

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple-Un But-Une Foi

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018

N° _____ /

Prévalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* dans les localités de Missira et Sélingué au Mali en 2017

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 02/07/2018 devant la faculté
de Pharmacie pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)

Par

M. Nouhoum THIAM

JURY

Président du jury : Professeur Ababacar I. MAIGA

Membres : Professeur Moctar DIALLO

Monsieur Ibrahim KEITA

Co-directeur de thèse : Docteur Youssouf DIARRA

Directeur de thèse : Professeur Ousmane KOITA

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

M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Boulkassoum	HADARA	Législation
M. Moussa	Feu HARAMA	Chimie Organique (décédé)
M. Gaoussou	KANOUE	Chimie Analytique
M. Alou A.	KEÏTA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Bréhima	KOUMARE	Bactériologie et Virologie
M. Abdrahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie /Parasitologie
M. Alassane	DICKO	Santé Publique
M. Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

M. Flabou	BOUGOUDOOGO	Bactériologie-Virologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
M. Abdoulaye	DJIMDE	Bactériologie-Virologie
M. Akory Ag	IKNANE	Santé Publique-Nutrition
M. Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie chef de DER
M. Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé Environnement

MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

M. Charles	ARAMA	Immunologie
M. Seydina S.A.	DIAKITE	Immunologie
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
M. Kassoum	KAYENTAO	Santé Publique Biostatistiques
M. Issiaka	SAGARA	Santé Publique Biostatistiques
Mme. Fanta	SANGHO	Santé Publique

M. Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique Biostatistiques
----------------------	---------	--------------------------------

ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochime Clinique
Mme. Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
M. Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie Clinique
Mme. Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
M. Souleymane	DAMA	Parasitologie Entomologie Méd
M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
M. Issa	DIARRA	Immunologie
Mme. Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
M. Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
Mme. Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Epidémiologie
M. Falaye	KEÏTA	Santé Publique/Santé Environ.
M. N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
M. Birama Apho	LY	Santé Publique
M. Yacouba	MAÏGA	Biostatistiques
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
M. Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
M. Oumar	SANGHO	Epidémiologie
M. Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. SAÏBOU	MAÏGA	Législation
Mme. ROKIA	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE**MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

M. LOSENI	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
M. Yaya	COULIBALY	Législation
Mme. ADIARATOU	TOGOLA	Pharmacognosie

ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

M. Bakary Moussa	CISSE	Galénique
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M. Balla FATOGOMA	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
M. Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
M. Antoine	DARA	Sciences Pharmaceutiques
M. Daouda LASSINE	DEMBELE	Pharmacognosie
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
M. Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
M. Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
Mme. Assitan	KALOGA	Législation
M. Hama Boubacar	MAÏGA	Galénique
M. Ahmed	MAÏGA	Législation
Mme AICHATA Ben Adam	MARIKO	Galénique
M. Aboubacar	SANGHO	Législation

M. BOURAMA	TRAORE	Législation
M. Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
M. Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
Mme. Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

DER : SCIENCES DU MEDICAMENT

PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

M. Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
M. Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

M. Sékou	BAH	Pharmacologie
M. Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique

MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

M. Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie

ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
M. Mody	CISSE	Chimie Thérapeutique
M. Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
M. Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
Mme. Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique

M. Abdrahamane	DIARA	Toxicologie
M. Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique
M. Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique
M. Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

DER : SCIENCES FONDAMENTALES

PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

M. Cheick F.	TRAORE	Biologie/Entomologie
M. Mahamadou	TRAORE	Génétique

MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

M. Mouctar	DIALLO	Biologie Chef de DER
M. Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

MAITRES ASSISTANTS/CARGES DE RECHERCHE

ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

M. Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
M. Modibo	DIALLO	Génétique
M. Abdoulaye	KANTE	Anatomie
M. Boureïma	KELLY	Physiologie Médicale
M. Moussa	KONE	Chimie Organique
M. Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

M. Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
M. Babou	BAH	Anatomie
M. Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
M. Souleymane	COULIBALY	Psychologie
M. Bouba	DIARRA	Bactériologie
M. Mamadou Lamine	DIARRA	Biologie Végétale, Botanique
M. Modibo	DIARRA	Nutrition
M. Moussa I.	DIARRA	Biophysique
M. Babacar	DIOP	Chimie
M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie
M. Yaya	KANE	Galénique
M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Aboubakary	MAÏGA	Chimie Organique
M. Massambou	SACKO	SCMP/SIM
M. Modibo	SANGARE	Anglais
M. Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
Mme. Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
M. Fana	TANGARA	Mathématique
M. Abdel Kader	TRAORE	Pathologies Médicales
M. Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

DEDICACE&REMERCIEMENTS

DEDICACE ET REMERCIEMENTS

Nous dédions cette thèse à DIEU Le Tout Puissant, Le Tout Miséricordieux, Le Tout Clément ; Qui nous a permis de voir ce jour. Alhamdoulilaahi Rabil Aalamina. Cet aboutissement introduit un autre chapitre dans notre vie.

A cette étape, nos remerciements et profondes reconnaissances vont à énormément de personnes et groupes qui nous ont servi de locomotive et de guide durant ce voyage.

- A notre père, Feu El hadj Alhousseyni THIAM

Nous prions pour le repos éternel de votre âme en paix ainsi que pour tous nos illustres disparus. Nous vous seront toujours reconnaissants pour tout. Nous sommes particulièrement fiers de l'éducation et de la rigueur dont nous avons bénéficié. Nous nous rappelons encore lorsque vous nous disiez : Nouhou, ta constance dans tes actions et dans tes relations humaines, ta patience et détermination dans tout ce que tu feras, te permettrons d'aboutir à du positif. Merci pour tout cher papa. Dors en paix.

- A notre mère Aminata TALL

Merci pour vos encouragements, vos bénédictions et votre patience. Par la grâce de Dieu, nous sommes aujourd'hui sur le point de soutenir. C'est l'aboutissement d'un cursus pour lequel nous vous serons toujours reconnaissants. Nous vous souhaitons longue et heureuse vie à nos côtés.

- A nos frères, sœurs, cousins et cousines : Madina, Aissata, Mariam, Aminata, Djeneba, Fatoumata Bady, Dija, Malado, Hawa, Rouyatou, Ousmane, Seydou, Daouda, Sadoun, Hassim, Issa, Aziz, Adama, Amadou, Adou, Mouctar et Kola.

Vous avez contribué chacun à sa manière à ce que nous atteignons cette étape. Je vous dis Merci.

- Nos sincères reconnaissances Aux Enfants qui ont pris part à cette étude et à leurs familles. Nous formulons les vœux que ces enfants puissent élever un jour leurs enfants dans un monde sans paludisme.
- A l'équipe de mise en œuvre de PMI 2017 à Missira et à Selingué. Sans vous, ce travail ne serait pas possible. Retrouvez ici l'expression de notre reconnaissance. Nos remerciements vont aux personnels du CSRéf de Selingué et de l'infirmerie de Missira.

- A nos enseignants de l'école privée Mission Catholique de Sikasso, nos enseignants du lycée Monseigneur Didier de Montclos de Sikasso (LMMS) et du Lycée Amion GUINDO ainsi qu'à nos enseignants de la faculté de Pharmacie de l'USTTB.

Vos cours, vos encouragements, vos conseils et l'inspiration positive dont vous nous avez fait grâce des années durant, nous permettent de cheminer dans la vie de tous les jours. Merci.

- A nos aînés : Clément Ansemo BANOU et Hamidou TEMBINE.

Vos soutiens ont été à la hauteur des enjeux. Puisse Dieu nous aider à être chaque jour à la hauteur de la confiance que vous avez placé en nous. Merci infiniment. Que Dieu vous donne longue et heureuse vie.

- A notre tonton Bocar Bayo TRAORE ; nous vous exprimons notre gratitude pour votre appui et présence à des moments clés dans notre formation. Merci.
- A nos amis Zanga Youssouf et Bouacar COULIBALY : nous avons partagé les moments les plus difficiles ensemble à la faculté mais également les moments les plus heureux. Nous sommes encore ensemble. Merci pour vos amitiés et soutiens de tous les jours. Merci.
- A nos amis Siaka BENGALY et Bréhima Laico TRAORE, nous sommes amis depuis le second cycle. Merci pour vos conseils et que nos amitiés perdurent à jamais. Merci.
- A l'ensemble du personnel du LBMA : vous nous avez accueilli les bras ouverts, formé à beaucoup de techniques de laboratoires et accompagné à chaque étape de cette thèse. Soyez dûment et sincèrement remercié. L'aventure continue. Nous ne citerons point de nom au risque de commettre le péché d'en omettre. Merci infiniment à toutes et à tous.
- A l'ensemble du personnel de la Pharmacie de la Référence à Kalaban :

Noël YEBEZIE, Martine KASSOGUE, Assitan DOUCOURE, Salimata TOLO, Assetou COULIBALY et Youssouf DOUMBIA. Nous sommes ensemble tous les jours et vos soutiens dans le cadre de cette thèse notamment en termes de disponibilité nous ont été d'une grande aide. Nous vous disons Merci.

- A l'ensemble du personnel de Laborex Mali, de la Pharmacie V2M et de la Pharmacie Yaye Diakité : Merci pour vos soutiens et compétences transmises.

- Aux membres de la Promotion N’Golo DIARRA, la 9^{ème} promotion du *Numérus clausus*, merci pour ces années passées ensemble. Bonne carrière à toutes et à tous !
- Aux membres de la Jeune Chambre Internationale Mali :

Le fait d’avoir eu à occuper le poste de Directeur National Chargé du Protocole en 2014, celui de Directeur National Chargé de la Communication 2016, celui de Secrétaire Général National 2017 nous a confronté à des rudes épreuves qui nous ont permis de nous améliorer. Merci pour les nombreuses opportunités de formations, de voyages et de leadership dont vous nous faites bénéficier à travers la JCI Mali depuis bientôt dix ans. Merci spécialement aux ami(e)s Harira H. CISSE, Didi K. DIALLO, Aminata TRAORE, Ibrahim Kalil SANOGO, Malado BORE, Djeneba OUANE, Oury KONE, Bouba TRAORE, Tidiane DIAALO, Mariam DIALLO, Souleymane Y. SIDIBE, Mamadou KENDE, Abdoulaye S. DOUCOURE, Abou GUINDO, Abdrahamane COULIBALY, Abdoul Kassim FOMBA, Abdoulaye YARO, Boubacar THIAM, Cheik Oumar HAIDARA, Youssouf DIAWARA...

- Aux membres et anciens de l’Amicale des Etudiants Ressortissants de la Région de Sikasso et Sympathisants et aux militant(e)s de l’Expérience Syndicale, merci de nous avoir aidé à améliorer nos techniques de débats et d’avoir partagé avec nous la joie de la camaraderie.
- Aux anciens membres de l’Amicale des Etudiants en Pharmacie du Mali : ces quelques années passées ensemble dans le même bureau nous ont permis de nous améliorer. Nous avons eu la chance et l’occasion de participer à des rencontres de la FESPAO dans la sous-région et d’organiser ces rencontres ici au Mali en 2015, d’organiser la journée de l’étudiant en pharmacie et des examens blancs pour les étudiants de la première année pharmacie entre autres. Toutes ces activités ont fortement contribué à notre formation. Merci spécialement à Alhadj DICKO, Zanga YOUSSEUF, Fatoumata O. MAIGA, Daniel DARA, Siraman DIARRA, Sémité Rachelle THERA... Nos remerciements vont également aux anciens camarades membres du bureau de la FESPAO 2012-2013.
- Au parlement des enfants du Mali : nous avons été initié à la vie associative dès 2003 en devenant membre du parlement des enfants de Sikasso avant de présider le bureau régional de 2005 à 2007 et de prendre part au bureau

national du parlement des enfants du Mali en président le groupe parlementaire « survie de l'enfant ». Nous y avons appris des techniques de plaidoyer pour la promotion des droits et devoir des enfants dans le cadre de la survie, de la protection, du développement et de la participation des enfants conformément à la Convention Relative aux Droits des Enfants. Nous y avons appris également les techniques de base des débats et à nous confronter à ses pairs pour parvenir à des compromis notamment lors des sessions parlementaires et des semaines nationales de l'enfant. Merci spécialement aux anciens parlementaires et amis Siaka COULIBALY, Albouhary HAIDARA, Aminta O. DIALLO, Absatou TRAORE, Awa CISSE, Oury KONE, Souleymane SIDIBE et à notre présidente nationale (2005-2007 et 2007-2009) de l'époque Fatoumata SANKARE.

- Aux membres et anciens de l'Association pour la Promotion des Jeunes et Enfants Communautaires (APJEC). Merci pour ces moments passés ensemble. Merci.
- A toutes et à tous, Merci pour vos appuis et bénédictions. ALBARKA, AWNI TCHÉ, TIYABOU.

**HOMMAGES AUX MEMBRES
DU JURY**

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du Jury

Pr Ababacar I. MAIGA

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

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

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

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

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

Que Dieu vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maitre et membre du Jury

Professeur Mouctar DIALLO

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

Votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre souci du travail bien fait et votre faculté d'écoute ont forcé notre admiration. Vous nous avez reçu avec beaucoup d'amabilité et simplicité. Vous nous avez motivé sur le terrain par vos mails et encouragé pour le travail bien fait. Soyez rassuré honorable maître de notre profonde reconnaissance.

Que Dieu vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maître et membre du Jury

M. Ibrahim KEITA

- **Assistant en Biologie moléculaire à la FMOS ;**
- **Attaché de recherche au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée.**

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

Que Dieu vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maître et co-directeur de thèse

Docteur Youssouf DIARRA

- ✓ **Pharmacien ;**
- ✓ **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.

Daignez recevoir nos vives félicitations pour votre caractère discret et votre rigueur scientifique !

Que Dieu vous donne une longue et heureuse vie !

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Ousmane KOITA

- ✓ **Pharmacien Biologiste (PharmD, PhD) ;**
- ✓ **Professeur Titulaire en Biologie moléculaire ;**
- ✓ **Chargé de cours de biologie cellulaire et moléculaire à la faculté de Pharmacie ;**
- ✓ **Ancien Directeur-Adjoint du SEREFO ;**
- ✓ **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée.**

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 fait comprendre que « pour *un étudiant rien ne valait une formation de qualité* »

Vous nous avez accueilli les bras ouverts au LBMA, initié à la recherche et dirigé les travaux de notre thèse, ce qui fait de ce travail, le vôtre !

Votre simplicité, votre ouverture d'esprit et votre rigueur scientifique font de vous un modèle à suivre.

Nous avons admiré votre ferme volonté à offrir à nous les apprenants, un cadre optimal pour l'apprentissage de la recherche avec du matériel de pointe.

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

Que LE TOUT PUISSANT vous accorde la santé et la longévité dans la recherche scientifique afin que d'autres générations d'étudiants puissent bénéficier de la qualité de votre enseignement.

Que Dieu vous donne une longue et heureuse vie !

Amen !

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents faciès de transmission du paludisme au Mali	10
Tableau 2: Taxonomie du vecteur du paludisme	12
Figure 14 : Carte du Mali montrant les deux sites d'étude du projet PMI 2017 (source IGM)	46
Tableau 3: Liste des amorces utilisées	59
Tableau 4: Composition du mélange réactionnel 1	60
Tableau 5 : Composition du mélange réactionnel 2	61
Tableau 6 : Concentration des amorces utilisées lors du HRM.....	64
Tableau 7: Composition du mix lors du HRM.....	64
Tableau 8 : Composition du mix lors du HRM.....	65
Tableau 9: Patients dépistés et enrôlés parmi les enfants de 6 à 59 mois	72
Tableau 10 : Répartition des patients par site d'étude (n=202).....	72
Tableau 11: Répartition des patients par tranche d'âge (n=202).....	73
Tableau 12 : Répartition des patients par tranches de parasitémiés (n=202)	74
Tableau 13 : Répartition des allotypes par patients (n=187)	76
Tableau 14: Répartition des patients selon la multiplicité de l'infection (n=187).....	77
Tableau 15 : Températures moyennes de fusion des souches de contrôles du gène <i>Pfdhfr</i> .	78
Tableau 16: Répartition des mutations sur le gène <i>Pfdhfr</i> à la position 51 selon le site d'étude (n=199).....	78
Tableau 17: Répartition des mutations sur le gène <i>Pfdhfr</i> à la position 59 selon le site d'étude (n=199).....	79
Tableau 18 : Températures de fusion moyennes des souches de contrôles du gène <i>Pfdhps</i>	80
Tableau 19: Répartition des mutations sur le gène <i>Pfdhps</i> à la position 436 en fonction du site d'étude	80
Tableau 20: Répartition des mutations sur le gène <i>Pfdhps</i> à la position 437 en fonction du site d'étude (n=191).....	81
Tableau 21: Prévalences des doubles mutations sur les gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i>	81
Tableau 22 : Prévalences des triples mutations sur les gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i>	82
Tableau 23: Prévalences des quadruples mutations sur les gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i>	82
Tableau 24 : Répartition des cas d'anémie par site d'étude.....	82
Tableau 25: Evolution de la multiplicité de l'infection en fonction de l'âge (n=187)	83
Tableau 26: Répartitions des mutations en fonctions des parasitémiés.....	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition du paludisme dans le monde	7
Figure 2: Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'homme et le moustique	18
Figure 3: Structure de la sulfadoxine	23
Figure 4: Structure de la pyriméthamine.....	23
Figure 5 : Schéma du mécanisme d'action des antifolates	26
Figure 6: Structure chimique de l'amodiaquine.....	28
Figure 7 : Séquences des acides aminés de K1	37
Figure 8 : Séquences des acides aminés de MAD20	38
Figure 9 : Séquences des acides aminés de RO33.....	38
Figure 10: Mécanismes de résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine	40
Figure 11 : Mutations sur le gène <i>Pfdhps</i> associées à la résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> à la pyriméthamine	40
Figure 12: Mutations sur le gène <i>Pfdhps</i> associées à la résistance de <i>P. falciparum</i> à la Sulfadoxine	41
Figure 13 : Carte de la mise en œuvre de la CPS	43
Figure 14 : Carte du Mali montrant les deux sites d'étude du projet PMI 2017 (source IGM).....	46
Figure 15 : Localisation géographique du site de Missira dans la commune de Sebecoro I	47
Figure 17: Principe du HRM	66
Figure 18 : Principe de tracée des courbes de fusion.....	67
Figure 19: Courbe de fusion d'un ADN normal et d'un ADN muté.....	67
Figure 20 : Dispositif du HRM au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de l'USTTB	68
Figure 21: La température de fusion en fonction de la fluorescence au HRM	68
Figure 22: Les courbes de fusion normalisées au HRM	69
Figure 23: Pics de fusion au HRM	69
Figure 24 : Schéma à suivre pour la détection des mutations par HRM.....	70
Figure 25: Répartition des patients selon le genre (n=202)	73
Figure 26: Répartition des patients selon le taux d'hémoglobine (n=202)	74
Figure 27: Image labélisée des bandes des allotypes de la <i>msp1</i>	75

Figure 28: Estimation des Prévalences des allotypes de la <i>msp1</i> par site d'étude (n=187)	76
Figure 29 : Répartition des patients en fonction de la polyclonalité par site d'étude.	77
Figure 30: Profils des courbes des haplotypes du gène <i>Pfdhfr</i> 51/59.....	78
Figure 31: Profils des haplotypes du gène <i>Pfdhps</i> 436/437 au HRM	79
Figure 32: Répartition des allotypes mutés en fonction de l'âge.....	84

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AL	Artémether-Luméfantrine
AQ	Amodiaquine
<i>An. Arabiensis</i>	<i>Anopholès arabiensis</i>
<i>An. Gambiae</i>	<i>Anopholès gambiae</i>
ARS	Artésunate
ART	Artémisinine
CDE	Convention relative aux Droits des Enfants
CI ₅₀	Concentration inhibitrice 50
CPN	Consultation prénatale
CPS	Chimioprévention du Paludisme Saisonnier
CQ	Chloroquine
CSCom	Centre de Santé Communautaire
CSRéf	Centre de santé de Référence
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
CYP2C19	Cytochrome 2C19
CYP2D6	Cytochrome 2D6
CYP3A4	Cytochrome 3A4
DAPI	4, 6-Di-amidino-2-Phenyl-Indole
DHA	Dihydroartémisinine
DTC	Vaccin antidiphtérique, antitétanique, anticoquelucheux
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ET	Ecart Type
FESPAO	Fédération des Etudiants en Sciences Pharmaceutiques de l'Afrique de L'Ouest

FRC	Formulaire de Report de Cas
G6PD	Glucose-6-Phosphate Deshydrogenase
Hb	Hémoglobine
HRM	Hight Resolution Melting
HRP2	Histidin Rich Protein 2
IFI	ImmunoFluorescence Indirecte
IGM	Institut Géographique du Mali
INRSP	Institut National de Recherche en Santé Publique
IP	Indice Plasmodique
LBMA	Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
LUM	Luméfantrine
MFQ	Méfloquine
MIILDA	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action
MOI	Multiplicity Of Infection
MSP1	Merozoite Surface Protein-1
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NGS	Next Generation Sequencing
NIH	National Institutes of Health
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PABA	Acide Para Amino Benzoique
<i>Pfdhfr</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase
<i>Pfdhps</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydroopteroate synthetase
PYR	Pyriméthamine
QBC	Quantitative Buffy-Coat
QN	Quinine
RBM	Roll Back Malaria

RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SP	Sulfadoxine Pyriméthamine
SSJ	Syndrome de Stevens-Johnson
TBE	Tris Borate EDTA
TCF	Temps de Clairance de la Fièvre
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TPI	Traitement Préventif Intermittent
TPIe	Traitement Préventif Intermittent de l'enfant
TPIg	Traitement Préventif Intermittent pendant la grossesse
TPIn	Traitement Préventif Intermittent du nourrisson
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
#	Nombre

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	1
2. Objectifs	5
2.1 Objectif Principal	5
2.2 Objectifs spécifiques.....	5
3. Généralités.....	6
3.1 Paludisme	6
3.1.1 Définition.....	6
3.1.2 Historique.....	6
3.1.3 Répartition géographique	7
3.1.4 Biologie.....	11
3.1.5 Diagnostic Biologique.....	18
3.1.6 Manifestation du paludisme	21
3.1.7 Médicaments utilisés dans la lutte contre le paludisme.....	22
3.1.8 Modes d'action des antipaludiques	24
3.1.9 Pharmacocinétique des antipaludiques couramment utilisés en association...	26
3.1.10 La sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar®)	31
3.1.11 Association atovaquone + proguanil (Malarone®).....	31
3.1.12 Association artéméther + luméfantrine (Coartem®/Riamet®)	31
3.1.13 Association artésunate + amodiaquine.....	32
3.1.14 Association artésunate + méfloquine	32
3.1.15 Traitement du paludisme	32
3.1.16 Traitement du paludisme simple aux autres espèces plasmodiales.....	33
3.1.17 Traitement du paludisme grave	33
3.1.18 Prophylaxie.....	33
3.1.19 Génétique des populations de <i>P.falciparum</i> à travers le gène <i>msp1</i>	37
3.1.20 Résistance du <i>Plasmodium</i> aux antipaludiques	39
3.2 La campagne de chimioprévention du Paludisme Saisonnier : CPS.....	42
3.2.1 Définition.....	42
3.2.2 Zones géographiques recommandées	42
3.2.3 Posologie et fréquence d'administration recommandées en fonction de l'âge	43

3.2.4	Contre-indications	43
3.2.5	Les dates des différents passages de la CPS à Missira et à Sélingué en 2017 ...	44
4.	Méthodologie.....	45
4.1	Contexte et justification de l'étude	45
4.2	Sites d'étude	45
4.2.1	Site de Missira	46
4.2.2	Site de Sélingué	48
4.3	Type d'étude.....	51
4.4	Période d'étude	51
4.5	Population d'étude	51
4.5.1	Critères d'inclusion dans l'étude.....	51
4.5.2	Critères de non inclusion.....	51
4.5	Echantillonnage	51
4.5.1	Procédure de recensement.....	52
4.5.2	Procédure d'identification	52
4.6	Interventions	53
4.6.3	Prise de médicaments	56
4.6.4	Suivi	56
4.6.5	Collectes et Traitement des échantillons.....	56
4.7	Le génotypage des échantillons	57
4.7.1	Extraction de l'ADN	57
4.7.2	Amplification du gène <i>msp1</i> par la PCR	59
4.7.3	Technique d'électrophorèse	62
4.8	Recherche des mutations sur les gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i>	63
4.8.1	Réactifs du HRM et matériels.....	63
4.8.2	PCR.....	63
4.8.3	High Resolution Melting HRM : Fusion à Haute Résolution.....	66
4.9	Saisies et analyses des données	70
4.10	Considérations éthiques et déontologiques	70
5.	Résultats.....	72
5.1	Facteurs démographiques	72
5.2	Résultats de la microscopie	74

5.3	Résultats obtenus avec l’Hemocue	74
5.4	Résultats du génotypage par PCR nichée de la <i>msp1</i>	75
5.5	Les marqueurs de résistance	78
5.5.1	Gène <i>Pfdhfr</i>	78
5.5.2	Gène <i>Pfdhps</i>	79
5.6	Analyses croisées	82
6.	Commentaires et discussion	85
6.1	Méthodologie	85
6.1.1	Lieux d’étude.....	85
6.1.2	Approche.....	85
6.1.1	Extraction de l'ADN du <i>Plasmodium falciparum</i>	86
6.1.2	L’utilisation de la PCR nichée sur le gène de la <i>msp1</i>	86
6.1.3	L’utilisation du HRM pour la détection des mutations sur le matériel génétique de <i>Plasmodium falciparum</i>	87
6.2	Résultats	87
6.2.1	Facteurs démographiques.....	87
6.2.2	Taux d’hémoglobine.....	88
6.2.3	Paramètres du polymorphisme génétique de la <i>msp1</i>	88
6.2.4	Les mutations associées à la résistance du <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine et à la pyriméthamine que nous avons étudié.....	89
7.	Conclusion.....	92
8.	Recommandations :	93
9.	REFERENCES	94
10.	ANNEXES.....	102

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile due à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres principalement nocturnes de moustiques *Anophèles* infectés, appelés « vecteurs du paludisme ». Il est encore présent dans 91 pays du globe [1]. L'Organisation Mondiale de la Santé le classe parmi les pathologies prioritaires en termes d'intervention, avec la tuberculose et le VIH/SIDA [2]. Bien qu'une maladie ancienne, ce n'est qu'à partir du dix-neuvième siècle que l'homme a fait de véritables avancées dans la connaissance de cette pathologie, notamment en découvrant le parasite, son cycle parasitaire, le rôle de l'anophèle dans sa transmission et sa physiopathologie. Il existe 5 types d'espèces de parasite responsables du paludisme chez l'homme, dont deux (*Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*) sont les plus dangereux [3]. *Plasmodium falciparum* est responsable de la plupart des cas mortels dans le monde et *P. vivax* est le parasite prédominant hors d'Afrique [1].

