



# FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

Année universitaire 2008- 2009

Thèse N°...../M

## TITRE

Evaluation de la sensibilité *in vitro* des isolats de terrain de *P.falciparum* à la chloroquine, à la monodéséthylamodiaquine, à la luméfántrine et à la dihydroartémisinine dans trois villages du Mali.

## THESE

Présentée et soutenue publiquement le / / 2009 devant la Faculté de  
Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie

Par

**M. Aly Kodio**

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

## MEMBRES DU JURY

Président : Professeur Moussa HARAMA

Membre : Professeur Flabou BOUGOUDOGO

Co-directeur : Docteur Abdoulaye DJIMDE

Directeur : Professeur Ogobara. K. DOUMBO

Nos remerciements s'adressent :

A **Dieu**, Le Clément, Le Tout Puissant, Le Tout Miséricordieux pour l'accompagnement et la santé dont nous avons bénéficié au cours de ce travail.

Ce travail est dédié:

A mes **grands parents**

En souvenir de votre affection et de votre disponibilité qui n'ont jamais fait défaut. Que Le Tout puissant vous accorde Sa paix éternelle. Amin !

A mon père **Amadou Boukary KODIO**, je ne s'aurais vous remercié pour le soutien, les conseils et la bonne éducation dont j'ai reçu de votre part.

Je ne cesserais de vous remercier. Ce travail est le vôtre. Que Dieu vous donne longue vie et bonne santé. Amin !

A ma mère **Oumou GUINDO**, j'ai bénéficié des énormes sacrifices que vous avez consenti, de votre tendresse, de votre soutien, de votre conseils. Je vous dis incessamment merci. Ce travail est également le vôtre.

Nos remerciements s'adressent :

A mon oncle **Mahamadou GUINDO**, recevez ici toute ma reconnaissance pour le soutien et les précieux conseils que vous m'avez apporté. Acceptez ce modeste travail comme un témoignage de mes sincères attachements.

A mes tantes **Aichata KODIO, Fatoumata GUINDO, Awa GUINDO, Assétou GUINDO, Amba DIAKITE** vos encouragements, votre disponibilité, votre souci pour notre réussite n'ont jamais manqué. Recevez mes vifs remerciements.

A mes petites sœurs **Aichata KODIO, Ramata KODIO** ainsi que mon petit frère **Mohamed KODIO**, je me souviens parfaitement de nos taquineries, de nos complicités. J'ai bénéficié de votre affection qui n'a jamais fait défaut. Ce travail est également le vôtre. Puisse Le Tout Puissant préserve cette affection et nous accorde pleins de bonheurs. Amin !

A mes cousins **Amadou KODIO, Abdramane DEMBELE, Ousmane KONE, Mahamadou DEMBELE**, je me rappelle des bons moments passés ensemble. Je vous remercie pour tout.

A mes cousines **Awa DEMBELE, Habiba KODIO, Fatoumata DEMBELE, Mariam DEMBELE**, je vous remercie pour vos gentillesse, vos disponibilités et vos encouragements. Recevez ici l'expression de ma profonde affection et mon sincère attachement.

A **Ogobara. K. DOUMBO** et sa famille, toute ma reconnaissance et mes vifs remerciements.

A **Hamidou KODIO** et sa famille, mes sincères remerciements.

A **Mohamed DEMBELE** et sa famille, toute ma reconnaissance et mon profond respect.

A **Mariétou**, tous mes remerciements pour votre gentillesse.

A mes amis **Dr Dramane MALLE, Dr Issaka CAMARA, Dr Madiou SACKO, Kassim DIALLO**, mes remerciements pour votre franche collaboration.

A **M. Mamadou BA**, merci pour l'encadrement dont j'ai bénéficié.

A **Dr Souleymane Dama**, merci **Kôrô** pour avoir veillé au bon déroulement de ce travail. Votre contribution a été de taille. Recevez l'expression de mon profond respect.

A tous mes encadreurs, mes remerciements.

A **Halima KADDOURI**, merci pour votre franche collaboration.

Aux **Dr Mamadou TEKETE, Dr Bakary FOFANA, Dr Hamma MAIGA, Dr Bakary SIDIBE, Dr Cheick Papa Oumar SANGARE, M. Sékou TOURE, M. Demba DEMBELE, Dr Oumar YATTARA, Aminatou KONE, Dr Oumar Bila TRAORE, M. Zoumana Isaac Traoré, Dr Hamidou NIANGALY, Dr Antoine DARA, M. Amadou TOGO, M. Nouhoum DIALLO**, merci pour vos conseils, vos encouragements.

A tous les **internes** du **MRTC / DEAP**, mes remerciements et mes encouragements.

A la population de **Kollé**, de **Bancoumana**, de **Faladjè**, merci pour votre collaboration.

A toutes les personnes qui ont contribué à ce travail de loin ou près.

**A notre Maître et Président du jury,**

**Le Professeur Moussa HARAMA**

*❖ Professeur de Chimie Organique à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.*

Cher maître vous nous faites l'honneur de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Vos qualités humaines, sociales et scientifiques font de vous plus qu'un maître mais un conseiller spécial responsable et admiré de tous. Nous avons vite apprécié la qualité de votre enseignement.

Permettez nous cher maître de vous exprimer toute notre gratitude et nos sincèrement remerciements.

A notre Maître et Juge,

Le Professeur Flabou BOUGOUDOGO PharmD, Ph.D

- ❖ *Professeur agrégé en Bactériologie et en Virologie,*
- ❖ *Responsable de l'enseignement de Bactériologie et de Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie.*
- ❖ *Directeur de l'Institut National de Recherche en Santé Publique.*

Cher maitre vous nous faites l'honneur en acceptant de juger cette thèse. Vous avez toujours montré votre souci constant pour la formation des jeunes dans la voie de la recherche. Ceci témoigne vos qualités humaines, sociales et scientifiques qui font de vous un exemple à suivre.

**A notre Maître et Co-directeur de thèse**

**Le Docteur Abdoulaye DJIMDE PharmD, Ph.D**

- ❖ *Maitre assistant en Microbiologie-Immunologie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.*
- ❖ *Responsable de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance du DEAP/MRTC.*
- ❖ *Chevalier de l'ordre national du Mali.*

Cher maître, permettez nous de vous remercier pour la confiance que vous nous avez faite en nous comptant parmi vos élèves. Vos qualités scientifiques et pédagogiques forcent l'admiration. Votre simplicité, votre disponibilité et votre souci constant de la formation font de vous un scientifique enviable. Vous avez cultivé en nous le sens du travail bien fait et la rigueur scientifique. Nous vous remercions et nous en sommes très reconnaissants.

**A notre maître et Directeur de thèse**

**Le Professeur Ogobara K. DOUMBO MD, Ph.D**

- ❖ *Professeur de Parasitologie et de Mycologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.*
- ❖ *Médecin chef du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires*
- ❖ *Directeur du pôle d'excellence de recherche sur le paludisme, Malaria Research and Training Center (MRTC)*
- ❖ *Membre de l'académie nationale de médecine de France,*
- ❖ *Chevalier de l'ordre national du Mali.*

Cher maître, nous vous remercions pour la confiance que vous avez placée en nous pour nous proposer ce travail. Nous avons vite apprécié, par votre vivacité d'esprit peu commune, un esprit critique à envier, vos immenses qualités scientifiques, humaines et votre amour pour le travail bien.

Vous avez cultivé à nous l'esprit d'équipe, le dévouement, l'endurance, et la persévérance, qualités indispensables qui sont votre sceau. Nous sommes très honorés d'être parmi vos élèves.

Soyez assuré, cher maître, de notre profonde gratitude et indéfectible attachement.

## LISTE DES FIGURES :

Figure 1: Cycle de développement de <i>P. falciparum</i> .....	15
Figure 2: schéma de l'inter-conversion du lactate et du pyruvate .....	16
Figure 3: Le mécanisme enzymatique de la LDH .....	17
Figure 4: Structure de la chloroquine. ....	19
Figure 5: Structure de la monodeséhylamodiaquine.....	21
Figure 6: Structure de l' Amodiaquine. ....	21
Figure 7: Structure de la Dihydroartémisinine .....	23
Figure 8: Structure de la Luméfantrine.....	24
Figure 9 : Photographie de gel d'agarose à 2% de la digestion de Pfcr1 K76T (Source MRTC/MEDRU) .....	50
Figure 10 : Photographie de gel d'agarose à 2% de la digestion de Pfmdr1 N86Y (Source : MRTC/MEDRU) .....	51
Figure 11 : Photographie de gel d'agarose à 2% de la digestion PfATPase6 S769N (MRTC/MEDRU).....	52
Figure 12 : Principe du test pLDH ELISA (Source: MRTC/MEDRU).....	66
Figure 13: Répartition des CI <sub>50</sub> de la Chloroquine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Bancoumana.....	79
Figure 14: Répartition des CI <sub>50</sub> de la Monodeséhylamodiaquine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Bancoumana. ....	80
Figure 15: Répartition des CI <sub>50</sub> de la Luméfantrine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Bancoumana.....	81
Figure 16: Répartition des CI <sub>50</sub> de la dihydroartémisinine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Bancoumana. ....	82
Figure 17: Répartition des CI <sub>50</sub> de la chloroquine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Faladjé.....	84
Figure 18: Répartition des CI <sub>50</sub> de la Monodeséhylamodiaquine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Faladjé. ....	85
Figure 19: Répartition des CI <sub>50</sub> de la Luméfantrine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Faladjé.....	86
Figure 20: Répartition des CI <sub>50</sub> de la dihydroartémisinine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Faladjé. ....	87
Figure 21: Répartition des CI <sub>50</sub> de la Chloroquine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Kollé.....	89
Figure 22: Répartition des CI <sub>50</sub> de la Monodeséhylamodiaquine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Kollé .....	90
Figure 23: Répartition des CI <sub>50</sub> de la Luméfantrine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Kollé.....	91
Figure 24: Répartition des CI <sub>50</sub> de la dihydroartémisinine selon les isolats de terrain de <i>P. falciparum</i> à Kollé. ....	92

**LISTE DES TABLEAUX:**

Tableau I: Composition du milieu réactionnel pour la 1 <sup>ère</sup> amplification pour un volume total de 25 µl.....	44
Tableau II: Programme de la première amplification de <i>Pfcrt</i> .....	44
Tableau III: Programme de la première amplification de <i>Pfmdr1</i> .....	45
Tableau IV: Programme de la première amplification de <i>PfATPase6</i> .....	45
Tableau V: Composition du milieu réactionnel pour la deuxième amplification pour un volume total de 25 µl.....	46
Tableau VI: Programme de la deuxième amplification de <i>Pfcrt</i> .....	46
Tableau VII: Programme de la deuxième amplification de <i>Pfmdr1</i> .....	47
Tableau VIII: Programme de la deuxième amplification de <i>PfATPase6</i> .....	47
Tableau IX: Composition du milieu réactionnel de digestion enzymatique pour un volume total de 20 µl.....	48
Tableau X : Préparation des solutions mères des antipaludiques .....	55
Tableau XI : Préparation des solutions filles des antipaludiques .....	56
Tableau XII : Plan de plaque de 96 cupules, en concentration finale en nM : .....	57
Tableau XIII : Les gammes de concentrations des antipaludiques.....	57
Tableau XIV : La comparaison d'intensité des bandes <<P>> et <<Pf>> entre optimal - IT2 et Optimal-IT 3 .....	71
Tableau XV : L'intensité de bande <<P>> ou <<Pf>> d'Optimal-IT 1 et d'Optimal-IT 2 .....	72
Tableau XVI: Susceptibilité <i>in vitro</i> de quatre antipaludiques des isolats de <i>Plasmodium falciparum</i> à Bancoumana. ....	78
Tableau XVII: Susceptibilité <i>in vitro</i> de quatre antipaludiques des isolats de <i>Plasmodium falciparum</i> à Faladjé. ....	83
Tableau XVIII: Susceptibilité <i>in vitro</i> de quatre antipaludiques des isolats de <i>Plasmodium falciparum</i> à Kollé. ....	88
Tableau XIX: Comparaison du marqueur moléculaire de résistance <i>Pfcrt</i> K76T aux profils des CI <sub>50</sub> de la chloroquine pour l'ensemble des localités. ....	93
Tableau XX: Comparaison de prévalence du marqueur moléculaire de résistance des dérivés d'artémisinine <i>PfATPase 6</i> à celle des profils des CI <sub>50</sub> pour l'ensemble des localités.....	93
Tableau XXIII: Comparaison de la prévalence du marqueur moléculaire de résistance <i>Pfmdr1</i> N86Y à celle des profils des CI <sub>50</sub> de la luméfantine à Bancoumana. ....	94
Tableau XXIV: Comparaison de la prévalence du marqueur moléculaire de résistance <i>Pfmdr1</i> N86Y à celle des profils des CI <sub>50</sub> de la luméfantine à Faladjé. ....	94
Tableau XXV: Comparaison de la prévalence du marqueur moléculaire de résistance <i>Pfmdr1</i> N86Y à celle des profils des CI <sub>50</sub> de la luméfantine à Kollé. ....	95

**SOMMAIRE:**

I.	INTRODUCTION:	9
II.	OBJECTIFS:	12
II.1.	Objectif général :	12
II.2.	Objectifs spécifiques :	12
III.	GENERALITES :	13
III.1.	Généralité sur le cycle biologique du paludisme :	13
III.1.1.	Cycle biologique de <i>Plasmodium falciparum</i> chez l'homme :	13
III.1.1.1.	Cycle schizogonique exo érythrocytaire intra hépatique (A) :	13
III.1.1.2.	Cycle intra érythrocytaire (B):	13
III.1.2.	Cycle chez l'Anophèle ou sporogonie :	14
III.2.	Rappel sur la LDH et la pLDH :	16
III.2.1.	La LDH (la lactate déshydrogénase humaine) :	16
III.2.2.	La pLDH (la lactate déshydrogénase plasmodiale) :	18
III.3.	Généralités sur les antipaludiques de l'étude:	19
III.3.1.	Chloroquine:	19
III.3.2.	Amodiaquine :	21
III.3.3.	Dihydroartémisinine :	22
III.3.4.	Luméfántrine (benflumetol) :	24
III.4.	Généralités sur la résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> aux antipaludiques de l'étude :	26
III.4.1.	Définition de la chimiorésistance :	26
III.4.2.	La résistance aux médicaments de l'étude :	26
III.4.2.1.	La résistance à la chloroquine :	26
III.4.2.2.	Résistance à l'amodiaquine :	28
III.4.2.3.	Résistance à la dihydroartémisinine :	28
III.4.2.4.	Résistance à la luméfántrine :	28
III.5.	Méthode d'évaluation de la chimiorésistance :	28
III.5.1.	Tests <i>in vitro</i> :	28
III.5.1.1.	Tests optiques:	28
III.5.1.2.	Tests isotopiques:	29
III.5.1.3.	Les Nouveaux tests:	29
III.5.1.3.1.	Micro-test de MARKII:	29
III.5.1.3.2.	Test de MAKLER :	29
III.5.1.3.3.	Tests moléculaires: Technique de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) :	30
III.5.2.	Tests " <i>in vivo</i> ":	31
IV.	METHODOLOGIE :	32
IV.1.	Lieu d'étude :	32
IV.1.1.	Faladjé :	32
IV.1.2.	Kollé :	34
IV.1.3.	Bancoumana :	35
IV.2.	Période et type d'étude :	36
IV.3.	Population d'étude :	36
IV.4.	Echantillonnage et taille de l'échantillon:	36
IV.5.	Méthodes de collecte des données:	37
IV.6.	Déroulement de l'enquête :	37

IV.7.	Techniques de laboratoire:.....	37
IV.7.1.	Examens parasitologiques: .....	37
IV.7.2.	Examen hématologique : .....	37
IV.7.3.	Etudes de biologie moléculaire:.....	38
IV.7.3.1.	Principe général de la PCR : .....	38
IV.7.3.2.	Modes opératoires normalisés pour la confection d'un confetti (papier buvard): .....	38
IV.7.3.3.	Modes opératoires normalisés pour l'extraction de l'ADN plasmodial par la méthode de méthanol : .....	39
IV.7.3.4.	Mise en évidence des génotypes <i>Pfcr</i> K76T, <i>Pfmdr1</i> N86Y, <i>PfATPase6</i> S769N par restriction enzymatique : .....	41
IV.7.4.	Etude de la chimiosensibilité <i>in vitro</i> de <i>P.falciparum</i> :.....	53
IV.7.4.1.	Prélèvement : .....	53
IV.7.4.2.	Matériels nécessaires à l'analyse : .....	53
IV.7.4.3.	Matériels et Réactifs: .....	53
IV.7.4.4.	Fiche technique : .....	61
IV.7.4.5.	Conservation après analyse : .....	64
IV.7.4.6.	Test d'antigène pLDH ELISA : .....	65
IV.8.	Gestion et analyse des données : .....	76
IV.9.	Considérations éthiques: .....	77
V.	RESULTATS : .....	78
V.1.	Résultats de la chimiosensibilité <i>in vitro</i> de <i>P.falciparum</i> à l'aide de la méthode pLDH ELISA: .....	78
V.1.1.	Mesure de la moyenne géométrique des CI <sub>50</sub> à Bancoumana : .....	78
V.1.2.	Mesure de la moyenne géométrique des CI <sub>50</sub> à Faladjé : .....	83
V.1.3.	Mesure de la moyenne géométrique des CI <sub>50</sub> à Kollé : .....	88
V.2.	Comparaison des résultats moléculaires aux résultats du test <i>in vitro</i> : .....	93
V.2.1.	Comparaison des résultats de <i>Pfcr</i> K76T aux profils des CI <sub>50</sub> de la chloroquine <i>in vitro</i> : .....	93
V.2.2.	Comparaison de la prévalence de <i>PfATPase 6</i> S769N à celle des profils des CI <sub>50</sub> :.....	93
V.2.3.	Comparaison de prévalence de <i>Pfmdr1</i> N86Y à celle des profils des CI <sub>50</sub> de la luméfantine: .....	94
VI.	COMMENTAIRES ET DISCUSSION : .....	96
VI.1.	Méthodologie : .....	96
VI.2.	RESULTATS : .....	98
VI.2.1.	Résultats de la chimiosensibilité <i>in vitro</i> de <i>P.falciparum</i> par la méthode pLDH ELISA : .....	98
VI.2.2.	Comparaison des résultats moléculaires aux résultats de test <i>in vitro</i> : .....	99
VI.2.2.1.	Comparaison de prévalences de <i>Pfcr</i> K76T à celles des profils des CI <sub>50</sub> de la chloroquine: .....	99
VI.2.2.2.	Comparaison de prévalences de <i>PfATPase 6</i> à celles des profils des CI <sub>50</sub> de la dihydroartémisinine : .....	100
VI.2.2.3.	Comparaison de la prévalence de <i>Pfmdr1</i> N86Y à celle des profils des CI <sub>50</sub> de la luméfantine: .....	100
VII.	CONCLUSION:.....	101
VIII.	RECOMMANDATIONS: .....	102
IX.	FICHE SIGNALÉTIQUE : .....	103

X. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :..... 107

***Serment de Galien***

## LISTE DES ABREVIATIONS :

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- BSA** : Bovine Sérum Albumin
- CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibant 50% des parasites
- CTA** : Combinaison Thérapeutique à base d' Artémisinine
- CQ**: Chloroquine
- DEAP**: Département épidémiologique des affections parasitaires
- DHART**: Dihydroartémisinine
- DO**: Dose Optimale
- dATP**: Désoxyadenosine triphosphate
- dGTP**: Désoxyguanosine triphosphate
- dTTP**: Désoxythymidine triphosphate
- dCTP**: Désoxycytidine triphosphate
- EDTA**: Ethyl-diamine trichloro-acétate
- ELISA**: Enzyme- Linked Immunosorbent Assay
- FMPOS**: Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
- GLP** : Good Laboratory Practice
- HRP**: horseradish peroxydase
- MDAQ**: Monodeséthylamodiaquine
- MEDRU**: Molecular Epidemiology and Drug resistance Unit
- MRTC**: Malaria Research and Training Center
- NIAID/NIH**: National Institute of Allergy and Infectious Diseases/ National Institutes of Health
- LUM**: Luméfantrine
- OMS**: Organisation Mondiale de la Santé
- PCR**: Polymerase Chain Reaction
- PNLP**: Programme National de Lutte contre le Paludisme
- pLDH**: plasmodium lactate déshydrogénase
- PfATPase6**: *Plasmodium falciparum* adenosine triphosphatase 6
- Pfcr1**: *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter
- Pfmdr1**: *Plasmodium falciparum* multi-drug resistant
- RPAL**: RPMI+0, 5% Albumax

**RPMI:** Royal Park Memorial Institute

**RPSH:** RPMI+ 10% Sérum Humain stérile

**SERCA:** Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase

**SF:** solution fille

**SM:** solution mère

**Taq polymérase:** *Thermus aquatus* polymérase

**TBE:** Tris-borate d'EDTA

**TMB:** Tetramethylbenzidine

**U.V:** rayons Ultra-Violet.

## I. INTRODUCTION:

Le paludisme (ou Malaria) est une érythrocytopathie hémolysante potentiellement létale due à la présence et au développement dans l'organisme humain d'un protozoaire du genre *Plasmodium* essentiellement transmis à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Cependant il peut être transmis par voie sanguine, transfusionnelle<sup>1</sup> ou placentaire<sup>2</sup>.

Lorsqu'en 1880, le médecin-militaire français Laveran a mis en évidence le *Plasmodium* dans le sang d'un sujet infecté à Constantine en Algérie, commence alors une nouvelle bataille contre une maladie qui accompagne l'homme. Quatre espèces sont inféodées à l'homme: *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*), *Plasmodium vivax* (*P. vivax*). Chez l'homme *P. falciparum* est le plus redoutable et le plus meurtrier<sup>3</sup>.

Le paludisme est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays tropicaux<sup>4</sup>. L'estimation établie par l'OMS du nombre de cas de paludisme survenu en 2006 est 247 millions [189 à 327]. L'estimation du nombre de décès (881 000) est comprise entre [610 000 à 1 212 000]. La moitié de la population mondiale soit 3,3 milliards de personnes risquent de contracter le paludisme. Pour 1,2 milliard d'entre elles, vivant principalement en Afrique ou en Asie du Sud-est, ce risque est considéré comme élevé. Quatre vingt six pour cent des 247 millions de cas estimés de paludisme en 2006 sont survenus dans la région africaine. Les enfants, surtout en Afrique, sont frappés de plein fouet par la maladie. Quatre vingt onze pour cent des 881 000 décès estimés en 2006 sont survenus en Afrique et 85% des personnes décédées avaient moins de cinq ans<sup>5</sup>.

La stratégie de l'organisation mondiale de la santé (OMS) de lutte antipaludique s'appuie sur quatre éléments techniques fondamentaux: (i) fournir gratuitement des moustiquaires imprégnées d'insecticide aux femmes enceintes et aux enfants; (ii) la pulvérisation intra domiciliaire à effet rémanent est une méthode généralement utilisée dans les foyers de forte transmission du paludisme; (iii) opter pour les CTA comme traitement de choix contre *P. falciparum*; (iv) Le recours systématique au traitement préventif intermittent pendant la grossesse.

La résistance des antipaludiques est un problème majeur de santé publique dans les pays endémiques<sup>6</sup>. Une augmentation de la résistance aux médicaments antipaludiques bon marché comme la chloroquine a été directement reliée à une forte mortalité d'enfant<sup>7, 5</sup>. La mutation *Pfmdr1* N86 a été associée à une réduction de la sensibilité à la luméfantine *in vitro*<sup>8, 9</sup>.

En fin 2006, les CTA constituait le traitement de première intention dans 66 pays. En juin 2008, seuls quatre pays et territoires n'avaient pas encore adopté les CTA comme traitement de première intention. Les principales CTA sont :

AL=Artemether/luméfantrine ((Riamet<sup>®</sup>, Coartem<sup>®</sup>),

AS+AQ=Artésunate+Amodiaquine (Sanofi → Arsucam<sup>TM</sup>),

AS+SP=Artésunate+Sulfadoxine/pyriméthamine (Sanofi→Arsudar<sup>TM</sup>),

AS+MQ=Artésunate+Méfloquine (Mepha → Artequin<sup>®</sup>),

DP=Dihydroartémisinine+Pipéraquine (Artekin<sup>TM</sup>).

Aucune résistance clinique aux CTA n'a été documentée jusqu'ici mais une susceptibilité *in vitro* diminuée aux dérivés d'artémisinine a été suggérée en Asie<sup>10</sup> et à Madagascar<sup>11</sup>. Les pays africains ont clairement besoin de surveiller étroitement l'apparition prévisible de la résistance de *P. falciparum* aux composants de CTA. En effet, avant que l'échec thérapeutique apparaisse, une élévation précoce de résistance peut être détectée par une augmentation des valeurs des concentrations inhibitrices 50% (CI<sub>50</sub>) *in vitro* et par les marqueurs moléculaires liés à la résistance. Cependant, une étude en Guyane française a montré que la mutation *PfATPase6 S769N* a été associée à une élévation de CI<sub>50</sub> de l'artémether, et a suggéré que la mutation pourrait être utilisée dans la surveillance moléculaire de la résistance à l'artémisinine pour continuer de compléter la surveillance *in vitro*<sup>12</sup>.

Jusqu'ici, très peu de laboratoires africains ont la capacité d'exécuter par routine des analyses *in vitro* de la sensibilité de *P. falciparum*.

Des méthodes plus faciles et bon marché d'évaluation de la sensibilité antipaludique *in vitro* sont nécessaires pour permettre une surveillance géographique plus large.

La surveillance épidémiologique précise et efficace exige la standardisation des méthodes *in vitro*. Bien qu'il ne soit pas facile de réaliser une telle standardisation, il est nécessaire d'éviter de perdre de précieuses informations et de précision sur la sensibilité de *P. falciparum* à des médicaments dans un pays donné à un moment donné. Au moins l'étape de culture doit être standardisée puisqu'il a été montré que des paramètres de culture tels que le milieu de culture, la durée d'incubation, l'atmosphère ou des conditions de stockage des échantillons et le délais avant de mettre les échantillons en culture semblent induire des variations élevées de croissance de *P. falciparum* et en valeurs CI<sub>50</sub><sup>13, 14, 15, 16</sup>.

D'ailleurs, les études *in vitro* ont parfois été invalidées a posteriori en raison de problèmes méthodologiques (changement de médicaments, effet inoculum) menant à la surestimation de la résistance au médicament<sup>17</sup>. Ceci souligne l'importance de développer des contrôles de qualité rigoureux pour le procédé d'analyse *in vitro*, en particulier dans le contexte de la surveillance de la résistance naissante. Plusieurs types de mesures sont actuellement employés dans les analyses *in vitro* qui évaluent l'inhibition de croissance de parasite comprenant : la quantification de la parasitémie, la production de protéine, l'incorporation de nucléotide dans l'ADN et souillure de fluorescence d'ADN. Les comparaisons entre ces méthodes indiquent qu'un test d'ELISA est probablement un des meilleurs puisque l'équipement requis est de base et les méthodes sont extrêmement sensibles<sup>18,19,20,21</sup>.

La réponse *in vivo* des isolats maliens de *P. falciparum* aux antipaludiques disponibles est bien documentée, mais aucune donnée sur la susceptibilité antipaludique *in vitro* n'avait été publiée<sup>22, 23, 24</sup>.

Notre étude s'inscrit dans le but de générer les premières données de ligne de base sur la susceptibilité *in vitro* des isolats cliniques de *P. falciparum* du Mali aux antipaludiques couramment utilisés au Mali.

## II. OBJECTIFS:

### II.1.Objectif général :

Evaluer la sensibilité *in vitro* des isolats de terrain de *P.falciparum* à la chloroquine, à la monodeséthylamodiaquine, à la luméfantrine et à la dihydroartémisinine dans trois villages du Mali.

### II.2.Objectifs spécifiques :

- ☞ Mesurer les  $CI_{50}$  de la chloroquine, de la monodeséthylamodiaquine, de la luméfantrine et de la dihydroartémisinine par le test ELISA pLDH à partir des isolats de terrain de trois localités.
- ☞ Comparer les résultats moléculaires de *Pfcrt* K76T, *PfATPase6* S769N, *Pfmdr1* N86Y respectivement aux profiles de  $CI_{50}$  de la chloroquine, de la dihydroartémisinine, de la luméfantrine dans les trois localités.

### III.GENERALITES :

#### III.1. Généralité sur le cycle biologique du paludisme :

##### III.1.1.Cycle biologique de *Plasmodium falciparum* chez l'homme :

##### III.1.1.1. Cycle schizogonique exo érythrocytaire intra hépatique (A) :

Au cours de la piqûre, l'Anophèle femelle infectée injecte dans un capillaire sanguin des sporozoïtes (1).

Les sporozoïtes transitent dans la circulation générale et, en quelques minutes (30 à 45 mn), ils envahissent les hépatocytes grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte du côté de l'espace de Disse, espace directement en contact avec le sang circulant (2). Le sporozoïte entre alors dans une phase de division, au sein d'une vacuole parasitophore, et de prolifération intracellulaire qui repousse en périphérie le noyau de la cellule et finit par constituer une masse multi nucléée appelée schizonte hépatique (3) qui conduit à la libération de plusieurs dizaines de milliers de mérozoïtes (4) dans la circulation (Figure. 1). Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure entre 8 à 15 jours, selon les espèces *P. malariae*, *P. falciparum* ne possède pas de formes de persistance hépatique ou hypnozoïte. Seuls *P. vivax* et *P. ovale* en possèdent.

