

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique (MESRS)

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple-Un But-Une Foi



U.S.T.T.B

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018

N° _____ /

**SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DE *Plasmodium falciparum* A LA
CHLOROQUINE, SELINGUE**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le ___/06/2018 devant la faculté de pharmacie pour
l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)

Par

Mlle Salimata DIALLO

JURY

Président du jury : Professeur Ababacar I. MAIGA

Membres : Professeur Mouctar DIALLO

Docteur Vincent SANOGO

Co-directeur de thèse : Monsieur Ibrahim KEÏTA

Directeur de thèse: Professeur Ousmane KOITA

Cette thèse a reçu le financement du Projet President's Malaria Initiative (PMI-USPQ FAA-16-002)

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE**ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2017-2018****ADMINISTRATION****Doyen:** Boubacar TRAORE, Professeur**Vice-doyen:** Ababacar I. MAIGA, Professeur**Secrétaire principal:** Seydou COULIBALY, Administrateur Civil**Agent comptable:** Famalé DIONSAN, Contrôleur des Finances.**LES PROFESSEURS HONORAIRES**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
2	M. Mahamadou	CISSE	Biologie
3	M. Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
4	M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
5	M. Boulkassoum	HADARA	Législation
6	M. Moussa	Feu HARAMA	Chimie Organique (décédé)
7	M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
8	M. Alou A.	KEÏTA	Galénique
9	M. Mamadou	KONE	Physiologie
10	M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
11	M. Bréhima	KOUMARE	Bactériologie et Virologie
12	M. Abdrahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
13	M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Mounirou	BABY	Hématologie
2	M. Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	M. Abdoulaye	DABO	Biologie /Parasitologie
4	M. Alassane	DICKO	Santé Publique
5	M. Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
6	M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCE/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
3	M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
4	M. Abdoulaye	DJIMDE	Bactériologie-Virologie
5	M. Akory Ag	IKNANE	Santé Publique-Nutrition
6	M. Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
7	M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie chef de DER
8	M. Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé Environnement

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Charles	ARAMA	Immunologie
2	M. Seydina S.A.	DIAKITE	Immunologie
3	M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
4	M. Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
5	M. Kassoum	KAYENTAO	Santé Publique Biostatistiques
6	M. Issiaka	SAGARA	Santé Publique Biostatistiques
7	Mme. Fanta	SANGHO	Santé Publique
8	M. Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique Biostatistiques

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
2	Mme. Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
3	M. Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie Clinique
4	Mme. Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
5	M. Souleymane	DAMA	Parasitologie Entomologie Méd
6	M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
7	M. Issa	DIARRA	Immunologie
8	Mme. Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
9	M. Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
10	Mme. Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
11	M. Oumar	GUINDO	Epidémiologie
12	M. Falaye	KEÏTA	Santé Publique/Santé Environ.
13	M. N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
14	M. Birama Apho	LY	Santé Publique
15	M. Yacouba	MAÏGA	Biostatistiques
16	M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
17	M. Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
18	M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
19	M. Oumar	SANGHO	Epidémiologie
20	M. Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	M. SAÏBOU	MAÏGA	Législation
3	Mme. ROKIA	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
-	Néant	-	-

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. LOSENI	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
2	M. Yaya	COULIBALY	Législation
3	Mme. ADIARATOU	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Bakary Moussa	CISSE	Galénique
2	M. Issa	COULIBALY	Gestion
3	M. Balla FATOGOMA	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
4	M. Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
5	M. Antoine	DARA	Sciences Pharmaceutiques
6	M. Daouda LASSINE	DEMBELE	Pharmacognosie
7	M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
8	M. Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
9	M. Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
10	Mme. Assitan	KALOGA	Législation
11	M. Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
12	M. Ahmed	MAÏGA	Législation
13	Mme AICHATA Ben Adam	MARIKO	Galénique
14	M. Aboubacar	SANGHO	Législation
15	M. BOURAMA	TRAORE	Législation
16	M. Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
17	M. Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
18	Mme. Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
19	M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

DER : SCIENCES DU MEDICAMENT**1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
2	M. Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCE/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Sékou	BAH	Pharmacologie
2	M. Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
2	M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	M. Mody	CISSE	Chimie Thérapeutique
3	M. Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
4	M. Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
5	Mme. Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
6	M. Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
7	M. Abdrahamane	DIARA	Toxicologie
8	M. Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
9	M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique
10	M. Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
11	M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
12	M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique
13	M. Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

DER : SCIENCES FONDAMENTALES**1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Cheick F.	TRAORE	Biologie/Entomologie
2	M. Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Mouctar	DIALLO	Biologie Chef de DER
2	M. Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
-	Néant	-	-

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
2	M. Modibo	DIALLO	Génétique
3	M. Abdoulaye	KANTE	Anatomie
4	M. Boureïma	KELLY	Physiologie Médicale
5	M. Moussa	KONE	Chimie Organique
6	M. Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

5. CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITES
1	M. Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	M. Babou	BAH	Anatomie
3	M. Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
4	M. Souleymane	COULIBALY	Psychologie
5	M. Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	M. Mamadou Lamine	DIARRA	Biologie Végétale, Botanique
7	M. Modibo	DIARRA	Nutrition
8	M. Moussa I.	DIARRA	Biophysique
9	M. Babacar	DIOP	Chimie
10	M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie
11	M. Yaya	KANE	Galénique
12	M. Boubacar	KANTE	Galénique
13	M. Aboubakary	MAÏGA	Chimie Organique
14	M. Massambou	SACKO	SCMP/SIM
15	M. Modibo	SANGARE	Anglais
16	M. Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
17	Mme. Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
18	M. Fana	TANGARA	Maths
19	M. Abdel Kader	TRAORE	Pathologies Médicales
20	M. Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

**DEDICACE ET
REMERCIEMENTS**

DEDICACE

Je dédie cette thèse à ma mère **feue Aïssata Diallo** (paix à son âme)
J'ai écouté tant de fois ton histoire, que j'aurais aimé te connaître davantage et que tu puisses être à mes côtés aujourd'hui, pour assister à la présentation de ma thèse de doctorat. Mais le bon Dieu en a décidé autrement. Je LUI rends grâce et je LE prie pour qu'Il puisse t'accueillir dans Son paradis. Repose en paix, maman !

REMERCIEMENTS

Au terme de mes études en pharmacie dans cette prestigieuse faculté de Pharmacie, je tiens à remercier tous ceux qui ont cru en moi, m'ont aidé et soutenu pour que ce jour soit : la présentation de ma thèse pour l'obtention du **grade de DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)**.

Ce jour, exceptionnel dans la vie d'une étudiante, me verra gravir une marche dans la quête de plus de responsabilités, de devoirs et d'obligations envers les miens, ce formidable corps professoral qui m'a tout donné et mon pays. Je le veux comme un exemple pour l'éducation de la jeune fille dans mon pays.

Ce jour a été grâce à tant d'amour et d'affection de mes parents (**Ahmadou Ali Beïdari Diallo, Kaltoumi Ali Beïdari Diallo, Seydou Traoré**), tant d'attentions et de bienveillance des amis de la famille (**Mr Chiompéré Koné, Mme Pierrette Sidibé, Mme Drabo Macoura**) et enfin tant de compétences et de rigueur professionnelles de la part du corps professoral de la Faculté de Pharmacie.

Enfin, ce jour a été grâce à l'amitié jamais démentie de personnes comme (**Cheick Oumar Konaté, Mme Kamaté Patricia Dakouo, et de bien d'autres que je ne pourrais pas citer ici individuellement**, grâce à l'attention et aux encouragements fraternels des frères, sœurs, cousins et cousines.

Merci **Ibrahim KEITA** pour ton aide, tes encouragements et tout ce que tu as fait pour moi pour la rédaction de cette thèse. Je ne pourrai jamais te remercier assez. Que le Seigneur t'aide dans tout ce que tu entreprendras.

Merci à **tout le personnel du LBMA et du CS Réf de Sélingué** respectivement pour tout ce que j'ai appris et pour l'hospitalité.

Aux **membres de la promotion Pr N'golo Diarra**, la neuvième promotion du numéris clausus je dis merci. J'ai tissé de bons liens avec vous et j'espère que nous continuerons cette sincère collaboration avec vous dans la vie professionnelle.

HOMMAGES

AUX MEMBRES

DU JURY

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maitre et Président du Jury

Professeur Ababacar I. MAIGA

- **Professeur titulaire de Toxicologie à la faculté de Pharmacie ;**
- **Vice-Doyen de la Faculté de Pharmacie ;**
- **Ancien Directeur Adjoint de la DPM.**

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

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

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

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

A notre Maitre et Juge**Professeur Mouctar DIALLO**

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

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

A notre Maître et juge**Docteur Vincent Sanogo**

- **Pharmacien diplômé de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto Stomatologie (FMPOS)**
- **Paludologue certifié au 6ème cours international de paludologie de l'OMS à Ouidah**
- **Chef de division Prévention et prise en charge des cas au PNLP**
- **Point focal Fond mondial**

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

A notre Maître et Co-directeur de thèse**Monsieur Ibrahim Keïta**

- **Assistant en biologie moléculaire à la faculté de médecine et d'odonto stomatologie (FMOS)**
- **Attaché de recherche au LBMA**

Cher Maître,

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

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

Votre modestie et votre ouverture au monde des apprenants vous procurent respect et considération.

Soyez-en félicité pour ce caractère !!!!

A notre Maître et Directeur de thèse**Professeur Ousmane KOITA**

- ✓ **Pharmacien Biologiste ;**
- ✓ **Professeur titulaire en Biologie Moléculaire ;**
- ✓ **Chargé de cours de Biologie Moléculaire appliquée à la FAST et de Biologie Animale à la faculté de Pharmacie ;**
- ✓ **Ancien Directeur-Adjoint du SEREFO ;**
- ✓ **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Appliquée de la FAST.**

Cher Maître,

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

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

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

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

Soyez rassuré honorable maître de notre reconnaissance.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AL	Artémether-Luméfantrine
AMM	Autorisation de mise sur le marché
<i>An. arabiensis</i>	<i>Anopheles arabiensis</i>
<i>An. gambiae</i>	<i>Anopheles gambiae</i>
AQ	Amodiaquine
ART	Artémisinine
AS	Artésunate
ASACO	Associations de santé communautaire
ATP	Adénosine triphosphate
CDC	Centers of disease control and prevention
CPS	Chimio prophylaxie saisonnière
CQ	Chloroquine
CSCOM	Centre de santé communautaire
CS Réf	Centre de santé de référence
CTA	Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine
CTAs	Combinaisons thérapeutique à base d'artémisinine
CYP 2C19	Cytochrome 2C19
CYP 2D6	Cytochrome 2D6
CYP 3A4	Cytochrome 3A4
DEET	N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide
DHFR	Dihydrofolate réductase
DHPS	Dihydroptéroate synthase
DNase	Acide Désoxyribonucléase
DNTP	Deoxyribonucléotides triphosphate
DNTPs	Deoxyribonucléotides triphosphates
DRC	Dépôt répartiteur de cercle
DRS	Direction régionale de la santé
DV	Dépôt de vente
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FDC	Fixed Dose Combination (Combinaison à dose fixe)
FPIX	Ferriprotoporphyrine IX ou hématine

G6PD	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
HRM	High Resolution Melting
HRP II ou HRP2	Histidin Rich Protein 2 (Protéine Riche en Histidine 2)
IFI	Immunofluorescence Indirecte
IP	Indice Plasmodique
IV	Intraveineuse
JC	<i>Jésus Christ</i>
KBR	Hydroxylethyl isobutyl piperidine carboxylate
LBMA	Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
LUM	Luméfantine
MDR	Multi drugs resistance
MQ	Méfloquine
MSHP	Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique
ODRS	Office de développement rural de Sélingué
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Pan LDH	Malaria pan Lactate Déshydrogénase
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEV	Programme élargi de vaccination
<i>Pf</i> CRT	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquino resistance transporter
pH	Potentiel hydrogène
PLDH	Lactate-déshydrogénase de <i>Plasmodium sp.</i>
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
QBC	Quantitative buffy-coat
RI	Résistance de stade I
RII	Résistance de stade II
RIII	Résistance de stade III
RIIP	Réseau international des Instituts Pasteur
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIS	Système d'Information sanitaire
SOMAGEP	Société Malienne de Gestion de l'eau potable
SP	Sulfadoxine Pyriméthamine
T_{1/2}	Temps de demi-vie

TDR	Test de Diagnostic Rapide
TPI	Traitement Préventif Intermittent
TPIe	Traitement Préventif Intermittent des enfants
TPIp	Traitement Préventif Intermittent pour le paludisme
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WHO	World Health Organization

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Faciès du paludisme au Mali.	10
Tableau II : Taxonomie du vecteur du paludisme	12
Tableau III : Composition du 10X Primer Probe	40
Tableau IV : Composition du master mix.....	40
Tableau V : Composition du mix lors du HRM.....	41
Tableau VI : Programme de PCR de <i>Pfprt</i> dans le thermocycleur PTC200.....	41
Tableau VII : Répartition des patients en fonction du quartier et du genre.....	43
Tableau VIII : Répartition des parasitémiés des patients en fonction du quartier.....	43
Tableau IX : Répartition des vendeurs selon l'âge	44
Tableau X : Répartition des vendeurs en fonction du niveau scolaire	44
Tableau XI : Répartition des vendeurs en fonction de la catégorie de clients.....	45
Tableau XII : Combinaison des médicaments proposés par les vendeurs de médicaments de la rue comme traitement antipaludique	45
Tableau XIII : Consommation de la Chloroquine dans les familles à Sélingué.....	47
Tableau XIV : Source d'approvisionnement des familles en Chloroquine	47
Tableau XV : Températures moyennes de fusion après optimisation.....	48
Tableau XVI : Les différents haplotypes retrouvés sur le gène <i>Pfprt</i>	51
Tableau XVII : Corrélation entre fréquences de mutation associée à la chloroquino-résistance, de vente et de consommation de la Chloroquine (dans les quartiers).	52

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Rapport sur le paludisme dans le monde en 2016	8
Figure 2 : Afrique – Malaria (Prévalence 2015)	9
Figure 3 : Distribution de cas de paludisme au Mali	10
Figure 4 : Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l’homme et chez le moustique	15
Figure 5 : Structure Chimique de la Chloroquine	20
Figure 6 : Représentation schématique de l’érythrocyte parasité.....	21
Figure 7 : 7a. Structure de l’hématine et 7b. Modèle de l’interaction de la chloroquine et la FPIX	23
Figure 8 : Efflux de la Chloroquine de la vacuole digestive	24
Figure 9 : Protéine <i>PfCRT</i>	25
Figure 10 : Représentation du chromosome 7 de <i>P. falciparum</i> illustrant un segment d’environ 100Kb sur lequel se situent les 8 gènes de transport dont le <i>Pfprt</i> , mis en évidence avec ses 13 exons ainsi que la mutation K76T.....	27
Figure 11 : Structure chimique de l’amodiaquine	28
Figure 12 : Principe du HRM	29
Figure 13 : Principe de tracée des courbes de fusion	30
Figure 14 : Courbe de fusion d’un ADN normal et d’un ADN muté.....	30
Figure 15 : Dispositif du HRM au LBMA	31
Figure 16 : La température de fusion en fonction de la fluorescence au HRM	32
Figure 17 : Les courbes de fusion au HRM.....	32
Figure 18 : Pics de fusion au HRM	33
Figure 19 : Cartes du Sélingué	34
Figure 20 : Médicaments (vendus comme) antipaludiques achetés chez les vendeurs de médicaments de la rue de Sélingué	46
Figure 21 : Répartition des allèles en fonction des mutations ponctuelles du gène <i>Pfprt</i>	48
Figure 22 : Pics de fusion de nos souches de référence et les haplotypes correspondants après HRM.....	49
Figure 23 : Souche mutée associée à la Chloroquino-résistance.....	49
Figure 24 : Souche sauvage associée à la Chloroquinà-résistance.....	50
Figure 25 : Souche mixte associée à la chloroquino-résistance	50
Figure 26 : Répartition des haplotypes selon les quartiers	51
Figure 27 : Résumé des résultats de l’étude	52

Table des matières

DEDICACE	vii
REMERCIEMENTS.....	viii
HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY	ix
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	xiv
LISTE DES TABLEAUX	xvii
LISTE DES FIGURES	xviii
Table des matières	xix
1 INTRODUCTION.....	1
2 OBJECTIFS	3
3 GÉNÉRALITÉS.....	4
3.1 Définitions :.....	4
3.1.1 Le paludisme.....	4
3.1.2 Les antipaludiques	4
3.1.3 La chloroquino-résistance :.....	5
3.2 Historique :.....	6
3.3 Répartition géographique	7
3.4 Biologie :.....	10
3.4.1 Vecteur :.....	11
3.4.2 Agent pathogène :	12
3.4.3 Cycle de vie des plasmodies:	13
3.4.4 Diagnostic biologique :.....	16
Diagnostic de présomption	16
3.4.5 Diagnostic parasitologique :	16
Le frottis mince et la goutte épaisse :	16
3.4.6 Diagnostic immunologique : ELISA et IFI.....	16
Les tests de diagnostic rapides: TDR.....	17
3.4.7 Manifestation du paludisme :.....	18
Traitement du paludisme	18
3.5 Résistance du <i>Plasmodium</i> aux antipaludiques : cas des aminoquinoléines	20
3.5.1 La Chloroquine	20
3.5.2 L’Amodiaquine.....	28
3.6 Méthode de détection des mutations ou de surveillance de la résistance :.....	29
High Resolution Melting HRM : Fusion à Haute Résolution :	29
4 METHODOLOGIE.....	34
4.1 Lieu d’étude:.....	34

4.1.1	Situation sanitaire	34
4.2	Type et période d'étude.....	35
4.3	Enrôlement des enfants dans le projet PMI.....	35
4.4	Enquêtes	36
4.5	Echantillonnage.....	36
4.5.1	Choix des participants.....	36
4.5.2	Collecte des échantillons.....	36
4.6	Détection des mutations ponctuelles associées à la résistance du <i>P. falciparum</i> à la chloroquine 36	
4.6.1	Marqueurs de résistance étudiés	36
4.6.2	Choix de la technique de détection	37
4.6.3	Extraction de l'ADN à partir des confettis.....	38
	Découpage des confettis	38
	Extraction de l'ADN par le kit Qiagen®	38
4.6.4	Fusion à Haute Résolution (High Resolution Melting-HRM).....	40
	Amorces et sondes utilisées	40
4.7	Gestion et analyse des données	42
5	RESULTATS	43
5.1	Facteurs sociodémographiques et densité parasitaire.....	43
5.1.1	Facteurs sociodémographiques	43
5.1.2	Densité parasitaire.....	43
5.2	Données des enquêtes.....	44
5.2.1	Investigations chez les vendeurs de médicaments	44
5.2.2	Investigations dans les familles	46
5.3	Prévalence des mutations du gène <i>Pfcr</i> associées à la chloroquino-résistance	47
5.3.1	Mutations ponctuelles du gène <i>Pfcr</i> associées à la chloroquino-résistance.....	47
5.3.2	Haplotypes du gène <i>Pfcr</i>	50
5.4	Relation entre fréquence de consommation de la Chloroquine et de mutation du gène <i>Pfcr</i> dans les quartiers	52
5.5	Résultats de l'étude par "Flowchart"	52
6	COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	53
7	CONCLUSION ET RECOMMANDATION.....	57
7.1	Conclusion.....	57
7.2	Recommandations	57
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	58
	Annexe xxi	
	FICHE SIGNALÉTIQUE.....	xxviii

IDENTIFICATION SHEETxxx

INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à la présence, au développement et à la multiplication chez l'homme des parasites du genre *Plasmodium*. Il se transmet généralement par la piqûre des moustiques du genre *Anopheles*. Le paludisme est la plus importante des maladies parasitaires transmissibles à l'homme [1]. Selon les dernières estimations de l'OMS en Décembre 2016 près de la moitié de la population mondiale est exposée au risque du paludisme : en 2015, l'OMS a enregistré environ 212 millions de cas de paludisme.

90% des cas et de décès associés surviennent en Afrique [2].

Au mali, les enfants de moins de 05 ans et les femmes enceintes sont les plus touchés [2].

Le principal moyen de prévention et de réduction de la transmission du paludisme est la lutte antivectorielle. La maladie peut également être prévenue au moyen d'antipaludiques [3]. La plupart des médicaments antipaludiques ciblent le stade érythrocytaire de l'infestation palustre comme la chloroquine[4], découverte en 1943 [5]. La chloroquine diffuse passivement à travers la membrane érythrocytaire puis la membrane de la vacuole parasitophore et la membrane parasitaire pour gagner enfin la vacuole digestive où elle empêcherait la détoxification de la ferriprotoporphirine IX (hématine) et donc entrainerait la lyse de la membrane parasitaire[6].

Ancien antipaludique de référence, la chloroquine aux propriétés exceptionnelles a rapidement ouvert la voie à son utilisation massive dans le monde entier [7]. Le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* avec la Chloroquine (CQ) s'est révélé si efficace que l'un des plus grands fléaux de l'humanité a été présenté comme étant «en voie d'éradication» [8].

Après une décennie d'utilisation, cependant, la résistance à la CQ (CQR) a émergé en Asie du Sud-Est et s'est propagée progressivement dans toutes les zones d'endémie palustre, y compris l'Afrique [9]. En effet la pression médicamenteuse liée à la mauvaise utilisation et son utilisation systématique en chimio prophylaxie ont joué un rôle prépondérant dans l'apparition et la sélection des souches résistantes [10].

Une des hypothèses principales évoquées est l'efflux de la chloroquine 40 à 50 fois plus rapide chez le parasite résistant, proposé par **Krogstad** [11]. Des études ont mis en évidence le rôle de la protéine *PfCRT* ou *Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter* dans la chloroquino-résistance en 2000. C'est une protéine située au niveau de la membrane de la vacuole digestive du parasite et codée par le gène *Pfcrt*. La mutation sur son codon 76 (K→T), associé à 7 autres points de mutation, permet au parasite de limiter l'accumulation de CQ dans sa

vacuole digestive où elle exerce son action inhibitrice [12]. Pas moins de 30 variantes ont été identifiées, rendant la protéine *PfCRT* extraordinairement polymorphe [7].

De nombreuses études ont signalé l'implication du gène *Pfcrf* dans la baisse de sensibilité du *Plasmodium* aux aminoquinoléines comme la quinine et l'amodiaquine (AQ) [13,14]. En effet, le mode d'action de l'AQ semble être le même que celui de la CQ. L'accumulation de l'AQ est corrélée à celle de la CQ et est aussi diminuée chez les isolats chloroquino-résistants [10].

L'émergence des souches résistantes et l'augmentation du taux d'échecs thérapeutiques ont conduit à l'abandon progressif de la CQ. En 2001, l'OMS a recommandé aux pays, principalement africains, affectés par le paludisme d'adopter de nouvelles associations thérapeutiques (combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine) préférentiellement à la monothérapie. Le retrait de la CQ devrait normalement entraîner une baisse drastique des mutations associées à la chloroquino-résistance et une augmentation de l'allèle sauvage sensible comme indiqué par **Fall et al.** [15,16]

Ainsi le Mali dans son circulaire 06-1774 a retiré de son arsenal thérapeutique la CQ dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* en 2006 [17]. Cependant, une étude réalisée en 2015 à Dioro (Mali), a montré que malgré l'abandon de la chloroquine 10 ans après son retrait des souches portant des mutations du gène *Pfcrf* associées à la résistance circulent avec une forte prévalence [18]. L'analyse de ce locus renseigne sur la pression médicamenteuse exercée au sein des populations [12]. C'est dans ce cadre que nous avons mené une étude transversale à visée investigatrice sur le site sentinelle de Sélingué pour déterminer les paramètres qui pourraient contribuer au maintien des souches de *P. falciparum* porteur de la mutation 76T sur le gène *Pfcrf*.

