce pour laquelle la culture de tous les stades du cycle de vie ont été établies(39) pour permettre tous les aspects de la recherche tels que le dépistage des médicaments.

Les efforts de culture *in vitro* de *Plasmodium* sont compliqués car chaque espèce a son propre cycle de vie et son propre ensemble de paramètres physiologiques, métaboliques et nutritionnels(40). Comme alternative à la culture *in vitro* continue, une culture *ex-vivo* soutenant des recherches importantes telles que les tests de sensibilité aux médicaments, a également été développée. Les cultures *ex vivo* sont développées en utilisant des isolats de *Plasmodium* fraîchement récoltés sur le terrain ou cryopréservés, qui subissent des modifications dans certain cas une fois en culture et compliquent ainsi la poursuite de recherches précises sur cette espèce cultivée *ex vivo*. Ainsi, il devient difficile d'étudier un stade spécifique, si les parasites cultivés *ex vivo* ne se développent pas correctement. Des tentatives inlassables ont toutefois permis de mettre au point des méthodes de culture *ex vivo* améliorées pour la deuxième espèce la plus répandue, *P. vivax*(41). Elle était un grand problème car cette espèce n'infecte que les globule rouge jeune. Cette culture *ex vivo* fournit actuellement des données utiles sur *P. vivax*, telles que sa sensibilité aux médicaments antipaludiques(41)(42), sa pathobiologie et ses mécanismes d'invasion(43).

Alors que les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine ont permis de réduire de manière significative la transmission, la morbidité et la mortalité de *P. falciparum*, la prolifération et transmission persistante de *P. malariae* sont largement signalées(44)(45). *P. malariae* est très répandu dans les régions où le paludisme est endémique, comme l'Amazonie(45) et l'Afrique subsaharienne(44)(46)(47). *P. malariae* peut provoquer une infection chronique potentiellement mortelle, une anémie grave comme décrite chez *falciparum* qui est le plus mortel, avec un impact socio-économique négatif important(48)(49). Toutefois, aucune méthode de culture n'a été mise au point pour contribuer au dépistage de

nouveaux médicaments antipaludiques contre *P. malariae* et permettre d'étudier et de comprendre sa biologie, comme son mécanisme d'invasion et ses marqueurs de résistance aux médicaments.

3.8. Cytométrie en flux :

La cytométrie en flux est une technologie qui permet de mesurer simultanément puis d'analyser de multiples caractéristiques physiques de particules uniques, généralement des cellules, lorsqu'elles s'écoulent dans un flux de fluide à travers un faisceau de lumière (50).

➤ Principe et Fonctionnement

Les cytomètres en flux utilisent des lasers comme sources de lumière pour produire des signaux lumineux diffusés et fluorescents qui sont lus par des détecteurs tels que des photodiodes ou des tubes photomultiplicateurs(51).

Il est composé de trois systèmes principaux : fluide, optique et électronique.

- Le système fluide transporte les particules dans un flux vers le faisceau laser pour l'interrogation.
- Le système optique se compose de lasers pour éclairer les particules dans le flux d'échantillons et de filtres optiques pour diriger les signaux lumineux résultants vers le système d'analyse et de filtres optiques pour diriger les signaux lumineux résultants vers les détecteurs appropriés.
- Le système électronique convertit les signaux lumineux détectés en signaux électroniques qui peuvent être traités par l'ordinateur.

Pour certains instruments équipés d'une fonction triage, le système électronique est également capable d'initier des décisions de triage pour charger et dévier les particules.

Dans le cytomètre en flux, les particules sont transportées vers l'interception du laser dans un flux de fluide. Toute particule ou cellule en suspension d'une taille comprise entre 0,2 et 150 micromètres peut être analysée.

Les cellules provenant de tissus solides doivent être désagrégées avant l'analyse. La partie du flux de fluide où se trouvent les particules s'appelle le noyau de l'échantillon. Lorsque les particules passent à travers l'intercepteur laser, elles diffusent la lumière laser. Toute molécule fluorescente présente sur la particule deviennent fluorescents. La lumière diffusée et fluorescente est collectée par des lentilles positionnées de manière appropriée. Une combinaison de séparateurs de faisceaux et de filtres dirige la lumière diffusée et fluorescente vers les détecteurs appropriés.

Les détecteurs produisent des signaux électroniques proportionnels aux signaux optiques qui les frappent.

Des données en mode liste sont collectées pour chaque particule ou événement. Les caractéristiques ou paramètres de chaque événement sont basés sur ses propriétés de diffusion.

Les données sont collectées et stockées dans l'ordinateur (50).

➤ Application

La cytométrie en flux est un outil puissant qui a des applications dans de multiples disciplines telles que :

- Immunologie,
- Biologie moléculaire,
- Virologie,
- surveillance des maladies infectieuses,
- Biologie du cancer,
- Tri des cellules (51)...

➤ Interprétation d'un résultat de cytométrie en flux

Analyse des cellules en fonction de deux paramètres :

Ces paramètres peuvent être soit la taille, granulosité, des couleurs.

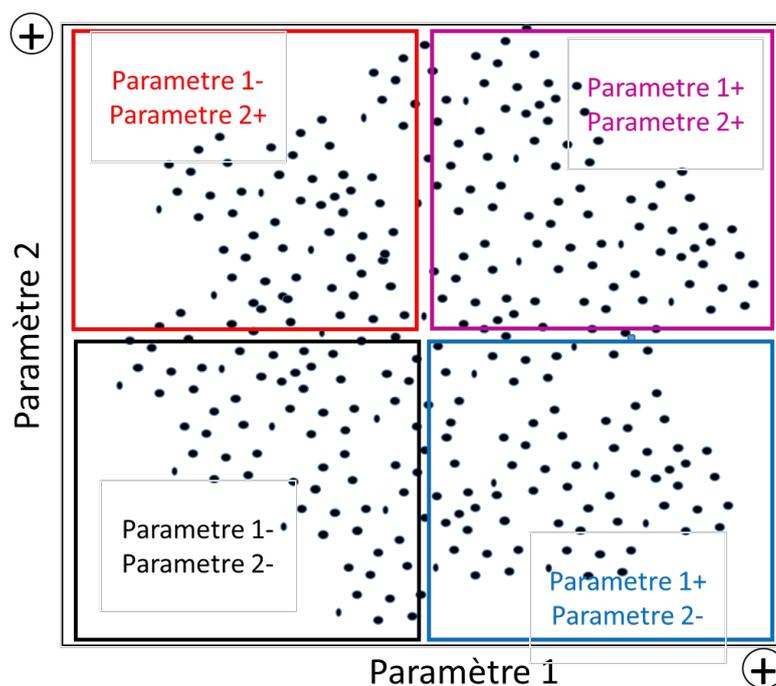


Figure 3 : Illustration de l'interprétation d'un résultat d'analyse de cytométrie en flux

3.9. Les stratégies de lutte contre le paludisme :

3.9.1. Traitement curatif :

Le Mali a adopté depuis 2005 les recommandations de l’OMS pour la prise en charge des cas du paludisme, notamment les Combinaisons Thérapeutiques à base d’Artémisinine (CTAs) contre le paludisme non compliqué (Artéméter+Luméfantrine et Artésunate+amodiaquine) chaque fois que la voie orale reste possible. L’artésunate, l’arthéméter et la quinine tous utilisés par voie parentérale sont les molécules de choix pour le traitement des cas de paludisme grave. Également, les formes suppositoires de l’artésunate se sont avérées utiles pour le traitement pré-transfert des cas de paludisme grave et compliqué. Le gouvernement du Mali s’est engagé à assurer gratuitement le traitement de l’accès palustre chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes.

3.9.2. Les mesures préventives :

La prévention du paludisme pendant la grossesse, la chimio prévention du paludisme saisonnier et la lutte anti-vectorielle (LAV) constituent les axes principaux de la lutte préventive contre le paludisme. Un vaccin efficace contre le paludisme serait également un outil majeur dans la lutte et l’éradication de cette maladie dans le monde.

3.9.2.1. La prévention du paludisme pendant la grossesse :

Le traitement préventif intermittent (TPI) avec la Sulfadoxine + Pyriméthamine est recommandé pour prévenir le paludisme pendant la grossesse. Ce traitement est administré à raison d’une dose mensuelle entre le 4ème et le 8ème mois de la grossesse. Chaque dose est composée d’une prise unique de 3 comprimés de Sulfadoxine (500mg) +Pyriméthamine (25mg) chacun.

3.9.2.2. La chimio prévention du paludisme saisonnier :

La chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) est une nouvelle stratégie de prévention du paludisme chez les enfants de 1-5ans basée sur l’administration d’une dose curative de Sulfadoxine-Pyriméthamine + amodiaquine (SPAQ) chaque mois pendant la saison de transmission. Elle est adoptée pour des zones où le paludisme est saisonnier avec une transmission pendant trois ou quatre mois de l’année. Cette CPS concerne les pays (en majorité sahélo-saharien de l’Afrique) qui répondent à ces critères et pour lesquels la SP et l’AQ conservent leur efficacité contre *P. falciparum*.

Des études sont en cours sur d’ autres molécules comme Dihydroartémisinine/Pipéraquine dans le cas de paludisme non compliqué.

3.9.2.3. La lutte anti-vectorielle :

Le Mali a adopté les méthodes de lutte anti-vectorielle pouvant être utilisées au niveau individuel et communautaire pour protéger contre les piqûres de moustiques.

Il s'agit de :

La promotion des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée de rémanence par la distribution gratuite à travers :

- La consultation prénatale pour la protection des femmes enceintes (CPN+).
- Le programme élargi de vaccination pour la protection des enfants de moins de 1 an (PEV+).
- La promotion de moustiquaires imprégnées d'insecticide à travers le circuit commercial pour la population générale.
- Le traitement ciblé des gîtes larvaires.
- La pulvérisation intra-domiciliaire avec pour objectif de réduire la population de moustique.
- La promotion de l'hygiène et de l'assainissement.

3.9.2. 4. Vaccin :

Un vaccin efficace contre le paludisme serait le meilleur outil pour pallier aux phénomènes de résistance contre les médicaments et surtout d'éradiquer le paludisme.

De nombreux candidats vaccins sont à l'étude. Malgré la réalisation de plusieurs essais vaccinaux, aucun vaccin d'excellents résultats de protection n'a été mis sur le marché. Par contre, on compte un candidat vaccin en phase III des essais cliniques depuis 2012, il est actif sur les formes pré-érythrocytaires. Le développement d'un vaccin contre le paludisme est entravé par des difficultés telles que la complexité du parasite et de son cycle de vie, une très grande variation antigénique et une compréhension limitée des interactions entre *P. falciparum* et le système immunitaire de l'hôte humain.

Dans l'infection par *P. falciparum*, le développement d'un vaccin est possible parce que l'infection induit une immunité clinique. Dans les zones hyper-endémiques à *P. falciparum*, l'immunité contre le paludisme sévère est acquise dès la petite enfance, alors que l'immunité contre une maladie bénigne n'est pas acquise avant la fin de l'adolescence (52). Différents vaccins contre le paludisme sont testés chez l'homme. Ainsi, quatre catégories de vaccins sont en phase d'essai contre le paludisme : des vaccins anti- stade pré-érythrocytaire, des vaccins anti-stade érythrocytaire, des vaccins bloquant la transmission, des vaccins bloquant la cytoadhérence des hématies parasitées (52).

Après des décennies de recherche, un vaccin contre le paludisme (**RTS, S/AS01**) a reçu un avis positif de l'agence européenne des médicaments en vertu de l'article 58 en 2015 ; cependant, il

n'est que modérément efficace et son avenir est incertain. Son introduction ne devrait pas diminuer la demande en médicaments antipaludiques(53).

3.9.3. Les antipaludiques :

La classification des antipaludiques est pharmacologique et chimique. C'est ainsi qu'on distingue :

❖ Les schizonticides : ils sont actifs sur les schizontes mais inactifs sur les gamétocytes. Ils sont curatifs des accès palustres, mais n'empêchent pas la transmission de la maladie. Ils comprennent : la quinine, les amino-4 quinoléines, les biguanides et dérivés, les diaminopyrimidines et les sulfamides.

En plus de l'activité schizontocide, l'artémisinine et dérivés est actif préférentiellement sur les formes anneaux jeunes 'Ring stages'(54).

❖ Les gamétocytocides : ils n'ont pas d'action forte sur les schizontes mais ont un intérêt sur le plan collectif car ils peuvent empêcher la transmission. Ils comprennent les amino-8 quinoléines

❖ D'autre part, certains antibiotiques appartenant à la famille des tétracyclines (Doxycycline) ou des macrolides (érythromycine) utilisés en association avec les schizonticides (en général la quinine) permettent de renforcer l'activité antipaludique.

3.9.3.1. Amino-4-quinoléines :

✓ Structure :

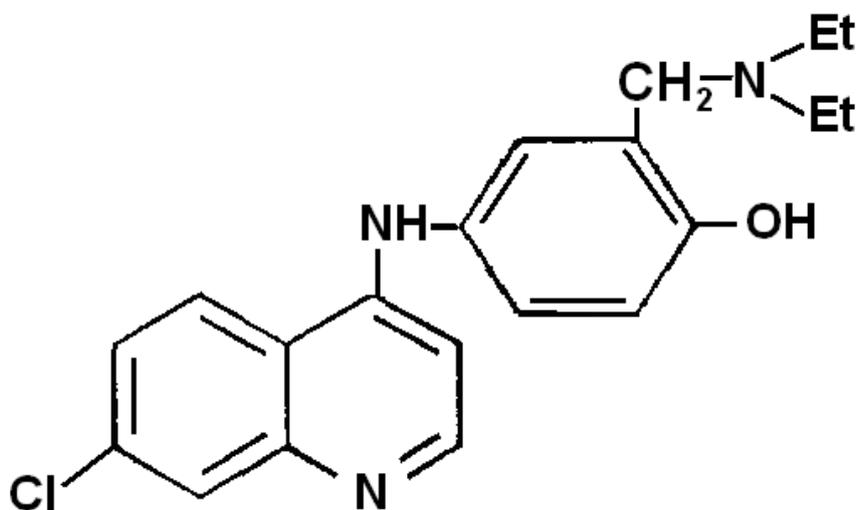


Figure 4 : Structure de l'amodiaquine

3.9.3.2 Amino-alcools :

Exemple 1 : Quinine :

✓ **Structure :**

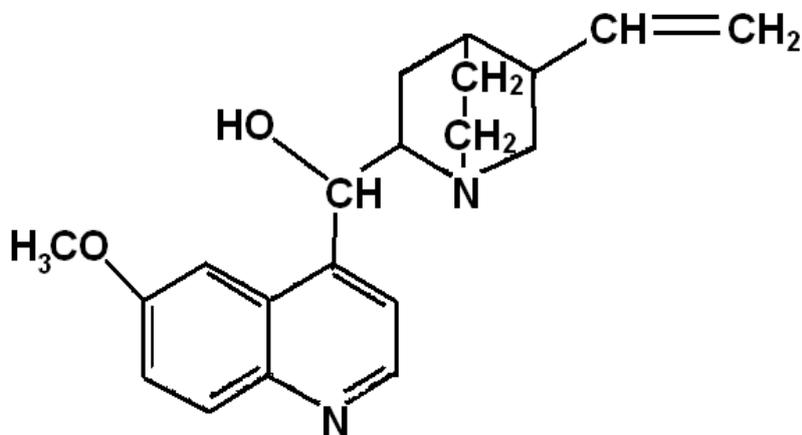


Figure 5 : Structure de la quinine

✓ **Mécanisme d'action :**

Comme pour tous les antipaludiques, le mécanisme d'action exact de la quinine garde encore quelques mystères. Ce produit se concentre dans le plasma et se fixe sur les hématies dans lesquelles il pénètre. Il intervient manifestement dans l'hématozoaire en s'intercalant dans l'ADN ; mais aussi sur plusieurs sites ce qui expliquerait la rareté des résistances. L'élément actif de la molécule est probablement le noyau benzénique, oxyquinoléique, que l'on retrouve dans les amino-quinoléines. La quinine bloque le cycle schizogonique au niveau des mérozoïtes libres dans le plasma ou encore des trophozoïtes avant leur transformation en schizontes. Elle n'a pas d'action biologique sur les gamétocytes. C'est un produit préconisé dans le traitement des accès palustres même en zone de chloroquino-résistance.

✓ **Formulation :**

Utilisée par voie orale ou injectable, la quinine est un antipaludique naturel (55)

Pharmacocinétique :

La quinine est rapidement et presque complètement absorbée par voie digestive ; le pic de concentration plasmatique est obtenu en une à trois heures. Près de 70 % de la quinine plasmatique sont liés aux protéines. La quinine est en majorité métabolisée en métabolite inactif par le foie. La quinine est éliminée dans les urines et disparaît presque totalement en 24 heures après l'arrêt du traitement.

Le passage transplacentaire et les taux dans le lait sont faibles. De petites quantités pénètrent dans le liquide céphalorachidien.

✓ Pharmacocinétique :

La pharmacocinétique de la quinine est caractérisée par une grande variabilité de l'absorption orale, de la liaison protéique, du volume de distribution et de la clairance métabolique (par le cytochrome P450 3A4) en fonction des individus, de la gravité et de l'évolution de la maladie. Le métabolisme conduit à un métabolite actif, la 3- hydroxy-quinine. En l'absence de dose de charge, l'état stable des concentrations plasmatiques n'est atteint qu'en 2 à 3 jours.

✓ Utilisation :

Elle peut s'utiliser par voie orale ou parentérale (IM ou IV). Elle reste le traitement d'urgence par excellence de l'accès pernicieux.

Exemple 2 : La Quinololéine méthanol et le 9-phénanthrène méthanol :

Structure :

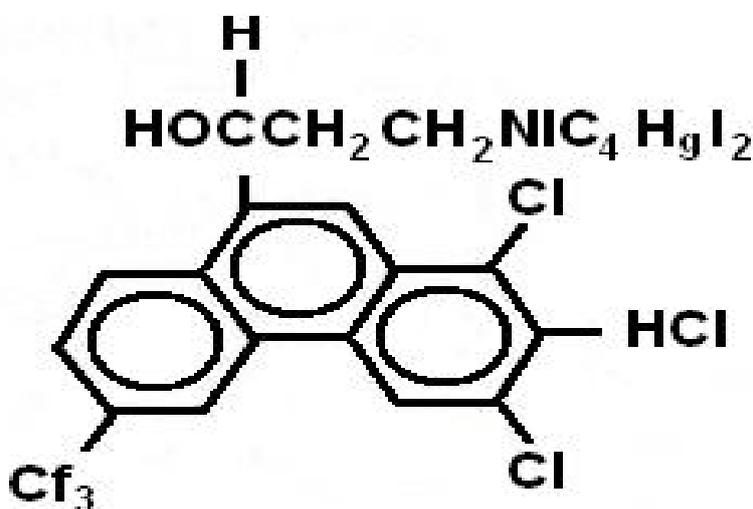


Figure 6 : Structure de la méfloquine

✓ Mécanisme d'action :

Leur mécanisme d'action est très proche de celui de la quinine en se fixant sur des phospholipides de la membrane érythrocytaire, et surtout à la ferriprotoporphyrine IX. Des récepteurs communs à la quinine, et sans doute à la chloroquine, pourraient rendre compte de certains retards d'efficacité de la méfloquine ou de l'halofantrine lorsque ces substances ont été préalablement administrées.

✓ Formulation :

Méfloquine (LARIAM®) : disponible uniquement en comprimé voie orale.

✓ Pharmacocinétique :

La méfloquine est une molécule très lipophile dont l'absorption est améliorée par la prise concomitante d'un repas riche en lipides. La méfloquine est liée à plus de 98 % aux protéines plasmatiques. Elle est métabolisée au niveau hépatique, notamment par le cytochrome P450 3A4, en dérivés inactifs. Sa demi-vie d'élimination moyenne est de 3 semaines. L'infection non compliquée ne modifie pas l'absorption de la méfloquine ; en revanche, le volume de distribution et la clairance sont diminués, ce qui explique que les concentrations soient plus élevées. Des résultats opposés ont été retrouvés dans un contexte d'infection sévère à *P. falciparum*, avec une diminution des concentrations par rapport aux données décrites chez le volontaire sain. Néanmoins, toutes ces modifications pharmacocinétiques ne durent que quelques jours, le temps de guérir l'infection. Les concentrations de méfloquine diminuent en fin de grossesse. Chez l'enfant, les paramètres pharmacocinétiques sont proportionnels au poids corporel(56)

✓ Utilisation :

La méfloquine se présente sous **forme** de comprimés, utilisés en traitement curatif ou en chimio prophylaxie.

Exemple 3 : luméfántrine

✓ Structure :

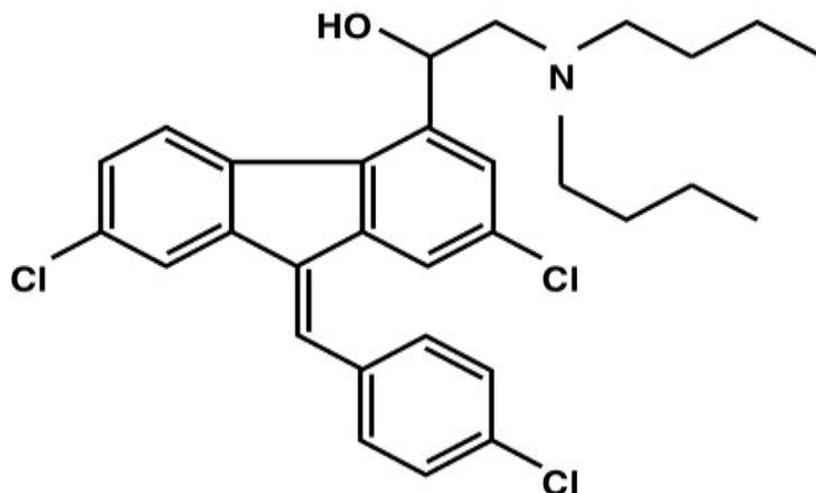


Figure 7: Structure de la luméfántrine

✓ Mécanisme d'action :

La luméfantine fait partie des amino-alcools qui sont de très bons schizonticides. Elle interagirait comme les autres amino-alcools avec une protéine membranaire du globule rouge (la stomatine) et serait transférée dans le parasite par une voie de recapture des phospholipides exogènes (57). Si le mode d'action des amino-4-quinoléines est connu, les bases moléculaires qui sous-tendent l'effet des amino-alcools ne sont pas encore totalement élucidées.

✓ Formulation :

Uniquement disponible sous forme de préparation orale dans laquelle elle est associée à l'artéméter : Comprimés contenant 20 mg d'artéméter et 120 mg de luméfantine.

✓ Pharmacocinétique :

La biodisponibilité orale est variable et hautement dépendante de l'administration concomitante d'aliments gras (58)(59). L'absorption augmente de 108% après un repas et est plus lente chez les malades présentant un accès palustre aigu que chez les convalescents. Le pic des concentrations plasmatiques s'observe environ 10 heures après administration. Sa demi-vie d'élimination est d'environ 3 jours.

✓ Utilisation :

Elle est utilisée dans le traitement, le contrôle, la prévention, et l'amélioration du paludisme.

3.8.3.3. Les anti métabolites :

Les antifoliniques :

Ils comprennent Les biguanides et les diaminopyrimidines

Exemple 1 : Proguanil

✓ Structure :

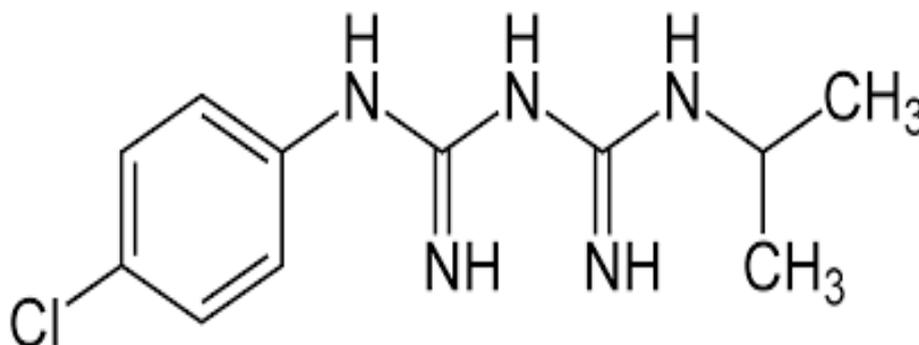


Figure 8: Structure du proguanil

✓ Mécanisme d'action :

Pro- drogue agissant à travers le cycloguanil.

Il fait partie des biguanides avec une activité schizontocide surtout sur *P. falciparum*, l'action est lente et se fait par inhibition spécifique de la Dihydrofolate réductase (DHFR) de l'hématozoaire. La DHFR est une enzyme clé du métabolisme de l'acide folique en acide tétrahydrofolique, facteur essentiel qui intervient dans les réactions de transfert de groupement monocarboné lors de la biosynthèse des purines, pyrimidines et protéines.

✓ Formulation :

Uniquement sous des formes orales.

✓ Pharmacocinétique :

Le proguanil est éliminé à 60% sous forme de métabolites hépatiques et 40% sous forme inchangée ; 60% de la dose administrée est éliminée dans les urines (sous forme inchangée et de métabolites). La demi-vie du proguanil et de son métabolite actif le cycloguanil sont respectivement de 15 et 12h /jour.

On ne connaît pas d'interactions médicamenteuses ayant une traduction clinique.

Du fait d'une élimination rénale importante, la posologie doit être adaptée au débit de filtration glomérulaire en dessous de 60 ml/min. Pas d'adaptation de posologie en cas de cirrhose, mais la plus grande prudence est recommandée en cas d'insuffisance hépatocellulaire.

✓ Utilisation

Le proguanil est un antimalarique schizontocide d'action lente, préventif, et actif sur les espèces de *Plasmodium* dont *P. falciparum* chloroquino résistant.

(<https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/proguanil>)

Exemple 2 : Diaminopyrimidines :

Ils sont composés essentiellement de la pyriméthamine et de la triméthoprime.

✓ Structure :

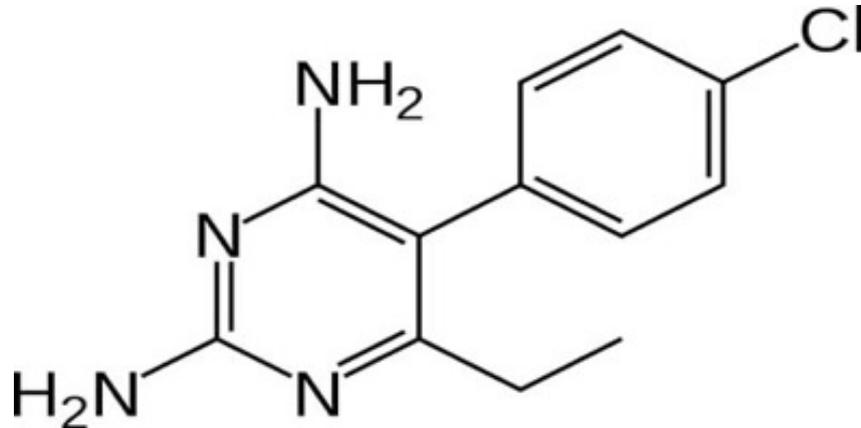


Figure 9: Structure de la pyriméthamine

✓ Mécanisme d'action :

La pyriméthamine a une action schizontocide surtout sur *P. falciparum* mais aussi une action gamétocytocide sur *P. vivax*. Il a un mécanisme d'action antifolinique sur les hématozoaires mais aussi un peu sur les cellules de l'hôte ce qui explique les effets secondaires.

✓ Formulation :

Existe généralement en forme comprimé et suspension buvable pour les enfants (sirop).

✓ Pharmacocinétique :

La demi-vie de la sulfadoxine est d'environ 8 jours. L'absorption digestive des 2 substances est bonne. En cas de retraitement, toujours avec 3 fois la dose unitaire, il faut attendre 8 jours avant de réitérer le traitement. La pyriméthamine a une $\frac{1}{2}$ vie de 4 jours. L'élimination des produits est rénale.

(<https://pharmacomedicale.org/medicaments/parspecialites/item/sulfadoxine-pyrimethamine>).

✓ Utilisation :

Utiles toujours en association dans la prévention et le traitement du paludisme non compliqué.

Les antifoliques :

Ils comprennent les sulfamides (sulfadoxine, sulfalène) et les sulfones (dapsone).