##### III.1.1.2. Cycle intra érythrocytaire (B):

Cette phase sanguine est responsable des symptômes cliniques qui peuvent être d'intensités variables. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte vont débiter le cycle sanguin asexué de prolifération de *P. falciparum* en infectant les érythrocytes (5). Le mérozoïte pénètre grâce à un processus biochimique et moléculaire actif et se différencie au sein de la vacuole parasitophore en anneau, puis en trophozoïte, stade à partir duquel une intense phase de division nucléaire commence. Il donne alors naissance au schizonte, celui-ci après segmentation montre une forme caractéristique de rosace, puis libère entre 8 à 32 mérozoïtes (6) qui rapidement réinfectent des érythrocytes sains. L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*.

L'apparition des gamétocytes (7) à lieu en général la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines dans le sang après la guérison clinique. A la suite d'une nouvelle piqûre par un Anophèle, les gamétocytes mâles et femelles sont ingérés avec le repas sanguin.

Il est important de noter que l'érythrocyte (ne possédant pas de système de synthèse et de transport des protéines et n'exprimant pas de molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I ou II à sa surface) est une niche idéale pour un parasite qui doit perdurer de longues périodes chez son hôte, afin d'être transmis au moustique.

### **III.1.2. Cycle chez l'Anophèle ou sporogonie :**

Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'Anophèle femelle ingère des gamétocytes (8), à potentiel sexuel mâle ou femelle. Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'exflagellation à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés (9). Il en résulte un zygote appelé ookinète (10) ; celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste (11). Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique et est suivie par plusieurs milliers de mitoses qui conduisent au développement de sporozoïtes (forme infestante). L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments mobiles et haploïdes dans l'hémolymphe (11). Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infestante. Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule entre 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et les espèces en cause.

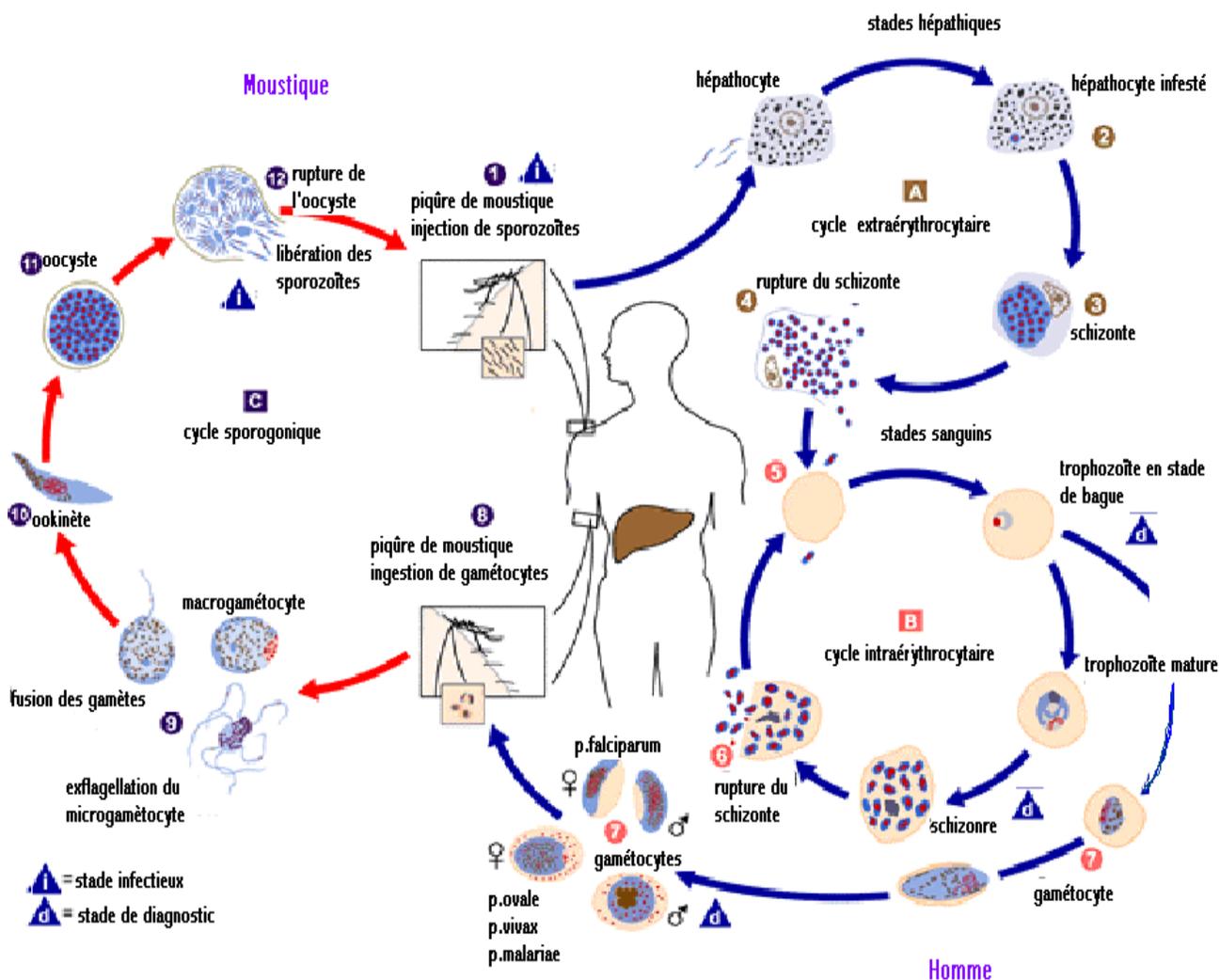


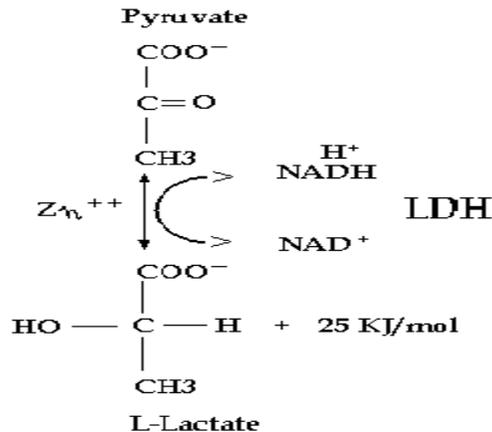
Figure 1: Cycle de développement de *P. falciparum*

Source: [http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/04vol30/30s1/page9\\_f.html](http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/04vol30/30s1/page9_f.html)

### III.2. Rappel sur la LDH et la pLDH :

#### III.2.1. La LDH (la lactate déshydrogénase humaine) :

La lactate déshydrogénase (LDH) est l'enzyme qui catalyse l'inter-conversion de la lactate et du pyruvate:



**Figure 2: schéma de l'inter-conversion du lactate et du pyruvate**

Cette réaction est centrale dans le fonctionnement du métabolisme énergétique de la cellule puisque le pyruvate est le pivot qui relie la glycolyse et le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs). Au moment de la réduction du pyruvate, l'enzyme a une activité maximale entre le pH 7,4 et 7,8, tandis qu'à l'oxydation de la lactate, la réaction est optimisée dans un milieu plus alcalin (pH 8.8-9.8)<sup>25</sup>.

En présence d'oxygène, le pyruvate pourra entrer dans la dernière voie métabolique ; mais en condition anaérobie, il s'accumulera sous forme de lactate. Les cellules ont des LDH avec des propriétés catalytiques, physiques et immunologiques différentes. La base de ces différences repose sur les sous-unités de cette enzyme qui sont au nombre de deux : H (cœur) et M (muscle).

Ces deux sous unités permettent l'existence de cinq iso enzymes (iso-LDH) tétramériques : LDH (M4, M3H, M2H2, MH3, H4). Chaque tissu est cependant enrichi en une ou deux de ces cinq iso enzymes pour avoir les propriétés nécessaires à son bon fonctionnement.

Le poids moléculaire de la sous-unité est approximativement de 35 kDa<sup>26</sup>.

La LDH de type M4 en solution existe souvent sous la forme tétramérique et montre une forte activité enzymatique, convertissant le pyruvate en lactate en présence du NADH et des protons. En 1976 Tenenbaum-Tenenbaum-Bayer et coll. ; ont montré que des dimères de cette sous-unité M4 ont une certaine activité enzymatique mais la forme tétramérique est considérée comme la

structure la plus active et indigène pour M4 LDH<sup>27</sup>. La dissociation de la forme tétramérique en des monomères ou le déploiement des sous-unités entraîne une perte de l'activité enzymatique. Par conséquent, l'activité enzymatique est directement liée à la structure de la LDH.

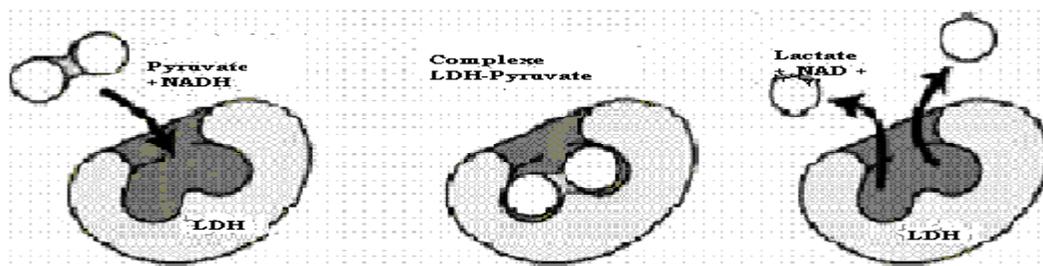
✓ **Le mécanisme enzymatique de la LDH :**

Les sous-unités de la LDH contiennent deux domaines : un domaine obligatoire de la NADH, qui est bien conservé, et un domaine catalytique.

Quand les structures secondaires se plient en structures tertiaires, ils forment une "poche" dans laquelle s'adapte le NADH.

Après avoir lié le NADH, la LDH subit un changement de conformation connu sous le nom de fermeture de boucle.

Ce changement de conformation permet de couvrir l'emplacement actif et de catalyser la réaction de réduction. En absence d'oxygène, cette réaction intervient au niveau de la dernière étape de la glycolyse. Le coenzyme NAD réduit lors de l'oxydation phosphorylante, ne pouvant être oxydé par la chaîne respiratoire mitochondriale, doit transmettre ses hydrogènes à un accepteur qui sera le pyruvate.



**Figure 3: Le mécanisme enzymatique de la LDH**

Les LDH ont pour cofacteurs l'ion zinc et le coenzyme NAD.

L'acide pyruvique et les NADH<sup>+</sup> produits lors de la glycolyse, peuvent s'engager dans deux voies différentes :

❖ Lorsque la glycolyse est peu sollicitée, les NAD sont en quantité suffisante pour transporter tous les protons (NADH<sup>+</sup>) dans la mitochondrie.

L'acide pyruvique, en se transformant en acétyl- Coenzyme A (acétyl-CoA) pénètre dans la mitochondrie, et par le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire va produire de l'eau et de l'énergie (dont environ 25% seront utilisés pour la reconstitution de l'Adénosine Tri Phosphate musculaire).

❖ Lorsque la vitesse de la glycolyse augmente, la production importante d'acide pyruvique et de NADH va entraîner la formation d'acide lactique ( $C_3H_6O_3$ ), car la capacité de prise en charge mitochondriale des NADH est dépassée.

Par l'action de la LDH, l'acide lactique peut se retransformer en acide pyruvique pour être utilisé alors comme substrat énergétique (lorsque l'intensité de l'exercice diminue et que les transporteurs de protons (NAD) peuvent amener tous les ions  $H^+$  dans la mitochondrie).

### III.2.2. La pLDH (la lactate déshydrogénase plasmodiale) :

Les plasmodies ont un besoin en énergie élevée pendant la phase intra-érythrocytaire pour assurer leur croissance et leur multiplication. Le glucose constitue la source principale d'ATP chez le parasite aussi bien que chez l'homme. La consommation du glucose dans les érythrocytes infectés est de 25 à 50 fois supérieure à celle des érythrocytes non infectés<sup>28</sup>. Le glucose est utilisé par la voie d'Embden-Meyerhoff qui fait intervenir des enzymes parasitaires spécifiques à la glycolyse<sup>29</sup>. La pLDH est une enzyme terminale dans la voie d'Embden Meyerhoff (glycolyse) des plasmodies<sup>30</sup>. Sa production et son accumulation peuvent être employées *in vitro* et *in-vivo* comme index de la viabilité plasmodiale. La pLDH était l'une des premières enzymes plasmodiales, qui s'avère électrophorétiquement, immunologiquement et cinétiquement distincte de celle de l'homme<sup>31</sup>. Elle a été employée principalement comme indicateur de la présence des plasmodies dans le sang. Les niveaux de la pLDH correspondent à la densité parasitaire dans le diagnostic initial. Ils montrent une diminution rapide de la parasitémie avec le traitement<sup>32</sup>. La pLDH joue un rôle important dans le métabolisme anaérobie des hydrates de carbone des plasmodies. Ainsi les plasmodies en utilisant le glucose anaérobie, exigent la génération du NAD pour un flux continu du glucose<sup>33</sup>. Le stade ultime de la voie d'Embden – Meyerhoff est marqué par la transformation du pyruvate en acide lactique par le pLDH. Ce métabolisme régénère la N-Acétyl Dinucléotide (NAD) qui est nécessaire à la production d'Adénosine triphosphate (ATP). L'acide lactique, produit final du métabolisme du glucose des espèces plasmodiales de mammifères est rapidement excrété par les parasites vers le compartiment extracellulaire<sup>34</sup>.

La LDH des procaryotes et des eucaryotes particulièrement celle du *P. falciparum* et de l'homme ont sensiblement un même poids moléculaire de 35 kDa<sup>35, 36, 37</sup>.

Cependant, la séquence génomique de la LDH plasmodiale présente des différences avec la LDH d'autres organismes<sup>36,37</sup>.

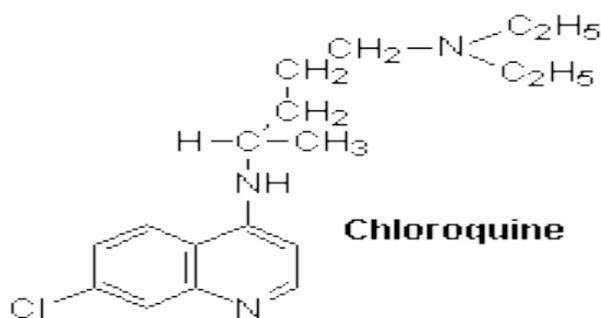
Au plan fonctionnel, la LDH plasmodiale est capable d'utiliser rapidement 3 fois plus de molécules de NAD que ne peut utiliser la LDH humaine<sup>38</sup>.

Makler et *al* ont développé une analyse de la sensibilité d'une drogue qui détermine des profils d'inhibition en mesurant l'activité enzymatique du pLDH .

### III.3. Généralités sur les antipaludiques de l'étude:

#### III.3.1. Chloroquine:

(diéthylamino-4' methyl-butylamino)-4 chloro-7 quinoleine C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>ClN



**Figure 4: Structure de la chloroquine.**

La chloroquine a été découverte par les chercheurs allemands en 1934 (Resorchin<sup>®</sup>)<sup>39 40</sup> Elle a été développée aux Etats-Unis en 1944 sous les appellations (Nivaquine<sup>®</sup>, Aralen<sup>®</sup>)<sup>41</sup> et a été l'antipaludique le plus utilisé depuis cette date jusqu'à la diffusion de la chloroquino-résistance.

A cause de la résistance, cette molécule n'est plus efficace dans de nombreux pays où les souches de *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistantes se sont développées depuis une vingtaine d'années. Les dérivés de la série 4-aminoquinoléines sont capables d'inhiber la polymérisation de l'hème libéré lors de la digestion de l'hémoglobine par le parasite.

- **Activité :**

La chloroquine est une base faible lysosomotrope, elle est capable de traverser la membrane de l'érythrocyte parasité et s'accumule dans la vacuole digestive du parasite en suivant le gradient du pH<sup>42</sup>. A l'intérieur de cette vacuole, l'hémoglobine est dégradée par les protéases et fournit une alimentation en acides aminés au parasite, mais aussi produit des groupements d'hème toxiques

comme dérivés (hématine). Le parasite normalement déttoxifie l'hématine en polymérisant le dérivé en hémazoïne. La chloroquine exerce son activité antipaludique en formant un complexe avec l'hématine toxique pour le parasite, lequel inhibe sa séquestration en hémazoïne<sup>43</sup>. L'hème libre est lytique pour la cellule.

- **Formes pharmaceutiques :**

Poudre blanche, amère, elle est utilisée sous forme de sulfate (Nivaquine® Resorchin® Aralen® Avloclor® Bemaphate® Cidanchin®) ou de diphosphate dans les pays anglo-saxons.

- **Présentation :** comprimé de 100mg et 300mg, sirop à 0,5%.

- **Pharmacocinétique :**

Après administration, la résorption est rapide par le tube digestif et quasi complète (80%). Elle atteint son taux plasmatique maximum en 1 à 2 heures. La chloroquine a un taux sanguin élevé et durable par liaison aux protéines plasmatiques avec une proportion de 50%. Le tropisme est hépatique et rénal. 45% est concentré dans les hématies. Elle ne passe pas dans le lait (éventuellement à l'état de traces selon certaines études)<sup>44 45</sup>.

La chloroquine est métabolisée par désalkylation et par glucuro-conjugaison. Son élimination est lente et elle se fait par voie rénale. La demi-vie de la chloroquine est dose dépendante, de 3 jours après une prise de 150 mg, 5 jours après 600mg.

- **Indication :**

La chloroquine était utilisée en chimioprophylaxie avec le proguanil (savarine®) dans les régions où des souches chloroquinorésistantes étaient présentes mais minoritaires.

- **Contre-indications :**

Les principales contre-indications de la chloroquine sont : l'hypersensibilité, le psoriasis, les antécédents d'épilepsie et la porphyrie.

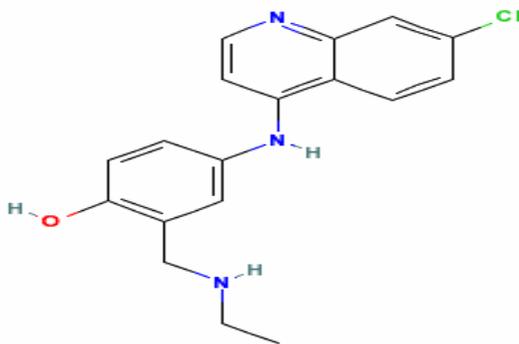
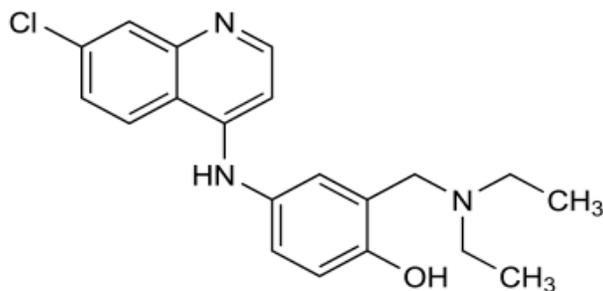
- **Effets secondaires :**

Les principaux effets secondaires suites à la prise de la chloroquine sont : le prurit, les nausées ou les vomissements, l'agranulocytose, la porphyrie aiguë intermittente, les douleurs abdominales, la baisse de l'acuité visuelle, le bourdonnement d'oreille, et la diarrhée.

- **Posologie :** Elle est de 25mg/kg répartis en 3 jours avec 10mg/kg le premier jour, 10mg/kg le deuxième jour et 5mg/kg le troisième jour.

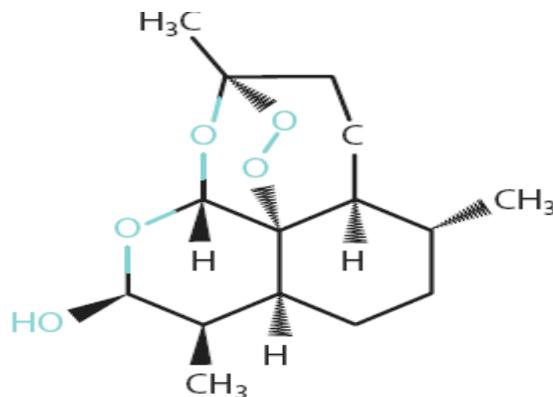
**III.3.2. Amodiaquine :****Monodeséhylamodiaquine :**

4-((7-Chloro-4-quinoliny)amino)-2-((ethylamino)methyl)phenol

**Formule:** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>O**Poids moléculaire:** 327.80802 [g/mol]**Structure chimique:****Figure 5: Structure de la monodeséhylamodiaquine****Formule de l'amodiaquine:**Dichlorhydrate dihydraté amodiaquine de (diéthylaminométhyl-3 hydroxy-4 aniline)-4 chloro-7 quinoléines. (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>OCLN<sub>3</sub>.2HCL.2H<sub>2</sub>O)**Figure 6: Structure de l'Amodiaquine.**

Après avoir été abandonnée dans les années 80, elle a connu, dix ans plus tard un regain d'intérêt dans le traitement de l'accès simple. L'amodiaquine est une amino-4-quinoléine (base de Mannich) dont le mode d'action est analogue à celui de la chloroquine.





**Figure 7: Structure de la Dihydroartémisinine**

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 voulus 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 en cours d'évaluation en tant qu'association médicamenteuse comportant de l'artémisinine (CTA) prometteuse.

❖ **Formulations :**

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

❖ **Pharmacocinétique :**

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<sup>48</sup>.

❖ **Toxicité :**

L'artémisinine et ses dérivés sont sans danger et remarquablement bien tolérés<sup>49, 50</sup>. Certains rapports ont fait état de troubles gastro-intestinaux bénins, de vertiges, d'acouphènes, de

réticulopénie, de neutropénie, d'une élévation des transaminases hépatiques et d'anomalies électrocardiographiques, notamment de cas de bradycardie et d'allongement de l'espace QT, mais la plupart des études n'ont pas retrouvé de telles anomalies. Le seul effet indésirable potentiellement grave rapporté avec cette classe de médicaments est une réaction d'hypersensibilité de type 1 chez environ 1 malade sur 3000<sup>51</sup>. Sa neurotoxicité a été rapportée dans des études chez l'animal, en particulier avec de très fortes doses d'artémotil et d'artémether administrées par voie intramusculaire, et n'a pas trouvé confirmation chez l'homme<sup>52, 53, 54</sup>. De la même façon, des décès d'embryons et des anomalies morphologiques en début de gestation ont été mis en évidence dans des études sur les animaux<sup>55</sup>. L'artémisinine n'a pas été suffisamment évaluée en Afrique au premier trimestre de la grossesse et doit donc être évitée pendant cette période chez les patientes présentant un paludisme simple jusqu'à ce que l'on dispose d'avantage d'informations.

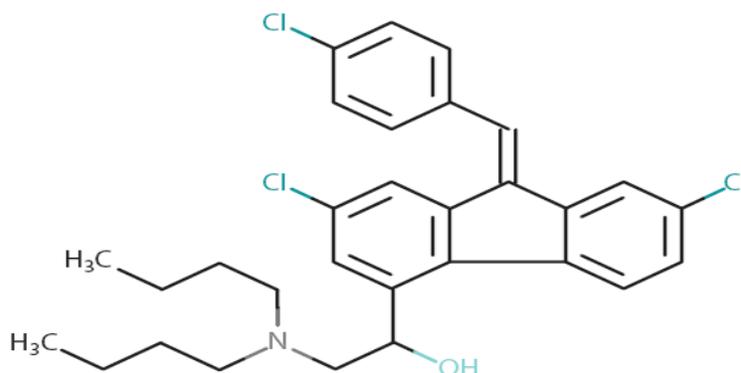
#### ❖ Interactions médicamenteuses :

Aucune connue.

#### III.3.4. Luméfántrine (benflumetol) :

**Formule :** 2-(dibutylamino)-1-[(9 Z)-2, 7-dichloro-9-[(4-chlorophenyl) methylidene] fluoren-4-yl] ethanol. C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>3</sub>NO.

**Poids moléculaire :** 528,9 [g/mol]



**Figure 8: Structure de la Luméfántrine**

La luméfántrine appartient au groupe des amino-alcools qui comprend également la quinine, la méfloquine et l'halofántrine. Elle a le même mécanisme d'action. La luméfántrine est un dérivé racémique du fluor mis au point en Chine.

Elle n'est disponible que sous forme de préparation pour voie orale dans laquelle elle est associée à l'artémether.

- **Formulation :**

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

- **Pharmacocinétique :**

La biodisponibilité orale est variable et hautement dépendante de l'administration concomitante d'aliments gras<sup>56, 57</sup>.

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 terminale est d'environ 3 jours.

- **Toxicité :**

Malgré des similitudes de structure et de propriétés pharmacocinétiques avec l'halofantrine, la luméfantine n'allonge pas de façon importante l'espace QT et n'a aucune autre toxicité importante<sup>58</sup>. En réalité, ce médicament semble être remarquablement bien toléré. Les effets secondaires signalés sont en général bénins – nausées, inconfort abdominal, céphalées et vertiges et sont impossibles à distinguer des symptômes de l'accès palustre aigu.

- **Interactions médicamenteuses :**

Le fabricant de l'artémether-luméfantine recommande d'éviter l'administration des substances suivantes : jus de pamplemousse ; antiarythmiques tels que l'amiodarone, le disopyramide, le flécaïnide, le procaïnamide et la quinidine ; antibactériens tels que les macrolides et les quinolones ; tous les antidépresseurs ; antifongiques tels qu'imidazoles et triazoles ; terféndine ; autres antipaludiques ; tous les antipsychotiques ; et les bêtabloquants tels que le métoprolol et le sotalol. Cependant, rien ne permet de penser que la coadministration de ces médicaments présente un danger.

### III.4. Généralités sur la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques de l'étude :

#### III.4.1. Définition de la chimiorésistance :

L'OMS a défini la chimiorésistance comme l'aptitude d'une souche de parasites du paludisme 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<sup>59</sup>.

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<sup>60</sup>.

Soit à une altération du site de fixation du médicament.

Soit à une inhibition de l'entrée du médicament<sup>61</sup>.

Soit à un reflux actif du médicament au niveau de son site d'action.

#### III.4.2. La résistance aux médicaments de l'étude :

##### III.4.2.1. La résistance à la chloroquine :

C'est la molécule de synthèse la plus largement distribuée et elle représente assurément l'un des produits ayant été le plus utilisé au monde au cours de ces cinquante dernières années. La large diffusion des résistances de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine est devenue un facteur limitant son emploi.

Actuellement deux gènes seraient impliqués dans le phénomène de la chloroquino-résistance: le *Pfmdr1* et le *Pfcrt*<sup>62, 63</sup>.

- **Le *Pfmdr1*: *Plasmodium falciparum* multidrug resistant gene**

Des homologues du gène *mdr*, responsables de la multirésistance des cellules cancéreuses aux médicaments anticancéreux 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<sup>64</sup>.

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<sup>62, 65</sup>.

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<sup>66</sup>. Une mutation au niveau du *Pfmdr1* Asn-Tyr en position 86 pourrait contribuer à la chloroquino-résistance<sup>67</sup>.

✓ **Le *Pfcr1* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) gene :**

L'équipe de Wellems au NIAID/NIH a montré qu'une mutation de ce gène codant pour une protéine trans-membranaire (*Pfcr1*) de la vacuole digestive de *Plasmodium falciparum* est responsable de la résistance à la chloroquine. Certains auteurs ont trouvé des résultats similaires tant *in vitro* qu' *in vivo*<sup>68</sup>.

Cette première étude a montré que les souches résistantes d'Asie et d'Afrique ont un des variants "*Pfcr1*" qui diffère du gène sensible à la chloroquine par 7 ou 8 mutations ponctuelles. En Amérique du sud, cette résistance est associée à d'autres variants "*Pfcr1*" porteurs de plusieurs mutations. Toute fois, les variants "*Pfcr1*" de ces trois régions ont en commun, deux mutations spécifiques (K76T et A220S). Les auteurs ont trouvé que la mutation d'un unique gène situé sur le chromosome 7 de *Plasmodium falciparum* conférait la résistance à la chloroquine. Ils ont également pu convertir une souche sensible à la chloroquine en une souche résistante en lui introduisant le gène muté "*Pfcr1*". Une étude réalisée sur terrain et adoptant le protocole de l'OMS 1996 a montré que tous les patients porteurs d'une infection palustre après traitement à la chloroquine présentaient la forme mutée de ce gène<sup>69</sup>. Toutefois on ne connaît pas encore le rôle précis et la fonction jouée par la protéine codée par ce gène, ni le mécanisme par lequel cette protéine confère la résistance à la chloroquine.

### III.4.2.2. Résistance à l'amodiaquine :

Jusqu'à nos jours il n'y a pas de marqueur moléculaire associé à la résistance pour l'amodiaquine. On pense que des variations alléliques sur le *Pfcr1* et sur le *Pfmdr1* auraient une relation avec une élévation de résistance à l'amodiaquine<sup>70</sup>.