OBJECTIFS

2 OBJECTIFS

► Objectif Général

Etudier les paramètres qui contribuent au maintien des souches de *Plasmodium falciparum* 76T sur le gène *Pfcr1* à Sélingué

► Objectifs spécifiques

- ❖ Examiner la vente illicite des médicaments antipaludiques à Sélingué
- ❖ Examiner la consommation clandestine de la CQ à Sélingué
- ❖ Estimer la prévalence des mutations associées à la Chloroquino-résistance à Sélingué

GENERALITES

3 GÉNÉRALITÉS

3.1 Définitions :

3.1.1 Le paludisme

Le paludisme, aussi appelé *malaria* (de l'italien *mala* : mauvais et *aria* : air signifiant mauvais air), est une protozoonose, une érythrocytopathie due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* qui se transmettent à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Le paludisme peut être prévenu par une lutte antivectorielle et au moyen de médicaments antipaludiques [3].

3.1.2 Les antipaludiques

Un antipaludique est un composé naturel ou de synthèse qui, administré par voie orale, parentérale ou rectale, à dose unique ou répétée, permet de détruire le parasite ou de bloquer sa croissance dans le but de prévenir ou de guérir la maladie palustre [19].

Mécanisme d'action des antipaludiques[6]

- ❖ Inhibition de la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive du *Plasmodium*
- ❖ Alkylation des métabolites de l'hémoglobine, production de radicaux libres
- ❖ Blocage de la fabrication des acides nucléiques

Les antipaludiques sont classés en fonction de leur mode d'action ou la structure chimique. La plupart d'entre eux ciblent le stade érythrocytaire de l'infestation palustre. Cette phase est la phase de l'infestation qui provoque une maladie symptomatique [4].

Classification des antipaludiques selon leur mécanisme d'action [20]:

Selon le mode d'action et la structure chimique, la classification suivante est classique

- Les schizonticides
 - Schizonticides érythrocytaires :
 - Amino-4-quinoléine : chloroquine, amodiaquine
 - Arylamino-alcools :
 - ✓ quinoléine méthanol : quinine, méfloquine
 - ✓ quinghaosu et dérivés de l'artémisinine (artémether, artésunate, dihydroartémisinine)

Les antipaludéens à effet intraérythrocytaire traversent la membrane des globules rouges puis celle du parasite et pénètrent dans sa vacuole digestive où ils s'accumulent. La résistance aux antipaludéens intra-érythrocytaires serait due à des expulsions des antipaludéens par les parasites.

- Schizonticides érythrocytaires et tissulaires :
 - Antifoliques : sulfamides (sulfadoxine)
 - Antifoliniques : pyriméthamine, proguanil
 - Antibiotiques : doxycycline
- Gaméticides :
 - Amino-8-quinoléines : primaquine, tafénoquine.

3.1.3 La chloroquino-résistance :

La chloroquino-résistance est définie comme l'aptitude d'une souche de *P. falciparum* à continuer son développement malgré l'administration et l'absorption de la chloroquine employée aux doses thérapeutiques recommandées [21].

La résistance d'un pathogène en général du *Plasmodium* en particulier à une molécule s'acquiert par suite d'une pression thérapeutique forte et conduit à la sélection des mutants. Elle peut aussi s'acquérir lorsqu'il y a une mauvaise observance durant le traitement ou une utilisation systématique en chimio prophylaxie [10,18].

Elle est caractérisée par la persistance de parasites asexués dans les hématies du patient 7 jours après le début d'un traitement bien conduit par la chloroquine (25 mg/kg pendant 3 jours). L'évaluation de la résistance en fonction de la parasitémie permet de définir trois seuils de résistance [9].

- ✓ résistance de stade RI : disparition des parasites au 7^{ème} jour, suivie d'une réapparition,
- ✓ résistance de stade RII : diminution de la parasitémie,
- ✓ résistance de stade RIII : aucune diminution de la parasitémie.

Les résistances de stade RI, RII, RIII permettent de diviser les pays endémiques en 3 groupes 1, 2, 3 (Annexe III), appelés par l'OMS les zones A, B, C. Les pays du groupe 0 sont des pays sans paludisme. Tous les pays d'Afrique sub-saharienne sont du groupe 3 [9].

- Les pays du groupe 1 sont caractérisés par l'absence de la chloroquino résistance.
- Les pays du groupe 2 sont caractérisés par la chloroquino résistance.

- Les pays du groupe 3 sont caractérisés par une prévalence élevée et la multi résistance.

3.2 Historique :

Le paludisme est l'une des plus vieilles maladies que l'humanité ait connues [18]. L'origine de la maladie est peu documentée, cependant les fouilles archéologiques suggèrent que l'expansion du paludisme concorderait avec l'apparition de l'agriculture [5].

Depuis l'antiquité chinoise et plus précisément à l'époque de l'empereur de Chine Huang Ti (appelé Nei Ching, en 2 700 avant JC) on peut voir les premières traces écrites évoquant les symptômes de la malaria. Connu sous le nom de l'« Empereur jaune », Nei Ching est considéré comme l'auteur des tous premiers textes médicaux chinois connus. À cette époque, le paludisme était symbolisé par un dragon à trois têtes: la première, un marteau, représente les maux de tête; la seconde, un seau d'eau glacée, symbolise les frissons et la troisième, un diadème de fer porté au rouge, représente la fièvre [5].

L'historique du paludisme peut être présentée en plusieurs étapes [18] :

- en 400 ans avant JC, Hippocrate décrivait le paludisme du kyste hydatique en Grèce ;
- en 1630 Don Francisco Lopez apprenait à des Indiens du Pérou les vertus de l'écorce du quinquina ;
- en 1820 Pelletier et Caventou isolent l'alcaloïde actif, la quinine ;
- en 1830 Maillot utilise la quinine dans la campagne d'Algérie ;
- en 1880 l'agent pathogène est découvert par Laveran à Constantine ;
- en 1880 Marchiafava et Golgi décrivaient trois espèces de *Plasmodium* parasite de l'homme : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* ;
- De 1895 à 1897, Ross suspecta la transmission de la maladie par le moustique du genre Anophèles avant que la confirmation ne soit faite par Grassi en 1898 ;
- en 1943 la chloroquine, premier antipaludique de synthèse fut obtenu ;
- en 1957 la chloroquino-résistance est constatée en Asie et en Amérique du sud ;
- en 1970 le Professeur Zhenxing Wei (Chine) réalisait un extrait de l'artémisinine ;
- en 1977 un chercheur de l'entreprise pharmaceutique Guilin synthétisa l'artésunate ;
- en 1978 le Professeur LiYin produisait pour la première fois l'artémether ;
- 1979 en Afrique, la résistance à la chloroquine a été observée pour la première fois en Tanzanie ;

- en 1992 la firme Rhône-Poulenc aujourd'hui Aventis en accord avec l'OMS et l'usine pharmaceutique de Kunming produisirent de l'artémether injectable ;
- en 2001, en Asie du Sud-est, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine est suspectée ;
- en 2006 au Cambodge, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine a été identifiée pour la première fois [18].

De nos jours, la recherche reste orientée dans la lutte anti vectorielle, le traitement curatif et prophylactique, la vaccination. La lutte anti vectorielle est confrontée à un problème technique (résistance aux insecticides) et un problème économique (de coût et de mise en valeur des insecticides). Le traitement antipaludique requiert actuellement de nouveaux produits efficaces contre les souches de *P. falciparum* résistantes aux amino-4-quinoléines [18].

3.3 Répartition géographique

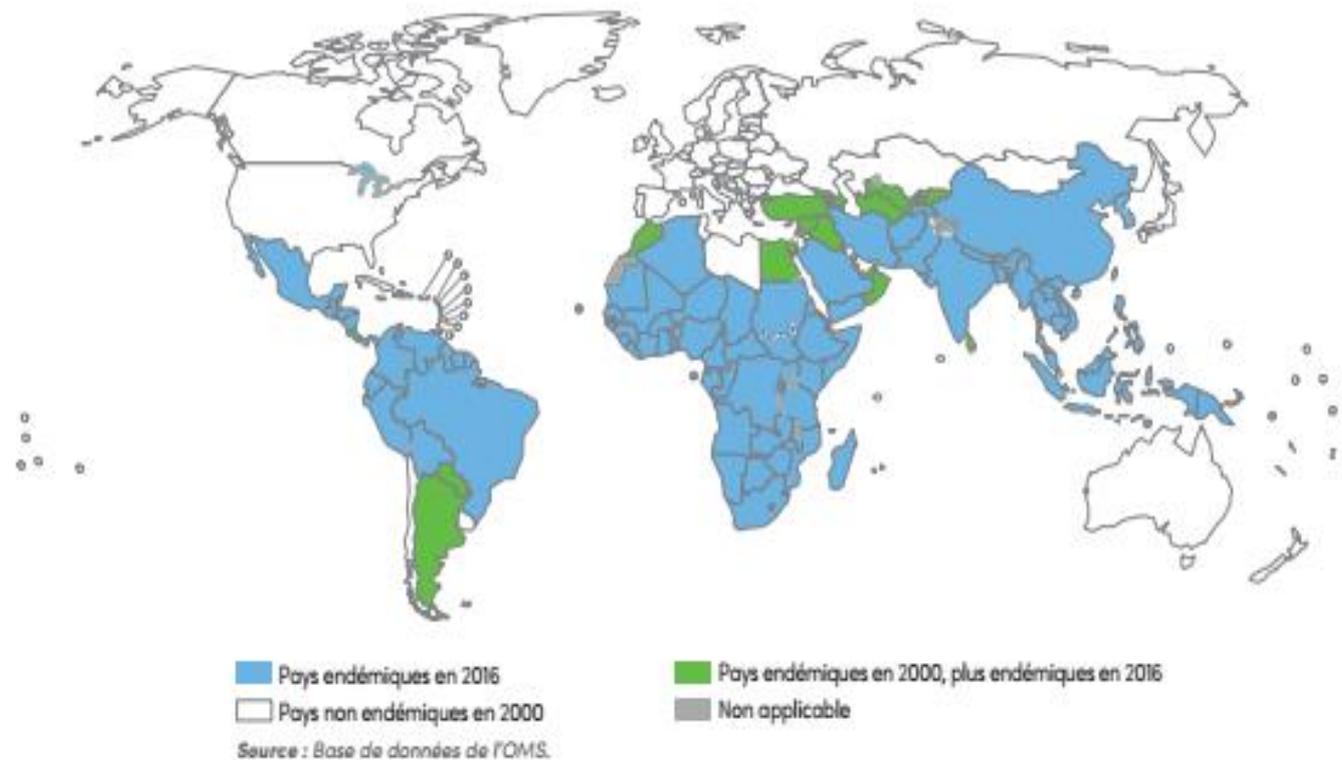
❖ Dans le monde

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. Il se trouve au premier rang des priorités de l'OMS pour ses désastres directs et aussi ses conséquences socio-économiques [18]. Au début de l'année 2016, près de la moitié de la population mondiale était exposée au risque de paludisme.

La chloroquino-résistance est apparue au début des années 1960. Les premiers foyers, de souches de *Plasmodium* résistants, ont été détectés dans le Sud-Est asiatique et en Amérique latine. Cette résistance s'est étendue jusqu'en Afrique.

Les rapports de résistance à l'Amodiaquine proviennent de l'Amérique du Sud ; d'Asie et d'Afrique de l'Est [22]. En Amérique du Sud, des cas de parasitémie ont été récemment relevés au troisième jour du traitement aux CTAs [18].

Pays d'endémie paludique en 2000 et 2016



2• RAPPORT SUR LE PALUDISME DANS LE MONDE 2016 - RÉSUMÉ

Figure 1 : Rapport sur le paludisme dans le monde en 2016 [23]

❖ En Afrique

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituent les groupes à risque [24]. La résistance du *Plasmodium* à la monothérapie de la Chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine continue d'évoluer en Afrique de l'Est, du Sud et Centrale [18]. Les essais cliniques en Afrique de l'Est ont montré des niveaux de résistance à l'AQ élevés *in vivo* [22].

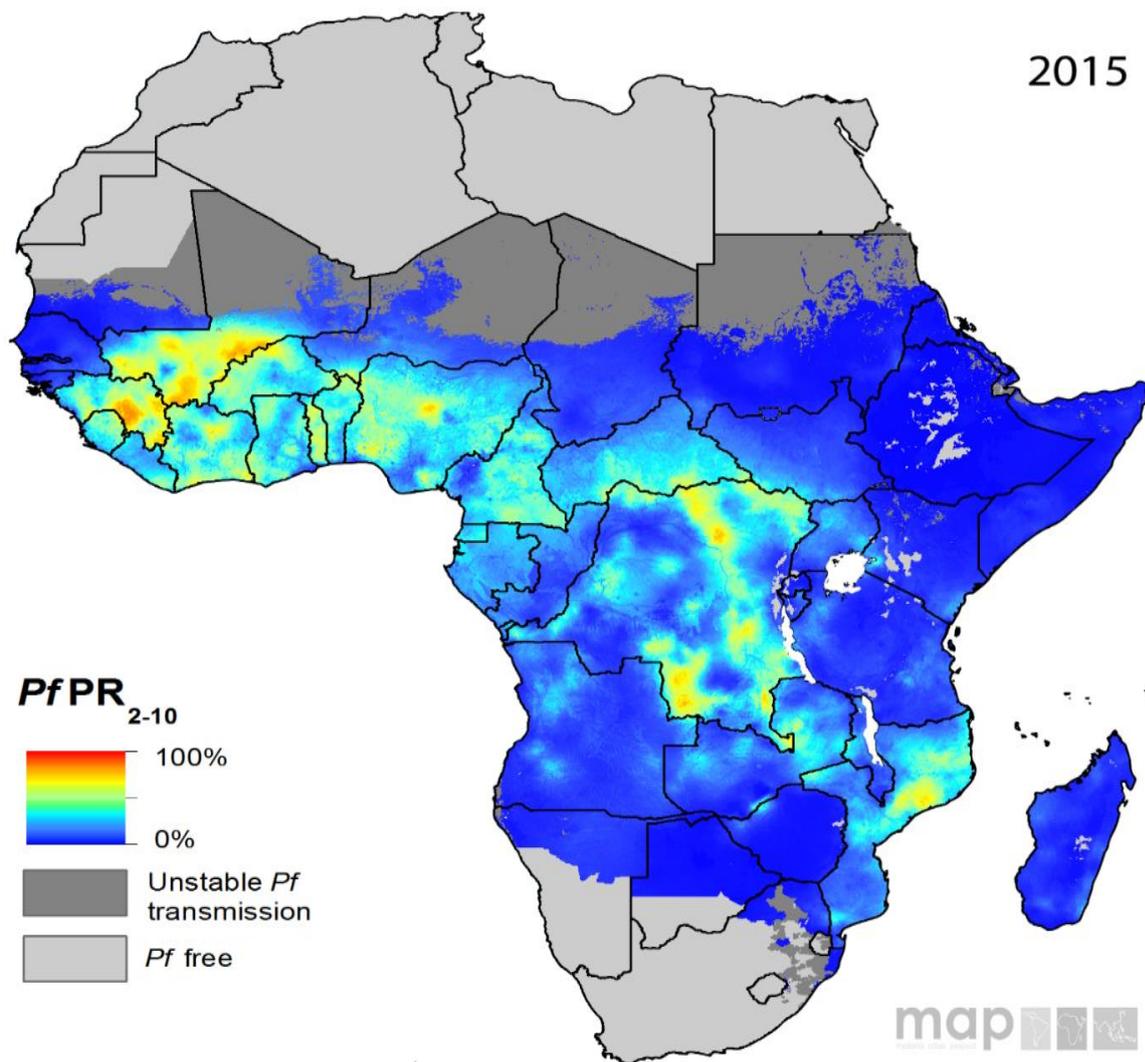


Figure 2 : Afrique – Malaria (Prévalence 2015) [25]

❖ Au Mali

Le paludisme est de type saisonnier, la transmission est endémique avec un pic pendant la saison des pluies [18]. Il existe cinq faciès de transmission du paludisme allant du sud au nord du pays au Mali. Ces faciès sont décrits dans le **Tableau I** [26].

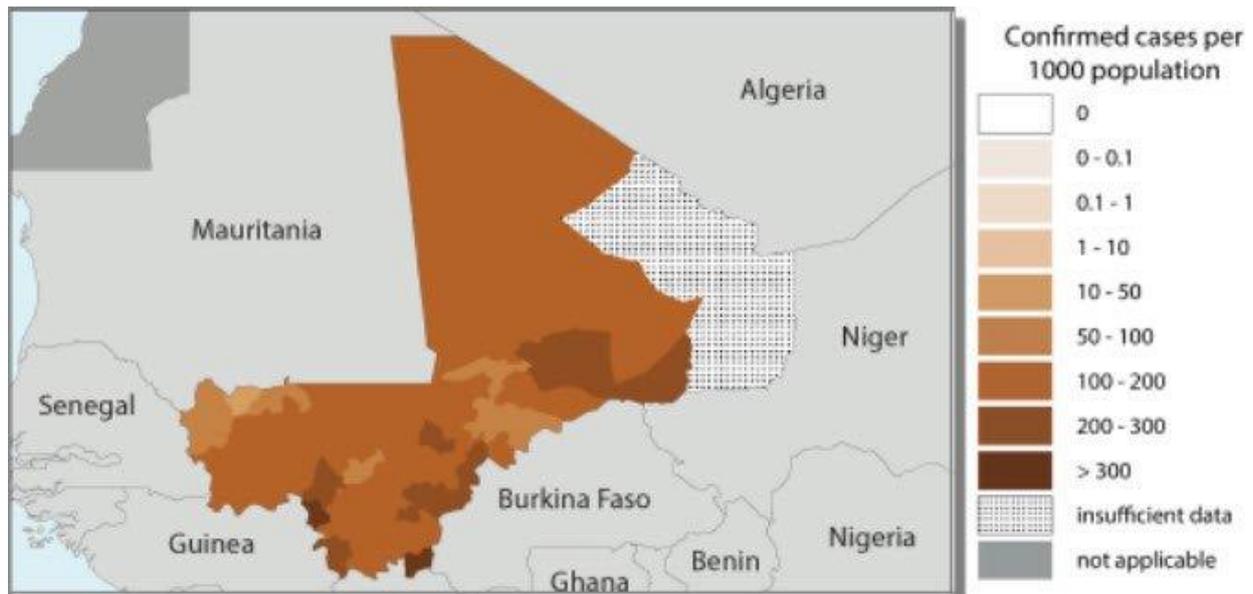


Figure 3 : Distribution de cas de paludisme au Mali [27]

Tableau I : Faciès du paludisme au Mali.

Faciès Epidémiologiques	Transmission Paludisme	Endémicité IP	Région géographique	Caractéristiques
Faciès soudano guinéen	-Intense (-6 mois/an)	Holoendémique IP > 75 %	Sikasso	Prémunition acquise 5 ans.
Faciès nord soudanien et Sahel	-Intense (3-4 mois/an)	Hyperendémique IP : 5 – 75 %	Ségou, Koulikoro, Mopti	Prémunition 9 ans. Neuropaludisme, fréquent à 1-9 ans.
Faciès saharien	-Sporadique -voire Epidémique	Epidémique IP < 10 %	Gao, Kidal, Tombouctou	Adultes aussi exposés risque paludisme grave et compliqué.
Faciès des Barrages	-Bimodale (Plurimodale)	Mésoendémique IP : 26 – 50 %	Sélingué, Manantali, Markala	Anémie palustre élevée chez moins 9ans.
Faciès urbain		Hypoendémique IP < 10 %	Bamako, Mopti ville	Adultes bamakois risque paludisme grave.

La chloroquino-résistance a été rapportée depuis les années 1990 au Mali [28,29], ce qui a conduit en 2006 au retrait de la chloroquine dans le traitement du paludisme à *P.falciparum*.

3.4 Biologie :

Le paludisme est dû à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d’une personne à l’autre par des piqûres de moustiques du genre *Anopheles* femelles infestées, appelés «vecteurs

du

paludisme». Ces derniers piquent principalement entre le crépuscule et le petit matin. [18].

3.4.1 Vecteur :

Le paludisme est transmis exclusivement par les piqûres de moustiques *Anopheles*. Parmi plus de 500 espèces d'*Anopheles* reconnues à ce jour, 41 sont des vecteurs majeurs du paludisme, dont le plus grand nombre (39%) se trouve en Asie du Sud-est, alors que les vecteurs les plus compétents, *An. gambiae* et *An. arabiensis*, sont en Afrique. Chaque espèce vectrice présente ses caractéristiques comportementales, géographiques et écologiques qui lui sont spécifiques et qui déterminent l'épidémiologie locale du paludisme [30].

Toutes les espèces importantes de vecteurs piquent la nuit. Les *Anopheles* se reproduisent dans l'eau et chaque espèce a ses préférences ; certaines par exemple préfèrent l'eau douce de faible profondeur comme les flaques d'eau, d'autres les rizières et les eaux dans les empreintes laissées dans le sol par les sabots d'animaux. La transmission est plus intense aux endroits où les espèces de vecteurs ont une durée de vie relativement longue (ce qui permet au parasite de compléter son cycle de développement à l'intérieur du moustique) et piquent plutôt les êtres humains que les animaux.

Par exemple, la longue durée de vie et la forte préférence pour l'homme des espèces africaines de vecteurs expliquent que près de 90% des décès par paludisme enregistrés dans le monde surviennent en Afrique [31].

Au Mali, des études conduites par **Touré en 1983** ont montré que *Anopheles gambiae s.l.* comporte *An. arabiensis* et les trois formes chromosomiques d'*An. gambiae s.s* nommées Mopti, Savane et Bamako. La forme Mopti se rencontre fréquemment dans les zones d'inondation du fleuve Niger, elle coexiste avec la forme Bamako dans les régions humides du sud, avec des fréquences faibles. La forme Savane se rencontre dans les zones du sud et du centre. La transmission du paludisme est assurée en saison sèche froide (Novembre –Février) par *An. arabiensis* et la forme Mopti de *An. gambiae s.s* lui succèdent en période sèche chaude (Mars-Juin). Les formes Savane et Bamako de *An. gambiae s.s* deviennent les principaux vecteurs pendant la saison des pluies (Juillet-Octobre). Ainsi, le long de l'année les vecteurs se relayent dans la transmission du *Plasmodium* [32].

Systématique [31] :

Il existe plus de 3 500 espèces répertoriées à ce jour au sein de la famille des *Culicidae* qui regroupe l'ensemble des insectes connus sous le nom vernaculaire de moustiques (**Tableau II**). Classés dans l'ordre des Diptères (2 ailes) et le sous-ordre des Nématocères (antennes filiformes). Ces insectes sont caractérisés par des antennes longues et fines à multiples articles, des ailes pourvues d'écaillés et la présence, chez les femelles au moins, de pièces buccales en forme de trompe rigide appelée proboscis. Les *Culicidae* sont répartis en deux sous-familles : *Anophelinae* et *Culicinae*.

Tableau II : Taxonomie du vecteur du paludisme

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

3.4.2 Agent pathogène :

Le *Plasmodium* est l'agent causal du paludisme. C'est un parasite intracellulaire, amiboïde, colonisant les hématies et produisant un pigment.

Systématique [31] :

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

microtubules sous membranaires, qui assurent la mobilité de la cellule. Sa taxonomie est la suivante :

- ❖ Embranchement : APICOMPLEXA,
- ❖ Classe : SPOROZOEAE,
- ❖ Sous-classe : COCCIDIA,
- ❖ Ordre: EUCCOCIDA,
- ❖ Sous-ordre : HAEMOSPORINA,
- ❖ Famille: PLASMODIDAE,
- ❖ Genre: *Plasmodium*

Les différentes espèces plasmodiales [33]:

Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (Plus de 140), touchant de nombreuses espèces animales, dont cinq espèces sont habituellement retrouvées en pathologie humaine : *P.falciparum*, *P.malariae* ; *P.vivax* ; *P. ovale* et *P.knowlesi*.