L'OMS estime qu'il y eu, en 2016, 216 millions de cas de paludisme dans 91 pays, soit 5 millions de cas de plus qu'en 2015 entraînant 445 000 décès en 2016, un chiffre similaire à celui de 2015 (446 000) [1]. Le prix à payer pour le paludisme est aussi financier. En 2016, le financement destiné à combattre et à éliminer le paludisme était estimé à 2,7 milliards de dollars (US \$) au total. Les contributions des gouvernements des pays endémiques atteignaient 800 millions de dollars (US \$), soit 31% du financement [1]. Le paludisme retentit indirectement sur l'économie en augmentant le nombre de congés maladies, en favorisant l'absentéisme à l'école ou au travail et en freinant la scolarisation par les séquelles neurologiques qu'il occasionne.

Depuis 2006, la plupart des pays dans lesquels *Plasmodium falciparum* est endémique ont progressivement actualisé leur politique de traitement, passant de la chloroquine (CQ) et de la Sulfadoxine Pyriméthamine (SP) dont plusieurs situations d'échec se sont avérées, aux associations thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) actuellement recommandées [4]. Cependant, selon l'OMS, depuis 2012, l'évolution de l'épidémiologie du paludisme a entraîné un passage progressif d'un mode de traitement unique en toute circonstance à des stratégies de lutte contre le paludisme ciblées sur des populations et/ou des endroits spécifiques afin d'obtenir un maximum d'efficacité. Conformément à cette approche et sur la base de nouvelles données factuelles, l'OMS recommande désormais une intervention supplémentaire pour lutter

contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* : la chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS). Elle s'est avérée efficace, peu coûteuse, sûre et réalisable en vue de la prévention du paludisme chez des enfants de moins de cinq ans en zones de forte transmission saisonnière du paludisme [5,6]. De ce fait, depuis 2012, la CPS est recommandée dans les zones de forte transmission saisonnière comme la sous-région du Sahel. Cette recommandation est particulièrement destinée aux pays de la zone du sahel dont le Mali, pour leur forte endémicité et de mortalité du paludisme notamment chez les enfants de 3 à 59 mois [5,7].

La Région africaine de l'OMS supporte une part disproportionnée de la charge mondiale du paludisme. En 2016, 90% des cas de paludisme et 91% des décès dus à cette maladie sont survenus dans cette Région [1]. En plus des conditions géographiques et climatiques propices aux développements du *Plasmodium* et de son vecteur l'anophèle femelle, les conditions économiques et socio-éducatives sur le continent favorisent ce triste tableau. Malgré tout, la Région africaine a réalisé des progrès dans la lutte contre le paludisme, avec une réduction de 42 % de l'incidence de la maladie et une baisse de 66 % du taux de mortalité palustre entre 2000 et 2015 [8].

Au Mali, *Plasmodium falciparum* qui est l'espèce la plus redoutable, la plus fréquente et la plus concernée par la chimiorésistance [9] prédomine avec 85 - 90% de la formule parasitaire, suivie des espèces *Plasmodium malariae* (10 à 14%), *Plasmodium ovale* (1%), et un cas de *Plasmodium vivax* au Nord rapporté par KOITA O en 1988. Le Mali a adhéré à travers le Programme National de Lutte contre le Paludisme à la CPS en 2013. Le PNLN est l'organe de pilotage des activités de lutte contre le paludisme au Mali. Il existe depuis 1993. Il est actuellement régi par le décret N° 07-022/P-RM du 18/07/2007 et rattaché au Secrétariat Général du Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique [6]. Les localités de Missira et de Selingué ont bénéficié de la CPS pour la première fois en 2017. Ces deux localités ont des profils épidémiologiques de transmission du paludisme différents de par leurs faciès.

Un des problèmes majeur dans la lutte contre le paludisme est le phénomène de résistances aux antipaludiques [10]. La résistance du *Plasmodium* aux antipaludiques a démarré avec la chloroquinorésistance [11]. La substitution de la Lysine par la Thréonine en position 76 du gène *Pfcr1* conduit à la mutation qui joue un grand rôle dans ce mécanisme de résistance à la chloroquine [12]. Elle a débuté en Asie du Sud-

Est avant de se propager vers l'Ouest jusqu'en Afrique [11]. Ce même phénomène c'est répété avec la Sulfadoxine-pyriméthamine avec moins d'ampleur. L'Afrique subsaharienne est moins atteinte par la résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP en atteste la recommandation de la CPS chez les enfants de 3 à 59 mois dans la zone du Sahel [5]. L'efficacité de la SP plus l'Amodiaquine dans le cadre de la CPS s'est avérée efficace en Afrique sub-saharienne selon différentes études [6,13–15]. Malgré tout, la surveillance des résistances demeure recommandée. Aussi, les mutations sur le gène *Pfdhps* (*Plasmodium falciparum* dihydroptéroate synthétase) aux positions 436, 437, 540, 581 et 613 sont reconnues être liées à la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine. Parmi ces mutations, celles rencontrées aux positions 540 et 437 sont les principales associées à la résistance à la sulfadoxine [16]. La mutation ponctuelle S108N du gène *Pfdhfr* (*Plasmodium falciparum* dihydrofolate réductase) est la principale mutation responsable de la résistance aux antifoliniques tel que la pyriméthamine. L'addition de trois ou quatre mutations sur le gène *Pfdhfr* (C59R, N511 ou I164L) et d'une ou deux mutations du gène de la dihydroptéroate synthétase cis citées, élève le niveau de résistance, rendant inefficace leur action potentialisatrice. C'est ce qui conduit au phénomène de résistance à la sulfadoxine–pyriméthamine [16]. La présence simultanée des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* favorise ainsi les cas d'échecs thérapeutique à la SP [16,17]. Les études sur les mutations sur ces gènes sont recommandées car la SP est recommandée chez les groupes les plus vulnérables (les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes) au paludisme et dans une des régions les plus exposées au paludisme dans le monde (l'Afrique subsaharienne) [1,4].

L'indisponibilité de vaccin efficace contre le paludisme à ce jour (2018), l'apparition croissante des résistances du *Plasmodium* aux antipaludéens et les difficultés à maîtriser le vecteur du paludisme font que la lutte contre le paludisme nécessite encore de nombreux efforts à fournir dans différents domaines et notamment dans celui de la recherche scientifique. L'OMS a élaboré une stratégie technique mondiale pour quinze ans 2016-2030 [18]. Cela nous montre que l'élimination du paludisme va encore nécessiter au moins de nombreuses années d'efforts intenses. Ce document décrit la vision de l'OMS qui est celle d'un monde sans paludisme, basée sur une stratégie dont les buts mondiaux sont ambitieux mais atteignables en 2030 via des objectifs intermédiaires aux années 2020 et 2025.

Au vu de tout ce qui précède, nous avons décidé d'apporter notre contribution en faisant une étude sur la prévalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* dans les localités de Missira et de Sélingué en marge des activités de la campagne de prévention du paludisme saisonnier 2017 au Mali.

Hypothèse : la prévalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* est actuellement élevée à Missira et à Sélingué suite à la forte et longue utilisation de la SP notamment après le retrait officiel de la chloroquine. Et cela d'autant plus que la CPS vient accentuer cette pression médicamenteuse.

OBJECTIFS

2. OBJECTIFS

2.1 Objectif Principal

Estimer la prévalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* chez les souches de *P. falciparum* isolées après les campagnes de CPS à Sélingué et à Missira en 2017.

2.2 Objectifs spécifiques

- Estimer les cas de paludisme confirmés chez les enfants (6 à 59 mois) ayant reçu les doses des CPS 2017 à Missira et à Sélingué ;
- Estimer la multiplicité de l'infection chez les enfants atteints du paludisme après la prise de la SP à Missira et à Sélingué ;
- Estimer les fréquences des mutations associées à la Sulfadoxine et à la Pyriméthamine ;
- Estimer la fréquence des multiples mutations chez les souches isolées de *Plasmodium falciparum*.

GENERALITES

3. GÉNÉRALITÉS

3.1 Paludisme

3.1.1 Définition

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

3.1.2 Historique

Le paludisme est l'une des plus vieilles maladies que l'humanité ait connues. Son historique peut être présenté en plusieurs étapes :

- 400 ans avant JC, Hippocrate décrivait le paludisme du kyste hydatique en Grèce [19] ;
- 1630 Don Francisco Lopez apprenait des Indiens du Pérou les vertus de l'écorce du quinquina [20] ;
- 1820 Pelletier et Caventou isolent l'alcaloïde actif, la quinine [21] ;
- 1830 Maillot utilise la quinine dans la campagne d'Algérie [21] ;
- 1880 l'agent pathogène est découvert par Laveran à Constantine [21] ;
- 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 [19] ;
- 1943 la chloroquine, premier antipaludique de synthèse fut obtenue [22] ;
- 1957 la chloroquinorésistance est constatée en Asie et en Amérique du sud [22] ;
- 1970 Zhenxing Wei (Chine) réalisait un extrait de l'artémisinine [23] ;
- 1977 un chercheur de l'entreprise pharmaceutique Guilin synthétisa l'artésunate [23] ;
- 1978 Li Yin produisait pour la première fois l'artémether [23] ;
- 1979 en Afrique, la résistance à la chloroquine a été observée pour la première fois en Tanzanie [19] ;
- 1992 la firme Rhône-Poulenc devenue par la suite Aventis en accord avec l'OMS et l'usine pharmaceutique de Kunming produisirent de l'artémether injectable [23] ;
- En 2001, en Asie du Sud-est, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine est suspectée [24];

- En 2006 au Cambodge, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine a été identifiée pour la première fois [24].

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

La surveillance des marqueurs de résistances aux différents antipaludiques est d'actualité et occupe de nombreux laboratoires de recherche notamment avec les techniques de biologie moléculaire. Ce monitoring continu est une recommandation de l'OMS en particulier dans les zones d'endémie palustre [24].

3.1.3 Répartition géographique

3.1.3.1 Dans le Monde

Pays d'endémie paludique en 2000 et 2016

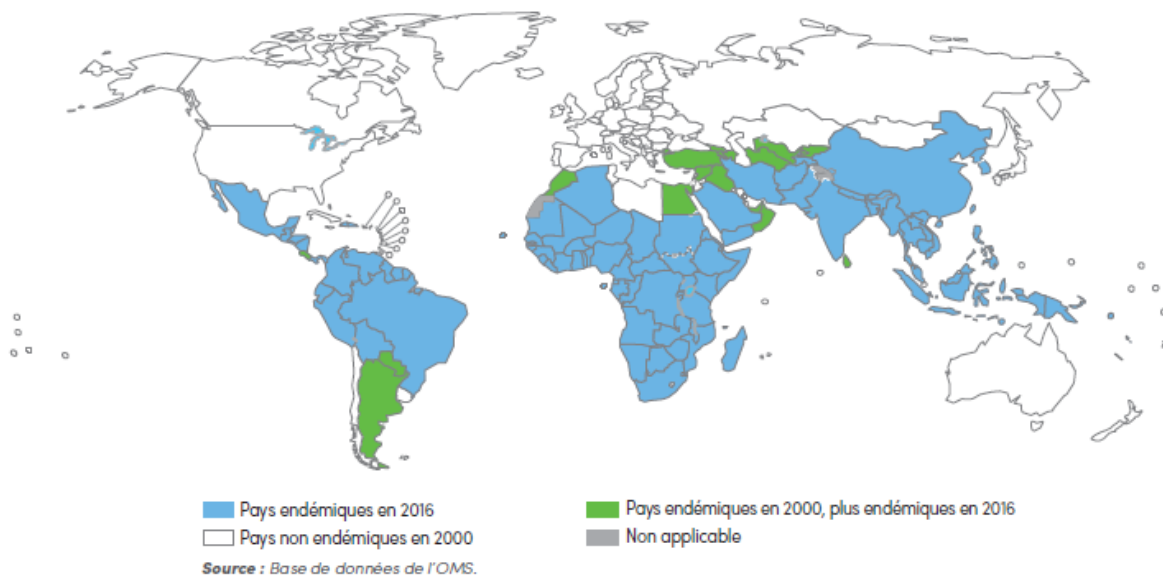


Figure 1: Répartition du paludisme dans le monde [25]

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. Il est au premier rang des priorités de l'OMS de par ses ravages directs et ses conséquences

socio- économiques. Selon l'OMS près de la moitié de la population mondiale est exposée au paludisme.

Les premiers cas de résistance à la chloroquine ont été rapportés en plusieurs points du monde entre 1957 et 1960 (Colombie et Venezuela, Cambodge et Thaïlande, Papouasie Nouvelle Guinée, Philippines) [10]. La résistance s'est progressivement propagée dans les zones endémiques.

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

3.1.3.2 En Afrique

Le paludisme est largement répandu dans toute l'Afrique sub-saharienne ou coexistent *P. falciparum* (nettement prédominant), *P. ovale* et de manière plus sporadique *P. malariae*. *Plasmodium vivax* peut être retrouvé en Afrique de l'Est. Il existe une transmission, faible, en Afrique du Nord (Algérie), essentiellement due à *P. vivax*, ainsi qu'au Cap-Vert et à l'île Maurice. L'île de la Réunion est indemne. En revanche, la transmission est bien présente aux Comores, dont Mayotte, et à Madagascar ou coexistent quatre espèces [3].

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne [27]. La résistance du *Plasmodium* à la monothérapie de la Chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine continue d'évoluer en Afrique de l'Est, du Sud et Centrale. Cette résistance est beaucoup plus faible en Afrique de l'Ouest.

Actuellement, aucun cas de résistance à l'artémisinine et ses dérivés n'a été confirmé en Afrique [28]. Cependant, une réduction de la sensibilité à l'artémisinine est présente dans certaines zones endémiques en Afrique [29]. Les résultats des différentes études menées montrent que les CTAs sont encore efficaces en Afrique [24]. La SP reste recommandée pour le traitement préventif intermittent du paludisme chez les femmes enceintes.

Elle est également recommandée pour la chimioprévention du paludisme saisonnier chez les enfants âgés de 3 à 59 mois dans la zone du Sahel [5]. Dans ce dernier cas, l'amodiaquine est associée à la SP. La SP+AQ sont efficaces à cet effet.

3.1.3.3 Au Mali

Au Mali le paludisme est de type saisonnier, c'est-à-dire que la transmission est endémique avec un pic pendant la saison des pluies. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituent les groupes les plus à risque [30]. Or les enfants de moins de cinq ans représentent environ 20% de la population au Mali [31]. Les faciès de transmission du paludisme au Mali sont assez variables. Il est plus endémique au sud par rapport au nord. On appelle faciès épidémiologique du paludisme, une région ou un ensemble de régions où le paludisme présente dans ses manifestations pathologiques, des caractères communs liés aux modalités de transmission du parasite. Le paludisme n'est pas une entité homogène à travers toute son aire de distribution, il varie selon les principaux faciès phytogéographies.

Tableau I : Les différents faciès de transmission du paludisme au Mali [19,32]

Faciès Épidémiologiques	Transmission Paludisme	Endémicité IP	Région Géographique	Caractéristiques
Faciès Soudanoguinéen	-Intense (-6 mois/an)	Holoendémique IP > 75 %	Sikasso	Prémunition acquise 5 ans.
Faciès nordsoudanien Et Sahel	-Intense (3-4 mois/an)	Hyperendémique IP : 5 – 75 %	Ségou, Koulikoro, Mopti	Prémunition 9 ans. Neuropaludisme, fréquent à 1-9 ans.
Faciès saharien	-Sporadique -voire épidémique	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 9 ans.
Faciès urbain		Hypoendémique IP < 10 %	Bamako, Mopti ville	Adultes Bamakois risque paludisme grave.

3.1.4 Biologie

Le paludisme est dû à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques *Anopheles* infectés, appelés «vecteurs du paludisme», qui piquent principalement entre le crépuscule et le petit matin [33].

3.1.4.1. Vecteur

Le paludisme est transmis exclusivement par les piqûres de moustiques *Anophèles*. Parmi plus de 500 espèces d'*Anophèles* 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 *Anophèles 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 [34]. Toutes les espèces importantes du vecteur piquent la nuit. Les *Anophèles* se reproduisent dans l'eau et chaque espèce a ses préférences ; certaines par exemple préfèrent l'eau douce de faible profondeur comme les flaques, les rizières et les empreintes laissées par les sabots d'animaux.

La transmission est plus intense aux endroits où les espèces de vecteurs ont une durée de vie relativement longue. Cela permet au parasite de compléter son cycle de développement à l'intérieur du moustique. Certains 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 [33].

Au Mali, des études conduites par Touré Y en 1982 ont montré qu'*Anophèles gambiae s.l* est composé de : *Anopheles gambiae s.s*, et d'*Anopheles arabiensis*. *Anopheles gambiae s.s* est composé de trois formes chromosomiques qui sont dénommées Bamako, Savane et Mopti. 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 [35].

La transmission du paludisme est assurée en saison sèche froide (Novembre –Février) par *Anopheles arabiensis* et la forme Mopti d'*Anopheles gambiae s.s* lui succèdent en période sèche chaude (Mars-Juin). Les formes Savane et Bamako d'*Anopheles 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* [35,36].

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 ci-dessous). 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'écailles 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 2: 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	Anopheles	
Sous-genre	Anopheles, Cellia, Nyssorhynchus, Kerteszia	

3.1.4.1 Agent causal

Le *Plasmodium* est responsable du paludisme. Ce dernier est transmis par un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (plus de 140), touchant diverses espèces animales mais seulement cinq de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine. Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*, parasite habituel des singes (macaques) d'Asie qui vient de passer récemment chez l'homme [3]. Les cinq espèces diffèrent par des critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques. *Plasmodium falciparum* se distingue clairement des autres espèces. En effet *P. falciparum* est, le plus répandu à travers le monde, développe des résistances aux antipaludiques et est responsable des formes cliniques potentiellement mortelles.

3.1.4.1.1 Systématique [36]

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, et probablement sécrètent une enzyme protéolytique ainsi que des microtubules sous membranaires, qui assurent la mobilité de la cellule. Sa taxonomie est la suivante :

Embranchement	APICOMPLEXA
Classe	SPOROZOEIA
Sous-classe	COCCIDIA
Ordre	EUCOCCIDA
Sous-ordre	HAEMOSPORINA
Famille	PLASMODIDAE
Genre	<i>Plasmodium</i>

3.1.4.1.2 Les différentes espèces plasmodiales

Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (Plus de 140), touchant de nombreuses espèces animales, dont quatre espèces sont habituellement retrouvées en pathologie humaine : *P. falciparum*, *P. malariae* ; *P. vivax* et *P. ovale*. Une cinquième espèce ; *P. knowlesi*, parasite habituel des singes d'Asie, s'est avérée être responsable d'une zoonose.

3.1.4.1.2.1 *Plasmodium falciparum*

C'est l'espèce la plus répandue dans le monde et est responsable des formes cliniques mortelles. Dans les régions équatoriales, elle est transmise toute l'année avec des recrudescences saisonnières. Sa transmission s'interrompt en dessous de 18°C. Sa période d'incubation s'étend de 7 à 12 jours [21].

Sur un frottis sanguin à *Plasmodium falciparum*, l'image se caractérise par sa monotonie. Concernant l'hématie hôte, c'est tous les globules rouges à tout stade de maturité qui sont parasités, leur taille reste inchangée et peut être parsemée de petites mouchetures caractéristiques, les tâches de Maurer, colorées en rouge-brun au Giemsa, le pluriparasitisme est fréquent au sein d'une hématie. Les aspects à la goutte épaisse sont différents, les hématozoaires paraissent plus petits et sont en plus grand nombre.

3.1.4.1.2.2 *Plasmodium malariae*

Il sévit sur les trois continents tropicaux avec une répartition beaucoup plus sporadique. Cette espèce de *Plasmodium* se différencie des autres espèces par une période d'incubation plus longue allant de 15 à 21 jours, par la périodicité de la fièvre (fièvre quarte), et surtout par sa capacité à entraîner des reviviscences très tardives (jusqu'à 20 ans après le retour de la zone d'endémie). L'infection à *Plasmodium malariae* est bénigne mais peut parfois entraîner des complications rénales [21].

Son frottis sanguin se caractérise par un parasitisme pauvre, mais toutes les formes évolutives peuvent être vues. L'hématie hôte, généralement âgée avec une légère diminution de diamètre et une teinte plus cuivrée, est caractérisée par le pointillé de Ziemann, qui n'est pas mis en évidence par les colorations usuelles.

En goutte épaisse, le champ microscopique est enrichi, les trophozoïtes jeunes peuvent prendre l'aspect de ceux de *Plasmodium falciparum*, avec la présence constante de pigment malarique, les autres éléments restent inchangés.

3.1.4.1.2.3 *Plasmodium ovale*

Il sévit en Afrique intertropicale du centre et de l'ouest (et dans certaines régions du pacifique) et provoque une fièvre tierce bénigne. Son incubation est de 15 jours au minimum mais peut être beaucoup plus longue jusqu'à 4 ans. L'infection à *Plasmodium ovale* est bénigne mais on peut observer des rechutes tardives (dans 5 ans) [21].

Le frottis sanguin montre un panachage de toutes les formes évolutives. L'hématie hôte est jeune, le pluriparasitisme est fréquemment observé (2 à 3 types de parasites par hématie), il est toujours hypertrophié, décoloré avec tendance à s'ovaliser et à se franger ses bordures, la schüffnérisation est intense et très précoce.

Les aspects de la goutte épaisse sont comparables à ceux de *Plasmodium vivax*, et le diagnostic différentiel est très difficile, voire impossible si le parasitisme est très faible.

3.1.4.1.2.4 *Plasmodium vivax*

Très largement répandu en Amérique du Sud et en Asie, il est beaucoup plus rarement observé en Afrique. Sa transmission s'arrête en dessous de 15°C. Sa période d'incubation est de 11 à 15 jours, mais on peut observer des rechutes dues au réveil des hypnozoïtes pendant 3 à 4 ans. L'infection à *Plasmodium vivax* est classiquement considérée comme bénigne [21].

Au frottis sanguin, on a un panache intense dans lequel on peut trouver toutes les variétés évolutives. *Plasmodium vivax*, attaque les jeunes hématies (réticulocytes), le pluriparasitisme est rare, l'hématie parasitée subit précocement un important remaniement, s'hypertrophie et tend à devenir polygonale avec apparition précoce de grains de Schüffner.

La goutte épaisse est aussi panachée et très enrichie, les trophozoïtes jeunes ont le même aspect que celui décrit précédemment, les autres éléments sont aisément reconnaissables.

3.1.4.1.2.5 *Plasmodium knowlesi*

Il sévit en Asie du Sud-Est (particulièrement en Malaisie, à Bornéo), en zone forestière car il est étroitement lié à la répartition des singes macaques, son hôte habituel, et de son vecteur piquant l'Homme et le singe. Il est morphologiquement proche de *P. malariae*. Il se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24 heures responsable d'une fièvre quotidienne [3].

Il existe de rares formes graves, voire mortelles, avec forte parasitémie. A ce jour aucune chimiorésistance n'a été observée pour cette espèce.

3.1.4.1.3 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 [21].

- **Chez l'homme [32,37]**

Il se déroule en deux phases : une phase hépatique (ou exo-érythrocytaire) et une phase sanguine (ou érythrocytaire)

- La phase hépatique

L'anophèle femelle infesté en piquant l'homme lui inocule le parasite dans le sang 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.

- Chez l'anophèle **[32] [37]**

Encore appelé cycle sporogonique, il débute dès l'infection 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 exflagellation qui l'allongera et le rendra mobile.

La fécondation du macrogamétocyte par le microgamétocyte aboutit à la formation d'un œuf mobile dans la lumière du tube digestif appelé ookinète. Celui-ci va traverser 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.

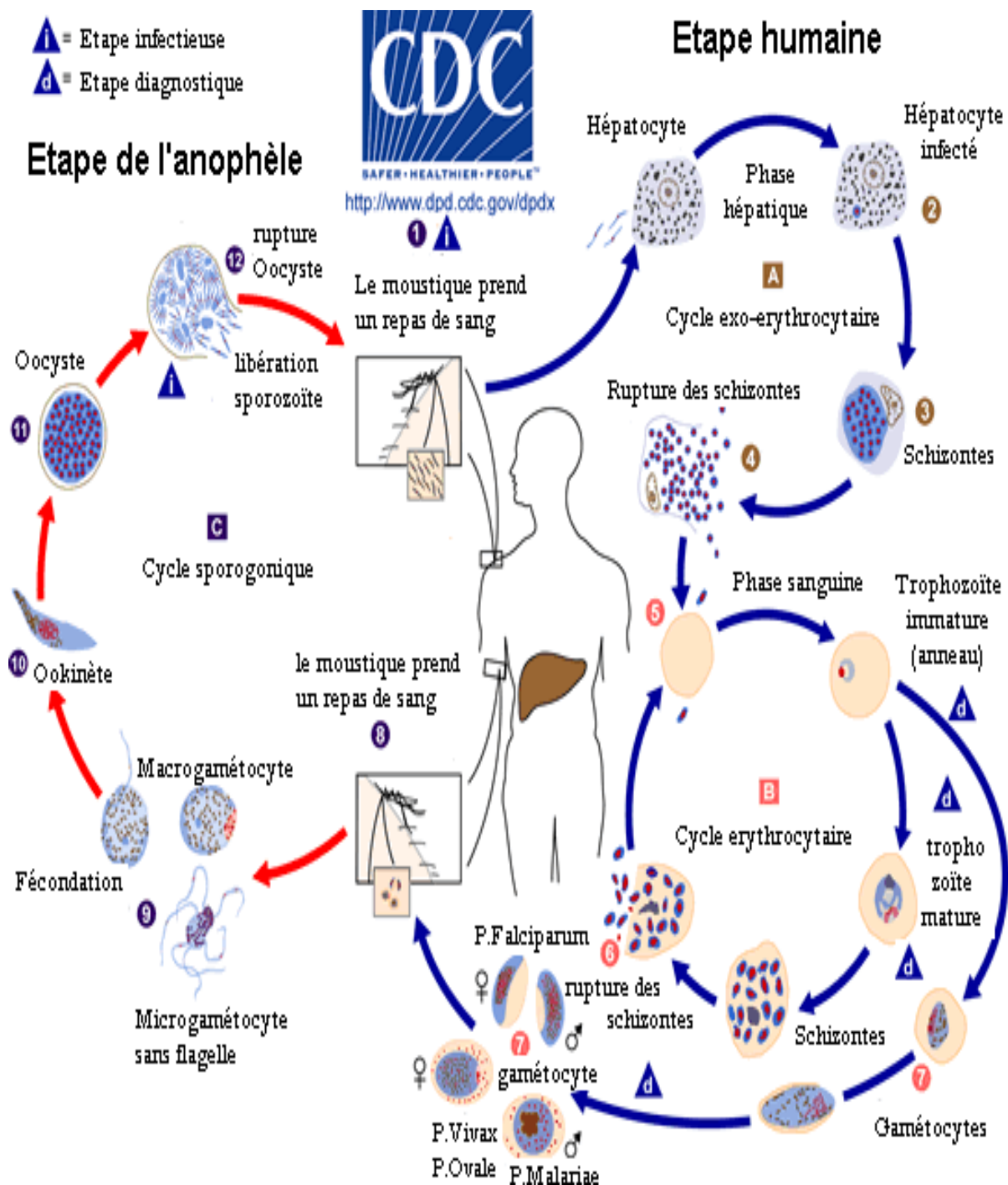


Figure 2: Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'homme et le moustique [38]

3.1.5 Diagnostic Biologique

3.1.5.1 Diagnostic de présomption

L'hémogramme révèle une anémie de type hémolytique, normochrome ou hypochrome, avec ou sans réticulocytose. Au cours des accès aigus et dans les accès pernecieux, 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 [39].