### III.4.2.3. Résistance à la dihydroartémisinine :

Des études récentes ont montré avec des preuves impérieuses que les dérivés d'artémisinine agissent par inhibition sélective sur la protéine *PfATPase6*, le seul type SERCA Ca<sup>2+</sup> ATPase dans le génome de *P. falciparum*, semble être la cible principale pour les dérivés d'artémisinine<sup>71, 72</sup>.

Enfin, pour la première fois, l'allèle *PfATP6* 769N, a été récemment associé à la diminution de la sensibilité à l'artémisinine dans une étude d'efficacité aux CTA. Cette mutation représente une spécificité géographique, car il a jusqu'ici seulement été détecté en Amérique du Sud.

### III.4.2.4. Résistance à la luméfantrine :

La mutation *Pfmdr1* N86 a été associée à une réduction de la sensibilité à la luméfantrine *in vitro*<sup>8, 9</sup>. Cependant, il a été suggéré que la sélection de la mutation *Pfmdr1* N86 peut représenter le marqueur de tolérance à la luméfantrine<sup>73</sup>.

## III.5. 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*.

### III.5.1. Tests *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, ce sont les micro-tests qui sont actuellement utilisés. On distingue:

#### III.5.1.1. Tests optiques:

Le micro-test OMS et le semi-micro-test de Le Bras<sup>74, 75</sup> 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 CO<sub>2</sub> et de l'O<sub>2</sub>, pendant 24 à 48 heures. Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice

(CMI), pour le micro-test OMS, et en concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) ou 90% (CI<sub>90</sub>) pour le semi-micro-test.

### III.5.1.2. Tests isotopiques:

Il s'agit du micro-test isotopique de Desjardins et le semi-micro-test isotopique de Le Bras et Deloron<sup>76,77</sup>.

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'hypoxanthine 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 CI<sub>50</sub> ou en CI<sub>90</sub>.

### III.5.1.3. Les Nouveaux tests:

Les tests récemment mis au point sont :

- Le micro-test de MARKII
- Le test de MAKLER
- Les tests moléculaires

#### III.5.1.3.1. Micro-test de MARKII:

C'est une modification du macro-test par les mêmes auteurs qui se sont inspirés de la technique de la culture continue de TRAGER et JENSEN. Il consiste à mettre en culture pendant 24 à 48 heures à 37°C sur des plaques de titration traitées avec différents antipaludiques à doses croissantes. Les kits sont fournis par l'OMS et donnent des doses critiques de sensibilité pour chaque médicament.

#### III.5.1.3.2. Test de MAKLER<sup>78</sup>:

C'est un test enzymatique fondé sur la capacité de la lactate déshydrogénase (LDH) de *P. falciparum* à utiliser rapidement le 3-acétylpyridine adénine dinucléotide dans la réaction aboutissant à la formation du pyruvate à partir du L-lactate. Le test vise à détecter et à quantifier la pLDH par une technique enzymatique, en présence de l'antipaludique étudié.

Il existe une corrélation entre la densité parasitaire et l'activité de la pLDH.

### III.5.1.3.3. Tests moléculaires: Technique de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) :

#### ✓ Principe :

Cette technique permet d'évaluer le niveau de mutation du parasite. Elle consiste en une amplification exponentielle de l'ADN plasmodial en présence d'une enzyme (Taq polymérase), d'amorces spécifiques et d'un milieu tampon. La révélation se fait par électrophorèse de l'ADN amplifié sur gel d'agarose à 2%.

#### ✓ Technique :

Cette technique décrite en 1985 par K. Mullis et al. permet une amplification enzymatique *in vitro* de l'ADN initial. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent de l'ADN à amplifier. Connaissant ces deux séquences, on synthétisera deux oligonucléotides qui ont deux fonctions. La première étant la reconnaissance de la partie de l'ADN à amplifier et le deuxième servant d'amorces à la Taq polymérase.

Des cycles successifs sont entrepris, chaque cycle comprenant :

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

Cette technique a eu de l'ampleur avec la découverte en 1988 d'un ADN polymérase non inactivé par la chaleur. Il s'agit de la Taq polymérase (isolée d'une bactérie thermophile adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude (" *thermus aquaticus* "). Avec la Taq polymérase on peut effectuer un nouveau cycle (dissociation, Association des amorces, réplication de l'ADN) sans avoir à ajouter chaque fois de l'enzyme.

Il est maintenant possible d'automatiser ces réactions grâce à des thermocycleurs programmables en température et en temps.

### III.5.2. 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. Actuellement l’OMS propose des suivis de 28, 28, 42, 42 et 63 jours respectivement pour la chloroquine, l’amodiaquine, la sulfadoxine-pyriméthamine, la luméfantrine-artémether (Coartem®) et la méfloquine<sup>79</sup>.

- **Test standard de l’OMS de 28 jours**<sup>80</sup>:

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.

## **IV. METHODOLOGIE :**

### **IV.1. Lieu d'étude :**

L'étude s'était déroulée dans trois localités: Faladjé, Kollé, et Bancoumana.

#### **IV.1.1. Faladjé :**

##### **1) Limites géographique de la commune rurale de N'TJIBA :**

La commune de N'TJIBA est limitée à l'est par la commune de Jedougou à l'ouest par la commune de Bozofala (Baoulé), au nord par le village de Daban, au sud par la commune de Kalifabougou.

##### **2) Situation géographique du village de Faladjé :**

Faladjé (le chef lieu de la commune de N'TJIBA) est situé dans la zone de savane sud soudanienne du Mali. Le village est limité au Nord par Boula, au Sud par Konkou-Zambougou, à l'Ouest par Sognebougou et à l'Est par N'teguedo. Le village est situé à 60 Km de Kati et 80 Km de Bamako.

##### **3) Climat et végétation :**

- Le climat est caractérisé par deux saisons : la saison sèche, et la saison pluvieuse. En saison pluvieuse les habitants s'occupent des travaux champêtres et en saison sèche des travaux d'aménagement. 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) Hydrographie :**

On y rencontre quelques cours d'eau saisonniers. Nous avons le Koba (grand marigot) au Nord du village, le Tomba à l'est et la mare Taya à l'ouest du village. Les cours d'eau sont exploités par les femmes en saison sèche.

On y fait des cultures maraîchères (gombo, oignon, aubergine, haricot, chou, salade, betterave, etc.). La pêche est inexistante.

### **5) Population :**

Mosaïque ethnique, avec environ ses 2910 habitants selon le recensement démographique du Département d'épidémiologie des affections parasitaires (DEAP) de décembre 2001, le 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. C'est ainsi que l'islam occupe presque les 70 %, le christianisme, 20 % et l'animisme 10 % de la population locale.

Avec une population de 2910 habitants le village de Faladjé comprend cinq quartiers : Bamanankin, Doura-kin, la Mission, Djélibabougou et le quartier des eaux et forêts.

A la sortie du village, l'habitat de façon générale en banco est fait en terrasse, en particulier nous pouvons rencontrer des concessions en tôle et rectangulaires.

### **6) Activité économique :**

La vie économique est basée sur l'agriculture et l'élevage. Les 90 % de la population pratiquent l'agriculture qui demeure la principale activité.

Le marché local offre des produits agricoles comme le sorgho, le maïs, l'arachide, le mil, le riz, les légumes (salade, chou,), les tubercules (pomme de terre, manioc, patate, igname,). Les fruits sont produits en fonction des saisons (mangue, goyave, pastèque, melon).

L'élevage, seconde activité, reste essentiellement le domaine de prédilection des peuhls, qui élèvent les bovins, les ovins, les caprins.

Il faut noter que l'élevage des petits ruminants (ovins, caprins, équidés et volaille) est pratiqué par les habitants.

Les porcins sont élevés par certaines familles chrétiennes. Ajoutons que le marché local hebdomadaire est alimenté par des produits (céréales, tissus, cola, poisson fumé produits pharmaceutiques) provenant de Kati et Bamako.

### **7) 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, en plus le centre dispose d'une maternité bien équipée, les vaccinations sont rigoureusement suivies au niveau de Faladjé.

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

#### **IV.1.2. Kollé :**

##### **1) Situation géographique :**

Kollé est situé sur la route reliant Bamako à Kangaba-Kankan (Guinée). C'est un village de l'arrondissement de Siby, cercle de Kati, région de Koulikoro, dans la zone soudano-sahélienne. Il est situé au sud du chef lieu d'arrondissement Siby), à une distance de 17 km. Il est limité au sud par le fleuve Niger à 9 km, à l'ouest par Samako 6 km, au sud-ouest Bancoumana distant de 3 km, au nord par Ténéya, nord-est par Coursalé distant de 7 km, et à 57 km au sud ouest de Bamako.

On note à l'ouest, une colline avec une superficie de 160 hectares, par contre le nord est limité par un plateau qui couvre une superficie de 1510 hectares. Le relief est suffisamment plat et constitué de plaine qui couvre la majeure partie (environ 5020 hectares ) avec une zone inondable et une zone exondée constituant de larges gîtes larvaires d'anophèles en saison de pluies.

##### **2) Climat et végétation :**

Kollé a un climat qui est de type soudanien, la mousson (vent maritime) l'harmattan (vent continental), se partagent l'année.

On distingue deux saisons :

- L'une pluviométrique qui va de mai à octobre avec le maximum de pluie en août et septembre.
- Et l'autre, sèche qui est fraîche de novembre à janvier et chaude de février à avril.

La végétation est une savane arborée composée de :

- Plantes herbacées : *Penisetum pedicellatum*, *Cymbopogon giganteus*, *Hyperhenia dissolita*, *Boudetia togolensis*, *Andropogon sp.*
- Plantes ligneuses : *Combretum sp* ; *acacia sp* ; *Khaya senegalensis*, *Farkia biglobosa*, *Adansonia digitata*, *Bautina sp* ; *Tamarindus indica*, *Vitellaria paradoxa*, *Guiera senegalensis*
- Plante lianexentes : *Saba senegalensis*.

### **3) Population :**

La population estimée à 2500 Habitants environ est constituée essentiellement de Malinkés et quelques Peulhs selon le recensement socio-démographique.

La religion musulmane est la plus dominante.

### **4) Activité économique :**

L'agriculture, l'élevage et le commerce représentent les principales activités économiques des habitants de Kollé.

### **5) Infrastructures socio-sanitaires :**

Le village dispose d'un centre d'alphabétisation, d'une medersa, d'une école primaire d'enseignement publique.

Il dispose également d'un dispensaire comprenant une salle d'accouchement dirigé par un infirmier et une matrone dont le personnel est entièrement à la charge du projet.

### **IV.1.3. Bancoumana :**

C'est un village rural situé à 60 Km au sud ouest de la capitale Bamako dans la savane Nord soudanienne du Mali. Il fait parti de la commune de Siby, cercle de Kati région de Koulikoro. Il se trouve sur la route reliant Bamako à Kangaba - Kankan (Guinée).

Il se trouve à 5 km du fleuve Niger sur sa rive gauche. A l'est, se trouve le village de Kollé. A l'ouest, il est limité par le village de Samako et au sud par le village de Dankassa sur la rive gauche du fleuve Djoliba.

Il est situé à 8°20 de longitude ouest et 12°20 de latitude Nord. Au nord, on note des prolongements des monts mandingues, au sud une grande plaine inondable propice à la culture du riz et du tabac, et la mare sacrée qui forme par endroit d'innombrables gîtes larvaires en saison pluvieuse. En plus du fleuve Niger à 5 km, le village est arrosé par un cours d'eau permanent, la Koba, situé à 500 m à l'ouest.

Le climat est de type soudanien. La mousson et l'harmattan se succèdent au cours de l'année.

On distingue deux saisons:

❖ Une saison pluvieuse qui va du mois de mai au mois d'octobre avec le maximum de pluie en août et septembre.

❖ Une saison sèche fraîche (novembre-janvier) et une saison sèche chaude (février - avril).

La végétation est une savane arborée typique du climat soudanien. La population a été estimée à environ 10 000 habitants d'après le recensement réalisé par l'équipe du DEAP en 2002. Elle est

majoritairement malinké, avec quelques peuhls et bambaras. L'islam est la religion dominante. Il existe cependant des chrétiens et des animistes.

On y trouve deux types d'habitation : des cases rondes ou rectangulaires en banco avec toits en chaumes et /ou en tôles. L'agriculture est la principale activité économique avec l'élevage et l'artisanat.

Le village dispose de:

- ✓ Une école fondamentale, construite avec l'aide de l'ONG Plan international et la participation de la communauté villageoise.
- ✓ Un dispensaire devenu un Centre de Santé Communautaire (CSCOM) sous la direction d'un médecin dans le quel est logé l'équipe de Bancoumana du MRTC.

#### **IV.2. Période et type d'étude :**

Nous avons réalisé une étude prospective entre octobre et novembre 2005.

#### **IV.3. Population d'étude :**

La population concernée par cette étude était des enfants de la tranche d'âge de 6 à 59 mois.

##### **✓ Critères d'inclusion:**

Les critères d'inclusion étaient basés sur la définition stricte des cas à savoir:

- être âgé de 6 à 59 mois résidant dans ces villages depuis au moins 6 mois
- avoir des signes cliniques évocateurs d'un accès palustre simple
- avoir une température axillaire non corrigée comprise entre 37,5°C et 39°C
- avoir une goutte épaisse positive mono-spécifique à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 2000 et 200000Tf/mm<sup>3</sup> de sang
- ne pas avoir d'autres pathologies pouvant compromettre l'inclusion
- avoir l'assentiment éclairé des parents.

#### **IV.4. Echantillonnage et taille de l'échantillon:**

Puisqu'il s'agissait d'une étude exploratoire, nous nous sommes fixés une taille de 50 échantillons. Nous avons reçu 59 échantillons de malades qui ont donné un taux de succès au test de chimiosensibilité 79,7% (47/59).

#### **IV.5. Méthodes de collecte des données:**

Les données ont été collectées dans les trois villages dans le cadre d'études des marqueurs moléculaires de la quinine et de la sulfadoxine-pyriméthamine à Kollé, à Faladjé et à Bancoumana.

Tous les malades ont bénéficié d'un examen clinique complet et de prélèvement de sang pour réaliser les examens biologiques.

Les données ont été collectées au poste de biologie à partir de prélèvements directs de sang capillaire et de sang veineux sur tube EDTA. Ces prélèvements ont servi à la confection de la goutte épaisse, au frottis mince, à la mesure du taux d'hémoglobine, aux confettis pour la PCR, à l'obtention du plasma et à la réalisation du test pLDH ELISA (mesure des  $CI_{50}$ ).

#### **IV.6. Déroulement de l'enquête :**

L'équipe de recherche était divisée entre trois postes de travail. Au poste n°1, détenu par l'infirmier de l'équipe, se faisait la sélection de tous les enfants cibles qui avaient des signes évocateurs de paludisme. Ces enfants ainsi sélectionnés étaient envoyés au poste n°2 munis d'une fiche individuelle d'identification pour une goutte épaisse et un frottis mince.

Après coloration et lecture de la goutte épaisse, le résultat était porté sur les fiches d'identification et envoyé au poste n°3 des médecins cliniciens.

Lorsque les conditions d'inclusion étaient réunies (parasitémie, espèce plasmodiale obtenue de l'assentiment...), le médecin en charge des inclusions décidait d'inclure le sujet dans le protocole. Alors il était reconduit au poste n°2 pour le prélèvement de sang veineux. Tous les cas hors protocole étaient pris en charge par un autre médecin.

#### **IV.7. Techniques de laboratoire:**

##### **IV.7.1. Examens parasitologiques:**

La recherche des hématozoaires du paludisme a été effectuée sur la goutte épaisse et sur le frottis mince. La goutte épaisse a servi à la détermination de la densité parasitaire (DP). Quant au frottis mince, il a été utilisé pour déterminer l'espèce plasmodiale.

##### **IV.7.2. Examen hématologique :**

L'examen hématologique a permis la mesure du taux d'hémoglobine à l'aide de « HemoCue B-Hemoglobin Analyzer ». Le protocole est celui de l'OMS, 1982<sup>81</sup>.

### **IV.7.3. Etudes de biologie moléculaire:**

Les études moléculaires ont été faites dans les locaux de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance (MEDRU) du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP). Pour cela, le matériel biologique utilisé, était l'ADN plasmodial extrait à partir des papiers confettis réalisés sur le terrain.

#### **IV.7.3.1. Principe général de la PCR :**

Le principe de cette technique moléculaire est d'utiliser de manière répétitive l'une des propriétés de l'ADN polymérase, celle de pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'une amorce. Les acteurs de la PCR sont essentiellement l'ADN, deux amorces (un sens et un anti-sens), une enzyme (la Taq polymérase) et les 4 nucléotides: dGTP, dATP, dTTP, dCTP.

La réaction correspond à la succession d'un certain nombre de cycles comportant chacun 3 étapes : une dissociation (dénaturation), une association (hybridation) et une élongation (extension). Les produits d'amplification sont ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose contenant du Bromure d'Ethidium.

#### **IV.7.3.2. Modes opératoires normalisés pour la confection d'un confetti (papier buvard):**

##### **a. Principe :**

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

##### **b. Echantillon et lieux 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 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> doigt de la main gauche qui doit être indemne de toute pathologie.

##### **c. 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, stylo, agrafeuse, scotch type OMS, insecticide, cantine sous clé.

**d. 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)
- Incrire 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 vaccino style stérile le dit 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.

**e. Gestion du confetti :**

Après séchage, le confetti est logé dans une enveloppe portant les mêmes spécifications que le confetti. Le tout est gardé soigneusement dans une cantine sous clefs à l'abri de la poussière, des insectes et des rongeurs.

**IV.7.3.3. Modes opératoires normalisés pour l'extraction de l'ADN plasmodial par la méthode de méthanol :**

**1. Principe :**

Il consiste à extraire l'ADN de *P. falciparum* des confettis en utilisant le méthanol.

**2. Matériel et réactifs:**

Le matériel utilisé pour l'extraction de l'ADN plasmodial se composait de: papier buvard, gants stériles, ciseaux, micropipettes de 200 et 1000 µl, embouts de 200 et 1000 µl, tubes de 500 µl, tubes de 1,5 ml, plaque chauffante, agitateur, papier hygiénique, méthanol, eau stérile, marqueurs à bout fin indélébile, minuterie, portoir, congélateur à -20 °C, becher, poubelle.

### **3. Contrôle de qualité :**

Respecter rigoureusement le protocole d'extraction et tester le solvant d'extraction (eau) comme un témoin négatif au cours de la PCR d'essai. Contrôler la température en sorte que les aérosols ne passent d'un tube à un autre entraînant un inter contamination.

### **4. Mode opératoire :**

- Porter des gants stériles
- Identifier les tubes de 500 µl conformément aux numéros des confettis à traiter
- Découper et laisser tomber approximativement 4 morceaux de 3 mm<sup>2</sup> du confetti dans le tube Eppendorf correspondant.
- Ajouter 75 à 100 µl de méthanol dans chaque tube contenant les morceaux de confettis préalablement découpés de manière à les immerger entièrement
- Recouvrir les tubes ouverts à l'aide de papier hygiénique et les laisser incuber pendant 15 min à la température ambiante du laboratoire
- Puis, verser le méthanol contenu dans les tubes sans faire tomber les morceaux de confettis et les sécher complètement sous vide ou à l'air libre
- Après séchage, ajouter dans chaque tube 150µl d'eau stérile ou dé ionisée puis les fermer
- Mettre 150µl de l'eau utilisée pour l'extraction dans un tube vide sans confettis qui serviront de contrôle négatif pour cette eau d'extraction.
- Chauffer les tubes dans un bloc chauffant pendant 15 min entre 95-100°C. Agiter les tubes toutes les 5 minutes pendant l'incubation
- Enfin, stocker les ADN ainsi extraits dans un congélateur à -20°C après les avoir refroidi sous température ambiante

#### IV.7.3.4. Mise en évidence des génotypes *Pfprt* K76T, *Pfmdr1* N86Y, *PfATPase6* S769N par restriction enzymatique :

##### 1) Principe :

Une double amplification (double PCR = Nested-PCR ou PCR nichée) d'une portion du gène susceptible de comporter la mutation cible est tout d'abord réalisée ; le produit de la première amplification étant utilisé pour effectuer la seconde.

L'ADN extrait des confettis étant de faible quantité, la PCR nichée permet d'obtenir des produits de PCR détectable sur gel d'agarose.

A chaque PCR, des amorces spécifiques par point de mutation sont utilisées. Les génotypes des gènes *Pfprt*, *Pfmdr1*, *PfATPase6* sont ensuite déterminés par restriction enzymatique au niveau des codons 76 pour *Pfprt*, 86 pour *Pfmdr1*, 769 pour *PfATPase6*.

##### 2) Echantillon :

Les échantillons sont constitués de l'ADN extrait des confettis au méthanol.

Témoins positifs du codon sauvage : 3D7 pour *Pfprt* et *Pfmdr1*

Témoins positifs du codon mutant : Dd2 pour *Pfprt* et *Pfmdr1*

Les témoins locaux (un sauvage et un mutant) ont été utilisés pour *PfATPase6*.

##### 3) Matériel :

La mise en évidence de ces mutations a nécessité ce matériel ci-après : ADN plasmodial, gants stériles, tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 15 ml, 50 ml), pipettes (2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl), embouts stériles (2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl), ciseaux, agitateur électrique, portoirs, chronomètre, papiers hygiéniques, papiers aluminium, marqueurs, bac de migration, moule et peigne à gel, scotch à papier, para-film, cahier de paille, bics, centrifugeuse électrique, thermocycleur, balance pèse produit, erlenmeyer, appareil photo UV, film polaroid 667, éprouvette graduée de 100 ml, spectrophotomètre, hotte, réfrigérateur-congélateur, incubateur, poubelle.

##### 4) Réactifs:

- **Pour déterminer le génotype au codon 76 de *Pfprt*:**

1. Paire d'amorces utilisées pour la 1<sup>ère</sup> amplification :

P1 : CCGTTAATAATAAATACACGCAG

P2 : CGGATGTTACAAAACACTATAGTTACC

La taille attendue du produit de PCR est de 537 pb (paire de base).

2. Paire d'amorces utilisées pour la 2<sup>ème</sup> amplification:

D1: TGTGCTCATGTGTTTAAACTT

D2: CAAAACACTATAGTTACCAATTTTG

La taille attendue pour les produits de PCR est de 134 pb.

3. Enzyme de restriction utilisée : *ApoI*, l'enzyme coupe les souches de génotypes sensibles en 100+34 pb.

• **Pour déterminer le génotype au codon 86 de *Pfmdr1***

1. Paire d'amorces utilisées pour la 1<sup>ère</sup> amplification :

MDR-1 : ATGGGGTAAAGAGAGAAAGA

MDR-2 : AACGCAAGTAATACATAAAGTCA

La taille attendue du produit de PCR est de 603 pb.

2. Paire d'amorces utilisées pour la 2<sup>ème</sup> amplification:

MDR-3 : TGGTAACCTCAGTATCAAAGAA

MDR-4 : ATAAACCTAAAAAGGAACTGG

La taille attendue du produit de PCR est de 521pb.

3. Enzyme de restriction utilisée : *AflIII*, l'enzyme coupe les souches de génotypes mutants (226pb).

• **Pour déterminer le génotype au codon 769 de *PfATPase6* :**

1. Paire d'amorces utilisées pour la 1<sup>ère</sup> amplification :

Amorce atp6\_oF: AACAAATGGATATGAAGCTATA

Amorce atp6\_oR: CATATTTGTGTATTTTATTATTTG

La taille attendue du produit de PCR est de 708 pb

2. Paire d'amorces utilisées pour la 2ème amplification

Amorce atp6\_nF : GAAACTTATGAGTGTTATTGTTG

Amorce atp6\_nR : TGTATTCTTAATATTTAAATCTTTAgTA

La taille attendue du produit de PCR est de 244 pb

3. Enzyme de restriction utilisée : *ScaI*, l'enzyme coupe les souches de génotype sauvage 217 pb + 27 pb et ne coupe pas le mutant.

#### 5. Autres réactifs utilisés :

Méthanol, agarose, bromure d'éthidium, 10X tampon de PCR 2,5 Mg<sup>2+</sup>, dNTP, chlorure de magnésium , Taq polymérase, eau dé ionisée, eau stérile, Tris Borate EDTA (TBE), sérum albumine de bovins (BSA), tampon de digestion, , colorant de migration (Dye).

#### 6. Méthodes :

##### ✓ 1<sup>ère</sup> amplification:

- Incrire le numéro d'identification du confetti sur le tube eppendorf
- Préparer le milieu réactionnel en fonction du nombre d'échantillons à traiter (**tableau I**)
- Repartir dans chaque tube 20µl du milieu réactionnel
- Ajouter 5µl d'ADN dans chaque tube correspondant
- Placer les tubes bien fermés dans le thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié (**Tableau II ; III ; IV**).

**Tableau I:** Composition du milieu réactionnel pour la 1<sup>ère</sup> amplification pour un volume total de 25 µl.

Composant	Concentration finale (X)
H <sub>2</sub> O	-
5X Tampon	2,5mM
10X dNTPs	200uM
100X Amorces	1uM
Taq Polymérase	1UI
ADN plasmodial	-
TOTAL	-

**Tableau II:** Programme de la première amplification de *Pfprt*

	Etapas	Température (°C)	Temps
1	Dissociation initiale	94	3 min
2	Dissociation	94	30 secs
3	Association	56	30 secs
4	Elongation	60	1 min
5	Retourner à l'étape 2, 44 fois		
6	Elongation finale	60	3 min
7	Fin du programme	4	Infini

**Tableau III:** Programme de la première amplification de *Pfmdr1*

	Etapes	Température (°C)	Temps
<b>1</b>	Dissociation initiale	95	3 min
<b>2</b>	Dissociation	92	30 secs
<b>3</b>	Association	48	45 secs
<b>4</b>	Elongation	48	1 min
<b>5</b>	Retourner à l'étape 2, 44 fois		
<b>6</b>	Elongation finale	60	5 min
<b>7</b>	Fin du programme	4	Infini

**Tableau IV:** Programme de la première amplification de *PfATPase6*.

	Etapes	Température (°C)	Temps
<b>1</b>	Dissociation initiale	95	3 min
<b>2</b>	Dissociation	92	45 secs
<b>3</b>	Association	55	45 secs
<b>4</b>	Elongation	68	45 secs
<b>5</b>	Retourner à l'étape 2, 44 fois		
<b>6</b>	Elongation finale	72	5 min
<b>7</b>	Fin du programme	4	Infini

✓ **2<sup>ème</sup> amplification :**

- Inscrire le numéro du tube de la première amplification sur le tube de la 2<sup>e</sup> amplification;
- Préparer le milieu réactionnel pour la 2<sup>ème</sup> amplification en fonction du nombre d'échantillons à traiter (**tableau V**).
- Repartir dans chaque tube 24 µl du milieu réactionnel;
- Ajouter 1µl du produit de la 1<sup>ère</sup> amplification dans chaque tube correspondant soit un total de 25 µl par réaction;

- Placer les tubes dans le thermocycleur pour la 2<sup>ème</sup> amplification suivant le programme approprié (**tableau VI ; VII ; VIII**)

**Tableau V:** Composition du milieu réactionnel pour la deuxième amplification pour un volume total de 25 µl.

Composants	Concentrations finales(X)
H <sub>2</sub> O	-
5X Tampon	2,5mM
10X dNTPs	200uM
100X Amorces	1uM
Taq polymérase	1UI
Produit PCR1	-
TOTAL	-

**Tableau VI:** Programme de la deuxième amplification de *Pfcr1*

	Etapes	Température (°C)	Temps
1	Dissociation initiale	95	5 min
2	Dissociation	92	30 secs
3	Association	48	30 secs
4	Elongation	65	1 min
5	Retourner à l'étape 2, 25 fois		
6	Elongation finale	65	3 min
7	Fin du programme	4	Infini

**Tableau VII:** Programme de la deuxième amplification de *Pfmdr1*

	Étapes	Température (°C)	Temps
<b>1</b>	Dissociation initiale	95	5 min
<b>2</b>	Dissociation	92	30 secs
<b>3</b>	Association	48	30 secs
<b>4</b>	Elongation	65	1 min
<b>5</b>	Retourner à l'étape 2, 15-20 fois		
<b>6</b>	Elongation finale	65	3 min
<b>7</b>	Fin du programme	4	Infini

**Tableau VIII:** Programme de la deuxième amplification de *PfATPase6*.

	Étapes	Température (°C)	Temps
<b>1</b>	Dissociation initiale	95	3 min
<b>2</b>	Dissociation	92	30 sec
<b>3</b>	Association	54	45 secs
<b>4</b>	Elongation	68	45 secs
<b>5</b>	Retourner à l'étape 2, 29 fois		
<b>6</b>	Elongation finale	72	5 min
<b>7</b>	Fin du programme	4	Infini

- Enlever les tubes de la machine et les placer à +4°C dans le réfrigérateur
- Migrer les produits de la deuxième amplification sur un gel d'agarose à 2%
- Le résultat est validé lorsque les conditions suivantes sont remplies :
  1. Conformité de la taille du produit de la deuxième amplification avec celle attendue ;
  2. Concordance des contrôles positifs (sauvage et mutant) par rapport à ceux qui sont énoncés dans le protocole ;

3. L'absence effective de bandes au niveau des contrôles négatifs.
4. Après validation des produits de la deuxième amplification, on procède à la digestion.