3.4.3 Cycle de vie des plasmodies:

Le cycle de développement du *Plasmodium* nécessite deux hôtes obligatoires : l'homme et le moustique. Chez l'homme s'effectue la multiplication asexuée ou schizogonie. Chez l'anophèle femelle s'effectue le cycle sexué ou sporogonie [18].

3.4.3.1 Chez l'homme :

Il se déroule en deux phases : une phase hépatique (ou exo-érythrocytaire) et une phase sanguine (ou érythrocytaire) [26,34]

✓ La phase hépatique :

L'anophèle femelle infesté en piquant l'homme lui inocule dans le sang, le parasite sous forme de sporozoïtes. Ceux-ci restent dans la circulation sanguine pendant une demi-heure avant de pénétrer dans les cellules du foie.

Une fois dans l'hépatocyte, les sporozoïtes restent quiescents (hypnozoïtes) pour *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax* ou par multiplication nucléaire, ils deviennent des schizontes intra hépatocytaires (corps bleus). Cette phase dure 7 à 21 jours en fonction de l'espèce plasmodiale, elle est cliniquement muette et correspond à la phase d'incubation de la maladie.

✓ **La phase sanguine :**

La rupture des corps bleus libère des mérozoïtes qui pénètrent les globules rouges par endocytose, et se transforment en trophozoïtes. Le trophozoïte grossit et se transforme en schizonte sanguin qui est appelé corps en rosace à maturité et qui contient de nombreux mérozoïtes dont le nombre varie selon l'espèce plasmodiale. L'éclatement de l'hématie libère les mérozoïtes dans la circulation sanguine. Chaque mérozoïte envahit une nouvelle hématie, poursuivant ainsi le cycle intraérythrocytaire.

Au cours de la multiplication dans les hématies, le parasite va produire au dépend de l'hémoglobine un pigment appelé l'hémozoïne. Parallèlement apparaissent dans l'hématie des taches de Maurer (*P.falciparum*), des granulations de Schüffner (*P.vivax* et *P. ovale*) ou des ponctuations de Ziemann (*P.malariae*)

Le cycle sanguin dure 48 heures chez le *P.falciparum*, *P.vivax* et *P. ovale*, 72 heures chez le *P.malariae*. C'est l'éclatement simultané des corps en rosace d'une même génération qui provoque l'accès fébrile typique du paludisme. Après plusieurs cycles schizogoniques sanguins, certains mérozoïtes se différencient en élément à potentiel sexué : les gamétocytes. Ceux-ci ne poursuivront leur développement que s'ils sont absorbés par un anophèle femelle.

3.4.3.2 Chez l'anophèle : [26,34]

Encore appelé cycle sporogonique, il débute dès l'infestation de l'anophèle femelle ayant piqué un impaludé porteur de gamétocytes. Les gamétocytes passent dans son estomac, le gamétocyte femelle (ou macrogamétocyte) se transforme et devient immobile. Le gamétocyte mâle (microgamétocyte) va subir une ex flagellation qui l'allongera et le rendra mobile.

La fécondation du macrogamétocyte par le micro-gamétocyte aboutit à la formation d'un œuf mobile dans la lumière du tube digestif appelé ookinète. Celui-ci va traverser le tube digestif et aller s'enkyster sur sa face externe formant un oocyste. Une fois mûr l'oocyste éclate et libère des sporozoïtes qui vont gagner les glandes salivaires de l'anophèle d'où ils seront inoculés à l'homme lors d'une nouvelle piqûre. La durée du cycle chez l'anophèle est de 10 à 40 jours selon la température extérieure et les espèces.

3.4.4 Diagnostic biologique :

Diagnostic de présomption

L'hémogramme révèle une anémie de type hémolytique, normochrome ou hypochrome, avec ou sans réticulocytose. Au cours des accès aigus et dans les accès pernicioeux, on retrouve parfois une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, remplaçant la leuconéutropénie habituelle, une thrombopénie est en rapport avec la séquestration splénique des plaquettes, tandis que dans les accès de reviviscence et le paludisme viscéral évolutif, une leucopénie est de règle, de même qu'une thrombopénie et une hypergammaglobulinémie [36].

3.4.5 Diagnostic parasitologique : [9]

C'est un diagnostic d'urgence, consistant à mettre en évidence le parasite présent dans le sang, permettant de faire le diagnostic de certitude de l'infestation palustre.

Toutes ses techniques sont des méthodes de diagnostic direct.

Le frottis mince et la goutte épaisse :

Ils demeurent la référence, et nécessitent une méthodologie simple, mais précise et rigoureuse et un long apprentissage. La sensibilité est corrélée au temps d'observation (pour un frottis : lecture d'au moins 100 champs, en pratique 20 minutes).

Quantitative Buffy-coat :

La coloration fluorescente des acides nucléiques par l'acridine orange : le malaria-test QBC (*quantitative buffy-coat*). Cette technique nécessite un équipement particulier. Sa sensibilité est de 5 hématies parasitées/ μ l.

Toutefois, le fait qu'il nécessite un microscope à fluorescence, qu'il manque de spécificité, ne sont pas à son avantage.

3.4.6 Diagnostic immunologique : ELISA et IFI [18]

Ces méthodes constituent le diagnostic indirect du paludisme.

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

Quant au principe d'ELISA, il consiste à fixer sur un support solide des éléments contenus dans le liquide biologique. Ensuite, les antigènes solubles sont détectés à l'aide d'un complexe immun marqué par l'enzyme, et seront révélés par addition d'un substrat spécifique de l'enzyme.

Ces techniques apportent des informations précieuses qui permettent de confirmer le paludisme, lorsque la parasitémie a été réduite par exemple par un traitement anti palustre. Elles permettent également de suivre la guérison par la décroissance du taux des anticorps, et ont aussi un intérêt en zone d'endémie.

Le diagnostic immunologique ne peut remplacer le diagnostic parasitologique direct, du fait que les anticorps apparaissent avec un retard de plusieurs jours sur la parasitémie et disparaissent plus tard [18].

Les tests de diagnostic rapides: TDR [18]

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

Plusieurs tests de diagnostic rapide (TDR) par immunochromatographie sont disponibles. Ils sont classés en fonction du nombre d'antigènes détectés; certains permettent la mise en évidence de la pLDH (*Plasmodium* lactate déshydrogénase) : Pf pour *P. falciparum*, Pv pour *P. vivax* ; Pan-LDH commune aux quatre espèces plasmodiales. La sensibilité et la spécificité revendiquées par les constructeurs de ces tests sont comparables.

Ces tests (immunologiques) ne doivent pas être employés seuls. Le parasite doit être mis en évidence par d'autres tests comme la goutte épaisse et le frottis mince.

3.4.7 Manifestation du paludisme : [18]

3.4.7.1 La forme "classique" :

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

3.4.7.2 Accès pernicieux :

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

3.4.7.3 Fièvre bilieuse hémoglobinurique :

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

3.4.7.4 Rechute :

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

Traitement du paludisme [37]:

Le paludisme est une maladie évitable dont on guérit. L'objectif premier du traitement est d'obtenir une guérison complète, c'est-à-dire l'élimination rapide et totale des plasmodies dans le sang du patient, pour éviter qu'un paludisme non compliqué n'évolue vers une forme grave potentiellement mortelle ou vers une infestation chronique provoquant une anémie. Du point de vue de la santé publique, le traitement est destiné à réduire la transmission de l'infection en diminuant le réservoir infectieux, et à éviter l'apparition et la propagation d'une résistance aux antipaludiques.

✓ Politique de traitement :

Depuis 2006, la plupart des pays où *Plasmodium falciparum* est endémique ont progressivement actualisé leur politique de traitement, passant de la chloroquine (CQ) et de la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) auxquels le paludisme résiste, aux associations thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) actuellement recommandées.

Ces dernières constituent désormais le meilleur traitement contre le paludisme simple à *P. falciparum* [19].

✓ **Traitement des infections à *P. falciparum***

L'OMS recommande les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) pour traiter le paludisme non compliqué causé par *P. falciparum*. Associant deux principes actifs qui ont des modes d'action différents, les CTA sont les antipaludiques les plus efficaces dont on dispose aujourd'hui. Actuellement, l'OMS recommande cinq CTA contre le paludisme à *P. falciparum*. Le choix des CTA doit se fonder sur les résultats des études d'efficacité thérapeutique contre les souches locales de paludisme à *P. falciparum*. Ces cinq CTA sont :

- Artéméther + Luméfantrine
- Artésunate + Amodiaquine
- Artésunate + Méfloquine
- Dihydroartémisinine + Pipéraquline
- Artésunate + Sulfadoxine–pyriméthamine (SP)

✓ **Traitement des infections à *P. vivax***

Les infections à *P. vivax*, doivent être traitées par la chloroquine là où ce médicament reste efficace. Dans les zones où l'on a mis en évidence des souches de *P. vivax* résistantes, les infections doivent être traitées par une CTA, de préférence une combinaison dans laquelle le médicament associé à l'artémisinine a un long temps de demi-vie.

Afin de prévenir les rechutes, la primaquine devrait être ajoutée au traitement; le dosage et la fréquence d'administration devront être ajustés en fonction de l'activité enzymatique de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) de chaque patient.

✓ **Traitement du paludisme grave**

Le paludisme grave doit être traité avec de l'artésunate injectable (par voie intramusculaire ou intraveineuse) pendant au moins 24 heures, suivi d'une CTA complète de 3 jours une fois que le patient peut tolérer des médicaments par voie orale. Lorsque le traitement injectable ne peut être administré (cas des enfants âgés de moins de six ans atteints de paludisme grave), les malades doivent recevoir un traitement d'artésunate par voie rectale avant d'être orientés immédiatement vers un centre pouvant leur dispenser un traitement parentéral complet.

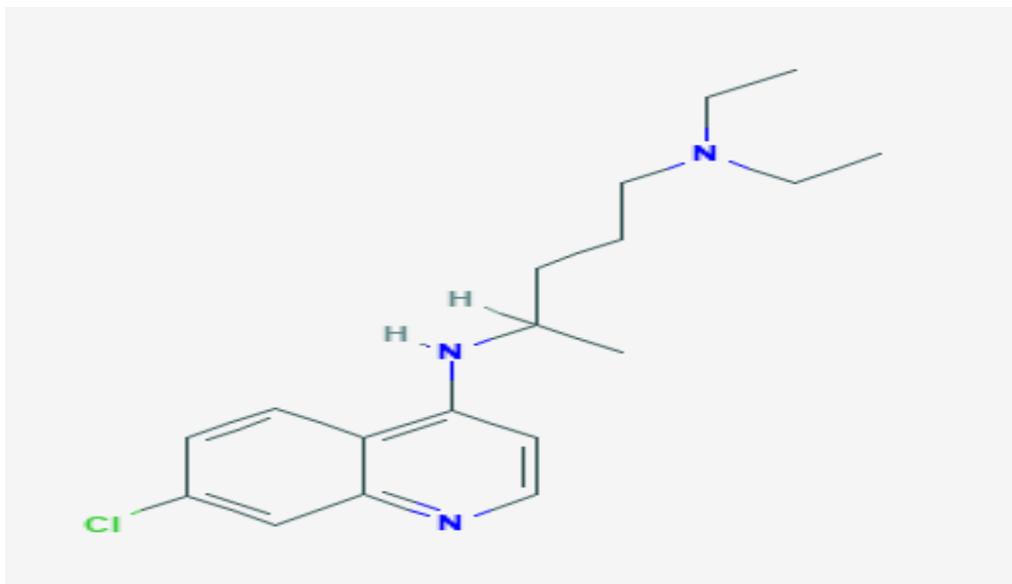
Compte tenu des derniers développements en matière de résistance, il est impératif que les traitements injectables à base d'artémisinine et les suppositoires à base d'artésunate ne soient pas utilisés en monothérapie. Le traitement initial du paludisme grave avec ces médicaments doit être complété par une CTA complète de 3 jours.

Le *P. falciparum* est devenu résistant à de nombreux antipaludiques (ex. chloroquine, et à d'autres antipaludiques selon son origine géographique : méfloquine, sulfadoxine, pyriméthamine, ...).

3.5 Résistance du *Plasmodium* aux antipaludiques : cas des aminoquinoléines

3.5.1 La Chloroquine

La Chloroquine (CQ) est une amino-4-quinoléine de synthèse qui a fait son apparition après la seconde guerre mondiale. Son activité est liée à ses propriétés d'accumulation sélective dans l'hématie parasitée et sa localisation préférentielle dans la vacuole digestive [10].



Figure

5 : Structure Chimique de la Chloroquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2719#section=2D-Structure>

Grâce à ses propriétés de base faible et à son noyau lipophile, la chloroquine diffuse passivement à travers la membrane érythrocytaire (en vert, **figure 6**) puis la membrane de la vacuole parasitophore (en vert clair, **figure 6**) et la membrane parasitaire (en jaune, **figure 6**) pour gagner enfin la vacuole digestive en s'accumulant dans cette dernière (en rouge, **figure 6**), qui est un compartiment acide de pH compris entre 4,8 et 5,2 [6].

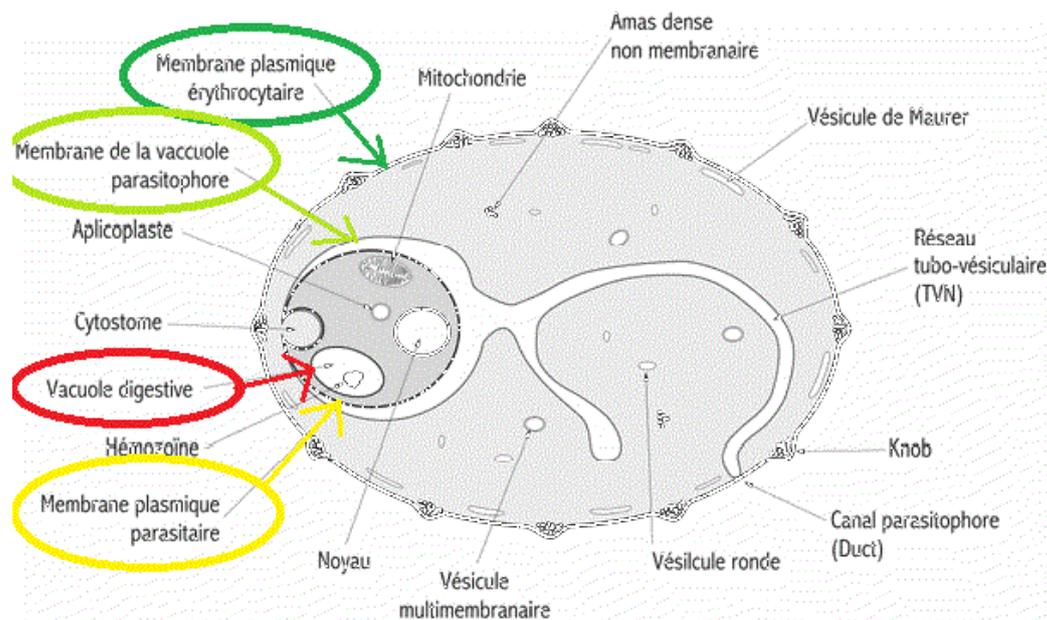


Figure 6 : Représentation schématique de l'érythrocyte parasité.

Source : <http://ebischoff.free.fr/Palu/JPG/Figure5.GIF>

Mécanisme d'action de la Chloroquine

- Accumulation de la chloroquine dans les hématies parasitées [6] :

Le mécanisme exact de l'action antipaludique de la chloroquine n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, toutes les hypothèses avancées à ce jour disent que les antipaludiques de la famille des 4-aminoquinolines agissent au niveau de la vacuole digestive des plasmodies. Des études, au cours desquelles la distribution de la chloroquine a été suivie par radio-marquage, ont montré qu'elle s'accumulait préférentiellement dans les hématies parasitées. Cependant, des travaux plus récents ont montré que la pénétration de la chloroquine dans l'hématie parasitée dépendait d'un transporteur particulier, la protéine NHE qui est un échangeur Na^+/H^+ .

- Interaction chloroquine-ferriprotoporphyrine IX [6] :

Pour assurer ses fonctions vitales, le *Plasmodium* utilise l'hémoglobine de la cellule hôte. La digestion de cette hémoglobine dans la vacuole digestive du parasite libère, d'une part, des acides aminés nécessaires au développement des plasmodies et, d'autre part, l'hème. Ce dernier, par oxydation, se transforme en un résidu toxique : la ferriprotoporphyrine IX (FPIX) ou hématine (*figure 7a*).

L'une des hypothèses expliquant cette accumulation est celle avancée par **Fitch** [38,39] sur l'affinité de la chloroquine pour la ferriprotoporphyrine IX soluble.

Selon cette hypothèse la chloroquine se lierait à la FPIX, en s'intercalant entre deux dimères (*figure 7b.*) pour former un complexe toxique possédant la même activité membranaire que l'hématine et donc entraînerait la lyse de la membrane du parasite.

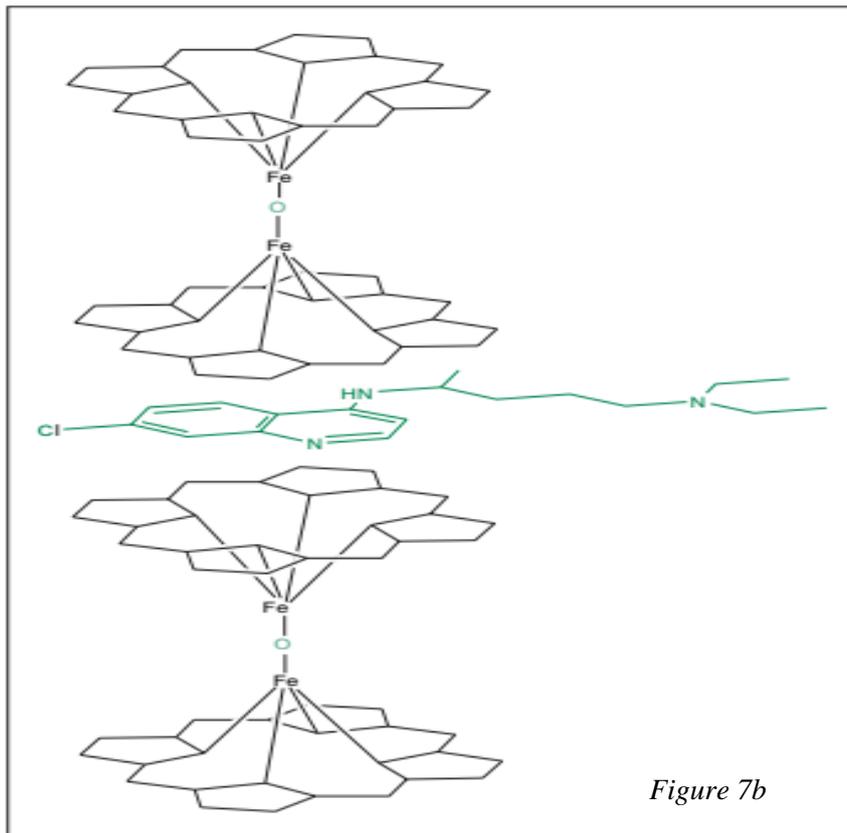
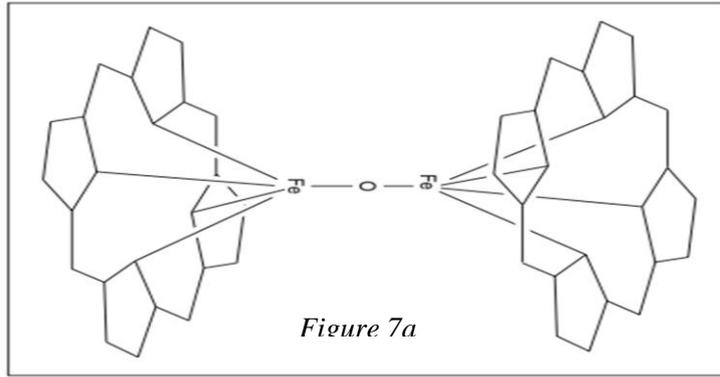


Figure 7 : 7a. Structure de l'hématine et 7b. Modèle de l'interaction de la chloroquine et la FPIX [6].

Mécanisme de la Chloroquino-résistance

Si l'activité de la chloroquine a été attribuée à son accumulation sélective dans les érythrocytes parasités par rapport aux érythrocytes non parasités, la chloroquino-résistance a été étroitement liée à une forte diminution de cette accumulation chez les souches résistantes. [6]

Les théories dominantes suggéraient que ces défauts d'accumulation étaient dus à une altération des gradients de pH et/ou de la perméabilité membranaire en conséquence d'un mécanisme d'efflux [40].

Une des hypothèses principales évoquées est l'efflux de la chloroquine 40 à 50 fois plus rapide chez le parasite résistant, proposé par **Krogstad** (Figure 8) [11].

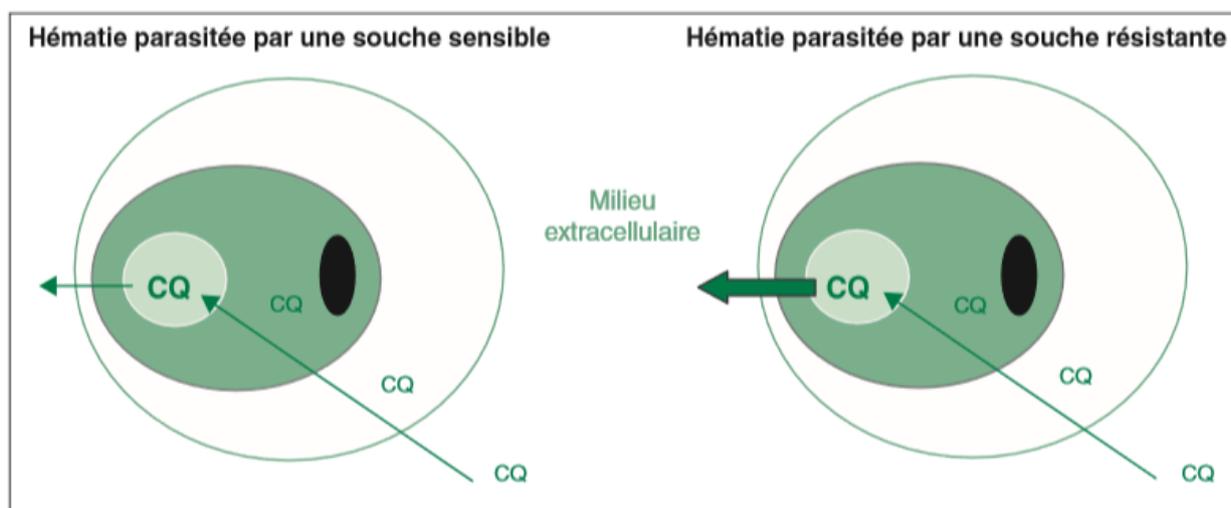


Figure 8 : Efflux de la Chloroquine de la vacuole digestive

Une spécificité structurale élevée de l'accumulation de médicaments est observée, ce qui implique le rôle soit d'un transporteur/perméase spécifique ou d'une molécule associée à l'hématine dans la vacuole digestive [40].

Par analogie avec la résistance des cellules cancéreuses, plusieurs hypothèses ont suggéré que l'efflux de la chloroquine était assuré par un ou plusieurs transporteurs. La première protéine soupçonnée fut la P-glycoprotéine homologue-1 (Pgh-1) qui est localisée sur la membrane de la vacuole digestive du parasite. Cette protéine est codée par le gène *pfmdr1*, homologue du gène *mdr1* humain qui code la P-gp 170 chez les cellules cancéreuses [6].