✓ Structure :

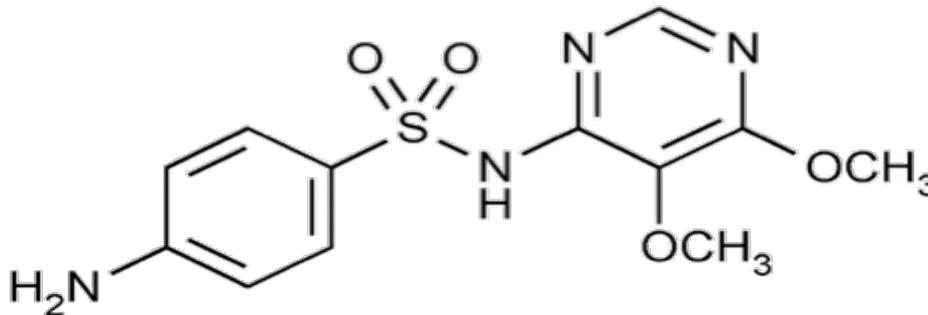


Figure 10: Structure de la sulfadoxine

✓ Mécanisme d'action :

Les antifoliques provoquent le blocage de la synthèse de l'acide dihydrofolique, indispensable à l'édification de l'ADN de l'hématozoaire mais leur action est lente. Ils sont actifs sur les souches de *P. falciparum* chloroquinorésistantes et très peu actifs sur *P. vivax*. On les associe souvent à des inhibiteurs de la Dihydrofolate réductase.

✓ Formulation :

Utilisées généralement en association sous forme comprimés.

✓ Pharmacocinétique :

La sulfadoxine et la sulfalène sont des sulfamides à longue durée d'action (demi-vie environ 200 heures pour la sulfadoxine et 65 heures pour la sulfalène). Ils sont fortement liés aux protéines plasmatiques et sont essentiellement éliminés par voie urinaire.

✓ Utilisation :

Les antifoliques sont utilisés en association ou seul pour la prévention et le traitement du paludisme simple

3.9.3.4. Pipéraquline :

✓ Structure :

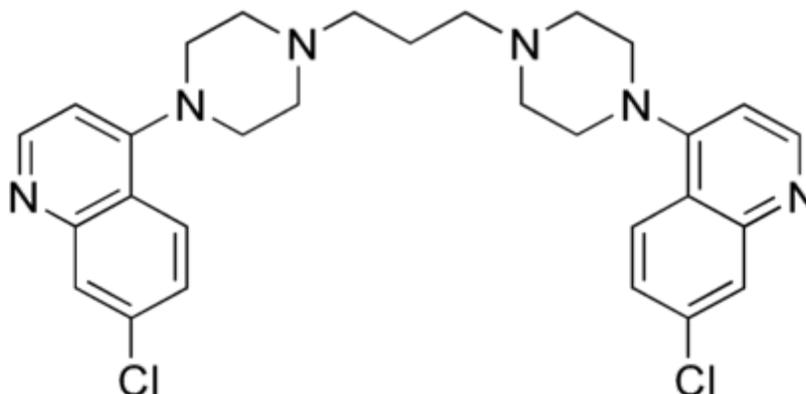


Figure 11: Structure de la pipéraquline

La pipéraquline est une bisquinoléine et cette classe a montré une bonne activité antiparasitaire *in vitro* sur les souches de *Plasmodium* résistantes à la chloroquine. La structure bisquinolone. Volumineuse peut être importante pour l'activité sur les souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine.

✓ Mécanisme d'action :

Le mécanisme d'action exact de la pipéraquline n'est pas élucidé, mais il est probablement identique à celui de la chloroquine qui est un analogue structurel proche. La pipéraquline pourrait agir par les mécanismes suivants :

- Inhibition des transporteurs qui assure l'exocytose de la chloroquine à partir des vacuoles digestives du parasite.
- Inhibition de la dégradation de l'hémoglobine dans les vacuoles digestives du parasite.

✓ Formulation :

Forme comprimé en combinaison thérapeutique avec la DHA : DHA (20mg) / PQP (160mg) et DHA (40mg) / PQP (320).

✓ Pharmacocinétique :

La pipéraquline, un composé hautement lipophile, est absorbée lentement. Chez l'homme, le Tmax de la pipéraquline est d'environ 5 heures après administration de doses uniques et répétées. Du fait de son élimination lente, la pipéraquline s'accumule dans le plasma après des administrations répétées. On observe une augmentation de l'effet d'allongement de l'intervalle QT. Elle est liée aux protéines plasmatiques (environ 99 %). Métabolisée essentiellement par le CYP3A4, la pipéraquline est ensuite éliminée avec une demi-vie d'élimination d'environ 22 jours.

✓ **Utilisation :**

Utilisée seul parfois en association dans la prise en charge de paludismes non compliqués causés par *Plasmodium falciparum*.

3.8.2.5. Pyronaridine :

✓ **Structure :**

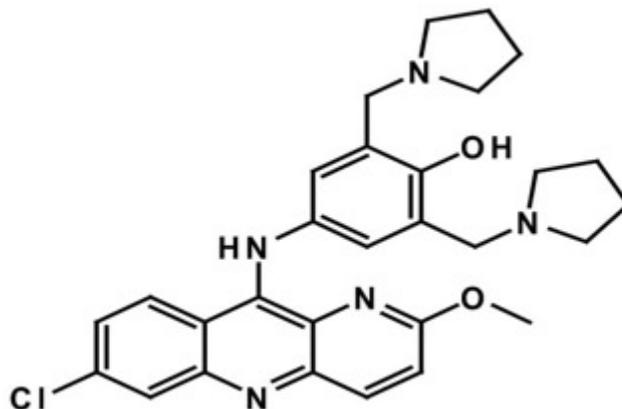


Figure 12: Structure de la pyronaridine

La pyronaridine est le premier dérivé benzonaphthyridine synthétisé en 1970 en Chine. Elle a été utilisée en Chine pour le traitement du paludisme en monothérapie pendant 30 ans. Plus récemment l'intérêt accordé à la pyronaridine a été renouvelée comme étant un partenaire possible des dérivés de l'artémisinine dans les CTAs. Elle existe sous la forme base et sel.

✓ **Mécanisme d'action :**

Elle agit par Inhibition de la topoisomérase II de l'ADN. L'action se fait au niveau de la vacuole digestive en inhibant la bio cristallisation de l'hème.

✓ **Formulation :**

- Capsules de 50mg et 100mg
- En combinaison thérapeutique : Pyronaridine (180 mg) / Artésunate (60mg)

✓ **Pharmacocinétique :**

L'absorption après administration orale ou intramusculaire(60) de la pyronaridine est rapide et le temps de demi-vie plasmatique après des doses répétées est de $194.8 \pm 47,8$ h (61). Les concentrations plasmatiques de la pyronaridine sont dose dépendante. La demi-vie d'élimination de la pyronaridine a été estimée à 13,2 jours chez les adultes atteints du paludisme et de 9,6 jours chez les enfants(62).

✓ **Utilisation :**

Utilisé en association pour le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* et au stade sanguin de *P. vivax*.

3.8.3.6. Artémisinine et dérivés :

✓ **Structure :**

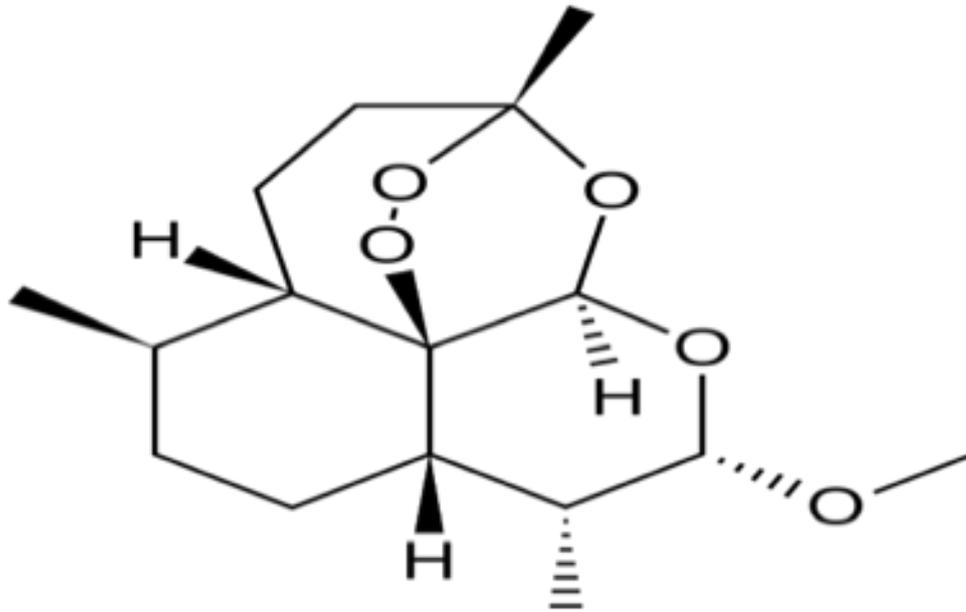


Figure 13: Structure de l'artéméter

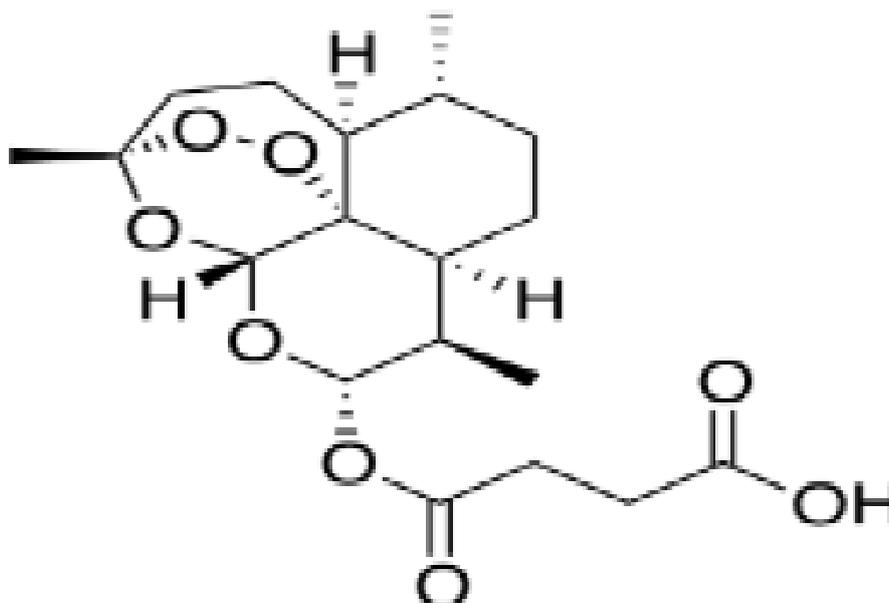


Figure 14: Structure de l'artésunate

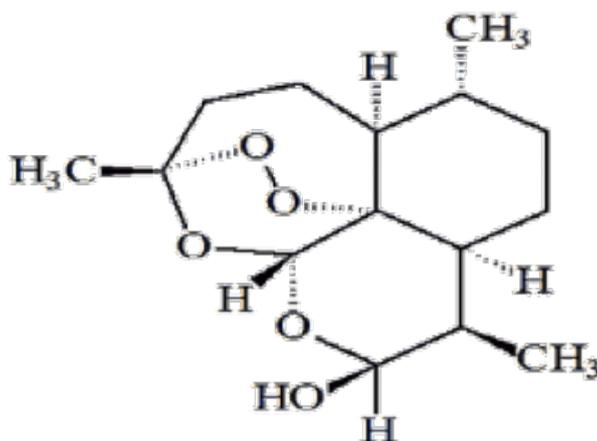


Figure 15: Structure de la dihydroartémisinine

L'artéméter est un éther méthylique liposoluble de la dihydroartémisinine, qui possède une activité schizontocide très rapide contre les formes anneaux (ring) sanguines de *P. falciparum* et *P. vivax*. Après administration intramusculaire, la concentration plasmatique atteint son maximum en six heures environ. Il a été rapporté que l'artéméter élimine la fièvre en 30 à 84 heures dans le paludisme grave à *P. falciparum*.

➤ L'artésunate injectable est le traitement recommandé par l'OMS pour le paludisme grave à *P. falciparum* chez l'enfant et l'adulte (63). C'est un médicament dérivé de l'artémisinine. Ce médicament à durée d'action courte tue les parasites plus rapidement que les antipaludiques conventionnels et permet une guérison plus rapide.

➤ La dihydroartémisinine est le principal métabolite actif des dérivés de l'artémisinine, mais elle peut également être administrée par voie orale et rectale en tant que médicament. Elle est relativement insoluble dans l'eau, et exige une formulation avec les excipients précis pour être suffisamment absorbée. Elle permet d'obtenir des taux de guérison analogues à ceux de l'artésunate par voie orale. Une formulation en doses fixes avec la pipéraquline est actuellement disponible en CTA.

✓ Mécanisme d'action des dérivés de l'artémisinine :

Ce sont des schizontocides actifs sur les souches de *Plasmodium* résistantes aux autres antipaludéens de même que sur les formes anneaux de *Plasmodium*. L'artémisinine et dérivés sont plus actifs contre le *Plasmodium* que les autres antipaludéens. Leur pont peroxyde intra-moléculaire, en présence du fer (Fe), donne des radicaux libres qui détruisent le parasite. Les chélateurs de Fer qui pénètrent dans les cellules inhibent l'effet de l'artémisinine et ses dérivés.

✓ **Formulation :**

➤ **Artéméther :**

- Formes injectables dosées à 20 mg
- Comprimés en combinaison thérapeutique : Artéméther (20mg) / Lumefantrine (120mg)

➤ **Artésunate :**

- En combinaison thérapeutique : Artésunate-Amodiaquine, Artésunate-Méfloquine

➤ **Dihydroartémisinine :**

Comprimés contenant 20 mg, 60 mg ou 80 mg de dihydroartémisinine ;
Suppositoires contenant 80 mg de dihydroartémisinine

✓ **Pharmacocinétique :**

➤ **Artéméther :**

L'absorption orale est rapide, le pic de concentration est obtenu au bout de 2 h, et la fixation aux protéines plasmatiques est de 95%.

Il est métabolisé par le CYP3A4 et le CYP2C19 en dihydroartémisinine métabolite actif, puis en métabolites inactifs. Il est éliminé sous formes de métabolites dans les urines et les fèces.

➤ **Artésunate :**

L'artésunate est essentiellement administré par voie orale et intraveineuse mais les voies intramusculaires et intra-rectales peuvent également être utilisées. L'AS est une pro drogue rapidement hydrolysée dans la circulation systémique par une estérase mais également via le cytochrome P450 2A6 (64) en dihydroartémisinine (DHA), métabolite actif principalement responsable de l'activité antipaludique. Après prise orale, l'artésunate est en partie hydrolysé en DHA dans la lumière du tube digestif. La biodisponibilité de la DHA après administration orale est supérieure à 80 % chez des adultes sains ou impaludés.

Après administration intraveineuse rapide, le pic de DHA (Tmax) survient de façon variable en fonction des études mais est, en moyenne, toujours inférieur à 25 minutes.

Après administration orale d'AS, les concentrations plasmatiques d'AS sont détectables environ 15 minutes après la prise et le pic est observé dans la première heure suivant la prise, témoignant d'une absorption rapide.

L'AS et la DHA ne sont pas très fortement liés aux protéines plasmatiques (environ (80 %)). La demi-vie d'élimination de l'Artésunate est en moyenne de 15 à 45 minutes selon les études et celle de la DHA de 30 à 100 minutes(65)(66).

➤ Dihydroartémisinine :

La dihydroartémisinine est rapidement absorbée après administration orale et les pics de concentrations sont atteints au bout de 2 heures et demie environ. L'absorption par la voie rectale est un peu plus lente, avec des pics de concentrations obtenus environ 4 heures après administration. Près de 55% de la dihydroartémisinine se fixent aux protéines plasmatiques. Sa demi-vie d'élimination est d'environ 45 minutes du fait qu'elle est éliminée par glycuronidation intestinale et hépatique (67).

✓ Utilisation :

Utilisés actuellement en association et est nommée "CTA" pour "Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine". Elles permettent de traiter la maladie lorsque les autres antipaludéens, comme la quinine, la chloroquine, ne fonctionnent pas. Ce traitement a permis de diminuer significativement le nombre de décès causés par la maladie.

3.9.3.7. Les amino-8 quinoléines :

Le principal représentant est la primaquine et la resinate tafenoquine qui est utilisable en vue de traitement prophylactique et radical de *P. vivax* et *P. ovale* (68).

✓ Structure :

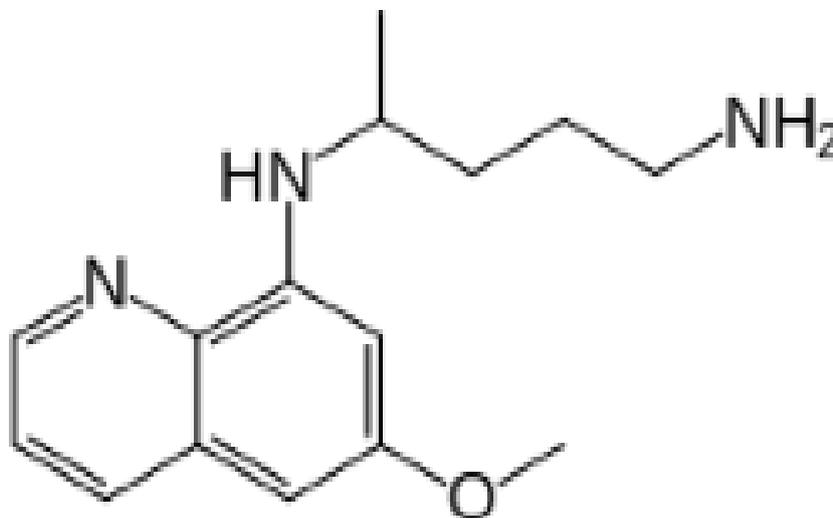


Figure 16: Structure de la primaquine

✓ **Mécanisme d'action :**

Le mécanisme d'action n'est pas bien compris. Il peut agir en générant des espèces réactives d'oxygène ou en interférant avec le transport des électrons dans le parasite.

Lorsqu'une personne est infectée par le paludisme, les parasites du paludisme se déplacent vers le foie pour atteindre leur maturité. Lorsqu'ils sont matures, les parasites entrent dans la circulation sanguine, où ils provoquent des symptômes. Certains types d'infections palustres peuvent rester dans le foie pendant des mois, voire des années, et provoquer des rechutes répétées, ou le retour des symptômes. Les deux médicaments sont actifs sur les hypnozoïtes hépatiques et les gamétocytes sanguins.

✓ **Formulation :**

Existe généralement sous forme de comprimé.

✓ **Pharmacocinétique :**

La Pharmacocinétique moins étudiée.

Absorption, destin et excrétion : Elle est bien absorbée après administration orale et rapidement métabolisé. Sa demi-vie d'élimination est d'environ 6 heures. Les métabolites de la primaquine ont des propriétés oxydantes et peuvent provoquer une hémolyse chez les patients déficients en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD).

✓ **Utilisation :**

La primaquine est utilisée sur les formes sexuée du *Plasmodium* mais aussi sur les hypnozoïtes pour prévenir les rechutes d'infections dues à *P. vivax* et *P. ovale* (traitement) et comme gamétocytocide afin de réduire la transmission de *P. falciparum* dans les régions où le paludisme est endémique(69). Utilisé aussi chez les voyageurs pour la prévention.

3.10. La chimiorésistance :

3.10.1. Définition de la chimiorésistance :

L'OMS a défini la chimiorésistance comme l'aptitude d'un microorganisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées mais comprises dans les limites de tolérance du sujet(70).

La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques est un phénomène réel sur tous les continents. Plusieurs études ont été menées pour expliquer le mécanisme de la résistance. Comme chez les bactéries, les principaux mécanismes de la résistance pourraient être dus :

- Soit à l'inactivation enzymatique ou à la dégradation des médicaments(71).
- Soit à une altération du site de fixation du médicament.
- Soit à une inhibition de l'entrée du médicament(72).
- Soit à un reflux actif du médicament au niveau de son site d'action.

Les variants issus d'erreurs de réplication de l'ADN, sont d'autant plus fréquents que la multiplication asexuée est rapide et que les systèmes enzymatiques de réparation de l'ADN sont imparfaits. Il y a sélection de plasmodies mutantes lorsque la concentration de l'antipaludique est suffisante pour inhiber la multiplication des plasmodies sensibles mais insuffisante pour bloquer celle des mutants, phénomène désignée sous le nom de « sélection médicamenteuse» (73). On pense que ce processus sélectif est facilité par la présence de concentrations plasmatiques infra thérapeutiques d'antipaludiques et lorsque la courbe dose-réponse est plate. Un parasite résistant est celui qui présente une ou plusieurs mutation(s) génétique(s) au niveau de son ADN (selon les médicaments). Les mutations génétiques ne sont pas dues à l'action du médicament, mais sont des anomalies qui se produisent lors de la réplication de l'ADN chromosomique ou mitochondrial du parasite. Donc le médicament administré à un sujet porteur de parasites trouve déjà présents dans l'organisme de celui-ci des parasites, soit préalablement mutés (résistants) soit non mutés (sensibles)(74). La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques est un phénomène réel sur tous les continents. Plusieurs études ont été menées pour expliquer le mécanisme de la résistance.

3.10.2. La résistance aux antipaludiques et gènes moléculaires associés :

Notion de marqueurs moléculaires de résistance

Les marqueurs moléculaires sont un type de marqueur génétique composé de fragments d'ADN qui servent de repères pour suivre la transmission d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre, les marqueurs moléculaires révèlent directement les modifications du

patrimoine génétique qu'ils se traduisent ou non par une modification phénotypique (phénotype), physiologique ou biochimique. Ces marqueurs moléculaires sont donc des indicateurs neutres de variabilité génétique qui permettent d'identifier le polymorphisme entre famille, genres, espèces, variétés, populations et même entre individus... Ainsi, les marqueurs moléculaires sont des outils très efficaces pour la phylogénie moléculaire puisqu'ils peuvent établir des relations de parenté entre individus(75).

Plasmodium malariae est un parasite du paludisme humain difficile à cerner et même avec l'utilisation de techniques moléculaires. Très peu d'études ont été faites concernant la résistance de *Plasmodium malariae* aux antipaludiques, mais des études ont été faite concernant sa recrudescence (13) .

3.10.2.1. Le *Pfmdr1* : *Plasmodium falciparum* multidrug résistance gène 1 :

Des homologues du gène *mdr*, responsables de la multirésistance des cellules cancéreuses aux médicaments anti-cancéreux ont été découverts chez *P. falciparum* et nommés *Pfmdr1* et *Pfmdr2*.

Le *Pfmdr2* est localisé sur le chromosome 14 de *P. falciparum*. Les études ont montré qu'il n'était pas impliqué dans la résistance à la chloroquine. Ce gène ne présente pratiquement aucune variation entre les parasites sensibles et ceux résistants (76).

En revanche des variations dans le nombre de copies du gène *Pfmdr1*, le gène correspondant situé sur le chromosome 5 du parasite, associées ou non avec des mutations ponctuelles, ont été initialement considérées dans la chloroquino-résistance. Des mutations ponctuelles de *Pfmdr1* sont liées à la chloroquino-résistance dans certaines études de terrain, par contre certains auteurs ont trouvé le contraire (77).

Le gène *Pfmdr1* code pour une protéine de perméabilité d'un poids moléculaire de 170kD. Comme les homologues des cellules cancéreuses, cette protéine serait impliquée dans le transport trans-membranaire de la chloroquine et d'autres molécules (78). Une mutation au niveau du *Pfmdr1* Asn-Tyr en position 86 pourrait contribuer à la chloroquino-résistance (79). Ce marqueur est impliqué dans la résistance des molécules suivantes : Méfloquine, chloroquine, quinine.

3.10.2.2. Le gène *Pfcrt* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) :

L'équipe de Wellems a montré qu'une mutation de ce gène codant pour une protéine trans-membranaire (*Pfcrt*) de la vacuole digestive de *P. falciparum* est responsable de la résistance à la chloroquine. Le gène *Pfcrt* est entièrement séquencé et comprend 13 exons. En Amérique du

sud, cette résistance est associée à d'autres variants "*Pfcr*" porteurs de plusieurs mutations. Toutefois, les variants "*Pfcr*" de ces trois régions ont en commun, deux mutations spécifiques (*K76T* et *A220S*)(80).

Le gène *Pfcr* est situé sur le chromosome 7, et code pour *Pfcr*, une protéine membranaire de transport vacuolaire. De nombreux polymorphismes de *Pfcr* associés à la résistance à la chloroquine ont été identifiés. La mutation sur le codon 76 (Thr→Lys) de *Pfcr* est essentielle dans la résistance à la chloroquine. La mutation Thr76Lys est associée à une résistance absolue à la chloroquine *in vitro*. De nombreuses études cliniques réalisées dans diverses zones géographiques ont confirmé l'association entre la mutation *Thr76Lys* et la résistance à la chloroquine notamment en Afrique, au Mali, au Cameroun, au Soudan, et au Mozambique, en Asie, au Laos et en Thaïlande, ainsi qu'en Amérique du Sud, au Brésil (81).

Jusqu'à nos jours il n'y a pas de marqueur moléculaire pour l'amodiaquine. On pense que des variations alléliques sur le *Pfcr* et sur le *Pfmdr1* auraient une relation avec une élévation de résistance à l'amodiaquine (82).

3.10.2.3. La DihydroPtéroate synthétase (*dhps*) / La Dihydrofolate réductase (*dhfr*) :

La résistance à la pyriméthamine-sulfadoxine est apparue à la frontière entre la Thaïlande et le Cambodge dans le milieu des années 60. En Afrique, la sensibilité de la pyriméthamine-sulfadoxine a commencée à baisser dans les années 1980. Cette résistance s'est répandue plus rapidement à l'Est qu'à l'Ouest du continent (74). La résistance *in vitro* à la pyriméthamine-sulfadoxine a été reportée dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne, variant de 13 à 30 %. De toutes les résistances aux antipaludiques, la base moléculaire de la résistance à la pyriméthamine-sulfadoxine est la mieux caractérisée. Les mutations spécifiques de *P. falciparum* qui conduisent à la résistance à la pyriméthamine et à la sulfadoxine ont été identifiées. Sulfadoxine et pyriméthamine agissent en synergie (75).

▪ La DihydroPtéroate synthétase (*Dhps*) :

Les mutations ponctuelles au niveau du gène *Dhps*(*DihydroPtéroate synthétase*), sont les bases moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine (83).

Il est situé sur le chromosome 5.

Les substitutions de Sérine-Phénylalanine en position 436 (Ser→Ala ou Phe), Alanine-Glycine en position 437 (Ala→Gly) et Lysine-Acide glutamique en position 540 ont été impliquées dans la résistance *in vitro* du *P. falciparum* à la sulfadoxine(84). Le rôle de la mutation Alanine-

Glycine en position 437 sur *DHPS* dans la résistance *in vitro* à la sulfadoxine a été confirmé par la technique de transfection.

▪ **La Dihydrofolate réductase (*Dhfr*) :**

Le gène de la résistance de *P. falciparum* à la pyriméthamine est situé sur le chromosome 4. Des mutations en position 51, 59 et 108 par substitution respectivement de l'Asparagine par l'Isoleucine, la Cystéine par l'Arginine et la Serine par l'Asparagine seraient à l'origine de la résistance à la pyriméthamine *in vitro*(85)(86)(87). La mutation I164L à elle seule confère au parasite la résistance à la pyriméthamine.

Le rôle des mutations DHPS et DHFR dans la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine *in vivo* n'est pas encore établi avec certitude malgré les données *in vitro*(88). Cependant certains auteurs ont trouvé une relation entre les échecs thérapeutiques et le génotype quintuple mutant (89).

La résistance *in vitro* au cycloguanil est due à une mutation Serine-Thréonine en position 108 associée à une Alanine-Valine en position 16 tandis que la mutation Isoleucine- Leucine en position 164 a été retrouvée chez les souches à la fois résistantes à la pyriméthamine et au cycloguanil (90)(91).

3.10.2.4. Le gène Cytochrome b du *Plasmodium falciparum* (*Pf*cytb) :

Gene de résistance à l'atovaquone dans la région couvrant les codons 271_284(92)(93). Cette résistance à l'atovaquone est conférée par mutation unique Tyr268S (Y268S) ou sur le gène du cytochrome b (*pf*cytb)(94)(95).

La position 268 dans le cytochrome b est très bien conservée dans tous phyla. Il est situé dans la composante en hélice "ef" du Qo et il est probable que la chaîne latérale de ce résidu participe dans une interaction hydrophobe stabilisante avec l'ubiquinol lié(96).

Le complexe bc1 est une protéine transmembranaire catalytique impliqués dans la photosynthèse bactérienne et la respiration mitochondriale (97)(98). Cette protéine essentielle effectue une étape clé dans la production d'énergie cellulaire. Sa fonction biochimique repose sur le cycle dit Q, qui est bien établie et fonctionne via des substrats de quinol qui se lient à l'intérieur du complexe protéique. Malgré des décennies de recherche, l'interaction quinol-protéine, qui initie le Q-cycle, n'a pas encore été complètement décrit(99).