✓ **Digestion enzymatique du produit de la 2<sup>ème</sup> amplification :**

- Incrire sur les tubes les numéros des différents échantillons
- Préparer le milieu réactionnel pour la digestion (**tableau IX**)
- Distribuer dans chacun des tubes correspondants 15 µl de ce mélange réactionnel
- Ajouter 5 µl du produit de la 2<sup>ème</sup> amplification dans les tubes correspondant et les fermer
- Mettre en incubation dans un thermocycleur ou un incubateur ou un bain-marie les tubes à 50°C pour l'enzyme *ApoI* et à 37°C pour les enzymes *AflIII*, *Scal* pendant 6 heures au minimum.
- Enlever les tubes du thermocycleur après le temps requis et les placer à + 4°C dans un réfrigérateur ;
- Procéder à la migration sur gel d'agarose à 2%.

**Tableau IX:** Composition du milieu réactionnel de digestion enzymatique pour un volume total de 20 µl

Réactifs	Volume (µl)		
	<i>Pfmdr1 N86Y</i>	<i>Pfcrt K76T</i>	<i>PfATPase6 S769N</i>
10X NEB Tampon N°3	2	2	2
BSA	0,2	0,2	-
Enzyme ( <i>Apo I</i> )		0,25	
Enzyme <i>Scal</i>		-	0,25
Enzyme <i>AflIII</i>	0,25		
H <sub>2</sub> O	12,55	12,55	12,75
ADN PCR2	5	5	5
Total	20	20	20

✓ **Electrophorèse:**

- La migration se fait sur gel d'agarose à 2%:
- Dissoudre 2g d'agarose dans 100ml de TBE à 0,5X (solution de tampon à une concentration de 0,5)
- Faire bouillir ce mélange
- Ajouter 5 µl de Bromure d'éthidium dans l'agarose bouillie ;
- Couler le gel dans la moule et attendre sa solidification ;
- Enlever les peignes et placer le gel avec le moule dans le bac de migration contenant le TBE à 0,5X ; le gel doit être (immergé) ;
- Découper le papier parafilm;
- Placer sur le parafilm 3 µl de colorant (Dye) pour chaque échantillon à migrer ;
- Placer 5 µl du marqueur de poids moléculaire dans le 1<sup>er</sup> puits ;
- Mélanger 5 µl de chaque échantillon au Dye puis loger dans le puits le mélange ;
- Faire migrer à 100 Volts pendant 30 – 45 min ;
- Sortir le gel du moule et le placer sur l'appareil à ultra violet (UV) pour la photographie ;
- Marquer devant chaque bande le numéro de l'échantillon correspondant.

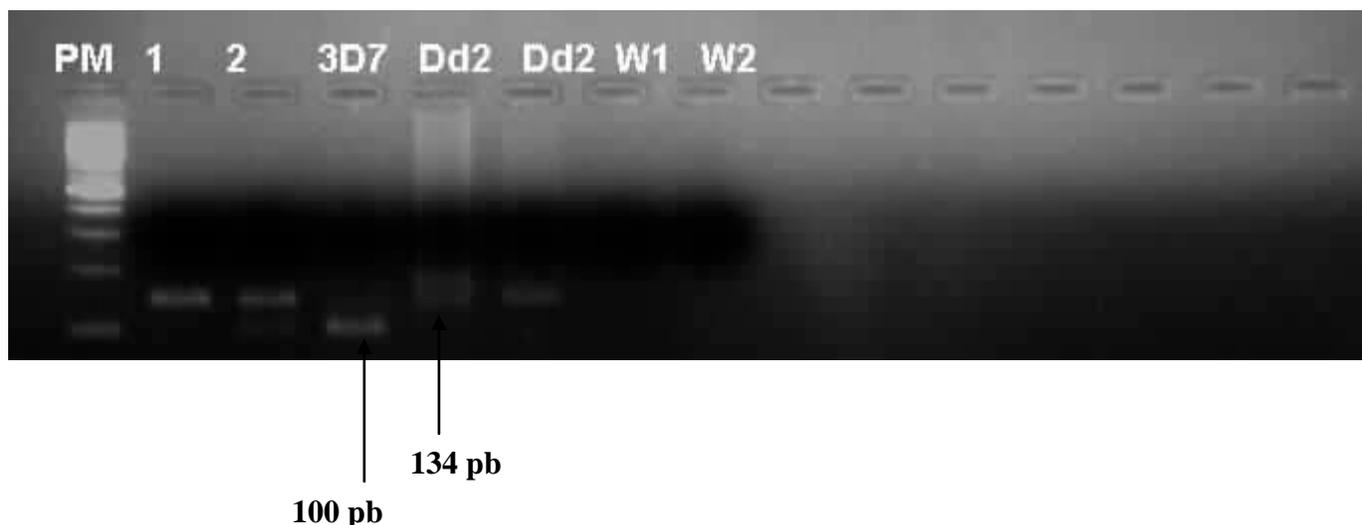
✓ **Interprétation de la photographie :**

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 des contrôles positifs (sauvage et mutant) avec ceux qui sont énoncés dans le protocole ;
3. L'absence effective de bandes au niveau des contrôles négatifs.

Une fois ces conditions remplies, un échantillon est jugé sauvage lorsque la taille de sa bande correspond à celle du contrôle sensible. Il est dit mutant quand la taille du produit digéré est au

même niveau que le contrôle résistant. En revanche le caractère mixte est évoqué devant un échantillon présentant deux bandes correspondant contrôles sensible et mutant.



**Figure 9 : Photographie de gel d'agarose à 2% de la digestion de Pfcrt K76T (Source MRTC/MEDRU)**

**Légende :**

Les échantillons vont du numéro 1 à 5

3D7 : Le témoin positif sensible

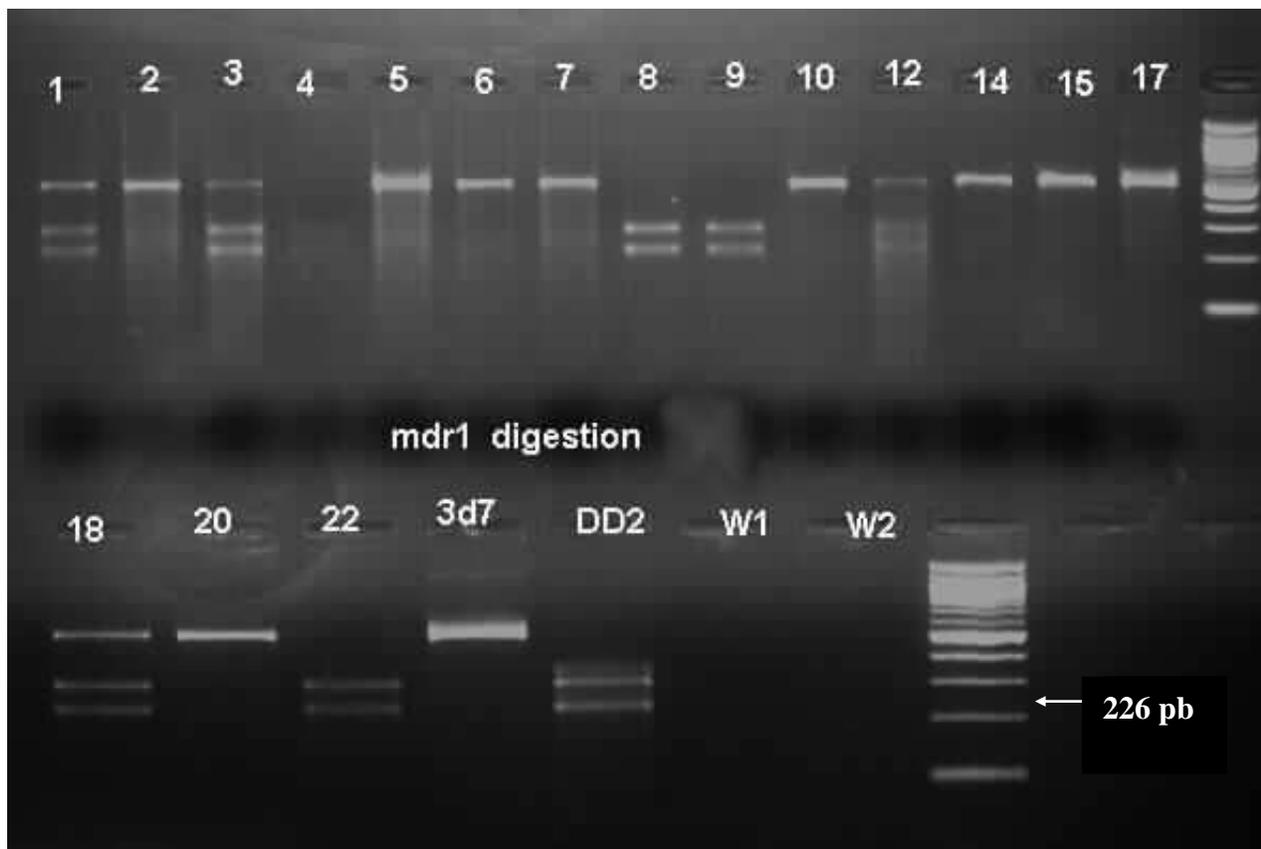
DD2 : Le témoin positif résistant

W1 : Le témoin négatif de la première amplification

W2 : Le témoin négatif de la deuxième amplification

Taille normale du produit= 100 paires de base.

PM: Poids Moléculaire.



**Figure 10 :** Photographie de gel d'agarose à 2% de la digestion de *PfmDr1* N86Y (Source : MRTC/MEDRU)

**Légende :**

Les échantillons vont du numéro 1 à 22

3D7 : Le témoin positif sensible

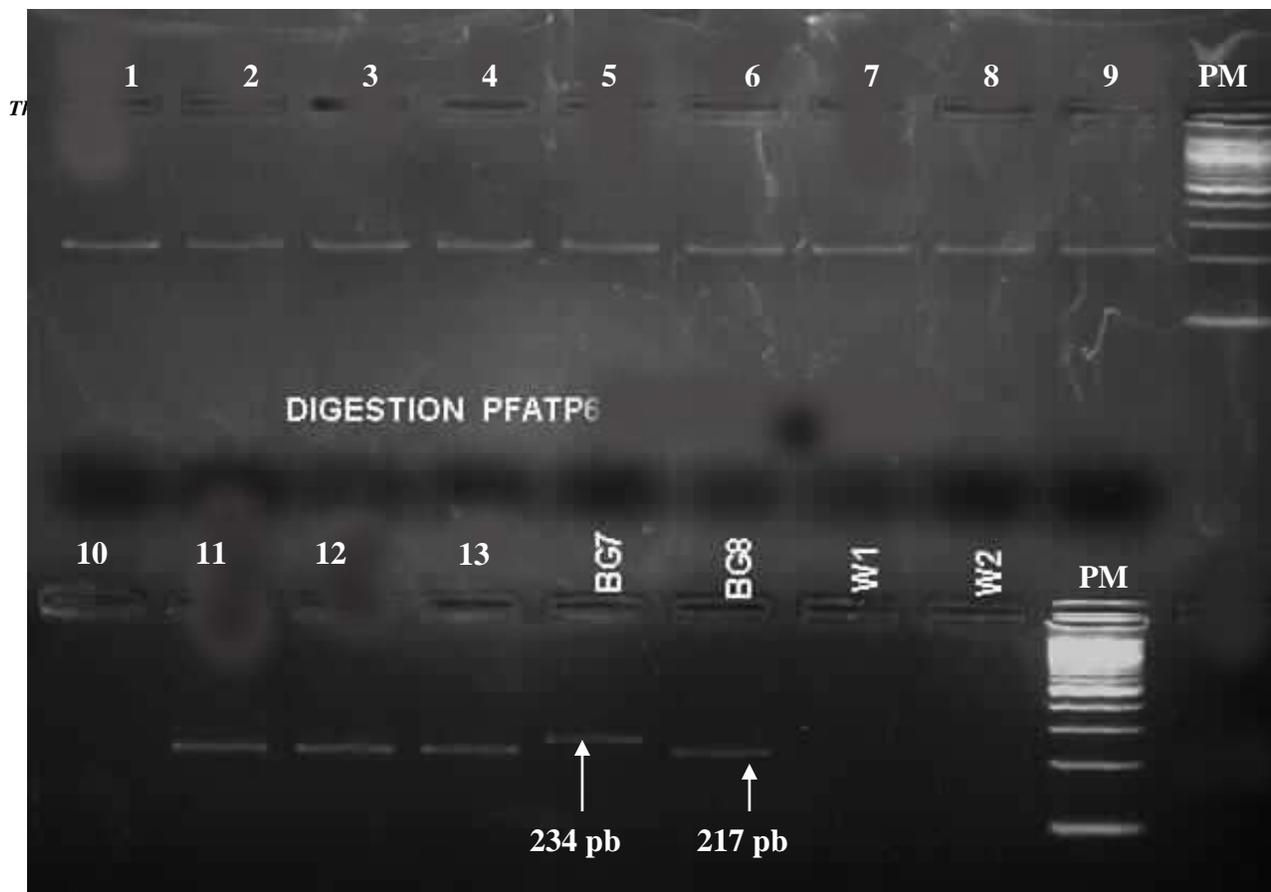
DD2 : Le témoin positif résistant

W1 : Le témoin négatif de la première amplification

W2 : Le témoin négatif de la deuxième amplification

Taille normale du produit= 226 paires de base

PM: Poids Moléculaire.



**Figure 11 : Photographie de gel d'agarose à 2% de la digestion *PfATPase6* S769N (MRTC/MEDRU)**

**Légende :**

Les échantillons vont du numéro 1 à 13

BG7 : Le témoin local positif résistant

BG8 : Le témoin local positif sensible

W1 : Le témoin négatif de la première amplification

W2 : Le témoin négatif de la deuxième amplification

Taille normale du produit= 217 paires de base.

PM : Poids Moléculaire

#### **IV.7.4. Etude de la chimiosensibilité *in vitro* de *P.falciparum*:**

##### **IV.7.4.1. Prélèvement :**

- Tube de prélèvement : 2 à 10 ml de sang total prélevés sur anticoagulant ACD (acide citrate dextrose) ou, à défaut, complexons (EDTA), Héparine, Citrate.
- Noter les conditions d'arrivée de l'échantillon sur la feuille de prescription (voir annexe) : température, délai de transmission (ne devrait pas excéder 72 h à 4°C ou 24 h à 24 h à température ambiante).

##### **IV.7.4.2. Matériels nécessaires à l'analyse :**

- Balance de précision
- Diluteur Microlab 510 B
- Réfrigérateur + 4 °C
- Congélateur à – 25 °C.
- Congélateur à – 80 °C
- Conteneur d'azote liquide à – 196 °C
- Microscope
- Hottes à flux lumineaire et aspirante
- Centrifugeuse
- Agitateur tournant
- Agitateur vibrant
- Incubateurs Cytoperm et Bestell B
- Système de transfert de pastilles de filtres + grilles + support
- Etuve thermosi sr 2000 à 37 °C
- Compteur à scintillation liquide

##### **IV.7.4.3. Matériels et Réactifs:**

#### **1. Examen microscopique des parasites :**

- Lames portes objets, lames
- Tubes Borel pour coloration et prisme de Borel
- Support en bois
- Giemsa
- Compte- cellules

## **2. Préparation de la verrerie pour culture :**

- Détergent Mucosol (5 l). Diluer 20 ml (2 bouchons de détergent Mucosol) dans 10 l d'eau du robinet, après usage, plonger la verrerie une nuit dans le mucosol dilué,
- Rincer à la main avec l'eau du robinet, rincé à l'eau distillée, sécher,
- Stériliser au poupin.

## **3. Préparation des solutions mères des antipaludiques :**

Une solution mère est préparée en mettant en solution la poudre pesée avec précision dans un solvant approprié tel que l'eau distillée, dans le méthanol ou dans l'éthanol, en fonction de la solubilité de chaque antipaludique.

Elles sont aliquotées en tubes en polypropylène de 5 ml et conservées dans le congélateur à -80° C.

### **• Matériel :**

- Pipettes à 2 traits à usage unique pour culture, stériles (1-2-5-10-25 ml).
- Sabote de pesée (3 cm) et fioles jaugées (10 à 250 ml) lavées au détergent pour culture, stériles
- Méthanol, éthanol, eau ultra pure (EUP), eau distillée stérile (AP-HP)
- Molécules antipaludiques

Pour chaque lot de plaque, un ou plusieurs tubes sont décongelés, utilisés pour préparer les dilutions en eau distillée, méthanol (MeOH) ou éthanol (EtOH) et jetés. Les solutions mères sont utilisables une année (Tableau XI).

**Tableau X** : Préparation des solutions mères des antipaludiques

Antipaludiques	Poids moléculaire	Concentration Solution mère (nM)	Pesée (mg)	Volume (ml), Solvant
Chloroquine di PO <sub>4</sub> Sigma C6628	516	255813	13,2	100, EUP*
Chloroquine di SO <sub>4</sub> Sigma C6628	418	3000000	62,70	50, H <sub>2</sub> O
Dihydroartémisinine Sigma 36,159-3	284,4	126582	3,6	100, Méthanol
Luméfantrine (benflumetol)	524	24809	1,3	100, Ethanol
Monodeséhyalamodiaquine HCl	399	152882	6,1	100, Méthanol

\*EUP: Eau ultra pure

NB: veiller éviter l'évaporation du solvant (qui doit être à 20 °C) durant la manipulation (surtout méthanol).

#### 4. Préparation des plaques de chimiosensibilité :

##### 4.1. Préparation des solutions filles des antipaludiques :

Les solutions filles de chaque antipaludique sont préparées dans le même solvant que les solutions mères respectives, à l'exception des dérivées de l'artémisinine qui sont dilués dans l'eau distillée.

- Sortir les solutions mères suffisamment à l'avance pour qu'elles soient à température ambiante.
- Vérifier à chaque fois tous les calculs des dilutions au préalable.
- Pour les prises d'essai des solutions, utiliser les pipettes stériles en plastique jetable.
- Les solutions filles des molécules étudiées sont préparées dans des fioles jaugées stériles.

**Tableau XI** : Préparation des solutions filles des antipaludiques

Molécule	Solvant	SF	SF1	SF2	SF3	SF4
CQ	Eau distillée	-	8,95/100 de SM	10/50 de SF 1	10/50 de SF2	12,5/50 de SF3
MDAQ	Eau distillée	-	8,97/100 de SM	10/50 de SF1	10/50 de SF2	12,5/50 de SF3
LUM	Ethanol	-	9,21/100 de SM	10/50 de SF1	10/50 de SF2	12,5/50 de SF3
DHART	Eau distillée	5/100 de SM	7,22/100 de SF	10/50 de SF1	10/50 de SF2	12,5/50 de SF3

Les volumes sont en ml.

#### 4.2. Distribution des solutions filles :

Les concentrations finales sont obtenues à partir des solutions filles par dilution dichotomique ou par volumes variables des solutions filles distribuées au moyen d'un diluteur volumétrique Microlab 510 B.

Les solutions de chloroquine, Monodeséthyl-amodiaquine, luméfantrine et dihydroartémisinine sont distribuées avec les programmes SF4-96 C, SF3-96 C, SF2-96 C et SF1-96 C en plaques 96 puits Falcon, en utilisant la seringue de 100 µl.

Pour toutes les molécules, les 3 premiers puits ne contiennent aucun antipaludique.

Distribuer la solution en commençant par SF4.

**Tableau XII** : Plan de plaque de 96 cupules, en concentration finale en nM :

0	0	0	CQ 12, 5	12,5	25	25	50	50	100	100	100
200	200	200	400	400	800	800	800	1600	1600	3200	CQ3200
0	0	0	MDAQ 7,5	7,5	15	15	30	30	60	60	60
120	120	120	240	240	240	480	480	960	960	1920	MDAQ1920
0	0	0	LUM 1, 25	1,25	2,5	2,5	5	5	10	10	10
20	20	20	40	40	40	80	80	160	160	320	LUM 320
0	0	0	DHART 0, 25	0,25	0,5	0,5	1	1	2	2	2
4	4	4	8	8	8	16	16	32	32	64	DHART 64

#### 4.3. Séchage et stockage des plaques :

Les solutions distribuées sont séchées à température ambiante sous une hotte à flux laminaire. Les plaques sont conservées à température ambiante à l'abri de la lumière et de l'humidité dans le placard jusqu'à l'utilisation, sauf les plaques contenant de la dihydroartémisinine qui sont conservées à +4°C. La péremption des plaques pré-dosées varie selon la stabilité des antipaludiques.

**Tableau XIII** : Les gammes de concentrations des antipaludiques

Antipaludiques	Concentrations finales en dilution dichotomique (nM)	Péremption des plaques
Chloroquine(CQ)	12,5 – 3200	1 an
Monodeséthylamodiaquine	7,5 – 1920	1 an
Dihydroartémisinine(DHART) et dérivés	0,25 – 64	6 semaines
Luméfantine	1,25 – 320	-

#### 4.4. Contrôle des plaques :

Réaliser un contrôle de qualité en testant deux souches clonées (W2 et 3D7) de chimiosensibilité différente.

- Les souches doivent être synchronisées au stade anneaux (> 90%)
- La parasitémie doit être comprise entre 0,30 et 0,50%,
- Diluer avec des hématies saines lavées pour atteindre cette parasitémie,
- Compléter la feuille « Résultats de l'étude de chimiosensibilité de la souche »,
- Incuber les plaques dans l'étuve Cytoperm,
- Collecter les plaques comme celles des patients,
- Lire les racks comme ceux des patients.

On doit obtenir un résultat situé dans la fourchette des  $CI_{50}$  acceptées; il est également possible de faire un contrôle par rapport à l'ancien lot d'un même isolat. Les clones de référence sont ceux fournis par MR4-ATCC (Manassas, VA, USA) congelés dans l'azote. Les résultats sont reportés sur la feuille récapitulative.

#### 5. Préparation des milieux de culture :

##### 5.1. Réactifs et matériels :

- Flacons stériles 180 ml
- Flacons stérile 30ml
- Unité de filtration standard 500 ml
- Eau stérile pour culture pyrolysée
- Milieu RPMI 1640
- HEPES (100g) SIGMA
- $NaHCO_3$  RP (250g) SIGMA

##### 5.2. Formule RPMI pour culture de *P.falciparum* :

Pour 5 litres de milieu RPMI 1640 tamponné (25 mM HEPES – 25 mM  $NaHCO_3$ ) :

- Dissoudre 52,2 g de milieu RPMI 1640 puis 29,8 g HEPES dans 2,5 L d'eau pyrolysée,
- Rajouter 210 ml d'une solution à 5% NaHCO<sub>3</sub> préparée la veille en eau pyrolysée, jetée après usage,
- Compléter à 5 litre avec de l'eau pyrolysée (pH 6,72),
- Stériliser à 0,2 microns avec une unité de filtration, (milieu stimulant la croissance d'un isolat que l'on veut adapter en culture : + 2 g/l glucose (dextrose), + 50 mg/l hypoxanthine ou inosine (pas dans le milieu pour chimio), + 0,25 mg acide après, + 30 mg L-glutamine en solution à pH neutre (à 4°C, t<sub>1/2</sub>= 130 j, à 37°C, t<sub>1/2</sub> = 6,8 j)).
- Etiqueter les flacons stériles 180 ml,
- Compléter 30-50 ml en pots stériles de 180 ml sous hotte à flux, étiqueter, dater (péremption 6 mois) et congeler rapidement à -20°C,
- Noter sur le cahier de paillasse les masses de réactifs, ainsi que leur lot,
- Contrôler la stérilité du milieu avec des tubes de bouillon glucosé tamponné (prêt à l'emploi) incube 4 jours à 37°C.

L'utilisation du RPMI après décongélation est d'une semaine.

### **5.3. RPSH = RPMI + 10% sérum humain stérile :**

- On utilise du sérum humain AB décomplémenté congelé (chambre - 20°C). Ils sont décongelés en les plaçant la veille à 4°C ou le jour même à 37°C jusqu'à décongélation puis placés dans la glace. S'assurer que les sérums ne soient pas décongelés-recongelés. Un aliquote ne devrait pas être décongelé une 3<sup>ème</sup> fois : décongélation de préparation du milieu = 1<sup>ère</sup> décongélation ; décongélation d'utilisation= 2<sup>ème</sup> décongélation,
- Chaque nouveau lot de sérum fait l'objet d'une préparation de 1litre de RPSH qui est testé en comparaison à l'ancien lot soit par un test in vitro à l'hypoxanthine soit sur une culture continue pendant 3- 4 cycles (la production de parasites doit être supérieure ou égale à celle de l'ancien milieu),
- RPSH = 1 volume de sérum pour 9 volume de RPMI filtré (soit 50 ml sérum stérile + 450 ml RPMI stérile) ; bien mélanger (manuellement),

- Etiqueter les flacons stériles 180ml,
- Compléter en 30 – 50 ml en pots stériles de 180 ml sous hotte à flux, étiqueter, dater (péremption 6 mois) et congeler rapidement à - 20°C,

L'utilisation du RPSH après décongélation est de 48 heures. Après ce délai, il peut être utilisé pour les lavages.

## **6. Préparation des hématies saines :**

### **6.1. Commande :**

Commander un culot globulaire au centre national de transfusion sanguine (CNTS) de préférence O<sup>+</sup> ou à défaut autre groupe appauvri en leucocytes prélevé au maximum depuis 7 jours (sang total prélevé stérilement sur CPD (ACD + phosphate, et SAGMA (CPD + adénine + mannitol)).

### **6.2. Matériel :**

- Potence (pour accrocher la poche de sang),
- Ethanol absolu,
- Tubes Falcon 14 ml, flacons stériles 40 ml

### **6.3. Aliquotement :**

- Etiqueter les tubes Falcon 14 ou 40 ml,
- Suspendre la poche de sang à la potence,
- Asperger d'éthanol absolu la poche, le laisser évaporer quelques minutes (éviter les éclaboussures, dévisser les tubes au fur et à mesure), clamper et couper sous le clamp la tubulure inférieure,
- Compléter stérilement la poche de sang dans des tubes Falcon 14 ou 40 ml,
- Conserver les tubes de sang à +4°C.

### **6.4. Délai d'utilisation :**

Il est de 3 à 4 semaines pour la culture, +1 ou 2 semaines pour le test de chimiosensibilité.

### **6.5. Lavage des hématies :**

- Laver les hématies 3 fois en RPMI et les utiliser dans les 7 jours.

- Faire stérilement 3 lavages du culot globulaire avec le RPMI tamponné, alterner de centrifugation : 5 mn à 2000 trs/ mn (tube Falcon 14 ml). Un lavage consiste à agiter par rotation ou retournement pendant 5 mn.

## **7. Cryoconservation :**

- Tubes de cryoconservation : cryotube en propylène 1,8 ml
- Solution de cryoconservation : 3% mannitol, 0,65% NaCl, 28% v/v glycérol bi-distillé dans l'eau bi-distillée stérile ; filtrer stérilement avec un filtre Sartorius 0,2 microns. Conserver à 4°C, péremption 3 mois.

### **IV.7.4.4. Fiche technique :**

#### **1. Contrôle des parasites :**

La recherche de chimiorésistance ne s'effectuera que sur *P.falciparum*. Pour obtenir un test ayant des chances de succès, il faudra :

- 1- qu'un traitement n'ait pas déjà été entrepris depuis plus de 24 heures au moment du prélèvement (sauf si ce traitement est suspect d'inefficacité),
- 2- que la morphologie du parasite soit normale ou peu altérée.

#### **Confirmation de l'espèce du *Plasmodium* et parasitémie :**

Identifier la lame (à bord dépoli) à l'aide d'un crayon.

Réaliser un frottis mince et une goutte épaisse de façon stérile (sous hotte). Suivre la procédure diagnostique du paludisme. On notera : la parasitémie en pourcentage d'hématies parasitées, l'espèce plasmodiale, l'aspect des parasites (âgés ou altérés), la présence des gamétocytes.

#### **2. Lavage des hématies du patient :**

##### **3.1. Matériel :**

- Falcon 14 ml
- Liquipipettes stériles

##### **3.2. Technique :**

Travailler stérilement sous la hotte à flux vertical en position travail.

- Noter l'identité du prélèvement sur un tube Falcon 14ml,
- Mettre les hématies identifiées dans ce tube à l'aide d'une liquipipette stérile,
- Evaluer le volume du culot afin de s'assurer de la faisabilité du nombre de plaques et de la congélation en azote envisagée,
- Ajouter du RPMI dans le culot globulaire,
- Agiter par rotation ou retournement pendant 5mn,
- Centrifuger 5 mn à 2000 trs/mn,
- Eliminer le surnageant et la couche supérieure contenant les globules blancs à l'aide d'une liquipipette stérile,
- Recommencer ces opérations deux autres fois.

On obtient un culot qui est à 75% d'hématocrite.

### **3. Congélation des hématies parasitées :**

Cette opération peut être faite avant lavage si le culot est jugé suffisant.