Enfin, des travaux plus récents ont mis en évidence le rôle d'une autre protéine ***PfCRT*** ou ***Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter*** (Figure 9) dans la chloroquino-résistance [6].

- La protéine *PfCRT* (*P. falciparum chloroquine resistance transporter*): [7,10,12,18]

C'est une protéine située aussi au niveau de la membrane de la vacuole digestive du parasite et codée par le gène *Pfcr* [6].

L'équipe de **Sidhu** a montré que des mutations de ce gène conféraient aux souches de *Plasmodium falciparum* la résistance à la chloroquine [41]

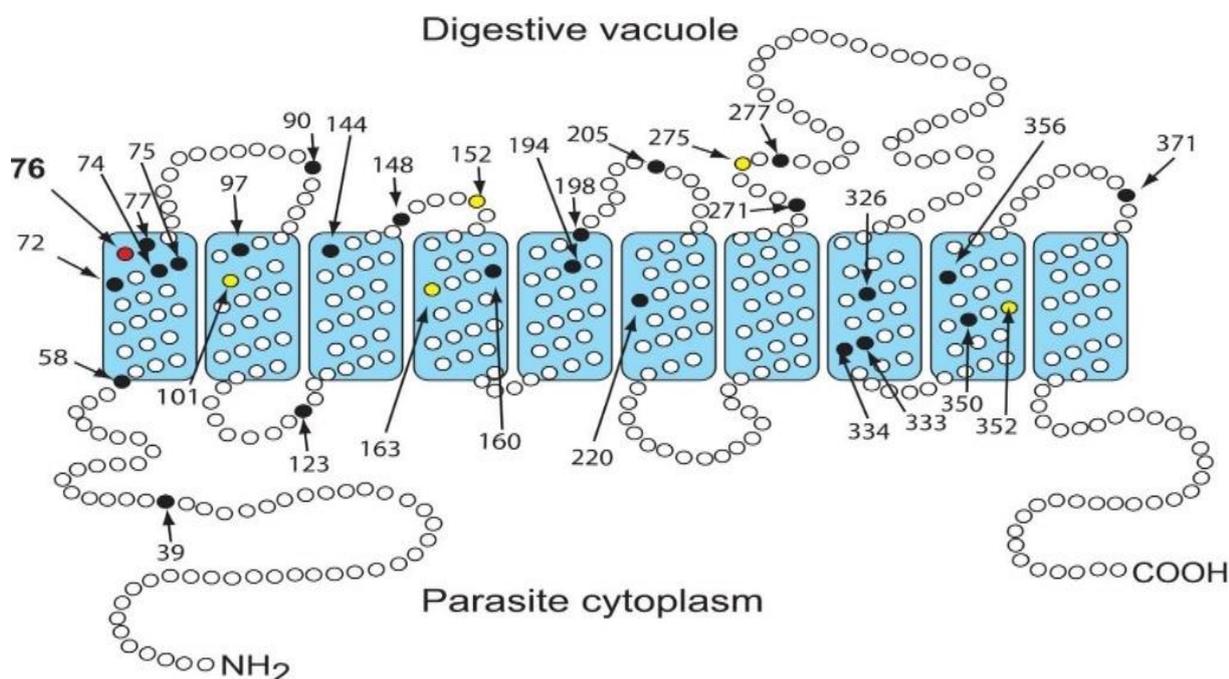


Figure 9 : Protéine *PfCRT*

Source : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23020971> [7]

Cette protéine comporte 13 exons et 10 segments transmembranaires; elle appartient à la superfamille des transporteurs métaboliques. Les données disponibles concordent avec le point de vue selon lequel la protéine *PfCRT* fonctionne comme un transporteur agissant directement comme médiateur de l'efflux de la chloroquine de la vacuole digestive. Ces auteurs ont suggéré qu'un effluveur dépendant de l'énergie (c'est-à-dire un transporteur capable de sortir le médicament de la vacuole digestive, contre un gradient électrochimique) est responsable de la résistance au CQ [42]

Ainsi, il est suggéré que *Pfcr* remplit plusieurs fonctions, telles que l'efflux d'alcaloïdes, de composés aminés, de cations divalent et de peptides qui résultent de la digestion vacuolaire de la globine. En outre, il est culminé pour avoir un rôle dans la régulation de l'homéostasie H⁺[41].

- Le gène *Pfcr* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter)

Le gène de la résistance à la chloroquine a été identifié en 2000. La substitution de la Lysine par la Thréonine à la position 76 du gène *Pfcr* conduit à la mutation qui joue un grand rôle dans ce mécanisme de résistance à la chloroquine [18]. Ce gène situé sur le chromosome 7 code pour un transporteur membranaire de la vacuole digestive. La mutation sur le codon 76 (K→T) où la lysine (K) est remplacée par la thréonine (T), associée à sept autres points de mutation, permet au parasite de limiter l'accumulation de la chloroquine dans sa vacuole digestive, où elle exerce son action inhibitrice. *Pfcr* est également impliqué dans la baisse de sensibilité du parasite à l'amodiaquine et à la quinine. L'analyse de ce locus renseigne sur la pression médicamenteuse exercée au sein des populations [12].

La **figure 10** illustre la localisation du segment d'environ 100 Kb présent dans le septième chromosome de *Plasmodium falciparum* hébergeant les gènes transporteurs, *Pfcr* et le gène *var*. Un segment supplémentaire d'environ 36 Kb est mis en évidence englobant les huit gènes de transporteur comprenant le gène *Pfcr* et une vue plus schématique du gène *Pfcr* avec ses 13 exons, la mutation K76T est aussi mise en évidence. Les cinq acides aminés présents à partir de la position 72-76 dans l'exon 2 caractérisent les haplotypes *Pfcr* résistants (CVIET et SVMNT) et sensibles (CVMNK) à la chloroquine [43].

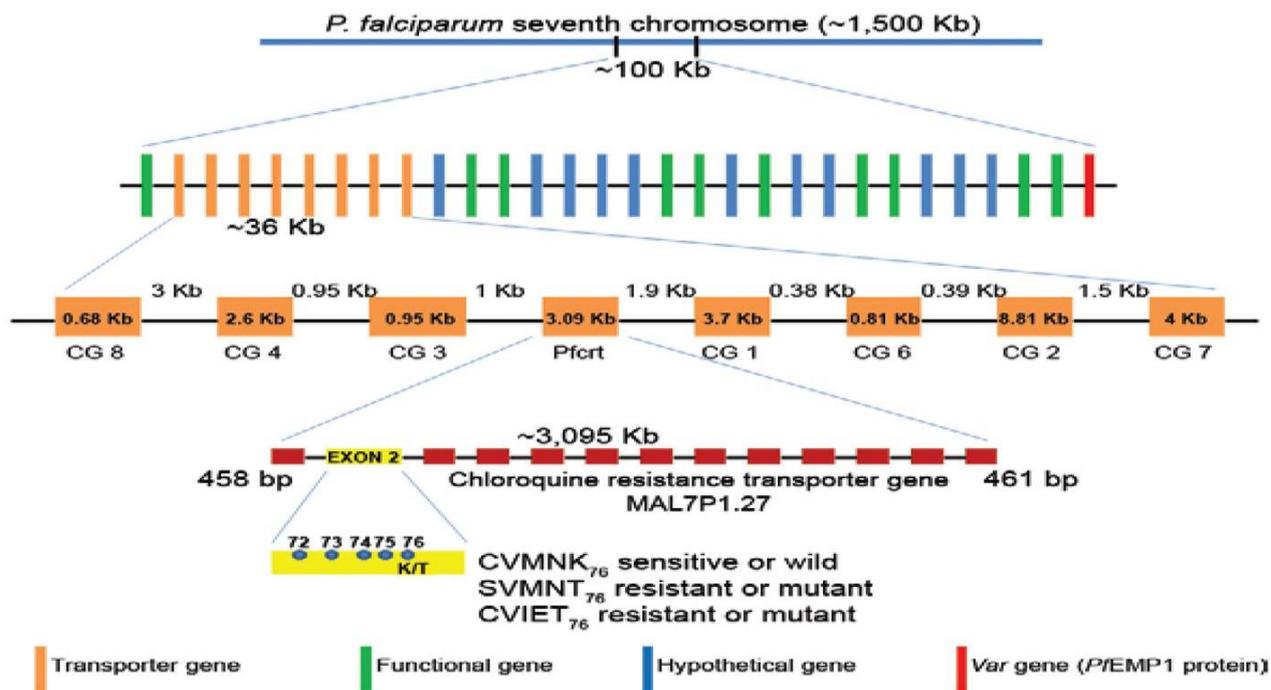


Figure 10 : Représentation du chromosome 7 de *P. falciparum* illustrant un segment d’environ 100Kb sur lequel se situent les 8 gènes de transport dont le *PfCRT*, mis en évidence avec ses 13 exons ainsi que la mutation K76T [43].

La présence de cette mutation sur le codon 76 multiplie le risque de résistance in vivo à la CQ. Cette mutation est souvent associée à d’autres mutations du même gène. Sur le codon 72 (C→S) la cystéine (C) pourrait être remplacée par la Sérine (S) ; le codon 74 (la Méthionine M → l’Isoleucine I); le codon 75 (l’Asparagine N → l’acide Glutamique E) ; le codon 220 (l’Alanine A→ la Sérine S) ; le codon 271 (la Glutamine Q→ l’acide Glutamique E) ; le codon 326 (l’Asparagine N→ la Sérine S) ; le codon 356 (l’Isoleucine I→ la Thréonine T) et sur le codon 371 (l’Arginine R→ l’Isoleucine I) dont les rôles ne sont pas clairement connus. Elles pourraient compenser l’effet de la mutation en position 76 sur la capacité du parasite à se multiplier (fitness) [10].

3.5.2 L'Amodiaquine

L'Amodiaquine (AQ), un 4-aminoquinoléine lié à la chloroquine a été utilisée couramment en monothérapie et maintenant comme un partenaire de médicament dans la combinaison thérapeutique à base d'artémisinine pour le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* [22]. Elle est plus souvent associée à l'artésunate qui est un dérivé semi synthétique de l'artémisinine.

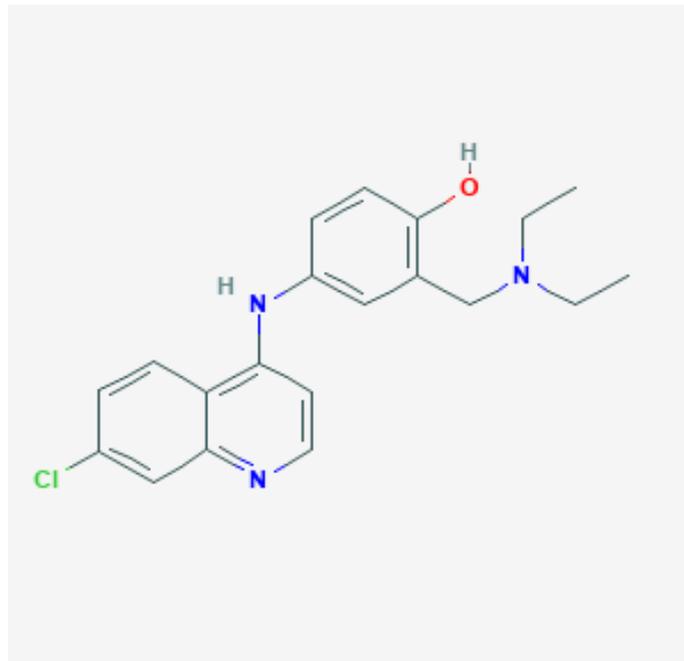


Figure 11 : Structure chimique de l'amodiaquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2165#section=Top>

Le mode d'action de l'AQ semble être le même que celui de la CQ. L'accumulation de l'AQ est corrélée à celle de la CQ et est aussi diminuée chez les isolats chloroquinorésistants [10]. Des études moléculaires ont montré que l'haplotype SVMNT du gène *Pfcr* prédomine dans des parties du monde rapportant historiquement la résistance de l'AQ in vivo [22].

3.6 Méthode de détection des mutations ou de surveillance de la résistance :

High Resolution Melting HRM : Fusion à Haute Résolution :

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

Principe :

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

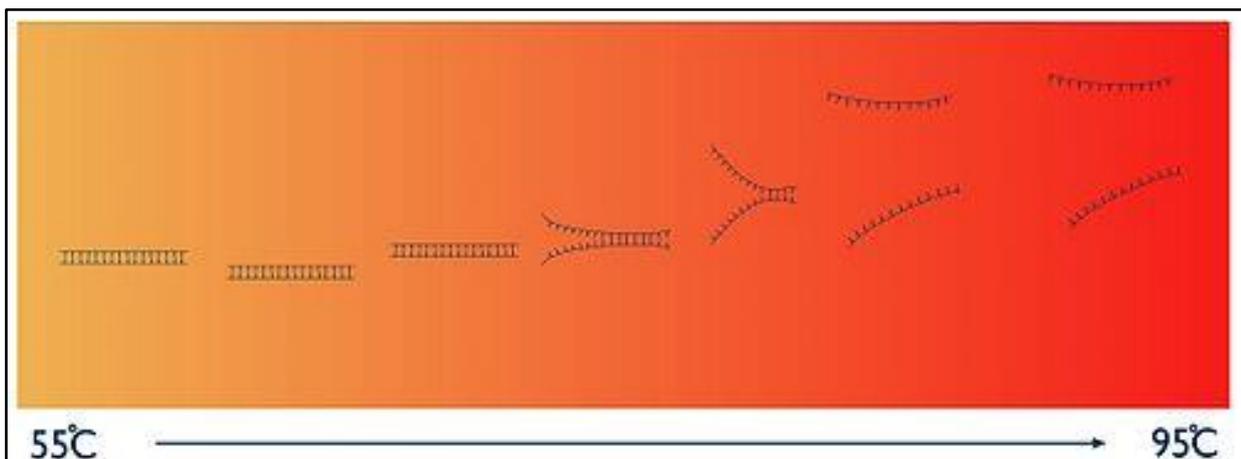


Figure 12 : Principe du HRM

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

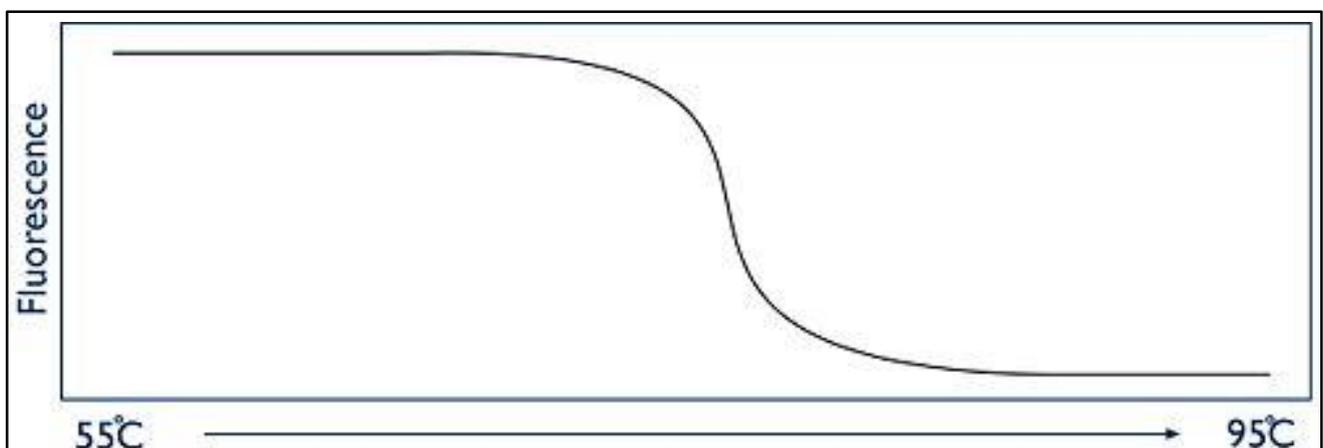


Figure 13 : Principe de tracé des courbes de fusion

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

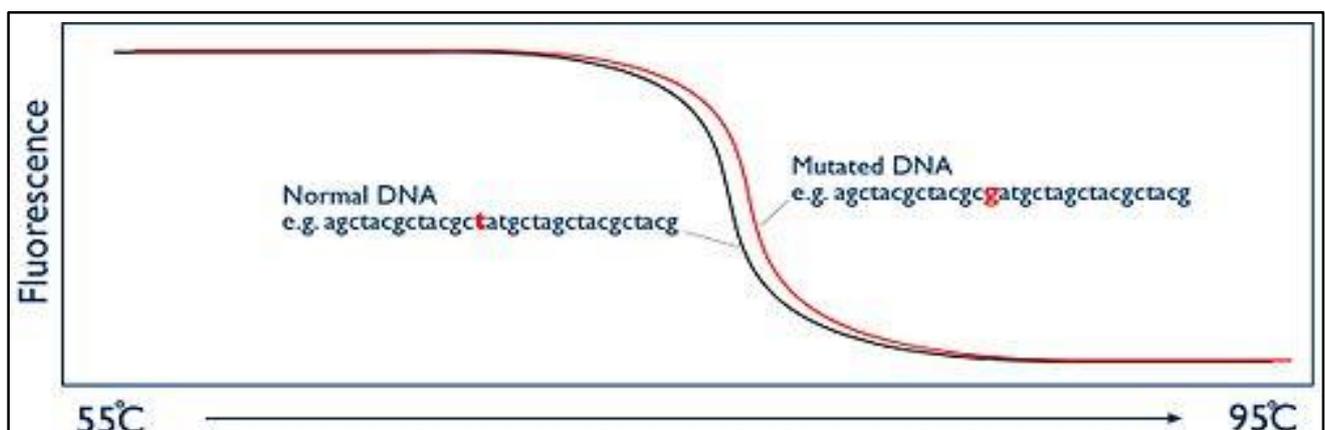


Figure 14 : Courbe de fusion d'un ADN normal et d'un ADN muté

Description du dispositif :

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

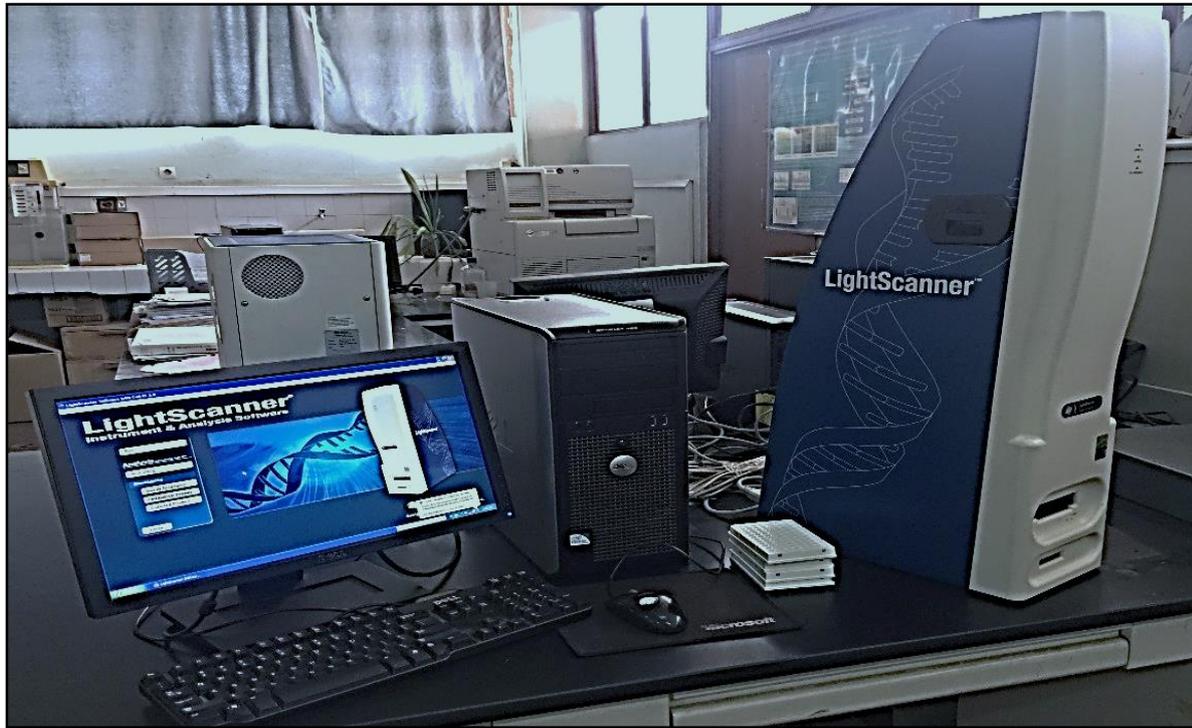


Figure 15 : Dispositif du HRM au LBMA

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

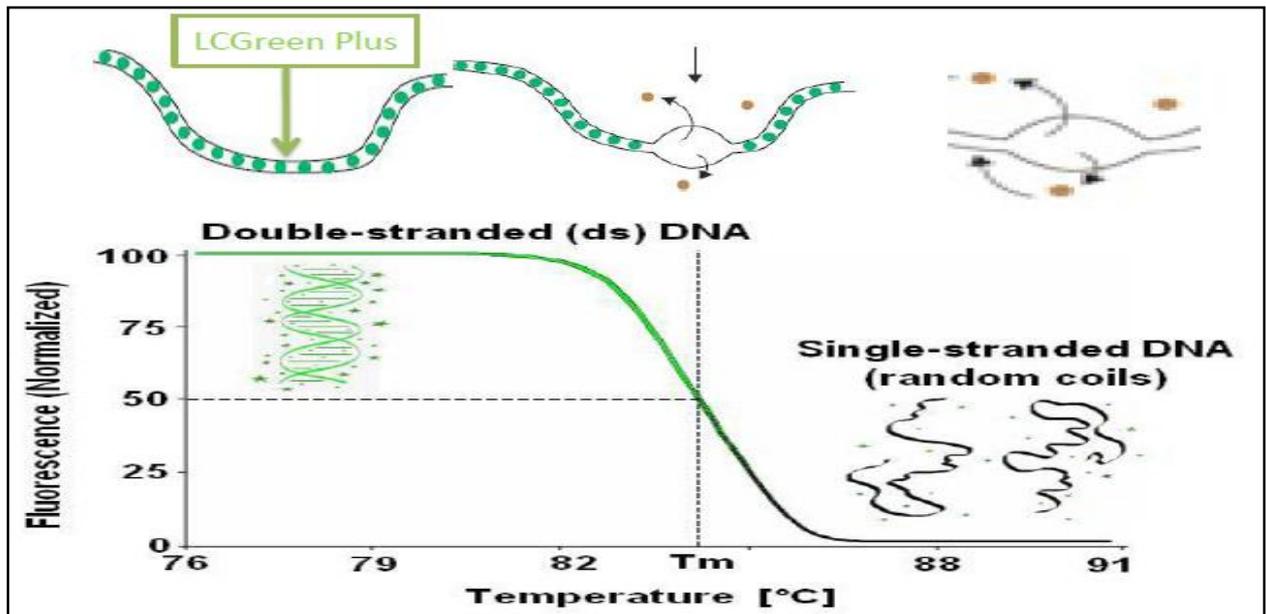


Figure 16 : La température de fusion en fonction de la fluorescence au HRM

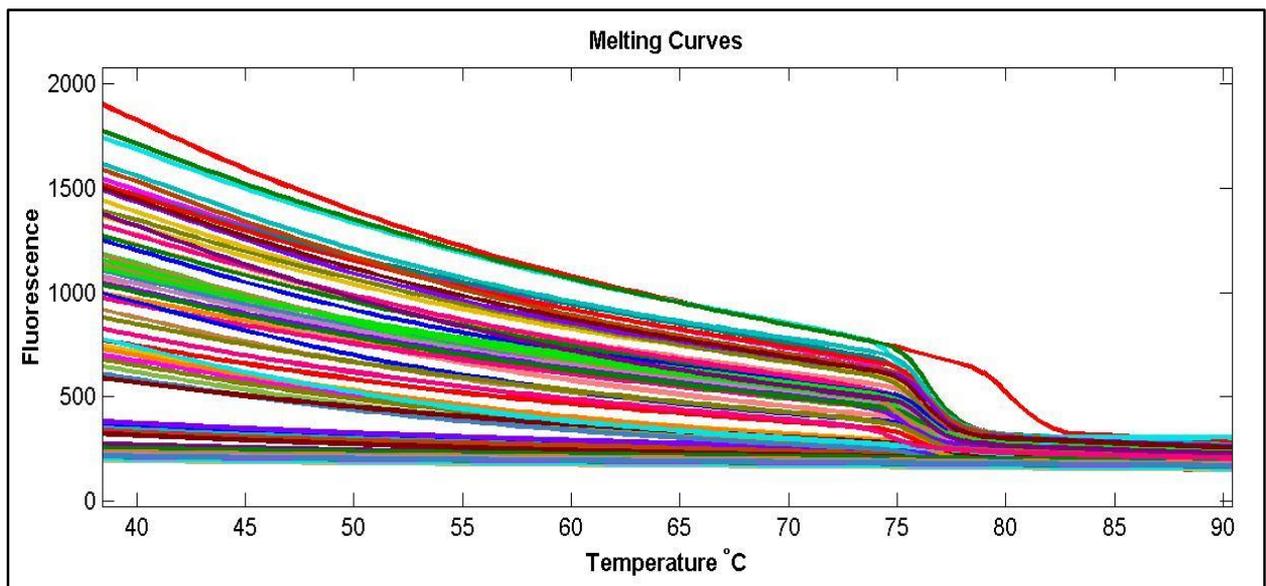


Figure 17 : Les courbes de fusion au HRM

Les courbes sont ensuite normalisées. Après la normalisation, les courbes peuvent être visualisées sous forme de pics (figure 18).