3.1.5.2 Diagnostic parasitologique [40]

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 ces techniques sont des méthodes de diagnostic direct.

3.1.5.3 Le frottis mince et la goutte épaisse

Elles demeurent la référence, elles 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).

Le frottis mince permet :

- ✓ L'étude morphologique des hématozoaires,
- ✓ Le diagnostic différentiel entre les espèces plasmodiales (il reste toujours un défi même pour un lecteur averti).

3.1.5.4 La goutte épaisse

Examen de référence de l'OMS, elle est largement utilisée pour le diagnostic de routine. Sa sensibilité (seuil de détection d'hématies parasitées/ μl) est de 20 hématies parasitées/ μl , 10 fois plus élevée que celle du frottis mince (100 à 200). Le problème du diagnostic d'espèce se pose rarement et l'incertitude est le plus souvent sans conséquence sur la conduite thérapeutique.

3.1.5.5 Quantitative Buffy-coat

Elle consiste en la coloration fluorescente des acides nucléiques par l'acridine orange et est dénommée malaria-test QBC (*quantitative buffy-coat*). Cette technique nécessite un équipement particulier. Sa sensibilité est de 5 hématies parasitées/ μL .

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

3.1.5.6 Diagnostic immunologique : ELISA et IFI

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 sera révélé par addition d'un substrat spécifique de l'enzyme.

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

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

3.1.5.7 Les tests de diagnostic rapides

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

Plusieurs tests de diagnostic rapide (TDR) par immunochromatographie sont disponibles. Ils sont classés en fonction du nombre d'antigènes détectés. La plupart, à l'exception de la série OptiMalt, permettent la mise en évidence de l'HRP2 (*Histidin Rich Protein 2*), spécifique de *P. falciparum* ; certains permettent la mise en évidence de la pLDH (Plasmodium lactate déshydrogénase) : 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.

La forme la plus simple est celle d'une bandelette qui est placée dans des puits contenant du sang et/ou une solution tampon. La bandelette de nitrocellulose peut être placée dans une cassette en plastique ou sur une carte. Les tests rapides antigéniques

sont simples d'utilisation, rapides et d'un apport précieux en poste isolé. Cependant, les tests rapides ont des limites :

- Les faux négatifs sont dus à une faible parasitémie de l'ordre de 100 parasites par μL ,

Soit 0,002% d'hématies infectées. Or, il est fréquent de mettre en évidence en pathologie d'importation ou chez le voyageur non immun en zone d'endémie sous chimioprophylaxie non ou mal adaptée des parasitémies très faibles. Le résultat des TDR peut donc être faussement négatif ;

- les faux positifs, moins bien connus, sont dus à une lecture trop tardive après le dépôt des réactifs, à la présence d'auto anticorps ou de facteur rhumatoïde à des taux élevés. De plus, la persistance de la circulation de l'HRP2 après disparition des parasites du sang circulant est trouvée jusqu'à 15 jours après négativité des tests microscopiques.

Ces tests ne doivent pas être employés seuls.

3.1.5.8 Réaction de polymérisation en chaîne

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

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

3.1.6 Manifestation du paludisme [21]

3.1.6.1 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.

3.1.6.2 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.

3.1.6.3 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.

3.1.6.4 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.

3.1.7 Médicaments utilisés dans la lutte contre le paludisme

Les antipaludiques ou antimalariques sont des médicaments de synthèse chimique ou extraits de plantes destinées à traiter ou prévenir le paludisme.

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

3.1.7.1 Classification des antipaludiques

Nous pouvons classer les antipaludiques en fonction de leur mode d'action ou la structure chimique.

3.1.7.1.1 Schizonticides érythrocytaires

Nous avons :

- Les Amino-4-quinoléines : chloroquine (Nivaquine®), amodiaquine (Flavoquine®), pipéraquline ;
- Les Amino-alcools : quinine (Quinimax®, Surquina®, Quinine Lafranc®), méfloquine (Lariam®), halofantrine (Halfan®), Luméfantrine ;
- Les Sesquiterpènes : artémisinine et ses dérivés : dihydroartémisinine, artémether, artésunate ;
- Les Antimétabolites : deux médicaments (Sulfadoxine et Pyriméthamine) de ce groupe sont objets de notre étude.

En ce qui concerne les métabolites, nous avons : les antifoliques (sulfadoxine, dapsonne) et les antifoliniques [proguanil (Paludrine®), pyriméthamine (Malocide®)].

La Sulfadoxine : elle est dirigée contre l'acide folique, c'est un inhibiteur du dihydroptéroate synthétase (DHPS). Elle renforce l'action antimalarique de la pyriméthamine. Elle est à la fois un antibactérien et un antipaludique.

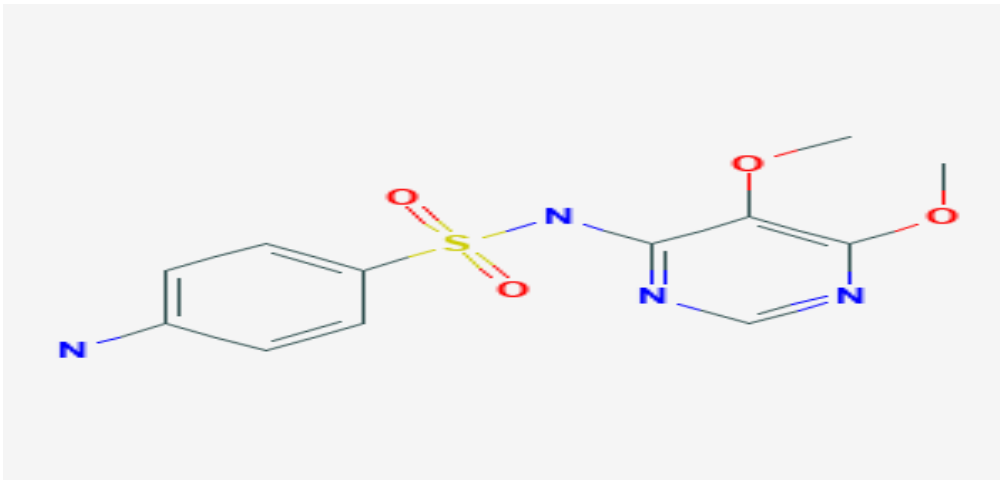


Figure 3: Structure de la sulfadoxine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/347913195>

La Pyriméthamine et le Proguanil : Ce sont des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (DHFR) empêchant ainsi la transformation de l'acide dihydrofolique en acide tetrahydrofolique conduisant à l'acide folinique, métabolite indispensable à la croissance du parasite intra globulaire.

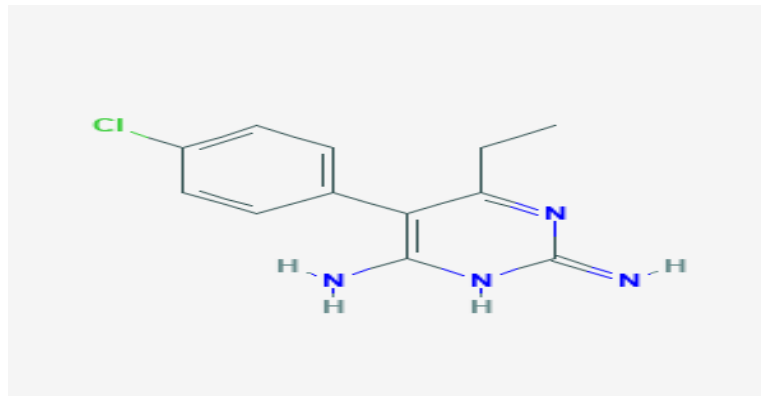


Figure 4: Structure de la pyriméthamine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/274087008>

- Antibiotiques : cyclines (Doxypalu®, Granudoxy®Gé, Vibraveineuse®), clindamycine (Dalacine®, Zindacine®),
- Analogues de l'ubiquinone : atovaquone.

3.1.7.1.2 Schizonticides intrahépatiques :

- Amino 8 quinoléines : primaquine (Primaquine®), tafénoquine.
- Antimétabolites : proguanil, cyclines.

3.1.7.1.3 Gamétocytocides

- Amino-8-quinoléines : primaquine (Primaquine®), tafénoquine.

3.1.7.1.4 Associations d'antipaludiques à effet synergique schizonticide

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

Certaines de ces associations sont déjà anciennes :

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

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

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

3.1.8 Modes d'action des antipaludiques [41]

3.1.8.1 Inhibition de la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive du *Plasmodium*

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

3.1.8.2 Alkylation des métabolites de l'hémoglobine, production de radicaux libres

- ✓ Les Artémisinines

3.1.8.3 Blocage de la fabrication des acides nucléiques

- ✓ Cytochrome bc → baisse d'ATP : atovaquone
- ✓ Inhibition de la DHPS : sulfadoxine, dapsonne (antifoliques)
- ✓ Inhibition de la DHFR : pyriméthamine, cycloguanil (antifoliniques)

3.1.8.4 Intérêt de l'utilisation de la sulfadoxine en association avec la pyriméthamine

La sulfadoxine est utilisée en association avec la pyriméthamine. L'association a une activité schizontocide en inhibant le métabolisme de l'acide folique (elle bloque la déhydrofolate réductase) dont l'hématozoaire a besoin pour sa croissance.

L'association sulfadoxine-pyriméthamine se montre efficace vis-à-vis de souches de *Plasmodium* résistantes à d'autres antipaludiques. Toutefois, il existe des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à cette association. Les sulfamides sont peu efficaces sur *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*.

La Sulfadoxine (dosée à 500mg) a un temps de vie $T_{1/2} \approx 8$ jours qui est plus long que celui de la Pyriméthamine (dosée à 25 mg) qui a $T_{1/2} \approx 4$ jours. La Sulfadoxine agit par inhibition de la dihydroptéroate synthétase (dhps). La pyriméthamine agit par inhibition de la dihydrofolate réductase (dhfr). Ces temps de demi-vie leur confèrent des propriétés préventives contre le paludisme pendant une longue période pouvant atteindre un mois.

L'action concomitante de la Sulfadoxine et de la Pyriméthamine sur les enzymes de la chaîne de synthèse de l'acide tetrahydrofolique (THF) dans les parasites minimise les risques de mutations enzymatiques ponctuelles et favorise leur efficacité contre *Plasmodium falciparum*.

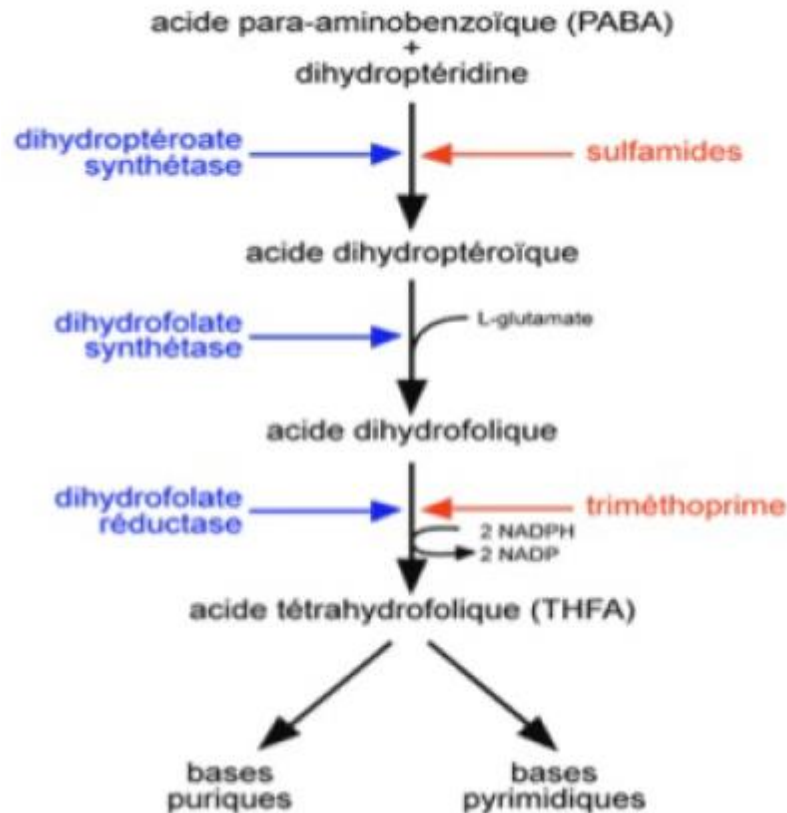


Figure 5 : Schéma du mécanisme d'action des antifolates [42]

3.1.9 Pharmacocinétique des antipaludiques couramment utilisés en association

✓ La Quinine : c'est un schizonticide endo-érythrocytaire

La quinine est un alcaloïde extrait des écorces du Quinquina.

Elle reste en pratique le traitement de référence des formes graves du paludisme à *P. falciparum*. Elle se présente en ampoules, comprimés, suppositoires, suivant la gravité du tableau clinique, la voie d'administration et la posologie sont différentes :

- En cas d'accès simple : posologie classique de 24 mg/Kg/Jours (en pratique 8 mg/kg de quinine toutes les 8 heures, pendant 7 jours, injectable ou per os),
- En cas de critères de gravité, la dose de charge : 17 mg/kg de quinine en 4 heures. Puis une dose d'entretien de 8 mg/kg en 4 heures. Toutes les 8 h, en perfusion intraveineuse obligatoire, pendant 7 jours,

Si le paludisme est contracté en zone de quininorésistance (Asie du Sud-Est, Amazonie) : adjoindre la doxycycline, 200 mg/j ou la clindamycine, 10 mg/kg toutes les 8 heures

Elle peut s'administrer par voie intra-rectale biquotidienne : 15 à 20 mg/kg de quinine diluée (Quinimax® solution injectable), à renouveler éventuellement 12 heures après.

Absorption : rapide par voie orale ou par voie intramusculaire, biodisponibilité : 80%, $T_{1/2} \approx 11$ h.

Métabolisme : le métabolisme se fait par l'intermédiaire du CYP3A4.

Élimination: Elle est rénale, 20% sont éliminés sous forme inchangée, 80% sous forme de métabolites dont un actif, d'où les adaptations de la posologie chez les insuffisants rénaux.[43]

Effets indésirables : [43]

Ils sont dose-dépendants :

- Fréquent, peu grave : cinchonisme (acouphènes, vertiges, céphalées, troubles de la vision, baisse aiguë de l'acuité auditive, troubles digestifs, vasodilatation périphérique) ;
- Hypoglycémie par augmentation de la sécrétion d'insuline.

D'autres effets indésirables sont relatifs à la toxicité. Les signes de toxicité surviennent pour des concentrations plasmatiques élevées lors d'accès palustres graves. Ce sont principalement :

- Toxicité cardiovasculaire : trouble de la conduction, troubles du rythme cardiaque, allongement de l'espace QT ;
- Toxicité oculaire perte passagère de vision par atteinte des cellules rétiniennes ;
- Toxicité auditive : altération de l'audition pour des fréquences élevées, acouphènes ;
- Toxicité neurologique : vertiges ;
- Toxicité cutanées photosensibilisation ;
- Toxicité hématologique.

✓ **Méfloquine**

L'administration se fait seulement par voie orale.

Absorption orale : On observe une bonne biodisponibilité (85%) augmentée par prise d'aliments et une très forte fixation aux protéines plasmatiques (98%).

Métabolisme : Il se fait par le CYP3A4 en métabolites inactifs.

Elimination: Lente inférieur à 10% sous forme inchangée dans les urines, 90% dans les fèces, $T_{1/2} \approx 15-22$ jours [43].

Effets indésirables [43]

Les effets indésirables sont relativement fréquents mais bénins, ce sont des troubles neuropsychiatriques qui peuvent survenir plusieurs semaines après l'arrêt du traitement du fait de la longue demi-vie de la méfloquine. Ces effets neuropsychiatriques (1/2000 en traitement curatif et 1/15000 en prophylaxie) sont : confusion, agitation, insomnie, vertiges, convulsions, diplopie, troubles de la conscience. Ils sont vraisemblablement dose-dépendants et favorisés par la prise d'alcool.

Autres effets indésirables : effets digestifs 7-20% (nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées).

La méfloquine peut entraîner des troubles du rythme cardiaque, le plus souvent des bradycardies.

✓ Amodiaquine :

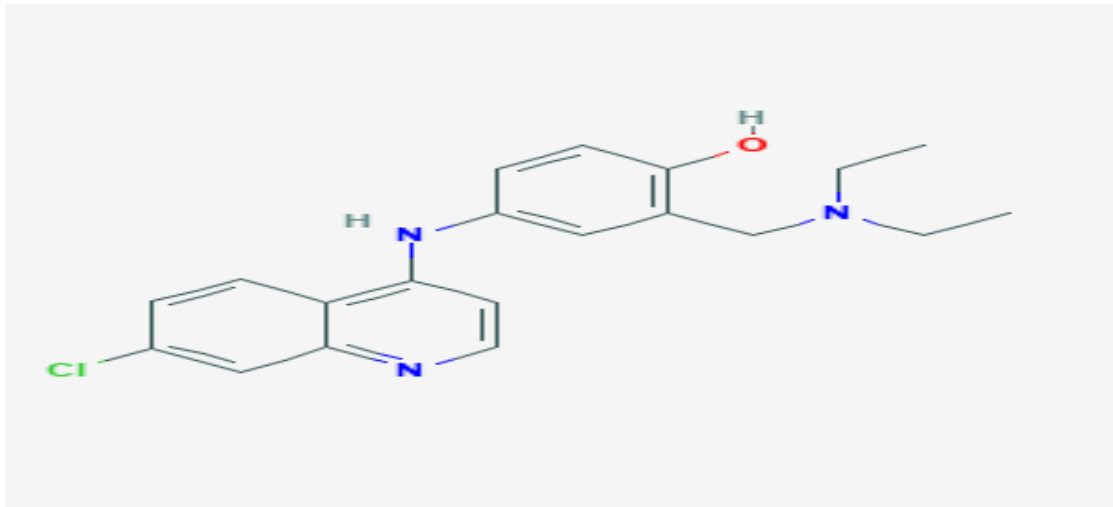


Figure 6: Structure chimique de l'amodiaquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/319061512#section=Top>

Les amino-4 quinoléines, à des doses assez élevées ont des propriétés anti-inflammatoires utilisées en rhumatologie dans le lupus érythémateux et la polyarthrite rhumatoïde

Après prise orale, l'absorption est totale et rapide. Le pic sérique est atteint entre la 2^e et la 4^e heure. Les amino-4 quinoléines se fixent aux protéines

sériques et dans certains tissus (foie, reins, rate, cœur). L'élimination rénale est très lente, d'où la possibilité de prises espacées.

Effets indésirables [43]

Rares aux doses utilisées en paludologie, des effets indésirables peuvent survenir dans le traitement de maladies du collagène qui nécessitent des doses trois fois plus élevées. Dans ce cas, peuvent apparaître :

- Des troubles nerveux : vertiges, céphalées
- Des troubles oculaires : rétinopathie non réversible
- ✓ **Dérivés de l'artémisinine** : artémether, artésunate, dihydroartémisinine

Les deux autres dérivés ont pour métabolite actif la dihydroartémisinine.

Absorption orale : l'absorption est rapide, le pic de concentration est atteint en 2 heures, la fixation aux protéines plasmatiques est de 95%.

Métabolisme : ils sont métabolisés par le CYP3A4 et CYP2C19 en dihydroartémisinine, métabolite actif, puis en métabolites inactifs, l'artémether induit son propre métabolisme.

Elimination : Ils sont éliminés sous formes de métabolites dans les urines et les fèces. Le temps de demi-vie $T_{1/2}$ de l'artémether et la dihydroartémisinine est d'environ 2 heures [43].

Effets indésirables [43]

Ils sont bien tolérés,

- Allergie dans 1 cas sur 3000,
- Dans de rares cas, des palpitations, céphalées, étourdissement, toux, douleurs abdominales, arthralgie, myalgie en cas de surdosage.
- ✓ **La Luméfantrine** :

Absorption : Elle débute 2 heures après son administration, la Luméfantrine est un composé très lipophile. Le pic de concentration est atteint 6-8 heures après son administration. Un repas riche en graisse augmente d'un facteur 2 l'absorption de la Luméfantrine chez un impaludé. A jeun, le taux d'absorption est inférieur à 10% donc toujours prendre avec un repas ou avec une boisson lactée.

Métabolisme : elle est métabolisée en desbutyl-luméfantrine par le CYP3A4, métabolite 5 à 6 fois plus antipaludéen que la luméfantrine *in vitro*, ce métabolite ne représente que 1% de l'exposition systémique à la luméfantrine.

Elimination : elle est fécale, principalement sous forme inchangée. La luméfantrine inhibe le CYP2D6. Son temps de demi-vie $T_{1/2}$ =2-3jours.

Effets indésirables [43]

Essentiellement, des troubles digestifs, une élévation modérée des transaminases et souvent des troubles du rythme ventriculaire

✓ **La Primaquine (Primaquine®) :**

La primaquine est le seul gamétocytocide disponible qui « efface » les gamétocytes de *P. falciparum* matures chez l'homme, empêchant ainsi la transmission de l'hématozoaire aux moustiques.

Effets indésirables :

Les troubles digestifs, méthémoglobinémie, agranulocytose, hémolyse chez les sujets ayant un déficit en G6PD.

L'hémolyse due à la primaquine est dose-dépendante chez les déficitaires en G6PD [43].

Dérivés de l'artémisinine en monothérapie :

- **Artémether** (Paluther®) : c'est un dérivé de l'artémisinine utilisé seul par voie injectable. Il se présente en ampoules pour intramusculaire profonde (ampoules de 40 mg/0,5 ml et 80 mg/1 ml). Il est prescrit dans les formes graves à *P. falciparum* à la posologie de 1,6 mg/kg toutes les 12 heures à J1 (3,2 mg/kg/24h), puis 1,6 mg/kg/24h de J2 à J5. Il peut être utilisé dans des régions peu médicalisées, compte tenu de son mode d'administration par voie IM. Il est bien toléré.
- **Artésunate** : [4] L'OMS recommande l'utilisation de l'artésunate IV en première intention dans le paludisme grave à *P. falciparum* chez l'enfant et l'adulte. L'artésunate existe sous forme de poudre pour injection et des gélules rectales. Son administration se fait selon la posologie de 2,4 mg/kg à heure 0, heure 12, heure 24 et toutes les 24 heures pendant 3 jours. Le relais est pris par un antipaludique oral après 3 jours.

3.1.10 Sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar®)

Il se présente en comprimés à 500 mg de sulfadoxine et 25 mg de pyriméthamine ; posologie : 3 comprimés en une prise (adulte), enfant : 1cp/10 kg. Cette combinaison a une toxicité hématologique et cutanée.

3.1.11 Association atovaquone + proguanil (Malarone®)

Elle est prescrite dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* et en chimioprophylaxie du paludisme à *P. falciparum*. La posologie dans le traitement de l'accès simple est de 8 mg/kg/j pendant 3 jours en prise unique quotidienne, soit 4 comprimés chez l'adulte par jour s'il a plus de 40 kg de poids, 3 comprimés chez l'adulte de 31 à < 40 kg, 2 comprimés chez l'adultes de 21 à < 30 kg, 1 comprimé chez l'adulte de 11 à < 20 kg. Chez l'enfant de moins de 11 kg : 2 comprimés par jour chez l'enfant de 5 à < 9 kg, 3 comprimés par jour chez l'enfant de 9 à < 11 kg de poids. Cette association a une action sur les souches hépatocytaires de *P. falciparum*. Elle est bien tolérée, quelques troubles digestifs sont signalés. Les différents dosages sont :

Dosage adultes et enfants > 40 kg : comprimés à 250 mg d'atovaquone et à 100 mg de proguanil ;

Le dosage pour enfants de 11 à 40 kg : comprimés à 62,5 mg d'atovaquone et à 25 mg de proguanil.

3.1.12 Association artémether + luméfantrine (Coartem®/Riamet®)

Cette association se présente en comprimés à 20 mg d'artémether et à 120 mg de luméfantrine et est prescrit pour le traitement de l'accès palustre simple à *P. falciparum* : 4 comprimés en 2 prises par jour pendant 3 jours (dose adulte). Actuellement, on rencontre également cette combinaison de plus en plus en comprimés de 80 mg d'artémether et à 480 mg de luméfantrine en boîte de 6 comprimés pour adulte de poids supérieur ou égale à 35 Kg. Il n'est pas utilisé en chimioprophylaxie. Les effets secondaires sont des troubles du sommeil, des céphalées, des étourdissements, des troubles digestifs, un prurit. Il n'y a pas de cardiotoxicité. Il y a une présentation pédiatrique : Coartem® dispersible formulation pédiatrique.