3.10.2.5. Le gène *k13 propeller* :

Le gène *K13-propeller* code pour la protéine Kelch dont certaines mutations dans le domaine β -propeller ont été associées à une augmentation de la demi-vie de la clairance parasitaire après traitement à l'artémisinine au Cambodge (100). Il est localisé sur le chromosome 13 en position 43700 (PF3D7_1343700). Le gène de 2181 pb (paires de bases) code pour une protéine de 726 acides aminés. Le *PfK13* a été décrit comme étant associé à la résistance *in vivo* et *in vitro* de *P. falciparum* à l'artémisinine en Asie du Sud-est par Ariey et al en 2014.

La protéine Kelch se présente sous forme d'hélice. Le carboxy-terminal du PF3D7_1343700 code pour six motifs kelch répétitifs qui se trouvent dans une grande région avec diverses fonctions cellulaires (101). Il y a une homologie entre la protéine *K13* et la protéine KLHL12 KLHL2 (impliquées dans la dégradation des protéines ubiquitines) et la protéine KEAP1 (impliquée dans l'adaptation de la cellule au stress oxydatif) (100).

Comme dans de nombreuses protéines Kelch, des mutations dans le domaine kelch sont prédites pour modifier la structure de la protéine ou de modifier sa charge modifiant en même temps sa fonction biologique. De tels changements pourraient éventuellement permettre l'émergence d'une protéine mieux adaptée pour résister aux facteurs de stress spécifiques associés à l'exposition aux dérivés de l'artémisinine. La protéine de 726 acides aminés comprend un domaine N terminal contenant les séquences spécifiques à *P. falciparum* et un domaine Kelch propeller (C terminal) séparés par un domaine BTB/POZ.

Ainsi le contrôle et l'élimination du paludisme sont sérieusement menacés par l'émergence et la propagation de la résistance aux dérivés d'artémisinine (ACT) et leurs médicaments partenaires. Au regard de la résistance aux CTA qui sont les médicaments de premier choix contre le paludisme, de nouveaux médicaments sont urgemment nécessaires à découvrir pour réussir l'éradication du paludisme. Dans notre étude nous avons inclus les antipaludiques candidats de Novartis comprenant le KDU691, un inhibiteur spécifique du *Plasmodium* phosphatidylinositol-4-OH kinase (PI4K). Nous avons aussi inclus l'imidazolopipérazine (IPZ) GNF179, une nouvelle classe d'antipaludéens qui ont démontré leur efficacité lors de premiers essais cliniques sur *Plasmodium falciparum* et *P. vivax*(102). Ici, nous avons évalué leurs activités *ex-vivo* contre des isolats cliniques de *P. malariae* comparées à ceux de *P. falciparum* afin dans l'avenir de faire face au traitement du paludisme dans sa diversité d'espèce plasmodiale.

Tableau I: Résumé des classes d'antipaludiques, leurs cibles et les gènes de résistance

Classe d'antipaludiques	Molécule	Cible	Gene de résistance	Références
Agents lysosomotropes				
Quinoléines	Chloroquine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>Pfprt</i> <i>Pfmdr-1</i>	Fidock et al.2000 et Sidhu et al.2002
	Quinine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>Pfnhe-1</i>	Ferdig M et al.2004
	Méfloquine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>Pfmdr-1</i> Autre	Peel et al.1994 et Price et al.2004
	Amodiaquine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>Pfmdr-1</i> <i>Pfprt</i>	Echeverry et al.2007
	Halofantrine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>Pfmdr-1</i> Autre	Peel et al.1994
	Luméfantrine	Synthèse d'Hémozoïne	<i>Pfmdr-1</i>	Duraisingh-Manoj T. et al. 2000
Endoperoxydes naturels et dérivés semi-synthétiques	Artémisinine	Hème et	<i>Kelch 13</i>	Ariey et al.2014
	Artésunate	Protéines dans la vacuole digestive	<i>Pfmdr-1</i> Autre	Price et al.1999
	Artémether		<i>PfATP6</i>	Eckstein-Ludwig U. et al.2003
Agents non lysosomotropes				
Sulfamides	Sulfadoxine	DHPS	<i>Pfdhps</i>	Wang et al.1997
Diaminopyridines	Pyriméthamine	DHFR	<i>Pfdhfr</i>	Peterson et al.1990
	Proguanil	DHFR	<i>Pfdhfr</i>	Peterson et al.1990
Hydroxy naphthoquinone	Atovaquone	Cytochrome b	<i>Pfcytb</i>	Korsinczky et al.2000

3.10.3. Méthode d'évaluation de la chimiorésistance :

L'évaluation de la chimiorésistance a été standardisée par l'OMS pour l'espèce *Plasmodium falciparum*. Il s'agit d'épreuves d'évaluation *in vivo* et *in vitro*.

3.10.3.1. Tests *in vivo* :

Elle consiste à administrer, à un sujet porteur de *Plasmodium falciparum*, la dose ordinairement recommandée de l'antipaludique à tester, et à contrôler la disparition des parasites du sang au bout d'un temps donné. L'évaluation de l'efficacité des schémas thérapeutiques se fait directement avec ces tests. Les tests *in vivo* habituels comportent : le test prolongé de 28 jours.

Actuellement l'OMS propose des suivis de 28, 28, 42, 42 et 63 jours respectivement pour la chloroquine, l'amodiaquine, la sulfadoxine-pyriméthamine, la luméfantine-artémether (Coartem®) et la méfloquine (103).

Test standard de l'OMS de 28 jours (104):

Il consiste à traiter les patients présentant une infection mono spécifique à *Plasmodium falciparum* avec contrôle de la parasitémie aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28.

Ce test présente les avantages suivants :

- Adhésion facile de la population car elle y trouve un intérêt médical immédiat.
- Détermination du niveau de la résistance afin d'adopter un schéma thérapeutique Adéquat.
- Matériel utilisable simple.
- Ils peuvent fournir des éléments de pharmacovigilance de l'antipaludique utilisé.

Cependant le test de 28 jours peut avoir des inconvénients :

- Faux résultats liés aux troubles du métabolisme du médicament, au niveau immunitaire du malade, et aux troubles d'absorption du médicament.
- Durée longue pour le diagnostic de la résistance.
- Difficultés de mettre les sujets hors d'état de réinfections en zone d'endémie surtout pendant la saison de transmission (épreuve de 28 jours).
- Critères d'inclusion souvent difficiles à mettre en pratique entre autre l'absence de la prise antérieure d'antipaludiques.
- Temps de réalisation assez long ,
- Insuffisance liée à la technique microscopique, en particulier la sensibilité, la spécificité, qui sont fonction de la compétence du lecteur.

3.10.3.2. Test *in vitro* :

Il consiste à mesurer l'inhibition de la maturation en schizontes des parasites isolés chez un sujet, en présence de doses croissantes d'un antipaludique donné. Après le macro-test mis au point par l'OMS et vite abandonné, c'est les micro-tests qui sont actuellement utilisés. On distingue :

-Tests optiques :

Le micro-test OMS et le semi-micro-test de Le Bras (105) ont été mis au point à la fin des années 70 afin d'évaluer la sensibilité de *P. falciparum* à certains médicaments. Ils sont basés sur la capacité des doses croissantes d'antipaludiques testés à empêcher la maturation des trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* en schizontes, lorsque le prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI (Roosevelt Park Memorial Institute) et incubé à 37°C, en présence du CO₂ et de l'O₂, pendant 24 à 48 heures. Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI), pour le micro-test OMS, et en concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) OU 90% (CI₉₀) pour le semi-micro-test.

-Tests isotopiques :

Ce sont des modifications, respectivement, du micro-test OMS et du semi-micro-test optique par l'adjonction dans chaque cupule d'un radio-isotope, l'Hypoxantine tritiée. La maturation des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites. La mesure de la radioactivité se fait après 42 à 48 heures d'incubation, à l'aide d'un compteur à scintillation. Les résultats sont donnés en coups par minute (CPM) et l'activité du médicament est exprimée en CI₅₀ ou en CI₉₀.

-Les Nouveaux tests :

Les tests récemment mis au point sont : Le micro-test de MARKII,

Le test de MAKLER,

Les tests moléculaires.

3.11. Molécules antiplasmodiales en développement clinique

Bien que des combinaisons de médicaments à base d'artémisinine soient disponibles pour traiter le paludisme, les cas d'échecs des traitements rapportés en Asie du Sud-Est soulèvent des inquiétudes quant à la propagation de la résistance aux CTA en Afrique. Au Rwanda, dans une étude publiée en août 2020 dans Nature Medicine il est rapporté les premiers cas de résistance de *plasmodium falciparum* à l'artémisinine(106).

Heureusement, il y a de l'espoir à l'horizon car plusieurs nouveaux candidats médicaments antipaludiques sont en cours d'essais cliniques ainsi que d'autres cibles médicamenteuses prometteuses qui sont en cours d'étude. L'élimination du paludisme nécessite l'utilisation de médicaments sûrs et bien tolérés dans les populations vulnérables : les enfants, pendant la grossesse, en particulier le premier trimestre, et chez celles souffrant de malnutrition ou de co-infection avec d'autres agents pathogènes. Le médicament idéal devrait être moins cher et très accessible, actif sur les formes sanguines sexuées et asexuées du parasite, de même que sur les formes hépatiques incluant les hypnozoïtes de *P. vivax* et *P. ovale*. Ainsi L'élimination du paludisme nécessite l'utilisation de nouvelles classes de médicaments bloquant la transmission, supprimant les hypnozoïtes et actif sur les parasites résistants du terrain. Il y a eu une approche collaborative de la découverte et du développement de médicaments avec des initiatives telles que Malaria Box, une ressource en accès libre contenant 400 composés avec une activité antipaludique mise à disposition gratuitement.

KDU691 : Une équipe de recherche internationale a pour la première fois déterminé la structure atomique d'une protéine kinase appelée PKG dans les parasites *Plasmodium*. Cette découverte aidera potentiellement à créer une nouvelle génération de médicaments antipaludéens et à faire avancer la recherche fondamentale. La PKG joue un rôle essentiel dans les stades de développement du cycle de vie complexe du parasite, donc la compréhension de sa structure est la clé du développement de thérapies contre le paludisme qui ciblent spécifiquement la PKG et non d'autres enzymes humaines, selon le chercheur Dr Charles Calmettes. Le lipide kinase « *Plasmodium* phosphatidylinositol 4-kinase » ou (PI4K), est identifiée comme cible thérapeutique. KDU691 une nouvelle classe de composés antipaludiques qui inhibe spécifiquement PI4K bloque le développement intracellulaire de plusieurs stades d'infection chez l'hôte vertébré et invertébré de *Plasmodium falciparum* et de *Plasmodium vivax*(107). KDU691 est aussi actif contre les parasites résistants à l'artémisinine et ayant les mutations K13(108).

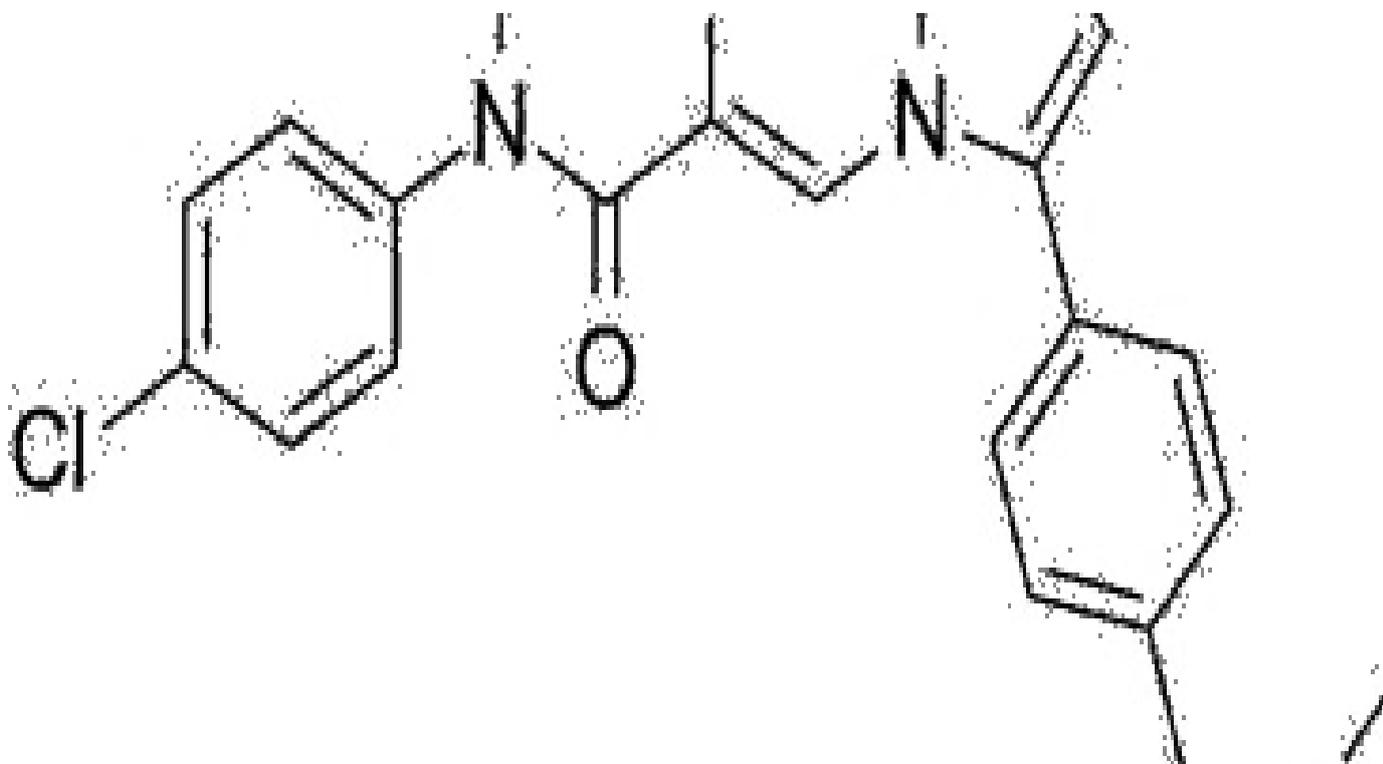


Figure 17 : Structure chimique général du KDU691

GNF-179 : Les imidazolopipérazines dont GNF179, sont aussi de nouvelles classes de médicaments. GNF179 est un analogue proche du candidat clinique KAF156 qui a démontré une puissante activité thérapeutique en combinaison avec une nouvelle formulation améliorée de la luméfantine lors d'essais cliniques de phase IIb chez des patients avec un paludisme à *P. falciparum* et de *P. vivax*(102). Le KAF156 est le premier composé d'une nouvelle classe d'antipaludique, les imidazolopipérazines, et a le potentiel dans l'élimination du paludisme, en guérissant rapidement les infections paludéennes, y compris les souches résistantes et en bloquant la transmission du parasite. KAF156 et son analogue proche GNF179 ont aussi le potentiel de prévenir le paludisme par leur propriété contre les stades hépatiques. KAF156 est et GNF179 sont très actif sur les parasites résistants à l'artémisinine (109).

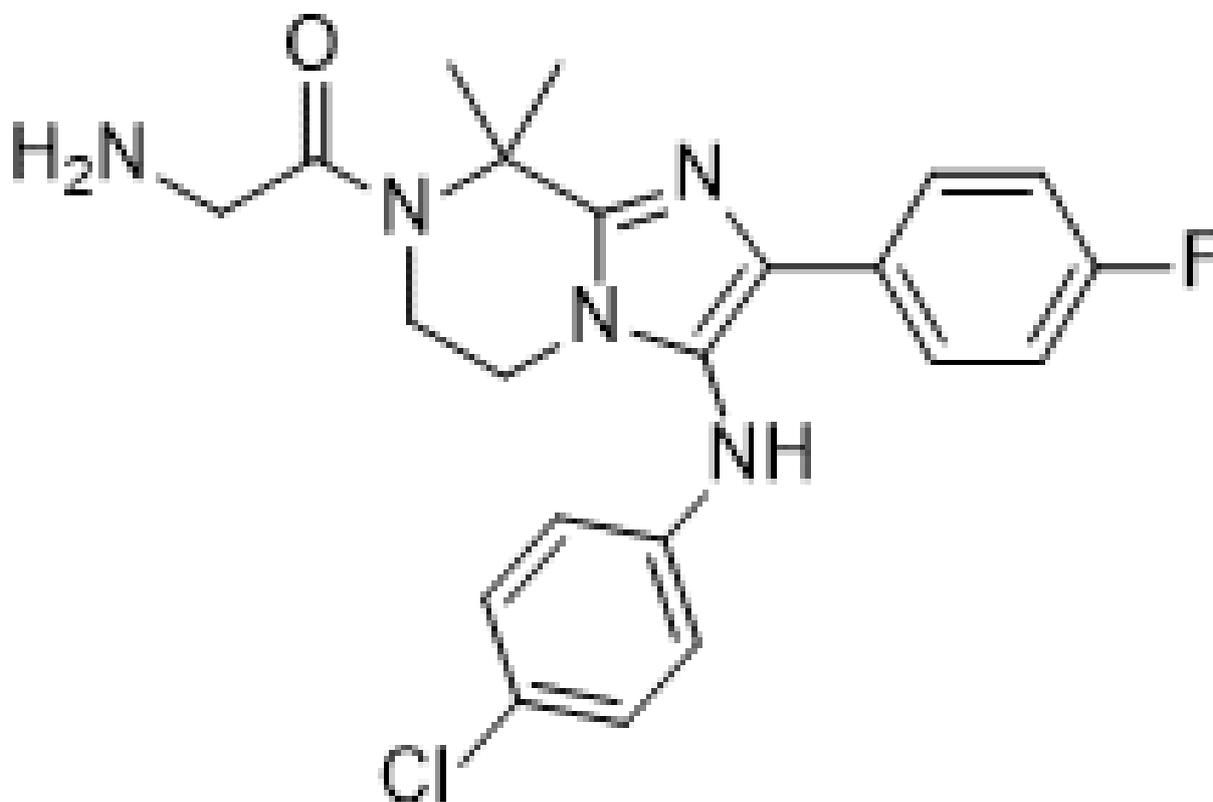


Figure 18 : Structure du GNF179

4. MATRIELS ET MÉTHODES :

4.1. Lieu d'étude :

Notre étude a été réalisée à Faladjé et dans les villages environnants. Faladjé est un village de la commune de N'Tjiba et situé à 80 Km au nord-ouest de la ville de Bamako (Figure 17). Le paludisme y est hyper endémique avec une transmission d'intensité saisonnière entre les mois de Juillet et Janvier.

4.1.1. Climat et végétation :

Le climat est caractérisé par deux saisons : une saison sèche, et une saison pluvieuse. La saison des pluies dure 6 à 7 mois (Mai-Novembre) avec une pluviométrie maximale en août et la saison sèche de 5 à 6 mois (décembre-avril). La végétation est dense et on y rencontre des grands arbres : le caïlcédrat (*Khaya senegalensis*), le néré (*Parkia biglobosa*), le karité (*Vitellaria paradoxa*), etc. La végétation est de type savane.

4.1.2. Population :

La population du village de Faladjé comprend les Bambara (l'ethnie majoritaire) qui cohabitent avec les peuhls, soninkés, maures, etc...

La religion occupe une place importante dans la vie des habitants. L'islam est pratiqué par près de 70 % de la population, tandis que 20 % pratique le christianisme, et 10 % l'animisme.

Le village de Faladjé comprend cinq quartiers : Bamanan-kin, Doura-kin, la Mission, Djélibabougou et le quartier des eaux et forêts.

4.1.3. Infrastructures socio-sanitaires :

L'aire de santé de Faladjé couvre toute la commune de N'TJIBA. Le système de santé est constitué d'un dispensaire qui est la seule structure de santé de la commune.

Le personnel dispense des soins en médecine générale, en pédiatrie. Le centre dispose d'une maternité bien équipée, les vaccinations de routine telles que planifiées par le programme élargi de vaccination (PEV) sont rigoureusement suivies.

Le village de Faladjé dispose d'une école de premier et second cycle dirigée par la mission catholique et une école communautaire.

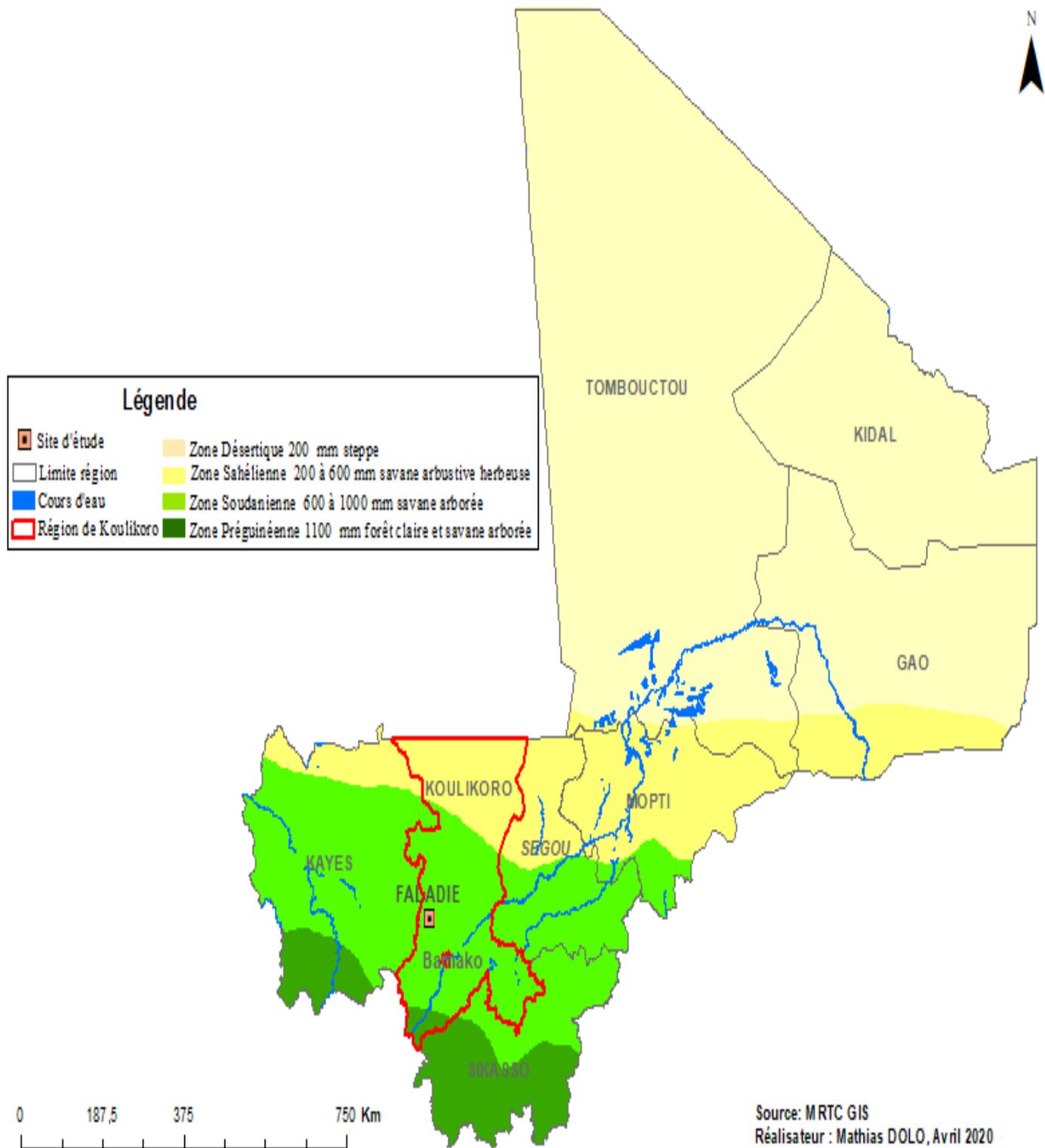


Figure 19: Présentation du site (Faladjé)

4.2. Le choix du lieu d'étude :

Des études antérieures effectuées sur le site de Faladjé ont rapporté une circulation de *P. malariae* à la microscopie, justifiant ainsi le choix de ce site pour effectuer notre étude.

4.3. Type d'étude :

Nous avons mené une étude d'observation prospective avec des passages hebdomadaires.

4.4. Période d'étude :

L'étude s'est déroulée en 2019 (janvier, février, mars et octobre, novembre, décembre) couvrant la collecte des échantillons et les expériences de laboratoire.

4.5. Population d'étude :

L'étude a porté sur les volontaires résidant sur le site d'étude et villages environnants, présentant ou pas des symptômes de paludisme.

4.6. Considérations éthiques et déontologiques :

Le protocole de l'étude, ainsi que les formulaires de consentement et d'assentiment libres et éclairés ont été soumis et approuvés par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et de la Faculté de Pharmacie (FAPH).

Avant le début de l'étude, la permission communautaire a été obtenue auprès des notables et la population des sites d'étude. Sur le terrain, le consentement/assentiment éclairé des sujets ont été obtenu conformément aux principes éthiques.

Chaque participant signait ou apposait son empreinte digitale sur une fiche de consentement volontaire qui lui était présenté par l'équipe de recherche. Pour les enfants mineurs, les parents ou les tuteurs signaient à leur place.

4.7. Critères d'inclusion et de non-inclusion :

✓ Critères d'inclusion :

- Volontaire de tout sexe confondu âgé de 1 an et plus, présentant un paludisme non compliqué,
- Résident à Faladjé et villages environnants,
- Volontaire présentant une infection asymptomatique à *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* ou *P. vivax*.
- Présence d'une fièvre définie comme une température axillaire non corrigée $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ ou antécédent de fièvre.
- Paludisme à *P. malariae* mono-infection ou infection mixte associant *Plasmodium malariae* à une autre espèce.

- Obtenir un consentement éclairé du participant ou le consentement des parents ou tuteurs légaux pour les enfants de moins de 14 ans et l'assentiment des enfants de 14 à 18 ans après qu'ils aient reçu une information détaillée du protocole.

✓ **Critères de non inclusion :**

- Patients ayant reçus un traitement antipaludique depuis moins de 14 jours,
- Paludisme grave,
- Femme enceinte,
- Anémie sévère,
- Pas disponible pour l'étude.

4.8. Traitement antipaludique administré :

Les patients ont été immédiatement pris en charge après le prélèvement de sang avec le traitement recommandé par l'OMS et le Ministère de la santé du Mali. La combinaison thérapeutique Artéméther + Luméfantrine (chaque comprimé est dose à 20mg d'artéméther et 120mg de la luméfantrine) a été administrée par voie orale pendant trois jours selon la posologie suivante en fonction du poids corporel :

- 5kg a < 15kg : 1 comprimé deux fois par jour,
- 15kg a < 25kg : 2 comprimés deux fois par jour,
- 25kg a < 35kg : 3 comprimés deux fois par jour,
- \geq 35kg : 4 comprimés deux fois par jour.

La prise correcte du médicament a été suivie par un investigateur de l'étude pendant toute la durée du traitement. Les volontaires sont gardés en observation pendant une heure afin de s'assurer qu'ils n'ont pas vomi le médicament. A la fin du traitement, l'investigateur clinique a examiné de nouveau le patient pour évaluer l'évolution clinique de la maladie. Une goutte épaisse et un frottis mince de contrôle ont été réalisés chez tous les volontaires au septième jour du traitement.

4.9. Méthodes de collecte des données :

4.9.1. Collecte des données cliniques :

Chaque participant a bénéficié d'un examen clinique complet à l'admission. Les données ont été recueillies par un clinicien du site par l'interview directe ou par l'examen physique du volontaire. Les informations cliniques collectées portaient sur le poids, la taille, la température corporelle, la recherche de la splénomégalie par palpation de la rate, les fréquences cardiaques et respiratoires, la recherche de signe de gravités. Le même examen était aussi fait en cas de visite (prévu ou imprévue).

4.9.2. Collecte des données Biologiques :

Elles ont été collectées au poste de biologie, chaque participant ou son tuteur avait déjà donné son consentement écrit après avoir pris connaissance du protocole avant son enrôlement. Les données biologiques ont été collectées à partir des prélèvements de sang capillaire au bout du doigt ou du sang veineux (3 ml-10 ml).

Nous avons effectué :

- Le frottis mince à partir d'un prélèvement au bout du doigt,
- les confettis sanguins à partir du prélèvement veineux d'un volume variable de sang (3 à 5 ml) pour les enfants âgés de moins de 5 ans ; et 5 à 10 ml pour les participants de plus de 5 ans. Les prélèvements ont été faits par un personnel qualifié. Les prélèvements ont servi :

- à diagnostiquer le paludisme par la goutte épaisse en déterminant la densité parasitaire (DP). Le frotti mince a été utilisé pour le diagnostic d'espèce de *Plasmodium*.