#### **4.1. Matériel :**

- Tube à congélation, Nalgène
- Solution de cryoconservation : réfrigérateur à + 4°C, réserve en chambre froide + 4°C.

#### **4.2. Technique :**

- Eliminer le surnageant et la couche supérieure contenant les globules blancs à l'aide d'une liquipipette stérile,
- Noter l'identité du patient sur un tube à congélation,
- Si la quantité est suffisante, mettre 15 gouttes de culot dans ce tube,
- Ajouter 19 gouttes de solution de cryoconservation à l'aide d'une liquipipette stérile,
- Mettre le tube en agitation rotative 10 mn,
- Mettre le tube en azote liquide ou à – 81°C,

- Indiquer la position dans le conteneur sur le registre du conteneur d'azote liquide ou du revco  $-81^{\circ}\text{C}$ .

### 7. Dilution préalable :

Pour une parasitémie supérieure à 1% de formes asexuées non altérées, il faudra diminuer la proportion d'hématies parasitées en ajoutant des hématies de donneur sain déleucocytées et lavées.

Faire la dilution du culot avec les globules rouges sains lavés : parasitémie optimum : 1% (si parasites beaux), pas de dilution si parasitémie = 2% dont  $\frac{1}{2}$  formes altérées, si parasitémie = 10% dont  $\frac{9}{10}$  formes altérées.

### 8. Préparation de la suspension parasitaire :

Préparer dans un même pot la suspension parasitaire (culot+RPSH) pour la ou les plaque(s). Pour arriver à un hémocrite de 1,5%, préparer ainsi la suspension parasitaire : on considère l'hémocrite du culot à 75% et on ajoute 10% à tous les volumes par sécurité.

<u>Pour une plaque micro</u> (96 cupules de 0,2ml)	...	<u>Pour 2 plaques micro :</u>
- Volume culot :	0,4 ml= 8 gouttes liquipette	... 16 gouttes
- Volume RPSH :	19,5 ml	... 39 ml
Total :	20 ml	... 40 ml

**- Volume  $^3\text{H}$ -hypoxanthine : 1 ml= 20 gouttes liquipette ... dans la moitié du vol total pas Hypoxanthine**

<u>1 plaque micro+1plaque semi-micro :</u>	...	<u>2 plaques semi-micro+1plaque micro</u>
- Vol. culot :	0,8ml= 16 gouttes	... 1,2 ml= 24 gouttes
- Vol. RPSH :	38,5ml	... 58 ml
- Vol. $^3\text{H}$ -hypoxanthine :	1,37ml= 27 gouttes	... 2 ml
Total :	41 ml	61 ml

<u>Pour 1 plaque semi-micro:</u> (24 cupules de 0,75 ml)	<u>2 plaques semi-micro:</u>
- Volume de culot : 0,4ml	... 16 gouttes
- Volume milieu RPSH : 19ml	... 38 ml
- Volume <sup>3</sup> H-hypoxanthine : 0,65 ml (25µl/cupule)=13 gouttes	... 26 gouttes
Total : 20 ml	.... 40 ml

### 9. Distribution de la suspension parasitaire :

- Sortir les plaques et les identifier (nom, numéro du prélèvement).
- Pour une microplaque de 96 puits, distribuer 200µl par cupule avec un combitip stérile 2,5 ml, position 4 ou pour une semi-microplaque de 24 puits, 750 µl par cupule avec un combitip stérile 12,5 ml, position 3. (Combitips stériles 12,5 ml-2,5 ml - 1,25 ml).
- Agiter manuellement la suspension parasitaire avant et entre chaque aspiration et la distribuer en diagonale dans les plaques.
- Distribuer dans la plaque non radioactive,

### 10. Agitation des plaques :

Agiter les plaques une minute sur l'agitateur vibrant à 600 tr/mn pour les plaques 96 cupules ; (200 tr/mn pour les plaques 24 cupules).

### 11. Incubation des plaques :

Incuber 42 h maximum à l'incubateur Heraus 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Noter l'heure de mise à l'étuve et l'heure de congélation.

Remplir la feuille de chimiosensibilité en indiquant la date et l'heure de début de l'incubation.

### 12. Congélation des plaques :

Après 42 h, agiter et congeler les plaques dans le congélateur à - 20°C.

#### IV.7.4.5. Conservation après analyse :

- Garder le tube de prélèvement, même vide, jusqu'au jour du rendu des résultats.
- Garder aliquot de plasma cryoconservé à - 20°C jusqu'à ce que les rapports soient finalisés.

- Garder aliquote d'hématies cryoconservé à -196°C (azote liquide) jusqu'à ce que les rapports soient finalisés.
- Garder les frottis et les gouttes épaisses identifiés avec étiquette dans les boites pendant 10 ans.

#### **IV.7.4.6. Test d'antigène pLDH ELISA :**

##### **1. Principe de la procédure ELISA :**

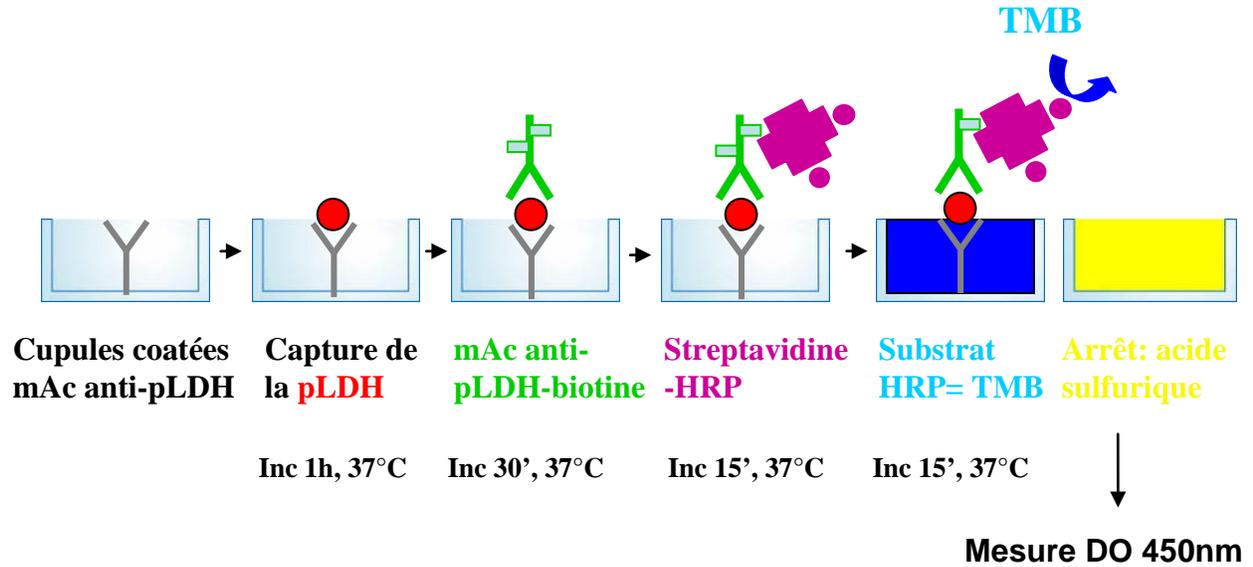
Le test de pLDH ELISA est un test d'immunocapture d'antigènes, rapide et hautement sensible.

L'antigène détecté est une enzyme métabolique intracellulaire, *Plasmodium lactate déshydrogénase* (pLDH) présent dans l'érythrocyte parasitée.

Le test permet la détection de *Plasmodium sp.* vivant (*P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale* et *P.malariae*) dans le sang total, ou peut être utilisé sur les échantillons de culture de *P.falciparum* pour mesurer l'inhibition du métabolisme pendant le test de chimiosensibilité *in vitro*.

Les puits cotées avec l'anticorps monoclonal (mAc) pan-spécifique pour toutes les LDH d'espèces de *Plasmodium* humain sont incubés avec les contrôles ou le sang total lysé. La pLDH est capturée par les anticorps immobilisés et le matériel non lié est enlevé par la procédure de lavage. Pendant l'étape de la seconde incubation, pLDH capturée est liée avec autre anticorps monoclonal pLDH pan-spécifique conjuguée avec la biotine. Après l'enlèvement d'excès de la biotine conjuguée par la procédure de lavage, la quantité de biotine est détectée dans la troisième incubation avec la streptavidine conjuguée avec la peroxydase (HRP).

HRP- conjugué non lié est lavé et finalement incubé avec une solution de substrat HRP basé sur la tetramethylbenzidine (TMB) et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) conduisant à une coloration bleue proportionnelle à la quantité de pLDH liée à la phase solide. La réaction enzymatique est stoppée par addition de l'acide sulfurique dilué et les valeurs de l'absorbance sont déterminées à 450 nm.



**Figure 12 : Principe du test pLDH ELISA (Source: MRTC/MEDRU)**

## 2. Réactifs :

- l'anticorps monoclonal pLDH de la souris.
- Tampon de lavage : 2 x 100 ml concentré (10 X) de phosphate tamponnée de solution de lavage.
- Tampon de lyse : 1 x 25 ml tampon dilué avec chlorure d'ammonium comme agent de lyse.
- Solution conjuguée 1 : 1 x 25 ml d'anticorps monoclonal anti-pLDH biotinylé prête à être utilisé dans une solution pourpre.
- Solution conjuguée 2 : 1 x 25 ml horseradish peroxydase conjugué à la streptavidine prête à être utilisé dans la solution jaune.
- Solution de substrat: 1 x 25 ml tampon de substrat de tetramethylbenzidine et peroxyde d'hydrogène combinés en sécurité, prêt à être utiliser, une tape de solution chromogène. Evitez l'exposition à la lumière et à la chaleur.
- Solution d'arrêt: 1x 15 ml solution d'acide sulfurique 0,5 M. Attention ! irritant. Evitez le contact avec les yeux et la peau.

- Contrôles : 2 x 1 ml contrôle positif et 2 x 1,5 ml contrôle négatif viable contenant du sérum humain lyophilisé incluant le recombinant de pLDH à une quantité détectable et non détectable respectivement.

### 3. Matériels :

- Tubes de citrate, d'EDTA, d'héparine ou les tubes de CPD-A.
- Micropipettes avec des embouts jetables.
- Nettoyez la verrerie volumétrique de laboratoire standard.
- Incubateur-agitateur pour Microplaque.
- Lecteur de Microplaque avec le spectrophotomètre à double longueur d'onde 450-620 nm (VERSAmax microplate reader™ (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA).

### 4. Procédure du test :

Utilisez un embout jetable séparé pour chaque transfert afin d'éviter la contamination transversale.

Permettez aux échantillons et aux réactifs de prendre la température ambiante avant l'emploi.

Une fois que l'analyse a commencé, toutes les étapes devraient être accomplies sans interruption.

#### 4.1. Reconstitution des réactifs :

- **Tampon de lavage** : diluez 100 ml de tampon de lavage concentré 10X à 1000 ml avec de l'eau distillée. Attention : les cristaux peuvent se former quand la solution de lavage concentrée est stockée à 2-8°C. Les cristaux peuvent facilement être dissous en apportant les flacons à la température ambiante ou en les plaçant à 37°C pendant quelques minutes. Garder la solution de lavage reconstitué entre 2-8°C pour un mois.
- **Contrôles positif et négatif** : reconstituez le contenu des flacons de contrôles positif et négatif avec respectivement 1ml et 1.5ml de tampon de lyse. Des contrôles reconstitués peuvent être maintenues entre 2-8°C jusqu'à un mois. Pour éviter les congélations et décongélations répétées garder les témoins en aliquots de 60 µl à -20°C décongeler au besoin et garder entre 2-8°C pour l'utilisation.

**Note 1 :** des contrôles reconstitués ou les aliquots décongelés doivent toujours être maintenues entre 2-8°C s'ils ne sont pas en utilisation. Des contrôles laissés à la température ambiante doivent être jetés.

#### **4.2. Procédure du test pour la détection de *Plasmodium sp.* dans le sang total :**

1. Placez les microtips par puits nécessaire sur l'armature de la plaque (4 puits pour contrôles).

Remplacez les puits scellés inutilisés à 2-8°C.

2. Distribuez 100 µl de tampon de lyse dans chacun des puits.

3. Ajoutez 50 µl de contrôle positif dans un puits, 50 µl de contrôle négatif dans trois puits.

Remplacez les contrôles à 2-8°C.

4. Ajoutez 50 µl des échantillons frais homogénéisés du sang total des patients ou 1 à 20 µl du sang de culture (ou au delà lorsque la parasitémie est en deçà de 0,05%) (Voir la **note 4**) à d'autres puits.

5. Couvrir la plaque avec un parafilm auto-adhésif et incuber pendant 60 minutes à 37°C dans des conditions douces d'agitation continue

6. Lavez les puits avec la solution de lavage reconstituée : ceci peut être exécuté avec un robot laveur automatique ou manuellement en procédant par retournement du contenu des puits au-dessus d'un récipient approprié et en remplissant chacun des puits immédiatement avec 350-400µl de tampon de lavage (pour la rondelle automatisée, utilisez l'excès de tampon de lavage et le programme continu de débordement).

Répétez le cycle de lavage 5 fois.

Le temps d'imbiber n'est nécessaire entre les cycles de lavage excepté juste après l'incubation de l'échantillon de sang total où la solution de lavage devrait être laissée dans les puits pendant 2 minutes.

Finalement, videz les puits et enlevez le fluide excessif en tapant doucement les plaques inversées sur un papier absorbant propre.

**Note 2 :** Si n'importe quelle trace de sang est encore visible à l'intérieur des puits après cette étape, reprenez votre procédé de lavage.

**Note 3 :** Faites attention d'éviter la contamination croisée avec d'autres tampons de lavage, si vous utilisez le laveur automatique pour beaucoup de technique ELISA.

7. Distribuez 100µl de la solution conjuguée 1 (mAc anti-pLDH biotinylé) dans chacun des puits.
8. Couvrez et incubez pendant 30 minutes à 37°C (le mélange n'est pas nécessaire).
9. Lavez les puits 5 fois avec la solution de lavage reconstituée (comme décrit en 6).
10. Distribuez 100 µl de la solution conjuguée 2 (streptavidine HRP) dans chacun des puits.
11. Couvrez et incubez pendant 15 minutes à 37°C (le mélange n'est pas nécessaire).
12. Lavez les puits 5 fois avec la solution de lavage reconstituée (comme décrit en 6).
13. Distribuez 100 µl de solution de substrat dans chacun des puits.
14. Couvrez et incubez loin de la lumière pendant 15 minutes à 37°C (l'agitation n'est pas nécessaire).
15. Ajoutez 50 µl de la solution d'arrêt dans tous les puits et lisez l'absorbance de chacun des puits avec un spectrophotomètre à 450 nm avec la longueur d'onde de référence à 620 nm dans un délai de 15 minutes.
16. Enregistrez les résultats.

#### **4.3. Procédure du test pour la détection de *Plasmodium falciparum* dans la culture de sang (test de chimiosensibilité *in vitro*) :**

1. Cultivez l'isolat de *P.falciparum* du patient dans la microplaque selon le screening standard de médicaments pour les souches de paludisme, en particulier, des échantillons frais non traités prélevés sur EDTA (< 24 h), la parasitémie doit être comprise entre 0,1 et 0,5%, et l'hématocrite à 1,5% ; l'incubation se fait à 5 % de CO<sub>2</sub>.
2. Après 40-46 heures de culture, arrêtez en congelant les microplaques de microcultures à - 20°C pendant au moins 1 heure.
3. Décongelez les microcultures à la température ambiante pendant 30-40 minutes.
4. Procédez au test préliminaire (pré-test).

**Note 2 :** Puisque le succès de culture est lié à la viabilité de contrainte de parasite, il est nécessaire d'ajuster le volume de culture à utiliser pour chaque isolat. Pour évaluer le succès de la sensibilité *in vitro* de dosage de médicaments et d'estimer le volume de l'échantillon à utiliser dans la méthode ELISA; procédez à l'essai préliminaire en utilisant Optimal-IT ou ELISA (voir « pré-test : validation du test de chimiosensibilité »).

**5.** Lorsque le volume de la culture à utiliser a été déterminé, traitez la totalité d'isolat selon le « procédé d'analyse pour la détection des espèces de plasmodium dans le sang total » comme décrit ci-dessus.

**Note 3:** La qualité des résultats dépendra de l'homogénéité de l'échantillon, ainsi nous recommandons de mélanger la microculture décongelée en utilisant un dispositif mélangeur de microplate pendant plusieurs minutes (15-20mn) avec une forte vitesse (~1000 rpm) et partager les volumes de culture dans les plaques ELISA immédiatement après le mélange (il est possible de continuer à mélanger par pipetage répété).

**Note 4 :** En cas de surestimation du volume à tester en ELISA et des valeurs de DO triplées lire à 405 nm au lieu de 450 nm.

**Remarque :**

- avant le test, quand la distribution est complète, il est recommandé de couvrir la plaque de microculture de film adhésif et de le stocker à + 4°C ;
- il est important de réaliser le test d'ELISA dans les 48 heures après que la plaque de microculture a été initialement décongelée ;

**4.4. Pré-test : validation du test de chimiosensibilité :**

**4.4.1. Optimal-IT pré-test :**

**4.4.1.1. Procédure :**

Nécessite 3 Optimal-IT par isolat.

Suit la méthode d'essai comme décrite dans le kit d'optimal-IT en utilisant des échantillons comme suit :

- Optimal-IT 1: 1µl de lysat d'un puits sans médicament ;

- Optimal-IT 2 : 5µl de lysat d'un puits sans médicament ;
- Optimal-IT 3 : 5µl de lysat d'un puits contenant une concentration maximale de médicament.

**Attention :** prendre soin totalement de lysat pour l'homogénéiser avant de pipeter (mélangez le contenu de puits en secouant fortement et/ou en pipetant plusieurs fois).

#### 4.4.1.2. Interprétation :

##### 4.4.1.2.1. Validation du test :

- L'Optimal-IT pré-test est valide si la bande de contrôle est clairement visible, le champ de réaction est dégagé du sang et la bande <<P>> est présente tandis que la bande <<Pf>> est présente. Sinon, répétez le pré-test.
- Optimal-IT 1 <<P>> et <<Pf>> ne devraient pas être plus fort que les bandes d'Optimal-IT 2. Si tel est le cas, une erreur s'est produite et Optimal-IT pré-test doit être répété.

Optimal-IT 1 $\leq$ Optimal-IT 2
----------------------------------

##### 4.4.1.2.2. Succès / échec du test de chimiosensibilité ?

La comparaison d'intensité des bandes <<P>> et <<Pf>> entre optimal - IT2 et Optimal-IT 3 indiqueront si l'analyse de sensibilité au médicament sera interprétable ou non.

**Tableau XIV :** La comparaison d'intensité des bandes <<P>> et <<Pf>> entre optimal - IT2 et Optimal-IT 3

Succès	Optimal-IT 2 > Optimal-IT 3
Echec	Optimal-IT 2 $\leq$ Optimal-IT 3 ou manque des bandes <<P>> et <<Pf>> pour tous les Optimal-IT.

#### Remarque :

- Pour une interprétation standardisée, quantitative et objective de l'intensité de bandes, il est recommandé de lire l'optimal-IT avec un lecteur automatique Diamed-IT Reader.

- Absence des bandes de <<P>> et de <<Pf>> sur les 3 optimal-IT, des jaugers indiquent habituellement un échec de l'analyse de sensibilité au médicament. Cependant, une confirmation devrait être réalisée en utilisant de plus grands volumes (par exemple 15µl pour jaugers 2 et 3) ou de préférence avec le pré-test d'ELISA.

- En cas de résultats douteux, c'est à dire la bande d'Optimal-IT 3 est légèrement plus faible qu'optimal-IT 2, il est recommandé de recourir au pré-test ELISA.

#### 4.4.1.2.3. Détermination du volume pour le test ELISA :

L'intensité de bande <<P>> ou <<Pf>> d'Optimal-IT 1 et d'Optimal-IT 2 guidera dans le choix du volume de lysat à utiliser pour la culture d'isolat du sang total en ELISA, selon le tableau ci-dessous.

**Tableau XV :** L'intensité de bande <<P>> ou <<Pf>> d'Optimal-IT 1 et d'Optimal-IT 2

Optimal-IT 1	Optimal-IT 2	Volumes de Lysat du test (µl)
-	+/-	20
-	1+	15
-	2+	10
+/-	>+/-	5
1+	>1+	4
2+	>2+	3
3+	3+	1 ou 2

+/- : bande très faible de Pf, à peine visible à l'œil nu ; 1+ : bande faible de Pf ; 2+ : bande pointue de Pf ; 3+ : bande très forte de Pf.

**Remarque :** Utilisation du lecteur Diamed-IT facilitera cette interprétation.

#### 4.4.2. Pré-test ELISA :

##### 4.4.2.1. Procédure :

Nécessite 8 barrettes par isolat (y compris 2 puits pour des contrôles positif et négatif). Remplissez chacun avec 100 µl de tampon de lyse et additionnez 2 à 15 µl de lysat homogénéisé comme décrit ci-dessous :

- Puits d'ELISA 1 : 2  $\mu$ l de lysat de culture d'un puits sans médicament (puits de contrôle de culture)
- Puits d'ELISA 2: 5  $\mu$ l de lysat d'un puits contrôle de culture
- Puits d'ELISA 3 : 15  $\mu$ l de lysat dans un puits contrôle de culture
- Puits d'ELISA 4 : 2  $\mu$ l de lysat de culture d'un puits avec la concentration la plus élevée en médicament (puits d'inhibition de culture)
- Puits d'ELISA 5 : 5  $\mu$ l de lysat d'un puits d'inhibition de culture
- Puits d'ELISA 6 : 15  $\mu$ l de lysat d'un puits d'inhibition de culture
- Puits d'ELISA 7 : 50  $\mu$ l de contrôle positif du test d'antigène ELISA.
- Puits d'ELISA 8 : 50  $\mu$ l de contrôle négatif du test d'antigène ELISA.

**Attention:** prendre soin totalement de lysat pour l'homogénéiser avant de pipeter (mélangez le contenu de puits en secouant fortement et/ou en pipetant plusieurs fois). Suivez la procédure du test comme décrit ci-dessus pour la détection des espèces de plasmodium dans des échantillons de sang total.

#### 4.4.2.2. Interprétation :

##### 4.4.2.2.1. Validation du pré-test :

Le pré-test d'ELISA est validé si l'absorbance du contrôle positif (DOpos) est supérieure à 0,500 et l'absorbance de contrôle négatif (DOneg) est entre 0,050 et 0,200. Autrement, le pré-test ne devrait pas être considéré valide et devrait être répété.

$$DO_{pos} > 0,500$$

et

$$0,050 < DO_{neg} < 0,200$$

##### 4.4.2.2.2. Succès / échec du test de chimiosensibilité :

Comparaison de paire (les puits 1 et 4, les puits 2 et 5, ou les puits 3 et 6) de l'absorbance des puits de contrôle de culture sans médicament (DOmax) et l'absorbance des puits d'inhibition de culture,

avec la concentration la plus élevée en médicament (DOmin), indiqueront le succès ou l'échec du test de chimiosensibilité.

Pour qu'un test de chimiosensibilité soit réussi, c'est à dire interprétable par l'ELISA, la DOmax doit être au moins 1,7 fois plus que la DOmin.

Succès :  $DO_{max} / DO_{min} \geq 1,7$

Echec :  $DO_{max} / DO_{min} < 1,7$

DOmax = DO d'échantillon provenant de puits sans médicament et DOmin = DO d'échantillon provenant de puits de plus concentration en médicament.

#### 4.4.2.2.3. Détermination du volume du test ELISA :

Le volume à utiliser sera cela qui correspond à la valeur de l'absorbance du puits de contrôle (DOmax) qui est la plus proche de 1,200.

##### Par exemple :

- si DOmax de 2  $\mu$ l = 0,180, DOmax de 5 $\mu$ l = 0,380, DOmax de 15  $\mu$ l =0,980 et choisissez alors 20  $\mu$ l comme volume pour réaliser ce test ELISA.
- si DOmax de 2  $\mu$ l = 0,270, DOmax de 5 $\mu$ l = 0,530, DOmax de 15  $\mu$ l =1,470, choisissez 15  $\mu$ l.
- si DOmax de 2  $\mu$ l = 0,760, DOmax de 5 $\mu$ l = 1,760, DOmax de 15  $\mu$ l >3, choisissez 4 ou 5  $\mu$ l.
- si DOmax de 2  $\mu$ l = 1,850, DOmax de 5 $\mu$ l = >3, DOmax de 15  $\mu$ l >3 choisissez 1 ou 2  $\mu$ l.

## 5. Interprétation des résultats :

### 5.1. Validation du test :

La valeur individuelle de l'absorbance (densité optique DO) du contrôle positif, DO<sub>pos</sub>, doit être au-dessus de 0,500 et la moyenne du DO du contrôle négatif doit être comprise entre 0,050 et 0,200.

$$\begin{array}{c} \text{DO}_{\text{pos}} > 0,500 \\ \text{et} \\ 0,050 < \text{DO}_{\text{neg}} < 0,200 \end{array}$$

Si une de ces caractéristiques n'est pas rencontrée, les résultats ne devraient pas être considérés valides et la série de test devrait être répétée.

Pour la détection de *P.falciparum* dans des cultures de sang (analyse de sensibilité de médicament), la DO moyenne du puits de culture de contrôle sans médicament (DO<sub>max</sub>) doit être entre 0,5 et 2,5 et au moins 1,7 fois plus que la valeur la plus basse du DO du plateau d'inhibition, de la concentration la plus élevée en médicament des puits (DO<sub>min</sub>). Faire un pré-test est nécessaire.

$$\begin{array}{c} 0,500 < \text{DO}_{\text{max}} < 2,500 \\ \text{et} \\ \text{DO}_{\text{max}} / \text{DO}_{\text{min}} \geq 1,7 \end{array}$$

### 5.2. Interprétation des résultats pour la détection de *P. falciparum* dans la culture de sang (interprétation du test de chimiosensibilité *in vitro*) :

Calculez les moyennes pour l'absorbance de toutes les répliques pour chaque concentration de médicament (DO<sub>x</sub>) et calculez la production relative de pLDH pour chacun.

$$\text{Production relative de pLDH} = \frac{\text{DO}_x - \text{DO}_{\text{min}}}{\text{DO}_{\text{max}} - \text{DO}_{\text{min}}} \times 100$$

DO<sub>x</sub> = DO moyenne d'une concentration donnée en médicament, DO<sub>max</sub> = DO moyen du puits de contrôle de la culture sans médicament et DO<sub>min</sub> = une valeur plus basse de DO du plateau d'inhibition (la concentration la plus élevée en drogue des puits).

Tracez le pourcentage relatif de production de pLDH en fonction de la concentration en médicament sur un papier de graphique en semi-Log.

(%) Production relative de pLDH = f (concentrations de médicament)

La courbe devrait montrer un plateau d'inhibition pour la concentration la plus élevée en médicament.

Graphiquement, déterminer la valeur CI<sub>50</sub> (concentration inhibant la maturation de 50% de parasites) et déduire le phénotype de sensibilité de l'isolat.

#### 6. Limite :

- La contamination des matériels utilisés peut causer des résultats aberrants
- Les vieux échantillons congelé-décongelés de sang total peuvent conduire aux résultats erronés et ne devraient pas être utilisés
- L'adhérence stricte aux procédures et l'équipement et le matériel appropriés est essentielle.

L'équipement devrait être vérifié régulièrement selon le procédé de GLP.

#### IV.8. Gestion et analyse des données :

Les données ont été saisies sur le logiciel Excel 2003 et analysées sur le logiciel SPSS 11.0. Le risque alpha a été fixé à 0,05. Les degrés de signification (p) ont été considérés statistiquement significatifs s'ils sont inférieurs ou égaux à 0,05.

Les CI<sub>50</sub> avec leurs intervalles de confiance à 95% (IC) ont été calculées avec un modèle Emax disponible à l'adresse <http://www.antimalarial-icestimator.net>,  $RE = 100 [(100 * Cc) / (Cc + CI_{50} C)]$  dans laquelle CI<sub>50</sub> est la concentration du médicament inhibant 50% de l'activité du parasite, c est un facteur de sigmoidicité qui exprime la pente de la courbe, RE est la relative à l'effet du parasite (en pourcentage), qui définit l'axe des Y et C est la concentration du médicament testé qui définit l'axe des abscisses.

Selon des études antérieures, <sup>82,83,84</sup> le seuil limite de résistance est la définition de résistance phénotypique uniquement disponible pour la chloroquine avec  $CI_{50} > 100$  nM obtenu de la méthode isotopique. Néanmoins, les seuils de sensibilité diminués à la monodeséhyllumodiaquine, à la luméfantine et à la dihydroartémisinine ont été estimés à 80, 150 et 10 nM, respectivement.

#### **IV.9. Considérations éthiques:**

Le protocole de recherche de l'étude a reçu l'approbation des comités d'éthique institutionnelle de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université de Bamako. Le consentement communautaire (autorités administratives et coutumières) et celui individuel ont été également obtenus sur le terrain avant les inclusions. La participation à l'étude était totalement volontaire et aucun sujet n'a été inclus contre son gré. Une fiche d'assentiment a été signée pour chaque patient et les personnes signataires étaient le parent ou personne responsable de l'enfant, le témoin et l'investigateur. L'équipe de recherche et la population des trois villages ont reçu la visite de supervision sur le terrain des membres du comité d'éthique de la FMPOS.