3.1.13 Association artésunate + amodiaquine

Cette association se trouve sous forme **libre** (Arsucam®) et sous forme fixe (AS/AQ®, Coarsucam®). Elle est prescrite dans le traitement de l'accès palustre simple à *P. falciparum* en Afrique. La posologie est d'une prise par jour pendant 3 jours. Il y a quatre dosages selon l'âge : 3-11 mois, 1 comprimé AS/AQ 25 mg/67,5 mg ; 1 à 6 ans, 1 comprimé 50 mg/135 mg ; 7 à 13 ans, 1 comprimé 100 mg/270 mg ; 14 ans et au-dessus, 2 comprimés (100 mg/270 mg).

3.1.14 Association artésunate + méfloquine

L'association existe également en association libre (Artequin®) ou en association fixe (AS/MQ®), qui est recommandées par l'OMS pour le traitement du paludisme à *P. falciparum* non compliqué. La posologie est d'une prise par jour pendant 3 jours. Il se présente en comprimés AS/MQ 25 mg/50 mg et 100mg/200 mg.

3.1.15 Traitement du paludisme

3.1.15.1 Traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* [4]

Dans les cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum*, l'OMS recommande de traiter avec une des associations à base d'artémisinine suivante :

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

Le traitement à base d'artémisinine doit s'étendre sur au moins trois jours.

- Chez les enfants de moins de 25Kg traités avec la dihydroartémisinine + Pipéraquline, ils doivent recevoir au minimum de 2,5mg/kg de poids corporel de dihydroartémisinine par jour et 20mg/kg de poids corporel de pipéraquline par jour pendant trois (03) jours.

Au cours du premier trimestre de la grossesse, le traitement s'étend sur 7 jours et s'effectue avec la Quinine + Clindamycine.

- Chez les nourrissons de moins de cinq (05) kilogrammes, le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* se fait avec les CTAs avec les

mêmes dosages que chez les enfants.

Chez les patients co-infectés au VIH/SIDA, l'OMS recommande d'éviter les associations [4] :

- Artésunate + SP si le patient est traité avec du Cotrimoxazole (triméthoprime plus sulfaméthoxazole) ;
- Artésunate + amodiaquine si le patient est traité avec Efavirenz ou Zidovudine

Chez les voyageurs non-immunisés, le paludisme simple à *Plasmodium falciparum* sera traité avec les CTAs avant leur retour en zone non-endémique.

3.1.16 Traitement du paludisme simple aux autres espèces plasmodiales [4]

Lorsque l'espèce plasmodiale n'est pas connue avec certitude, le traitement peut se faire avec le protocole de traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum*.

Dans les zones où le *Plasmodium* a déjà été déclaré résistant à la chloroquine, le traitement se fera avec les CTAs.

3.1.17 Traitement du paludisme grave [4]

L'adulte et l'enfant qui ont le paludisme grave (y compris les nourrissons, les femmes enceintes à tous les stades et les femmes allaitantes) doivent être traités avec de l'artésunate en injection intraveineuse ou intramusculaire pendant au moins 24 heures jusqu'à ce que le patient tolère l'administration du médicament par la voie orale puis compléter le traitement avec trois (03) jours de traitement avec les CTAs.

L'administration de l'artésunate se fait à raison de 3mg/kg de poids corporel chez les enfants de moins de 20kg et 2,4mg/kg de poids corporel chez le grand enfant et l'adulte.

Dans les milieux où l'artésunate n'est pas disponible en injectable, il faut préférer l'artémether injectable que la quinine dans les cas de paludisme grave chez l'enfant et l'adulte.

3.1.18 Prophylaxie [33]

3.1.18.1 Lutte antivectorielle

La lutte antivectorielle est essentiellement basée sur :

- L'aménagement de l'environnement destiné à diminuer le nombre de gîtes des

anophèles,

- La technique de l'insecte stérile : elle permet l'éradication ou la diminution d'une population d'insectes, les mâles irradiés par un rayonnement gamma (bombe au Cobalt 60) deviennent sexuellement stériles à cause de mutations dominantes au niveau du sperme.
- Les aspersions intra-domiciliaires d'insecticides à effet rémanent,
- Les moustiquaires imprégnées d'insecticides : outil majeur de prévention du paludisme au niveau communautaire selon la stratégie de lutte recommandée par l'OMS. Mais la résistance des vecteurs est préoccupante, et il est nécessaire de ré-imprégner régulièrement les moustiquaires pour maintenir leur efficacité. Actuellement, il y a un développement de moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée d'action (MIILDA) [OLYSET®, PERMANET®] avec une efficacité de 5 ans.
- Les ports de vêtements imprégnés d'insecticides (utilisés par les armées)
- Les répulsifs (insecticides ou repellents). Beaucoup de répulsifs sont disponibles sur le marché. Deux produits sont recommandables en pratique : le DEET et le KBR 3023.

3.1.18.2 Chimio prophylaxie

3.1.18.2.1 Chimio prophylaxie des expatriés et des voyageurs [4]

La prophylaxie médicamenteuse est indispensable pour les zones à *P. falciparum*. Elle n'est pas efficace à 100%. Elle doit être prise pendant tout le séjour et après le retour pendant une durée variant avec l'antipaludique.

- Schéma prophylactique pour l'adulte suivant les groupes 1, 2 ou 3 :
 - **Pays du groupe 1** : chloroquine (Nivaquine®) 100 mg/j, séjour + 4 semaines après,
 - **Pays du groupe 2** : association chloroquine (100 mg/j) + proguanil (200 mg/j) (Savarine®) 1 comprimé par jour, séjour + 4 semaines après ; ou association atovaquone + proguanil (Malarone®) : dose chez les sujets de plus de 40 kg : 1 comprimé adulte (250 mg/100 mg) par jour, séjour + une semaine après.
 - **Pays du groupe 3** : trois choix sont possibles :
 - choix n°1 : Lariam®, comprimés à 250 mg, 1 comprimé par semaine, 10 jours avant + séjour + 3 semaines après,

- choix n°2 : Malarone® : même dose que pour les pays du groupe 2, séjour + une semaine après,
- choix n°3 : doxycycline (Doxypalu®, Granulodoxyl®Gé), comprimés à 100 et 50 mg: 100 mg chez l'adulte et chez l'enfant de plus de 8 ans ou pesant plus de 40 kg, 50 mg chez l'enfant de plus de 8 ans pesant moins de 40 kg, séjour+ 4 semaines après.
- Schéma prophylactique chez la femme enceinte suivant les groupes 1, 2 ou 3 :
 - **pays du groupe 1** : Nivaquine®
 - **pays du groupe 2** : Savarine® ou Malarone®,
 - **pays du groupe 3** : séjour déconseillé, si séjour indispensable : Lariam® ou Malarone®
 - Schéma prophylactique Nivaquine chez l'enfant
- **pays du groupe 1** : Nivaquine®
- **pays du groupe 2** : association chloroquine (Nivaquine®) 1,5 mg/kg/j + proguanil (Paludrine®) 3 mg/kg/j (la Savarine® n'étant prescrite qu'à partir de 15 ans) ou Malarone®, comprimé enfant (62,5 mg/25 mg) suivant poids : 1 cp/j de 11 à 20 kg, 2 cp/j de 21 à 30 kg, 3 cp/j de 31 à 40 kg à heure fixe et en prise unique.
- **pays du groupe 3** : si poids > 15 kg ou âge > 3 ans : Lariam®; alternative : doxycycline si > 8 ans ou Malarone® si poids entre 11 kg et 40 kg : de 11 à 20 kg 1cp/j, de 21 à 30 kg : 2cp.j, de 31 à 40 kg : 3 cp/j. Si enfant < 11 kg, ½ cp/j de 5 < 7 kg (hors AMM), ¾ cp/j de 7 < 11kg (hors AMM).

La chimioprophylaxie doit être poursuivie pendant 4 semaines après le retour, sauf pour le Lariam® pendant 3 semaines et pour la Malarone® pendant une semaine seulement, ce court délai s'expliquant par l'activité schizonticide de la Malarone® dans les formes tissulaires de *P. falciparum* en développement transitoire dans le foie.

3.1.18.2 Traitement Préventif Intermittent (TPI) des femmes enceintes et des enfants des pays en développement [4]

Le traitement préventif intermittent (TPI) consiste à l'administration intermittente et systématique d'antipaludiques : amodiaquine ou sulfadoxine-pyriméthamine (SP) chez les femmes enceintes à titre prophylactique. La chimioprophylaxie est recommandée par l'OMS pendant la grossesse, associée aux moustiquaires imprégnées, dans les zones de haute transmission d'endémie palustre. La SP est utilisée préférentiellement

lors des visites prénatales (femmes enceintes ayant plus de 16 semaines d'aménorrhée). Il faut prescrire deux doses de TPIp séparées d'au moins un mois, 3ème dose si la femme enceinte est séropositive, trois comprimés de SP en prise unique.

Le traitement préventif intermittent chez les enfants (TPIe) réduit la prévalence de l'infection palustre. La chimioprevention du paludisme saisonnier (CPS) est recommandée chez les nourrissons de 3-11 mois et les enfants de 12-59 mois. Elle associe l'amodiaquine et la sulfadoxine-pyriméthamine. Chez les nourrissons : un demi-comprimé de 153 mg d'Amodiaquine une fois par jour pendant 3 jours et une dose unique d'un demi-comprimé de 500/25 mg de SP. Chez l'enfant, un comprimé entier de 153 mg d'Amodiaquine une fois par jour pendant 3 jours et une dose unique d'un comprimé entier de 500/25 mg de SP. La CPS est prescrite pendant la période durant laquelle le risque de contracter le paludisme est le plus élevé pour les enfants : par exemple au Mali en Août, Septembre et Octobre, donc en trois occasions à un mois d'intervalle. La CPS doit être couplée à l'utilisation des moustiquaires imprégnées, ce qui permet de réduire de façon substantielle l'infection par le *Plasmodium*, le développement du paludisme et l'anémie. La mise en œuvre du traitement préventif intermittent du paludisme chez les enfants de moins de 5 ans (TPIe) a été lente au départ mais elle a connu une accélération notable à partir de 2015.

3.1.18.2.3 Effets indésirables des médicaments antimalariques en chimioprophylaxie

Tous les médicaments antimalariques utilisés en chimioprophylaxie : chloroquine, méfloquine, doxycycline, chloroquine + proguanil, atovaquone + proguanil ont des effets indésirables, neuropsychiques, digestifs, cutanés, en règle non graves. La méfloquine a la plus haute proportion de manifestations neuropsychiques surtout chez les femmes (céphalées, vertiges, troubles psychiques : tendance dépressive, confusion, obnubilation, anxiété, hallucinations). L'association chloroquine + proguanil a la plus haute proportion de troubles cutanés (prurit, éruptions). Tous entraînent des troubles digestifs. La photosensibilité à la doxycycline est dose dépendante, non significative à 50 mg, peu significative à 100 mg, fréquente à 200 mg. Une des complications potentielles de la doxycycline est la diarrhée à *Clostridium difficile*, elle est très rare et ne doit pas faire éliminer ce médicament dans cette indication.

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

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

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

Figure 7 : Séquences des acides aminés de K1 [44]

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

Figure 8 : Séquences des acides aminés de MAD20 [44]

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

Figure 9 : Séquences des acides aminés de RO33 [44]

3.1.20 Résistance du *Plasmodium* aux antipaludiques

La résistance du *Plasmodium* aux médicaments est en grande partie expliquée par sa capacité à développer des gènes de résistances. En 1996, un consortium a été formé pour séquencer le génome de *Plasmodium falciparum* qui renferme 14 chromosomes [45]. Ce consortium comprenait le centre de Sanger (qui était en charge des chromosomes 1, 3 à 9 et 13), l'université de Stanford (qui était en charge du chromosome 12) et l'institut pour la recherche de génomique et le programme de malaria du centre naval de recherches médicales (qui était en charge des chromosomes 2, 10, 11 et 14). Le consortium a présenté le génome en 2002. Le nombre de gènes situés sur ces 14 chromosomes est estimé à 5314 [45]. Notre étude concerne le gène *Pfdhfr* qui est situé sur le chromosome 4 et le gène *Pfdhps* situé sur le chromosome 8.

3.1.20.1 Les aminoquinoléines : la chloroquine

Le gène de la résistance à la chloroquine a été identifié en 2000. La substitution de la Lysine par la Thréonine en position 76 du gène *Pfcr1* conduit à la mutation qui joue un grand rôle dans ce mécanisme de résistance à la chloroquine [12]. Ce gène est dénommé le *P. falciparum* chloroquine transporter (*Pfcr1*). Il est situé sur le chromosome 7 et code pour un transporteur membranaire de la vacuole digestive. La mutation sur le codon 76 (K→T), associée à sept autres points de mutation, permet au parasite de limiter l'accumulation de chloroquine dans sa vacuole digestive, où elle exerce son action inhibitrice. *Pfcr1* est également impliqué dans la baisse de sensibilité du parasite à l'amodiaquine et à la quinine. Dans les zones où les allèles de résistance ne sont pas fixés, on observe une augmentation de la fréquence de l'allèle sauvage après abandon de la chloroquine. L'analyse de ce locus renseigne sur la pression médicamenteuse exercée au sein des populations.

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

La résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine, une thérapie contre le paludisme largement utilisée notamment à la suite de l'échec de la chloroquine, a pris naissance dans la même région d'Asie du Sud-Est et se propage encore vers l'Afrique subsaharienne [9,16].

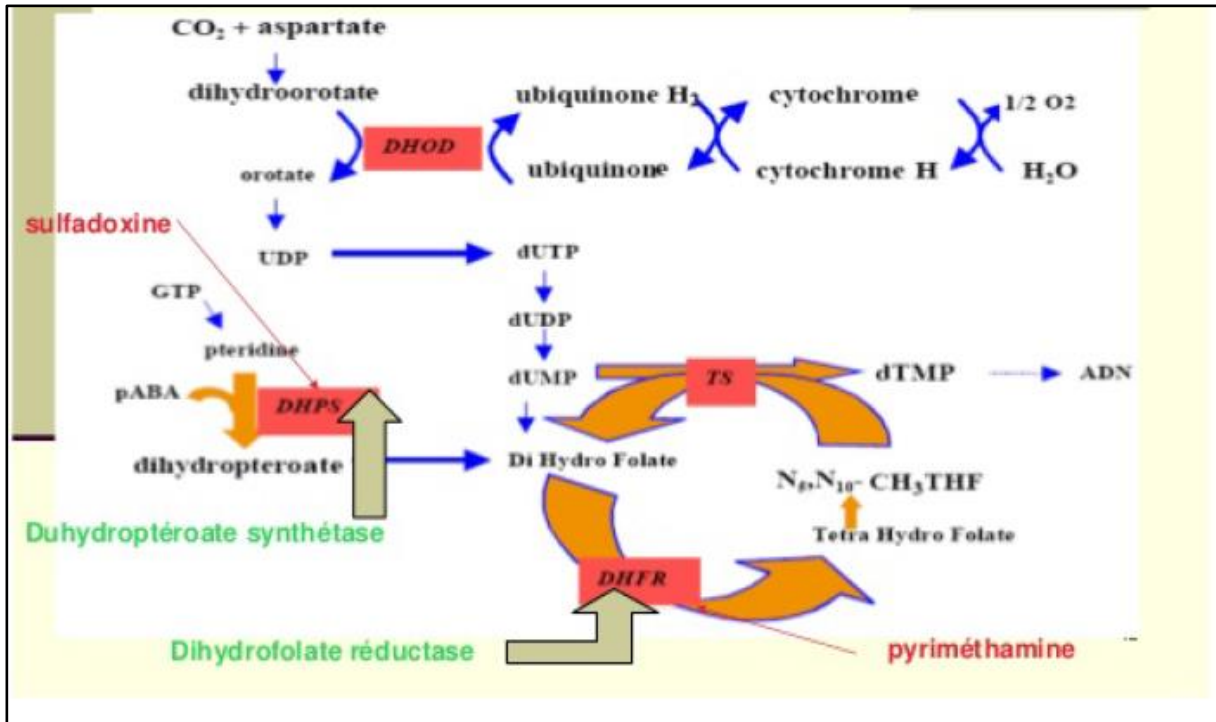


Figure 10: Mécanismes de résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine [46]

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

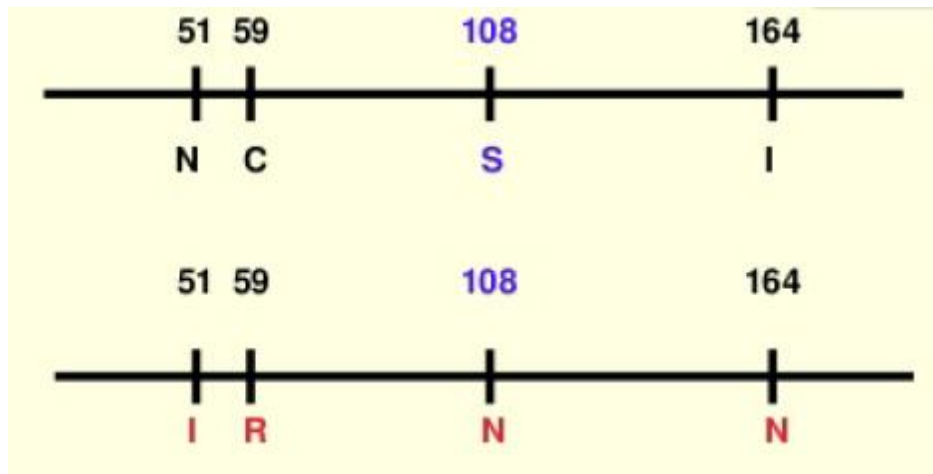


Figure 11 : Mutations sur le gène *Pfdhfr* associées à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la pyriméthamine [46]

Sur le gène *Pfdhfr*, la mutation à la position 108 est la plus fréquente et majeure, les positions 51 et 59 augmentent la résistance et la position 164 est rare en Afrique [42].

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

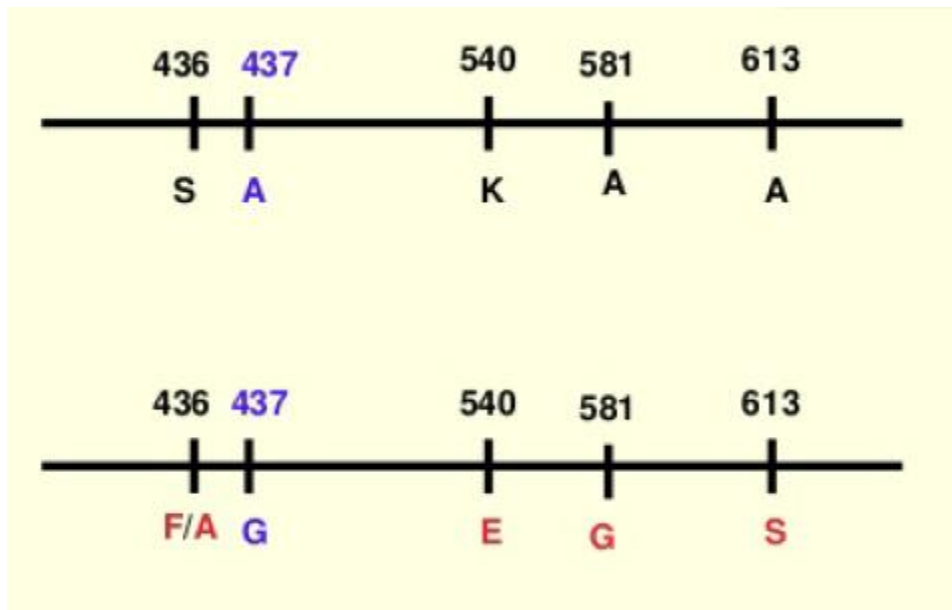


Figure 12: Mutations sur le gène *Pfdhps* associées à la résistance de *P. falciparum* à la Sulfadoxine[46]

Les mutations aux positions 437 et 540 sont majoritairement celles qui modifient la configuration de la *dhps* [42], les autres constituent des facteurs favorisant la résistance.

3.1.20.3 Les CTAs : résistance de *Plasmodium falciparum*

Au cours des dernières années, le nombre de personnes infectées par le paludisme, ou qui en sont mortes, a diminué de manière significative [25]. Ce succès est attribué à un accroissement de l'investissement dans la prévention et dans les mesures de traitement, notamment les moustiquaires de lit imprégnées d'insecticide et l'utilisation des thérapies combinées à base d'artémisinine qui se sont avérées très efficaces.

Toutefois, ces gains récents en vies sauvées sont menacés par l'apparition de la résistance à l'artémisinine et sa propagation dans de nombreuses régions d'Asie du Sud-Est [47]. La résistance aux thérapies couramment utilisées à base d'artémisinine a été fermement établie dans l'ouest du Cambodge, la Thaïlande, le Vietnam, la Birmanie orientale et dans le nord du Cambodge, tandis que des signes de résistance émergente ont été observés dans le centre de la Birmanie, le Sud du Laos et le Nord-Est du Cambodge.

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

3.2 Campagne de chimioprévention du Paludisme Saisonnier : CPS

3.2.1 Définition [5]

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

3.2.2 Zones géographiques recommandées

La CPS est recommandée dans les zones de forte transmission saisonnière dans toute la sous-région du Sahel. Un cycle de traitement complet par de la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et de l'amodiaquine (AQ) doit être administré à des enfants âgés de 3 à 59 mois à intervalles d'un mois, à partir du début de la saison de transmission, jusqu'à un maximum de quatre cycles pendant la saison de haute transmission du paludisme (à condition que les deux médicaments conservent une efficacité antipaludique suffisante). Les régions cibles pour la mise en œuvre sont celles dans lesquelles la transmission du paludisme et la majorité (> 60 %) des cas cliniques surviennent sur une courte période d'environ quatre mois, où l'incidence du paludisme dépasse 0,1 cas par saison de transmission dans la classe d'âges cible et où SP + AQ restent efficaces (efficacité > 90 %) [5].

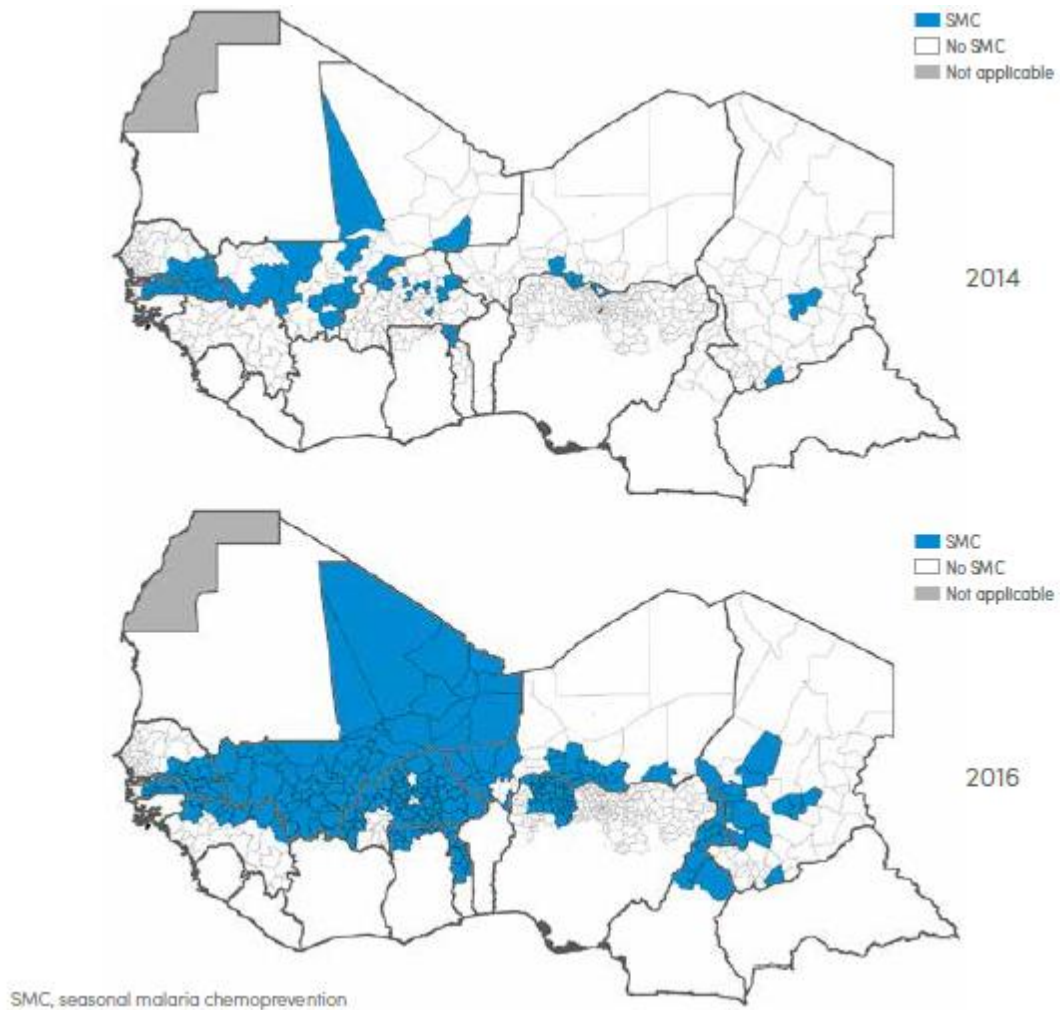


Figure 13 : Carte de la mise en œuvre de la CPS [25]

3.2.3 Posologie et fréquence d'administration recommandées en fonction de l'âge [5]

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

3.2.4 Contre-indications [5]

La CPS ne doit pas être administrée à :

- un enfant souffrant d'une maladie fébrile aiguë ou d'une maladie grave, incapable de prendre des médicaments par voie orale ;
- un enfant séropositif pour le VIH et recevant du cotrimoxazole en traitement

préventif ;

- un enfant qui a reçu une dose de SP ou d'AQ au cours du mois précédent ;
- un enfant allergique à la SP ou à l'AQ ;
- Les cas de crise de paludisme (confirmé) survenant au cours de la période d'administration de la CPS ne doivent pas être traités par des schémas thérapeutiques faisant intervenir SP ou AQ.

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

Un plan stratégique 2013-2017 de Prévention, de Prise en charge, de Surveillance, de recherche opérationnelle et partenariat RBM (Roll Back Malaria=faire reculer le paludisme) a été adopté. A la suite, un autre a été adopté ; il s'agit d'un plan national de communication et de plaidoyer en matière de lutte contre le Paludisme 2014- 2018 [6].