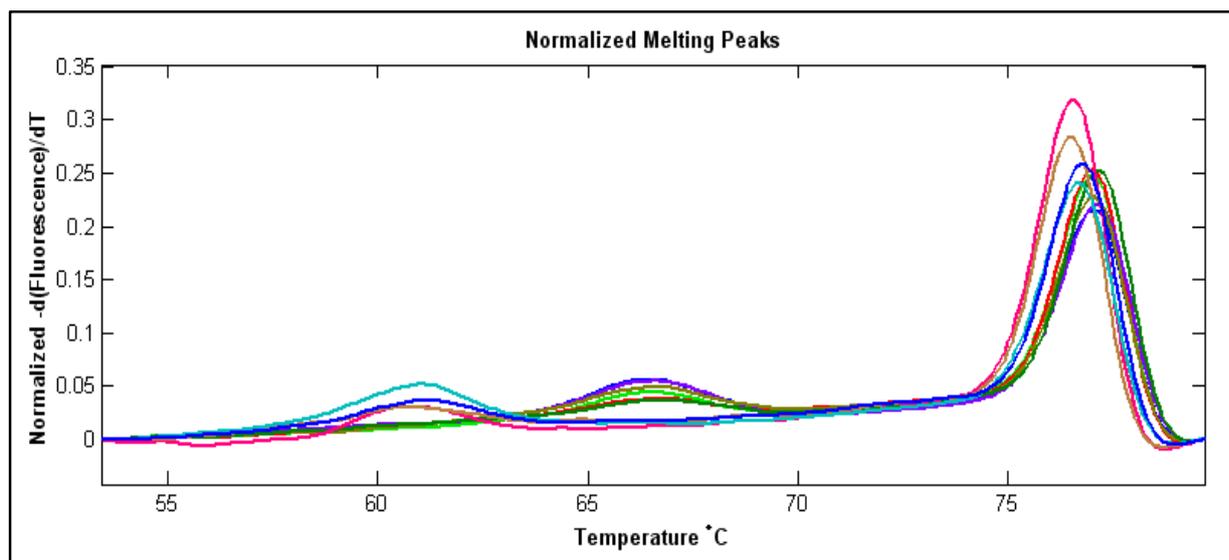


Figure 18 : Pics de fusion au HRM

METHODOLOGIE

4 METHODOLOGIE

4.1 Lieu d'étude:

L'étude s'est déroulée à Sélingué, cercle de Yanfolila situé dans la région de Sikasso, Mali (figure 19). Sa population est estimée à 111 469 habitants. Carrière ; Dalabala ; Sanankoroni ; Kangaré ; Bozola ; Dalaba ; Bougoudani et Kibarou constituent les principaux quartiers de la commune de Baya. Sélingué est une localité endémique où la transmission du paludisme est assurée par deux phénomènes : 1) Le barrage de Sélingué et 2) La pluviométrie.

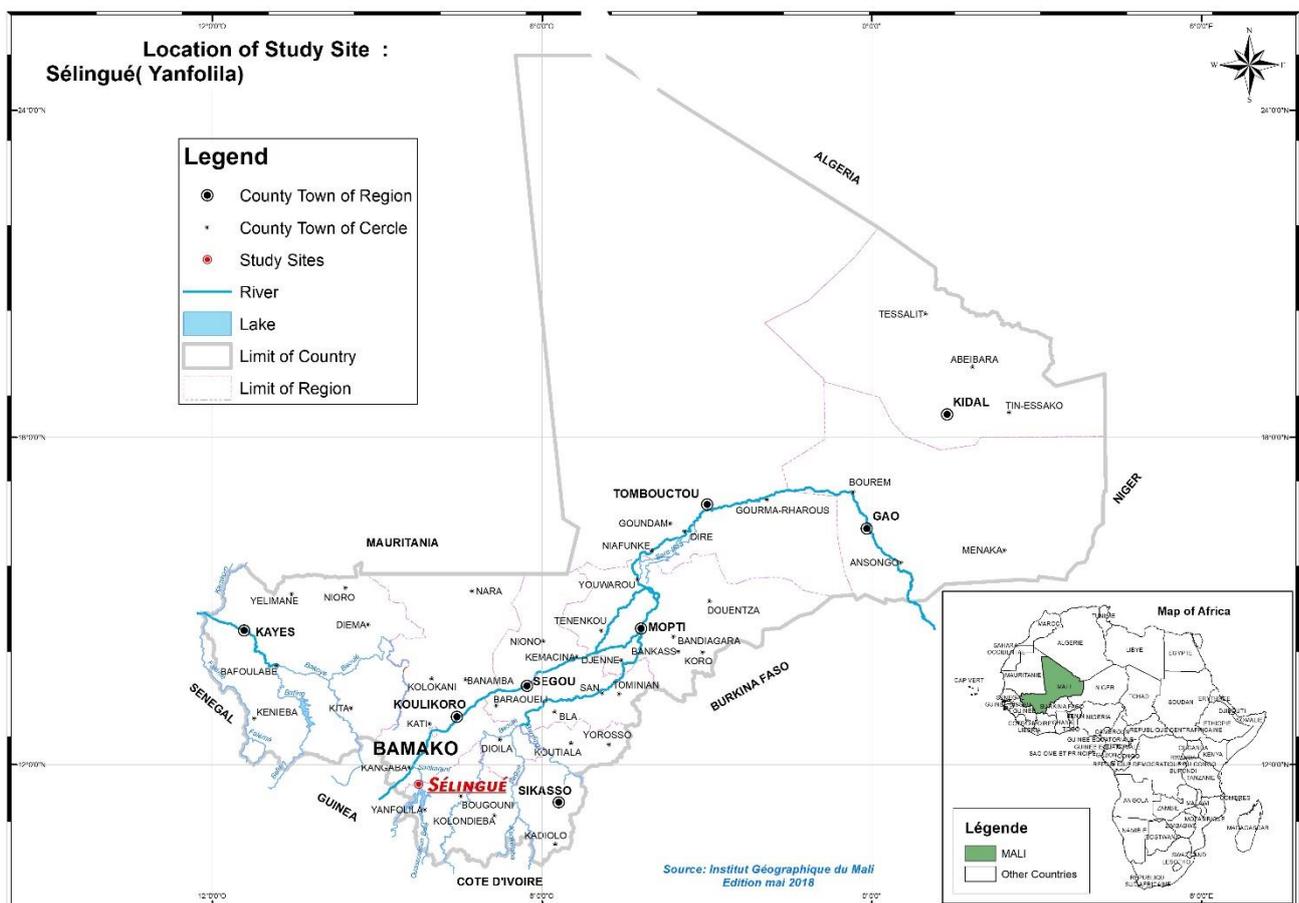


Figure 19 : Cartes du Sélingué [44]

Source : Institut Géographique du Mali

4.1.1 Situation sanitaire

Le district sanitaire de Sélingué regroupe un Centre de Santé de Référence et sept (7) aires de santé organisées en centres de santé communautaires (CSCoM) et gérées par des

associations de santé communautaire (ASACO) : Kangaré, Binko, Tagan, Carrière, Faraba, Sièkorolé et Diarani plus trois (3) CSCom du cercle de Kangaba (Manikoura, Séléfougou, Figuiratomo). Pour des raisons d'accessibilité géographique, la zone sanitaire de Sélingué abrite des dispensaires, des maternités (Mafléni, Bambala, Makandiana et Solinkoro) et une infirmerie de l'institut nationale de prévoyance sociale au niveau de l'office de développement rural de Sélingué (ODRS).

4.2 Type et période d'étude

L'étude s'est déroulée du 17 Novembre 2016 au 16 Décembre 2016. Il s'agissait d'une étude transversale à visée investigatrice s'inscrivant dans le cadre du projet PMI (President Malaria Initiative) sur l'efficacité des antipaludiques (du 26 Novembre 2015 au 20 Janvier 2017). Un total de 449 enfants atteints du paludisme simple à *P. falciparum*, âgés de 06 à 59 mois a été enrôlé dans ce projet à Sélingué. Notre étude s'est focalisée sur les 03 quartiers qui ont présenté une forte prévalence de cas de paludisme simple à *P. falciparum* selon les résultats du projet PMI.

4.3 Enrôlement des enfants dans le projet PMI

Des dépistages actifs et volontaires ont été faits à travers la goutte épaisse pour diagnostiquer l'accès palustre simple à *P. falciparum* chez les enfants âgés de 06 à 59 mois à Sélingué. Une fois l'accès palustre simple à *P. falciparum* confirmé, les enfants répondant aux critères d'inclusion étaient enrôlés (inscrits) par un clinicien après l'obtention de l'assentiment de leurs parents.

Un prélèvement capillaire a été effectué chez les enfants avant l'administration des médicaments (Artemether+luméfantrine ou Artésunate+Amodiaquine). Ce prélèvement a servi à la réalisation des confettis. Des gouttes de sang étaient déposées dans les cercles de spots du papier confetti, puis on les laissait sécher à l'abri des mouches et du soleil avant de les introduire dans des enveloppes pour les protéger de la poussière.

Un minimum de trois (03) spots par confetti et par patient était réalisé. Sur le confetti du patient se trouvaient également ses informations: l'identifiant du patient et la date de passage.

4.4 Enquêtes

Des enquêtes ont été réalisées dans 8 quartiers de Sélingué incluant les 03 quartiers qui ont présenté une forte prévalence de paludisme (Carrière, Dalabala et Bozola). Un total de 200 familles a participé à l'enquête et 21 vendeurs de médicaments de la rue ont été interrogés pour estimer :

- ♣ le niveau de vente illicite de la chloroquine auprès des vendeurs (Annexe I) et
- ♣ le niveau de consommation clandestine de la chloroquine dans les familles (Annexe II).

Le choix des familles a été fait de façon raisonnée en fonction de la prévalence du paludisme simple à *P. falciparum* dans les quartiers.

4.5 Echantillonnage

4.5.1 Choix des participants

Nous avons fait un choix raisonné de 60 patients parmi les 449 enfants enrôlés à Sélingué en se basant sur la prévalence du paludisme simple à *P. falciparum* dans différents quartiers. Ainsi nous avons choisi 35 enfants à la Carrière qui avait la plus forte prévalence de cas de paludisme simple à *P. falciparum* suivi de Dalabala où nous avons choisi 15 enfants et enfin Bozola où 10 enfants ont été choisis.

4.5.2 Collecte des échantillons

Nous avons sélectionné les confettis des 60 patients inclus dans notre étude pour la réalisation des tests moléculaires.

4.6 Détection des mutations ponctuelles associées à la résistance du *P. falciparum* à la chloroquine

4.6.1 Marqueurs de résistance étudiés

Nous avons étudié quatre marqueurs de résistance afin de détecter des mutations ponctuelles sur le gène *Pfprt* associés à la chloroquino-résistance. Ce gène situé sur le chromosome 7 code pour un transporteur membranaire de la vacuole digestive. Pas moins de 30 variantes ont été identifiées, rendant la protéine *PfCRT* extraordinairement polymorphe.

La mutation sur le codon 76 (K→T), associée à sept autres points de mutation (dont les codons 72 ; 74 ; 75) permet au parasite de limiter l'accumulation de chloroquine dans sa vacuole digestive, où elle exerce son action inhibitrice.

Les marqueurs utilisés étaient :

- ♣ *Pfcr* 72S : sur le codon 72, la Cystéine C pourrait être remplacée par la Sérine S.
- ♣ *Pfcr* 74I : à la position 74, la Méthionine M pourrait être remplacée par l'isoleucine I.
- ♣ *Pfcr* 75E : à la position 75, l'asparagine N pourrait être remplacée par l'acide glutamique
- ♣ *Pfcr* 76T : sur le codon 76, la lysine K pourrait être remplacée par la thréonine T.

Ces marqueurs permettent d'obtenir différents haplotypes du gène *Pfcr*

Haplotypes du gène *Pfcr* recherchés:

Un haplotype est un groupe d'allèles d'un même gène ou de plusieurs gènes situés sur un même chromosome et habituellement transmis ensemble. Les marqueurs de résistance étudiés mettent en évidence différents haplotypes basés sur quatre positions ou codons du gène *Pfcr* (72, 74, 75 et 76).

- ♣ CMNK est l'haplotype sauvage
 - ♣ CMNT
 - ♣ CIET
 - ♣ SMNT
 - ♣ CIDT
 - ♣ CMET
- } Sont des haplotypes mutés
- ♣ CIET/CMNK est l'haplotype mixte (présence simultanée de l'haplotype sauvage et muté).

4.6.2 Choix de la technique de détection

La technique de fusion à haute résolution/ High Resolution Melting (HRM) a été utilisée pour détecter des mutations ponctuelles sur le gène *Pfcr* associés à la chloroquino-résistance. C'est une technique de biologie moléculaire permettant la détection de mutations de polymorphisme génétique et de différences épigénétiques dans des échantillons d'ADN double brin. Un changement, même mineur, dans la séquence de l'ADN conduit à une variation de la cinétique de fusion, qui peut être détectée grâce à la haute résolution utilisée. Cette technique a été utilisée avec succès dans plusieurs études comme celle menée par **Andriantsoanirina et al, en 2009 sur** Rapid detection of point mutations in *Plasmodium falciparum* genes associated with antimalarial drugs resistance by using High-Resolution Melting analysis [45], celle de **Daniels et**

al, en 2012 sur Genotyping drug resistance markers in *Plasmodium falciparum* Application of refined methods of High Resolution Melting Analysis to a human malaria pathogen [46] et celle de Ashrafi et al, en 2017 sur Application of high resolution melting assay (HRM) to study temperature-dependent intraspecific competition in a pathogenic bacterium [47].

4.6.3 Extraction de l'ADN à partir des confettis

Découpage des confettis

Trois spots de sang par échantillon étaient découpés et placés dans des tubes 1,5mL. Lors du découpage, pour passer d'un échantillon à un autre, le puncheur était trempé dans l'éthanol 70° puis dans de l'eau distillée, ensuite nettoyé avec le *kimwipe*. La plaque de découpage était aussi nettoyée à l'alcool.

Extraction de l'ADN par le kit Qiagen®

L'extraction de l'ADN des papiers confettis à partir du kit Qiagen® (Germany) a été réalisée selon les instructions du fabricant.

Toutes les étapes de centrifugation doivent se faire à la température ambiante de 15 à 20°C. Avant de commencer, s'assurer que :

- ✓ Les bains-marie sont à 85° C pour l'étape 2 ; 56°C pour l'étape 3 et 70°C pour l'étape 4 ;
- ✓ Le buffer AE ou l'eau distillée sont équilibrés à la température ambiante pour l'élution (étape 10) ;
- ✓ Les buffers AW1 et AW2 ont été préparés avec l'alcool comme l'indique le guide du kit d'extraction ;
- ✓ Les buffers AL et ATL ne contiennent pas de précipités, sinon les faire dissoudre en les incubant à 56°C.

Mode opératoire

1. Dans les tubes de 1,5mL contenant les 3 spots de sang déjà découpés, ajouter 180µL de buffer ATL,
2. Incuber à 85°C pendant 10minutes puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,
3. Ajouter 20µL de Protéinase K de la solution de stock. Vortexer, puis incuber à 56°C pendant 1 heure. Centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube

A noter que l'ajout de la protéinase K est essentiel.

4. Ajouter 200 μ L de buffer AL aux échantillons. Centrifuger bien, et incuber à 70°C pendant 10 minutes puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.

Pour assurer une bonne lyse, il est essentiel d'ajouter le buffer AL et vortexer immédiatement. Il ne faut pas ajouter la protéinase K directement au buffer AL.

Après l'ajout du buffer AL, il est possible que des précipités blancs se forment. Dans la plupart des cas, ces précipités disparaissent après l'incubation.

5. Ajouter 200 μ L d'éthanol (96-100%) aux échantillons, bien vortexer puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.

Il est essentiel que l'éthanol et les échantillons soient bien vortexés.

6. Soigneusement transférer la solution de l'étape 5 dans les colonnes.

Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1 minute. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat.

Bien fermer les colonnes pour éviter la formation des aérosols lors de la centrifugation.

7. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 μ L du buffer AW1.

Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1 minute. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat.

8. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 μ L du buffer AW2.

Fermer les colonnes puis centrifuger à 14000rpm pendant 3 minutes.

9. Recommandé: transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collections qui contiennent le filtrat puis centrifuger à haute vitesse pendant 1 minute.

Cette étape aide à éliminer le restant de la solution du buffer AW2 restée après l'étape précédente.

10. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes 1,5 mL stériles puis jeter les colonnes qui peuvent contenir encore du filtrat. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 150 μ L du buffer AE ou d'eau distillée. Incuber à la température ambiante (15-20°C) pendant 1 minute puis à 8000rpm pendant 1 minute.

Le volume d'ADN dissout utilisé lors de la PCR ne doit pas excéder les 10%, par exemple, pour une PCR de 50 μ L, il ne faut pas ajouter plus de 5 μ L d'ADN.

Après l'extraction de l'ADN, on peut aliquoter 60 μ L d'ADN comme solution de travail et conserver le reste à 20°C.

4.6.4 Fusion à Haute Résolution (High Resolution Melting-HRM)

Nous avons fait la recherche des marqueurs de résistance à la chloroquine par High Resolution Melting (HRM).

Amorces et sondes utilisées

Pour détecter des mutations ponctuelles du gène *Pfcr* associées à la résistance du *P. falciparum* à la chloroquine, les amorces suivantes ont été utilisées :

Forward: GTAAAACGACGGCCAGTTTCTTGTCTTGGTAAATGTGCTCA

Reverse: CAGGAAACAGCTATGACCGGATGTTACAAAACCTATAGT TACCAAT

Sonde: GTGTATGTGTAATGAATAAAATTTTTG-block

Un mix (10X Primer Probe) est préparé à partir des amorces et la sonde (tableau III).

❖ Protocole standart

Tableau III : Composition du 10X Primer Probe

Concentration initiale	Amorces	Volume en μL	Concentration finale
50 μM	Forward	1	0,5 μM
50 μM	Reverse	5	2,5 μM
100 μM	Sonde	2	0,2 μM

Ce mix nous sert de solution de travail pour le master mix

Préparation du master mix

Le tableau IV présente la composition du master mix. Ce mélange est constitué de LCgreen® et du 10X Primer probe dans lequel sont ajoutés 2,5 μl d'extraits d'ADN de chaque échantillon.

Tableau IV : Composition du master mix

Réactifs	Concentration initiale	Volume en μL	Concentration finale
H2O	-	10	-
LCgreen®	2,5X	10	1X
Primer Probe	10X	2,5	1X
ADN		2,5	
Volume final		25	

Ce master mix nous sert de solution de travail

❖ **Protocole alternatif**

Comme protocole alternatif nous avons préparé un master mix dont la composition se trouve dans le tableau

Tableau V : Composition du mix lors du HRM

Concentration initiale	Réactifs	Volume en μL	Concentration final
-	ddh ₂ O	2	-
2,5	LightScanner master mix	4	1X
10 μM	Forward primer	0,25	0,25 μM
10 μM	Reverse primer	1,25	1,25 μM
10 μM	Sonde	1	1 μM
-	ADN	1,5	-
Total		10	

❖ **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Un volume de 25 μL du mélange réactionnel (tableau IV) était distribué dans chaque puits et 30 μL d'huile minérale y était ajouté pour empêcher l'évaporation. La plaque est recouverte d'*Adhesive seal* puis centrifugée à 2500 rpm pendant cinq (05) minutes. Elle est ensuite introduite dans un thermocycler (PTC200) et l'amplification se déroulait selon le programme dans le tableau VI

Tableau VI : Programme de PCR de *Pfprt* dans le thermocycleur PTC200

Dénaturation initiale	95°C	5 : 00	1 Fois
Dénaturation	95°C	0 :30	55 Fois
Appariement	56°C	0 :30	
Elongation	72°C	1 :00	
Elongation finale	72°C	10 :00	1 Fois
Conservation	4°C	∞	

A la fin de la PCR, la plaque est chauffée à 95 °C pendant 30s et est de nouveau centrifugée, puis nous passons à la fusion à haute résolution (HRM).

High Resolution Melting (HRM)

La plaque est introduite dans le LightScanner-96 (Idaho Technologies, Inc., Salt Lake City, UT) et on fait varier la température progressivement de 40°C à 95°C. Au bout de 10 minutes, les courbes de fusion (qui sont fonction de la fluorescence de la solution grâce au LCGreenPlus agent intercalant fluorescent) apparaissent sur l'écran de l'ordinateur.

Les courbes sont ensuite normalisées et les pics sont analysés pour déterminer les températures de fusion correspondant aux différents haplotypes (CMNK, CMNT, CIET, SMNT, CIDT, CMET et Mixtes).

4.7 Gestion et analyse des données

Les réponses au questionnaire ont été reportées sur les fiches d'enquête (**Annexe I & II**) puis saisies dans SPSS IBM. Les données moléculaires ont été saisies sur Microsoft Office Excel 2013 et analysées avec SPSS IBM Statistics 20.

Le test de Khi-2 a été utilisé pour savoir si :

- ♣ La parasitémie des enfants inclus dans l'étude variait en fonction des quartiers
- ♣ Le taux de consommation de la CQ variait en fonction des quartiers
- ♣ Le taux de mutation associée à la chloroquino-résistance variait en fonction des quartiers
- ♣ Il y a une association entre le taux de consommation de la CQ et le taux de mutation associée à la chloroquino-résistance.

L'étude a été validée par le comité d'éthique de l'INRSP.

RESULTATS

5 RESULTATS

5.1 Facteurs sociodémographiques et densité parasitaire

5.1.1 Facteurs sociodémographiques

La prévalence du paludisme simple à *P. falciparum* nous a permis d'inclure 60 enfants (garçons et filles) de 06 mois à 59 mois provenant des quartiers Carrière, Dalabala et Bozola. Le tableau VII montre la répartition des patients en fonction du quartier et du genre.