## V. RESULTATS :

### V.1.Résultats de la chimiosensibilité *in vitro* de *P.falciparum* à l'aide de la méthode pLDH ELISA:

Nous avons effectué le test sur 59 isolats dont 47 ont réussi soit 79,7% pour l'ensemble des trois sites d'étude.

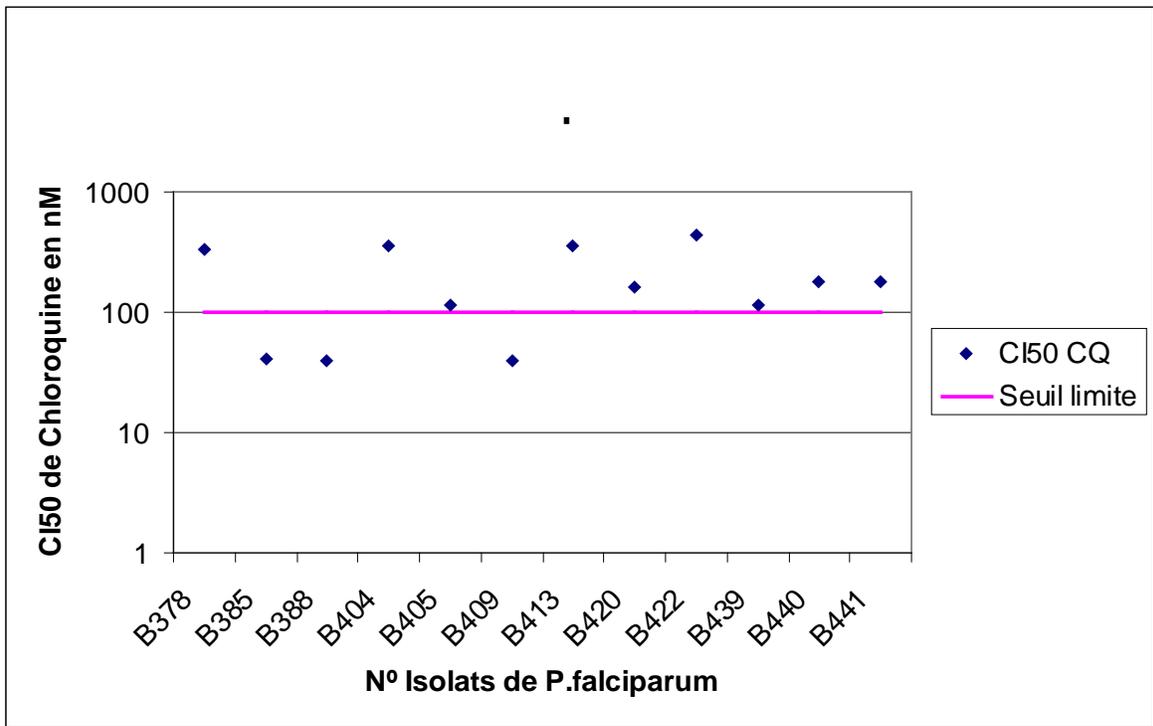
Les seuils limites de résistance ont été estimés à 100 nM pour la chloroquine, 80 nM pour la monodeséthylamodiaquine, 150 nM pour la luméfantine, 10 nM pour la dihydroartémisinine selon ces études<sup>82, 83, 84</sup>.

#### V.1.1. Mesure de la moyenne géométrique des CI<sub>50</sub> à Bancoumana :

**Tableau XVI:** Susceptibilité *in vitro* de quatre antipaludiques des isolats de *Plasmodium falciparum* à Bancoumana.

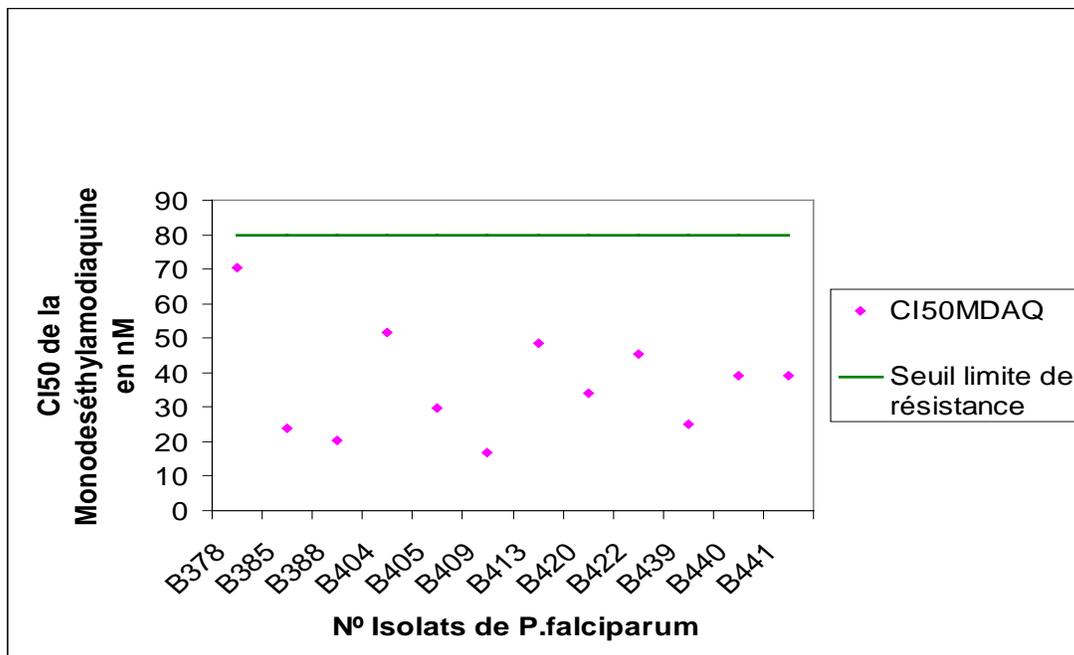
Médicaments	Nombre d'isolat (n)	Moyennes géométriques de CI <sub>50</sub> (nM)	Seuils limites de résistance (nM)	Intervalles de confiance à 95%
Chloroquine	12	143,94	100	106,87 ; 284,14
Monodeséthylamodiaquine	12	34,26	80	27,31 ; 46,87
Luméfantine	12	10,65	150	6,16 ; 22,17
Dihydroartémisinine	12	0,69	10	0,48 ; 1,10

Ce tableau montre la moyenne géométrique de la chloroquine supérieure à son seuil limite de résistance (143,94 nM à IC 95% 106,87 à 284,14) contrairement à la monodeséthylamodiaquine, à la luméfantine et à la dihydroartémisinine à Bancoumana



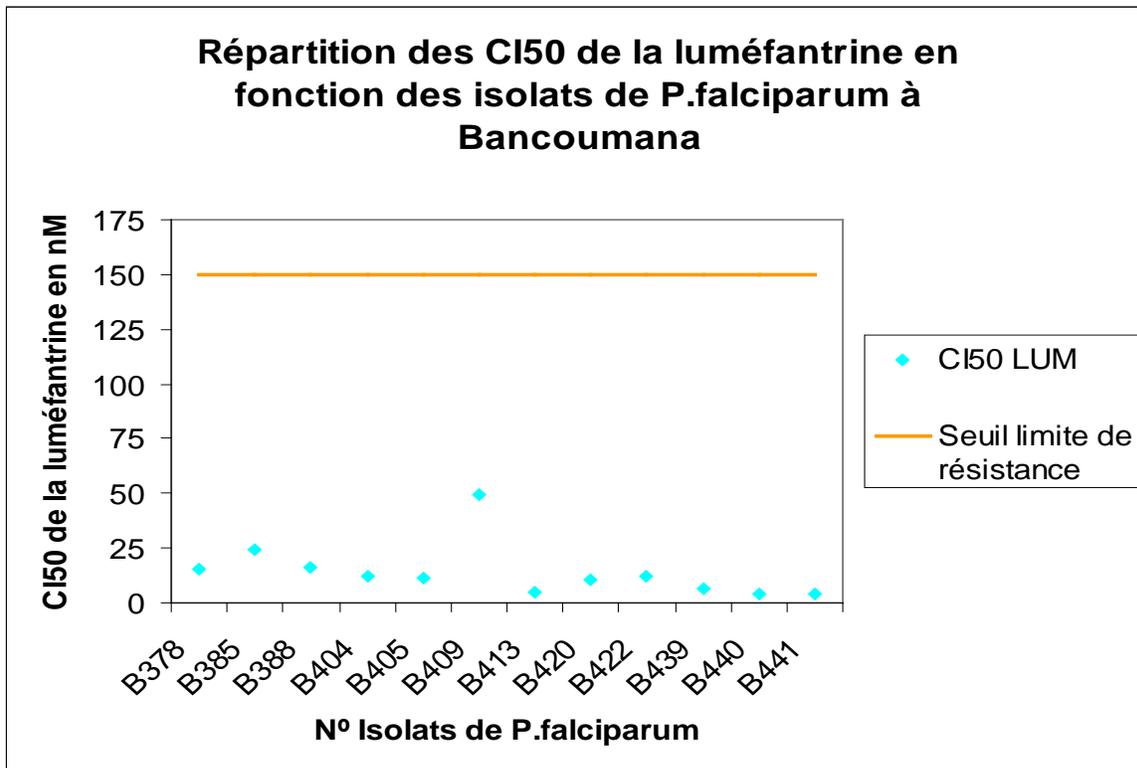
**Figure 13: Répartition des CI<sub>50</sub> de la Chloroquine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Bancoumana.**

Nous remarquons que 75% des isolats de *P.falciparum* testés à la chloroquine avaient leur CI<sub>50</sub> au dessus du seuil limite de résistance.



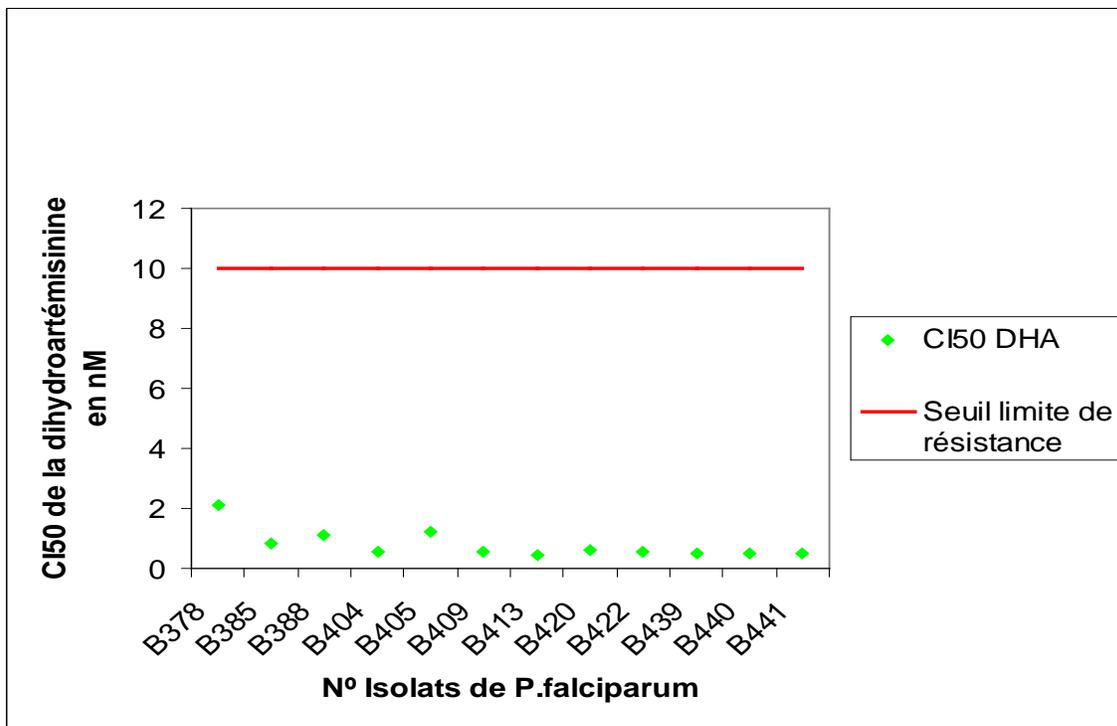
**Figure 14: Répartition des CI<sub>50</sub> de la Monodeséthylamodiaquine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Bancoumana.**

Les CI<sub>50</sub> de la Monodeséthylamodiaquine étaient enregistrées en dessous du seuil limite de résistance à Bancoumana. La plus forte CI<sub>50</sub> était 70,55 nM.



**Figure 15: Répartition des CI<sub>50</sub> de la Luméfántrine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Bancoumana.**

Les CI<sub>50</sub> de la luméfántrine étaient largement en dessous du seuil limite de résistance à Bancoumana



**Figure 16: Répartition des CI<sub>50</sub> de la dihydroartémisinine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Bancoumana.**

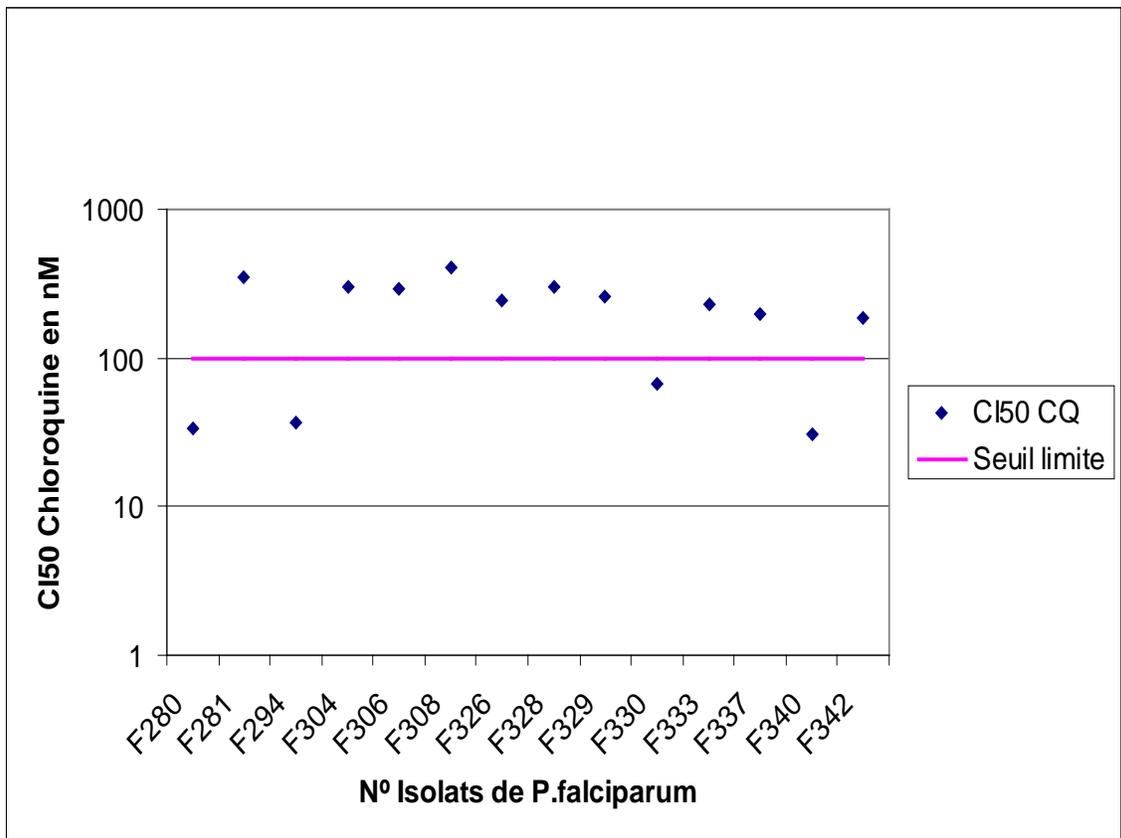
Les CI<sub>50</sub> de la dihydroartémisinine étaient largement en dessous du seuil limite de résistance à Bancoumana

### V.1.2. Mesure de la moyenne géométrique des $CI_{50}$ à Faladjé :

**Tableau XVII:** Susceptibilité in vitro de quatre antipaludiques des isolats de *Plasmodium falciparum* à Faladjé.

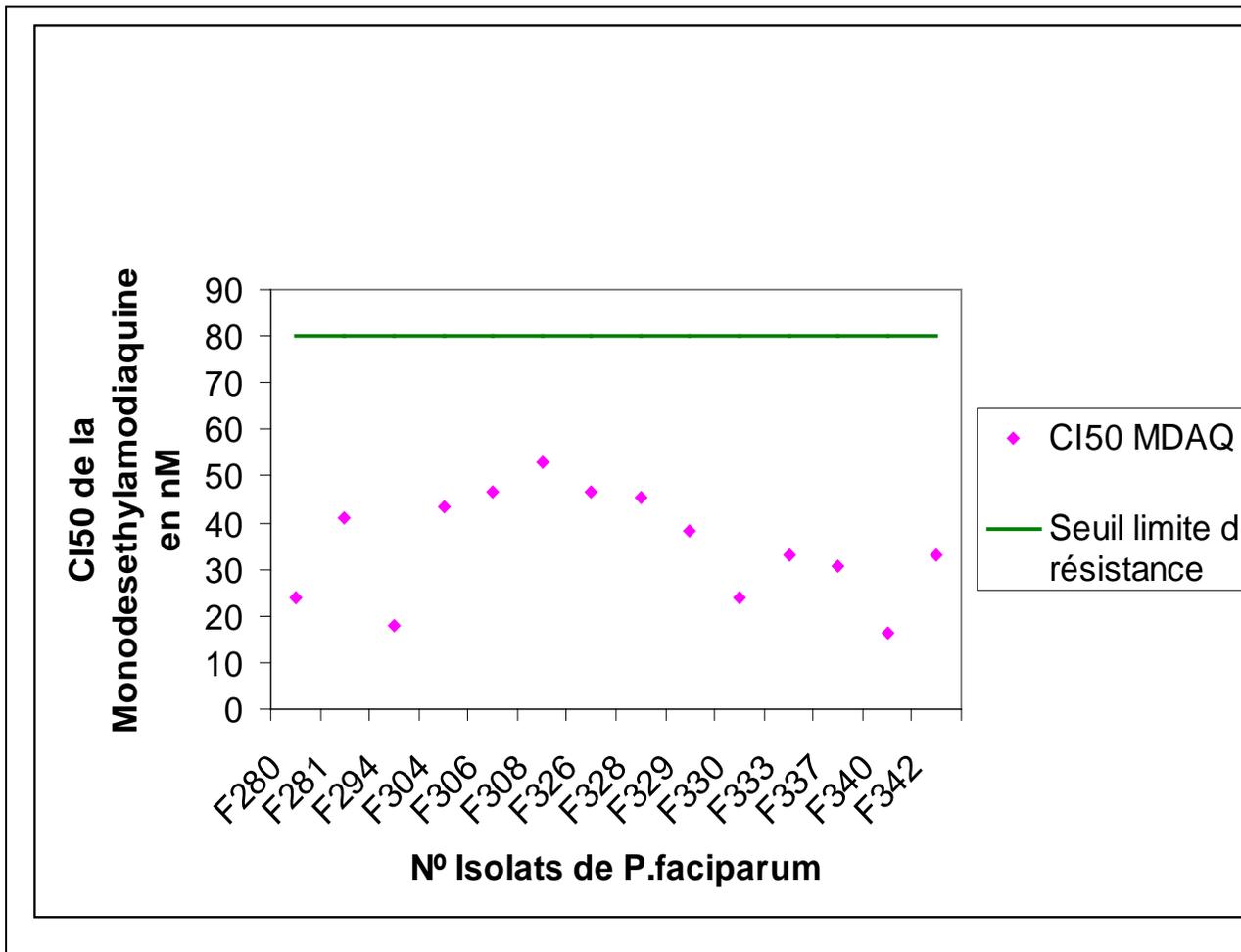
Médicaments	Nombre d'isolat (n)	Moyennes géométriques $CI_{50}$ (nM)	Seuil limite de résistance	Intervalles de confiance à 95% (IC 95%)
Chloroquine	14	156,55	100	138,38 ; 282,31
Monodeséhyলামodiaquine	14	33,25	80	28,61 ; 41,86
Luméfántrine	14	7,95	150	6,63 ; 10,37
Dihydroartémisinine	14	0,81	10	0,64 ; 1,17

La moyenne géométrique des  $CI_{50}$  de la chloroquine (156,55 nM à IC95% 138,38 à 282,31) était supérieure à son seuil de résistance.



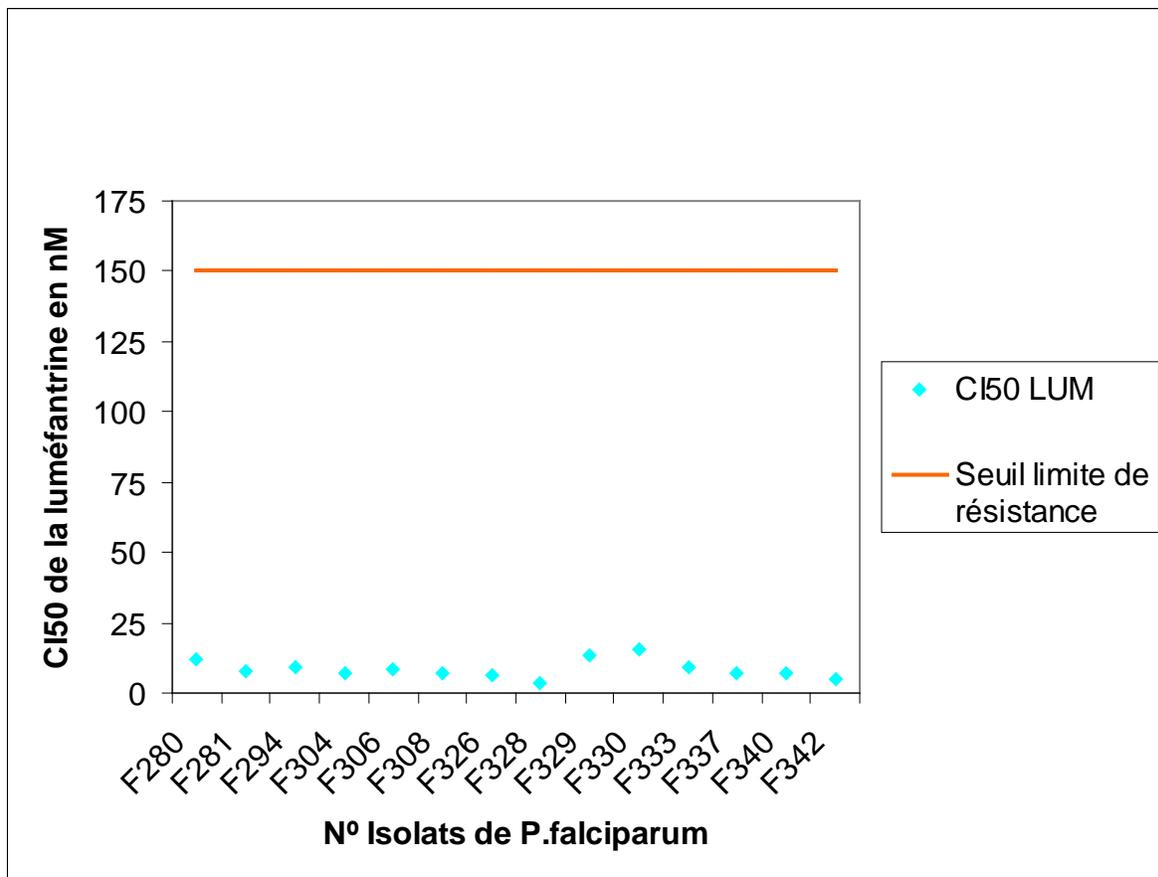
**Figure 17: Répartition des CI<sub>50</sub> de la chloroquine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Faladjé.**

Cette figure nous indique que 71 % des isolats testés contre la chloroquine avaient donné des CI<sub>50</sub> supérieures au seuil limite de résistance à Faladjé.



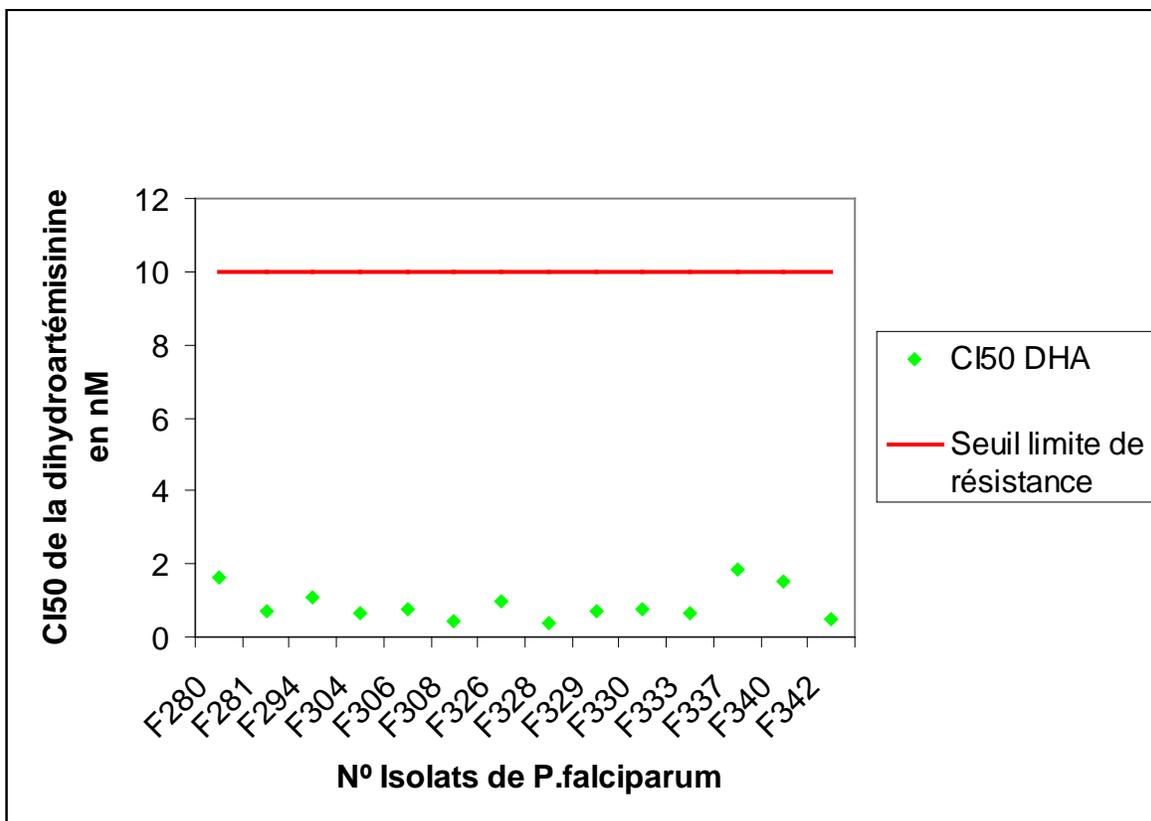
**Figure 18: Répartition des CI<sub>50</sub> de la Monodeséthylamodiaquine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Faladjé.**

A Faladjé, 100% des isolats de terrain de *P. falciparum* avaient donné des CI<sub>50</sub> de la monodeséthylamodiaquine en dessous du seuil limite de résistance.



**Figure 19: Répartition des CI<sub>50</sub> de la Luméfantrine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Faladjé.**

Les CI<sub>50</sub> de la luméfantrine des isolats de terrain de *P. falciparum* étaient largement en dessous du seuil limite de résistance à Faladjé.