Le PNLP coordonne la mise en œuvre de la CPS en étroite collaboration avec les services décentralisés du Ministère de la santé. La mise en œuvre a commencé par des zones pilotes avant d'être élargit à la quasi-totalité du territoire national. Les zones qui concernent notre étude (Missira et Sélingué) ont bénéficié de la CPS pour la première en 2017.

Les différents passages de la CPS à Missira et à Sélingué en 2017 :

3.2.5 Les dates des différents passages de la CPS à Missira et à Sélingué en 2017

Date de passage	Sélingué	Missira
1 ^{er} passage	3-7 Juillet	8-12 Août
2 ^{ème} passage	8-12 Août	10-14 Septembre
3 ^{ème} passage	16-20 Septembre	16-20 Octobre
4 ^{ème} passage	18-22 Novembre	17-21 Novembre

METHODOLOGIE

4. MÉTHODOLOGIE

4.1 Contexte et justification de l'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la réalisation des activités du projet PMI 2017 au Mali par le LBMA, avec comme particularité, le déroulement des activités en même temps que les campagnes de chimioprévention saisonnière du paludisme chez les enfants de moins de cinq ans dans les localités de Missira et de Sélingué.

4.2 Sites d'étude

L'infirmierie de Missira (village) et le district sanitaire du CSREF de Sélingué ont servi de cadre pour l'accueil, le dépistage, la collecte des échantillons de sang veineux et le traitement des patients.

L'étude s'est tenue dans deux localités de faciès épidémiologiques du paludisme différents à savoir le faciès nordsoudanien et Sahel à Missira et le faciès des barrages à Sélingué. Missira est un village localisé dans la commune rurale de Sebecoro 1, dans le cercle de Kolokani, région administrative de Koulikoro. La zone irriguée de Sélingué est localisée dans la sous-préfecture de Kangaré, cercle de Yanfolila, région administrative de Sikasso.

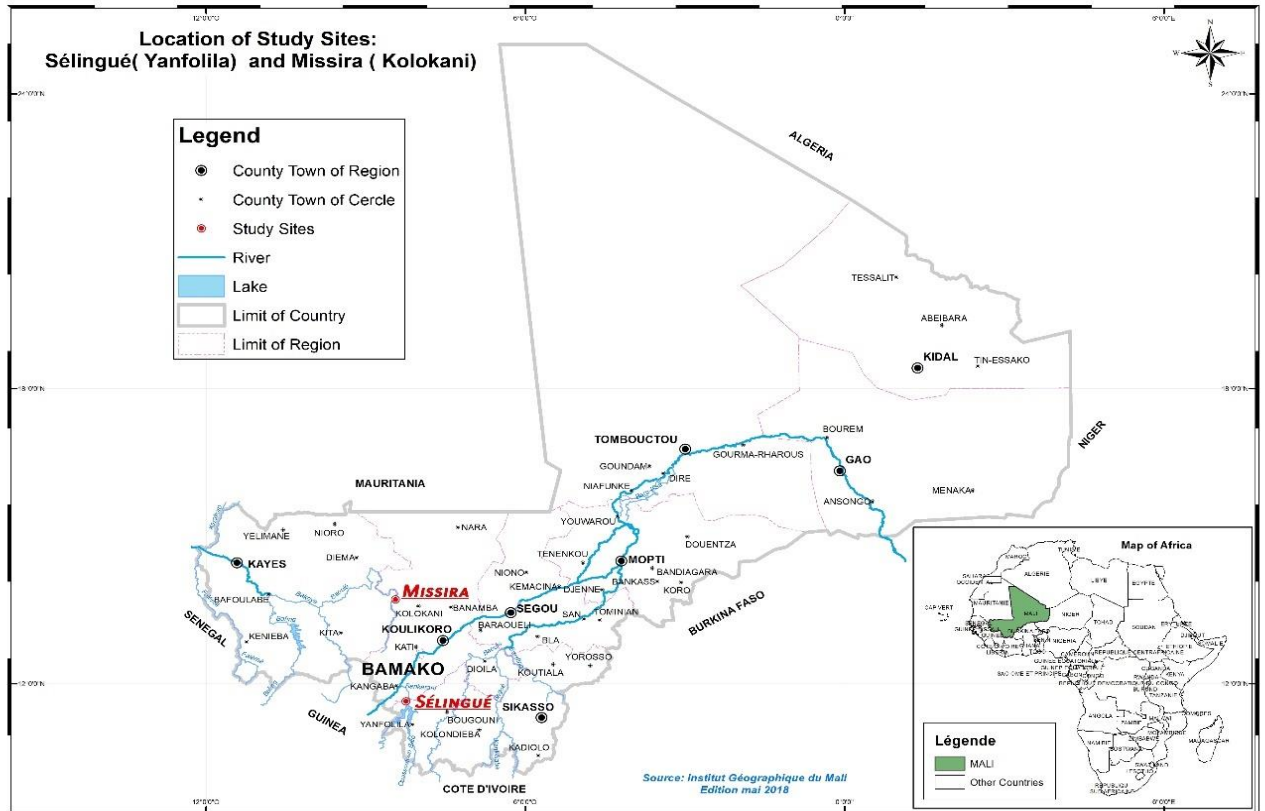


Figure 14 : Carte du Mali montrant les deux sites d'étude du projet PMI 2017 (source IGM)

4.2.1 Site de Missira

Le village de Missira est une zone d'endémie palustre de par la pluviométrie et la présence des marres faisant beaucoup de gîtes larvaires.

Le village est situé à environ 170 km au nord-ouest de Bamako. La zone de Missira est située aux abords immédiats de la réserve de biosphère de la boucle de Baoulé sur la rive droite de la rivière Baoulé qui est la limite naturelle entre les cercles de Kolokani et de Kita. Cette boucle comprend les parties Ouest du cercle de Kolokani, la partie Est du cercle de Kita, celle du Sud du cercle de Diéma et Nord-Ouest du cercle de Kati. La zone de Missira est contiguë au parc national de la boucle du Baoulé et à la forêt classée du Fina desquelles elle n'est séparée que par le cours du Baoulé.



Figure 15 : Localisation géographique du site de Missira dans la commune de Sebecoro I

Le village de Missira a été fondé par Kandia Diawoye FOFANA, il y a environ 145 ans. Ce dernier est Originaire du Kaarta qu'il a quitté avec ses frères et sœurs de l'ethnie Kakolo suite à l'invasion peulh des troupes de El hadj Oumar TALL qui voulait les convertir à l'islam dans les années 1840-1845. Kandia Diawoye FOFANA a été le premier chef du village de Missira. L'actuel chef est Yaye Makan FOFANA. Le village compte environ 1500 habitants. Les principales ethnies sont les Kakolos et les Bambaras constituant la population sédentaire. Des Peuhls et des Maures constituent la population nomade. L'islam et l'animisme sont les pratiques religieuses du village.

Le climat est de type soudanien Nord (550 -750mm de précipitations par an) avec une nette tendance sahélienne vers le nord. Les deux principales saisons sont : la saison des pluies en relation avec des vents soufflants du sud-ouest (mousson) et la saison sèche durant laquelle l'harmattan (vent chaud et sec venant du nord-est) est prédominant. La saison sèche s'étale de novembre à mai et comprend une saison sèche fraîche (novembre–février) et une saison sèche chaude (mars-mai). La saison de pluie, couvre la période de juin à octobre et la valeur annuelle des précipitations diminue progressivement du Sud vers le Nord.

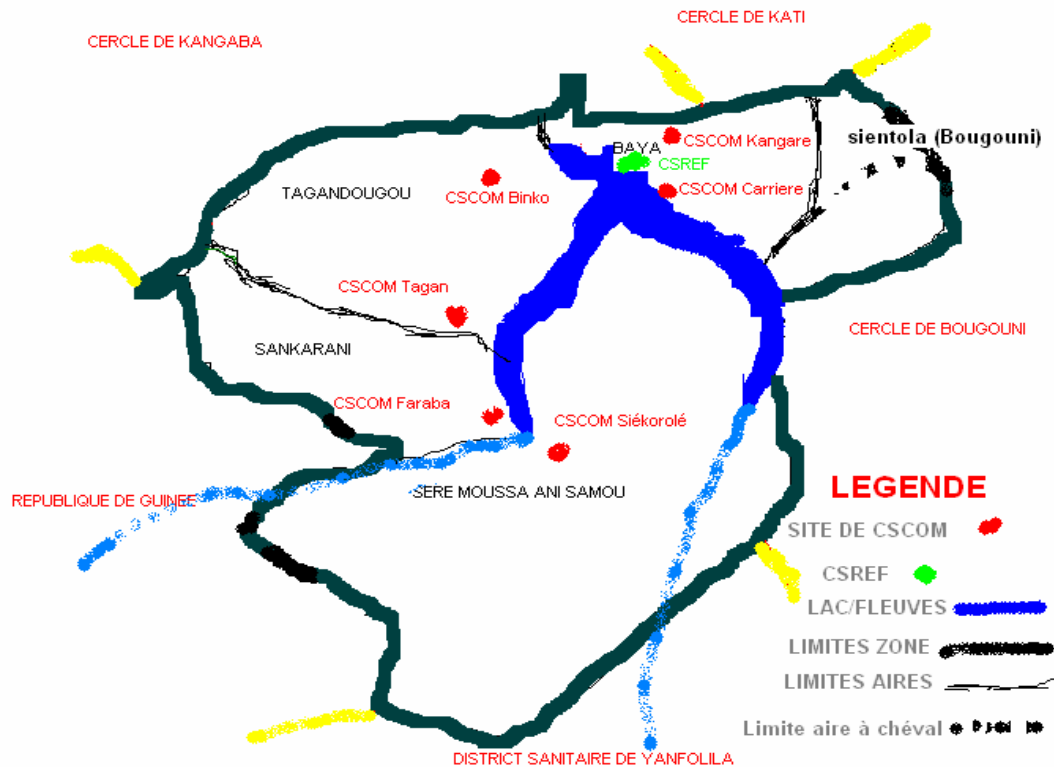
Le réseau hydrographique de la boucle du Baoulé est formé par le Baoulé et ses affluents. Le Baoulé long de 842 km prend sa source dans les monts Mandingues, à 700 m d'altitude avec la confluence des rivières Simanko et de Kénienbaoulé. Il se jette dans le Bakoye au Nord de Toukoto. Le Baoulé de la source vers l'embouchure a des affluents comme : le Bafing (rive gauche), le kénéié (rive gauche), le dla (rive droite), le keniébako (rive gauche) et le babing-ko (rive gauche). Ces cours d'eau constituent des gîtes larvaires pour les simulies (*Similium damnosum*) vectrices de l'onchocercose) et des gîtes permanents pour le développement des *Anophèles* pendant une bonne partie de l'année.

Le village de Missira est accessible en toute saison. Il existe une voie bitumée de Bamako à Kolokani (119 km) et 50 km environ de piste latéritique menant à Missira. Les moyens de transport sont les charrettes, les bicyclettes, les motocyclettes et les automobiles.

Les activités économiques sont l'agriculture, l'exploitation forestière, la chasse, la pêche, la cueillette, l'apiculture et le petit commerce.

Le village de Missira est doté d'une école de six classes, d'un camp forestier (pour la réserve de biosphère), d'une mosquée. Il n'y avait aucun poste de santé dans le village. Le centre le plus proche est à 8 km (centre de santé communautaire de Sébécoro 1) vers lequel sont acheminés les malades. Mais depuis 2004, un centre de santé a été mis en place par le LBMA dans le cadre de l'essai clinique d'un médicament en phase II : Aminoquinoleine de type 13 (AQ13).

4.2.2 Site de Selingué



CARTE SANITAIRE DE LA ZONE DE SELINGUE/CERLE DE YANFOLILA

Figure 16: Carte sanitaire de la zone de Selingué

La population de la zone de Selingué est estimée 111 469 habitants. Du point de vue géographique, la zone de Selingué est définie comme étant la superficie territoriale qui subit les influences directes du lac de retenue d'eau occasionné par le barrage hydroélectrique. Elle est traversée par trois grands cours d'eau à savoir : le Sankarani, le Baoulé et le Wassoulouballé. Elle est liée à Bamako par une route bitumée d'environ 150 Km au Sud- ouest.

Le climat est de type soudanéen humide. Il est caractérisé par une pluviométrie abondante avec une précipitation annuelle atteignant 1200 mm d'eau.

On y distingue deux saisons : une saison pluvieuse (juin-octobre) et une saison sèche qui se divise en une sèche fraîche (novembre-février) et une sèche chaude de mars à mai.

La végétation est dominée par une savane herbacée et arbustive parsemée de forêt galerie en bordure d'eau. On y trouve des arbres tels le Karité ; le Cailcedrat, le So, le Lenké, le Kele-zaba, le Tabacouba etc. Le relief est accidenté en quelques endroits

avec la proximité de la zone guinéenne caractérisée par des massifs montagneux, des plateaux et des collines.

La construction du Barrage hydroélectrique de Sélingué qui produit annuellement plus de 180 Mégawatts sur le Sankarani a suscité la création d'un lac de retenue d'eau d'une superficie de 4900 Ha qui constitue un grand potentiel de culture irriguée et de pêche.

Différentes ethnies sont présentes à Sélingué mais les Malinkés et les Bozos pratiquant respectivement l'agriculture et la pêche sont les ethnies dominantes. On y trouve aussi des bambaras, des peulhs et d'autres ethnies du Mali. On y rencontre des musulmans, des chrétiens et des animistes. Des populations qui pratiquent essentiellement l'agriculture et la pêche s'y sont installées. La zone est pratiquement urbaine par zone notamment à Kangaré chef-lieu de la sous-préfecture. Elle devient rurale progressivement en s'éloignant. En plus de l'agriculture, la pêche, l'élevage, le commerce, l'orpaillage traditionnel y est pratiqué.

- Infrastructure socio sanitaire :

Le Centre de Santé de Référence(CSRéf) de Sélingué est dirigé par un médecin chef au côté duquel travaillent les autres agents du centre. Il est situé à l'ouest de l'école fondamentale à Kangaré chef-lieu de la sous-préfecture. Des médecins généralistes, des sages-femmes, des infirmiers diplômés d'état, des matrones, des étudiants en médecine et pharmacie, des techniciens de laboratoire, des infirmiers stagiaires, les gérants de pharmacie, les manœuvres concourent au bon fonctionnement du centre aux côtés du médecin chef. Les différentes structures fonctionnelles du centre de santé sont constituées en unités dirigées chacune par un responsable désigné par le médecin chef. Le personnel travaillant dans une unité donnée est placé sous la responsabilité directe du responsable de l'unité.

Le CSRéf est géré par un conseil de gestion qui se réunit tous les trois mois. Il est composé par un président (le Président du conseil de cercle), le médecin chef du CSRéf, les maires des communes rurales, le sous-préfet, le chef de service du développement sociale et de l'économie solidaire, le président de la FELASCOM (fédération locale des associations de santé communautaire) et les présidents des Associations de santé communautaire. Le CSRéf assure les activités de 2^{ème} niveau de référence à savoir les consultations externes, les consultations prénatales, des

accouchements, la planification familiale, des interventions chirurgicales, des activités de laboratoire d'analyse, des activités d'ophtalmologie, d'odontostomatologie et de formation continue.

4.3 Type d'étude

Nous avons fait une étude prospective dans les localités de Selingué et Missira. C'était pendant les différents passages de la CPS dans ces localités.

4.4 Période d'étude

Cette étude s'est déroulée d'Août à Décembre 2017

4.5 Population d'étude

Notre population d'étude était constituée d'enfants âgés de 6 à 59 mois.

4.5.1 Critères d'inclusion dans l'étude

- Lame positive à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 1.000 et 199.999 Tf/ μ L ;
- Patients vivant dans un rayon de 5 km ;
- Patients âgés de 6 à 59 mois ;
- Diagnostic d'accès palustre simple (pas d'évidence de paludisme sévère ou de paludisme cérébral) ;
- Sujets pouvant potentiellement rester dans l'étude jusqu'à J42 ;
- Assentiment des parents ou tuteurs car l'ensemble de nos patients étaient âgés de 6 à 59 mois.

4.5.2 Critères de non inclusion

- Prise antérieure d'antipaludiques dans les 4 jours précédents ;
- Patients vivant dans un rayon supérieur à 5 km ;
- Evidence de paludisme sévère (glycémie \leq 2,2 mM, Hb $<$ 5 g/dl, densité parasitaire \geq 200.000 par μ l, signes de perte de mémoire durant les dernières 24 heures) (OMS, 2000)

4.5 Echantillonnage

D'abord nous avons procédé à un recensement des enfants âgés de 3 à 59 mois des deux sites avec l'appui des relais communautaires. Ensuite, à leurs identifications par des prises de photos afin de pouvoir les reconnaître par la suite s'ils venaient à être

atteints par le paludisme après avoir reçu des doses de la CPS. Ces deux activités ont eu lieu avant le premier passage de la campagne de CPS 2017. Il était établi qu'un enfant a bénéficié de la CPS, soit par la vérification de la carte d'administration des doses délivrées par les agents de la CPS et/ou par l'affirmation des parents ou tuteurs des enfants que ce dernier a bénéficié des doses de la CPS.

4.5.1 Procédure de recensement

4.5.1.1 Missira

Le recensement a été fait de porte en porte par une équipe du LBMA composée d'un pharmacien et des internes en pharmacie après approbation des autorités administratives et coutumières. L'équipe a été appuyée par le chef du village, l'imam et un agent de l'infirmerie de Missira. Il s'agissait de remplir des FRC (formulaire de report de cas) permettant de recueillir les informations suivantes : nom et prénom de l'enfant, nom et prénom de la mère ou la tutrice, le village ou quartier, la date, le sexe ainsi que l'âge de l'enfant. Ces informations recueillies dans les FRCs ont été saisies sur Excel pour constituer notre cohorte.

4.5.1.2 Sélingué

Des relais communautaires supervisés par une équipe du LBMA composée de deux pharmaciens, un biologiste et des internes en médecine et en pharmacie ont effectué un recensement des enfants âgés de 3 à 59 mois à Kangaré, Dalabala, Carrière, Dalaba, Binkokin, Lafiabougou et Bozola. Le processus s'est déroulé en étroite collaboration avec le CSREF de Sélingué et les autorités administratives dont les chefs des villages. Les FRCs (formulaire de rapport de cas) permettaient de recueillir les informations suivantes : nom et prénom de l'enfant, nom et prénom de la mère ou la tutrice, le village ou quartier, la date, le sexe ainsi que l'âge de l'enfant. Ces informations ont également été saisies sur Excel pour compléter la base de données de notre cohorte.

4.5.2 Procédure d'identification

L'identification a été réalisée par l'équipe du LBMA. Elle a consisté à prendre des photos (visage uniquement) pour identifier les enfants en les joignant aux informations préalablement recueillies lors du recensement. Les prises des photos des enfants se sont faites porte à porte en se servant de la base de données du recensement.

4.6 Interventions

Notre population cible étant constituée des enfants âgés de 6 à 59 mois, nous cherchions des suspicions du paludisme auprès des mamans ou tuteurs ainsi qu'au sein des services de santé des zones concernées par l'étude. Devant un probable cas, notre intervention commençait par un examen clinique par un médecin, cet examen est suivi de dépistages par un test de diagnostic rapide (TDR) et par goutte épaisse / frottis mince pour confirmer l'accès palustre simple à *Plasmodium falciparum*. Dans l'affirmatif, nous cherchions l'assentiment des parents ou tuteurs. Après l'obtention de l'assentiment, un prélèvement de sang veineux (4 mL) est fait et les patients sont traités sans exception y compris les patients qui ne répondaient pas aux critères d'inclusions de l'étude. Cette étude s'est faite parallèlement à un essai d'efficacité des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (Artémether + Luméfantrine et Artésunate + Amodiaquine). Pour les patients qui remplissaient les critères d'inclusion à cette dernière, ils étaient suivis pendant 42 jours. Le sang veineux est utilisé pour confectionner des papiers confettis pour les tests de génotypage et la détection des mutations par HRM. Le restant du sang est aliquoté pour des tests *in vitro*. Le taux d'hémoglobine a été estimé à l'aide d'un appareil Hemocue® 301. Nous avons présenté les taux d'hémoglobine suivant les intervalles données par l'OMS [48].

4.6.1 Aspect clinique

Les patients sont soumis à un examen clinique visant à rechercher d'éventuels symptômes du paludisme. Le patient est ensuite soumis à un diagnostic d'immunologie (Test de Diagnostic Rapide) et de parasitologie (Goutte épaisse et frottis mince) du paludisme au laboratoire. Après la confirmation de l'accès palustre simple à *P. falciparum* le patient revient chez le médecin pour la mesure de certains paramètres comme la fréquence respiratoire, la fréquence cardiaque, le poids et la prise de médicament.

4.6.2 Diagnostic biologique

4.6.2.1 Tests de Diagnostic Rapide (TDRs)

Les tests de diagnostic rapide dont nous disposions étaient des cassettes de la firme SD BIOLINE.

C'est un test de diagnostic rapide pour la détection qualitative et différentielle de la HRP-II (Protéine riche en Histidine II) spécifique de *Plasmodium falciparum*.

4.6.2.2 La Goutte épaisse et frottis mince

Cet examen microscopique se faisait en plusieurs étapes :

- **Etape1 : Prélèvement du malade**

Matériel nécessaire :

Lames d'examen de microscope

Lancettes stériles à usage unique

Méthanol ou éthanol

Coton hydrophile

Crayon gras ou stylo graveur

Méthode :

- Chez les enfants la piqure se faisait au niveau du 3^{ème} ou 4^{ème} doigt et se faisait sur le côté qui est moins sensible (recommandation de l'OMS)
- Nettoyer l'endroit choisi d'abord avec un tampon de coton imbibé d'alcool et avec un tampon sec pour enlever toute trace d'alcool
- Puis on pique d'un coup sec et rapide
- On déposait les premières gouttes de sang sur du papier filtre (confettis)
- De la main droite on tient une lame par les bords et de la main gauche le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang
- Ensuite on prenait une 2^{ème} lame et on recueillait une seconde goutte de sang en la mettant délicatement avec une extrémité de la lame.

- **Etape 2 : Préparation et coloration de la goutte épaisse et du frottis mince**

✓ **La goutte épaisse se prépareit comme suit :**

- On fait un étalement épais au centre de la lame.
- On étale le sang avec le bout d'une lame propre jusqu'à épaississement uniforme
- Au bout de la lame on collait les étiquettes sur lesquelles se trouvent les identifiants des patients.
- On laisse sécher les lames à l'air libre pendant 10 minutes à l'intérieur du laboratoire, donc à l'abri de la poussière et des mouches.

✓ **Préparation du frottis mince :**

- Tenir la lame d'une main. De l'autre main, poser le bord de la lame rodée juste en avant de la goutte de sang.
- Puis faire glisser la lame jusqu'à ce qu'elle touche la goutte de sang et laisser le sang se répartir tout le long du bord de la lame rodée.

- Ensuite pousser la lame rodée jusqu'au bout de la lame d'étalement, d'un mouvement doux et régulier
- Au bout de la lame d'étalement, on collait l'étiquette identifiant le patient.
- ✓ **Coloration de la goutte épaisse et du frottis mince :**

La solution de coloration était diluée à 10% et pour cela on prenait 45 ml d'eau distillée plus 5 ml de Solution concentrée de Giemsa que l'on mélange. Puis plonger les lames à colorer dans la cuve à coloration contenant la solution de Giemsa et laisser colorer pendant 15 minutes. Sortir les lames, rincer à l'eau de robinet et laisser sécher pendant quelques minutes.

- **Etape 3 : examen de la goutte épaisse à la recherche des parasites du paludisme**

On dépose une goutte d'huile à immersion sur la goutte épaisse, puis on amène l'objectif à 100 au-dessus de la goutte épaisse. On abaisse l'objectif jusqu'à ce qu'il entre en contact avec l'huile à immersion ensuite, on procède à la mise au point et on observe les différents champs par défilement. En cas de présence de parasites, à l'aide d'un compteur on comptait les parasites vus ainsi que les leucocytes. Le nombre de parasites se comptait sur 300 leucocytes.

- **Etape 4 : Estimation de la densité parasitaire sur la goutte épaisse :**

En cas de résultat positif à *P. falciparum*, la densité parasitaire est estimée afin de voir le niveau de gravité de l'infection palustre lié au taux d'hématies parasitées.

Un paludisme à *P. falciparum* est considéré comme sévère quand le nombre d'hématies parasitées est supérieur à 100.000 par μL , l'accès pernicieux est probable au-delà de 150.000 par μL et une parasitémie supérieure à 400.000 par μL est un élément de très mauvais pronostic

Vu l'estimation que le nombre moyen de leucocyte par μL est 7 500 :

Le calcul du nombre de parasite par μL se faisait selon la formule suivante :

$$\text{Nombres de parasites par } \mu\text{L} = \frac{7,500 \times \text{Nombres de parasites comptés}}{\text{Nombre de leucocytes comptés}}$$

Équation 1 : Formule de calcul de la parasitémie

La positivité des gouttes épaisses et l'estimation de la parasitémie étaient faites en fonction des normes de l'OMS sur la goutte épaisse et le frottis mince.

4.6.3 Prise de médicaments

Tous nos patients ont été traités du paludisme dont ils souffraient y compris les patients non inclus dans l'étude pour des parasitémies faibles.

4.6.4 Suivi

Tous nos patients qui respectaient les critères d'inclusions et de non inclusions sus cités ont été suivis dans une étude parallèle qui visait à tester l'efficacité des CTAs. Nos patients étaient suivis par un médecin et leurs médicaments étaient prises en charge (y compris pour d'autres maladie que le paludisme) jusqu'à la fin des 42 jours de suivi.

4.6.5 Collectes et Traitement des échantillons

Les lames des gouttes épaisses étaient lues par deux lecteurs différents et un troisième dans les cas où la différence entre les parasitémies trouvées par les deux premiers lecteurs valait 20%. Après la lecture des lames, ces dernières sont arrangées dans des boites à lames pour leur conservation au laboratoire de biologie moléculaire appliquée (LBMA) à Bamako. Au bout de chaque lame se trouvait une étiquette portant les informations du patient (l'identifiant, la date, le numéro de la lame).

Sur les papiers confetti du patient se trouvaient également ses informations (Identifiant et la date). Après le dépôt des gouttes de sang dans les cercles de spots, on les laissait s'assécher avant de les introduire dans des enveloppes afin de les protéger de la poussière. Nous faisons au minimum trois (03) spots par confetti et par patient.