Les parasitémies ont été estimées en comptant 200 globules blancs (leucocytes) et le tout rapporté à 8000 leucocytes par millimètre cube de sang. La gamétocytémie était déterminée sur 1000 leucocytes.

- déterminer le taux d'hémoglobine,
- confectionner des papiers buvards ou confettis de sang pour les analyses moléculaires et génomiques du parasite,
- faire les analyses fonctionnelles du parasite (test d'invasion, tests *ex-vivo* et *in-vitro*).

4.9.2.1. Goutte épaisse :

- **Principe :**

Technique de concentration en vue de la recherche des hématozoaires dans le sang. Elle consiste à réaliser un étalement épais de sang circonscrit dans un cercle d'environ 1 cm de diamètre.

- **Matériel :**

Blouse, gants stériles, lames porte-objet, vaccinostyles stériles à usage unique, alcool à 70°C, coton hydrophile, poubelle, Giemsa à 10%, bacs de coloration, éprouvette graduée, râteliers, eau desionisée, crayon à papier, chronomètre, huile à immersion, compteur manuel, papier hygiénique, microscope optique binoculaire, une machine à calculer, une table de lecture et une chaise.

- **Mode opératoire :**

Les lames étaient marquées par un crayon indélébile. le majeur ou annulaire de la main gauche était désinfectée par un tampon d'alcool, puis essuyé avec un morceau de coton sec afin d'enlever le reste d'alcool. Une ponction capillaire était faite au niveau de ce doigt et la première goutte était essuyée avec un morceau de coton sec. La seconde goutte a été récupérée sur une lame porte-objet. Avec l'extrémité d'une 2ème lame la goutte a été étalée par des mouvements spiralés (défibrination) pendant une à 2 minutes sur 1 cm de diamètre environ.

Nous avons laissé sécher à plat sur un support à la température ambiante à l'abri de la poussière et des mouches pour ensuite colorer dans une solution de Giemsa à 10% pendant 15 minutes. Ensuite, rincer avec l'eau propre, en faisant couler le liquide très délicatement sur la lame et laisser sécher sur le râtelier.

- **Examen microscopique :**

La lecture des gouttes se faisait sur place par un biologiste à l'aide d'un microscope optique binoculaire à l'objectif 100 avec huile à immersion. La densité parasitaire était déterminée en comptant le nombre de parasites sur 200 leucocytes et le tout apporté à 8000 leucocytes par millimètre cube de sang. La gamétocytémie était déterminée sur 1000 leucocytes.

Le frottis mince était utilisé pour l'identification des espèces de *Plasmodium*. Après la lecture, les lames étaient conservées dans des boîtes de l'OMS. Pour le contrôle de qualité, 10% des lames ont été relues par un microscopiste certifié qui n'a pas participé à l'étude.

9.2.2. Modes opératoires normalisés pour la confection d'un confetti :

▪ Principe :

Le principe consiste à imbiber du papier buvard avec du sang d'un sujet souffrant de paludisme pour des analyses moléculaires.

▪ Échantillon et niveau de prélèvement :

Il s'agit de sang capillaire prélevé par ponction à l'aide de vaccinostyle stérile au niveau de la face latérale de l'extrémité du 3ème ou 4ème doigt de la main gauche qui doit être indemne de toute pathologie.

▪ Matériel et réactifs :

Pour la confection du confetti, nous avons utilisé le matériel suivant : papier buvard (3Mm Whatman, Hillsboro, OR), gants stériles, vaccinostyle stérile (lancette), coton hydrophile sec, enveloppes standards, ciseaux, poubelle pour vaccinostyles usés et l'alcool 70%, registre, bics, agrafeuse, scotch type OMS, insecticide, cantine sous clé.

▪ Mode opératoire :

Découper du papier buvard Wattman à l'aide d'une paire de ciseaux environ 4 cm de long sur 2 cm de large.

Diviser un des deux bouts du papier en quatre dents (1/2 cm de largeur sur 1 cm de hauteur).

Inscrire le numéro d'identification du patient et la date sur l'autre bout du papier buvard.

Désinfecter la face latérale de l'annulaire gauche à l'aide d'un coton hydrophile imbibé d'alcool à 70%.

Piquer d'un coup sec à l'aide d'un vaccinostyle stérile ledit doigt.

Essuyer la première goutte de sang à l'aide d'un morceau de coton sec, ensuite imbiber le papier buvard de sang.

Laisser sécher le confetti à l'abri des mouches et de la poussière.

▪ Gestion du confetti :

Après séchage, le confetti est logé dans une enveloppe portant le même numéro d'identification du volontaire que le confetti. Le tout est gardé soigneusement dans une cantine sous clefs à l'abri de la poussière, des insectes et des rongeurs.

4.9.2.3. Les Analyses moléculaires des espèces de *Plasmodium* :

Les analyses moléculaires ont été effectuées dans le laboratoire de l'Unité d'Épidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance (MEDRU : Molecular Epidemiology and Drug Resistance Unit) du Département d'Épidémiologie des Affections parasitaires (DEAP) de la Faculté de Pharmacie (FAPH) de l'Université des Sciences des Techniques et de Technologies de Bamako (USTTB).

Nous avons procédé à l'extraction de l'ADN des parasites du paludisme pour effectuer le diagnostic moléculaire par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

- **Extraction de l'ADN :**

L'ADN a été extrait à partir des confettis en utilisant le QIAamp DNA mini kit de QIAGEN (cat# 51304 et 51306) selon les procédures du fabricant et les procédures standardisées du laboratoire MEDRU (voir annexe 1).

- **Diagnostic moléculaire du genre *Plasmodium* :**

Le diagnostic moléculaire des espèces de *Plasmodium* a été fait en utilisant le protocole décrit par Fuehrer et al 2014 (49). Nous avons procédé à la sélection des échantillons positifs au genre *Plasmodium* par PCR nichée.

- **Première amplification (PCR 1) :**

Identifier les tubes de 200 ou 500 µl conformément aux numéros des confettis,

Préparer le mélange réactionnel dans un tube de 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction par réaction,

Repartir dans chaque tube identifié (échantillons) 20 µl (témoins) de mélange réactionnel,

Ajouter 5 µl d'ADN extrait au Qiagen dans chaque tube correspondant,

Placer les tubes bien fermés dans le Thermocycleur.

➤ Couple d'amorce :

rPLU1: TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA.

rPLU5: CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC.

Chaque tube contenait un mélange réactionnel comme décrit dans le tableau suivant :

Tableau II: Préparation du mélange réactionnel pour un échantillon

	Concentration initiale	Concentration Finale	Volume par réaction en μl
BioTaq Buffer	10X	1X	5,00
dNTPs	10X	1X	2,5
rPLU1 amorce	100 μ M	0.25 μ M	0,25
rPLU5 amorce	100 μ M	0.25 μ M	0,25
BioTaq Polymérase (5U/μl)	5U/ μ l	0,005U	0,125
Eau	-	-	11,875
Volume total			20 μl

5 μ l d'échantillon d'ADN correspondant ont été ajouté dans chaque tube pour un volume final de la réaction de 25 μ l

L'amplification a été faite en utilisant le programme décrit dans le tableau suivant :

Tableau III: Programme de la première amplification

	Étapes	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	5 min
2	Dénaturation	94°C	1 mn
3	Hybridation	58°C	1 mn
4	Élongation	72°C	2 min
6	Élongation finale	72°C	5 min
7	Nombre de cycle	25 cycles	-
8	Conservation	4°C	Infini

La taille attendue du produit d'amplification s'estime à 1670 paires base.

➤ **Deuxième amplification (PCR 2) :**

Identifier les tubes de 200 ou 500 µl conformément aux numéros des produits de la première amplification,

Couple d'amorce :

rPLU3: TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC

rPLU4: TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC

Chaque tube contenait un mélange réactionnel comme décrit dans le tableau suivant :

Tableau IV: Préparation du mélange réactionnel pour un échantillon

Réactifs	Concentration initiale	Concentration Finale	Volume par réaction en µl
10x BioTaq Buffer	10X	0.25 µM	5,00
dNTPs	8mM	0.25 µM	2,50
rPLU3 amorce	100µM	1X	0,25
rPLU4 amorce	100µM	1X	0,25
BioTaq Polymérase (5U/µl)	5U/µl	0,005U	0,125
Eau	-	-	15,875
Volume total			24 µl

Ajouter dans chaque tube contenant 24µl du mélange réactionnel, 1µl du produit dilué au 1/10 de la première amplification.

La seconde PCR a été effectuée selon le programme d'amplification décrit dans le tableau suivant :

Tableau V: Programme de la deuxième amplification

	Étapes	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	5 min
2	Dénaturation	94°C	1 mn
3	Hybridation	64°C	1 mn
4	Élongation	72°C	2 min
6	Élongation finale	72°C	5 min
7	Nombre de cycle	30 cycles	-
8	Conservation	4°C	Infini

Après l'amplification, nous avons procédé à la révélation par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. La taille attendue du produit d'amplification pour les échantillons positifs est de 240 paires base.

➤ **Diagnostic moléculaire des espèces de *Plasmodium***

Pour chaque échantillon positif au genre *Plasmodium*, nous avons procédé à l'identification moléculaire des espèces en utilisant le produit de la première PCR selon le protocole décrit par Fuehrer et al 2014(49).

Couples d'amorces spécifiques à chaque espèce :

- *Plasmodium falciparum* : taille attendue du produit d'amplification [206bp]

Couples d'amorce :

rFAL1 : TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT

rFAL2: ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC

- *Plasmodium malariae* : taille attendue du produit d'amplification [145 bp]

Couple d'amorce:

rMAL1: ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC

rMAL2: AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA

- *Plasmodium ovale curtisi* : taille attendue du produit d'amplification [787-789 bp]

Couple d'amorce :

rOVA1: ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA

rOVA2: ATC TAA GAA TTT CAC CTC TGA CAT CTG

- *Plasmodium ovale wallikeri* : taille attendue du produit d'amplification [782 bp]

Couple d'amorce:

rOVA1v: ATC TCC TTT ACT TTT TGT ACT GGA GA

rOVA2v : GGA AAA GGA CAC TAT AAT GTA TCC TAA TA

- *Plasmodium vivax* : taille attendue du produit d'amplification [121 bp]

Couple d'amorces

rVIV1 : CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC

rVIV2 : ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA

Le mélange réactionnel pour un échantillon et pour chaque espèce a été préparé comme décrit dans le tableau suivant :

Tableau VI: Préparation du mélange réactionnel pour un échantillon

Réactifs	Concentration initiale	Concentration Finale	Volume par réaction en μl
10x BioTaq Buffer	10X	1X	5,00
dNTPs	8mM	0.8mM	2,50
Couples d'amorce d'une des espèces	100 μM	0.4 μM	0,50
BioTaq Polymérase (5U/μl)	5U/ μl	0,025U	0,125
Eau	-	-	15,875
Volume total	24 μl		

Ajouter dans chaque tube 1 μl du produit de la première PCR pour un volume réactionnel totale de 25 μl .

L'amplification a été faite selon le programme décrit dans le tableau suivant :

Tableau VII: Programme d'amplification pour le diagnostic de l'espèce

	Étapes	Température	Temps
1	Dénaturation initiale	95°C	5 min
2	Dénaturation	94°C	1 mn
3	Hybridation	64°C	1 mn
4	Élongation	72°C	2 min
6	Élongation finale	72°C	5 min
7	Nombre de cycles	25 cycles	-
8	Conservation	4°C	Infini

Après l'amplification, nous avons procédé à la révélation par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

8.2.5. Contrôle de qualité et interprétation des résultats après révélation :

Deux personnels qualifiés ont procédé indépendamment au contrôle de qualité des photographies des gels après électrophorèse et l'analyse des bandes obtenues. L'interprétation de la photographie du gel tient compte des trois conditions suivantes :

1. Conformité de la taille du produit de la deuxième amplification avec celle attendue ;
2. Concordance de la taille des bandes des contrôles positifs de chaque espèce avec celle des échantillons ;
3. L'absence effective de bandes au niveau des contrôles négatifs.

4.10. Test *ex- vivo* de l'efficacité des médicaments antipaludiques courants et médicaments candidats sur les espèces de *Plasmodium* :

Les tests *ex-vivo* ont été faits sur les isolats de terrain pour déterminer leur sensibilité aux médicaments antipaludiques (Artéméther, Luméfantine, Chloroquine, Quinine et pipéraquline) et aux médicaments candidats contre le paludisme (KDU691 et GNF179). L'efficacité *ex- vivo* de ces médicaments a été évaluée chaque 24 heures pendant 72 heures. Le test *ex- vivo* a été fait dans des plaques de 96 puits pour chaque espèce avec des séries de dilutions des différents médicaments de l'étude en suivant les étapes décrites ci-dessous :

- **Lavage des échantillons sanguins de terrain**

Les prélèvements sanguins sur tube ACD provenant de terrain étaient centrifugés à 657 g pendant 5 minutes pour éliminer le plasma. Le culot globulaire est ensuite lavé trois (3) fois en ajoutant une solution dont la composition est la suivante :

- _Quantité suffisante d'eau stérile pour 1 litre,
- _10,43g de la poudre du RPMI + glutamine (INV-31800022),
- _2,5g de NaHCO₃,
- 5,96g d'Hepes : 5,96g,
- 2,5 ml de la Gentamicine (10mg/ml).

Pour chaque lavage, on ajoutait deux fois le volume équivalent au culot globulaire de la solution dont la composition est citée ci-dessus. Le mélange est ensuite agité délicatement par retournement à la main puis centrifugé à 657 g pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite jeté par aspiration à l'aide d'une petite sérologique.

- **Résuspension du culot globulaire après lavage**

A la fin des lavages, la résuspension du culot était faite pour ramener la parasitémie à 1% et le taux d'hématocrite à 2% avec une solution appelée milieu de culture complet dont la composition est la suivante :

- _Quantité suffisante d'eau stérile pour 1 litre,
- 10,43g de la poudre du RPMI + glutamine (INV-31800022),
- 2,5g de NaHCO₃,
- 5,96g d'Hepes,
- 5g d'Albumax I (INV-11020021),
- 1ml d'Hypoxantine :
- 4ml de la solution de Glucose à 50% (**uniquement pour le test sur *P. falciparum* et *P. ovale***),
- 2,5 ml de la Gentamicine (10mg/ml),

• **Dilution des médicaments dans des plaques de 96 puits**

Le test *ex-vivo* de l'efficacité d'une série de dilution au 1/3 des médicaments de l'étude a été effectué dans des plaques de 96 puits. Pour chaque médicament, 60ul de la solution étaient ajoutés dans des puits successifs de la plaque pour obtenir des concentrations finales de : 10uM ; 3,333uM ; 1,111uM ; 0,370uM ; 0,125uM ; 0,041uM ; 0,0131uM et 0,004uM.

Tableau VIII: Série de dilution des médicaments dans des plaques de 96 puits

Concentration finale des médicaments (µM)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10	A	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	Contrôle non traité	Globule rouge non infecté
3,333	B	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	Contrôle non traité	Globule rouge non infecté
1,111	C	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	Contrôle non traité	Globule rouge non infecté
0,370	D	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	Contrôle non traité	Globule rouge non infecté
0,125	E	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	Contrôle non traité	Globule rouge non infecté
0,041	F	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	Contrôle non traité	Globule rouge non infecté
0,0131	G	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	Contrôle non traité	Globule rouge non infecté
0,004	H	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	Contrôle non traité	Globule rouge non infecté

- **Test *ex-vivo* d'efficacité proprement dit des médicaments**

La susceptibilité *ex-vivo* de chaque espèce de *Plasmodium* à différentes concentrations des médicaments de l'étude a été évaluée en ajoutant 60ul de la suspension globulaire avec une parasitémie de 1% et un taux d'hématocrite de 2% dans chaque puit contenant 60ul d'une concentration donnée du médicament.

Ainsi le volume final de 120ul de préparation dans chaque puit est incubé à 37°C dans un incubateur avec 5% CO₂. Deux plaques ont été utilisées pour les espèces *P. falciparum* et *P. ovale* dont l'une a été incubée pendant 48 heures et la seconde pendant 72 heures. En outre, trois plaques ont été utilisées pour l'évaluation de la susceptibilité *ex-vivo* de *P. malariae* aux différents médicaments après 48, 72 heures d'incubation.

Après 48 heures pour *P. falciparum* et *P. ovale* et 48, 72 heures pour le traitement de la culture par *P. malariae*, retirer la plaque de l'incubateur.

- **Mesure du taux de survie des parasites après le test *ex-vivo***

Le taux de survie des parasites a été déterminé après exposition *ex vivo* à différentes concentrations des différents médicaments de l'étude en utilisant la cryométrie en flux.

Au bout de chaque intervalle d'exposition, les parasites ont été marqués en utilisant le **SYBR green** et le **Mitotracker** (voir préparation dans l'annexe 2) selon les procédures décrites ci-dessous :

- Les plaques sont centrifugées à 657 g pendant 5 minutes au bout des 48 et 72 heures d'incubation selon les espèces de *Plasmodium*.
- Jeter le surnageant,
- Ajouter 120ul de la solution de SYBR green 5X + Mitotracker 1mM
- Incuber pendant une heure et à 37°C dans l'incubateur,
- Retirer les plaques de l'incubateur et centrifuger à 657 g pendant cinq (5) minutes et jeter le surnageant,
- Ajouter 120 ul d'une solution de lavage constituée du HBSS 1X et du FBS 2%
- Mélanger et centrifuger à 657 g pendant 5minutes
- Répéter le lavage trois (3) fois.
- Reconstituer 120ul du culot globulaire avec 6 ml du milieu de culture complet pour une plaque.
- Passer la plaque à la cryométrie en flux.

- **Détermination de la CI50 des médicaments**

Le cymomètre en flux BD ACCURI C6 flow cytometer (numéro de série : 2901) a été utilisé pour déterminer le taux de survie des parasites à une série de dilution des différents médicaments comme indiqué dans le tableau VIII. Le logiciel GraphPad Prism version 8 a été utilisé pour : 1) l'analyse des données, 2) la prédiction des concentrations inhibitrices à 50 % (CI50), ainsi que 3) le t test statistique pour la comparaison des résultats. La valeur $p \leq 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. Pour chaque isolat, un facteur Z' permettant d'évaluer la qualité de l'essai médicamenteux *ex vivo* est calculé à partir des témoins positifs (8 puits témoins contenant des parasites sans ajouter de médicament) et de témoins négatifs (8 puits blancs de sang O⁺ ne contenant ni parasite, ni médicament). La validité du test est déterminée par la valeur de Z' qui doit être supérieure à 0,5 pour un essai acceptable. L'appréciation de l'allure de chaque courbe à l'œil et ses standards de déviation pour déterminer sa pertinence peut être prise en compte pour valider des essais même si la valeur Z' est inférieure à 0,5.

- **Mesure de la parasitémie par cytométrie en flux :**

Nous avons utilisé la cytométrie en flux pour mesurer la parasitémie dans les échantillons de sang et dans les cultures.

FL1-H (SG) mesure la quantité d'ADN parasite permettant de voir que les globules rouges parasités. La granulosité de tous les globules rouges parasités et non parasité est visualisé par FSC-H. La viabilité du parasite est mesuré à la FL4-H (MT) en utilisant un marquage des mitochondries avec un mitotracker rouge vif.

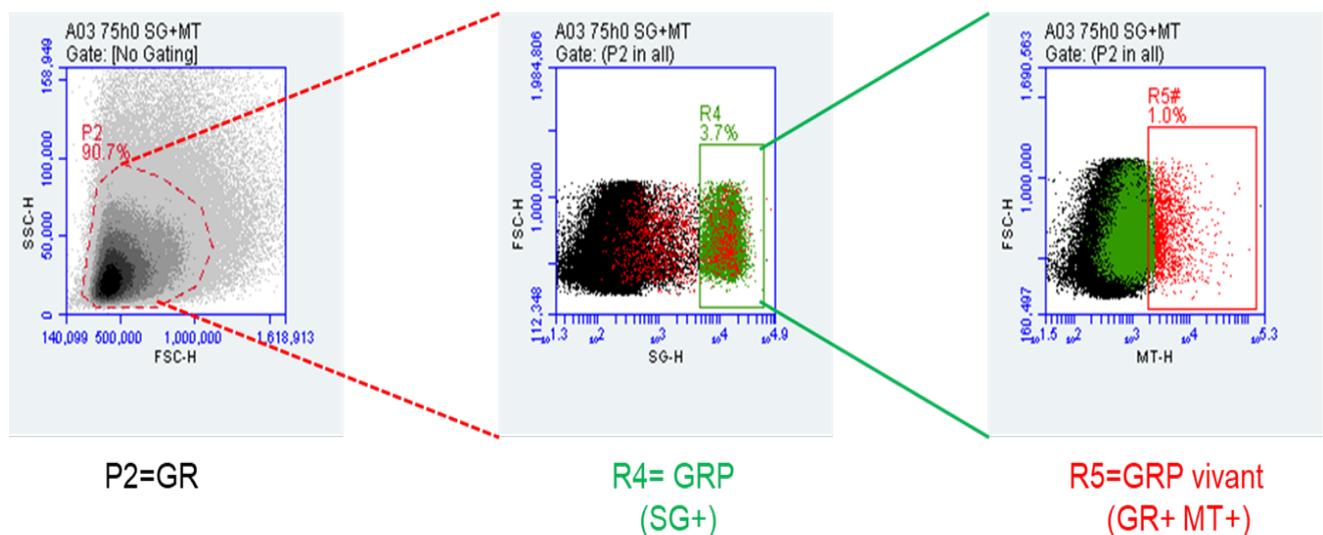


Figure 20 : Schéma d'analyse d'un résultat de cytométrie en flux

5. RESULTATS

Un total de 4170 participants ont été inclus dans cette étude à Faladjé dont 2145 cas d'infections symptomatiques et 2025 cas d'infections asymptomatiques.

5.1. Microscopie des cas d'infections symptomatique et asymptomatique du paludisme à Faladjé :

Du mois d'avril au mois de septembre, nous n'avons pas inclus de participants dans cette étude.

La figure 21 montre le nombre de participants à infection symptomatique et asymptomatique.

Les participants ont été recrutés entre janvier et Mars puis Octobre et Décembre.

Le nombre d'infections asymptomatiques était plus élevé en Janvier, Février et Mars (figure 21).

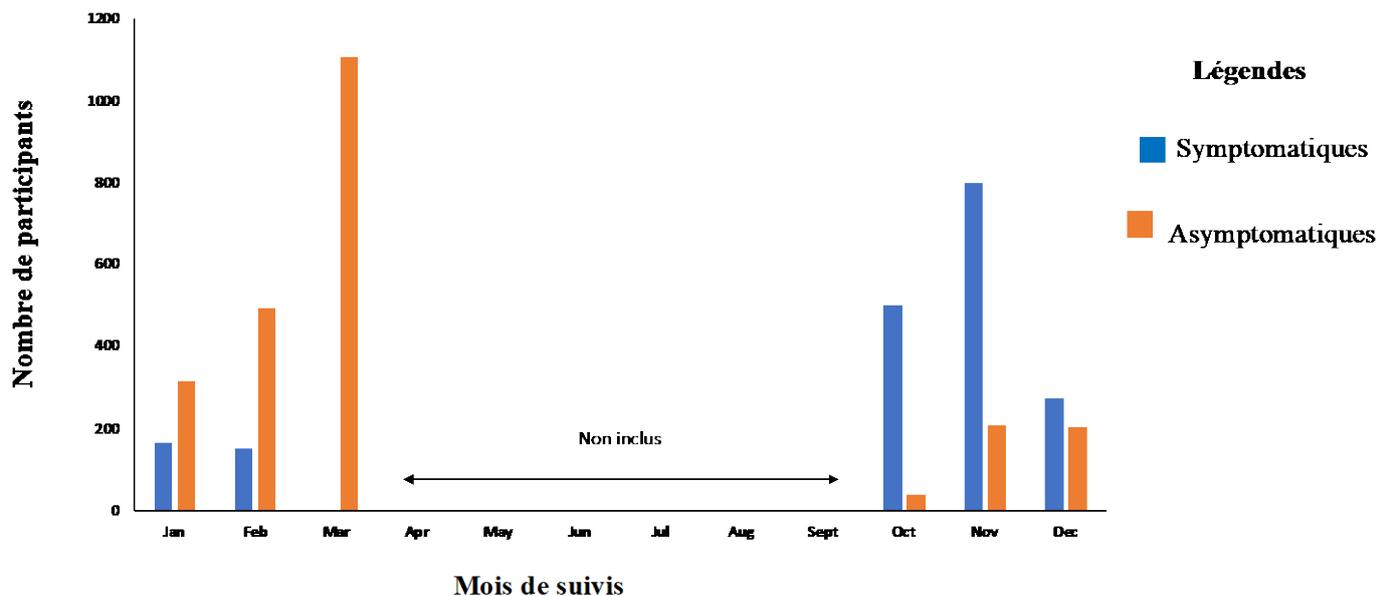


Figure 21: Nombre de participants symptomatiques et asymptomatiques inclus dans l'étude selon le mois à Faladjé

Le tableau IX montre qu'aucun cas d'infections symptomatiques n'a été observé en Mars 2019.

Tableau IX: Répartition mensuelle des cas d'infections **symptomatiques** selon les espèces Plasmodiales observés à la microscopie à Faladjé

Espèces plasmodiales	Proportion (%) n					
	Janvier	Février	Mars	Octobre	Novembre	Décembre
<i>Plasmodium falciparum</i>	(88,67) 47	(63,63) 7	(0) 0	(99,18) 361	(97,98) 534	(95,31) 203
<i>Plasmodium malariae</i>	(11,33) 6	(27,27) 3	(0) 0	(0,82) 3	(0,92) 5	(3,29) 7
<i>Plasmodium ovale</i>	(0) 0	(9,09) 1	(0) 0	(0) 0	(1,10) 6	(1,40) 3
Total	(100) 53	(100) 11	(0) 0	(100) 364	(100) 545	(100) 213

L'analyse du tableau X montre que les cas asymptomatiques de *P. ovale* n'ont été rencontrés qu'en Février et Décembre.

Tableau X : Répartition mensuelle des cas d'infections **asymptomatiques** selon les espèces Plasmodiales observés à la microscopie à Faladjé

Espèces plasmodiales	Proportion (%) n					
	Janvier	Février	Mars	Octobre	Novembre	Décembre
<i>Plasmodium falciparum</i>	(90,74) 49	(88,09) 74	(76,56) 98	(90,90) 10	(95,74) 45	(95) 38
<i>Plasmodium malariae</i>	(9,26) 5	(10,71) 9	(23,44) 30	(9,09) 1	(4,26) 2	(2,5) 1
<i>Plasmodium ovale</i>	(0) 0	(1,19) 1	(0) 0	(0) 0	(0) 0	(2,5) 1
Total	(100) 54	(100) 84	(100) 128	(100) 11	(100) 47	(100) 40

La microscopie des frottis sanguins colorés au Giemsa a permis d'identifier les infections plasmodiales incluant *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale* à Faladjé.

a) Trophozoïte jeune de *Plasmodium falciparum* dans l'hématie,

b) Trophozoïte âgé de *Plasmodium falciparum* dans l'hématie.

Sur le plan morphologique, seuls les stades annulaires et trophozoïtes de *P. falciparum* ont été observés dans les frottis minces (figure 22).