Tableau VII : Répartition des patients en fonction du quartier et du genre

Quartiers	Genre		Total
	Masculin	Féminin	
Carrière	19	16	35
Dalabala	10	5	15
Bozola	3	7	10
Total	32	28	60

Le sexe ratio était de 1,14 en faveur des garçons.

5.1.2 Densité parasitaire

La répartition des parasitémiés des patients en fonction du quartier est consignée dans le tableau VIII

Tableau VIII : Répartition des parasitémiés des patients en fonction du quartier

Quartiers	Tranches de parasitémiés par μL de sang	
	2000 – 50000	50005 – 199999
Carrière	28	7
Dalabala	13	2
Bozola	9	1
Total	50	10
valeur de p (test exact de Fisher)	0.69	

La plus part des patients avait une parasitémie comprise entre 2000 et 50000 trophozoïtes par μL de sang soit 83,3% des patients . La parasitémie des enfants ne variait pas en fonction des quartiers puisqu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative ($p=0,69$) avec le test exact de Fisher.

5.2 Données des enquêtes

5.2.1 Investigations chez les vendeurs de médicaments

5.2.1.1 Informations relatives aux vendeurs

Nous avons effectué des investigations auprès de 21 vendeurs de médicaments de la rue dans les principaux quartiers de Sélingué (**Tableaux IX, X XI et XII**) pour estimer le niveau de vente illicite de la chloroquine.

Tableau IX : Répartition des vendeurs selon l'âge

Tranche d'âge (ans)	Effectifs	Pourcentage
11 – 19	5	23,8
20 – 40	16	76,2
TOTAL	21	100

La majorité des vendeurs se trouvait dans la tranche d'âge de 20 à 40 ans (76,2%)

Tableau X : Répartition des vendeurs en fonction du niveau scolaire

Niveaux	Effectifs	Pourcentage
Non-scolarisé	10	47,6
Coranique	5	23,8
Primaire	4	19,0
Primaire et Coranique	2	9,5
TOTAL	21	100

La plupart des vendeurs était non-scolarisée 47,6%.

5.2.1.2 Profession des clients des vendeurs de médicaments de la rue

Le **Tableau XI** renseigne sur la profession des clients des vendeurs de médicaments de la rue chez lesquels les enquêtes ont été menées.

Tableau XI : Répartition des vendeurs en fonction de la catégorie de clients

Profession des clients	Effectifs	Pourcentage
Tous types de profession demandée	1	4,8
Commerçants +ouvriers +élèves ou étudiants+ chômeurs+ménagères +revendeurs	1	4,8
Agriculteurs +Commerçants +élèves ou étudiants+ ménagères	1	4,8
Agriculteurs+ Commerçants+ élèves ou étudiants ménagères+revendeurs	1	4,8
Agriculteurs+ Commerçants +élèves ou étudiants +ménagères+ revendeurs+ ouvriers+ chômeurs	1	4,8
Agriculteurs+ Commerçants+ élèves ou étudiants +ménagères pêcheurs	1	4,8
Agriculteurs +Commerçants +élèves ou étudiants +ménagères+ chômeurs	3	14,3
Agriculteurs+ Commerçants+ élèves ou étudiants+ ménagères+ artisans	4	23,8
Commerçants +élèves ou étudiants+ ménagères	1	4,8
Agriculteurs +Commerçants +élèves ou étudiants +ménagères artisans +chômeurs	6	23,8
Commerçants+ ménagères +chômeurs	1	4,8
TOTAL	21	100

La clientèle était principalement constituée par les Agriculteurs ; les Commerçants ; les Elèves ou Etudiants ; les Ménagères ; les Artisans et les Chômeurs.

5.2.1.3 Médicaments antipaludiques vendus

Nous avons demandé aux vendeurs de médicaments de rue, quels médicaments antipaludiques vendent-ils à leurs clients pour le traitement du paludisme.

Tableau XII : Combinaison des médicaments proposés par les vendeurs de médicaments de la rue comme traitement antipaludique

Médicaments antipaludiques vendus	Effectifs	Pourcentage
Chloroquine (Nirupquin 100mg)	6	28,6
Amodiaquine hydrochloride ; Nirupquin 100mg	1	4,8
Amodiaquine ; Efferalgan ; Paracétamol 500mg	2	9,5
Amodiaquine hydrochloride ; Efferalgan	3	14,3
Nirupquin 100mg +Efferalgan +Zebedol	1	4,8
Nirupquin 100mg; Efferalgan ; Paracétamol 500mg; Zebedol	2	9,5
Amodiaquine hydrochloride ; Nirupquin 100mg; Efferalgan ; Paracétamol 500mg	4	19,0
Nirupquin 100mg; Efferalgan ; Paracétamol 500mg	1	4,8
Amodiaquine hydrochloride ; Nirupquin 100mg; Efferalgan ; Paracétamol 500mg ; Zebedol	1	4,8
TOTAL	21	100

Il ressort de cette enquête que la plupart des vendeurs ont de la chloroquine à vendre (soit 76,2% des vendeurs).

5.2.1.4 Evidence de la vente de chloroquine

Pour avoir la certitude de la vente de la chloroquine par les vendeurs de médicaments de rue des trois quartiers (Carrière, Dalabala et Bozola), nous avons demandé ensuite acheté de la chloroquine chez ces vendeurs. Sur les dix vendeurs questionnés, 100 % ont répondu à l'affirmative à la vente de la Chloroquine et neuf (soit 90%) nous ont vendus de la Chloroquine (Nirupquin® 100 mg). La **Figure 20** montre la photo des médicaments (vendus comme) antipaludiques parmi lesquels la Chloroquine achetée chez les vendeurs de médicaments de la rue.



Figure 20 : Médicaments (vendus comme) antipaludiques achetés chez les vendeurs de médicaments de la rue de Sélingué

5.2.2 Investigations dans les familles

5.2.2.1 Consommation de la chloroquine dans les familles

Nous nous sommes renseignés dans les familles pour savoir si leurs membres consomment la CQ. Les réponses à notre question sont consignées dans les **Tableaux XIII et XIV**

Tableau XIII : Consommation de la Chloroquine dans les familles à Sélingué

Réponses	Consomme	Ne consomme Pas	Ne sait pas	N'as pas répondu	Total
Effectif	146	44	3	7	200
Pourcentage	73%	22%	1,5%	3,5%	100%

73% des familles enquêtées affirment consommer de la Chloroquine

5.2.2.2 Source d'approvisionnement des familles en Chloroquine

Parmi les 146 familles qui nous ont affirmé la consommation de la Chloroquine, 100 nous ont donné leur source d'approvisionnement.

Tableau XIV : Source d'approvisionnement des familles en Chloroquine

Source	Effectifs	Pourcentage
Vendeurs ambulants	50	34
Boutiques	13	8,9
Pharmacies	14	9,6
CSCOM	4	2,7
Vendeurs ambulants et Boutiques	13	8,9
Pharmacie et vendeurs ambulants	3	2
Pharmacie et boutique	3	2
Pas répondue	46	32
TOTAL	146	100

Les familles qui consomment la Chloroquine ont plusieurs de source d'approvisionnement et la majorité (44,9%) d'entre elles s'approvisionnait auprès des vendeurs ambulants.

5.3 Prévalence des mutations du gène *Pfcr*t associées à la chloroquino-résistance

5.3.1 Mutations ponctuelles du gène *Pfcr*t associées à la chloroquino-résistance

La technique de HRM a été utilisée pour détecter les mutations ponctuelles du gène *Pfcr*t associées à la chloroquino-résistance à Sélingué.

Comme toute méthode de recherche, cette méthode a été au préalable optimisée. Le HRM des trois souches contrôles a été fait deux fois, ceci a permis d'estimer la température moyenne de fusion de l'ADN de ces souches.

Tableau XV : Températures moyennes de fusion après optimisation

Souches contrôles	1 ^{ère} Réaction	2 ^{ème} Réaction	3 ^{ème} Réaction	Moyennes
3D7	59,5	59	59,8	59,4
Dd2	49	49,7	49,5	49,4
7G8	53,5	53,9	-	53,7

Les températures de fusion des souches contrôles variaient très peu.

La **figure 21** donne la répartition des allèles en fonction des mutations ponctuelles.

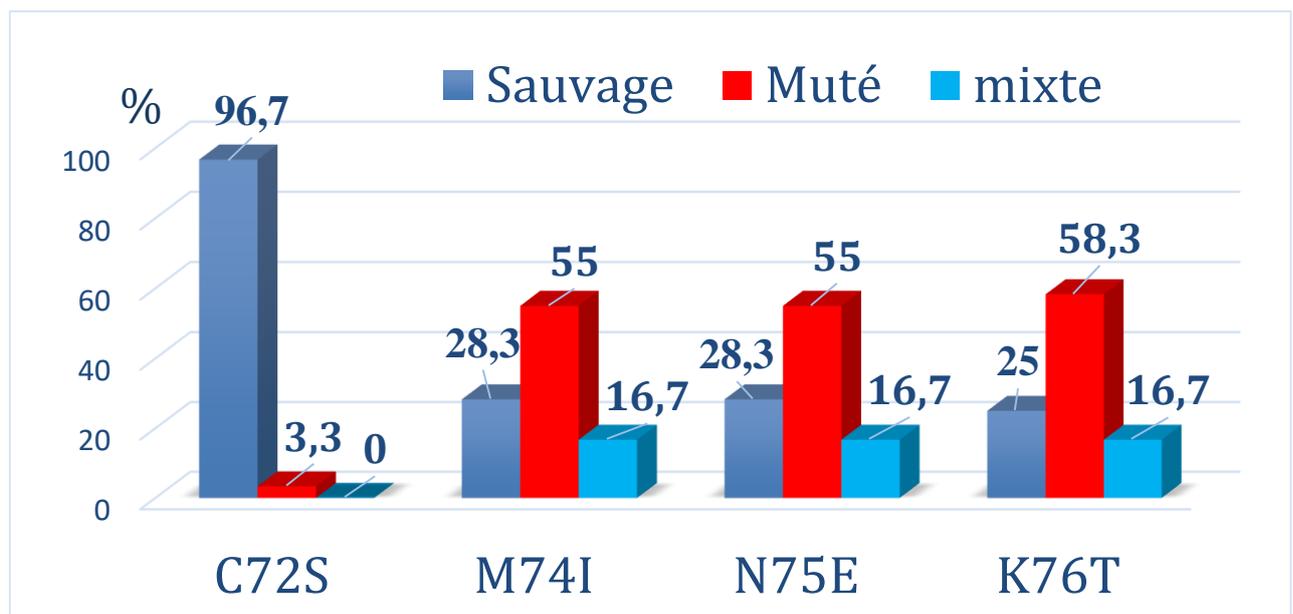


Figure 21 : Répartition des allèles en fonction des mutations ponctuelles du gène *Pfprt*

Hormis la position 72 où l'allèle sauvage est prédominant avec 96,7%, l'allèle muté est majoritairement représenté à toutes les autres positions.

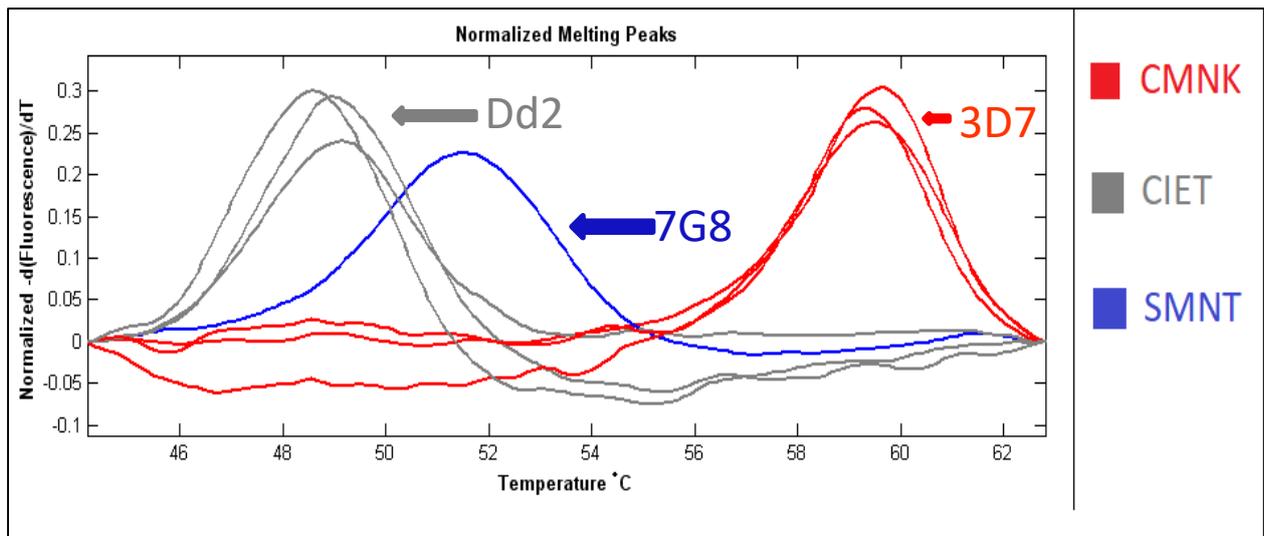


Figure 22 : Pics de fusion de nos souches de référence et les haplotypes correspondants après HRM

La température de fusion des souches mutées CIET et SMNT étaient respectivement de 49°C et 52°C et celle des souches sauvages CMNK était de 60°C

La figure 23 montre le profil d'une souche portant l'allèle **76T** mutée parmi nos échantillons.

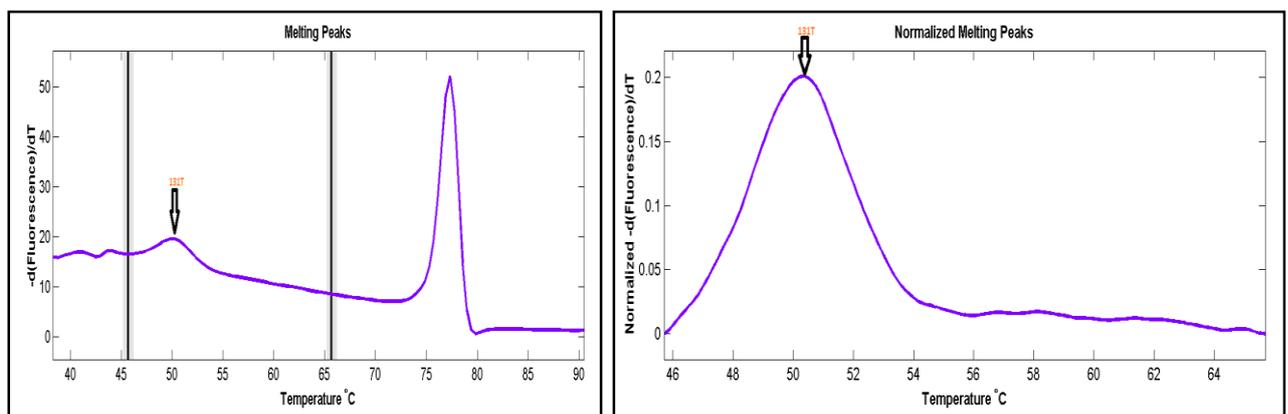


Figure 23 : Souche mutée associée à la Chloroquino-résistance

La température est à peu près 49°C.

La figure 24 illustre le profil d'une souche portant l'allèle **76K** sauvages parmi nos échantillons.

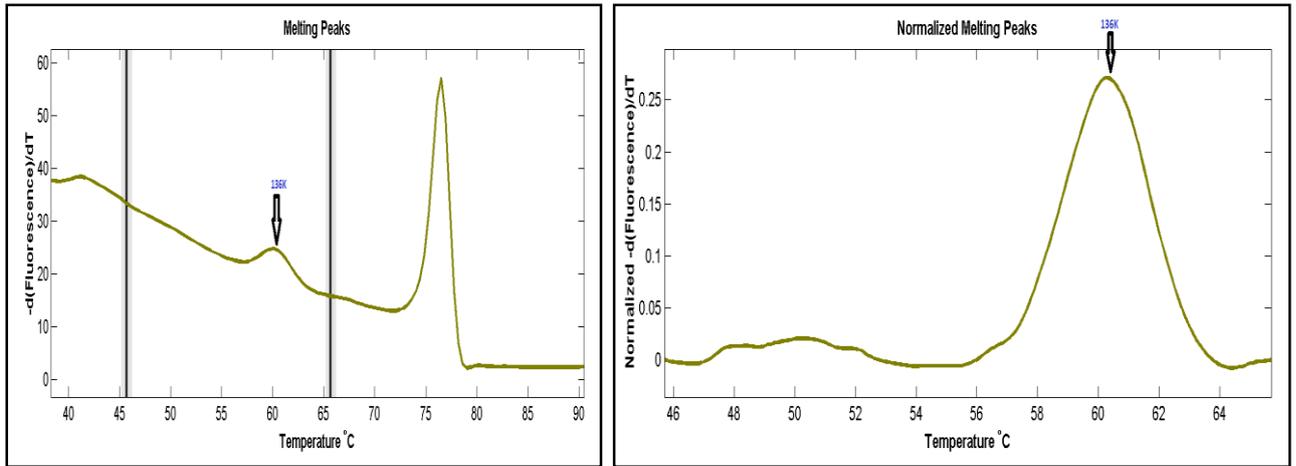


Figure 24 : Souche sauvage associée à la Chloroquinà-résistance

La température est à peu près 60°C

La figure 25 montre le profil d'une souche mixte portant à la fois un profil muté et un profil sauvage à la position 76 du gène *Pfcr*.

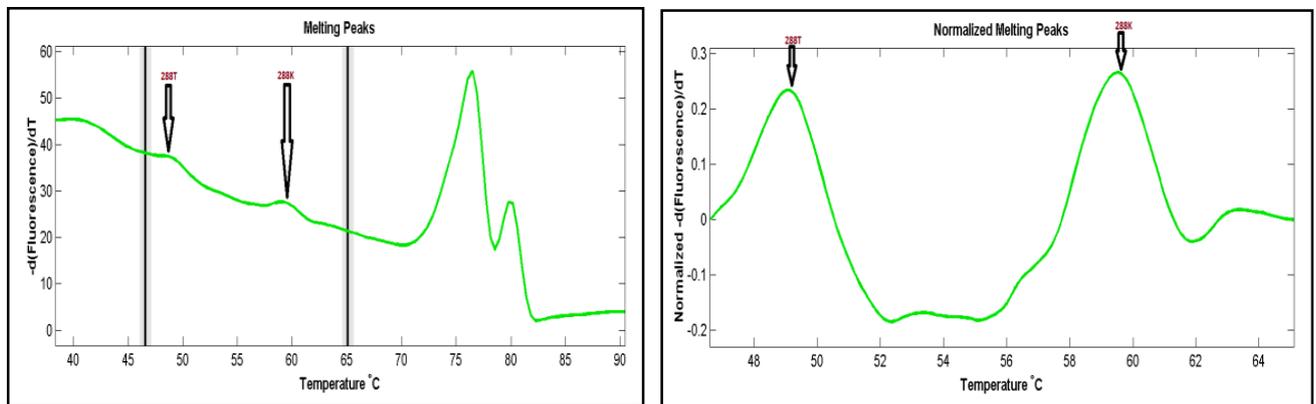


Figure 25 : Souche mixte associée à la chloroquino-résistance

Cette souche présente à la fois le profil muté (température à peu près 49°C) et sauvage (température à peu près 60°C).

5.3.2 Haplotypes du gène *Pfcr*

Les allèles retrouvés ont permis d'avoir les haplotypes du gène *Pfcr* liés à la chloroquino-résistance regroupés dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Les différents haplotypes retrouvés sur le gène *Pfcr*

Haplotypes	Effectifs	Pourcentage
CMNK	15	25
CIET	33	55
SMNT	2	3,3
CMNK / CIET	10	16,7
TOTAL	60	100

Nous avons eu trente et trois (33) haplotypes CIET mutés ; deux (02) haplotypes SMNT mutés ; quinze (15) haplotypes CMNK sauvages et dix (10) haplotypes CMNK/CIET mixtes à la fois sauvages et mutés.

Nous avons réparti les haplotypes retrouvés selon les quartiers. La **figure 26** illustre cette répartition

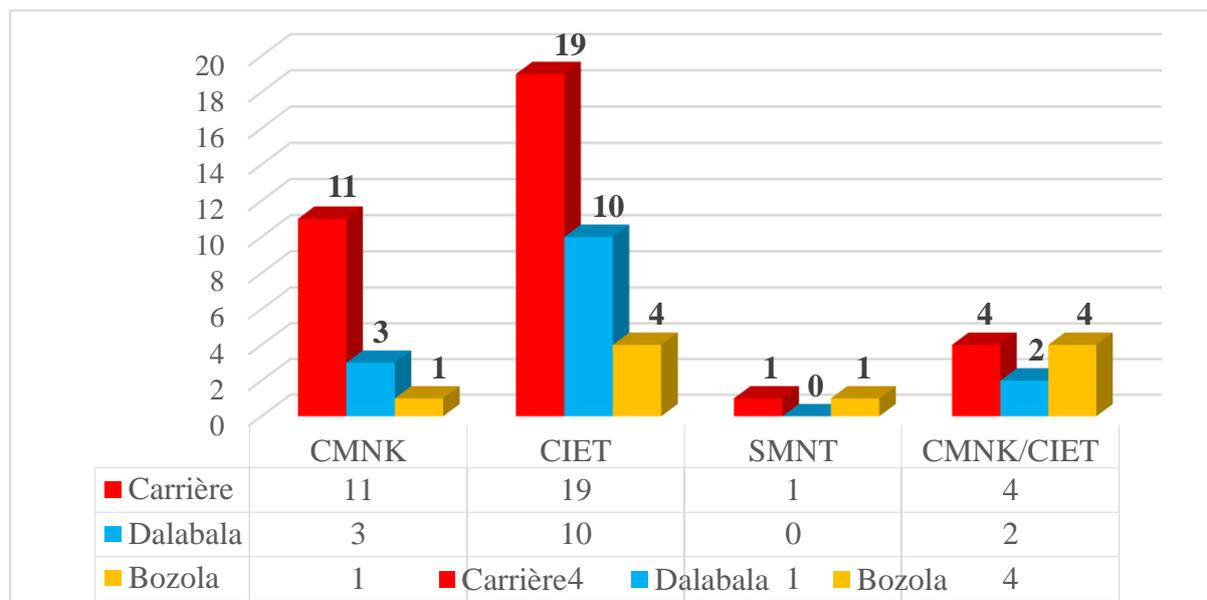


Figure 26 : Répartition des haplotypes selon les quartiers

L’haplotype CIET mutés prédomine avec un pourcentage de 55%. Il n’y avait pas de différence statistiquement significative de l’apparition des mutations en fonction des quartiers avec $p= 0,33$

5.4 Relation entre fréquence de consommation de la Chloroquine et de mutation du gène *Pfcr* dans les quartiers

Tableau XVII : Corrélation entre fréquences de mutation associée à la chloroquino-résistance, de vente et de consommation de la Chloroquine (dans les quartiers).