Quant aux cassettes des TDRs, on écrivait les identifiants des patients aux dessus puis on les conservait dans une boite.

Le premier jour de visite du patient, c'est-à-dire le J0, un prélèvement de sang veineux est fait avant l'administration de la première dose de médicament.

Au total 4 ml de sang est prélevé et repartis entre trois cryotubes. Deux tubes contenaient du Glycérolyte® pour le culot et un tube était réservé au recueil du plasma. Après l'aliquotage, les cryotubes sont conservés dans l'azote liquide avant d'être envoyés à Bamako au LBMA.

4.7 Le génotypage des échantillons

Le génotypage des échantillons (sang veineux conservé sur des papiers confettis) des deux sites (Missira et Selingué) était fait dans le but de pouvoir déterminer la multiplicité de l'infection chez les souches de *P. falciparum* isolées lors de la collecte.

4.7.1 Extraction de l'ADN

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

4.7.1.1 Protocole

Il faut disposer de : au moins 3 bains-Marie, portoir de tube 1.5ml, portoir de tube 1.5ml pour le bain-Marie, vortexeuses, Ethanol 96-100%, pipettes de [20, 200, 1000 μ L], centrifugeuse de tube 1,5mL

Toutes les étapes de centrifugation doivent se faire à la température ambiante (15-20°C)

Avant de commencer, s'assurer que :

- Mettre le buffer AE ou l'eau distillée à la température ambiante pour l'élution, l'étape 10,
- S'assurer que les buffers AW1 et AW2 ont été préparés avec l'alcool comme indiqué dans le guide du kit d'extraction,
- S'assurer que les buffers AL et ATL ne contiennent pas de précipités, sinon les faire dissoudre en les incubant à 56°C.

4.7.1.2 Procédure

1. Dans les tubes de 1.5mL contenant les 3 spots de sang déjà découpés, ajouter 180 μ L de buffer ATL,
2. Incuber à 85°C pendant 10 minutes puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,
3. Ajouter 20 μ L 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 200µL de buffer AL aux échantillons. Centrifuger bien, et incuber à 70°C pendant 10 minutes puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.
Pour assurer une bonne lyse, il est essentiel d'ajouter le buffer AL et vortexer immédiatement.
Il ne faut pas ajouter la protéinase K directement au buffer AL.
Après l'ajout du buffer AL, il est possible que des précipités blancs se forment. Dans la plupart des cas, ces précipités disparaissent après l'incubation.
5. Ajouter 200µL d'éthanol (96-100%) aux échantillons, bien vortexer puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube,
Il est essentiel que l'éthanol et les échantillons soient bien vortexés.
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 500µL du buffer AW1. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1 minute.
Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat.
8. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500µL 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 collection qui contiennent le filtrat puis centrifuger à haute vitesse pendant 1 minute.
Cette étape aide à éliminer le restant de la solution du buffer AW2 restant après l'étape précédente.
10. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes 1.5mL stériles puis jeter les tubes de collection qui peuvent contenir encore du filtrat. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 150µL du buffer AE ou d'eau distillée. Incuber à la température ambiante (15-20°C) pendant 1 minute puis centrifuger à 8000rpm pendant 1 minute.

Le volume d'ADN dissout utilisé lors de la PCR ne doit pas excéder les 10%, par exemple pour une PCR de 50µL, il ne faut pas ajouter plus de 5µL d'ADN. L'ADN ainsi obtenu est conservé à -20°C

4.7.2 Amplification du gène *msp1* par la PCR

4.7.2.1 Amorces utilisées

Nous avons utilisé la technique de « Nested PCR » ou PCR nichée afin d'optimiser la réaction en particulier dans les situations de faible parasitémie. Deux groupes d'amorces ont été utilisés dans cette étude. Le premier groupe est constitué d'une paire d'amorces identifiées à partir des séquences de nucléotides conservées au niveau des blocs 1 et 3. Ces amorces peuvent ainsi amplifier le fragment du gène de la protéine de la membrane de surface-1 (*msp1*) entre les blocs 1 et 3. Cette amplification initiale permet l'obtention des fragments de 200 à 500pb qui seront ensuite utilisés pour la seconde amplification avec les amorces spécifiques K1, MAD20 et RO33. Ce produit amplifié appelé amplicon est ensuite amplifié une seconde fois par 3 paires d'amorces qui sont K1, MAD20 et RO33. Ces amorces amplifient d'une manière spécifique les parasites (*P. falciparum*) présentant les allèles K1, MAD20 et RO33 au niveau du bloc 2.

Tableau 3: Liste des amorces utilisées

Amorces	Séquences	Taille (Pb)	Référence
<i>msp1</i>	5'-ACTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTA-3' 5'-AGTACGTCTAATTCATTTGCACGAA-3'	256-522	O.KOITA 2000
<i>msp1</i> allotype-spécifique block2, amorce K1	5'-CTTAAATGAAGAAGAAATTACAAAAGGTGC-3' 5'-GAGGGCTTGCACCAFARGAAGT-3'	140-266	
<i>msp1</i> allotype-spécifique block2, amorce MAD20	5'-GTATTAATGAAGGAACAAGTGGAACAG-3' 5'-TATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATT-3'	151-193	
<i>msp1</i> allotype-spécifique block2, amorce RO33	5'-AATAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGT-3' 5'-TCTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGA-3'	153	

Nous avons utilisé la paire d'amorces *msp1* pour effectuer la première réaction.

4.7.2.2 Première amplification par la Technique de PCR

La première amplification s'est faite avec les amorces spécifiques conservées pour les blocs 1 et 3 du gène de *msp1*.

Tableau 4: Composition du mélange réactionnel 1

Concentration initiale	Réactifs	Volume en μL	Concentration finale
-	ddH ₂ O	15,375	-
10X	Buffer	2,5	1X
50mM	MgCl ₂	1,5	3mM
10mM	dNTPs	2,0	0,8mM
10 μM	Amorce Aller <i>msp1</i> Bloc1-3	0,5	0,2 μM
10 μM	Amorce Retour <i>msp1</i> Bloc1-3	0,5	0,2 μM
5U	Taq PoL	0,125	0,025U
	ADN	2,5	-
Total		25,0	

La deuxième amplification de la *msp1* a été réalisée avec les amorces internes spécifiques pour les allotypes K1, MAD20 et RO33.

Tableau 5 : Composition du mélange réactionnel 2

Concentration initiale	Réactifs	Volume en μL	Concentration finale
-	ddH ₂ O	15,375	-
10X	Buffer	2,5	1X
50mM	MgCl ₂	1,5	3mM
10mM	dNTPs	2,0	0,8mM
10μM	Amorce Aller (K1, MAD20, RO33)	0,5	0,2 μM
10μM	Amorce Retour (K1, MAD20, RO33)	0,5	0,2 μM
5U	Taq PoL	0,125	0,025U
-	ADN	2,5	-
Total		25,0	

Le volume réactionnel final du mélange est de 22,5 μL auquel était ajouté 2,5 μL d'extrait d'ADN soit un volume final de 25 μL . Ensuite l'amplification enzymatique s'effectuera dans un thermocycler de type PTC 200® en fonction du programme suivant :

- Une dénaturation initiale de 2 minutes à 95°C suivie de 35 cycles de :
- Une dénaturation pendant 30 secondes à 94°C ;
- Un appariement pendant 30 secondes à 55°C ;
- Une extension pendant 1 minute à 72°C.

Après les 35 cycles, l'extension continue pendant 10 mn à 72°C et la conservation se fait à 4°C.

4.7.2.3 Deuxième réaction d'amplification par PCR

Elle consiste à amplifier le produit de la première amplification par les paires d'amorces spécifiques de **K1, MAD20 et RO33**. Le produit amplifié est utilisé comme matrice. Le volume réactionnel de 22,5 μL de mix aux quels était ajoutés 2,5 μL d'extrait de l'amplicon précédent pour un volume final de 25 μL . Ensuite l'amplification enzymatique s'effectuait dans un thermocycler de type PTC 200® en fonction du programme suivant :

- Une dénaturation initiale de 2 minutes à 95°C suivie de 35 cycles ;
- Dénaturation pendant 30 secondes à 94°C ;
- Appariements pendant 30 secondes à 57°C ;
- Extension pendant 1 minute à 72°C ;

Après les 35 cycles, l'extension continue pendant 10 mn à 72°C et la conservation se fait à 4°C.

4.7.3 Technique d'électrophorèse

4.7.3.1 Procédure

Préparer une solution d'agarose à 2% de TBE 0,5x et chauffer au four micro-onde pendant environ 1,30mn ;

Laisser refroidir un peu et ajouter 30µl de bromure d'éthidium, mélanger puis mouler dans un bac monté d'un peigne sur une surface plane bien ajustée, laisser le gel se polymériser pendant environ 30mn à 1 heure ;

Loger les échantillons à tester et les contrôles en mélangeant 13µL d'ADN et 2µL de Dye dans les puits du peigne en commençant par le marker VI (DNA Molecular Weight Marker VI, Roche, Allemagne) ;

Placer le gel dans le bac à électrophorèse submergé d'une solution de TBE 0,5x

Faire migrer du pôle moins (-) vers le pôle plus (+) pendant environ 90mn à 100 volts et à 2 ampères ;

Révéler les bandes en scannant le gel à l'aide de l'appareil photo (UVP® High Performance UV Transilluminator) relié à l'ordinateur, sauvegarder le fichier et analyser les paramètres moléculaires ;

4.7.3.2 Visualisation des bandes amplifiées

Les bandes rendues fluorescentes par le bromure d'éthidium étaient photographiées sous la lumière Ultra-Violette du transilluminateur (Fisher) ensuite l'image du gel était téléchargée à l'aide de la caméra du système UVP® sur l'ordinateur. La présence d'une bande de taille spécifique sur le gel d'agarose traduit la présence d'un allotype de *P. falciparum*. La présence de plus d'une bande pour un même échantillon signifie que la personne est infectée par plus d'un parasite. Ensuite, les bandes identifiées pour chaque paire d'amorces étaient enregistrées dans le tableur Excel. Le programme

UVP® nous permet d'estimer la taille de chacun des fragments amplifiés afin de mettre en évidence aussi bien le polymorphisme de taille que celui de séquence au niveau des différents allotypes utilisés.

4.7.3.3 Détermination de la taille des bandes

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

4.8 Recherche des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*

Nous avons fait la recherche des mutations sur les gènes *Pfdhps* et *Pfdhfr* par High Resolution Melting (HRM).

4.8.1 Réactifs du HRM et matériels

- 2,5X LightScanner MasterMix ;
- H₂O pour la PCR ;
- Amorces ;
- Sonde ;
- ADN ;
- Plaques blanches ;
- Adhesive Seal ;
- Huile minérale.

4.8.2 Réaction de polymérisation en chaîne

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

4.8.2.1 Les séquences des amorces que nous avons utilisées sont

- Gène *Pfdhfr* N51/C59

Amorce Aller : ACATTTAGAGGTCTAGGAAATAAAGGAGT

Amorce Retour : ATATTTACATCTCTTATATTTCAATTTTTCATATTTTGATTCATTCAC

Sonde : AAATGTAATCCCTAGATATGAAATATTTTTGTGCAG-block

- Gène *Pfdhps* S436/A437

Amorce Aller : GAATGTTTCAAATGATAAATGAAGGTGCTA

Amorce Retour : CAGGAAACAGCTATGACGAAATAATTGTAATACAGGTACTACTAAATCTCT

Sonde : ATCCTCTGGTCCTTTTGTATACC-block

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

Tableau 6 : Concentration des amorces utilisées lors du HRM

C. initiale	Amorces	Volume en μL	C. Finale
50 μM	Amorce Aller	1	0,5 μM
50 μM	Amorce Retour	5	2,5 μM
100 μM	Sonde	2	0,2 μM

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

Le mélange réactionnel pour la PCR est constitué comme suit :

Tableau 7: Composition du mélange(mix) lors du HRM

Concentration initiale	Réactifs	Volume en μL	Concentration finale
-	H2O	10	-
2,5X	LightScanner Mix	10	2,5X
10X	Amorce Sonde	2,5	10X
-	ADN	2,5	-

Protocole alternatif

Tableau 8 : Composition du mélange (mix) lors du HRM

C. initiale	Réactifs	Volume en μL	C. finale
-	ddH ₂ O	2,0	-
2,5X	LightScanner Master Mix	4,0	1X
10μM	Amorce Aller	0,25	0,25 μM
10μM	Amorce Retour	1,25	1,25 μM
10μM	Sonde	1,0	1 μM
-	ADN	1,5	-
Total		10,0	

4.8.2.2 PCR proprement dite

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

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

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

Dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes

Dénaturation à 94°C pendant 15 secondes

Appariement à 52°C pendant 30 secondes

Extension à 72°C pendant 1 minute.

55 cycles

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

4.8.3 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

4.8.3.1 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.

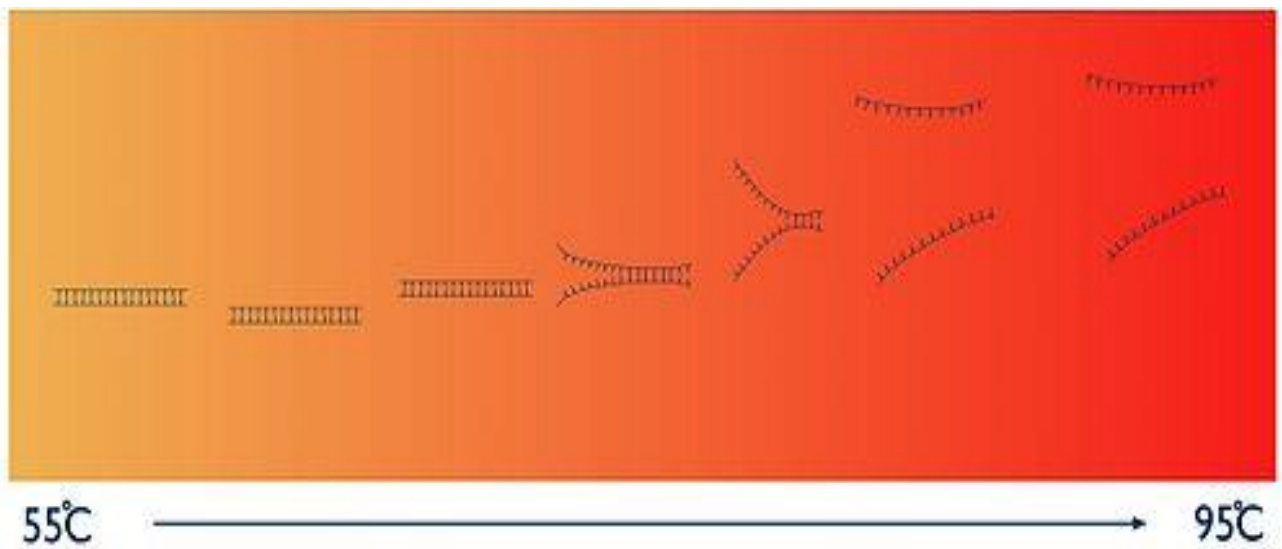


Figure 17: Principe du HRM

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 appelé courbe de fusion.

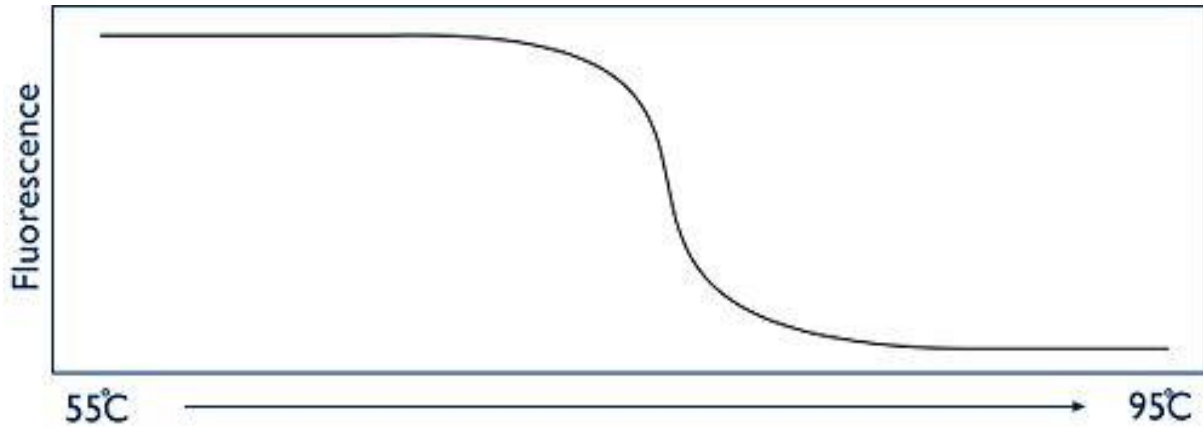


Figure 18 : Principe de tracée des courbes de fusion

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

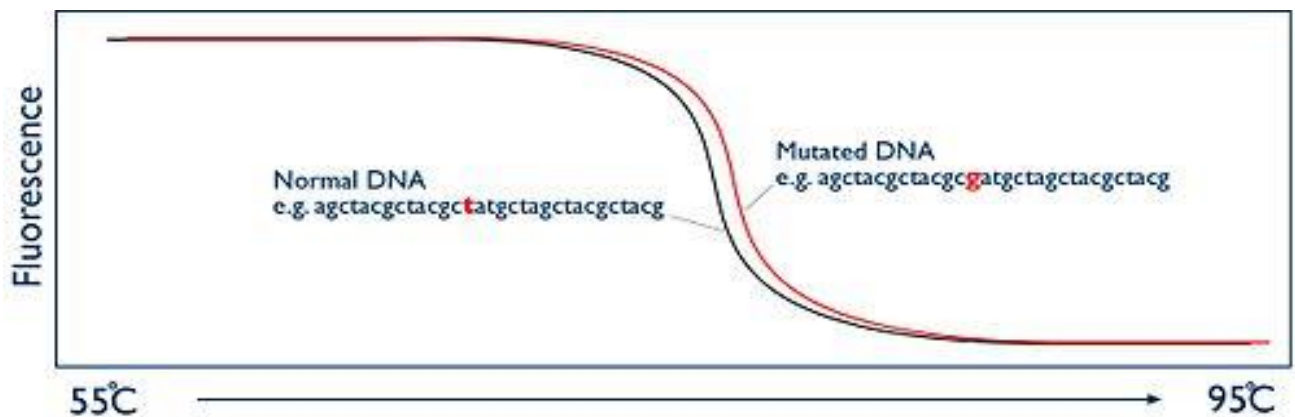


Figure 19: Courbe de fusion d'un ADN normal et d'un ADN muté

4.8.3.2 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 20 : Dispositif du HRM au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de l'USTTB

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

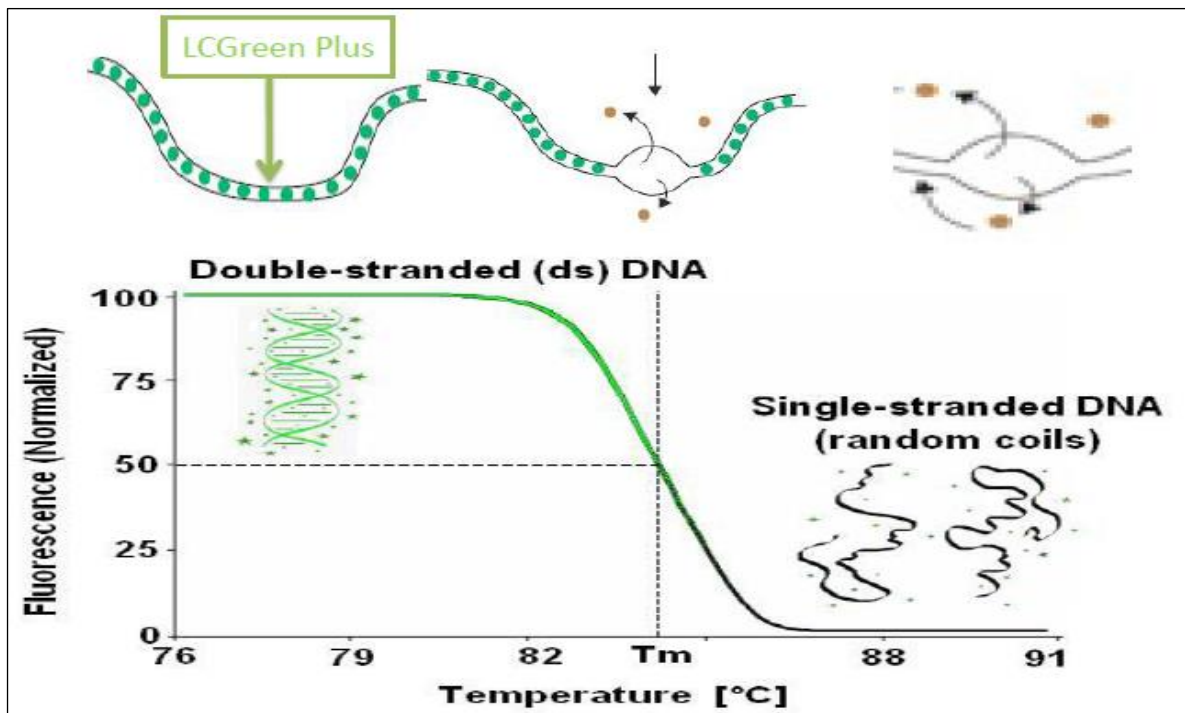


Figure 21: La température de fusion en fonction de la fluorescence au HRM

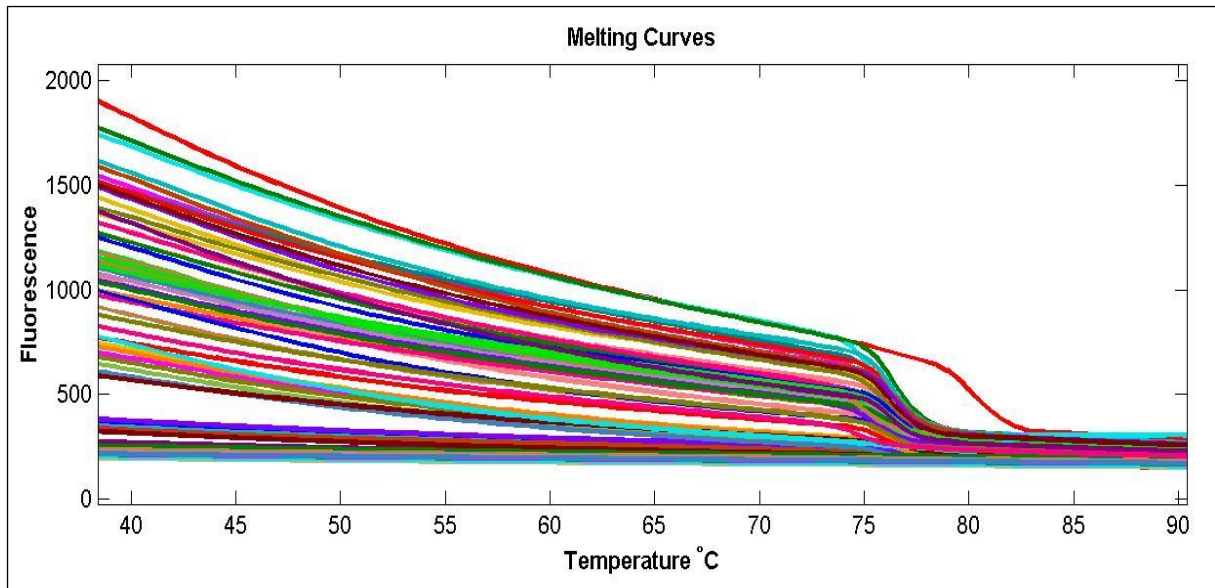


Figure 22: Les courbes de fusion normalisées au HRM

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

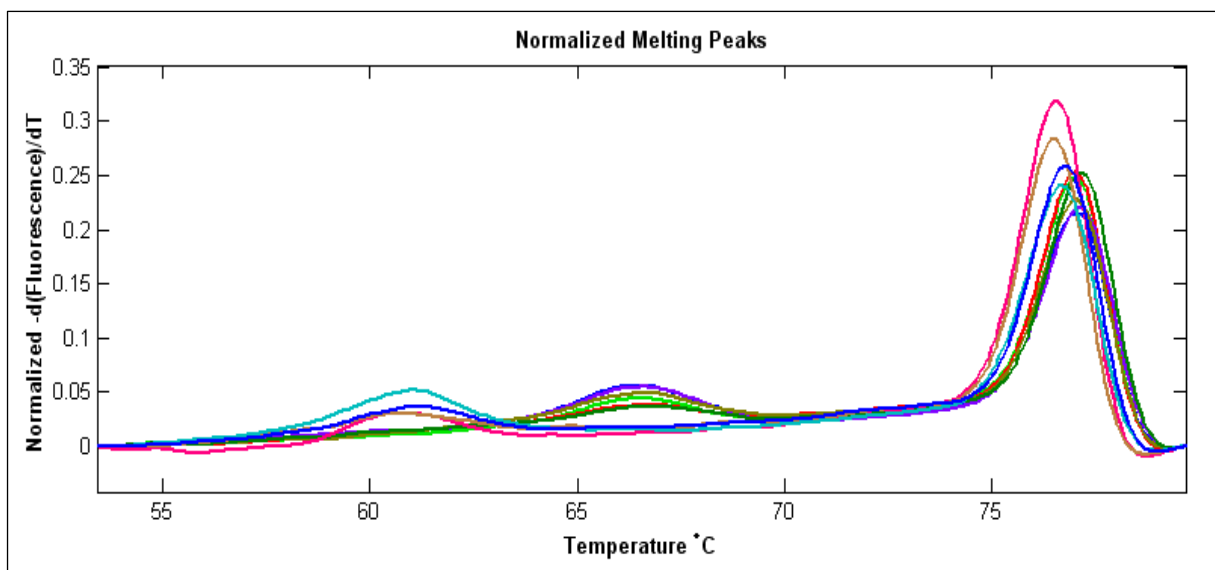


Figure 23: Pics de fusion au HRM

4.8.3.3 Procédure de détection des mutations par HRM

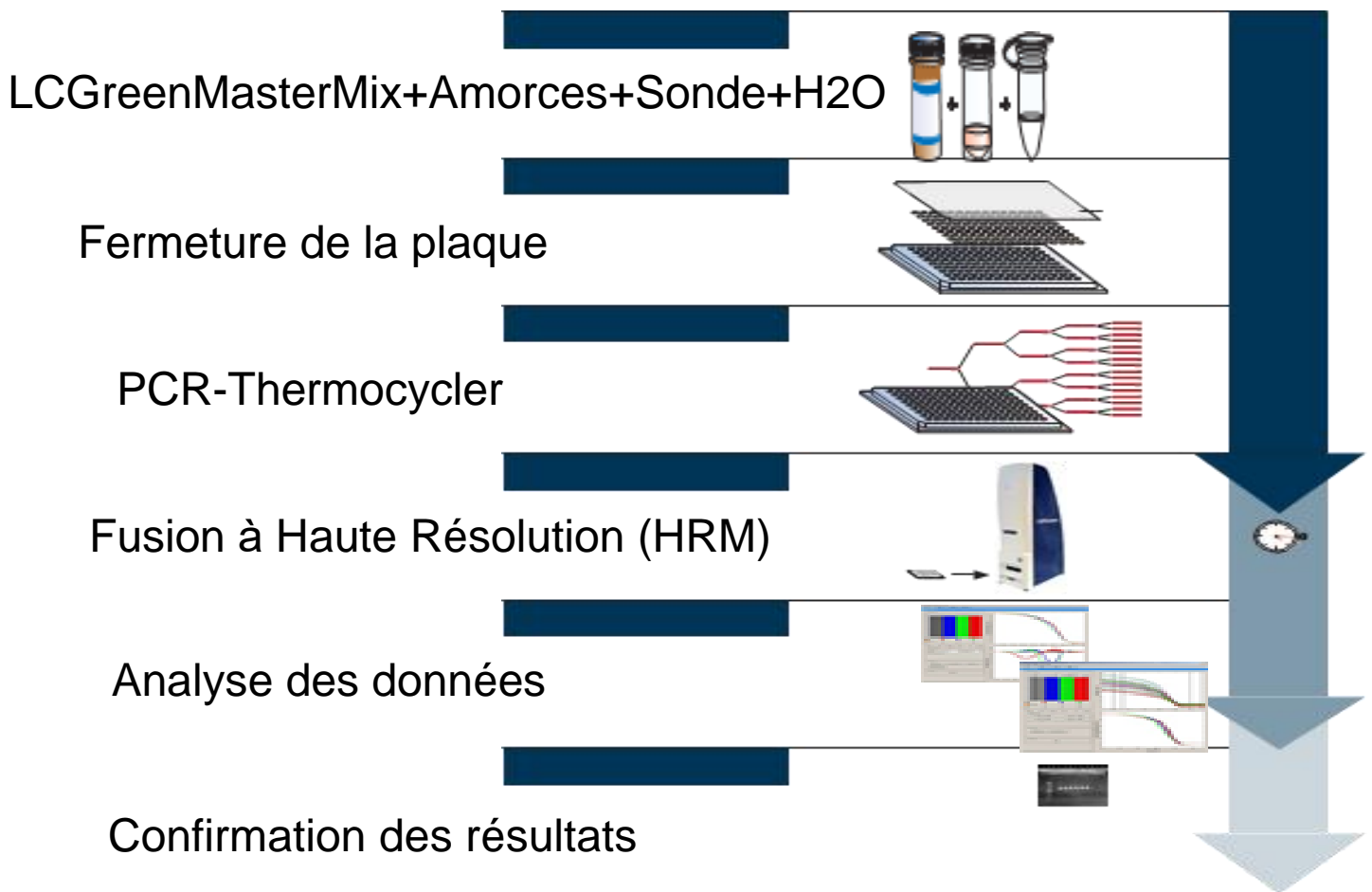


Figure 24 : Schéma à suivre pour la détection des mutations par HRM

4.9 Saisies et analyses des données

Pour les saisies et analyses des données, nous avons utilisé Microsoft® Office Excel 2013, IBM SPSS® STATISTIQUE VERSION 20, GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