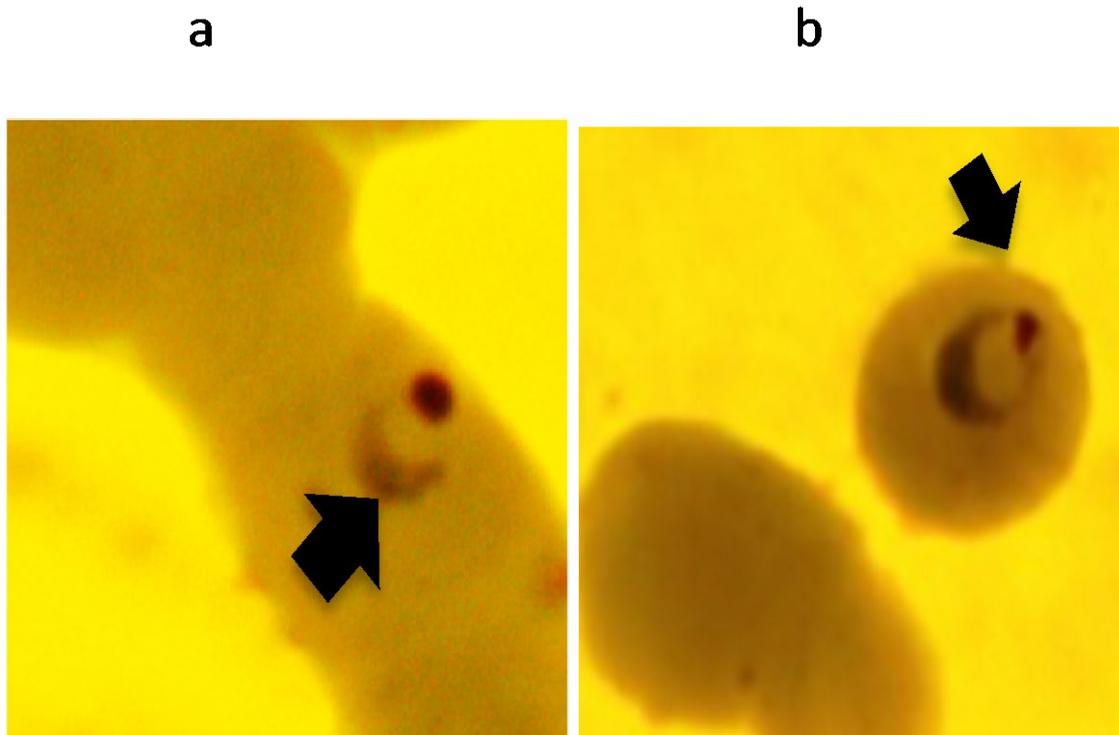


Figure 22 : Photographie des champs microscopiques d'un frottis sanguin

Source : Fanta Sogoré (DEAP/MRTC/MEDRU, 2019)

La figure 23 montre que les infections à *P. falciparum* étaient fortement détectées principalement chez les volontaires symptomatiques à la fin de la saison de haute transmission du paludisme d'octobre à décembre (figure 23).

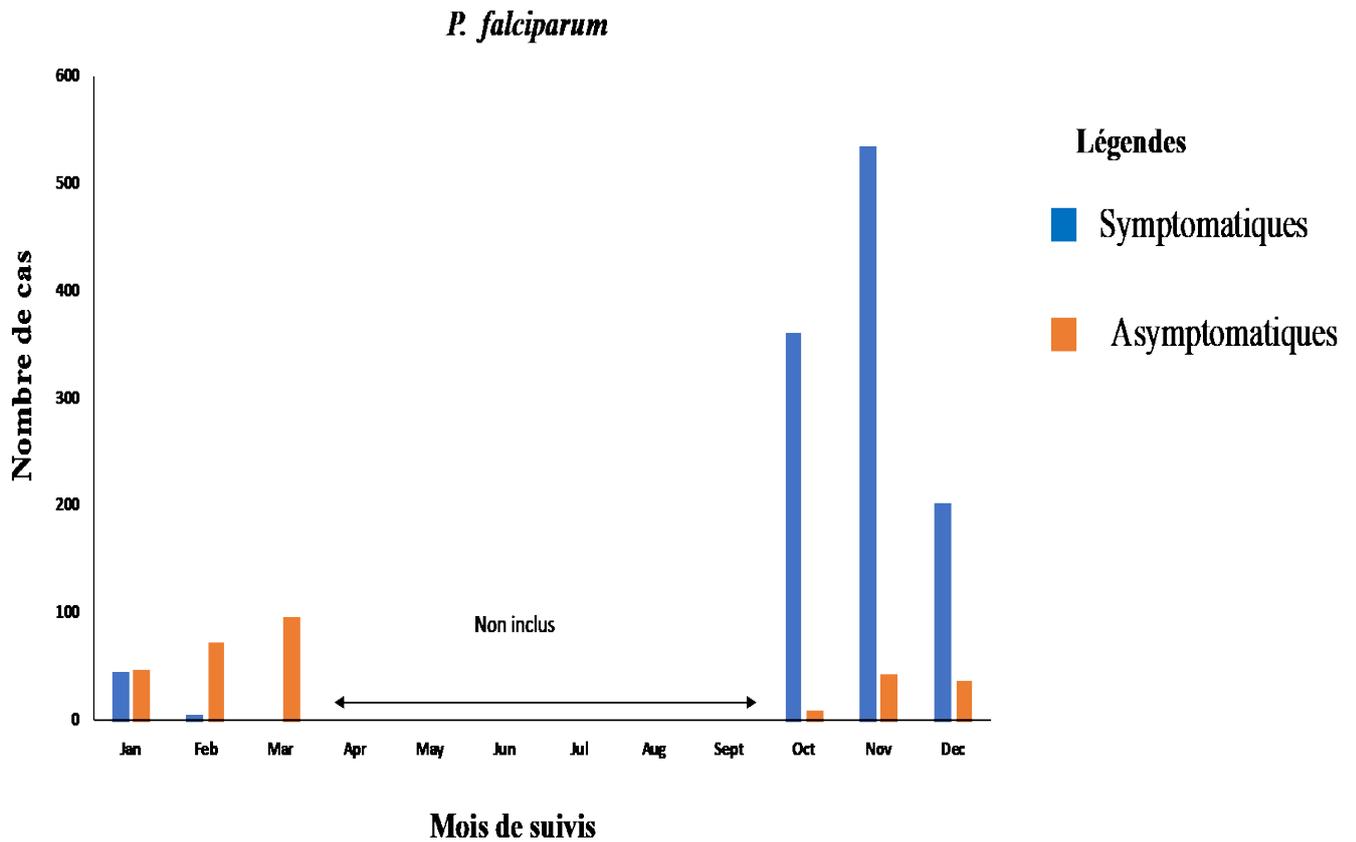


Figure 23: Répartition des infections à *P. falciparum* chez les volontaires symptomatiques et asymptomatiques selon le mois à Faladjé

- a) Trophozoïte en forme de bande équatoriale dans l'hématie caractéristique d'une infection à *Plasmodium malariae*,
b) schizonte de *Plasmodium malariae* dans l'hématie (figure 24).

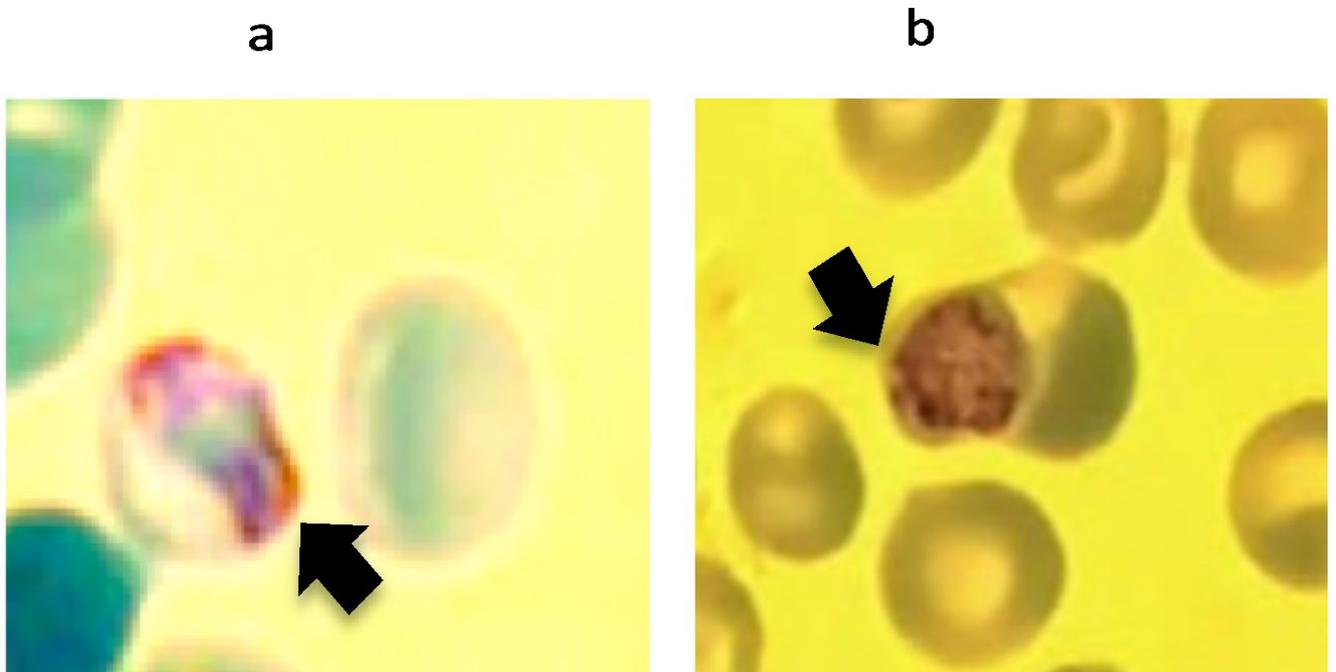


Figure 24 : Photographie des champs microscopiques d'un frottis sanguin

Source : Fanta Sogoré (DEAP/MRTC /MEDRU, 2019)

Nous avons observé le plus grand nombre d'infections à *P. malariae* en Janvier, Février et Mars chez les patients asymptomatiques (figure25).

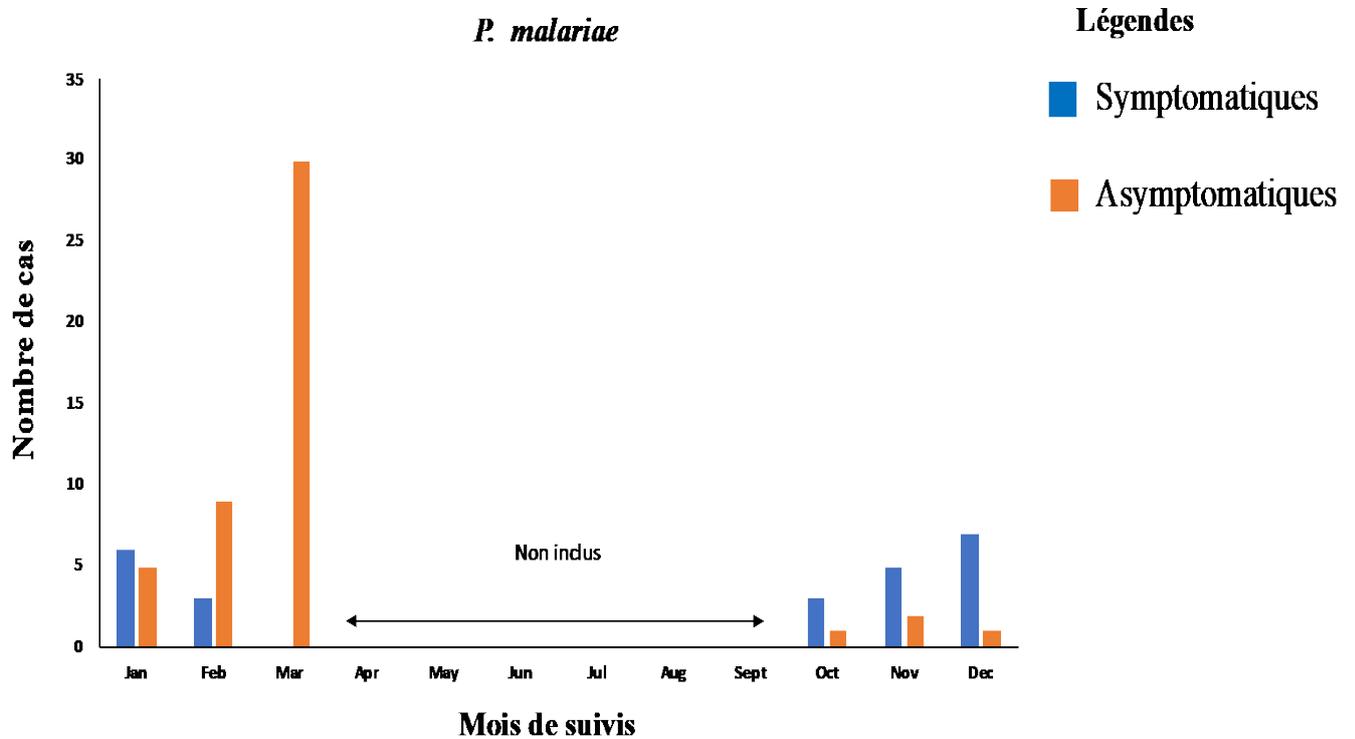


Figure 25: Répartition des infections à *P. malariae* chez les volontaires symptomatiques et asymptomatiques selon le mois à Faladjé

La microscopie ne nous a pas permis d'identifier les espèces de *P. ovale*.

a) trophozoïte de *Plasmodium ovale* dans l'hématie,

b) schizonte de *Plasmodium ovale* dans l'hématie (Figure 26).

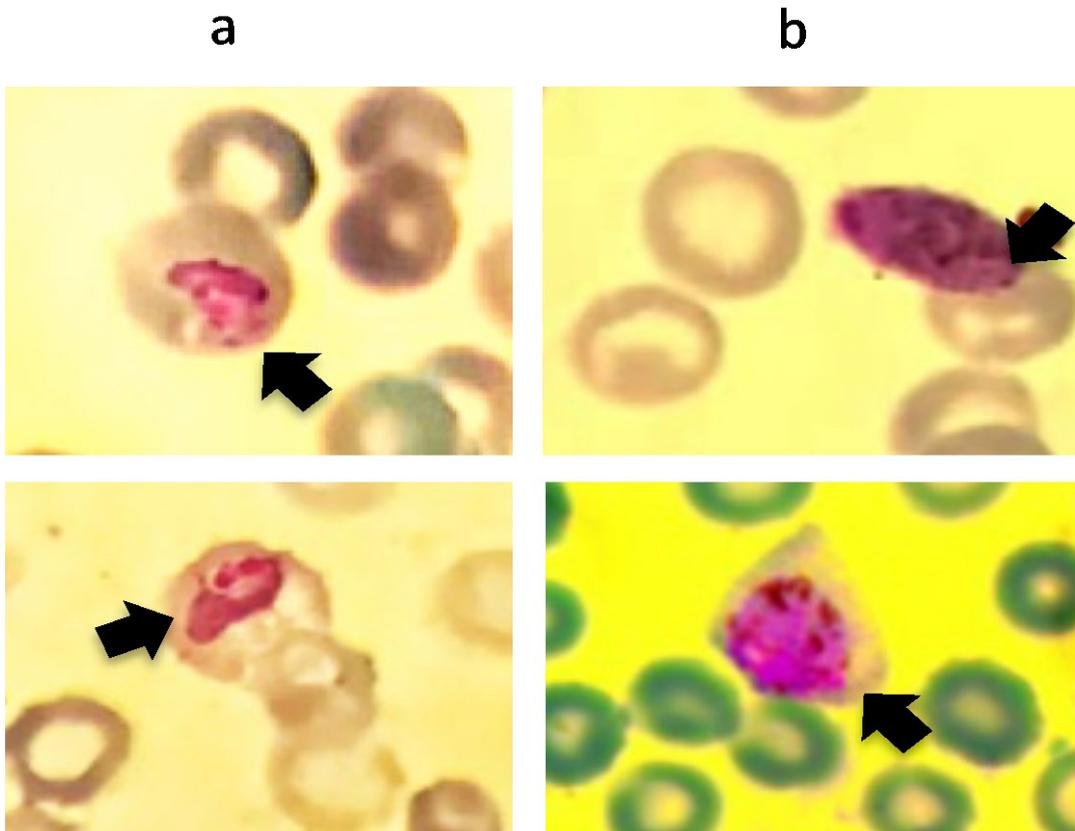


Figure 26: Photographie des champs microscopique d'un frottis sanguin

Source : Fanta Sogoré (DEAP/MRTC/MEDRU, 2019)

Un nombre élevé d'infections à *P. ovale* ont été observés pendant et vers la fin de la saison des pluies et chez les patients symptomatiques.

La fréquence et la prévalence des infections à *P. ovale* étaient inférieures à 1 % dans les populations tant symptomatiques que non symptomatiques.

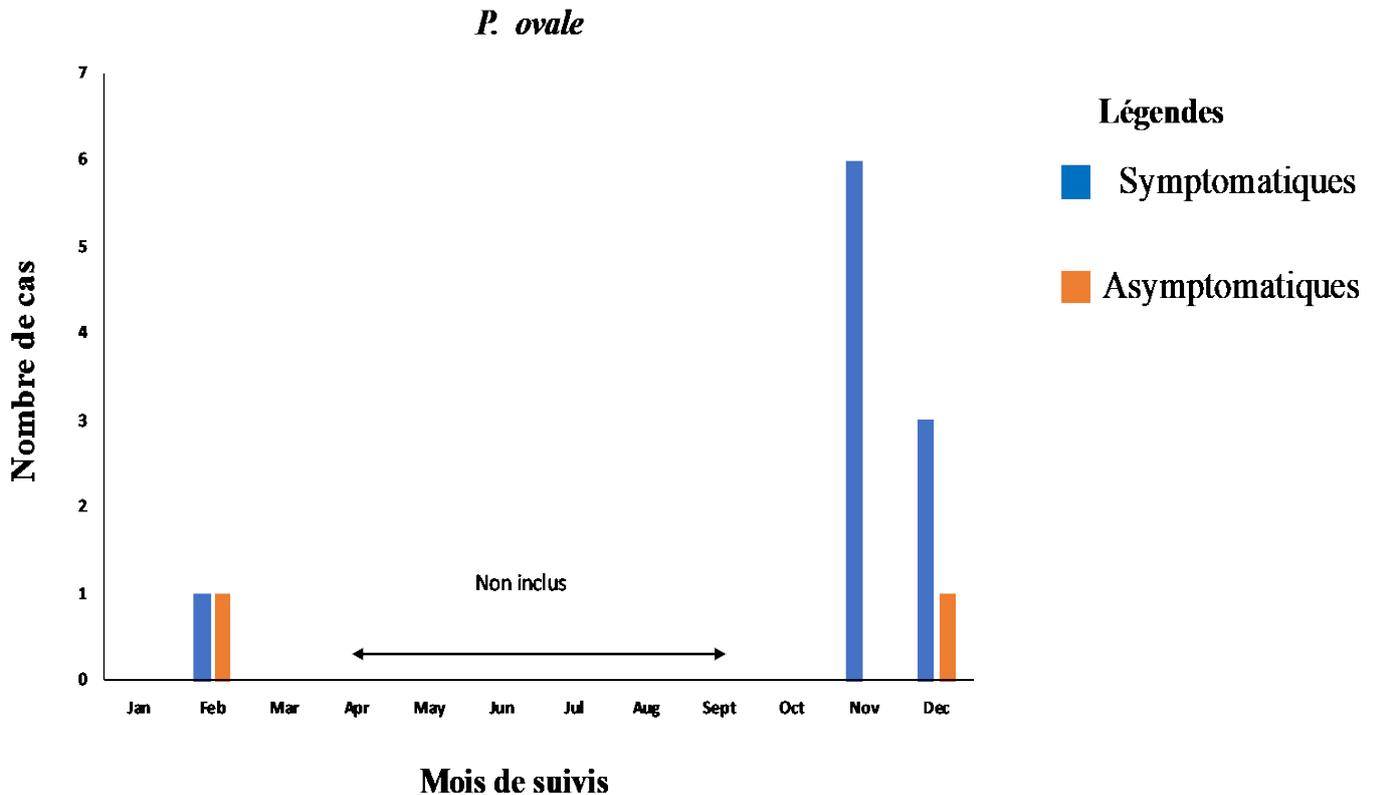


Figure 27: Répartition des infections à *P. ovale* chez les volontaires symptomatiques et asymptomatiques selon le mois à Faladjé

Aucune infection à *Plasmodium vivax* n'a été détectée à la microscopie.

5.2. Détection moléculaire d'isolats cliniques des espèces plasmodiales :

La détection moléculaire a révélé la présence d'une mono infection de *P. falciparum* dans les échantillons 4, 5 et 10 (figure 28 A). Une mono infection à *Plasmodium malariae* a été détectée dans les échantillons 3, 8 et 9 (figure 28 B). Les échantillons 1 et 2 étaient respectivement des infections mixtes de *P. ovale wallikeri* avec *P. falciparum* et *Plasmodium ovale curtisi*, *P. malariae* plus *P. falciparum* (figure 28 D-A, figure 28 C-B-A). Des infections mixtes à *P. malariae* et *P. falciparum* ont été détectées dans les échantillons 6 et 7 (figure 28 B-A).

La détection microscopique ne fait pas la différence entre les parasites de *P. ovale wallikeri* et ceux de *P. ovale curtisi*. Cependant la PCR, a permis de discriminer les espèces du *Plasmodium ovale* (*Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri*).

P. vivax n'a également pas été détecté par le diagnostic PCR dans nos échantillons (figure 28 E).

La taille du produit d'amplification des espèces :

- *Plasmodium falciparum* : environ 206 pb
- *Plasmodium malariae* : environ 145 pb
- *Plasmodium ovale curtisi* : environ 787-789 pb
- *P. ovale wallikeri* : environ 782 pb
- *Plasmodium vivax* : environ 121 pb

A= Photo de gel du diagnostic moléculaire de *P.falciparum*

B= Photo de gel du diagnostic moléculaire de *P.malariae*

C= Photo de gel du diagnostic moléculaire de *P.ovale curtisi*

D= Photo de gel du diagnostic moléculaire de *P.ovale wallikeri*

E= Photo de gel du diagnostic moléculaire de *P.vivax*

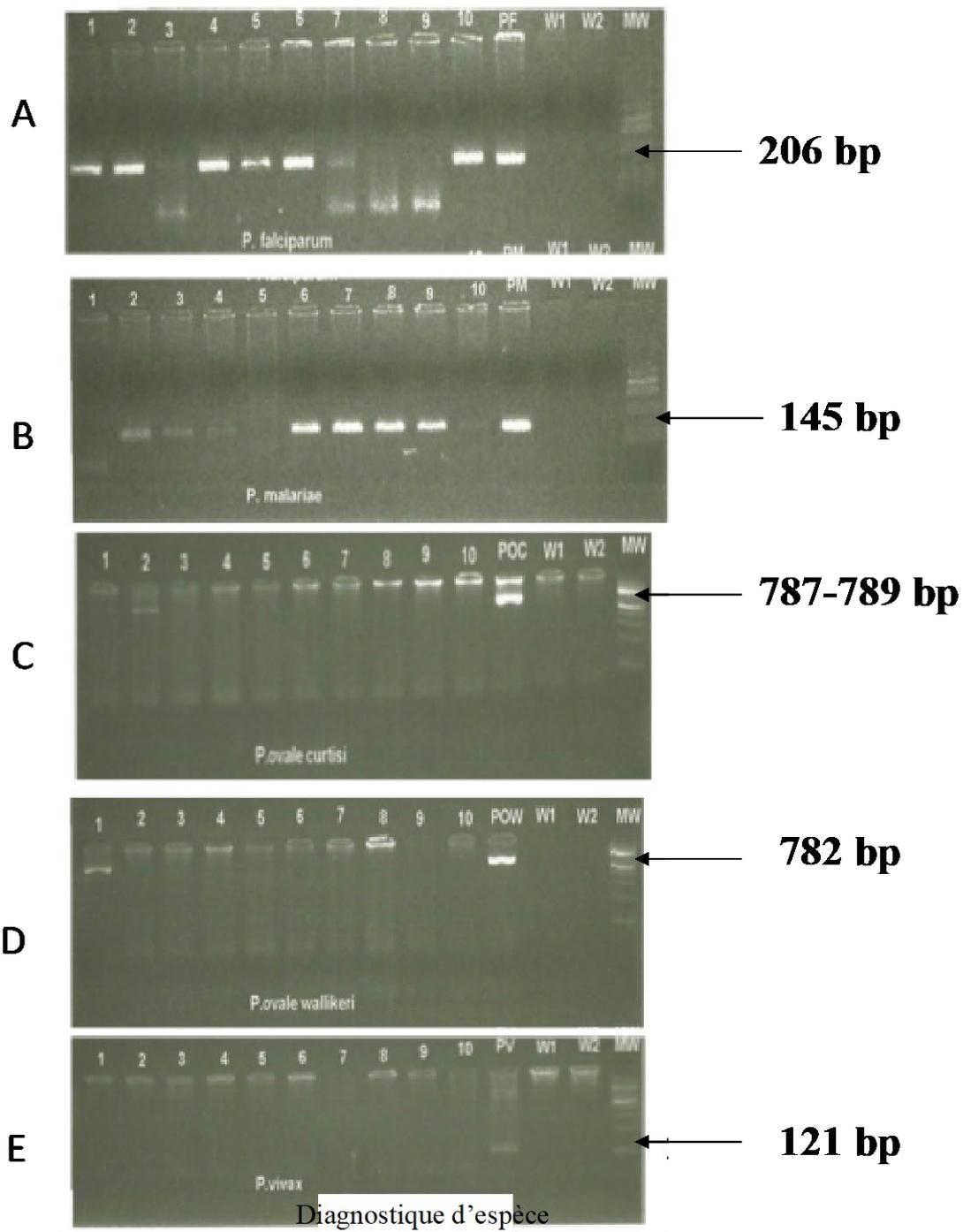


Figure 28: Photo de gel du diagnostic moléculaire des espèces plasmodiales

Légende de la figure 28 :

PF= *Plasmodium falciparum* contrôle positif ;

PM= *Plasmodium malariae* contrôle positif ;

POC= *Plasmodium ovale curtisi*;

Pow= *Plasmodium ovale wallikeri*

W1= water 1 et W2= water 2 sont des contrôles négatifs ;

MW= Poids moléculaire, Pb= Paires de bases.

Le tableau XI montre que *Plasmodium falciparum* était l'espèce dominante selon les observations moléculaires.

Tableau XI : Répartition des espèces Plasmodiales observée à la biologie moléculaire

Échantillons / Espèces	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>P. falciparum</i> (Pf)	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>P. malariae</i> (Pm)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>P. ovale curtisi</i> (Poc)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. ovale wallikeri</i> (Pow)	+	-	-		-	-	-	-	-	-
<i>P. vivax</i> (Pv)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Formule parasitaire	<i>Pf+Pow</i>	<i>Pf+Pm+Poc</i>	<i>Pm</i>	<i>Pf+Pm</i>	<i>Pf</i>	<i>Pf+Pm</i>	<i>Pf+Pm</i>	<i>Pm</i>	<i>Pm</i>	<i>Pf</i>

5. 3. Prévalence et fréquence moléculaire des espèces plasmodiales :

Le tableau (XII) indique que *P. falciparum* était l'espèce dominante.

Aussi l'infection à *Plasmodium malariae* était plus prévalente chez les participants asymptomatiques.

Tableau XII : Prévalence moléculaire des espèces de *Plasmodium* chez les Symptomatiques et asymptomatiques sur le site de Faladjé, Mali

		<i>Pf</i>	<i>Pm</i>	<i>Po</i> <i>w</i>	<i>Pf+P</i> <i>oc+P</i> <i>m</i>	<i>Pf+Pm</i>	<i>Pf+Pow</i>	<i>Pf+Poc</i>	Toutes les espèces
Participants symptomatiques	Prévalence	(96,84)	(2,39)	(0,1	(0,08)	(0,46)	(0,08)	(0)	(100)
	(%) n	1257	31	5) 2	1	6	1	0	1298
Participants asymptomatiques	Prévalence	(83,04)	(14,5	(0,3	(0)	(1,73)	(0)	(0,34)	(100)
	(%) n	240	3) 42	4) 1	0	5	0	1	289

5.4. Mise au point de la culture *ex-vivo* de *Plasmodium malariae* par cytométrie en flux :

La figure 33 montre qu'avec la supplémentation du milieu de culture avec une solution de glucose à 10 %, *P. malariae* disparaissait de la culture dans les 24 à 48 h (données non publiées). Dans les milieux de culture de *P. falciparum* dépourvus du supplément de glucose, la croissance et la viabilité de *P. malariae* ont été mesurées quotidiennement pendant trois jours, comme le montrent les figures. FL1 mesure le contenu en acides nucléiques (Sybr Green voir les boxes 1) pendant que FL4 mesure le contenu en mitochondrie déterminant la viabilité cellulaire (mitotracker voir les boxes 2) (figure 33).