**Figure 20: Répartition des CI<sub>50</sub> de la dihydroartémisinine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Faladjé.**

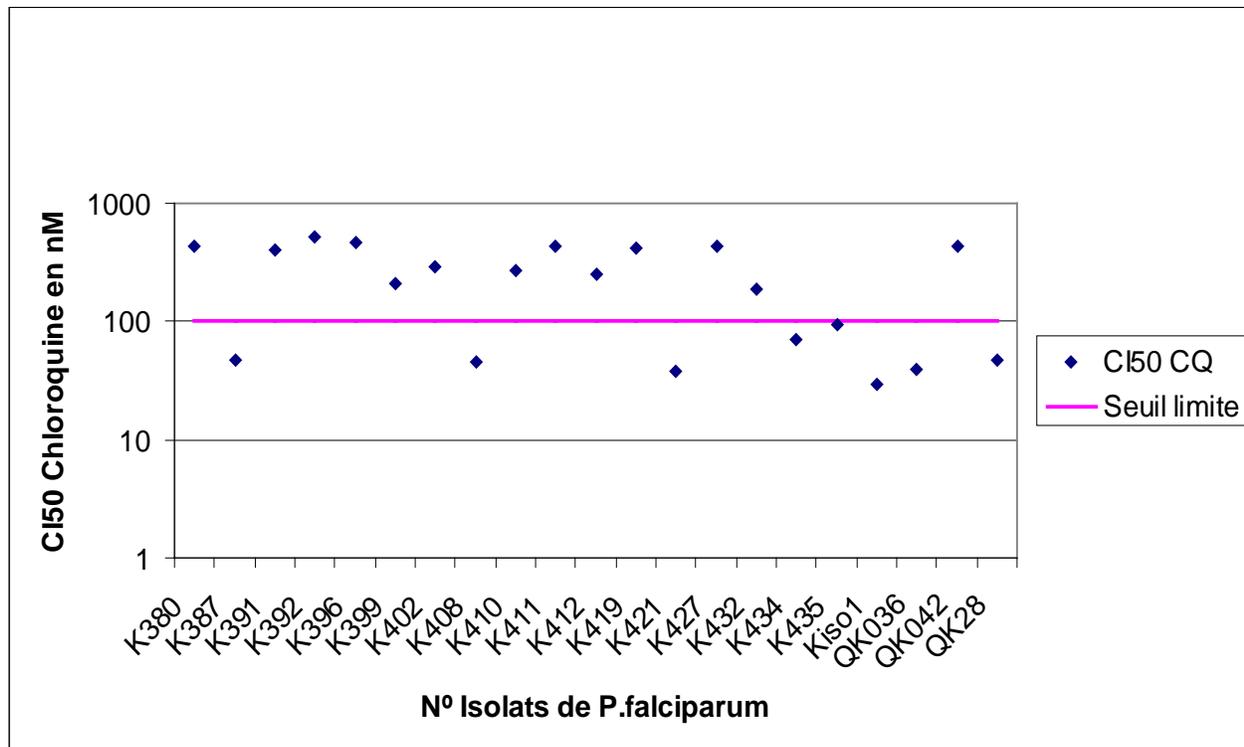
Les CI<sub>50</sub> de la dihydroartémisinine des isolats de terrain de *P. falciparum* étaient largement en dessous du seuil limite de résistance à Faladjé.

### V.1.3. Mesure de la moyenne géométrique des $CI_{50}$ à Kollé :

**Tableau XVIII:** Susceptibilité *in vitro* de quatre antipaludiques des isolats de *Plasmodium falciparum* à Kollé.

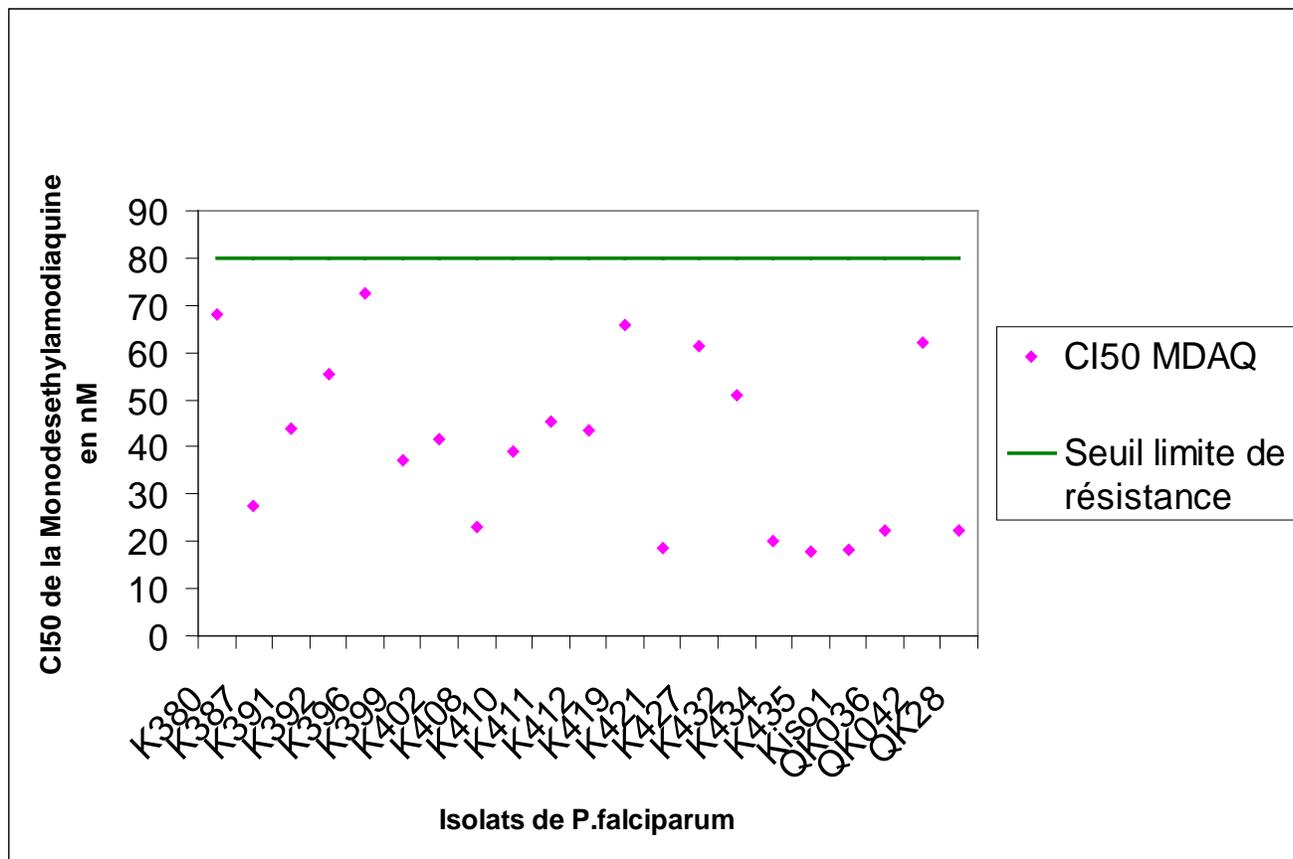
Médicaments	Nombre d'isolat (n)	Moyennes géométriques $CI_{50}$ (nM)	Seuil limite de résistance	Intervalles de confiance à 95%
Chloroquine	21	163,76	100	159,07 ; 329,94
Monodeséhyalamodiaquine	21	36,68	80	32,09 ; 49,72
Luméfántrine	20	16,79	150	14,68 ; 23,87
Dihydroartémisinine	21	0,85	10	0,74 ; 1,30

Ce tableau donne les moyennes géométriques des  $CI_{50}$  de la monodeséhyalamodiaquine, de la luméfántrine, de la dihydroartémisinine qui sont inférieures à leurs seuils limites de résistance exception faite pour la chloroquine.



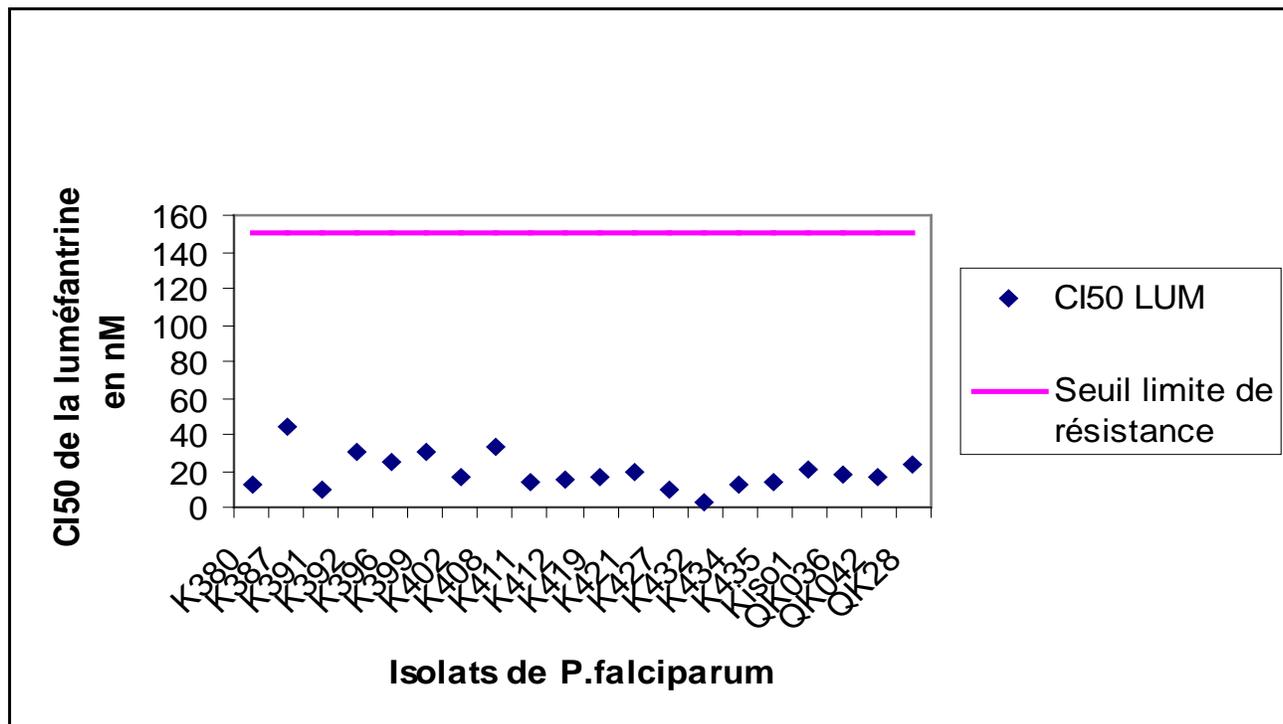
**Figure 21: Répartition des CI<sub>50</sub> de la Chloroquine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Kollé.**

Cette figure montre que sur 21 isolats de *P.falciparum*, 38% des isolats avaient donnés des CI<sub>50</sub> en dessous et 62% en dessus du seuil de résistance.



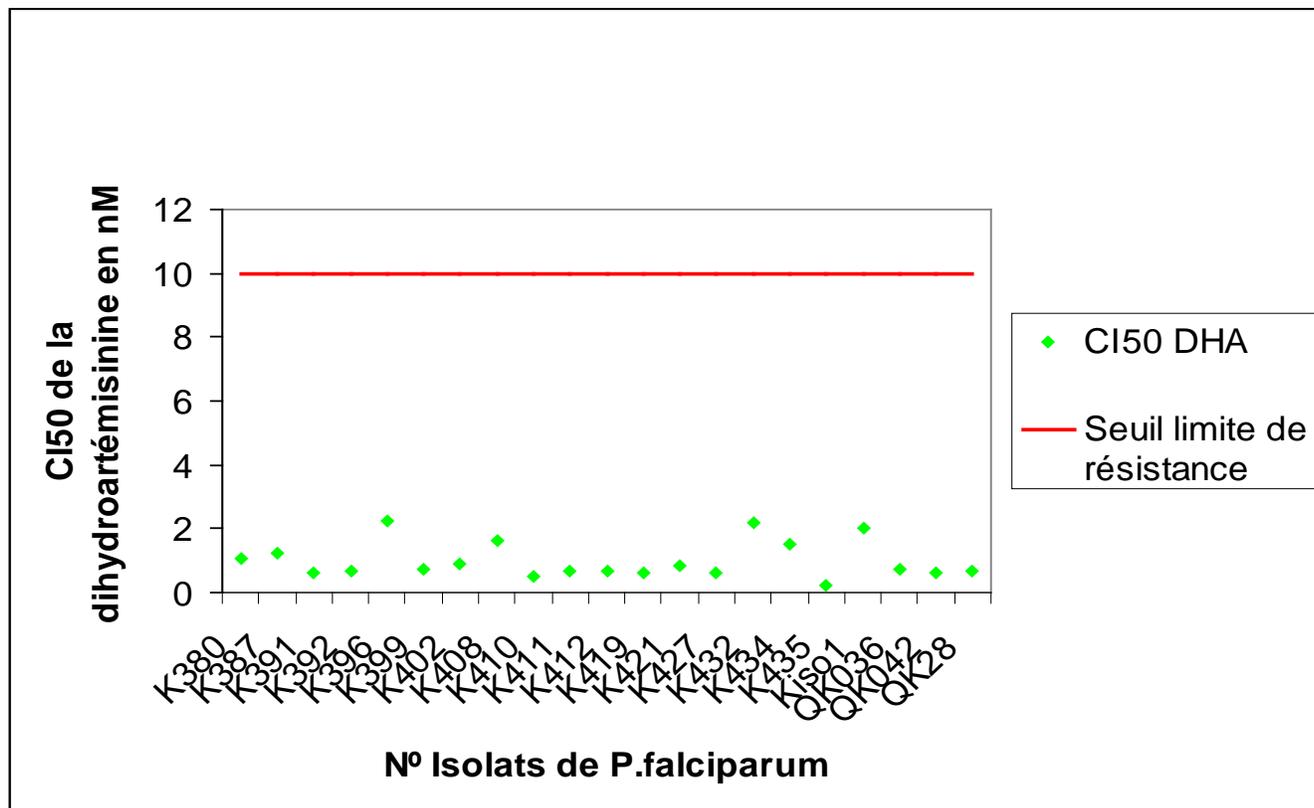
**Figure 22: Répartition des CI<sub>50</sub> de la Monodeséthylamodiaquine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Kollé**

Cette figure montre que les CI<sub>50</sub> de la monodeséthylamodiaquine sont en dessous du seuil limite de résistance. Nous notons que les CI<sub>50</sub> de quelques isolats s’approchent du seuil de résistance.



**Figure 23: Répartition des CI<sub>50</sub> de la Luméfantine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Kollé.**

Nous observons sur cette figure que les CI<sub>50</sub> de la luméfantine des isolats de terrain de *P. falciparum* sont largement en dessous du seuil limite de résistance.



**Figure 24: Répartition des CI<sub>50</sub> de la dihydroartémisinine selon les isolats de terrain de *P. falciparum* à Kollé.**

Comme à Bancoumana et à Faladjé, les CI<sub>50</sub> de la dihydroartémisinine des isolats de terrain de *P. falciparum* ont été largement en dessous du seuil limite de résistance.

## V.2. Comparaison des résultats moléculaires aux résultats du test *in vitro* :

### V.2.1. Comparaison des résultats de *Pfcr* K76T aux profils des $CI_{50}$ de la chloroquine *in vitro*:

**Tableau XIX:** Comparaison du marqueur moléculaire de résistance *Pfcr* K76T aux profils des  $CI_{50}$  de la chloroquine pour l'ensemble des localités.

		<i>Pfcr</i> K76T		
		Sauvages	Mutants	Total
<b>Profils de <math>CI_{50}</math></b>	Sensibles	10	3	13 (27,7%)
	Résistants	1	33	34 (72,3%)
Total		11 (23,4%)	36 (76,6%)	47 (100%)

Nous n'avons trouvé de différence statistiquement significative avec  $p=0,625$  (MacNemar).

### V.2.2. Comparaison de la prévalence de *PfATPase 6* S769N à celle des profils des $CI_{50}$ :

**Tableau XX:** Comparaison de prévalence du marqueur moléculaire de résistance des dérivés d'artémisinine *PfATPase 6* à celle des profils des  $CI_{50}$  pour l'ensemble des localités.

		<i>PfATPase 6</i>		
		Sauvages	Mutants	Total
<b>Profils de <math>CI_{50}</math></b>	Sensibles	47	0	47 (100%)
	Résistants	0	0	0
Total		47 (100%)	0	47 (100%)

Nous n'avons pas rencontré de mutation ponctuelle *PfATPase 6* S769N et 100% des isolats testés *in vitro* étaient sensibles.

### V.2.3. Comparaison de prévalence de *Pfmdr1* N86Y à celle des profils des CI<sub>50</sub> de la luméfantine:

**Tableau XXI:** Comparaison de la prévalence du marqueur moléculaire de résistance *Pfmdr1* N86Y à celle des profils des CI<sub>50</sub> de la luméfantine à Bancoumana.

		<i>Pfmdr1</i> N86Y		
		Sauvages	Mutants	Total
<b>Profils de CI<sub>50</sub></b>	Sensibles	11	1	12 ( <b>100%</b> )
	Résistants	0	0	0
Total		11 ( <b>91,7%</b> )	1 ( <b>8,3%</b> )	12 ( <b>100%</b> )

Nous avons eu 8,3% de souches mutantes à la méthode PCR. Les souches de *P.falciparum* étaient 100% sensibles à la luméfantine par le test pLDH ELISA.

Nous n'avons trouvé de différence statistiquement significative avec p= N.S.

**Tableau XXII:** Comparaison de la prévalence du marqueur moléculaire de résistance *Pfmdr1* N86Y à celle des profils des CI<sub>50</sub> de la luméfantine à Faladjé.

		<i>Pfmdr1</i> N86Y		
		Sauvages	Mutants	Total
<b>Profils de CI<sub>50</sub></b>	Sensibles	14	0	14 ( <b>100%</b> )
	Résistants	0	0	0
Total		14 ( <b>100%</b> )	0	14 ( <b>100%</b> )

Nous n'avons pas eu de souche mutante à la méthode PCR et aucun cas de résistance *in vitro* à la méthode pLDH ELISA.

**Tableau XXIII:** Comparaison de la prévalence du marqueur moléculaire de résistance *Pfmdr1* N86Y à celle des profils des CI<sub>50</sub> de la luméfantrine à Kollé.

		<i>Pfmdr1</i> N86Y		
		Sauvages	Mutants	Total
<b>Profils de CI<sub>50</sub></b>	Sensibles	18	2	20 ( <b>100%</b> )
	Résistants	0	0	0
Total		18 ( <b>90%</b> )	2 ( <b>10%</b> )	20 ( <b>100%</b> )

Les souches mutantes de *P.falciparum* étaient de 10 % à la méthode PCR et aucun cas de résistance *in vitro* à la méthode pLDH ELISA.

Nous n'avons trouvé de différence statistiquement significative  $p= 0,5$ .

## VI. COMMENTAIRES ET DISCUSSION :

### VI.1. Méthodologie :

Le cadre de notre étude a été Bancoumana, Faladjé et Kollé. Le choix de ces villages a été justifié pour des raisons suivantes : accessibilité géographique facile en toute saison, existence de données épidémiologiques antérieures, adhésion de la population aux études antérieures et la présence d'une équipe du DEAP dans ces villages pendant la saison de transmission (juin à décembre). Aussi sur le plan épidémiologique, ces villages sont des zones hyper endémiques de paludisme.

Au cours de cette étude, nous avons évalué chez des sujets âgés de 6 à 59 mois la sensibilité in vitro des isolats de terrain de *P.falciparum* à la chloroquine, à la monodeséhyalamodiaquine, à la luméfantine et à la dihydroartémisinine dans trois villages du Mali (Faladjé, Bancoumana et Kollé).

Le choix de la chloroquine se justifiait du fait qu'elle était le médicament de première intention préconisé par le PNLP pour la prise en charge des cas de paludisme simple en cette période. Le choix de la monodeséhyalamodiaquine, de la luméfantine et de la dihydroartémisinine se justifiait par le fait que ces médicaments sont des composants de CTA.

Deux souches de référence de *P.falciparum* W2 d'Indochine et 3D7 d'Afrique (l'une résistante et l'autre sensible) ont été adaptées en culture servant au contrôle de qualité. Au cours des études cliniques, 59 isolats de *P. falciparum* ont été collectés à Kollé, Bancoumana d'octobre à novembre 2005 coïncidant à la période de transmission de paludisme. Les protocoles des études respectives ont été approuvés par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université de Bamako et le consentement éclairé et / ou avis ont été obtenus auprès de chaque patient ou parent / tuteur préalable à l'inclusion dans les études.

Quatre médicaments antipaludiques dissous dans leurs solvants appropriés ont été distribués et séchés dans des plaques à 96 puits : la chloroquine Disulphate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, É.-U.) dans l'eau 12-3200 nM, monodeséhyalamodiaquine (SAPEC, Barbengo, Suisse) dans l'eau 7,5-1920 nM, luméfantine (Novartis Pharma, Bâle, Suisse) dans l'éthanol 1,25-320 nM et dihydroartémisinine (Sanofi Aventis, Gentilly, France) dans l'eau 0,25-64 nM. Pour chaque médicament testé, trois puits de contrôle ont été exemptes de médicaments et chaque concentration a été étudiée en double ou triple exemplaire. Tous les isolats ont été testés avant la date d'expiration des lots de plaques. Les isolats cliniques avec au moins 0,1% de densité parasitaire ont été inclus dans l'étude. Les échantillons ont été maintenus à +4 C et transportés au laboratoire dans

les 48 h de la collecte. Au laboratoire, les échantillons de sang ont été lavés trois fois avec une solution de RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Technologies de la vie, Auckland, Nouvelle-Zélande), plus 25 mM Hepes (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Etats-Unis) et 25 mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Les échantillons ont ensuite été remis en suspension dans l'hématocrite 1,5% dans le même milieu de culture complété avec 10% de sérum humain (Abcys Biowest, Paris, France). Pour des parasitémies initiales de plus de 1%, une dilution a été faite par l'ajout d'érythrocytes non infectées du groupe O<sup>+</sup> (Centre National de Transfusion Sanguine, Bamako, Mali), de manière à obtenir 0,5%-1% de densité parasitaire.

Les plaques ont été incubées pendant 42-48 h à 37 °C CO<sub>2</sub> dans un incubateur (20% O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>), puis congelées et conservées à – 20 °C. Les tests in vitro ont été révélés par la production pLDH ELISA.

Les tests de pLDH ELISA ont été exécutés sans ajouter l'hypoxanthine tritiée à la suspension de culture. Après décongélation des plaques, l'hémolyse de culture a été homogénéisée en agitant les plaques qui avaient été recouvertes d'un film plastique adhésif. Le succès du test de chimiosensibilité et le volume approprié d'hémolysat de culture à utiliser dans chaque dosage ont été déterminés pour chaque isolat clinique au cours d'un test préliminaire pLDH ELISA (pré-test). Le pré-test et le test pLDH ELISA ont été effectués au moyen d'un Kit commercial (test ELISA de l'antigène du paludisme, DiaMed AG, 1785). Les densités optiques (DO) ont été mesurées au moyen d'un lecteur de microplaque nommé VERSAmax microplate reader<sup>TM</sup> (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA) équivalent d'un spectrophotomètre.

La détection de marqueurs moléculaires de la résistance à la chloroquine, à la dihydroartémisinine et à la luméfantine a été effectuée sur des confettis imbibés de sang contenant des parasites de *P.falciparum* provenant des patients.

La méthode utilisée a été la double PCR suivie de la restriction endonucléase permettant de déterminer les types d'allèles (mutant ou sensible) sur les gènes *Pfcr1*, *PfATPase 6* et *Pfmdr1* respectivement à leurs codons K76T, S769N, N86Y.

La période d'étude d'octobre à novembre 2005 a été choisie sur la base des données relatives à la dynamique de la transmission du paludisme au Mali (période de haute transmission) .

Les CI<sub>50</sub> avec leurs intervalles de confiance à 95% (IC) ont été calculées avec un modèle Emax disponible à l'adresse <http://www.antimalarial-icestimator.net>,  $RE = 100 [(100 * Cc) / (Cc + CI_{50} C)]$  dans laquelle la CI<sub>50</sub> est la concentration du médicament inhibant 50% de l'activité du parasite,

c'est un facteur de sigmoidicité qui exprime la pente de la courbe, RE est la relative à l'effet du parasite (en pourcentage), qui définit l'axe des ordonnées et C est la concentration du médicament testé qui définit l'axe des abscisses.

Selon des études antérieures<sup>82, 83, 84</sup>, le seuil limite de résistance est la définition de résistance phénotypique uniquement disponible pour la chloroquine avec  $CI_{50} > 100$  nM obtenu de la méthode isotopique. Néanmoins, les seuils de sensibilité à la monodeséhyalamodiaquine, à la luméfantine et à la dihydroartémisinine ont été estimés à 80, 150 et 10 nM, respectivement. La comparaison des moyennes géométriques de  $CI_{50}$  testés pour les quatre médicaments utilisés a été effectuée sur **SPSS 11.0**. Au préalable la saisie a été faite sur **EXCELL 2003**.

## **VI.2. RESULTATS :**

### **VI.2.1. Résultats de la chimiosensibilité *in vitro* de *P.falciparum* par la méthode pLDH ELISA :**

Les moyennes géométriques de  $CI_{50}$  de la chloroquine étaient de 143,94 ; 156,55 ; 163,76 nM à Bancoumana, Faladjé et Kollé respectivement. Ces moyennes géométriques dépassent le seuil de résistance de la chloroquine défini à 100 nM.

Nous n'avons pas trouvé de différence entre les moyennes géométriques de  $CI_{50}$  des trois sites d'étude pour la chloroquine ( $P=0,630$ ).

Ces résultats sont similaires à ceux de [Pradines et al., 2006](#) à Pointe-Noire (République de Congo) qui ont eu une moyenne géométrique de la chloroquine  $CI_{50}$  à 141nM (N=110)<sup>85</sup>. A Bangkok (Thaïlande), [Timothy J.C Anderson et al., 2005](#) ont eu 231,8 nM (N=85)<sup>86</sup>; au Cameroun, [P. Agnamey et al., 2000](#) ont eu 202 nM à IC95%, 197-207 nM<sup>87</sup>; à Yaoundé (Cameroun), [Leonardo K. Basco et al., 1998](#), ont eu 237nM (N =38), à 95% IC 202- 277nmol/l<sup>88</sup> qui sont plus élevées que nos résultats.

Les moyennes géométriques de  $CI_{50}$  de la monodeséhyalamodiaquine étaient de 34,26 nM ; 33,25 nM ; 36,68 nM à Bancoumana, Faladjé, Kollé respectivement.

Nous n'avons pas trouvé de différence entre les moyennes géométriques de  $CI_{50}$  des trois sites d'étude pour la monodeséhyalamodiaquine ( $P=0,575$ ). Ces résultats sont largement inférieurs au seuil de résistance de la monodeséhyalamodiaquine 80nM. Ces résultats sont similaires à ceux de [Leonardo K. Basco et al., 1998](#) avec 31,1nmol/l (N=40) à 95% IC 26,8- 36,1nmol/l ; au Yaoundé (Cameroun) et légèrement supérieurs à ceux de [Bruno Pradines et al., 2006](#) avec 22,4 nmol/l (N=90) à Pointe-Noire (République de Congo)<sup>88</sup>.

Nous avons trouvé comme moyenne géométrique de  $CI_{50}$  de la luméfantine 10,65 nM ; 7,95 nM; 16,79 nM respectivement à Bancoumana, Faladjé et Kollé. Nous avons eu une différence statistiquement significative entre la moyenne géométrique de  $CI_{50}$  de la luméfantine de Faladjé et Kollé ( $p=0,000$ ) et également entre Bancoumana et Kollé ( $p=0,047$ ); pas de différence statistiquement significative entre Bancoumana et Faladjé ( $p=0,257$ ). Ces moyennes géométriques de  $CI_{50}$  sont largement inférieures au seuil de résistance défini pour la luméfantine qui est de 150 nM.

Au Cameroun (Yaoundé), [Leonardo K. Basco et al., 1998](#), ont eu 11,9 nmol/l (N=38) à 95% IC 10,4- 13,6 nmol/l ; [Bruno Pradines et al., 1999](#) au Sénégal ont eu 55,1 nmol/l (N=158) à 95% IC 48.1 à 62.1 nM<sup>89</sup>; [Bruno Pradines et al., 2006](#) à Pointe-Noire (République de Congo) ont eu 6,8 nmol/l (N=91) ont confirmé nos résultats.

Les moyennes géométriques de  $CI_{50}$  de la dihydroartémisinine à Bancoumana, Faladjé et Kollé étaient respectivement 0,69 ; 0,81 ; 0,85 nM. Nous n'avons pas eu de différence entre les moyennes géométriques de  $CI_{50}$  de la dihydroartémisinine dans les trois sites ( $p=0,551$ ). Ces résultats sont largement inférieurs au seuil de résistance défini à 10 nM. Ceci soutient la politique courante au Mali qui recommande l'artémether-luméfantine et l'artésunate-amodiaquine en tant que traitements principaux pour le paludisme simple.

Ces résultats sont similaires à ceux de [Bruno Pradines et al., 2006](#) à Pointe-Noire (République de Congo) avec 1,02 nmol/l (N=110) ; [Timothy J.C.Anderson et al., 2005](#) à Bangkok (Thaïlande) avec 4,6 nmol/l (N=86).

## **VI.2.2. Comparaison des résultats moléculaires aux résultats de test in vitro :**

### **VI.2.2.1. Comparaison de prévalences de *Pfcr* K76T à celles des profils des $CI_{50}$ de la chloroquine:**

Nous avons trouvé à Bancoumana, Faladjé, Kollé respectivement 75%, 78,6%, 76,2% de *Pfcr* 76T. Ces prévalences de la chloroquine résistance sont comparables ( $p=0,975$ ), ont atteint un niveau de résistance élevé à Bancoumana., Faladjé, Kollé. Nous n'avons pas eu de différence statistiquement significative entre la prévalence des profils des  $CI_{50}$  de la chloroquine et celle de *Pfcr* K76T ( $p=0,625$ ) pour l'ensemble des localités. Ces résultats sont comparables à ceux de [Djimé et al.](#) en 2001 qui ont eu 60% à Mopti et Bandiagara ; [Tékété M. M., en 2001](#) a eu 67,2% à Kollé et 64,4% à Bancoumana<sup>90</sup>.

#### **VI.2.2.2. Comparaison de prévalences de *PfATPase 6* à celles des profils des $CI_{50}$ de la dihydroartémisinine :**

Tous les isolats s'étaient révélés sensibles à la dihydroartémisinine *in vitro* dans l'ensemble des sites d'étude.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de [Jambou et al. 2005](#) en Amérique du Sud montrant l'association entre la mutation *PfATP6 S769N* et la diminution de la susceptibilité de l'artéméther .