Les tests statistiques les plus utilisés ont été le Khi deux et le Test de Fisher. Les tests ont été réalisés avec GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

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

4.10 Considérations éthiques et déontologiques

Le protocole de recherche de cette étude a été soumis et validé par le Comité d'éthique de l'INRSP, (Ministère de la Santé, Mali). Tout changement ultérieur du protocole était

soumis à l'approbation de ce comité d'éthique. C'est une étude à risque minimal car il ne s'agit pas de tester un nouveau médicament ou un matériel à usage biomédical. Elle s'appuie sur des tests de diagnostic et du schéma thérapeutique qui sont utilisés en routine dans les centres de santé dans lesquels nous avons conduit cette étude. Nous précisons que le volume total prélever par patient (4 mL) se trouve dans l'intervalle des quantités admises par le NIH et autres agences, lesquelles sont $\leq 3,0$ ml par kg dans un intervalle de temps ≥ 8 semaines. Pour un assentiment éclairé avant la prise du sang, nous, investigateurs, avons eu à :

- Expliquer le protocole à chaque parent ou tuteur ;
- Répondre aux questions des parents ou tuteurs ;
- Obtenir un assentiment libre, éclairé et signé ;
- Remettre une copie originale de l'assentiment signé aux parents ou accompagnants ;
- Prélever le sang.

La décision de participer ou de ne pas participer relevait exclusivement du parent ou tuteur de l'enfant. Ce dernier était informé de la possibilité de se retirer de l'étude à tout moment sans aucune conséquence ou préjudice.

Tous les documents de l'étude (y compris les codes de nos données) sont gardés dans un lieu sécurisé, et les échantillons de sang sont étiquetés avec un code unique sans le nom du patient pour assurer la confidentialité des informations.

RESULTATS

5. RÉSULTATS

Notre étude a porté sur des enfants (garçons et filles) de 6 à 59 mois des localités de Missira (village) et de Sélingué (district sanitaire).

5.1 Facteurs démographiques

Tableau 9: Patients dépistés et enrôlés parmi les enfants de 6 à 59 mois

Groupes	Nombre d'enfants	%
Recensés	5247	-
Dépistés	3319	63,25
Enrôlés	202	6,08

6% des patients dépistés avait une parasitémie supérieure ou égale à 1000Tf/ μ L de sang et répondait aux critères d'inclusion dans l'étude.

Tableau 10 : Répartition des patients par site d'étude (n=202)

Localités	Patients	%
Missira	92	45,5
Sélingué	110	54,5
Total	202	100

54,5% de nos patients étaient de Sélingué. Toutefois, il n'y avait aucune différence statistiquement significative entre les proportions des deux sites d'étude. (Khi-deux ; P=0,208028)

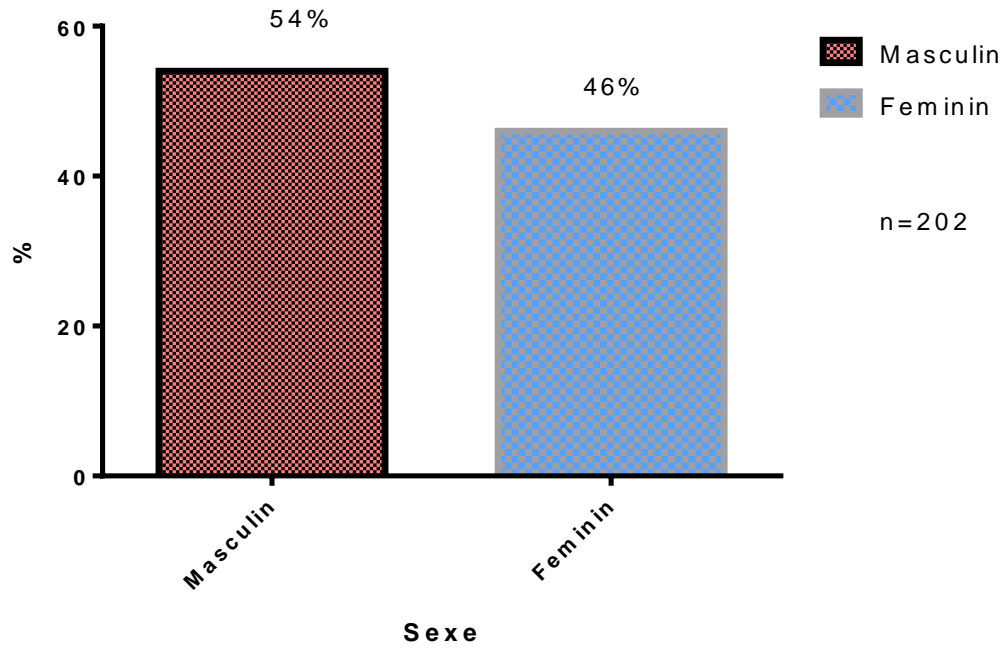


Figure 25: Répartition des patients selon le genre (n=202)

La majorité de nos patients était du genre masculin soit 54%(109/202).

Le sexe ratio 1,17(109/93) était en faveur du sexe masculin.

Nous avons reparti les patients ayant participé à cette étude par tranche d'âge.

Tableau 11: Répartition des patients par tranche d'âge (n=202)

Tranche d'âge (en mois)	Patients	%
[6-24]	30	14,8
[25-36]	60	29,7
[37-48]	50	24,8
[49-59]	62	30,7
Total	202	100

La tranche d'âge 49-59 mois était la plus représentée avec 30,7% suivie de celle de 25-36 mois.

5.2 Résultats de la microscopie

Tableau 12 : Répartition des patients par tranches de parasitémiés (n=202)

Tranche de parasitémie	Patients	%
[1000-50000]	164	81,1
[50005-100000]	24	11,9
[100005-150000]	7	3,5
[150005-200000]	7	3,5
TOTAL	202	100,0

3,5% de nos patients avait une forte parasitémie, comprise entre 150 005 et 200 000 contractée entre deux passages de CPS. Malgré les passages de la CPS, ces patients étaient exposés à un (possible) accès pernicieux.

5.3 Résultats obtenus avec l'Hemocue

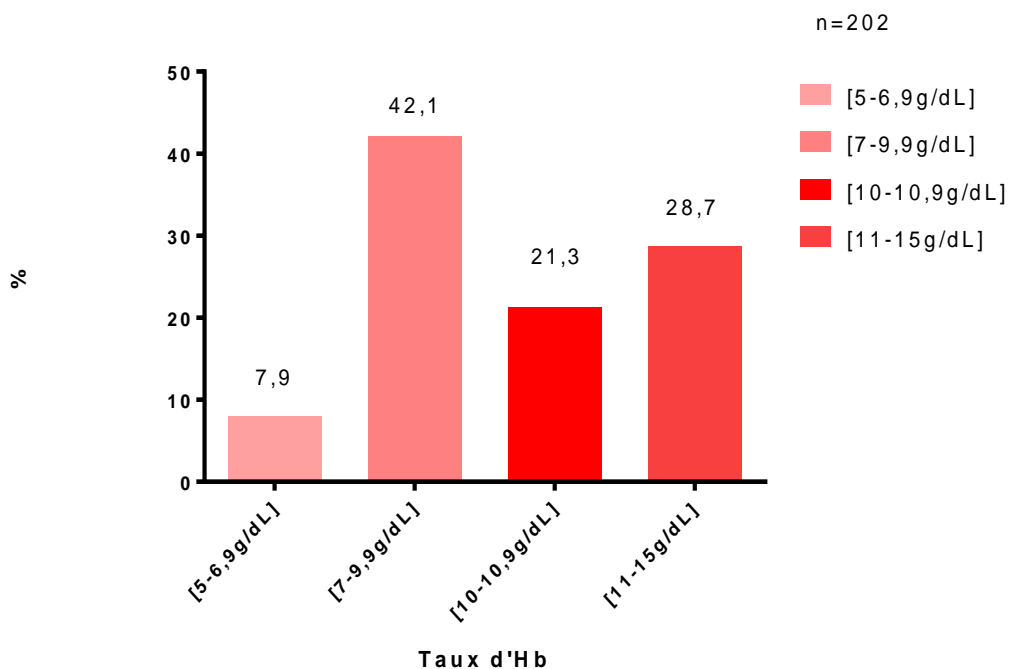


Figure 26: Répartition des patients selon le taux d'hémoglobine (n=202)

42,1% des patients avaient une anémie modérée (7 à 9,9g/dL) selon les critères de classification des anémies par l'OMS chez les enfants âgés de 6-59 mois.

5.4 Résultats du génotypage par PCR nichée de la *m*sp1

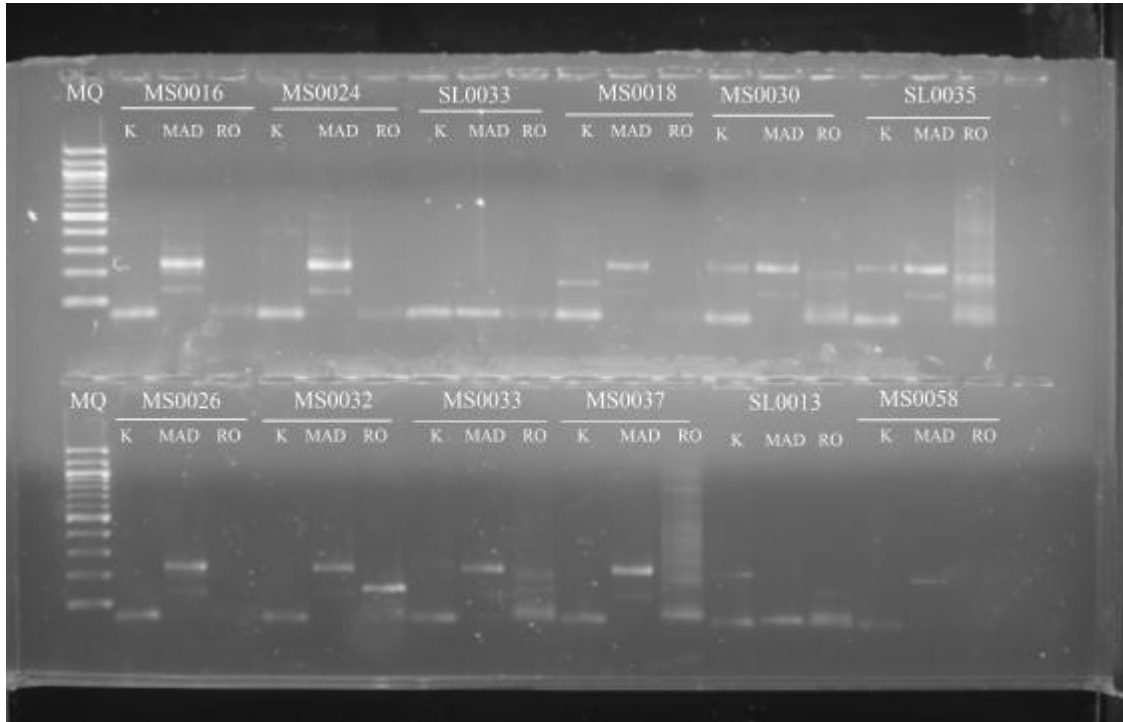


Figure 27: Image labélisée des bandes des allotypes de la *m*sp1

Le génotypage par la PCR nichée de la *m*sp1 a donné des résultats interprétables dans 93% des échantillons soit 187/202.

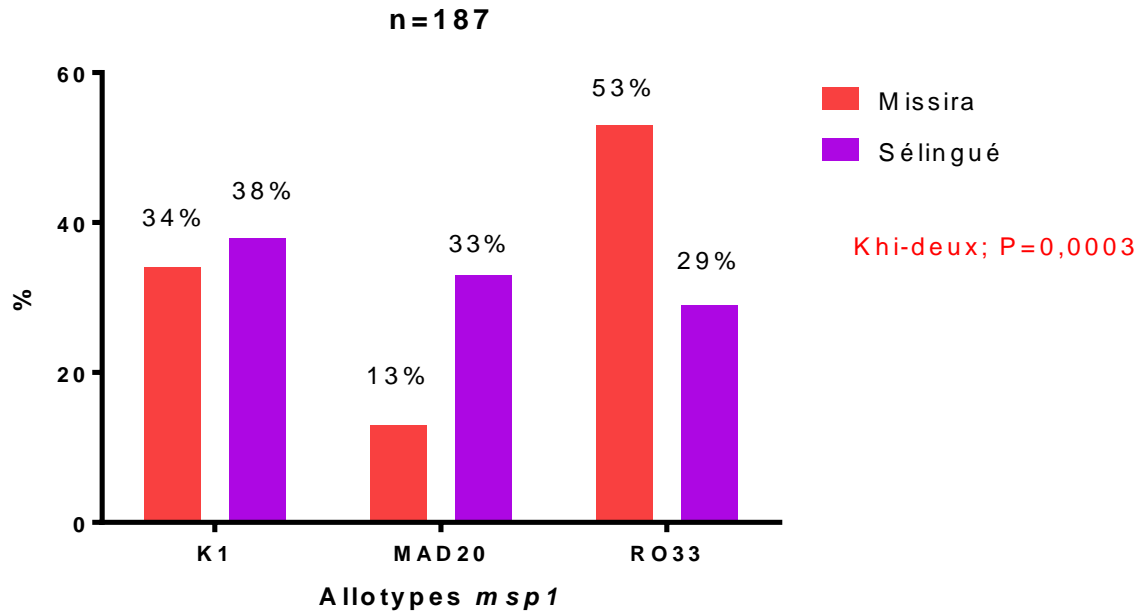


Figure 28: Estimation des Prévalences des allotypes de la *msp1* par site d'étude (n=187)

Un total de 273 marqueurs K1(99) MAD20 (65) et RO33 (109) ont été obtenus après le génotypage de nos échantillons.

Nous avons constaté une différence statistiquement significative dans la répartition de ces marqueurs (K1, MAD20 et RO33) entre Missira (n=87) et Sélingué (n=100).

(Khi-deux ; P=0, 0099).

Tableau 13 : Répartition des allotypes par patients (n=187)

Allotypes	Patients	%	MOI
K1	99	36,26	1,5
MAD20	65	23,81	
RO33	109	39,93	
Total	273	100	

La multiplicité de l'infection était d'environ 2 allotypes par patient

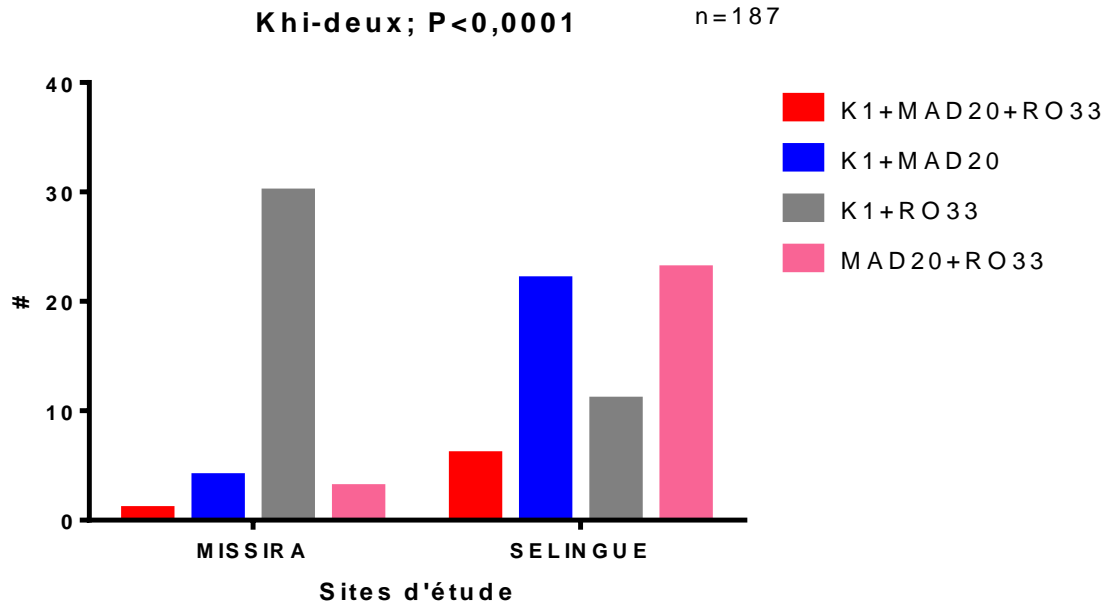


Figure 29 : Répartition des patients en fonction de la polyclonalité par site d'étude

Les allotypes mixtes étaient plus fréquents dans la localité de Selingué que Missira. La différence en termes de polyclones entre les deux localités était statistiquement significative (Khi-deux ; P<0,0001)

Tableau 14: Répartition des patients selon la multiplicité de l'infection (n=187)

MOI	Missira #(%)	Sélingué #(%)	Total #(%)
1	52(59,77)	56(56)	108(57,75)
2	34(39,08)	38(38)	72(38,5)
3	1(1,14)	6(6)	7(3,74)
Total	87(100)	100(100)	187(100)

La majorité de nos patients avait un allotype de *Plasmodium falciparum*. Il faut cependant noter que 3,74% des patients étaient infectés par trois allotypes de *Plasmodium falciparum* en même temps.

5.5 Marqueurs de résistance

5.5.1 Gène *Pfdhfr*

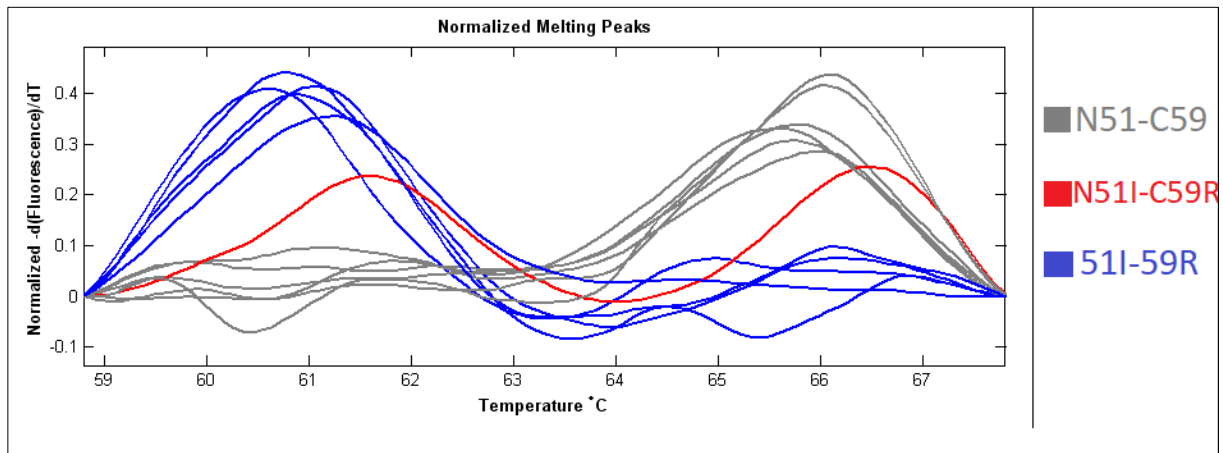


Figure 30: Profils des courbes des haplotypes du gène *Pfdhfr* 51/59

Les haplotypes correspondant aux souches mutées avaient une température de fusion (61°C) plus basse que ceux des souches sauvages (66°C).

Tableau 15 : Températures moyennes de fusion des souches de contrôles du gène *Pfdhfr*

<i>Pfdhfr</i>	1 ^{ère} réaction	2 ^{ème} réaction	3 ^{ème} réaction	Moyenne en °C
3D7	67,5	67,7	67	67,4
Dd2	62,3	62,8	62	62,4

La température moyenne de la souche sauvage (3D7) était 67,4°C contre 62,4°C pour la souche mutée Dd2.

Tableau 16: Répartition des mutations sur le gène *Pfdhfr* à la position 51 selon le site d'étude (n=199)

Allèles (<i>Pfdhfr</i> 51)	Missira (n=91) #(%)	Sélingué (n=108) #(%)	Total #(%)
N51	26(28)	40(37)	66(33,17)
51I	58(64)	62(57)	120(60,30)
51N/I	6(7)	6(6)	12(6,03)
* 51	1(1)	0(0)	1(0,5)

Sur le gène *Pfdhfr* 51 il y avait au total 133 mutations (dont une non déterminée) contre 66 sauvages.

Les prévalences des allèles mutés (51I et 51N/I) à Missira et à Sélingué étaient comparables. ($P > 0,9999$; Test de Fischer).

Tableau 17: Répartition des mutations sur le gène *Pfdhfr* à la position 59 selon le site d'étude (n=199)

Allèles (<i>Pfdhfr</i> 59)	Missira (n=91) #(%)	Sélingué (n=108) #(%)	Total #(%)
C 59	27(30)	43(40)	70(35)
59R	63(69)	64(59)	127(64)
59C/R	0(0)	1(1)	1(0,5)
* 59	1(1)	0(0)	1(0,5)

A la position 59, le HRM a détecté un total de 129 mutations (dont une non déterminée) contre 70 sauvages.

Les prévalences des mutations 59R et 59C/R à Missira et à Sélingué étaient comparables ($P > 0,9999$; Test de Fischer). Un échantillon portant un profil mixte (C/R) a été détecté à Missira.

5.5.2 Gène *Pfdhps*

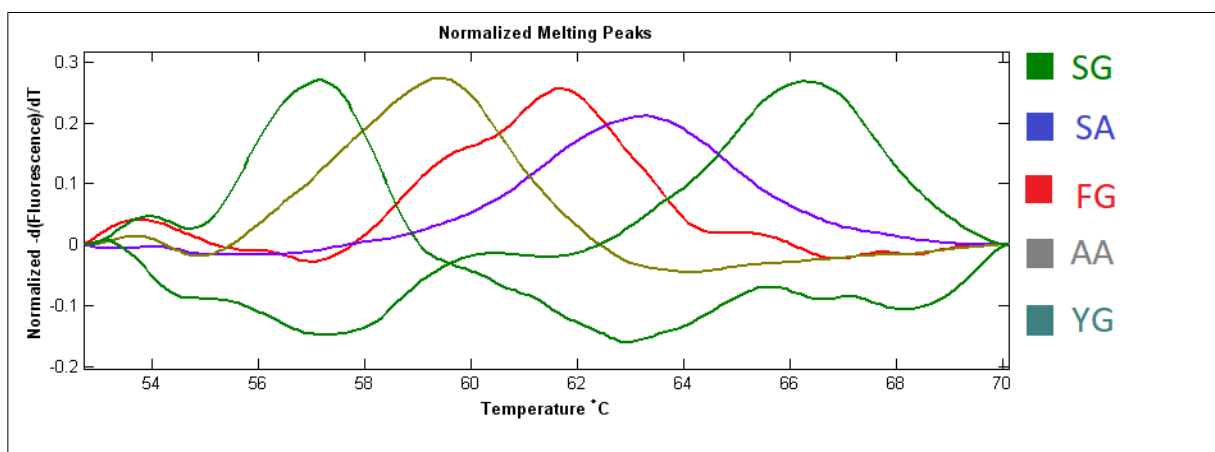


Figure 31: Profils des haplotypes du gène *Pfdhps* 436/437 au HRM

Nous avons remarqué un polymorphisme très élevé plus particulièrement à la position 436.