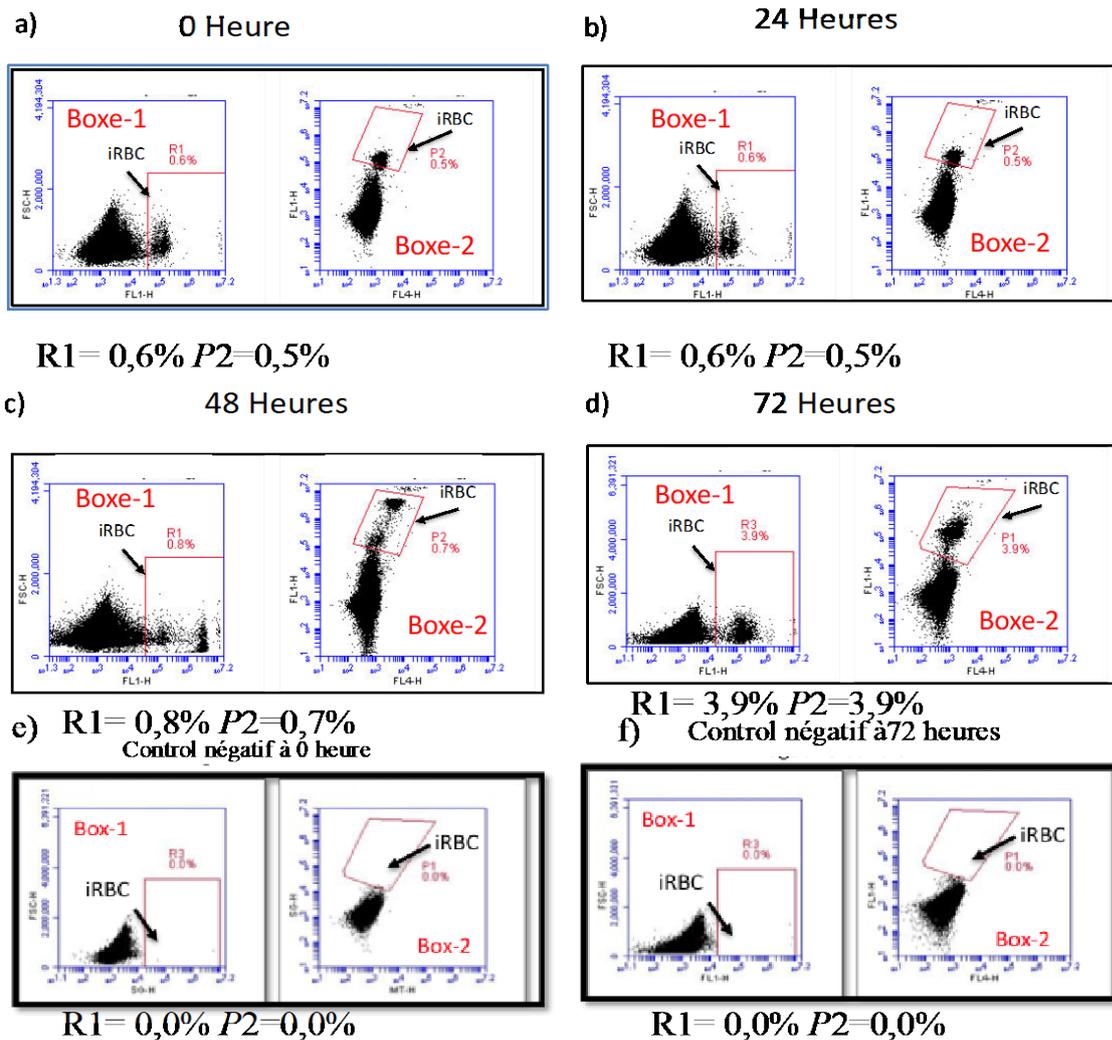


Figure 29 : Surveillance de la croissance de *P. malariae* en culture *ex-vivo* par cytométrie en flux.

$R1$ =Proportion des parasites (%), $p2$ =Proportion des parasites vivants (%).

P. malariae a pu être maintenue pendant au moins 72 heures dans nos conditions de culture *ex-vivo* au laboratoire.

Stades sanguins asexués de *P. malariae* au temps : a) zéro heure de la mise en cultures ; b) vingt-quatre heures de culture, c) quarante-huit heures de culture et d) soixante-douze heures de culture.

5.5. Adaptation à la culture *ex-vivo* d'isolats cliniques de *P. malariae*

Pour confirmer que *P. malariae* peut se développer avec succès en culture, 19 isolats de terrain ont été mis en culture et la parasitémie des parasites viables a été évaluée quotidiennement pendant trois jours.

La figure 34 montre que les parasites mis en culture complètent leur croissance après 72 heures. Nous avons observé une croissance de ces isolats cliniques *ex-vivo* avec une densité parasitaire variant environ entre 4% à 8% après 72 heures culture.

Nous notons qu'après quarante-huit heures (48h) de culture, une nette maturation du parasite était observée dans les boxes 1 et 2, car FL1 seul ou combiné avec FL4 a montré un signal parasitaire de taille plus important que celui observé dans les deux temps 0h et 24 h (Figure 33c). Ainsi, *P. malariae* a réussi à mûrir en culture *ex-vivo*. Une légère augmentation du nombre de parasites a également été observée pendant les quarante-huit heures (48 h) de culture (Figure 33c). Après soixante-douze heures (72 h), une augmentation plus importante du nombre de parasites a été observée, passant de 0,5% de parasites viables au temps 0h à 3,9% au temps 72 heures (Figure 33d). Cela correspond à une augmentation de 7,8 fois de la population parasitaire initiale au temps zéro(0h) après soixante-douze heures 72 h de culture (figure 33d).

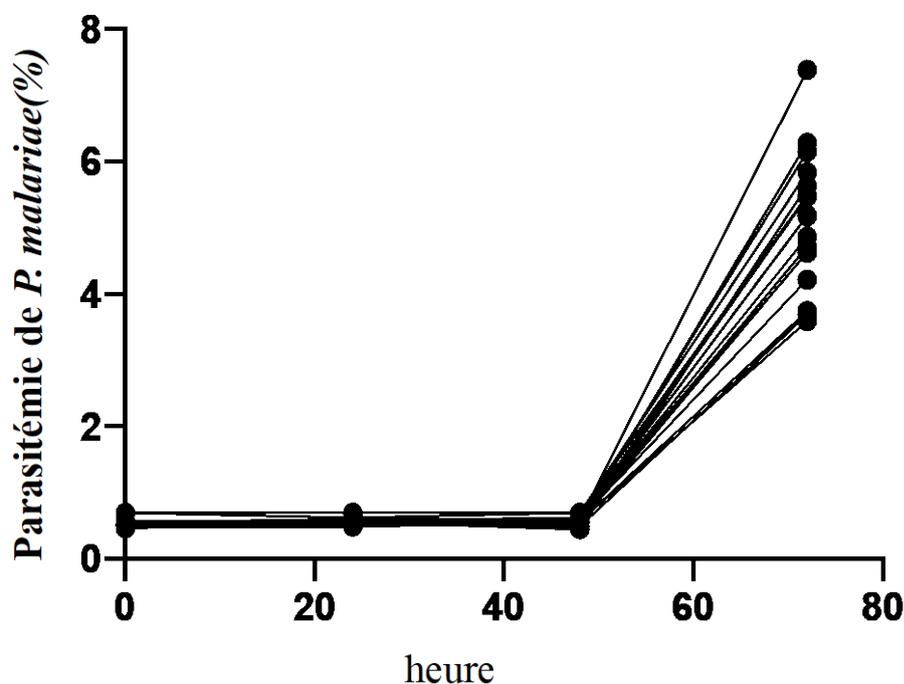


Figure 30: Développement de 19 isolats cliniques de *P. malariae* mesuré toutes les 24 heures à la cytométrie de flux pendant 72 heures

5.6. Mise au point d'une méthode *ex-vivo* d'évaluation d'antipaludiques contre les isolats cliniques de *P. malariae* :

Nous avons observé que les différentes doses d'artéméther que nous avons utilisées étaient actives contre les isolats de *P. malariae* en *ex-vivo* et à 72 heures d'exposition (figure 35).

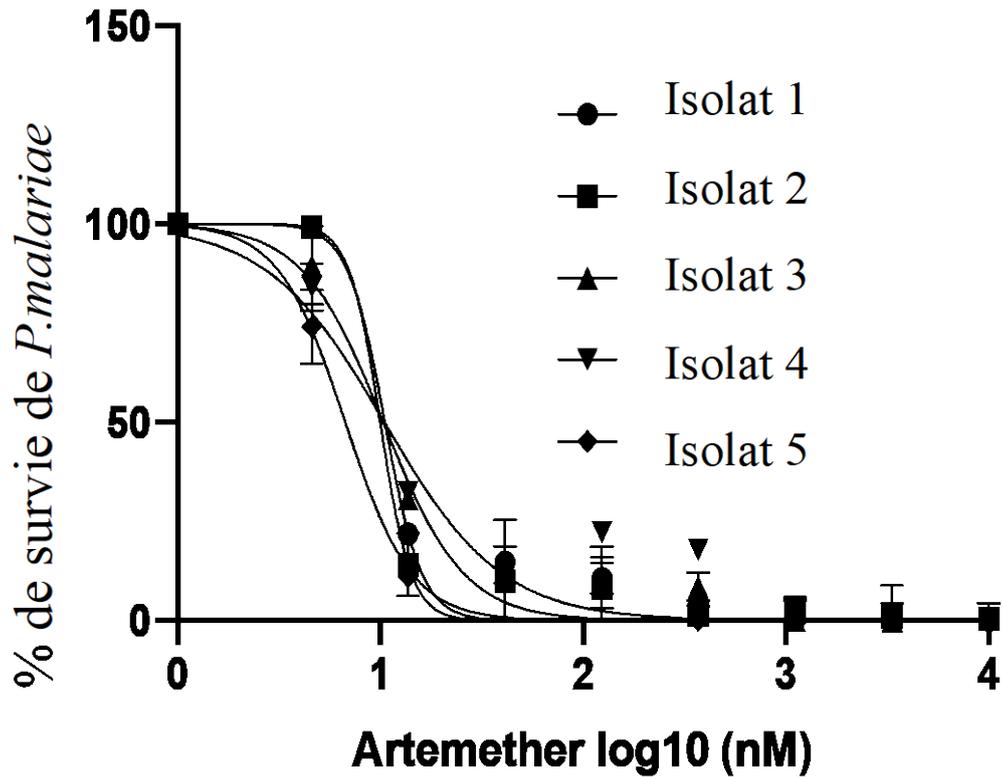


Figure 31: Sensibilité *ex-vivo* de cinq isolats de *P. malariae* aux différentes concentrations d'Artéméther

Les courbes dose-réponses de la figure 36 ci-dessus indiquent que la Luméfantrine était active contre les isolats de *P. malariae ex vivo* à 72 heures d'exposition

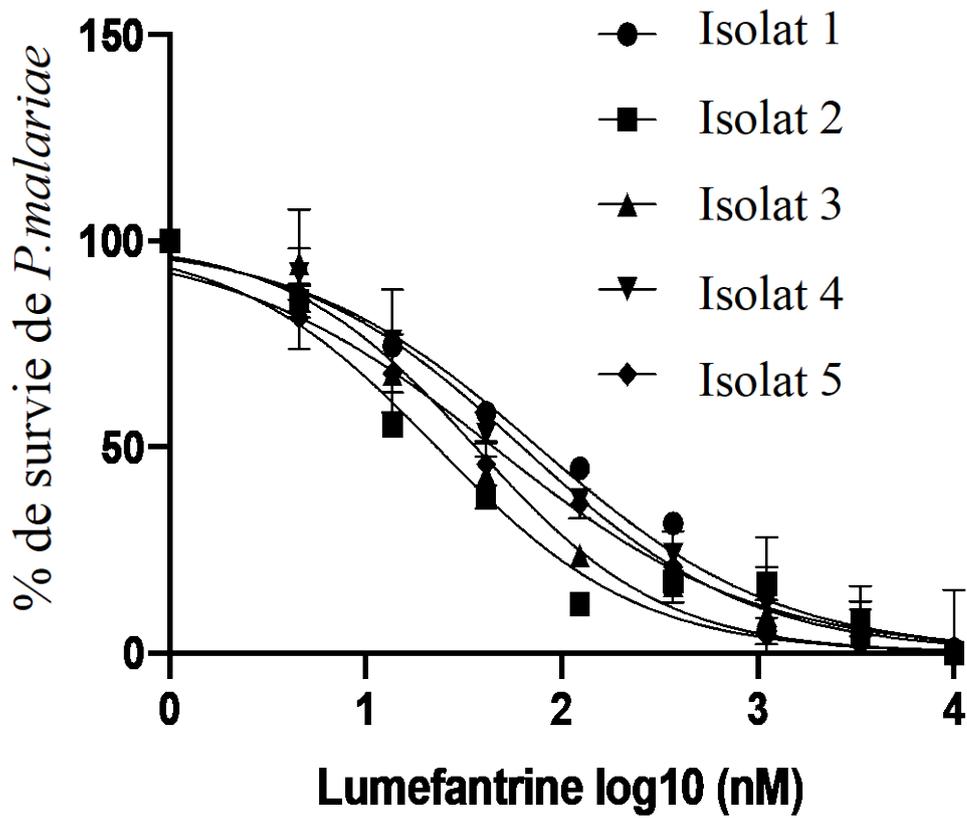


Figure 32: Sensibilité *ex-vivo* de cinq isolats de *P. malariae* aux différentes concentrations de la Luméfantrine.

L'exposition *ex-vivo* aux différentes concentrations de la Chloroquine (figure 37) montre que les isolats de *P. malariae* collectés à Faladjé étaient sensibles à cette molécule au bout de 72 heures de traitement *ex-vivo*.

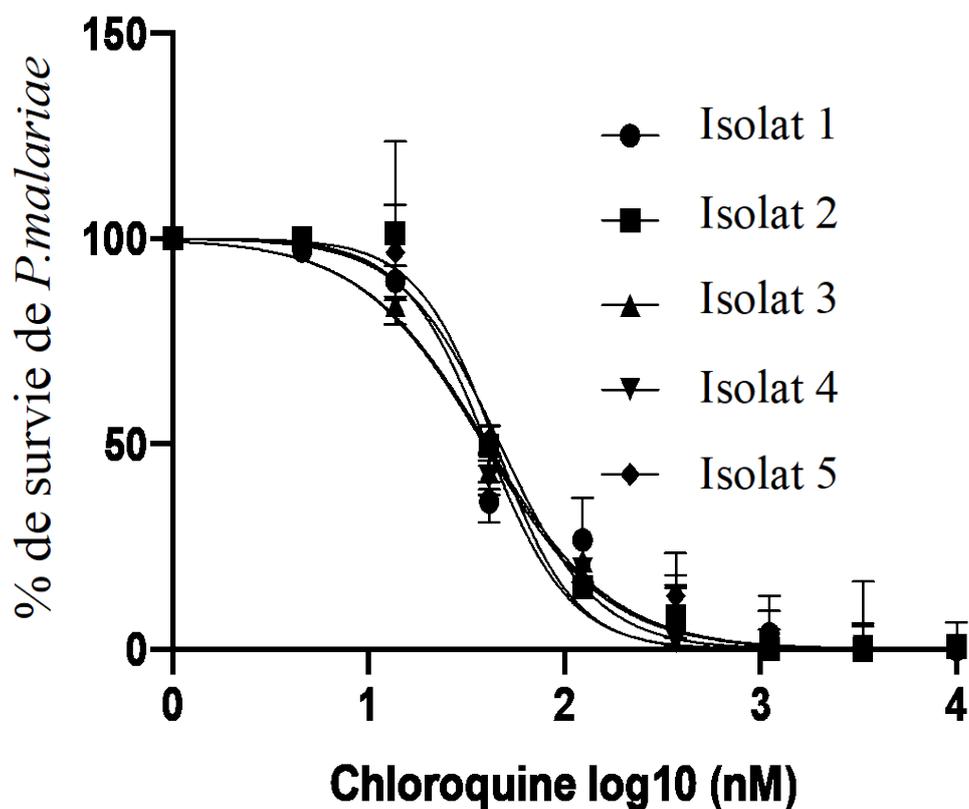


Figure 33: Sensibilité *ex-vivo* de cinq isolats de *P. malariae* aux différentes concentrations de la Chloroquine.

Nous avons observé que les différentes doses de la Quinine que nous avons utilisées étaient actives contre les isolats de *P. malariae ex-vivo* à 72 heures d'exposition (figure 38).

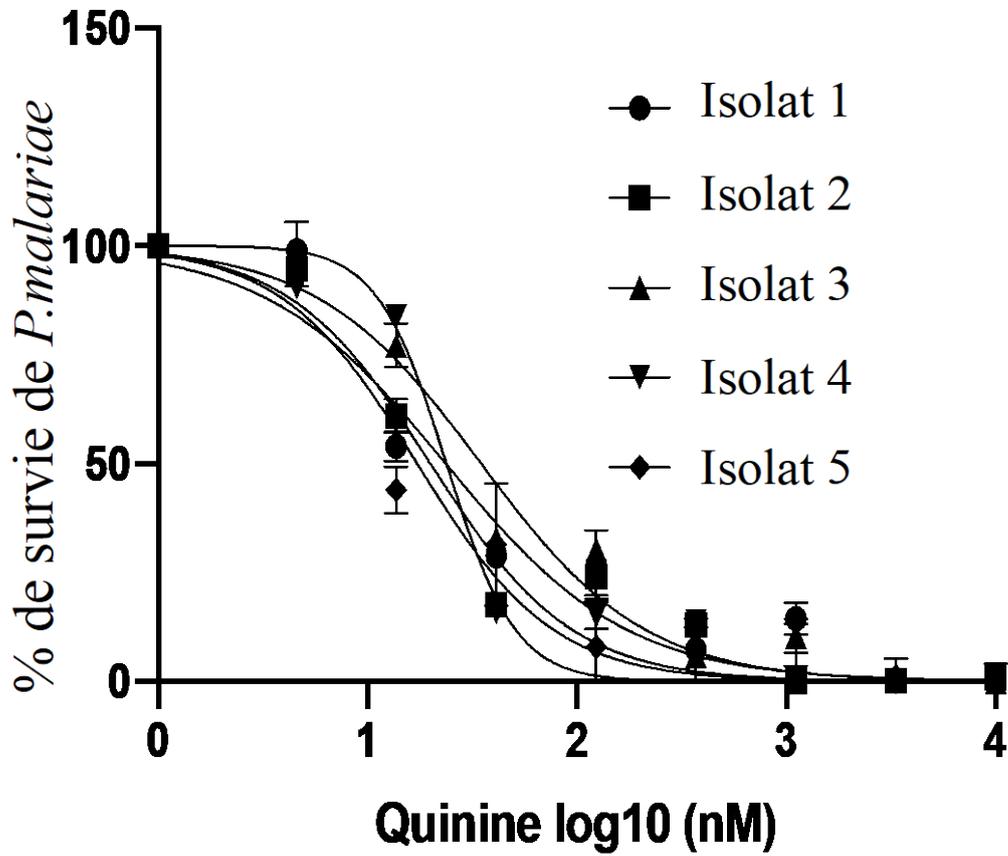


Figure 34: Sensibilité *ex-vivo* de cinq isolats de *P. malariae* aux différentes concentrations de la Quinine.

5.7. Concentrations inhibitrices 50 % (CI₅₀) des molécules testées *ex-vivo* contre les stades sanguins asexués d'isolats cliniques de *P. malariae* :

Lorsque la culture *ex-vivo* des isolats de *P. malariae* a été établie, nous avons entrepris d'évaluer son potentiel pour le criblage d'antipaludiques.

Tableau XIII : Concentrations inhibitrices 50 % (CI₅₀) des molécules testées *ex-vivo* contre les stades sanguins asexués d'isolats cliniques de *P. malariae*

Médicaments	IC ₅₀ (nM) contre <i>P. malariae</i>				
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5
Artéméther	3,51	9,971	5,31	10,46	6,71
Luméfantrine	75,7	23,03	36,32	62,84	44,89
Chloroquine	38,81	44,48	40,19	40,1	46,84
Quinine	23,6	19,95	34,83	23,78	17,24

L'artéméther était la molécule qui avait les CI₅₀ les plus faibles, suivi de la quinine, donc ils inhibaient plus efficacement *Plasmodium malariae*.

La luméfantrine et la chloroquine ont montré des CI₅₀ similaires sur les différents isolats de *P. malariae* (tableau XIII).

5.8. Comparaison de la sensibilité *ex-vivo* aux médicaments d'isolats cliniques de *P. malariae* à celle d'isolats cliniques de *P. falciparum* et de la souche de laboratoire 7G8 :

Celle d'isolats cliniques de *P. falciparum* et de la souche de laboratoire 7G8.

Une sensibilité réduite statistiquement significative des isolats de *P. malariae* à l'artéméther comparée à celle des isolats cliniques de *P. falciparum* a été observé.

L'artéméther a efficacement inhibé la souche de laboratoire 7G8 de *P. falciparum* de même que ses isolats cliniques (figure 39).

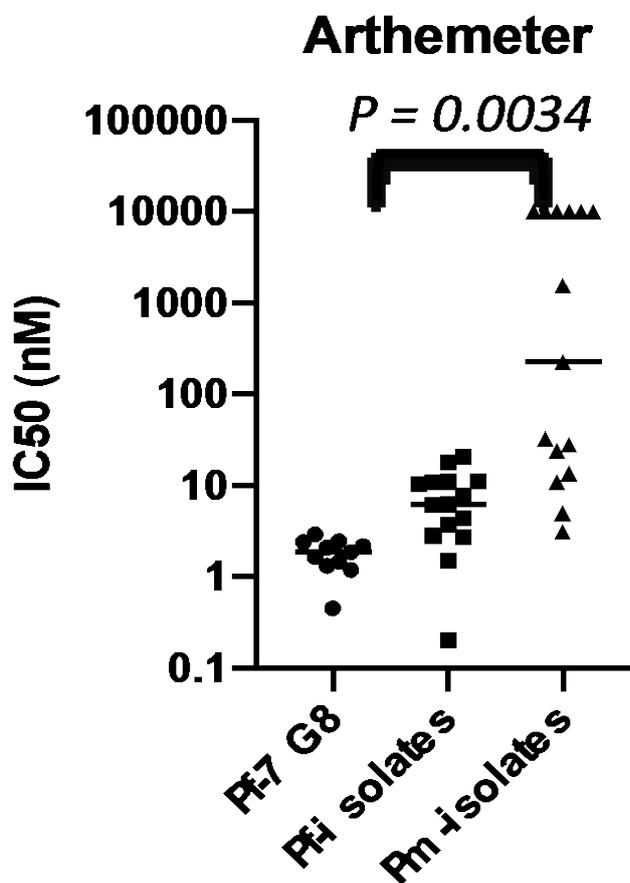


Figure 35: Comparaison de la sensibilité à l'Artéméther d'isolats cliniques de *P. malariae* à

La figure 40 montre qu'une sensibilité réduite statiquement significative des isolats de *P. malariae* à la luméfántrine comparée à celle des isolats cliniques de *P. falciparum*. Comme l'artéméther, la luméfántrine a montré le même profil d'inhibition des deux différentes espèces plasmodiales (figure 39-40).

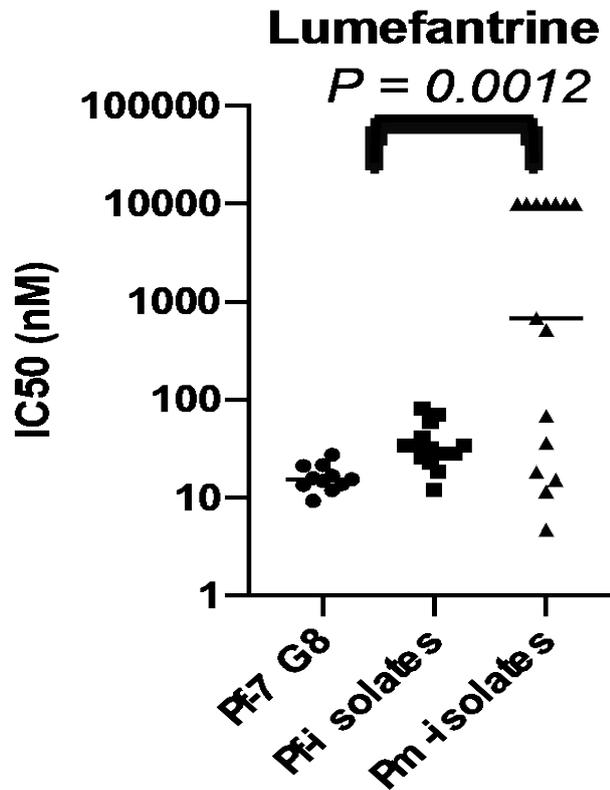


Figure 36 : Comparaison de la sensibilité à la Luméfántrine d'isolats cliniques de *P. malariae* à celle d'isolats cliniques de *P. falciparum* et de la souche de laboratoire 7G8

Nous avons observé un niveau de sensibilité comparable des isolats cliniques de *P. malariae* et ceux de *P. falciparum* à la Chloroquine. Près de la moitié des isolats cliniques de *P. malariae* et ceux de *P. falciparum* était réfracteur à l'inhibition de la chloroquine. Comme attendu, la souche de laboratoire *P. falciparum* 7G8 était aussi résistant à la Chloroquine dans notre essai (figure 41).

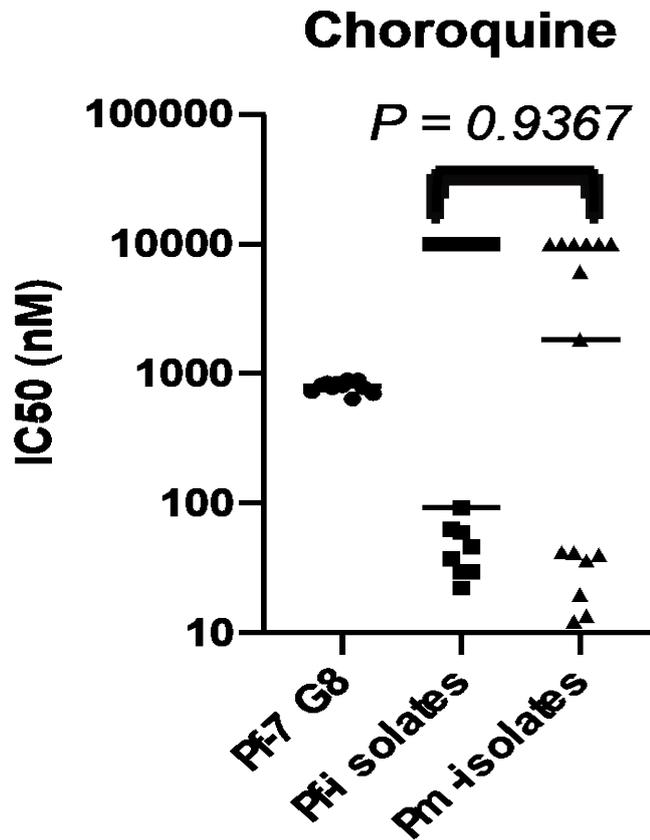


Figure 37 : Comparaison de la sensibilité à la chloroquine d'isolats cliniques de *P. malariae* à celle d'isolats cliniques de *P. falciparum* et de la souche de laboratoire 7G8

5.9. Évaluation *ex-vivo* de la sensibilité de *P. malariae* et *P. falciparum* aux molécules antipaludiques en développement clinique :

La figure 43 montre qu'un niveau de sensibilité comparable des isolats cliniques de *P. malariae* et ceux de *P. falciparum* à la molécule KDU691 a été observée.

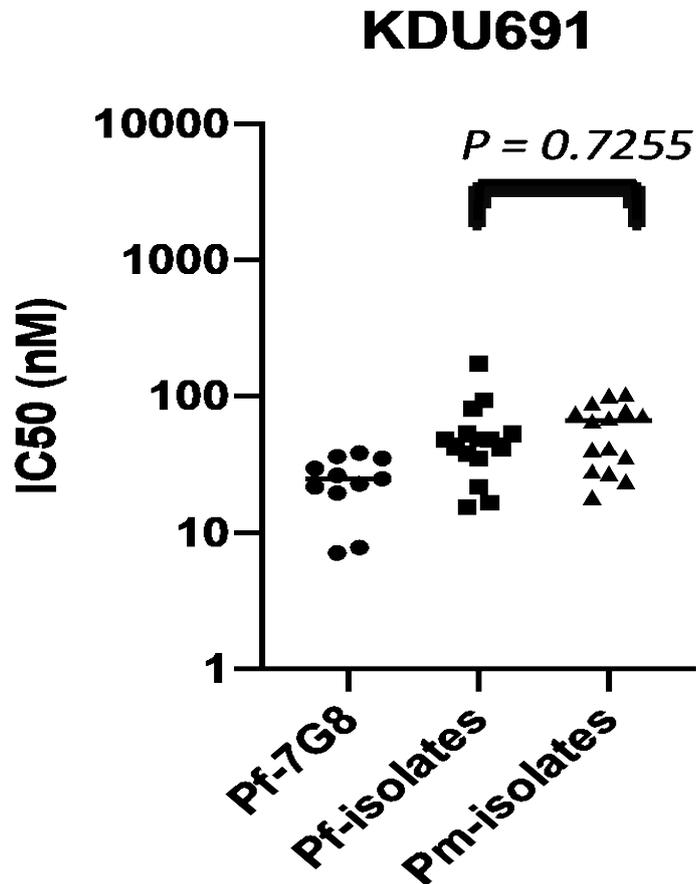


Figure 39: Comparaison de la sensibilité au médicament candidat KDU691 d'isolats de *P. malariae* et de *P. falciparum* collectés sur le terrain à celle de la souche 7G8

Nous avons observé une sensibilité comparable des isolats cliniques de *P. malariae* et ceux de *P. falciparum* au médicament candidat antipaludique GNF179 (figure 44).