Ces résultats ne sont comparables à ceux de [Linhua Tang et al. 2008](#) <sup>91</sup> en Chine et de [Isabel D.Ferreira et al. 2008](#) au Brésil<sup>92</sup>.

#### **VI.2.2.3. Comparaison de la prévalence de *Pfmdr1 N86Y* à celle des profils des $CI_{50}$ de la luméfantine:**

Nous avons eu à Bancoumana, Faladjé et Kollé respectivement 91,7 % ; 100 % ; 90 % de *pfmdr1 86N* avant traitement.

Dans l'étude de [Sisowath, et al. 2005](#) en Tanzanie la prévalence de *Pfmdr1 86N* était de 15% avant traitement et de 41% après traitement<sup>93</sup>.

En Ouganda, [Grant Dorsey et al. 2006](#) ont eu 8% avant traitement et 43% après traitement des échantillons des patients atteints de nouvelles infections<sup>94</sup>.

## VII. CONCLUSION:

Nous pouvons conclure que la chloroquine a atteint un niveau de résistance *in vitro* élevé dans l'ensemble des localités.

Les isolats de *P.falciparum* gardent une sensibilité *in vitro* à la dihydroartémisinine, à la monodéséthylamodiaquine et à la luméfantrine.

Nous avons eu une forte résistance à *pfcr1* K76T ; une faible résistance à *pfmdr1* N86Y et aucune résistance à *pfATPase6* S769N.

## VIII. RECOMMANDATIONS:

Au terme de cette étude, nous formulons les recommandations suivantes:

### **Aux décideurs de la santé :**

- ▶ Il y a un besoin accru de formation et de développement de capacité dans ces méthodes d'évaluation de la chimiorésistance pour des laboratoires dans les laboratoires centraux et régionaux au Mali.

### **Aux scientifiques :**

- ▶ Développer la recherche des marqueurs moléculaires pour les nouvelles molécules et les anciennes molécules pour lesquelles nous n'avons pas encore de marqueurs précis afin de pouvoir suivre la dynamique de leur efficacité.
- ▶ Surveiller régulièrement par les méthodes *in vitro* de dépistage de la résistance naissante aux CTA.
- ▶ Poursuivre ce travail sur une taille plus importante d'isolats représentatifs des faciès épidémiologiques de transmission du paludisme au Mali.

**IX. FICHE SIGNALÉTIQUE :****Nom :** KODIO**Prénom :** ALY**Nationalité :** Malienne**Année de soutenance :****Ville de soutenance :** Bamako**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.**Secteur d'intérêt :** Parasitologie, Epidémiologie de la chimiorésistance, Biologie moléculaire.

**Titre :** Evaluation de la sensibilité *in vitro* des isolats de terrain de *P.falciparum* à la chloroquine, à la monodéséhyalamodiaquine, à la luméfantrine et à la dihydroartémisinine dans trois villages du Mali.

**Résumé :**

Le but de ce travail était d'évaluer la sensibilité *in vitro* des isolats de terrain de *P.falciparum* à la chloroquine, à la monodéséhyalamodiaquine, à la luméfantrine et à la dihydroartémisinine dans trois villages du Mali.

Pour atteindre ce but nous avons réalisé une étude prospective de novembre à décembre 2005 sur des sujets âgés de 6 à 59 mois de Bancoumana, Faladjé et de Kollé. Durant, les études cliniques *in vivo*, 59 isolats de *P. falciparum* ont été collectés à Kollé, Bancoumana et Faladjé dont 47 ont réussi au test pLDH ELISA. Les isolats cliniques ont été cultivés avec une solution de RPMI 1640, plus 25 mM Hepes et 25 mM NaHCO<sub>3</sub> (à 1,5% d'hématocrite, +10% de sérum humain.). Les plaques ont été incubées pendant 42-48 h à 37 °C dans un incubateur CO<sub>2</sub> (20% O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>), puis congelées et conservées à - 20 °C. Les tests *in vitro* ont été révélés par la production pLDH ELISA.

La détection de marqueurs moléculaires de la résistance à la chloroquine, à la monodéséhyalamodiaquine, à la dihydroartémisinine et à la luméfantrine a été effectuée sur des confettis imbibés de sang contenant des parasites de *P.falciparum* provenant des patients. La méthode utilisée a été la double PCR suivie de la digestion d'enzymes de restriction permettant de déterminer les types d'allèles (mutant ou sensible) sur les gènes *Pfcr1*, *PfATPase 6* et *Pfmdr1* respectivement à leurs points de mutation K76T, S769N, N86Y.

L'analyse des moyennes géométriques de CI<sub>50</sub> a révélé : pour la chloroquine 143,94, 156,55, 163,76 nM à Bancoumana, Faladjé et Kollé respectivement (p= 0,630). Ces moyennes géométriques dépassent le seuil de résistance défini à 100 nM ; pour la monodéséhyalamodiaquine

34,26 nM, 33,25 nM, 36,68 nM à Bancoumana, Faladjé, Kollé respectivement ( $p=0,575$ ). Ces résultats sont largement inférieurs au seuil de résistance 80 nM ; pour la luméfantrine 10,65 ; 7,95 ; 16,79 nM à Bancoumana, Faladjé et Kollé respectivement. Ces moyennes géométriques de  $CI_{50}$  sont largement inférieures au seuil de résistance définie pour la luméfantrine 150 nM ; pour la dihydroartémisinine à Bancoumana, Faladjé et Kollé respectivement 0,69 ; 0,81 ; 0,85 nM ( $p=0,551$ ). Ces résultats sont largement inférieurs au seuil de résistance défini 10 nM.

La recherche des mutations ponctuelles sur les différents gènes a révélé des taux d'allèle mutant pour *Pfcr1* 76T à Bancoumana, Faladjé, Kollé respectivement 75%, 78,6%, 76,2% ( $p=0,975$ ). Nous avons trouvé les prévalences de l'allèle *Pfmdr1* 86N à Bancoumana, Faladjé et Kollé respectivement 91,7 % ; 100 % ; 90%. Aucune mutation ponctuelle *PfATPase 6* S769N n'a été observée.

En conclusion, la monodeséhyalamodiaquine, la luméfantrine et la dihydroartémisinine gardent leur efficacité *in vitro* contre les isolats de *P.falciparum* alors que la chloroquine est inefficace dans les trois villages.

**Mots clés:** Bancoumana, Faladjé, Kollé, *P. falciparum*, PCR, *Pfcr1*, *PfATPase 6*, *Pfmdr1*, mutation ponctuelle, pLDH ELISA,  $CI_{50}$ , prévalence, monodeséhyalamodiaquine, luméfantrine, dihydroartémisinine, chloroquine.

**Name:** KODIO

**First Name:** ALY

**Nationality:** Malian

**Year of defense:**

**City of defenses:** Bamako

**Place of deposit:** Library of the Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmacy.

**Sector of interest:** Parasitology, Epidemiology of drug resistance, Molecular Biology.

**Title:**

Evaluation of sensitivity *in vitro* of field *P. falciparum* isolates to chloroquine, monodesethylamodiaquine, lumefantrine and dihydroartémisinine in three villages in Mali.

**Abstract:**

The purpose of this work was to assess the *in vitro* sensitivity of field *P. falciparum* isolates to chloroquine, monodesethylamodiaquine, lumefantrine and dihydroartemisinin in three villages in Mali.

To achieve this goal we conducted a prospective study from November to December 2005 on subjects aged 6 to 59 months of Bancoumana, Faladjé and Kollé. During the *in vivo* clinical studies, 59 isolates of *P. falciparum* were collected to Kollé, Bancoumana and Faladjé were included, we had 47 successful pLDH test. The clinical isolates were cultured with a solution of RPMI 1640, plus 25 mM Hepes and 25 mM NaHCO<sub>3</sub> (hematocrit 1.5%, with 10% human serum AB). The plates were incubated for 42-48 hours at 37 ° C in a CO<sub>2</sub> incubator (20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), then frozen and stored at - 20 ° C. The *in vitro* assays were revealed by pLDH ELISA production.

The detection of molecular markers of resistance to chloroquine, monodesethylamodiaquine, dihydroartemisinin and lumefantrine was made on confetti soaked with blood containing *P. falciparum* parasites from patients. We used nested PCR followed by enzymes restriction to determine the alleles types (sensitive or mutant) on *Pfcr* genes, *PfATPase 6* and *Pfmdr1* at their points of mutation respectively K76T, S769N, and N86Y.

The analysis of IC<sub>50</sub> geometric means revealed: for chloroquine 143.94, 156.55, 163.76 nM in Bancoumana, Faladjé and Kollé respectively (P = 0.630). These geometric means exceeded the resistance set at 100 nM. For monodesethylamodiaquine 34.26 nM 33.25 nM, 36.68 nM in Bancoumana, Faladjé, Kollé respectively (P = 0.575). These results are well below the threshold of resistance 80 nm. For lumefantrine 10.65, 7.95, 16.79 nM in Bancoumana, Faladjé and Kollé respectively. These IC<sub>50</sub> geometric means are well below the threshold set for the resistance

lumefantrine 150 nM. For dihydroartemisinin in Bancoumana, Faladjé and Kollé respectively 0.69; 0.81; 0.85 nM (P = 0.551). These results are well below the resistance identified 10 nM.

The rates of mutant allele for *Pfcr*t 76T were in Bancoumana, Faladjé, Kollé respectively 75%, 78.6%, 76.2% (P = 0.975). The prevalence of mutant allele *Pfmdr*1 86N in Bancoumana, Faladjé and Kollé were respectively 91,7 %; 100 %; 90 %. No point mutation was observed at *PfATPase* 6 S769N.

In conclusion, the monodesethylamodiaquine, dihydroartemisinin, and lumefantrine keep their in vitro efficacy against *P. falciparum* isolates but chloroquine remains ineffective in these three villages.

**Keywords:**

Bancoumana, Faladjé, Kollé, *P. falciparum*, PCR, *Pfcr*t, *PfATPase* 6, *Pfmdr*1, mutation, pLDH ELISA IC<sub>50</sub>, prevalence, monodesethylamodiaquine, lumefantrine, dihydroartemisinin, chloroquine.

## X. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

---

**1 Bruneel F, Thellier M, Eloy O, Mazier D, Boulard G, Danis M, Bedos JP.** Intensive Care Med 2004 Sep, 30 (9):1851-2. Epub 2004 Jul 16.

**2 Marques HH, Vallada MG, Sakane PT, Boulos M.** [Congenital Malaria. Case reports and a brief review of literature]. J Pediatric( Rio J ). 1996 Mar-Apr,72(2):103-5. Portuguese

**3 Kenya. Ministry of Health. Malaria Control Programme.** Epidemiology of malaria in Kenya. Afr J Med Pract. 1994 Mar-Apr;1(1):5-6.

**4 Breman, J.** The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. Am. J. Trop. Med. Hyg 2001; 64(1,2) S, 1-11

**5 Rapport mondial sur le paludisme 2008:** malaria.who.int/wmr2008/WMR08-news-summary-FR.pdf

**6 Snow, R.W., Trape, J.F., Marsh, K., 2001.** The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa. Trends Parasitol. 17, 593–597.

**7 Trape, J.F., Pison, G., Preziosi, M.P., Enel, C., Desgrees du Lou, A., Delaunay, V., Samb, B., Lagarde, E., Molez, J.F., Simondon, F., 1998.** Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. C R Acad Sci III. 321, 689–697.

**8 Duraisingh MT, Roper C, Walliker D, Warhurst DC.** Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum. Mol Microbiol 2000; 36:955–61.

**9 Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC.** The tyrosine-86 allele of the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum is associated with increased sensitivity to the anti-malarials méfloquine and artemisinin. Mol Biochem Parasitol 2000; 108:13–23.

**10 Yang, H., Liu, D., Yang, Y., Fan, B., Yang, P., Li, X., Li, C., Dong, Y., Yang, C., 2003.** Changes in susceptibility of Plasmodium falciparum to artesunate in vitro in Yunnan Province, China. Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg. 97, 226–228.

---

**11 Randrianarivelosia, M., Raharimalala, L.A., Randrianasolo, L., Ratsimbasoa, A., Rason, M.A., Arieu, F., Jambou, R., 2001.** Madagascar isolates of *Plasmodium falciparum* showing low sensitivity to artemether in vitro. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95, 237–243.

**12 Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, Ekala MT, Bouchier C, Esterre P, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O.** Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet.* 2005 Dec 3; 366(9501):1960-3.

**13 Duraisingh, M.T., Jones, P., Sambou, I., von Seidlein, L., Pinder, M., Warhurst, D.C., 1999.** Inoculum effect leads to overestimation of in vitro resistance for artemisinin derivatives and standard antimalarials: a Gambian field study. *Parasitology* 119, 435–440.

**14 Ringwald, P., Meche, F.S., Bickii, J., Basco, L.K., 1999.** In vitro culture and drug sensitivity assay of *Plasmodium falciparum* with non serum substitute and acute-phase sera. *J. Clin. Microbiol.* 37, 700–705.

**15 Basco, L.K., 2004.** Molecular epidemiology of malaria in Cameroon XX. Experimental studies on various factors of in vitro drug sensitivity assays using fresh isolates of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 474–480.

**16 Briolant, S., Parola, P., Fusai, T., Madamet-Torrentino, M., Baret, E., Mosnier, J., Delmont, J.P., Parzy, D., Minodier, P., Rogier, C., Pradines, B., 2007.** Influence of oxygen on asexual blood cycle and susceptibility of *Plasmodium falciparum* to chloroquine: requirement of a standardized in vitro assay. *Malar J.* 6, 44.

**17 Basco, L.K., 1993.** Halofantrine resistance in Africa. *Lancet* 341, 1283.

**18 Druilhe, P., Moreno, A., Blanc, C., Brasseur, P.H., Jacquier, P., 2001.** A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64, 233–241.

**19 Noedl, H., Wernsdorfer, W.H., Miller, R.S., Wongsrichanalai, C., 2002.** Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1658–1664.

**20 Kaddouri, H., Nakache, S., Houze, S., Mentre, F., Le Bras, J., 2006.** Susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Africa using a highly sensitive *Plasmodium* lactate dehydrogenase

---

immunodetection assay and an inhibitory Emax model for precise IC50 estimation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3343–3349.

**21 Bacon, D.J., Latour, C., Lucas, C., Colina, O., Ringwald, P., Picot, S., 2007.** Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for in vitro antimalarial efficacy testing and application to clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1172–1178

**22 Djimde, A.A., Doumbo, O.K., Traore, O., Guindo, A.B., Kayentao, K., Diourte, Y., Niare-Doumbo, S., Coulibaly, D., Kone, A.K., Cissoko, Y., Tekete, M., Fofana, B., Dicko, A., Diallo, D.A., Wellem, T.E., Kwiatkowski, D., Plowe, C.V., 2003.** Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 558–563

**23 Sagara, I., Dicko, A., Djimde, A., Guindo, O., Kone, M., Tolo, Y., Thera, M.A., Sogoba, M., Fofana, M., Ouattara, A., Sissoko, M., Jansen, H.F., Doumbo, O.K., 2006.** A randomized trial of artesunate-sulfamethoxypyrazine-pyrimethamine versus artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 630–636.

**24 de Radigues, X., Diallo, K.I., Diallo, M., Ngwakum, P.A., Maiga, H., Djimde, A., Sacko, M., Doumbo, O., Guthmann, J.P., 2006.** Efficacy of chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Koumantou, Mali. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 1013–1018.

**25 Gay, R. S., MaComb, R. B., Bowers, G. N., Jr., 1968.** Optimum reaction conditions for human lactate dehydrogenase isoenzyme as they affect total lactate dehydrogenase activity.

**26 Abad-Sapatero, C., Griffith, J., Sussman, J., Rossmann, M., 1987.** Refined crystal structure of dog fish M4 Apo-lactate Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 198, 445-467. *Clin. Chem.* 14, 740-747.

**27 Tenenbaum-Bayer, H., and Levitzki, A., 1976.** The refolding of lactate dehydrogenates subunits and their assembly to the functional tetramer. *Biochimica et Biophysica Acta* . 445, 261-279.

**28 TANABE.K.** Glucose transport in Malaria infected erythrocytes. *Parasitology to day*, (6), 225-229. 1990.

**29 ROTH. E. F., J. R., CALVIN. M.C., MAX AUDIT.I., ROSA.J., and ROSA. R.** The enzyme of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with *plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* 72, 1922-1925.

- 
- 30 M.T. Makler and D.J. Hinrichs**, Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48 (1993), pp. 205–210
- 31 Sherman I.W.** Heterogeneity of lactate dehydrogenase in avian malaria *Plasmodium lophurae*. *J. Exp. Med.* 114 (1961), pp. 1049–1062.
- 32 ODUOLA AMJ, OMITOWOJU GO, SOWUNMI A, MAKLER MT, FALADE CO, KYLE DE, FEHINTOLA FA, OGUNDAHUNSI OAT, PIPER RC, SCHUSTER BG, MILHOUS WK.** *Plasmodium falciparum*: evaluation of lactate dehydrogenase in monitoring therapeutic responses to standard antimalarial drugs in Nigeria. *Exp. Parasitol.* 87 (1997), pp. 283–289.
- 33 Sherman I.W.** Carbohydrate metabolism in asexual stages. In: I.W. Sherman, Editor, *Malaria. Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*, ASM Press (1998), pp. 135–144.
- 34 KANAANIJ ;and GINSBURG.H.** Transport of lactate in *Plasmodium.falciparum* -infected human erythrocytes. *Journal of cellular physiology* 1991 149. 469-76
- 35 VANDER. JAGT.D.L; L.A; and HEID-RICH.J.E. 1981.** Partial purification and characterization of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. *Mol and biochem parasitol* 4, 255-264.
- 36 SIMMONS. D. L; HYDE.J.E; MACKAY.M; GOMAN.M; and SCAIFE. J.1985.** Cloning studies on the gene coding for L-(+)-lactate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*.*Mol and biochem parasitol* 15, 23-243.
- 37 BZIK.D.J; FOX.B.A and GONYER.K.** Expression of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase in *Escherichia coli*.*Mol and biochem parasitol* 1993 59, 55-166
- 38 MAKLER MT, RIES JM, WILLIAMS JA, BANCROFT JE, PIPER RC, GIBBINS BL, HINRICHS DJ.** Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg* 1993 ; 48(7) : 739-741
- 39 Guttman P, Ehrlich P.** Ueber die wirkung des methylemblau bei malaria. *Berlin Klin Wochenschr* 1891; 28:953-6.
- 40 Thompson PE, Werbel LM.** Antimalarial agent: chemistry and pharmacology. In: De Stevens G, ed. *Medical chemistry*, Vol. 12. News York: Academic Press, 1972.
- 41 Coatney GR.** Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine. *Am J Trop Med Hyg* 1963; 12:121-8.

- 
- 42 Yayon, A., Cabantchick, Z.I., and Ginsberg, H.** Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes as the target of the anti-malarial drug chloroquine. *EMBO J.* 1984 Nov,3(11):2695-700
- 43 Fitch, C.D.** (1972) *Proc Helminth.soc. Washington* 39, 265-27.
- 44 Akintonwa A, Gbajumo SA, Mabadeje AF.** Placental and milk transfert of chloroquine in human. *Ther Drug Monit.* 1988;10(2):147-149.
- 45 Ogunbona FA, Onyeji CO, Bolaji OO, Torimiro SE.** Excretion of chloroquine and desethylchloroquine in human milk.  
*Br J Clin Pharmacol.* 1987 Apr;23(4):473-6.
- 46 Winstanley PA et al.** The disposition of amodiaquine in Zambians and Nigerians with malaria. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1990, 29:695–701.
- 47 Hatton CS et al.** Frequency of severe neutropenia associated with amodiaquine prophylaxis against malaria. *Lancet*, 1986, 1:411–414.
- 48 Newton PN et al.** Comparison of oral artesunate and dihydroartemisinin antimalarial bioavailabilities in acute falciparum malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46:1125–1127.
- 49 Ribeiro IR, Olliaro P.** Safety of artemisinin and its derivatives. A review of published and unpublished clinical trials. *Medicine Tropical (Mars)*, 1998, 58(3 Suppl.): 50–53.
- 50 Price R et al.** Adverse effects in patients with acute falciparum malaria treated with artemisinin derivatives. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999, 60:547–555.
- 51 Leonardi E et al.** Severe allergic reactions to oral artesunate: a report of two cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2001,95:182–183.
- 52 Van Vugt M et al.** A case-control auditory evaluation of patients treated with artemisinin derivatives for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000, 62:65–69.

- 
- 53 Kissinger E et al.** Clinical and neurophysiological study of the effects of multiple doses of artemisinin on brain-stem function in Vietnamese patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000, 63:48–55.
- 54 Hien TT et al.** Neuropathological assessment of artemether-treated severe malaria. *Lancet*, 2003, 362:295–296.
- 55 World Health Organization, 2003.** Assessment of the safety of artemisinin compounds in pregnancy. Geneva, (document WHO/CDS/MAL/2003.1094).
- 56 Ezzet F, Mull R, Karbwang J.** Population pharmacokinetics and therapeutic response of CGP 56697 (artemether + benflumetol) in malaria patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1998, 46:553–561.
- 57 White NJ, van Vugt M, Ezzet F.** Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. *Clinical Pharmacokinetics*, 1999, 37:105–125.
- 58 Van Vugt M et al.** No evidence of cardiotoxicity during antimalarial treatment with artemether-lumefantrine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999, 61:964–967.
- 59 OMS.** Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. Série de Rapports techniques, n°529, Genève : Organisation mondiale de la santé, 1973 ; 128 p.
- 60 SPRATT BG.** Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Sciences* 1994; 264:388-393.
- 61 NIKAIDO H et al.** Prevention of drug access to bacterial target: permeability barriers and active efflux. *Sciences* 1994;264:382-388.
- 62 BASCO LK, LE BRAS J, RHODES Z & WILSON MC.** Analysis of Pfmdr1 and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from Sub-Saharan Africa. *Mol Biochem Parasitol*, 1995; 74:157-166.
- 63 FIDOCK DA, NOMURA T, TALLEY AK, et al.** Mutation in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol cell* 2000;6:861-71.
- 64 COWMAN AF, KARCZ SR.** The pfmdr gene homologues of *Plasmodium falciparum*. *Acta leiden* 1991; 60(1):121-9.

---

**65 BRAY PG, & WARD SA.** A comparison of phenomenology and genetic of multidrug resistance in cancer cells and quinoleine resistance in Plasmodium falciparum. Pharmacol Ther.1998;77:1-28

**66 HENK B, HENDRIK W, VAN V, BERT P, ARNOLD JM, DRIESSEN W, N. K.** Mechanism of MDR transporters; FEMS Microbiology Reviews 1997;21:55-84.

**67 DURAISINGH MT, DRAKRLEY CJ, MULLER O, BAYLEY R, SNOUNOU G et al.** Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the Pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum by chloroquine and amodiaquine. Parasitology, 1997; 177:1429-1433.

**68 BASCO L, Ringwald P.** Analysis of key Pfcrt point mutation and vitro and in vivo response to chloroquine in Yaoundé, Cameroun. J Infect Dis. 2001 Jun 15;183(12):1828-31.

**69 Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV, Coulibaly D.** A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. N Engl J. Med 2001 Jan 25; 344(4):257-63.

**70 Ochong EO, van den Broek IV, Keus K, Nzila A.** Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the Plasmodium falciparum multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan. Am J Trop Med Hyg. 2003 Aug; 69(2):184-7.

**71 Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S.** Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. Nature 2003, 424(6951):957-961.

**72 Uhlemann AC, Cameron A, Eckstein-Ludwig U, Fischbarg J, Iserovich P, Zuniga FA, East M, Lee A, Brady L, Haynes RK, and Krishna S:** A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. Nature structural & molecular biology 2005, 12(7):628-629

**73 Hastings IM, Ward SA.** Coartem (artemether-lumefantrine) in Africa: the beginning of the end? The Journal of Infectious Diseases 2005; 192:1303–1304

**74 Payne D.** 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. WHO/MAL 1984; 84:2-21.

---

**75 Le Bras J, Deloron P.** In vivo sensitivity of *P. falciparum*: evaluation of a new semi-micro-test. Am. J. Trop. Med. Hyg 1983; 32:447-53.

**76 DESJARDIN RE, CANFIELDS CJ, HAYNES JP, CHNULAY JD.** Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by semi-automated micro technique. Antimicrob. Agent Chemother 1979;16:710-8.

**77 Le Bras J, Andrieux B, Hatin I, Savel J, Coulaud JP.** *Plasmodium falciparum*: Interprétation du semi-micro-test de chimiosensibilité par incorporation de l'hypoxanthine radioactive. Path Bio 1984; 32:463-466.

**78 MAKLER MT, HINRICHS DJ.** Measurement of the lactate deshydrogenase: stage-specific lactate production in synchronized culture. Exp. Parasitol 1993; 54:391-6.

**79 WHO:** Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. 2003 protocole.

**80 WHO:** Rapport d'une consultation de l'OMS Genève, Suisse, 3-5 décembre 2001

**81 OMS – Genève.** Manuel des techniques de base pour le laboratoire médical, 1982 189-203 ; 353-359

**82 Basco, L.K., Le Bras, J., 1993.** In vitro activity of artemisinin derivatives against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. Am. J.Trop. Med. Hyg. 49, 301–307.

**83 Pradines, B., Tall, A., Fusai, T., Spiegel, A., Hienne, R., Rogier, C., Trape, J-F., Le Bras, J., Parzy, D., 1999.** In vitro activities of benflumetol against 158 Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum* in comparison with those of standard antimalarial drugs. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 418–420.

**84 Ringwald, P., Basco, L.K., 1999.** Comparison of in vivo and in vitro tests of resistance in patients treated with chloroquine in Yaoundé, Cameroon. Bull. WHO. 77, 34–43.

**85 Bruno Pradines, Philippe Hovette, Thierry Fusai, Henri Léonard Atanda, Eric Baret, Philippe Cheval, Joel Mosnier, Alain Callec, Julien Cren, Rémy Amalvict, Jean Pierre Gardair, and Christophe Rogier.** Prevalence of In Vitro Resistance to Eleven Standard or New Antimalarial Drugs among *Plasmodium falciparum* Isolates from Pointe-Noire, Republic of the Congo. J Clin Microbiol. 2006 July; 44(7): 2404–2408.

**86 Timothy J. C. Anderson, Shalini Nair, Huang Qin, Sittaporn Singlam, Alan Brockman, Lucy Paiphun, and François Nosten.** Are Transporter Genes Other than the Chloroquine Resistance Locus (*pfcr*) and

---

Multidrug Resistance Gene (pfmdr) Associated with Antimalarial Drug Resistance? Antimicrob Agents Chemotherapy. 2005 Jun; 49(6):2180-8.

**87 P. AGNAMEY, S.R. MOYOU, P. BRASSEUR, P.F. GALEGA.** UN FOYER DE PALUDISME MULTI-RESISTANT EN ZONE FORESTIERE AU CAMEROUN REVISITE 14 ANS APRES. Med Trop 2002; 62: 141-144

**88 LEONARDO K. BASCO, JEAN BICKII, AND PASCAL RINGWALD.** In Vitro Activity of Lumefantrine (Benflumetol) against Clinical Isolates of Plasmodium falciparum in Yaoundé, Cameroon. Antimicrob Agents Chemotherapy Sept. 1998, p. 2347–2351.

**89 BRUNO PRADINES, ADAMA TALL, THIERRY FUSAI, ANDRE SPIEGEL, REMI HIENNE, CHRISTOPHE ROGIER, JEAN FRANCOIS TRAPE, JACQUES LE BRAS, AND DANIEL PARZY.** In Vitro Activities of Benflumetol against 158 Senegalese Isolates of *Plasmodium falciparum* in Comparison with Those of Standard Antimalarial Drugs. Antimicrob Agents Chemotherapy Feb. 1999, p. 418–420

**90 TEKETE M. M.** Sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine dans deux villages de la savane malienne : Kollé et Bancoumana. Thèse Pharmacie. Bamako, FMPOS, 2001. N : 02-P-9

**91 Guoqing Zhang, Yayi Guan, Bin Zheng, Song Wu and Linhua Tang.** No PfATPase6 S769N mutation found in Plasmodium falciparum isolates from China. Malar J. 2008 Jul 8; 7:122.

**92 Ferreira ID, Martinelli A, Rodrigues LA, do Carmo EL, do Rosário VE, Póvoa MM, Cravo P.** *Plasmodium falciparum* from Pará state (Brazil) shows satisfactory in vitro response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type PfATPase6. Trop Med Int Health. 2008 Feb; 13(2):199-207.

**93 Sisowath, C., J. Stromberg, A. Martensson, M. Msellem, C. Obondo, A. Bjorkman, and J. P. Gil. 2005.** In vivo selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). J. Infect. Dis. 191:1014-1017.

**94 Dokomajilar C, Nsoya SL, Greenhouse B, Rosenthal PJ, Dorsey G.** Selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic. Antimicrob Agents Chemother. 2006 May; 50(5):1893-5.

---

## *SERMENT DE GALIEN*

*Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de  
l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

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

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

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

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

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

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

***Je le jure !***