	Quartier	Fréquences		
		Vente	Consommation	Mutation
	Carrière	4/4 (100%)	25/37 (67,56%)	24/35 (68,57%)
	Dalabala	2/3 (66,66%)	26/36 (72,22%)	12/15 (80%)
	Bozola	2/2 (100%)	26/30 (86,66%)	9/10 (90%)
Valeur de p			0,18	0,33 (test exact de Fisher)

Avec $p= 0,33$, Il n’existait pas de différence statistiquement significative dans la répartition des mutations entre les quartiers

Il en était de même pour la consommation de la chloroquine dans les quartiers avec $p= 0,18$

5.5 Résultats de l’étude par "Flowchart"

La figure 27 illustre le schéma expérimental de notre étude

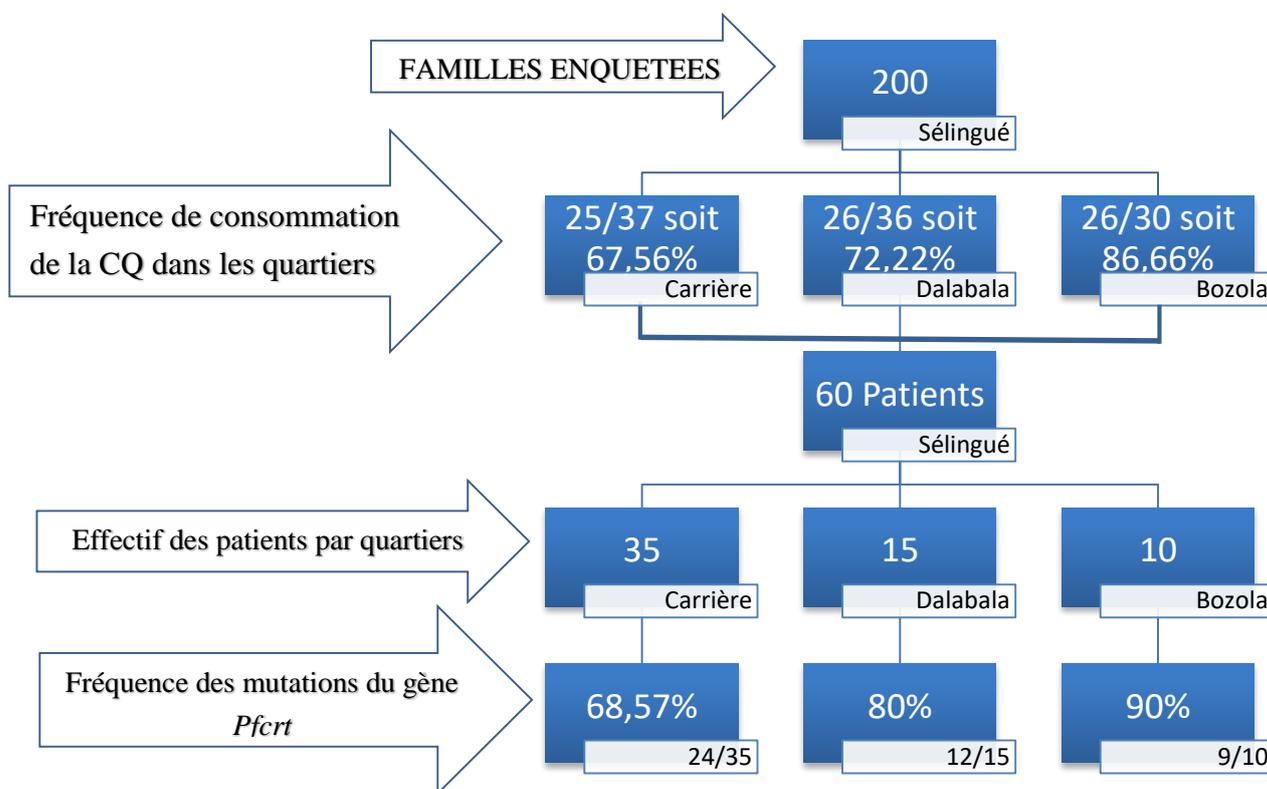


Figure 27 : Résumé des résultats de l’étude

COMMENTAIRES

ET

DISCUSSIONS

6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION

L'objectif général de notre étude était la surveillance de la résistance du *Plasmodium falciparum* à la Chloroquine à Sélingué plus précisément dans la commune de Baya.

Par conséquent nous avons fait une étude transversale à visée investigatrice qui, s'est déroulée du 17 Novembre 2016 au 16 Décembre 2016 à Sélingué.

Sélingué est une zone endémique où le paludisme sévit beaucoup et où il y a beaucoup de gîtes larvaires d'anophèle. La transmission est assurée d'une part par le barrage de Sélingué et d'autre part la pluviométrie.

Méthodologie

Nous avons pour échantillon 60 patients chez lesquels nous avons fait un prélèvement sanguin capillaire sur les papiers confettis. Le dépistage se faisait par la goutte épaisse. Nous avons fait l'extraction de l'ADN de nos échantillons avec le kit Qiagen avant de procéder aux tests moléculaires. Nous avons utilisé ce kit dans le but de pouvoir obtenir des résultats de qualité. L'utilisation de ce kit a été décrit comme comportant certains avantages, notamment l'extraction d'une quantité optimale d'ADN surtout chez les organismes intracellulaires ainsi que l'élimination des facteurs inhibiteurs de la PCR comme les sels biliaires, l'urée, l'hémoglobine et l'héparine [48].

Lors de cette étude, nous avons examiné la vente et la consommation des antipaludiques surtout de la Chloroquine de façon spécifique par enquête. Les enquêtés ont répondu à nos questions avec comme notion, qu'il s'agissait d'une enquête sur les antipaludiques. Cette approche nous a permis d'avoir des éléments de réponse à la plupart de nos questions même si la vente de la chloroquine s'avère interdite actuellement au Mali [17]. L'enquête menée lors de l'étude comportait deux volets, une partie sur la vente illicite et l'autre sur la consommation clandestine. Beaucoup d'informations recueillies avec les vendeurs ont été confirmées par les consommateurs dans les familles enquêtées. Cette approche par enquête a été utilisée dans une étude menée au Burkina Faso entre 2007 et 2008 portant sur une enquête sur les médicaments vendus dans le marché parallèle à usage antipaludique dans la ville de Ouagadougou, Burkina Faso par Sangaré et al. [49].

Pour étudier les mutations aux positions 72, 74, 75 et 76 sur le gène *Pfcr*, nous avons fait la recherche des marqueurs de résistance à la chloroquine par la fusion à haute résolution (HRM).

Le HRM est une méthode bien connue actuellement pour sa sensibilité et sa spécificité (recherche des SNPs). Certaines études sur l'étude des mutations sur le gène *Pfcr* ont utilisé la PCR-RFLP [50,51].

Dans une étude menée par **Ihle et al**, en 2014 comparant les méthodes de séquençage au HRM il est ressorti que le HRM avait la même sensibilité que le séquençage par la méthode de **Frederic Sanger** [52]. Cette technique a été utilisée dans plusieurs autres études comme celle de **Andriantsoanirina et al, 2009** [45], celle de **Daniels et al. 2012** [46] et celle de **Ashrafi et al. 2017** [47].

Nos souches de références utilisées étaient 3D7, Dd2 et 7G8. La souche 3D7 est la souche sauvage et sensible à la chloroquine tandis que les souches Dd2 et 7G8 sont des souches mutées. Ces souches ont été utilisées comme références dans beaucoup d'autres études de recherches de mutations à la position 76 du gène *Pfcr*. Les deux premières souches citées ont été utilisées dans une étude menée par **Diarra en 2015** [18]. Ces trois souches ont été utilisées par **Daniels et al. 2012** [46]. En plus de 3D7, une autre souche (W2 du Sud-Est d'Asie) a été utilisée par **Andriantsoanirina et al. 2009** [45]. Cette dernière est une souche résistante à la chloroquine.

Résultats

Après avoir mené l'enquête sur la vente illicite des antipaludiques, nous avons remarqué que la majorité des vendeurs de médicaments de la rue étaient des jeunes âgés de 20 à 40 ans avec une moyenne de 26,5 ans. Notre résultat est concordant avec ceux de beaucoup d'études dont celui d'une étude menée au Burkina Faso entre 2007 et 2008 portant sur une enquête sur les médicaments vendus dans le marché parallèle à usage antipaludique dans la ville de Ouagadougou, Burkina Faso par **Sangare et al. 2012**, où la plupart des vendeurs étaient aussi des jeunes avec la moyenne d'âge de 21,3 ans [49,53]. Plus de 47 % des vendeurs enquêtés sont non-scolarisés. Ceci pourrait expliquer le fait que ces personnes s'adonnent à cette pratique avec la vente continue et illégale de la Chloroquine. Dans une étude menée sur la problématique de la vente des médicaments au Mali à Kalaban-Coro par **Traoré en 2009**, 50% des enquêtés avaient un niveau de scolarisation se limitant au 1er cycle [53].

Notre enquête nous a permis de savoir que les vendeurs de médicaments de la rue vendent certains médicaments comme antipaludique alors qu'ils ne le sont pas, tels que le Paracétamol 500mg, l'Efferalgan 500mg, le Zebedol (Paracétamol + Diclofenac de Sodium). Aussi, les familles enquêtées nous ont confirmé l'utilisation de la chloroquine pour le traitement du paludisme. Ceci confirme la vente illicite et la consommation clandestine et continue de la chloroquine à Sélingué.

Notre étude nous a permis de savoir que les mutations ponctuelles sur le gène *Pfcr* circulent toujours à haute fréquence de nos jours à Sélingué. La position 72 s'est révélée la moins mutée avec seulement 3,3% de souches mutées. La position 76 qui est suffisamment connue pour son association à la résistance à la Chloroquine était mutée chez 75% des échantillons traités. Nos résultats sont concordants avec ceux de **Diarra** dans une étude menée en 2015 sur la prévalence de l'allèle **76T** dans la localité de Dioro au Mali [18]. La prévalence de l'allèle 76T dans notre étude était cependant légèrement plus élevée que celle d'une étude menée par **de Monbrison et al. 2003** [54] sur la sensibilité de la PCR en temps réel dans la détection des mutations ponctuelles sur les *Pfmdr1* et *Pfcr*. La prévalence des mutations à la position 76 du gène *Pfcr* est supposée diminuer avec l'abandon de l'utilisation de la chloroquine. Cette diminution de la fréquence des mutations associées à la chloroquine a diminué en Angola après l'abandon de la chloroquine [55]. Toutefois, le maintien de la circulation de l'allèle **76T** dans la localité de Sélingué est un phénomène qui a été confirmé dans une étude menée au Sénégal [56] même si cette dernière fréquence avait largement baissé par rapport à celle du Mali.

Les mutations sur les positions 74 et 75 étaient retrouvées à des fréquences élevées dans notre étude soit 55% chacune. Dans une étude menée en 2003 par **de Monbrison et al.** en France chez 161 patients venus de 16 différentes zones endémiques du paludisme principalement en **Afrique**, ils ont trouvé 54% de souches mutées aux positions 74 et 75 [54].

Nous avons obtenu 33 haplotypes CIET (soit 55%) mutés sur les 60 échantillons analysés. Cet haplotype qui est un des haplotypes typiques d'Afrique est connu pour son association à la résistance à la chloroquine [57]. Une étude similaire a été faite en Uganda en 1999 chez les enfants âgés de 06 mois à 59 mois par **Kyosiimire-Lugemwa et al.** Ils ont trouvé l'haplotype CIET chez tous les isolats de l'hôpital de Mulago à Kampala dont ils ont prélevés le sang [58]. Tous les isolats de l'étude de **Golassa et al en 2014 en Ethiopie** présentaient l'haplotype CIET muté [59]. Une autre étude similaire faite avec les isolats de Nigeria et Brésil par **Gbotosho et al.** en 2011 a trouvé pour résultats 72% de l'haplotype CIET chez les isolats de Nigeria contre 21% de CMNK, 2% de CMNT et 0% de SMNT [60]. La fréquence d'environ 55% de cet haplotype dans la localité de Sélingué suggère que la Chloroquine est encore consommée dans cette localité.

Deux 02 haplotypes SMNT mutés (soit 3,3%) ont été obtenus lors de cette étude. Cet haplotype qui est typique de l'Asie du Sud-Est et l'Amérique du Sud [61] a aussi été retrouvée à hauteur de 19% en Tanzanie dans une étude menée par **Alifrangis et al. 2004** [62].

Cet haplotype est aussi lié à la résistance à l'amodiaquine [22,63]. Les haplotypes CIET et SMNT retrouvés à Sélingué pourront être dus à la consommation clandestine et continue de la chloroquine par la communauté.

CONCLUSION

ET

RECOMMENDATIONS

7 CONCLUSION ET RECOMMANDATION

7.1 Conclusion

L'objectif de notre étude était d'estimer la prévalence des mutations associées à la chloroquino-résistance et les facteurs qui contribuent au maintien de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine. Malgré l'abandon de la chloroquine par le Ministère de la Santé pour le traitement du paludisme simple en 2006, nous avons trouvé une forte prévalence (75%) des haplotypes mutés de *Pfcr* associés à la résistance à la chloroquine à Sélingué. Certes, nous n'avons pas examiné la position 350 du gène *Pfcr* où la cystéine (C) pourrait être remplacée par l'arginine (R) mais pensons que les positions déterminantes du maintien de l'allèle 76T sont les positions 72, 74, 75 et 76 du gène *Pfcr*. Ceci témoigne que l'allèle 76T était bien établi au Mali. Il faudra noter que l'haplotype résistant SMNT typique de l'Amérique du Sud a été retrouvé à Sélingué avec une prévalence de 3,3%. Nos investigations ont permis de mettre en évidence la vente illicite et la consommation clandestine de la chloroquine à Sélingué et ceci pourrait expliquer la circulation des souches portant les mutations du gène *Pfcr* dans cette localité. Pour appuyer notre étude, des investigations doivent être menées à Dioro et à Bamako où les prévalences des mutations sont respectivement 49% et 56,89%.

7.2 Recommandations

- ✓ Au ministère de la santé à travers le PNLP de renforcer:
 - Contrôle de l'importation et la vente illicite des médicaments en particulier la CQ
 - Sensibilisation de la population sur les dangers liés à la consommation des médicaments retirés sur le marché
- ✓ Au LBMA de mener
 - Investigations à Dioro et à Bamako où les prévalences des mutations sont respectivement 49% et 56,89%.
 - Etudes sur les autres facteurs qui pourront contribuer au maintien des souches CQR en incluant la position 350 du gène *Pfcr*
- ✓ A la population de suivre:

Recommandations du MSHP (ne pas utiliser les médicaments déconseillés)

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS. Fiches modèles OMS d'information à l'usage des prescripteurs: Médicaments utilisés en parasitologie - Deuxième édition: Protozoaires: Paludisme. Deuxième édition. 1997 [cité 21 mars 2017]; Disponible sur: <http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Jh2923f/2.5.html>
2. OMS | 10 faits sur le paludisme. WHO [Internet]. Déc. 2016 [cité 29 mai 2017]; Disponible sur: <http://www.who.int/features/factfiles/malaria/fr/>
3. OMS. Paludisme [Internet]. 2017 Avril [cité 3 mai 2017]. Report No.: 94. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/fr/>
4. Mark Travassos, MD, MSC, Miriam K Laufer, MD, MPH. Antimalarial drugs: An overview. [Cité 14 mai 2018]; Disponible sur: http://freeuptodate.scientificjournals4all.com/contents/mobipreview.htm?20/20/20809?source=see_link&anchor=H13
5. Yaya S. Le paludisme: Repères historiques, climatiques et anthropiques. En 2013 [cité 8 sept 2017]. p. De 15 à la page 52. Disponible sur: http://www.ruor.uottawa.ca/bitstream/10393/24125/3/Yaya_Sanni_2013_Le_paludisme_re_p%C3%A8res_historiques_climatiques_et_anthropiques.pdf
6. Misbahi H. Paludisme: mode d'action de la chloroquine et mécanisme de la chloroquinorésistance. J Pharm Clin [Internet]. 2013 [cité 11 juill. 2017];32(3):143–153. Disponible sur: http://www.jle.com/fr/revues/jpc/e-docs/paludisme_mode_daction_de_la_chloroquine_et_mecanisme_de_la_chloroquinoresistance_298082/article.phtml
7. Andrea Ecker, Adele M., Lehane, Jérôme Clain, David A. Fidock. PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. nov 2012 [cité 11 mars 2018]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23020971>
8. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. Lancet Infect Dis [Internet]. juin 2004 [cité 23 mai 2018];4(6):327-36. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309904010436>
9. Pierre Aubry, Bernard-Alex Gaüzère. Paludisme Actualités 2017 [Internet]. 2017^e éd. Centre René Labusquière, Institut de Médecine Tropicale, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux (France): Médecine Tropicale (diplôme de médecine tropicale des pays de l'océan indien); 2017 [cité 28 mars 2018]. Disponible sur: <http://medecinetropicale.free.fr/cours/paludisme.pdf>
10. Pradines B, Dormoi J, Briolant S, Bogreau H, Rogier C. La résistance aux antipaludiques. Rev Francoph Lab [Internet]. 2010 [cité 4 sept 2017];2010(422):51–62. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773035X10705104>
11. Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Oduola AM, Martin SK, Milhous WK, Schlesinger PH. Efflux of chloroquine from Plasmodium falciparum: mechanism of chloroquine resistance. Science [Internet]. 1987;238(4831):1283–1285. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3317830>

12. Ménard D, Arieu F, Mercereau-Puijalon O. Étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (RIIP-Palu). médecine/sciences [Internet]. 1 juin 2013 [cité 21 sept 2017];29(6-7):647-55. Disponible sur: <http://dx.doi.org/10.1051/medsci/2013296020>
13. Tinto H, Guekoun L, Zongo I, Guiguemdé RT, D'Alessandro U, Ouédraogo JB. Chloroquine-resistance molecular markers (Pfcrt T76 and Pfmdr-1 Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. Trop Med Int Health [Internet]. 1 févr. 2008;13(2):238-40. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3156.2007.01995.x>
14. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. Mol Cell [Internet]. Oct. 2000;6(4):861-71. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2944663/>
15. Gaye O, Babou I, Faye O, Fall A, Molez JF, Bah IB, Diallo S. [Malaria morbidity and therapeutic efficacy of antimalarials. Study conducted in the Dakar region]. Med Trop Rev Corps Sante Colon [Internet]. déc 1993;53(4):479-85. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8139436>
16. O. Faye, M. Fall, O. Gaye, I.B. Bah, T. Dieng, Y. Dieng, O. Ndir, S. Diallo. Impact de l'accessibilité aux antipaludéens sur la morbidité palustre et la chloroquino-résistance. Etude menée à Touba (Sénégal). juin 1997 [cité 6 juin 2018]; Disponible sur: <http://www.patexo.fr/documents/articles-bull/T90-5-1838.pdf>
17. Ministère de la Santé du Mali. Circulaire 06-1774 Retrait de la Chloroquine de l'arsenal thérapeutique du Mali [Internet]. 2006 [cité 13 mai 2018]. Disponible sur: http://mail.cnom.sante.gov.ml/index.php?view=article&catid=61&id=320%3Acirculaire-06-1774-retrait-de-la-chloroquinetxt&format=pdf&option=com_content&Itemid=87
18. Diarra Y. Etude d'efficacité des antipaludiques : cas de l'artemether-lumefantrine et la chloroquine dans la commune rurale de Dioro [Internet]. [Bamako]: USTTB/Faculté de Pharmacie; 2016 [cité 17 nov 2016]. Disponible sur: www.kenya.net/fmpos/theses/2016/pharma/pdf/16P05.pdf
19. Gentilini M. Médecine tropicale [Internet]. Paris: Médecine sciences publications; 2012. Disponible sur: <https://www.lavoisier.fr/livre/medecine/medecine-tropicale-6e-ed/gentilini/descriptif-9782257203960>
20. D Filisetti, L Monassier. Les antipaludéens [Internet]. janvier 2012. Faculté de Médecine de Strasbourg: Dr D Filisetti & Pr L Monassier; 2012 [cité 1 mai 2018]. Disponible sur: http://udsmed.u-strasbg.fr/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco_Chap16-Antipaludeens_2012.pdf
21. Les zones impaludées : Le paludisme - Routard.com [Internet]. [Cité 28 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.routard.com/dossier-pratique-sur-le-voyage/cid135755-paludisme-voyage-tropique.html?page=3>
22. Khalid Beshir, Colin J. Sutherland, Ioannis Merinopoulos, Toby Leslie, Mark Rowland, Rachel L. Hallett. Amodiaquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria in Afghanistan Is Associated with the pfcrt SVMNT Allele at Codons 72 to 76. 3 juin 2010 [cité 12 mars 2018];54(9). Disponible sur: <http://aac.asm.org>

23. Organisation mondiale de la Santé 2017. RAPPORT SUR LE PALUDISME DANS LE MONDE 2016 RÉSUMÉ [Internet]. 2017 [cité 6 sept 2017]. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254913/1/WHO-HTM-GMP-2017.4-fre.pdf>
24. Koita OA, Sangaré L, Sango HA, Dao S, Keita N, Maiga M, Mounkoro M, Fané Z, Maiga AS, Traoré K, Diallo A, Krogstad DJ. Effect of Seasonality and Ecological Factors on the Prevalence of the Four Malaria Parasite Species in Northern Mali. J Trop Med [Internet]. 14 mars 2012 [cité 3 mai 2017];2012:e367160. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/367160/abs/>
25. Afrique - Malaria (prévalence 2015) • Carte • PopulationData.net [Internet]. [Cité 15 déc. 2017]. Disponible sur: <https://www.populationdata.net/cartes/afrique-malaria-prevalence-2015/>
26. Doumbo O. Epidémiologie du paludisme au Mali: étude de la chloroquino-résistance, essai de stratégie de contrôle basée sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associée au traitement systématique des accès fébriles [Internet]. [1970-2014, France]: Université des sciences et techniques de Montpellier 2; 1992. Disponible sur: www.theses.fr/1992MON20039
27. Severe Malaria Observatory. Paludisme Mali [Internet]. Severe Malaria Observatory. 2017 [Cité 8 sept 2017]. Disponible sur: <https://www.severemalaria.org/countries/mali>
28. Le Bras J, J.C Doury, P. Ringwald. Chimiosensibilité du paludisme d'importation a plasmodium falciparum en France en 1995: Place de la chloroquine et du Proganil. Médecine d'Afrique Noire [Internet]. 1996 [cité 1 juin 2018];43(12). Disponible sur: www.santetropicale.com/Resume/124312.pdf
29. J. Le Bras, Doury J.C, P. Ringwald. Actualisation des recommandations en matière de prophylaxie du paludisme pour les voyageurs. Juin 1990 [cité 2 juin 2018]; Disponible sur: http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/1990/9025/beh_25_1990.pdf
30. Jean Mouchet, Pierre Carnevale, Marc Coosemans, Didier Fontenille, Charles Ravaonjanahary, Alain Richard, et al. Typologie du paludisme en Afrique. [Cité 30 avr. 2018]; Disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_33-34/39002.pdf
31. Institut de Recherche pour le Développement IRD. Vaincre le paludisme (3) Les systèmes vectoriels. [Cité 30 avr. 2018]; Disponible sur: http://www.suds-en-ligne.ird.fr/paludisme/pdf/3-systemes_vectoriels.pdf
32. Y. T. Touré. Étude de la sensibilité d'Anopheles funestus et d'Anopheles gambiae sensu lato aux insecticides dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali [Internet]. [Cité 30 avr. 2018]. Disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/cahiers/entomo/02302.pdf
33. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie, (ANOFEL). cours.pdf [Internet]. 2014^e éd. 2014 [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf>
34. Julien Bonneville, Charles Defrance, Thomas Miklaveç, Sanisphère [France]. Guide pratique de lutte contre le paludisme en entreprise. Janv. 2007 [cité 30 avr. 2018];