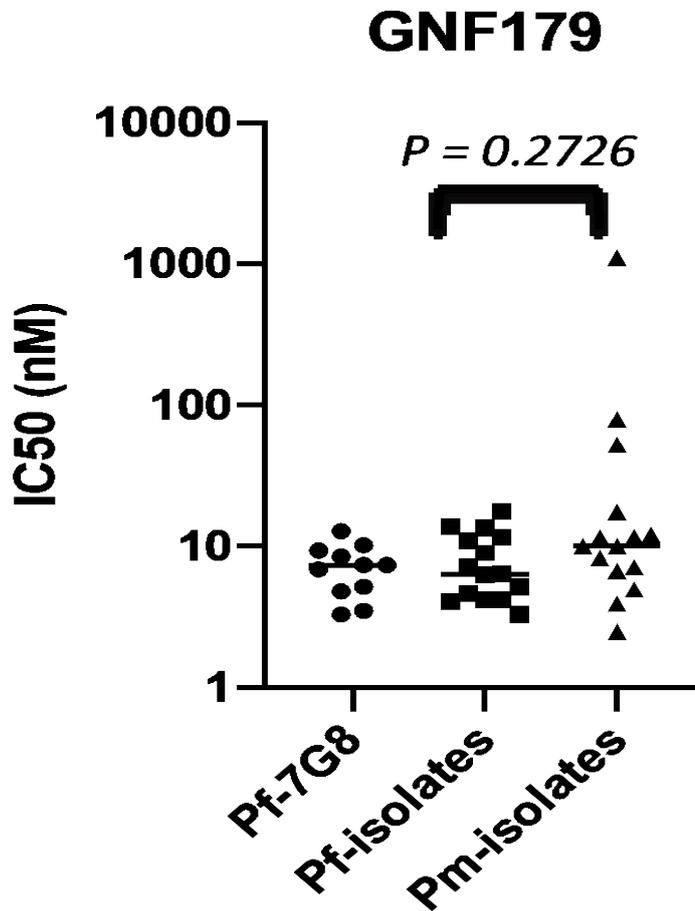


Tableau XIV : IC₅₀ des médicaments de références d'isolats cliniques de *P. malariae* à celle d'isolats cliniques de *P. falciparum* et de la souche de laboratoire 7G8. X = répliquât non testé

Test standard du cycle de vie des médicaments pour tous les isolats												
<i>Pf</i> -7G8 à 48 heures					Isolat <i>Pf</i> à 48 heures assai				Isolat <i>Pm</i> à 72 heures assai			
Médicaments	Art	Lum	CQ	P Q	Art	Lum	CQ	PQ	Art	Lum	CQ	PQ
IC ₅₀ (nM)	1,194	15,937	639,2		6,21	26,179	37,21	28,581	5,019	18,41	19,87	37,204
IC ₅₀ (nM)	0,4524	13,573	814,1		20,7	31,941	10000	35,719	10000	10000	42,1	31,008
IC ₅₀ (nM)	2,9356	21,139	786,5		2,831	11,927	46,09	33,051	11,04	520,7	13,62 8	34,629
IC ₅₀ (nM)	1,328	9,318	894,4		0,2031	28,179	59,52	36,816	10000	11,56	1000 0	32,51
IC ₅₀ (nM)	2,481	15,478 1	897		17,93	41,583	63,16	41,48	1552	4,758	12,26 1	29,47
IC ₅₀ (nM)	2,1	27,434	698,93		10,9	33,916	92,04	29,11	227,5	10000	1836	31,73
IC ₅₀ (nM)	1,47	13,8	840,1		10,98	28,361	10000	33,85	28,05	10000	6141	19,94
IC ₅₀ (nM)	2,4	11,93	846,5		10,39	71,473	10000	27,63	10000	15,361	1000 0	27,77
IC ₅₀ (nM)	2,17	14,94	810,02		6,11	22,614	10000	39,26	10000	10000	1000 0	24,71
IC ₅₀ (nM)	1,65	21,64	727,11		11,1	82,04	10000	31,55	10000	10000	1000 0	28,41
IC ₅₀ (nM)	1,88	16,93	779,16		7,82	28,102	10000	53,37	24,16	681,30 3	1000 0	36,32
IC ₅₀ (nM)	x	x	x		4,4	59,39	10000	42,13	13,74	10000	1000 0	18,48
IC ₅₀ (nM)	x	x	x		2,74	33,974	29,418	27,62	3,161	10000	41,91 5	x
IC ₅₀ (nM)	x	x	x		1,502	18,351	22,18		10000	69,371	36,30 7	x
IC ₅₀ (nM)	x	x	x		3,75	33,974	29,418		32,619	36,391	40,10 6	x
Médiane	1,88	15,471	810,02		6,21	31,941	92,04	33,85	227,5	681,30 3	1836	30,239
Moyenne	1,8237 2727	16,555 6364	793,91 0909		7,8377 4	36,800 2667	4691,93 573	35,397 4615	4126,4 8593	4757,1 9027	4545, 546	29,348 4167

Tableau XV : C₅₀ des molécules antiplasmodiales en développement clinique d'isolats cliniques de *P. malariae* à celle d'isolats cliniques de *P. falciparum* et de la souche de laboratoire 7G8. X = répliquât non testé

Test standard du cycle de vie des médicaments pour tous les isolats						
Médicaments	<i>Pf</i> -7G8 à 48 heures		Isolat- <i>Pf</i> à 48 heures		Isolat- <i>Pm</i> à 72 heures	
	GNF 179	KDU 691	GNF 179	KDU 691	GNF 179	KDU 691
IC ₅₀ (nM)	8,478	35,17	3,308	15,46	17,6	28,6
IC ₅₀ (nM)	6,899	36,06	4,6406	37,85	12,16	75,32
IC ₅₀ (nM)	3,51	38,59	4,217	35,2	4,961	18,2615
IC ₅₀ (nM)	3,308	7,083	10,89	41,057	10,038	102,04
IC ₅₀ (nM)	3,308	7,803	7,18	48,08	6,7	72,91
IC ₅₀ (nM)	10,16	26,38	13,88	53,49	7,14	89,42
IC ₅₀ (nM)	5,19	29,71	13,51	172,6	2,48	23,98
IC ₅₀ (nM)	7,39	24,91	17,7	93,93	79,3	66,56
IC ₅₀ (nM)	4,82	19,64	11,63	48,26	11,09	69,53
IC ₅₀ (nM)	9,39	22,84	4,06	81,09	11,74	78,58
IC ₅₀ (nM)	7,38	21,63	9,01	53,72	52,61	104,06
IC ₅₀ (nM)	x	x	6,35	42,05	8,3	41,93
IC ₅₀ (nM)	x	x	5,196	16,501	11,603	36,18
IC ₅₀ (nM)	x	x	4,195	48,015	3,931	41,035
IC ₅₀ (nM)	x	x	6,37	21,59	10,047	27,301
Médiane	6,899	24,91	6,37	48,015	10,047	66,56
Moyenne	6,34845455	24,5287273	8,14244	53,9262	16,6466667	58,3805

6. DISCUSSION :

L'élimination du paludisme implique diverses approches parmi lesquelles les traitements avec les médicaments anti paludiques. Cependant, ces médicaments sont identifiés de nos jours à travers un criblage intensif contre seulement l'espèce *P. falciparum*. Ces médicaments développés contre le paludisme à *P. falciparum* pourraient ne pas être efficaces contre les autres espèces de *Plasmodium*. Ces espèces autres que *P. falciparum* comme *P. malariae* ne sont pas adaptées à la culture continue permettant le criblage et l'identification de nouveaux médicaments. Nous avons mené une étude longitudinale impliquant des passages transversaux de dépistage de toutes les espèces de *Plasmodium* causant le paludisme chez l'Homme à Faladjé au Mali. Nous avons choisi des saisons de faible transmission, lorsque les cas de paludisme pouvaient encore être détectés (de Janvier à Mars et d'Octobre à Décembre), non seulement pour inclure les participants à cette étude, mais aussi pour minimiser la détection des infections mixtes avec des espèces de *P. falciparum*.

Dans cette étude, nous avons utilisés des isolats cliniques détectés à la microscopie et confirmés par la PCR.

Nous avons développé une méthode de culture *ex-vivo* des formes asexuées qui nous a permis de tester l'efficacité *ex-vivo* des médicaments à activité antiplasmodiales contre *P. malariae*. *P. falciparum* est historiquement et principalement l'espèce la plus mortelle et dominante en Afrique sub-saharienne, par conséquent les stratégies d'élimination ainsi que les programmes importants de recherche biomédicale ciblent particulièrement cette espèce. *P. falciparum* a l'avantage d'être adapté à la culture continue de ses formes asexuées permettant le criblage de nouveaux médicaments. Cependant, les outils actuels de surveillance et de diagnostic dans la plupart des pays d'Afrique subsaharienne ne sont pas conçus pour identifier et signaler avec précision les infections des autres espèces de *Plasmodium* telle que *P. malariae*(110). Ceci entraîne une insuffisance de données épidémiologiques et de la sensibilité de ces autres espèces aux médicaments antipaludiques.

Au total 4170 volontaires ont été enrôlés dont 2145 volontaires présentant des symptômes du paludisme et 2025 volontaires sans symptômes du paludisme. Cette taille d'échantillon est raisonnable de nos jours comparée aux études antérieures et revues bibliographiques effectuées sur *P. malariae* (111).

Le nombre de cas de l'infection symptomatique était supérieur au nombre de cas de l'infection asymptomatique au cours de cette étude. Les infections symptomatiques étaient plus prévalente pendant la saison des pluies allant de mai à novembre. Nous avons observé une augmentation

fulgurante des cas symptomatiques entre les mois d'octobre et novembre, avec un pic au mois de novembre. Elle a été suivie d'une diminution progressive des cas symptomatiques du mois de décembre au mois de février. Cependant, les infections asymptomatiques étaient plus abondantes pendant la saison sèche allant de décembre à avril. Nous avons noté une importante augmentation des cas asymptomatiques du mois d'octobre au mois de mars, avec un pic en mars. Ces résultats démontrent la variation saisonnière des cas de paludisme symptomatique et asymptomatique à Faladjé. Ils s'expliqueraient par la forte intensité de transmission du paludisme pendant la saison des pluies caractérisée par des parasitémies élevées et de signes cliniques. Tandis que la saison sèche serait caractérisée par des faibles parasitémies et l'absence de signes cliniques. Ces résultats concordent avec ceux de plusieurs essais cliniques qui ont montré que les parasitémies récurrentes étaient significativement plus importante pendant la saison des pluies comparées à la saison sèche du fait de la forte intensité de transmission du paludisme pendant la saison pluvieuse (112)(113). Sur le plan morphologique, les stades annulaires de *Plasmodium* sont similaires et difficiles à distinguer pour toutes les espèces, tandis que les trophozoïtes et les formes matures peuvent être utilisés pour discriminer les espèces de *Plasmodium*. Les trophozoïtes de *P. falciparum* sont légèrement plus petits que ceux des autres espèces. La présence de quelques stades matures ainsi que d'un plus grand nombre de formes trophozoïtes et l'absence d'érythrocytes multiples infectés sont très suggestives des espèces autres que *falciparum*(15).

En Avril et Mai, les cas de paludisme sont difficiles à détecter, tandis que la période de juin à septembre correspond à la saison de forte transmission du paludisme à *P. falciparum*(114). Au moment que l'on pensait que *P. falciparum* représentait principalement tous les cas de paludisme, *P. malariae* est détecté dans plusieurs pays à travers des cas d'études. Cependant, les données épidémiologiques sur l'importance de *P. malariae* font défaut, comme cela a déjà été signalé pour *P. vivax* en Afrique subsaharienne(115).

La prévalence moléculaire de *Plasmodium falciparum* était supérieure à celle des trois autres espèces *Plasmodiales*. La prévalence moléculaire de *Plasmodium malariae* était élevée que celle de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* chez les participants symptomatiques et asymptomatiques. La prévalence de l'infection symptomatique à *Plasmodium falciparum* était largement supérieure que celle de l'infection asymptomatique de la même espèce. Tandis que, la fréquence de l'infection asymptomatique à *Plasmodium malariae* était plus élevée que celle de l'infection symptomatique de la même espèce. L'ensemble des infections mixtes était associé à *Plasmodium falciparum* chez les volontaires symptomatiques et asymptomatiques. Ces résultats seraient dus au fait que, *Plasmodium*

falciparum est l'espèce la plus répandue et la plus morbide en Afrique au Sud du Sahara. Dans la répartition des espèces plasmodiales, l'espèce *Plasmodium falciparum* est suivie du *Plasmodium malariae* caractérisé par une faible parasitémie, incidence de sa morbidité et la rareté des cas sévères associés à cette espèce. Ces résultats de la répartition des mono infections et des infections mixtes plasmodiales corroborent ceux des études conduites au Sénégal et en Ouganda(47)(46).

Contrairement, une étude menée en Mauritanie dans la ville de Kaédi par Ousmane Ba *et al*, en 2019, a trouvé que les infections à *P. malariae* étaient plus fréquentes 2/4671 (0,04%) pendant la saison pluvieuse(116) .

Comme *P. falciparum*, les infections à *P. malariae* étaient associées à un paludisme clinique symptomatique. Cette Prévalence élevée des infections à *P. malariae* chez les patients asymptomatique, pourrait entraîner une infection chronique de longue durée si elle n'est pas traitée. Ces infections non traitées de *P. malariae* peuvent également évoluer vers une splénomégalie palustre hyper réactive et vers une complication potentiellement mortelle telle que le paludisme grave, et peuvent entraîner des décès(117). En plus de l'impact clinique négatif, les infections à *P. malariae* peuvent avoir un impact socio-économique négatif important. Ainsi, *P. malariae* est très fréquent en Afrique subsaharienne (118) et nécessite d'urgence des outils de traitement et d'élimination appropriés.

Après une détection précise de toutes les espèces de *Plasmodium* à partir d'échantillons collectés sur le terrain, nous avons pu identifier les conditions de culture permettant de maintenir les isolats de terrain de *P. malariae* en culture pendant 72 heures.

P. malariae disparaissaient de la culture dans les 24 à 48 h. Nous avons observé que le retrait du supplément de glucose dans le milieu de culture contribuait à mieux maintenir en culture les isolats cliniques de *P. malariae* contrairement au milieu de culture de *P. falciparum* qui nécessite l'ajout de glucose supplémentaire. Cette condition de culture nous a également permis d'observer le développement de *P. malariae* et l'augmentation de sa parasitémie.

La croissance *ex-vivo* de *P. malariae* a été suivies par cytométrie en flux combinant les marquages d'ADN nucléaire et d'ADN mitochondriale afin de déterminer la parasitémie et la viabilité de tous les parasites(119)(120).Le Sybr Green mesure tous les parasites (morts + vivants) alors que le mitotracker rouge profond ne mesure que les parasites vivants. L'examen au microscope de lames de frottis sanguins minces colorées au Giemsa reste l'approche de référence utilisée pour la détection, la quantification, et la spéciation des stades sanguins du *Plasmodium*(121). Toutefois, cette technique repose sur les compétences des microscopistes qui doivent être bien formés pour évaluer correctement la parasitémie et aussi pour identifier

avec précision les différentes espèces et stades de parasites. Il s'agit également d'une approche longue et très fastidieuse, souvent entachée d'erreurs humaines. Plusieurs rapports ont indiqué une forte concordance entre la cytométrie de flux et la microscopie pour déterminer la parasitémie et la croissance du *Plasmodium*(122)(123). Ainsi, avec la capacité de la cytométrie de flux à résoudre les biais microscopiques et les difficultés à évaluer avec précision et la croissance des parasites du paludisme, font que cette technique est l'approche privilégiée(122)(124). En 24 heures de culture de *P. malariae*, aucune croissance n'a été observée. En accord avec le cycle de vie asexué de soixante-douze heures (72 h) de *P. malariae*(15), une augmentation substantielle de la parasitémie a été observée après soixante-douze heures (72 h) de culture. Les études précédentes indiquent que *P. malariae* peut produire de 6 à 14 mérozoïtes par schizonte, mais le nombre moyen est de 8 à 14 (15). Nous notons que la parasitémie de *P. malariae* a été multipliée par huit dans notre étude, ce qui indique que la moyenne des mérozoïtes était de 8 par schizonte. Ceci signifie que le taux de croissance de *P. malariae* observé dans notre étude se situait dans la fourchette prévue rapportée dans les précédentes études.

Les nouveaux médicaments antipaludiques sont principalement identifiés et développés après des tests approfondis contre *P. falciparum*, qui est la seule espèce adaptée à la culture continue *in vitro* des stades asexués. Des études récentes de culture *ex-vivo* ont permis de révéler en partie le profil de sensibilité de *P. vivax*(41)(125) et *P. knowlesi*(126) aux médicaments antipaludiques. Les études de sensibilité des parasites aux médicaments sont très importantes pour guider l'optimisation de la découverte d'un médicament qui serait capable d'inhiber toutes les espèces de *Plasmodium*. Le profil de sensibilité aux médicaments de *P. malariae* n'est pas disponible car cette espèce n'avait encore pas été adaptée à la culture *ex-vivo* et/ou *in vitro* permettant le dépistage des médicaments. Après avoir établi les conditions de culture *ex-vivo* de *P. malariae*, nous avons entrepris d'évaluer le potentiel de la méthode de culture pour le dépistage d'antipaludique ciblant *P. malariae*.

Nous avons constaté que les différents isolats obtenus à partir de nos différents patients présentaient une sensibilité différentielle à l'Artéméther (CI₅₀ allant de 3,51 nM à 10,46 nM), à la Luméfantrine (CI₅₀ : 23,03 nM à 75,7 nM), à la Chloroquine (CI₅₀ : 38,81 à 46,84 nM) et à la Quinine (CI₅₀ : 17,24 nM à 34,83 nM).

Les courbes doses réponses des médicaments de même que les valeurs des CI₅₀ obtenues avec notre méthode pour l'artéméther, la luméfantrine, la chloroquine et la quinine étaient comparable(127) à celles reportées pour *P. falciparum*(128)(129). Toutefois, des rapports d'études précédentes ont indiqué des échecs de traitement contre *P. malariae* avec les

médicaments actuels découverts contre *P. falciparum*(46)(130)(131). Ces différences pourraient être dues à des facteurs tels que les effets pharmacocinétiques et pharmacodynamiques liés à l'hôte, qui sont absents *ex-vivo*.

Le test *ex-vivo* de niveau de sensibilité nous a montré :

- Une réduction de la sensibilité statistiquement significative ($p=0,0034$ et $p=0,0012$) respectivement pour l'artéméther et la luméfantine d'isolats cliniques de *Plasmodium malariae* comparée aux d'isolats clinique de *Plasmodium falciparum*,
- Une sensibilité comparable à la chloroquine ($p=0,9367$),
- Une bonne sensibilité aussi bien des isolats cliniques de *Plasmodium malariae* et ceux de *Plasmodium falciparum* à la pipéraquline a été observée.

Les molécules antiplasmodiales en développement clinique qui comprenaient l'inhibiteur spécifique du *Plasmodium* phosphatidylinositol-4-OH kinase (PI4K) KDU691 et l'imidazolopipérazine (IPZ) GNF179 ont pu inhiber efficacement les isolats cliniques de *P. malariae*.

La molécule KDU691 a efficacement inhibé la souche de laboratoire 7G8 de *P. falciparum*, et les isolats cliniques de terrain à la fois *P. malariae* et *P. falciparum* avec des CI_{50} en dessous de 100 nanomolaires.

Ainsi, la sensibilité de *P. malariae* est similaire à celle de *P. falciparum* quand ils sont exposés aux traitements KDU691 et GNF179 respectivement ($p = 0,7255$) et ($p = 0,2726$).

Nos résultats sur l'effet d'inhibition de ces deux molécules avec *Plasmodium falciparum* sont similaires à ceux rapporté par Lamonte et al en 2020 (132).

En plus nous avons montré l'efficacité d'inhibition de ces deux molécules sur *P. malariae*.

Cette observation fait partie des nouvelles dans la littérature et permettra de renforcer la lutte contre les différentes espèces de *Plasmodium malariae* (133).

7. CONCLUSION :

La présente étude a permis d'établir des conditions optimales de culture *ex-vivo* des isolats cliniques de *P. malariae* permettant le criblage des molécules antipaludiques. La sensibilité *ex-vivo* d'isolats cliniques de *P. malariae* et *P. falciparum* aux deux médicaments candidats antipaludiques indique qu'ils seraient prometteurs et pourraient servir d'alternatives en cas de résistance avérée aux médicaments antipaludiques couramment utilisés.

8. RECOMMANDATIONS :

Bailleurs :

Soutenir les recherches sur les espèces non *falciparum* surtout *Plasmodium malariae*.

Aux chercheurs

- Mener d'autres études sur *P. malariae* pour mieux comprendre sa biologie et l'épidémiologie du paludisme causé par cette espèce,
- Établir des conditions de culture continue des stades asexués au laboratoire,
- Continuer le criblage des molécules antipaludiques afin de découvrir des médicaments plus efficaces contre le *P. malariae*.

Aux autorités sanitaires et administratives

- Soutenir et promouvoir la recherche pour faciliter les études qui pourront aboutir au développement de médicaments efficaces contre *P. malariae*.
- Prendre en compte les résultats des recherches, les élargir afin de mettre à jour les stratégies de lutte contre le paludisme.

9. REFERENCES :

1. Carme B et al. Indices plasmodiques et charges parasitaires chez des donneurs de sang à Brazaville CONGO. *Ann Soc Belge Med Trop.* 1994;(73):179–87.
2. World Health Organization. *World Malaria Report.* Vol. WHO/HTM/GM, World Health. 2010. 238 p.
3. Faye FBK, Spiegel A, Tall A, Sokhna C, Fontenille D, Rogier C, et al. Diagnostic Criteria and Risk Factors for Plasmodium ovale Malaria . *J Infect Dis.* 2002;186(5):690–5.
4. Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. Plasmodium malariae and Plasmodium ovale - the “bashful” malaria parasites. *Trends Parasitol.* 2007;23(6):278–83.
5. Strydom KA, Ismail F, Freaun J. Plasmodium ovale: A case of not-so-benign tertian malaria. *Malar J [Internet].* 2014;13(1):1–5. Available from: *Malaria Journal*
6. Trager, W. & Jensen JB. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *J Natl Med Assoc.* 1976;68(6):530–3.
7. Talapko J, Škrlec I, Alebi T, Juki M, Aleksandar V. *Malaria : The Past and the Present.* 2019;1–15.
8. Gissot M. Etude de la régulation transcriptionnelle des gènes lors du cycle érythrocytaire de Plasmodium falciparum. *Biochimie(q-bio.BM).* Université Pierre et Marie Curie-Paris VI. 2005.
9. Comparata A, Grassi B, La R, Linceo C, Beniamino I, Nazionale A. Battista Grassi : a zoologist for malaria *. *2006;3(2):187–95.*
10. Alano P. Plasmodium falciparum gametocytes. *2017;51–69.*
11. Malaria L. La Malaria, ossia la mal’aria: brevi note di una “storia sociale e popolare.” *2005;265–70.*
12. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M, Asia S. Biology of f Human Malaria Plasmodia Including Plasmodium Knowlesi. *Mediterr Jounal Hemotology Infect Dis.* 2012;4(1).
13. Grande R, Antinori S, Meroni L, Menegon M, Severini C. A case of Plasmodium malariae recurrence: Recrudescence or reinfection? *Malar J [Internet].* 2019;18(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2806-y>
14. Dobson M J. The malariology centenary. *Parassitologia.* 1999;41(1-3):21–32.
15. Collins WE, Jeffery GM. Plasmodium malariae : Parasite and Disease. *2007;20(4):579–92.*

16. D. WEINMAN RM. Infectious blood diseases of man and animals, volume II, academic press,. 1968. 576 p.
17. Gunalan K, Niangaly A, Thera MA, Doumbo OK, Miller LH. Plasmodium vivax Infections of Duffy-Negative Erythrocytes: Historically Undetected or a Recent Adaptation? Trends Parasitol [Internet]. 2018;34(5):420–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.02.006>
18. Tachibana M, Tsuboi T, Kaneko O, Khuntirat B, Torii M. Two types of Plasmodium ovale defined by SSU rRNA have distinct sequences for ookinete surface proteins. Mol Biochem Parasitol. 2002;122(2):223–6.
19. Win TT, Jalloh A, Tantular IS, Tsuboi T. Herzensfluss-Institut - Lebensberatung Partnerschaftsheilung-Wirbelsäulenbegradigung. 2004;10(7):1235–40. Available from: <http://www.herzensfluss-institut.de/institut.html>
20. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite plasmodium ovale occur globally. J Infect Dis. 2010;201(10):1544–50.
21. Taylor T ATM. Hunter's Trop Med Emerg Infect Dis [Internet]. 2013;695–717.
22. Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-singh J, et al. Erratum: Anaemia in African children: Malaria or iron deficiency? (Lancet (2003) 361 (2249-50)). Lancet. 2003;362(9394):1504.
23. Frevert Uea. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. trends parasitol. 2004;20(9):417–24.
24. Mota MM et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. Science (80-). 2001;991(5501):141–4.
25. M Gissot,Pea Refour,Boschet c, Coupé S, Mazier D VC. Transcriptome of 3D7 and its gametocyte-less derivative F12 Plasmodium falciparum clones during erythrocytic development using a gene-specific microarray assigned to gene regulation, cell cycle and transcription factors. Gene. 341:267–77.
26. Rodriguez MaLH-HF H-HF de. Insect-malaria parasites interactions:the salivary gland. Insect Biochem Mol Biol. 34(7):615–24.
27. Golgi C. Malarial infection. Arch Sci M. 1886;10:109–35.
28. Zaw MT L z. Two sympatric types of Plasmodium ovale and discrimination by molecular methods. J Microbiol Immunol Infect [Internet]. 2005;6–11.
29. Collins WE JG. Plasmodium ovale:Parasite and Disease. Clin Microbiol Rev. 2005;18(3):570.

30. Collins WE JG. *Plasmodium malariae*: Parasite and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(4):579–92.
31. WHO 2. Assessment of the safety of artemisinin compounds in pregnancy. Geneva. WHO/CDS/MAL ed. 2003;
32. WHO/MAL ed. WHO. Strategies d'utilisations des antipaludiques: besoins de données, traitement du paludisme non compliqué et prise en charge pendant la grossesse. 1994;72.
33. Thellier M. Diagnosis of Malaria using thick bloodsmears: definition and evaluation of a faster protocol with improved readability. *Trop Med Hyg.* 2002;96:115–24.
34. William Yavo. Comparative study of four malaria diagnostic techniques used in Ivory Coast. *Bull Soc Pathol Exot.* 2002;95:238–40.
35. Ambroise Thomas P PC et al. Le diagnostic du paludisme: actualités et perspectives. *Cah santé* ed. 1993;
36. Mason D P KF et al. A comparaison of two rapid field immunochromatographic tests to expert microscopy in the diagnosis of malaria. *Acta Trop.* 2002;82:51–9.
37. organisation mondiale de la santé. Techniques de base pour le DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE DU PALUDISME Partie I. Guide du stagiaire. 90 p.
38. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong M V, Slemenda SB, Wilkins PP, Silva AJ. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. 2006;44(3):1087–9.
39. Hollingdale MR. Is culture of the entire Plasmodium cycle, in vitro, Now a Reality? *Parasitol Today.* 1992;8(7):223.
40. Schuster FL. Cultivation of Plasmodium spp. *Society.* 2002;15(3):355–64.
41. Russell B, Suwanarusk R, Malleret B, Costa FTM, Snounou G, Kevin Baird J, et al. Human ex vivo studies on asexual Plasmodium vivax: The best way forward. *Int J Parasitol* [Internet]. 2012;42(12):1063–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.08.010>
42. Aguiar ACC, Pereira DB, Amaral NS, De Marco L, Krettli AU. Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum ex vivo susceptibility to anti-malarials and gene characterization in Rondônia, West Amazon, Brazil. *Malar J.* 2014;13(1):1–7.
43. Mascarenhas A, Chery L, Gomes E, Rathod PK, Ferreira MU, Duraisingh T. Enhanced Ex Vivo Plasmodium vivax Intraerythrocytic Enrichment and Maturation for Rapid and Sensitive Parasite Growth Assays. 2018;1–9.
44. Yman V, Wandell G, Mutemi DD, Miglar A, Asghar M, Hammar U, et al. Persistent transmission of plasmodium malariae and plasmodium ovale species in an area of

- declining plasmodium falciparum transmission in Eastern Tanzania. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(5):1–16.
45. Camargo-Ayala PA, Cubides JR, Niño CH, Camargo M, Rodríguez-Celis CA, Quiñones T, et al. High plasmodium malariae prevalence in an endemic area of the colombian amazon region. PLoS One. 2016;11(7):1–17.
 46. Betson M, Clifford S, Stanton M, Kabatereine NB, Stothard JR. Emergence of Nonfalciparum Plasmodium Infection Despite Regular Artemisinin Combination Therapy in an 18-Month Longitudinal Study of Ugandan Children and Their Mothers. J Infect Dis. 2018;217(7):1099–109.
 47. Roucher C, Rogier C, Sokhna C, Tall A, Trape JF. A 20-year longitudinal study of plasmodium ovale and plasmodium malariae prevalence and morbidity in a West African population. PLoS One. 2014;9(2):1–13.
 48. Langford S, Douglas NM, Lampah DA, Simpson JA, Kenangalem E, Sugiarto P, et al. Plasmodium malariae Infection Associated with a High Burden of Anemia: A Hospital-Based Surveillance Study. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(12):1–16.
 49. Fuehrer HP, Noedl H. Recent advances in detection of Plasmodium ovale: Implications of separation into the two species Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium ovale curtisi. J Clin Microbiol. 2014;52(2):387–91.
 50. Marti GE, Stetler-Stevenson M, Bleesing JJH, Fleisher TA. Introduction to flow cytometry. Vol. 38, Seminars in Hematology. 2001. 93–99 p.
 51. Villas BH. Flow cytometry: an overview. Cell Vis. 1998;5(1):56–61.
 52. C. BISSEYE. Thèse de doctorat, Université de Ouagadougou, Burkina Faso. 2011.
 53. Pascale Vandoolaeghe LS. Le vaccin antipaludique RTS,S/AS01 chez les enfants âgés de 5 à 17 mois au moment de la première vaccination The RTS,S/AS01 malaria vaccine in children aged 5-17 months at first vaccination. 2018;8688:1–15.
 54. Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: In-vitro and ex-vivo drug-response studies. Lancet Infect Dis. 2013;13(12):1043–9.
 55. Dardé ML, Fougère É, Buxeraud J. Les antipaludiques. Actual Pharm. 2018;57(581):27–37.
 56. JULLIEN V. Pharmacocinétique des antipaludiques : Paludisme. La Lett l'infectiologue. 2012;27(6):239–43.
 57. Debert M. Traités de chimie thérapeutique, principaux antifongiques et antiparasitaires.

- TEC DOC/éd médicales Int ed. 2000;
58. Ezzet F, Karbwang J. Population pharmacokinetics and therapeutic response of CGP 56697 (artemether + benflumetol) in malaria patients. *Br J Clin Pharmacol.* 1998;46(6):553–61.
 59. White N.J, Van Vugt M EF. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. *Clin Clin Pharmacokinetics.* 1999;37:105–25.
 60. Croft SL, Duparc S, Arbe-Barnes SJ, Craft JC, Shin CS, Fleckenstein L, et al. Review of pyronaridine anti-malarial properties and product characteristics. *Malar J.* 2012;11(Iv):1–28.
 61. RamanathanS, Karupiah S, Nair NK et al. A new and simple solid-phase extraction method for LC determination of pyronaridine in human plasma.824. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2005;824:45–50.
 62. Ayyoub A, Methaneethorn J, Ramharther M, Djimde AA, Tekete M, Duparc S, et al. Population Pharmacokinetics of Pyronaridine in Pediatric Malaria Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(3):1450–8.
 63. WHO. Directives pour le traitement du paludisme, 2^o Édition,. Genève. 2011;
 64. Andersson ÆTB, Bjo XLÆA, Gustafsson LL, Masimirembwa ÆCM. Identification of human cytochrome P 450 s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from in vitro data. 2003;429–42.
 65. Byakika-Kibwika P, Lamorde M, Mayito J, Nabukeera L, Mayanja-Kizza H, Katabira E, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous artesunate during severe malaria treatment in Ugandan adults. *Malar J.* 2012;11:1–6.
 66. Morris CA, Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Jung D, Shin CS, Fleckenstein L. Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. *Malar J.* 2011;10:1–17.
 67. Newton PN, Van Vugt M, Teja-Isavadharm P, Siriyanonda D, Rasameesoraj M, Teerapong P, et al. Comparison of oral artesunate and dihydroartemisinin antimalarial bioavailabilities in acute falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(4):1125–7.
 68. Baird JK. Tafenoquine for travelers' malaria: evidence, rationale and recommendations. *J Travel Med.* 2018;25(1):1–13.
 69. Le Bras J, Musset L CJ. Mécanisme D ' Action Des Antipaludiques Et. 2006;36(8):401–5.

70. Organisation mondiale de la santé. Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. Série de Rapports techniques, n° 529, Genève : Organisation mondiale de la santé, 1973;128.
71. Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* (80-). 1994;264(5157):388–93.
72. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial target: Permeability of antibiotics. *Science* (80-). 1994;264(April):382–8.
73. WHO/ CDS/ RBM/ 2001.35. Les combinaisons thérapeutiques antipaludiques. Rapport d'une consultation technique de l'OMS.
74. Touray MG, Warburg A, Laughinghouse A, Krettli AU, Miller LH. Developmentally Regulated Infectivity of Malaria Sporozoites for Mosquito Salivary Glands and the Vertebrate Host. *J Exp Med*. 1992;175(6):1607–12.
75. Chevallier MH. Les marqueurs moléculaires. 2013;130–7.
76. COWMAN AF KS. The *pfmdr* gene homologues of *Plasmodium falciparum*. *Acta leiden*. 1991;60(1):121–9.
77. Bray PG, Ward SA. A comparison of the phenomenology and genetics of multidrug resistance in cancer cells and quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*. 1998;77(1):1–28.
78. Bolhuis H, Van Veen HW, Poolman B, Driessen AJM, Konings WN. Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol Rev*. 1997;21(1):55–84.
79. DURAISINGH MT, DRAKRLEY CJ, MULLER O, BAYLEY R SG et al. Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *Pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology*. 1997;177:1429–33.
80. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. Vol. 344, *New England Journal of Medicine*. 2001. p. 257–63.
81. Neveu Natassia. Une complication majeure du paludisme : le neuropaludisme. AMU PHARM - Aix-Marseille Université - Faculté de pharmacie; 2017.
82. Ochong E, Broek I van den, Keus K. Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates f. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2003;69(2):184–7. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/69/2/184.short>
83. Wang P, Read M, Sims PFG, Hyde JE. Sulfadoxine resistance in the human malaria

- parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol.* 1997;23(5):979–86.
84. Hyde JE. The dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene in the drug resistance of malaria parasites. *Pharmacol Ther.* 1990;48(1):45–59.
 85. Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J. Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(23):8360–4.
 86. Zolg JW, Plitt JR, Chen GX, Palmer S. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;36(3):253–62.
 87. Cortese JF, Plowe C V. Antifolate resistance due to new and known *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutations expressed in yeast. *Mol Biochem Parasitol.* 1998;94(2):205–14.
 88. Diourte Y, Djimé A, Doumbo OK, Sagara I, Coulibaly Y, DICKO A, Diallo M, Diakite M, Cortese JF PC. Pyrimethamine-sulfadoxine efficacy and selection for mutation in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate and dihydropteroate synthetase in Mali. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(3):475–8.
 89. Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, et al. Molecular Markers for Failure of Sulfadoxine-Pyrimethamine and Chlorproguanil-Dapsone Treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria . *J Infect Dis.* 2002;185(3):380–8.
 90. Gyang FN, Peterson DS, Wellems TE. *Plasmodium falciparum*: Rapid detection of dihydrofolate reductase mutations that confer resistance to cycloguanil and pyrimethamine. *Exp Parasitol.* 1992;74(4):470–2.
 91. Peterson DS, DI santi SM, Pavoia M, Calvosa VS, DO Rosario VE W TE. Prévalence of dihydrofolate Ans-108 mutations as the basis for pyrimethamine resistance of *P. falciparum* malaria in the brasalian amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45(4):492-497.
 92. Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(8):2100–8.
 93. Schwöbel B, Alifrangis M, Salanti A, Jelinek T. Different mutation patterns of atovaquone resistance to *Plasmodium falciparum* in vitro and in vivo: Rapid detection

- of codon 268 polymorphisms in the cytochrome b as potential *in vivo* resistance marker. *Malar J*. 2003;2:1–7.
94. Savini H, Bogreau H, Bertaux L, Bouchiba H, Kraemer P, Parzy D, et al. First case of emergence of atovaquone-proguanil resistance in *Plasmodium falciparum* during treatment in a traveler in Comoros. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(6):2283–4.
95. Massamba L, Madamet M, Benoit N, Chevalier A, Fonta I, Mondain V, et al. Late clinical failure associated with cytochrome b codon 268 mutation during treatment of *falciparum* malaria with atovaquone-proguanil in traveller returning from congo. *Malar J* [Internet]. 2020;19(1):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-020-3126-y>
96. Fisher N, Majid RA, Antoine T, Al-Helal M, Warman AJ, Johnson DJ, et al. Cytochrome b mutation Y268S conferring atovaquone resistance phenotype in malaria parasite results in reduced parasite bc 1 catalytic turnover and protein expression. *J Biol Chem*. 2012;287(13):9731–41.
97. Wikstrom M, Krab K, Saraste M. Proton-translocating cytochrome complexes. *Ann Rev Biochem*. 1981;50(1):623–55.
98. Crofts A, Berry E. Structure and function of the cytochrome bc I complex of mitochondria and photosynthetic bacteria Antony R Crofts * and Edward A Berryt. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. 1998;8(4):501–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VS6-45478N7-19/1/06a826fa3732b3b5c58901e2533e185f>
99. Barragan AM, Schulten K, Solov IA. Mechanism of the Primary Charge Transfer Reaction in the Cytochrome bc 1 Complex. 2016;
100. Frédéric Arie^{1, 2, †}, Benoit Witkowski³, Chanaki Amaratunga⁴, Johann Beghain^{1, 2, †}, Anne- Claire Langlois^{1, 2}, Nimol Khim³, Saorin Kim³, Valentine Duru³, Christiane Bouchier⁵, Laurence Ma⁵, Pharath Lim^{3, 4, 6}, Rithea Leang⁶, Socheat Duong⁶, Sokunthea Sren and DM. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. 2016;1(1):23–30.
101. Adams J, Kelso R, Cooley L. The kelch repeat superfamily of proteins: Propellers of cell function. *Trends Cell Biol*. 2000;10(1):17–24.
102. White NJ, Duong TT, Uthaisin C, Nosten F. Antimalarial Activity of KAF156 in *Falciparum* and *Vivax* Malaria. 2017;375(12):1152–60.
103. WHO. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of

- uncomplicated falciparum malaria.
104. WHO. Rapport d'une consultation de l'OMS Genève, Suisse, :3–5.
 105. D P. Aspects pratiques de l'utilisation des systèmes standard OMS d'épreuve in vitro macro et micro-test de l'OMS pour la détermination de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine, la méfloquine, l'amodiaquine et la quinine. 1984;84:2–21.
 106. Uwimana A, Legrand E, Stokes BH, Ndikumana JLM, Warsame M, Umulisa N, et al. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat Med.* 2020;26(10):1602–8.
 107. Mcnamara CW, Lee MCS, Lim CS, Lim SH, Roland J, Nagle A, et al. Targeting *Plasmodium* PI (4) K to. *Nature* [Internet]. 2013;(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12782>
 108. Dembele L, A X, Chavchich M, Bonamy GMC, Selva JJ, Lim MY. The *Plasmodium* PI (4) K inhibitor KDU691 selectively inhibits parasites. 2017;(March 2016):1–9.
 109. Dembele L et al. Imidazolopiperazines kill both rings and dormant rings in wild-type and K13 artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018;62.
 110. Gunasekera WMKTDW, Premaratne RG, Weerasena OVDSJ, Premawansa WS, Handunnetti SM, Fernando SD. Utility of pf/pan RDT for diagnosis in the prevention of re-establishment of malaria in Sri Lanka. *Pathog Glob Health* [Internet]. 2018;112(7):360–7. Available from: <https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1536855>
 111. Kotepui M, Kotepui KU, Milanez GD, Masangkay FR. Global prevalence and mortality of severe *Plasmodium malariae* infection: A systematic review and meta-analysis. *Malar J* [Internet]. 2020;19(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03344-z>
 112. Bukirwa H, Yeka A, Kanya MR, Talisuna A, Banek K, Bakyaite N, et al. Artemisinin Combination Therapies for Treatment of Uncomplicated Malaria in Uganda. *PLoS Clin Trials.* 2006;1(1):e7.
 113. Sagara I, Fofana B, Gaudart J, Sidibe B, Togo A, Toure S, et al. Repeated artemisinin-based combination therapies in a malaria hyperendemic area of Mali: Efficacy, safety, and public health impact. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(1):50–6.
 114. Portugal S, Tran TM, Ongoiba A, Bathily A, Li S, Doumbo S, et al. Treatment of chronic asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection does not increase the risk of clinical malaria upon reinfection. *Clin Infect Dis.* 2017;64(5):645–53.

115. Howes RE, Jr RCR, Battle KE, Longbottom J, Mappin B, Ordanovich D, et al. *Plasmodium vivax* Transmission in Africa. 2015;1–27.
116. Ba O, Sow A, Ba H, Dahdi S, Lo B. Seasonal transmission of malaria in the senegal river valley: Case study of the city of kaedi-mauritanie. *Pan Afr Med J.* 2019;34:1–10.
117. Bisoffi Z, Leoni S, Angheben A, Beltrame A, Esemé FE, Gobbi F, et al. Chronic malaria and hyper-reactive malarial splenomegaly: A retrospective study on the largest series observed in a non-endemic country. *Malar J.* 2016;15(1):1–8.
118. Yman V et al. Persistent transmission of *plasmodium malariae* and *plasmodium ovale* species in an area of declining *plasmodium falciparum* transmission in Eastern Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;(13).
119. Dembele L, Ang X, Chavchich M, Bonamy GMC, Selva JJ, Lim MYX, et al. The *Plasmodium* PI(4)K inhibitor KDU691 selectively inhibits dihydroartemisinin-pretreated *Plasmodium falciparum* ring-stage parasites. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–10.
120. Dembele L, Gupta DK, Lim MYX, Ang X, Selva JJ, Chotivanich K, et al. Imidazolopiperazines kill both rings and dormant rings in wild-type and K13 artemisinin-resistant *plasmodium falciparum* In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(5).
121. Giemsa GEV und V meiner. Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung. *Cent für Bakteriolog.* 1904;(37):308–11.
122. Malleret B, Claser C, Ong ASM, Suwanarusk R, Sriprawat K, Howland SW, et al. A rapid and robust tri-color flow cytometry assay for monitoring malaria parasite development. *Sci Rep.* 2011;1:1–10.
123. Franz S, Frey B, Sheriff A, Gaipf US, Beer A, Voll RE, et al. Lectins Detect Changes of the glycosylation status of Plasma Membrane Constituents During Late Apoptosis. *Cytometry A.* 2006;69(1):230–9.
124. Tiendrebeogo RW, Adu B, Singh SK, Dodoo D, Dziegiel MH, Mordmüller B, et al. High-Throughput tri-colour flow cytometry technique to assess *Plasmodium falciparum* parasitaemia in bioassays. *Malar J.* 2014;13(1):1–12.
125. Lu F, Gao Q, Chotivanich K, Xia H, Cao J, Udomsangpetch R, et al. In vitro anti-malarial drug susceptibility of temperate *Plasmodium vivax* from central China. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(2):197–201.
126. van Schalkwyk DA, Blasco B, Davina Nuñez R, Liew JWK, Amir A, Lau YL, et al. *Plasmodium knowlesi* exhibits distinct in vitro drug susceptibility profiles from those

- of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* [Internet]. 2019;9(January):93–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.02.004>
127. Cheruiyot AC, Auschwitz JM, Lee PJ, Yeda RA, Okello CO, Leed SE, et al. Assessment of the Worldwide antimalarial resistance network standardized procedure for in vitro malaria drug sensitivity testing using SYBR green assay for field samples with various initial parasitemia levels. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(4):2417–24.
128. Tinto H et al. Ex vivo anti-malarial drugs sensitivity profile of *Plasmodium falciparum* field isolates from Burkina Faso five years after the national policy change. *Malar J*. 2014;207(13):1475–2875.
129. Wong RPM, Lautu D, Tavul L, Hackett SL, Siba P, Karunajeewa HA, et al. In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* to conventional and novel antimalarial drugs in Papua New Guinea. *Trop Med Int Heal*. 2010;15(3):342–9.
130. Visser BJ, Van Vugt M, Grobusch MP. Malaria: An update on current chemotherapy. *Expert Opin Pharmacother*. 2014;15(15):2219–54.
131. Rutledge GG, Marr I, Huang GKL, Auburn S, Marfurt J, Sanders M, et al. Genomic Characterization of Recrudescence *Plasmodium malariae* after Treatment with Artemether/Lumefantrine. 2017;23(8).
132. LaMonte GM, Rocamora F, Marapana DS, Gnädig NF, Otilie S, Luth MR, et al. Pan-active imidazolopiperazine antimalarials target the *Plasmodium falciparum* intracellular secretory pathway. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15440-4>
133. Dembele L, Aniweh Y, Diallo N, Sogore F, Sangare CPO, Haidara AS, et al. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium falciparum* comparative susceptibility to antimalarial drugs in Mali. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(8):2079–87.

10. ANNEXES :

Annexe 1 : Mode opératoire de l'extraction d'ADN à partir des confettis en utilisant le kit Qiagen

○ **Matériels et réactifs :**

Blouse, paire de gants, paire de ciseaux, papier hygiénique, confettis, marqueur indélébile, racks, tubes eppendorf, Becher, poubelle, pipette (100, 200, 1000), embout (100, 200, 1000), QIAamp DNA Mini Kit, hotte, plaque chauffante, Bain-marie, Vortex, thermomètre, congélateur.

○ **Mode opératoire :**

L'ADN Plasmodiale a été extrait à l'aide du kit QIAGEN (cat#51304 et 51306).

○ **L'extraction de l'ADN :**

➤ Cette extraction consiste à découper approximativement 3mm^2 de confettis imprégnés de sang, le transférer dans un microtube de 1,5ml puis ajouter 180 μl de Buffer ATL et incubé à 85°C pendant 10 minutes. Puis centrifuger brièvement.

➤Après avoir ajouté 20 μl de Protéinase K, mélanger à l'agitateur, et incubé à 56°C pendant une heure. Puis centrifuger brièvement.

➤Ajouter 200 μl de Buffer AL puis mélanger bien au vortex, et incubé à 70°C pendant 10 minutes. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du couvercle du tube.

➤Ajouter 200 μl d'éthanol (96-100%) puis bien mélanger ou agiter. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du couvercle du tube.

➤Transférer soigneusement le mélange dans une colonne QIAamp, fermer la colonne puis centrifuger à 5,9 g pendant une minute.

➤Placer la colonne dans un nouveau tube de collection, soigneusement ouvrir la colonne ajouter 500 μl de Buffer AW1, fermer la colonne puis centrifuger à 5,9 g pendant une minute.

➤ Placer la colonne dans un nouveau tube de collection, soigneusement ouvrir la colonne ajouter 500 μl de Buffer AW2, fermer la colonne puis centrifuger à 16,11 g pendant 3 minutes.

➤ Placer la colonne dans un nouveau tube de collection puis centrifuger à 16,11 g pendant une minute.

➤Placer la colonne dans un tube pré-labellisé de 1,5 ml puis ajouter 150 μl de Buffer AE, incubé à la température ambiante du labo pendant 1 minute puis centrifuger à 5,9 g pendant 1 minute. Cet éluât contient l'ADN.

➤Garder à -20°C .

Annexe 2 : Préparation des marqueurs

Deux marqueurs sont utilisés :

✓ Syber Green (SG) :

Il a la capacité de se fixer sur les acides nucléiques

- Ajoutez 2,5 µl de Syber Green 10.000X dans 497,5 µl de solution 1X HBSS pour obtenir une solution 50X de Syber Green.
- Préparer des aliquotes de 20 µl dans des tubes à centrifuger de 1,5 ml et conserver à - 20 ° C (à cette température la solution peut être conservée pendant 6 mois maximum)

✓ Préparation de la solution Mitotracker (MT) :

Colore le noyau et se fixe sur les cellules en activité.

- Ajoutez 92 µl de DMSO à un tube de MT (fourni sous forme de poudre lyophilisée à 50 µg) pour obtenir un résultat de 1 mM.
- Faire une solution de 1 mM MT.
- Conserver à -20 ° C pendant 6 mois maximum.
- Ajouter 6 µl de solution de MT 1 mM à 794 µl de solution 1X HBSS pour obtenir une solution de MT de 7,5 µM.
- Préparer des aliquotes de 20 µl dans des tubes à centrifuger de 1,5 ml.
- Conserver à -20 ° C pendant 6 mois maximum.

Fiche signalétique :

Auteur : SOGORE Fanta

Téléphone : +223 78296165

Adresse email : fantasogore2@gmail.com/fanta.sogore@icermali.org

TITRE : Etude de la prévalence de *Plasmodium malariae* et de sa susceptibilité *ex-vivo* aux molécules à activité antiplasmodiale à Faladjé, Mali.

Année de soutenance : 2020-2021

Ville de soutenance : Bamako

Pays d'origine : Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et la Faculté de pharmacie (FAPH).

Secteur d'intérêt : Parasitologie, Biologie moléculaire

Introduction :

La culture *in vitro* et *ex-vivo* de *P. falciparum* a facilité la recherche active sur le parasite du paludisme en vue de la recherche de connaissances fondamentales et de la découverte de traitements médicamenteux efficaces. Un tel programme de découverte de médicaments n'est actuellement pas facilement envisageable pour *P. malariae* simplement en raison de l'absence de système de culture *in vitro* et *ex-vivo* de ses stades sanguins asexués. Malgré l'existence de combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) efficaces contre *P. falciparum* ; *P. malariae* est de plus en plus souvent détecté dans les pays où le paludisme est endémique. Ici, nous avons optimisé et adapté les conditions *ex-vivo* dans lesquelles *P. malariae* peut être cultivé et utilisé pour le dépistage des médicaments antipaludiques. Par la suite, cela nous a permis de tester des composés tels que l'artéméther, la chloroquine, la luméfántrine et la quinine pour leur activité antipaludique *ex-vivo* contre *P. malariae*.

Méthodes :

Nous avons mené une étude prospective longitudinale visant à évaluer l'efficacité *ex-vivo* du panel d'antipaludiques contre *P. malariae*. Les composés testés comprenaient la chloroquine, la luméfántrine, l'artéméther et la quinine, tous de Sigma (Sigma-Aldrich, France). Cette étude a été menée de septembre 2018 à octobre 2019 à Faladjé, un village rural situé dans la région de Koulikoro à 80 km de Bamako. Le paludisme est hyper endémique et très saisonnier à Faladjé.

Les courbes dose-réponse et les concentrations inhibitrices à 50 % (CI50) ont été calculées par analyse de régression non linéaire à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 8, les

données ayant été préalablement normalisées par rapport aux témoins non traités. Un test statistique a été effectué à l'aide de la version 8 du logiciel GraphPad Prism et d'un test t. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

Résultats :

Nous avons inclus 4170 participants dans l'étude dont 2145 cas symptomatiques et 2025 asymptomatiques.

Les infections à *P. malariae* étaient plus Prévalente (14,53 %) dans la population asymptomatique que celles des populations symptomatiques (2,39 %).

Nous notons qu'une diminution des infections à *P. falciparum* a été observée dans la population asymptomatique (83,04 %) par rapport à celles des populations symptomatiques (96,84 %).

P. malariae a réussi à se développer en culture *ex-vivo*. Lorsque les milieux de culture étaient complétés avec 10 % de glucose, les parasites de *P. malariae* disparaissaient de la culture dans les 24 à 48 h. Lorsque la méthode de culture *ex-vivo* des isolats de *P. malariae* a été établie, nous avons entrepris d'évaluer son potentiel pour le criblage d'antipaludiques. Tous les antipaludiques (Artéméther, Luméfántrine, Chloroquine et Quinine) ont pu inhiber la plupart des isolats *P. malariae* dans un délai de 72 h d'exposition au médicament.

Lorsque la susceptibilité de *P. malariae* a été évaluée aux médicaments candidats comparée à celle de *P. falciparum*, nous avons observé une susceptibilité similaire entre les deux espèces aux traitements KDU691 et GNF179 respectivement ($p = 0,7255$) et ($p = 0,2726$).

Conclusions :

Dans cette étude, *P. malariae* s'est développé avec succès dans les conditions de culture de *P. falciparum*, en l'absence d'un supplément de 10% glucose. Cette méthode de culture a permis de cribler les médicaments antipaludiques contre les isolats cliniques de *P. malariae*. Basé sur nos données, la cytométrie en flux pourrait être une meilleure approche que la microscopie optique pour évaluer la maturation de *P. malariae*.

Mots clés : *P. malariae*, culture *ex-vivo*, médicaments candidats et de références

Data Sheet:

Author: SOGORE Fanta

Phone: +223 78296165

Email: fantasogore2@gmail.com/fanta.sogorei@icermali.org

Title: Study of the prevalence of *Plasmodium malariae* and its *ex-vivo* susceptibility to molecules with antiplasmodial activity in Faladjé, Mali.

Year of defense: 2020-2021

Defended in: Bamako

Nationality : Malian

Submitted to : Bibliothèque de la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et la Faculté de pharmacie (FAPH).

Field of interest: Parasitology, Molecular biology

Background:

In vitro and *ex-vivo* culture of *P. falciparum* has facilitated active research on the parasite for fundamental knowledge and the discovery of effective drug treatments. Such a drug discovery program is currently not readily feasible for *P. malariae* simply because of the lack of an *in vitro* and *ex-vivo* culture system for its asexual blood stages. Despite the existence of artemisinin-based combination therapies (ACTs) effective against *P. falciparum*, *P. malariae* is increasingly detected in malaria endemic countries. Here, we optimized and adapted the *ex-vivo* conditions under which *P. malariae* can be grown and used for antimalarial drug screening. Subsequently, this allowed us to test compounds such as artemether, chloroquine, lumefantrine and quinine for their *ex-vivo* antimalarial activity against *P. malariae*.

Methods:

We conducted a longitudinal prospective study to evaluate the *ex-vivo* efficacy of the antimalarial drug panel against *P. malariae*. The compounds tested included chloroquine, lumefantrine, artemether and quinine, all from Sigma (Sigma-Aldrich, France). This study was conducted from September 2018 to October 2019 in Faladjé, a rural village located in the Koulikoro region 80 km from Bamako. Malaria is hyper endemic and very seasonal in Faladjé.

Results:

We had included 4170 participants in our study of which 2145 symptomatic and 2025 non-symptomatic. *P. malariae* infections were more frequent (14.53%) in non-symptomatic population than symptomatic population (2.39%).

P. malariae infections were more prevalent (14.53%) in the asymptomatic population than in the symptomatic populations (2.39%).

We note that a decrease in *P. falciparum* infections was observed in the asymptomatic population (83.04%) compared to those in the symptomatic populations (96.84%).

P. malariae was successful in *ex-vivo* culture. When culture media were supplemented with 10% glucose, *P. malariae* parasites disappeared from the culture within 24-48 h. When the method for *ex-vivo* culture of *P. malariae* isolates was established, we set out to evaluate its potential for screening antimalarials. All antimalarials (Artemether, Lumefantrine, Chloroquine and Quinine) were able to inhibit most *P. malariae* isolates within 72 h of drug exposure.

When the susceptibility of *P. malariae* was assessed to drug candidates compared to that of *P. falciparum*, we observed a similar susceptibility between the two species to KDU691 and GNF179 treatments, respectively ($p = 0.7255$) and ($p = 0, 2726$).

Conclusions:

In this study, *P. malariae* grew successfully under *P. falciparum* culture conditions in the absence of 10% glucose supplementation. This culture method allowed screening of antimalarial drugs against clinical isolates of *P. malariae*. Based on our data, flow cytometry may be a better approach than light microscopy to assess the maturation of *P. malariae*.

Keywords : *P. malariae*, *ex-vivo* culture, candidate and reference drugs

SERMENT DE GALIEN



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseils de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples ;

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels ;
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ;
- Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Je le jure