- Disponible sur: <https://www.business-humanrights.org/fr/pdf-guide-pratique-de-lutte-contre-le-paludisme-en-entreprise>
35. Prevention C-C for DC and. CDC - Malaria - About Malaria - Biology [Internet]. [Cité 15 déc. 2017]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>
 36. parasitologie A française des professeurs de. Parasitologie, mycologie [Internet]. Format utile; 1995 [cité 1 mai 2018]. Disponible sur: [https://babordplus.u-bordeaux.fr/notice.php?q=id_origine:\(190010\)&fq=id_source:\(1\)](https://babordplus.u-bordeaux.fr/notice.php?q=id_origine:(190010)&fq=id_source:(1))
 37. OMS | Traitement du paludisme - tour d'horizon [Internet]. WHO. 2016 [cité 29 avr. 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/fr/>
 38. Fitch CD, Dutta P, Kanjanangulpan P, Chevli R. Ferriprotoporphyrin IX: a mediator of the antimalarial action of oxidants and 4-aminoquinoline drugs. *Prog Clin Biol Res* [Internet]. 1984;155:119-30. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6382310>
 39. Fitch CD. Ferriprotoporphyrin IX: role in chloroquine susceptibility and resistance in malaria. *Prog Clin Biol Res* [Internet]. 1989;313:45-52. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2675116>
 40. Le Bras J. Mécanismes et dynamique des chimiorésistances de *Plasmodium falciparum*. *Bull Société Pathol Exot* [Internet]. 1999 [cité 6 nov. 2018];92(4):236–241. Disponible sur: <http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/T92-4-GMI-3.pdf>
 41. Sidhu ABS, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites Conferred by pfcrt Mutations. *Science* [Internet]. 4 oct. 2002;298(5591):210-3. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2954758/>
 42. Bray PG, Martin RE, Tilley L, Ward SA, Kirk K, Fidock DA. Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol Microbiol* [Internet]. 56(2):323-33. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2005.04556.x>
 43. Awasthi G, Das A, Awasthi G, Das A. Genetics of chloroquine-resistant malaria: a haplotypic view. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. Déc. 2013 [cité 28 mai 2018];108(8):947-61. Disponible sur: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0074-02762013000800947&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 44. Institut Géographique du Mali. Localisation de Sélingué sur la carte du Mali [Internet]. Mai 2018. Institut Géographique du Mali; Institut Géographique du Mali; Disponible sur: www.igm-mali.ml/
 45. Andriantsoanirina V, Lascombes V, Ratsimbaoa A, Bouchier C, Hoffman J, Tichit M, et al. Rapid detection of point mutations in *Plasmodium falciparum* genes associated with antimalarial drugs resistance by using High-Resolution Melting analysis. *J Microbiol Methods* [Internet]. août 2009 [cité 19 nov. 2017];78(2):165-70. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701209001535>
 46. Rachel Daniels, Papa Diogoye Sène, Mikeal Wall, Jason McKinney, Daouda Ndiaye, Pardis Sabeti, et al. Genotyping drug resistance markers in *Plasmodium falciparum* Application of refined methods of High Resolution Melting Analysis to a human malaria

- pathogen. Juin 2012; Disponible sur: <http://biofiredefense.com/media/Genotyping-drug-resistance-markers-in-Plasmodium-falciparum-2011Pstr.pdf>
47. Ashrafi R, Bruneaux M, Sundberg L-R, Pulkkinen K, Ketola T. Application of high resolution melting assay (HRM) to study temperature-dependent intraspecific competition in a pathogenic bacterium. *Sci Rep* [Internet]. 20 avr. 2017;7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5430548/>
 48. Menu E, Mary C, Toga I, Raoult D, Ranque S, Bittar F. Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples. *BMC Res Notes* [Internet]. Déc. 2018 [cité 29 mai 2018];11(1). Disponible sur: <https://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-018-3300-2>
 49. Ibrahim Sangare, S. BAMBANA, R. NOSSAMBA–DIOUMANDE R, A. ZIDA, B. SONDO, TR GUIGUEMDE. Enquête sur les médicaments vendus dans le marché parallèle à usage antipaludique dans la ville de Ouagadougou, Burkina Faso. *Médecine D’Afrique Noire* [Internet]. 2012;59(4). Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/280443918_Enquete_sur_les_medicaments_vendus_dans_le_marche_parallele_a_usage_antipaludique_dans_la_ville_de_Ouagadougou_Burkina_Faso
 50. Antony HA, Das S, Parija SC, Padhi S. Sequence analysis of *pfprt* and *pfmdr1* genes and its association with chloroquine resistance in Southeast Indian *Plasmodium falciparum* isolates. *Genomics Data* [Internet]. 18 avr. 2016;8:85-90. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4856815/>
 51. Veiga M, Ferreira P, Björkman A, Gil J. Multiplex PCR-RFLP methods for *pfprt*, *pfmdr1* and *pfdhfr* mutations in *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Probes* [Internet]. 1 mai 2006;20:100-4. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/7313192_Multiplex_PCR-RFLP_methods_for_pfprt_pfmdr1_and_pfdhfr_mutations_in_Plasmodium_falciparum
 52. Michaela Angelika Ihle, Jana Fassunke, Katharina König, Inga Grünewald, Max Schlaak, Nicole Kreuzberg, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer* [Internet]. 10 janv. 2014;14:13. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-13>
 53. Traoré MD. Problématique de la vente des médicaments au Mali. Cas de la Commune périphérique de Kalaban-Coro. 2010 [cité 29 mai 2018]; Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2010/pharma/pdf/10P57.pdf>
 54. de Monbrison F, Raynaud D, Latour-Fondanaïche C, Staal A, Favre S, Kaiser K, et al. Real-time PCR for chloroquine sensitivity assay and for *pfmdr1*–*pfprt* single nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *J Microbiol Methods* [Internet]. Sept. 2003 [cité 1 mai 2018];54(3):391-401. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701203000861>
 55. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam G, A R, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimé AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV. Reemergence of Chloroquine-Sensitive *Plasmodium falciparum* Malaria after Cessation of Chloroquine Use in Malawi. *J Infect Dis* [Internet]. 15 juin 2003 [cité 26 mai 2018];187(12):1870-5. Disponible sur: <https://academic.oup.com/jid/article/187/12/1870/2191300>

56. Boussaroque A, Fall B, Madamet M, Wade KA, Fall M, Nakoulima A, et al. Prevalence of anti-malarial resistance genes in Dakar, Senegal from 2013 to 2014. *Malar J* [Internet]. Déc. 2016 [cité 28 mai 2018];15(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-016-1379-2>
57. Zhou R, Zhang H, Yang C, Liu Y, Zhao Y, Li S, et al. Molecular mutation profile of pfert in *Plasmodium falciparum* isolates imported from Africa in Henan province. *Malar J* [Internet]. Déc. 2016 [cité 26 mai 2018];15(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-016-1306-6>
58. Kyosiimire-Lugemwa J. The Lys-76-Thr mutation in PfCRT and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda. [Cité 20 avr. 2018]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11926004#>
59. Golassa L, Enweji N, Erko B, Aseffa A, Swedberg G. High prevalence of pfert-CVIET haplotype in isolates from asymptomatic and symptomatic patients in south-central Oromia, Ethiopia. *Malar J* [Internet]. 27 mars 2014 [cité 4 mai 2018];13(1):120. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1475-2875-13-120>
60. Grace O, Gbotosho, Onikepe A, Folarin, Carolina Bustamante, Luis Hildebrando Pereira da Silva, Elieth Mesquita, Akintunde Sowunmi, Mariano G. Zalis, Ayoade M. J. Oduola, Christian T. Happi. Short Report: Different Patterns of pfert and pfmdr1 Polymorphisms in *P. falciparum* Isolates from Nigeria and Brazil: The Potential Role of Antimalarial Drug Selection Pressure. 28 août 2011;
61. Sa JM, Twu O, Hayton K, Reyes S, Fay MP, Ringwald P, et al. Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 10 nov. 2009;106(45):18883-9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2771746/>
62. Alifrangis M, Dalgaard MB, Lusingu JP, Vestergaard LS, Staalsoe T, Jensen ATR, Enevold A, Rønn AM, Khalil IF, Warhurst DC, Lemnge MM, Theander TG, Bygbjerg IC. Occurrence of the Southeast Asian/South American SVMNT haplotype of the chloroquine-resistance transporter gene in *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *J Infect Dis* [Internet]. 15 juin 2006;193(12):1738-41. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16703518>
63. Sa JM, Twu O. Protecting the malaria drug arsenal: halting the rise and spread of amodiaquine resistance by monitoring the PfCRT SVMNT type. *Malar J* [Internet]. 2010 [cité 25 mai 2018];9(1):374. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-9-374>

ANNEXES

Annexe**Annexe I** : Fiche d'enquêtes Vendeurs**Fiche d'enquête N°2****Site d'enquête :**

1. Numéro du vendeur du médicament: -
-----/.
2. Date de rencontre: -----/-----
--/-----/.
3. Type de vendeur : Ambulant ;
Tablier ; Boutique
4. Age: -----. Sexe :
M= Masculin, F=Féminin.
5. Nationalité: -----
-----.
6. Provenance: -----

-----.
7. Niveau scolaire: Illettré ;
Lettré ; Coranique ; Primaire
; Secondaire ; Supérieur .
8. Situation matrimoniale: 1=Marié,
2=Célibataire, 3= Divorcé, 4= Veuf.
9. Statut du vendeur: Indépendant;
Employé.
10. Formation spécifique : 1=Oui
2=Non.
Si oui, nature de la formation: -----

-----.
11. Connaissez-vous les médicaments que
vous vendez? 1=Oui 2=Non.
12. Motivation du choix du métier:
1=Vocation 2=Hasard 3=Contexte
relationnel.

13. Satisfaction du client selon le vendeur:

1=Oui 2=Non 3=Ne sait pas.

14. Catégorie socioprofessionnelle des

clients (Cocher les professions
rencontrées): Agriculteurs ;
Artisans ; Commerçants ;
Ouvriers ; Elèves et étudiants ;
Chômeurs ;
Fonctionnaires ; Ménagères ;
Revendeurs ; Autres .

**15. Nombre d'heures d'activités de vente
dans la journée : .****16. Nombre moyen de clients par jour:
.****17. Entrave rencontrée dans l'exercice de
la vente: Oui ; Non .**

Si oui, par qui: La police ; L'ordre
des pharmaciens ;

Les grossistes ; Les concurrents
.

Autres à préciser-----

-----.

**18. Avez-vous reçu des sanctions dans
votre activité? Oui ; Non .**

Si oui, quel type de sanction: Amende
 ; Demande de patente ;
Confiscation ; Brutalité .

Autres à préciser-----

-----.

19. Opinion sur l'intérêt de réglementer la vente des médicaments hors pharmacies:

Il faudrait laisser inchanger ; Il faudrait codifier ;

Il faudrait interdire ce type de vente ; N'a pas d'opinion .

20. Opinion sur l'opportunité d'une formation minimum pour les vendeurs:

Cela devrait être obligatoire . Cela serait utile, mais pas obligatoire .

Cela serait inutile . N'a pas d'opinion .

21. Mode habituel du choix du produit vendu:

Le client demande d'emblée un produit précis .

Le client décrit les symptômes et le vendeur identifie le(s) produit(s) approprié(s) .

Autres à préciser -----

-----.

22. Les maladies les plus fréquemment traitées.

Fièvre et Paludisme ; Maux de tête ; Fatigue ; Maux de ventre ; Jaunisse ; Autres maladies (à préciser) -----

-----.

23. Estimez-vous compétant pour la vente de médicaments ? Oui , Non , Ne sait pas .

24. Remarques -----

-----.

Annexe II : Fiche d'enquête Familles

Fiche d'enquête N° 1

Site d'enquête :

Numéro de l'individu: -----/.

Date de rencontre: -----/-----/-----
-----/.

Rang de l'individu dans la famille : Père ;
Mère ; Fils ; Célibataire .

25. Age: -----, Sexe :
M=Masculin, F=Féminin.

26. Nationalité: -----
-----.

27. Provenance: -----
-----.

28. Niveau scolaire: Illettré ; Lettré ;
Coranique ; Primaire ; Secondaire ;
Supérieur .

29. Situation matrimoniale: 1=Marié,
2=Célibataire, 3= Divorcé, 4= Veuf.

30. Avez-vous des enfants? Oui ;
Non .
Si oui combien? .

31. Quelle est votre activité actuelle?
(plusieurs réponses possibles)
Travail à temps partiel; Travail à
temps complet; A la recherche d'un
emploi; Etudiant ; Elève ou
stagiaire ; A la retraite ;
Femme au foyer ; Autres : -----

32. Quelle est ou quelle a été votre dernière
profession? (Le plus précisément

possible) Agriculteur ; Artisan ;
Commerçant ;
Ouvrier ; Elève et étudiant ;
Chômeur ;
Fonctionnaire ; Ménagère ;
Autre . Préciser-----

--

33. Quel est votre dernier diplôme obtenu?
(plusieurs réponses possibles)
DEF / CAP ; Baccalauréat ; BTS
; DUT ; Diplôme d'état (santé,
sociale) ; Licence; Master ;
Doctorat ; Autres . Préciser-----

-----.

34. Type d'habitat : Pailles; Tôle ;
Banco .
Commentaire : -----

35. Nombre de chambres dans la famille:
.

36. Nombre de personnes dormant dans une
chambre: .

37. Nombre d'enfants parmi ceux qui dorment dans une chambre|___|.

38. Utilisation de la moustiquaire: Oui |___|
Non |___|.

Si oui

1) Imprégnée |___| Non
imprégnée|___|.

2) Durée d'utilisation de la
moustiquaire |___|
Mois |___|Ans.

3) Votre moustiquaire a-t-elle été
lavée? Oui |___| ; Non|___|.

Si oui, combien de fois a-t-elle
été lavée? 1 fois |___|; 2 fois |___|;
3 fois |___|; Plus de 3 fois |___|.

4) Durée d'intervalle entre les
lavages : |___| Mois;
|___|Ans.

39. Vos enfants dorment-ils sous
moustiquaire? Oui |___|; Non|___|.

Si oui, combien d'enfants dorment sous
moustiquaire?

1 enfant |___|; 2 enfants |___|; Tous les
enfants |___|.

40. Connaissez-vous le paludisme? Oui |___|;
Non |___|.

Si oui, comment se transmet-il?
Nourriture |___| -----
----- Pluie|___|; Moustique |___|.

41. Peut-on se protéger contre le paludisme?
Oui |___|; Non |___|.

Si oui, comment?

Ne pas manger gras |___|; Eviter la pluie
|___|; Dormir sous moustiquaire|___|.
Autres |___| Préciser-----

42. Connaissez-vous la chloroquine? Oui
|___| ; Non |___|.

Si oui est-elle un médicament efficace
pour traiter le paludisme?

Oui |___| ; Non |___|.

Annexe III : Liste des zones de Chloroquino-résistance[21]

La chloroquino-résistance est définie comme l'aptitude d'une souche de *Plasmodium falciparum* à continuer son développement malgré l'administration et l'absorption de la chloroquine employée aux doses thérapeutiques recommandées.

✓ **Pays du groupe I** : Pas de chloroquino-résistance❖ **Afrique**

- Cap-Vert

❖ **Amériques**

- Venezuela (sauf Amazonie)

- Haïti

- Pérou (sauf Amazonie)

- Costa Rica

- Équateur (Ouest)

- Salvador

- Bolivie (sauf Amazonie)

- Honduras

- Argentine (Nord-Ouest)

- Mexique (Yucatan)

- Paraguay (Est)

- Nicaragua

- République dominicaine

- Panama (Ouest)

- Guatemala

- Jamaïque (Kingston)

- Belize

❖ **Asie**

-Chine (Nord-Est)

-Tadjikistan

❖ **Moyen-Orient**

- Irak

- Iran (sauf sud-est)

- Yémen (Socotra)

✓ **Pays du groupe II** : Existence de chloroquino-résistance❖ **Afrique**

- Madagascar

❖ **Amériques**

- Colombie (sauf Amazonie)

❖ **Asie**

- Inde (sauf Assam)
- Népal (Terai)
- Sri Lanka
- Iles Salomon
- Tadjikistan

✓ **Pays du groupe III** : Existence de chloroquino-résistance et risque de multi-résistance❖ **Afrique**

- Afrique du Sud (Nord-Est)
- Angola
- Bénin
- Botswana
- Burkina Faso
- Burundi
- Cameroun
- Comores
- Congo
- Côte d'Ivoire
- Djibouti
- Erythrée
- Ethiopie
- Gabon
- Gambie
- Ghana
- Guinée
- Guinée-Bissau
- Guinée équatoriale
- Kenya
- Liberia
- Malawi
- Mali
- Mauritanie
- Mayotte
- Mozambique
- Namibie
- Niger
- Nigeria
- Ouganda
- République centrafricaine
- Rwanda
- Sao Tome-et-Principe
- Sénégal
- Sierra Leone
- Somalie
- Soudan
- Swaziland
- Tanzanie
- Tchad
- Togo
- Zambie
- Zimbabwe

❖ **Amériques**

- Bolivie (Amazonie)
- Brésil (Amazonie)
- Colombie (Amazonie)
- Equateur (Amazonie)
- Guyana
- Guyane française (fleuves)
- Panama (Est)
- Pérou (Amazonie)
- Surinam
- Venezuela (Amazonie)

❖ **Asie et Océanie**

- Afghanistan
- Bangladesh (sauf Dacca)
- Bhoutan
- Cambodge
- Laos
- Chine (Yunnan et Hainan)
- Inde (Etats du Nord-Est)
- Indonésie (sauf Bali)
- Malaisie (sauf zones urbaines et côtières)
- Myanmar (Birmanie)

- Pakistan
- Papouasie-Nouvelle-Guinée
- Philippines
- Salomon (îles)
- Thaïlande (parties frontalières avec Cambodge, Laos, Myanmar et Malaisie)
- Timor oriental
- Vietnam (sauf bande côtière et deltas)
- Vanuatu

❖ **Moyen-Orient**

- Arabie Saoudite (Sud et Ouest)
- Iran (Sud-Est)
- ❖ - Yémen (sauf Socotra)

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : Diallo

Prénom : Salimata

Téléphone : 00223 64 21 18 42

Email : sallyadeline1@gmail.com

Titre de la thèse : Surveillance de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la Chloroquine, Sélingué

Nationalité : Malienne

Année universitaire : 2017-2018

Ville de soutenance : Bamako-Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie (FAPH)

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

Résumé

Malgré les efforts et les moyens déployés pour la lutte contre le paludisme, cette maladie continue à faire des ravages dans le monde surtout en Afrique (90% de cas de paludisme et 92% de décès lié au paludisme sont survenus de l'Afrique selon l'OMS).

Selon les dernières estimations de l'OMS en Décembre 2016 près de la moitié de la population mondiale est exposée au risque du paludisme : en 2015, l'OMS a enregistré environ 212 millions de cas de paludisme.

Au mali, les enfants de moins de 05 ans et les femmes enceintes sont les plus touchés.

De plus le *Plasmodium falciparum* devient résistant à la chloroquine qui était utilisée dans le traitement préventif et curatif du paludisme.

Par sa résistance, elle a été retirée du marché malien depuis 2006. Malgré ce retrait le marqueur de résistance à la chloroquine continu d'apparaître à haute fréquence.

Nous avons fait une étude de surveillance de cette résistance à Sélingué du 17 Novembre 2016 au 16 Décembre 2016 dans le cadre du projet PMI pour savoir si la chloroquine est toujours

consommée clandestinement ou si cette résistance est liée à d'autres molécules de la même famille que la chloroquine.

Nous avons choisi 60 patients pour cette étude tous âgés de 06mois à 59mois.

La plupart de ces patients avait des souches qui circulent avec le marqueur de résistance à la chloroquine. La température de fusion associée aux mutations sur le gène *Pfcr*t nous a permis de détecter **55%** de CIET mutés ; **25%** de CMNK sensibles; **16,7%** de CMNK/CIET mixtes et **3,3%** de SMNT mutés.

Nous avons enquêté 200 familles et 21 vendeurs à Sélingué

Parmi les 200 familles, 146 (soit 73%) utilisaient encore la chloroquine.

Parmi les 21 vendeurs, 16 (soit 76,2%) avaient de la chloroquine à vendre.

Mots clés : Paludisme ; antipaludiques ; chloroquine ; amino-quinoléines ; PCR ; HRM ; *Pfcr*t.

IDENTIFICATION SHEET

Last name: Diallo

First name: Salimata

Tel: 00223 64 21 18 42

Title: Surveillance of *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine in Sélingué

Academic year: 2017-2018

City of defense: Bamako-Mali

Place of deposit: Library of Faculty of Pharmacy

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

Abstract

Despite the efforts and the means deployed for the fight against malaria, this disease continues to wreak havoc around the world, especially in Africa (90% of malaria cases and 92% of malaria-related deaths occurred in Africa according the WHO).

According to the latest WHO estimates in December 2016, nearly half of the world's population is at risk of malaria: in 2015, WHO registered about 212 million cases of malaria.

In Mali, children under 5 years and pregnant women are the most affected.

In addition, *Plasmodium falciparum* becomes resistant to chloroquine which was used in preventive and curative treatment of malaria.

By its resistance it has been withdrawn from the Malian market since 2006. Despite this withdrawal the chloroquine resistance marker continues to appear at high frequency.

We did a surveillance study of this resistance in Sélingué from November 17, 2016 to December 16, 2016 in the framework of the PMI project to know if chloroquine is still eaten clandestinely or if this resistance is linked to other molecules of the same family as chloroquine.

We chose 60 patients for this study, all from 06 months to 59 months.

Most of these patients had strains that circulate with chloroquine resistance marker. The melting temperature associated with the mutations on *Pfcr* gene allowed us to detect **55%** of CIET mutated; **25%** of CMNK sensitives; **16,7%** of CMNK/CIET mixtes and **3,3%** of SMNT mutated.

We surveyed 200 families and 21 vendors in Sélingué.

Of the 200 families 146 (73%) still used chloroquine.

Of the 21 sellers, 16 (76.2%) had chloroquine for sale.

Keywords: Malaria ; antimalarial ; Chloroquine ; amino-quinolines ; PCR ; HRM ; *Pfcr*.

SERMENT DE GALIEN



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

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

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

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

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

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

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

Je le jure

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : Diallo

Prénom : Salimata

Téléphone : 00223 64 21 18 42

Email : sallyadeline1@gmail.com

Titre de la thèse : Surveillance de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la Chloroquine, Sélingué

Nationalité : Malienne

Année universitaire : 2017-2018

Ville de soutenance : Bamako-Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie (FAPH)

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



Résumé

Malgré les efforts et les moyens déployés pour la lutte contre le paludisme, cette maladie continue à faire des ravages dans le monde surtout en Afrique (90% de cas de paludisme et 92% de décès lié au paludisme sont survenus de l'Afrique selon l'OMS. Selon les dernières estimations de l'OMS en Décembre 2016 près de la moitié de la population mondiale est exposée au risque du paludisme : en 2015, l'OMS a enregistré environ 212 millions de cas de paludisme. Au mali, les enfants de moins de 05 ans et les femmes enceintes sont les plus touchés.

De plus le *Plasmodium falciparum* devient résistant à la chloroquine qui était utilisée dans le traitement préventif et curatif du paludisme. Par sa résistance, elle a été retirée du marché malien depuis 2006. Malgré ce retrait le marqueur de résistance à la chloroquine continu d'apparaître à haute fréquence.

Nous avons fait une étude de surveillance de cette résistance à Sélingué du 17 Novembre 2016 au 16 Décembre 2016 dans le cadre du projet PMI pour savoir si la chloroquine est toujours consommée clandestinement ou si cette résistance est liée à d'autres molécules de la même famille que la chloroquine. Nous avons choisi 60 patients pour cette étude tous âgés de 06mois à 59mois.

La plupart de ces patients avait des souches qui circulent avec le marqueur de résistance à la chloroquine. La température de fusion associée aux mutations sur le gène *Pfprt* nous a permis de détecter **55%** de CIET mutés ; **25%** de CMNK sensibles; **16,7%** de CMNK/CIET mixtes et **3,3%** de SMNT mutés.

Nous avons enquêté 200 familles et 21 vendeurs à Sélingué. Parmi les 200 familles, 146 (soit 73%) utilisaient encore la chloroquine. Parmi les 21 vendeurs, 16 (soit 76,2%) avaient de la chloroquine à vendre.

Mots clés : Paludisme ; antipaludiques ; chloroquine ; amino-quinoléines ; PCR ; HRM ; *Pfprt*.