Tableau 18 : Températures de fusion moyennes des souches de contrôles du gène *Pfdhps*

<i>Pfdhps</i>	1 ^{ère} réaction	2 ^{ème} réaction	3 ^{ème} réaction	Moyenne
3D7	63,3	63	63	63,1
Dd2	58,6	58	58,7	58,4

La température moyenne de la souche sauvage (3D7) était 63,1°C contre 58,4°C pour la souche mutée Dd2.

Tableau 19: Répartition des mutations sur le gène *Pfdhps* à la position 436 en fonction du site d'étude

Allèles (<i>Pfdhps</i> 436)	Missira (n=84) #(%)	Sélingué (n=107) #(%)	Total (n=191) #(%)
S 436	66(79)	83(78)	149(78,01)
436 F	7(8)	22(20)	29(15,18)
436 A	6(7)	2(2)	8(4,19)
436 Y	1(1)	0(0)	1(0,52)
436*	4(5)	0(0)	4(2,1)

Au total, à la position 436, le HRM a détecté 42 mutations (dont quatre non déterminées) contre 149 sauvages.

Nous avons remarqué une différence statistiquement significative dans la distribution des mutations à la position 436 entre Missira et Sélingué (χ^2 ; P=0.006).

Tableau 20: Répartition des mutations sur le gène *Pfdhps* à la position 437 en fonction du site d'étude (n=191)

Allèles (<i>Pfdhps</i> 437)	Missira (n=84) #(%)	Sélingué (n=107) #(%)	Total #(%)
A 437	38(45)	49(46)	87(46)
437 G	40(48)	56(52)	96(50)
437G/A	4(5)	2(2)	6(3)
* 437	2(2)	0(0)	2(1)

A la position 437 du gène *Pfdhps*, le total des mutations était 104 (dont deux non déterminées) contre 87 sauvages.

La distribution des mutations à la position 437 était la même au niveau de nos 2 sites d'étude (Test de Fisher ; P=0,4019).

Tableau 21: Prévalences des doubles mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*

Doubles mutations sur	Missira (%)	Sélingué (%)	Groupées (%)
<i>Pfdhfr</i> (51,59)	64/91(70)	47/108(44)	111/199(56)
<i>Pfdhps</i> (436,437)	11/84(13)	16/107(15)	27/191(14)

Les doubles mutations détectées à Missira et Sélingué sur les gènes *Pfdhfr* (51,59) et *Pfdhps* (436,437) étaient comparables (Test de Fisher ; P=0,1343).

Tableau 22 : Prévalences des triples mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*

Triples mutations	Missira Prev(%)	Sélingué Prev(%)	Total Prev(%)
<i>Pfdhfr</i> (51,59) <i>Pfdhps</i> 436	14/83(17)	7/105(7)	21/188(11)
<i>Pfdhfr</i> (51,59) <i>Pfdhps</i> 437	30/83(36)	28/105(27)	58/188(31)
<i>Pfdhfr</i> 51 <i>Pfdhps</i> (436, 437)	8/83(10)	7/105(7)	15/188(8)
<i>Pfdhfr</i> 59 <i>Pfdhps</i> (436,437)	7/83(8)	8/105(8)	15/188(8)

Les prévalences des triples mutations étaient également comparables pour les deux sites (χ^2 ; $P=0,2930$)

Tableau 23: Prévalences des quadruples mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*

Quadruple mutations	Missira Prev(%)	Sélingué Prev(%)	Total Prev(%)
<i>Pfdhfr</i> (51, 59) <i>Pfdhps</i> (436, 437)	7/83(8)	5/105(5)	12/188(6)

La fréquence des quadruples mutations était de 6% (12/188) lors de cette étude. Le HRM a détecté plus de quadruples mutations à Missira qu'à Sélingué, toutefois les proportions de ces mutations étaient similaires. (χ^2 ; $p=0,306450$)

5.6 Analyses croisées

Tableau 24 : Répartition des cas d'anémie par site d'étude

Classes des taux Hb J0	Sites d'étude		Total
	Missira #(%)	Sélingué #(%)	
Anémie sévère [5-6,9g/dL]	7(5)	9(6)	16(11)
Anémie modérée [7-9,9g/dL]	34(24)	51(35)	85(59)
Anémie légère [10-10,9g/dL]	22(15)	21(15)	43(30)
Total	63(44)	81(56)	144(100)

Les patients présentant l'anémie après avoir reçu les doses de CPS étaient repartis de façon similaire entre les 2 localités (χ^2 ; $P=0.3816$)

Tableau 25: Evolution de la multiplicité de l'infection en fonction de l'âge (n=187)

Multiplicité de l'infection	Tranche d'âge en mois				Total #(%)
	[6-24] #(%)	[25-36] #(%)	[37-48] #(%)	[49-59] #(%)	
1	15(13,9)	31(28,7)	31(28,7)	31(28,7)	108(100)
2	10(14)	23(32)	17(24)	22(30)	72(100)
3	1(14,3)	1(14,3)	1(14,3)	4(57,1)	7(100)
Total	26(14)	55(29)	49(26)	57(31)	187(100)

Nous avons remarqué que la multiplicité de l'infection n'évoluait pas avec l'âge.

(χ^2 ; $P=0,7721$).

Tableau 26: Répartitions des mutations en fonctions des parasitémies

	Tranche des parasitémies				Total #(%)
	[1000-50000] #(%)	[50005-100000] #(%)	[100005-150000] #(%)	[150005-200000] #(%)	
<i>Pfdhfr51</i>	108(81)	19(14)	2(2)	4(3)	133(100)
<i>Pfdhfr59</i>	103(80)	18(14)	3(2)	5(4)	129(100)
<i>Pfdhps436</i>	36(86)	4(10)	1(2)	1(2)	42(100)
<i>Pfdhps437</i>	82(79)	16(15)	3(3)	3(3)	104(100)
Total	329(81)	57(14)	9(2)	13(3)	408(100)

Les mutations *Pfdhfr51*, *Pfdhfr59*, *Pfdhps436* et *Pfdhps437* n'évoluait pas en fonction des parasitémies. (χ^2 ; $P=0,9943$).

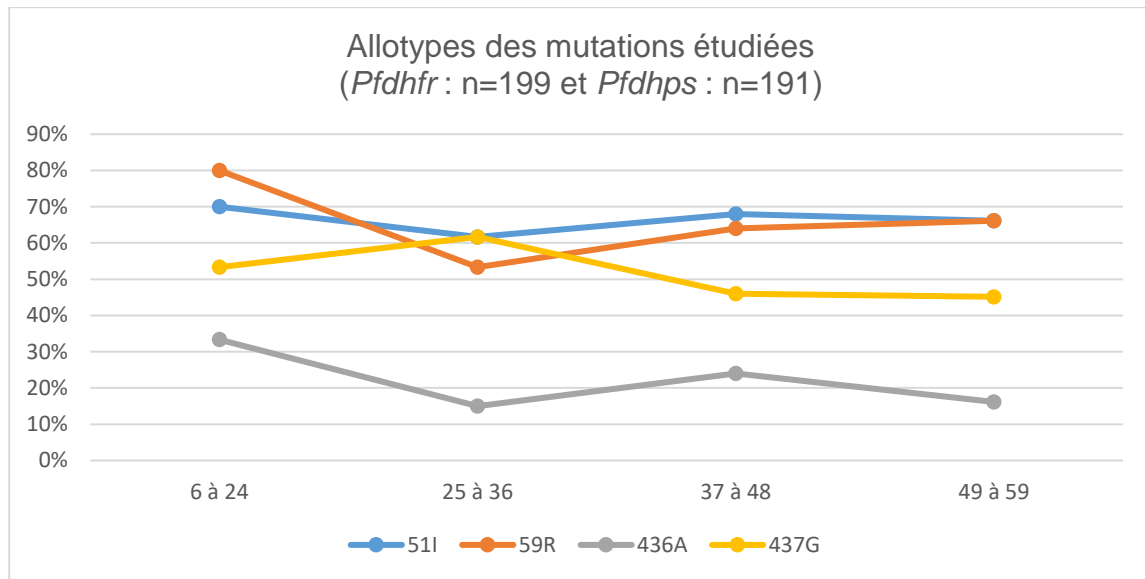


Figure 32: Répartition des allotypes mutés en fonction de l'âge

L'allotype 436A a été le moins rencontré (en dessous des 30% dans les tranches d'âge concernées par l'étude à l'exception de celle de 6 à 24 mois), tandis que 59R était de moins de 80% chez les 6 à 24 mois.

Nous n'avons pas constaté une différence statistiquement significative dans la distribution des mutations entre les différentes tranches d'âges. (χ^2 ; P=0,1600).

COMMENTAIRES&DISCUSSION

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Nous avons fait une étude prospective de la distribution des mutations associées à la résistance sur les gènes *Pfdhps* aux positions 436, 437 et *Pfdhfr* aux positions 51 et 59 dans les localités de Missira et de Sélingué au Mali.

6.1 Méthodologie

6.1.1 Lieux d'étude

Les localités de Missira et de Sélingué ont été choisies pour cette étude car les faciès de transmission dans ces deux localités sont différents [27]. Suivant les différents faciès de transmission du paludisme au Mali, à Missira le faciès de transmission du paludisme est de type nord-soudanien et Sahel. La transmission du paludisme y est intense pendant 3 à 4 mois par an. Elle est hyperendémique (IP : 5-75%). C'est un profil épidémiologique caractérisé par une prémunition de 9 ans et la fréquence du neuropaludisme chez les 1 à 9 ans. Ce profil épidémiologique est commun aux régions de Ségou, Koulikoro et Mopti à l'exception de Mopti ville.

A Sélingué, le faciès de transmission du paludisme correspond aux Faciès des Barrages (Sélingué, Manantali et Markala). Avec comme caractéristique, une anémie palustre élevée chez les moins de 9 ans. La transmission du paludisme y est Bimodale (plurimodale). La pluviométrie élevée et la présence du barrage hydroélectrique à Sélingué et la présence des marres à Missira en font des sites propices à la circulation du parasite du paludisme (*Plasmodium*) et au développement de son vecteur (l'anophèle) à cause des retenues d'eau.

6.1.2 Approche

Notre approche a consisté en un recensement des enfants concernés, suivi de leurs identifications par des prises de photos. Cette méthode nous avait permis de créer une base de données que nous consultions pour savoir si l'enfant avait pris une dose de SP/AQ et pour le reconnaître lors qu'il serait atteint par le paludisme. Nous certifions que l'enfant avait pris une dose de la CPS soit par vérification de la carte d'administration des doses de CPS par les agents de santé communautaire et les relais communautaires, soit en se référant au témoignage des parents ou tuteurs de l'enfant. Cette approche visant à tester l'efficacité de la chimioprévention a été utilisée dans beaucoup d'études similaires. Le recensement et l'identification (prise de photo de

l'enfant) permettent toujours d'avoir une cohorte. Ils contribuent en plus des confirmations verbales émises par les parents de ces enfants de diminuer la survenue d'erreurs en termes de ceux qui ont reçu ou non les doses de SP.

Les données de notre étude ont été collectées sur les formulaires de report de cas (FRC) et saisies dans le logiciel Excel pour en faire une base. Cette méthode nous a permis de collecter des données fiables et exploitables.

Le dépistage se faisait par la clinique et la parasitologie. La lecture des lames des gouttes épaisses et de frottis minces se faisait d'abord par un technicien de laboratoire, puis une deuxième fois par un pharmacien biologiste et en fin une dernière lecture par un parasitologue si besoin était de départager les deux premiers lecteurs. Ces lectures répétées des lames évitent d'avoir des cas de faux positifs. Les prélèvements de sang veineux après obtention de l'assentiment des parents ou tuteurs se faisaient dans le but de pouvoir continuer les tests *in vitro* au laboratoire à Bamako. Les souches ainsi isolées lors de cette étude étaient conservées dans l'azote liquide afin de les maintenir viables. Les papiers confettis ont été faits avec le sang total, séchés à la température ambiante à l'abri des mouches et du soleil suivant les recommandations de l'OMS.[49] Ensuite les papiers confettis ont été rangés dans des sachets secs avec des dessiccants (desséchants) pour leurs bonnes conservations. Ces dessiccants ont été utilisés dans le but de prévenir le développement des moisissures sur ces papiers filtres [49].

Durant l'étude, un système de supervision était mis en place pour prévenir la survenue d'éventuelles erreurs.

6.1.3 Extraction de l'ADN de *Plasmodium falciparum*

Le kit Qiagen a été utilisé pour l'extraction de l'ADN. Ce kit permet d'avoir de l'ADN purifié, débarrassé de toutes impuretés comme l'hémoglobine pouvant entraîner des interférences lors de la PCR. Ce kit a aussi l'avantage de pouvoir extraire de l'ADN génomique de qualité.

6.1.4 Utilisation de la PCR nichée sur le gène de la *mSP1*

La Multiplicité de l'Infection (MOI) a été examinée par la PCR nichée sur le gène *mSP1*. Cette technique de la PCR est largement utilisée à cet effet par le monde scientifique [50]. Le gène de la *mSP1* est très connu pour son polymorphisme et constitue une des

recommandations majeures de l'OMS en termes de détermination de la multiplicité de l'infection [51].

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

La recherche des marqueurs de résistance s'est faite par HRM. La fusion à haute résolution de l'ADN est connue pour sa sensibilité dans la détection des mutations ponctuelles [20]. Dans une étude menée par Rachel F Daniel et al en 2012, le HRM a été décrit comme une méthode efficace pour la détection des mutations ponctuelles mais aussi la différenciation des haplotypes [20]. D'autres études ont toutefois utilisé la PCR-RLFP [52,53]. La méthode de séquençage reste tout de même la méthode la plus sensible, spécialement le NGS (terme anglo-saxon : Next Génération Sequencing) [54]. Toutefois, lors d'une étude menée en 2014 par Michaela Angelika et al sur la comparaison entre le HRM, le pyrosequencing, le NGS avec le Sanger sequencing, le HRM a été trouvé aussi sensible que le séquençage par la méthode de Sanger [54]. La méthode de détection des mutations à l'aide du HRM que nous avons utilisé, a été utilisé avec succès au Mali pour la première fois en 2016 par Diarra Y [19]. Les positions que nous avons étudiées lors de cette étude sont aussi utilisées actuellement dans la plupart des études portant sur la résistance de la SP. Les positions 51 et 59 du gène *Pfdhfr* ainsi que 436 et 437 du gène *Pfdhps* sont connues pour leur association dans la résistance de *Plasmodium falciparum* à la Pyriméthamine et la Sulfadoxine [55]. La résistance de *P. falciparum* à la pyriméthamine nécessite très souvent l'étude des positions 108 et 613. Aussi, la position 540 du gène *Pfdhps* est très connue pour son implication dans la résistance à la Sulfadoxine. Notre étude n'a pas inclus l'étude de ces dernières, ceci constitue une limite.

6.2 Résultats

6.2.1 Facteurs démographiques

Notre étude a porté sur une population de 202 enfants souffrants du paludisme simple confirmé tous âgés de 6 à 59 mois après avoir dépisté 3319 enfants (tableau 8, objectif spécifique 1). Ce groupe, dont le système immunitaire est moins développé, est le groupe le plus vulnérable à développer le paludisme grave d'où l'importance de toute étude scientifique visant à nous renseigner sur les mutations de résistance pouvant nuire à la chimioprévention pour ce groupe particulièrement. La tranche d'âge (moins

de 5 ans) concernée par cette étude est une bonne tranche pour faire un bon échantillonnage vu que c'est la même tranche d'âge qui comporte le plus grand pourcentage de la population Malienne subdivisée en intervalles de quatre ans d'âge selon la Pyramide des âges [31]. Selon la cinquième enquête démographique et sanitaire du Mali, les enfants de moins de cinq ans représentent 17% de la population malienne [56].

Le sexe ratio 1,17(54/46) était en faveur du sexe masculin. Ce résultat est comparable au sexe ratio de 1,04 en faveur du sexe masculin trouvé au Mali par la Banque Mondiale en 2015 chez les enfants de moins de cinq ans [31].

6.2.2 Taux d'hémoglobine

Chez la majorité de nos patients, le taux d'hémoglobine était en moyenne 9,3g/dL. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la majorité des patients viennent avec une anémie légère ou modérée due au pouvoir hémolysant des plasmodies. Ce taux est similaire au taux (9,24g/dL) trouvé par Djimde M à Koro en 2008 [57]. Il était inférieur au taux moyen de 11,4g/dL trouvé à Sikasso chez des enfants atteints du paludisme simple en 2012 dans la tranche d'âge 5 à 9 ans par Berthe M [58]. Le minimum des taux d'hémoglobine dans notre étude était 5,3g/dL et le maximum était de 13,3g/dL.

6.2.3 Paramètres du polymorphisme génétique de la *mSP1*

La *mSP1* est une protéine localisée sur le chromosome 9 de *Plasmodium falciparum*. Elle est composée de 17 blocks dont le plus variable est le block 2. Celui-ci, par sa variabilité permet de distinguer les clones de *Plasmodium falciparum*. Ledit block 2 comprend les allèles K1, MAD20 et RO33. La PCR nichée de la *mSP1* est largement utilisée pour la détermination de la multiplicité de l'infection (MOI) palustre.

Avec les amorces de bloc conservé et des allotypes K1, MAD20 et RO33, nous avons fait la PCR nichée qui nous a permis de déterminer les fréquences des différents allotypes de la *mSP1*.

La multiplicité de l'infection que nous avons (MOI) était 1,5 (notre objectif spécifique 2) et elle était comparable à celles rapportées en 2016 par Yavo et al (1,66 en Côte d'Ivoire et 1,58 au Gabon) [50]. Elle était supérieure à la multiplicité de l'infection palustre (1,37) trouvée en Malaisie en 2011 par Atrosh et al [59]. Elle était inférieure à celles trouvées [(3,11 entre 2006 et 2007) et (1,63 entre 2013 et 2016)] par Huang Bo et al dans la grande Ile des Comores [60]. Elle était inférieure à celle (2,8) trouvée au

Niger en 2017 par Ibrahim Arzika et al [61]. La multiplicité de l'infection d'environ 2 génotypes par patient témoigne qu'il y a une forte transmission du paludisme dans les localités où s'est tenue cette étude.

Les prévalences des allèles de la *msp1* que nous avons trouvés étaient 36% pour K1, 24% pour l'allèle MAD20 et 40% pour RO33. Cette prédominance de l'allèle RO33 que nous avons trouvée, a été également trouvée en Malaisie par Atrosh et al mais le taux de RO33 (80%) double celui de notre étude [59]. La même prédominance de RO33 est confirmée par une étude de Huang Bo et al dans la Grande Ile des Comores de 2006 à 2007 (84,8% de RO33) et entre 2013 et 2016 (63,4% de RO33) [60]. Cependant, la prédominance de RO33 est contredite par une étude menée par Mohammed et al qui trouve une prédominance de l'allèle K1 (33,9%) en Ethiopie en 2015 [62]. Ainsi que par une étude de Mawili-Mboumba et al au Gabon en 2015 qui rapporte également une prédominance de l'allèle K1 (65,5%) [63]. Nous avons une différence dans la distribution des allèles de la *msp1* entre Missira et Selingué contrairement à Mawili-Mboumba et al qui n'ont pas trouvé de différence entre Oyem et Owendo au Gabon [63]. La prévalence de K1 (36%) que nous avons rencontrée était inférieure à celles trouvées en Côte d'Ivoire (64,6%) et au Gabon (56,6%) par Yavo et al en 2016 [50].

Nous avons trouvé une prédominance de la présence de l'allèle K1 (38%) suivie de MAD20 (33%) et RO33 (29%) à Selingué. La prédominance de K1 (45,55) a été également trouvée par Diarra Y en 2016 à Diaro dans la région de Ségou mais elle était suivie de RO33 (30,69%) et MAD20 (24,75%) [19]. Nous avons une prédominance de RO33 (53%) suivie de K1 (34%) et de MAD20 (13%) à Missira contrairement aux résultats de Diarra Y [19].

6.2.4 Les mutations associées à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine et à la pyriméthamine que nous avons étudié

6.2.4.1 Position 51 sur le gène *Pfdhfr*

L'estimation des mutations à la position 51 du gène *Pfdhfr* (66,83%) que nous avons trouvée était nettement supérieure au taux de 28,2% trouvé sur la même position en 2008 par Djimde M à Koro dans la région de Mopti au Mali [57]. Cependant, cette estimation était similaire au 79,2% de mutations sur *Pfdhfr* à la position 51 rapporté par Diawara et al dans une étude menée à Kita au Mali sur la même population cible que notre étude [64]. Elle concorde aussi avec le taux de 67,5% trouvé sur la même position au

Niger selon une étude menée par Woï L et al en 2017 [65]. Notre résultat (taux de mutations à la position 51 de *Pfdhfr*) était cependant plus bas que celui (83,5%) obtenu au Sénégal par Wurtz et al en 2012 [66], plus bas que le taux de 93% rapporté par une étude menée par Gama et al en 2011 en Angola [67] et plus bas que le taux de 72,3% obtenu en Chine par Huang F et al en 2012 [68]. Donc, bien que la prévalence des mutations à la position 51 du gène *Pfdhfr* dans notre étude avait dépassé les 50% (la prévalence est haute), elle serait soit similaire ou inférieure à celles retrouvées dans la sous-région et ailleurs. La différence (taux plus élevé dans notre étude) entre le résultat de notre étude (récente) à cette position et celui de Djimde M à Koro (2008) pourrait s'expliquer par le fait que les mutations évoluent avec le temps.

6.2.4.2 Position 59 sur le gène *Pfdhfr*

La prévalence des mutations à la position 59 du gène *Pfdhfr* était de 65% lors de notre étude. Elle était supérieure à celle d'une étude menée à Koro par Djimde M en 2008 où il a été trouvé un taux de 35% [57]. Elle était inférieure au 81,2% rapporté dans l'étude de Diawara et al en 2017 au Mali [64]. Ce même taux de 65% était légèrement proche de celui (74,1%) d'une étude menée par Wurtz et al au Sénégal en 2012 [66]. A la même position 59, la prévalence des mutations que nous avons était inférieure à celle d'une étude menée au Sénégal par Amor et al en 2012 qui rapporte 95% entre 2002 et 2005 d'une part et d'autres parts 91,8% entre 2008 et 2010 [69]. La prévalence de ces mutations 59R obtenue lors de notre étude était proche des 60,8% qui ont été trouvés au Niger par Woï L et al en 2017 [65]. Notre résultat était comparable au 57% obtenu en Angola par Gama et al en 2012 [67]. Notre résultat était plus bas que celui trouvé (95,1%) par Huang F et al dans la province du Yunnan en Chine en 2012 [68]. Cela concorde avec la disparité (en faveur de l'Afrique) de la distribution des mutations sur les gènes *Pfdhfr* entre l'Asie et l'Afrique.

Cette haute prévalence des mutations sur le gène *Pfdhfr* à la position 51 et 59 pourrait être due à la pression médicamenteuse induite par l'administration massive et continue de la pyriméthamine.

6.2.4.3 Position 436 sur le gène *Pfdhps*

La prévalence des mutations sur le gène *Pfdhps* à la position 436 était de 22% lors de notre étude. Ce pourcentage des mutations à la position 436 était nettement inférieur aux 60,2% trouvés au Niger par Woï L et al en 2017 [65]. Ce taux est cependant supérieur à ceux d'Amor et al au Sénégal 12,3% entre 2002 et 2005 et 0% entre 2008

et 2010 [69]. L'écart se réduit lorsque nous comparons le taux de 22% trouvé dans notre étude à celui de 35,1% trouvé par Wurtz et al en 2012 au Sénégal [66]. Cependant les 22% de mutations détectés à ladite position 436 dans notre étude étaient comparables au 23% des mêmes mutations trouvées par Gama et al en Angola en 2011 [67] et les 59,7% trouvés par Huang F et al en Chine en 2012 [68].

6.2.4.4 Position 437 sur le gène *Pfdhps*

A la position 437 du gène *Pfdhps*, nous avons une prévalence de 54% contre 45% obtenu par Djimde M en 2008 à Koro au Mali [57] et 41,8% dans l'étude de Diawara et al en 2017 à Kita au Mali [64]. Cette prévalence était inférieure à celle (80%) trouvée à la même position au Niger par Woï L et al en 2017 [65]. Les mutations 437G obtenues (50%) étaient moins détectées (40,2%) dans une étude menée au Sénégal par Wurtz et al en 2012 [66]. A la position 437 du gène *Pfdhps*, les 55% de mutations, que nous avons obtenu était inférieures au 71% entre 2002 et 2005 et au 83,6% entre 2008 et 2010 obtenu sur la même position au Sénégal par Amor et al [69]. Le taux de mutations 437G (50%) de notre étude était plus significatif que le taux de 7% rapporté par l'étude de Gama et al en Angola en 2011 [67] et inférieur au taux de 94% trouvés en Chine par Huang F et al en 2015 [68].

6.2.4.5 Multiples mutations

Nous avons confronté les multiples mutations (notre objectif spécifique 4) rencontrées dans notre étude aux résultats d'une étude similaire à la nôtre en terme de population cible menée au Niger par Woï L et al en 2017 [65]. Il ressort que, les 56% des doubles mutations sur le gène *Pfdhfr* aux positions 51 et 59 que nous avons, étaient proches des 58,3% trouvés par Woï L et al dans cette dernière étude [65]. Le taux de doubles mutations (14%) que nous avons sur le gène *Pfdhps* aux positions 436 et 437 était nettement inférieur au taux de 49,5% trouvé au Niger par Woï L et al.

L'induction de la pression médicamenteuse induite par l'administration de la Pyriméthamine et la sulfadoxine est aussi confirmée par la présence des mutations sur le gène *Pfdhps* aux positions 436 et 437. Le polymorphisme associé à l'apparition d'un nouvel acide aminé (Y) à la position 436 suggère un changement de comportement du parasite vis-à-vis de la sulfadoxine.

CONCLUSION

7 CONCLUSION

Nous avons fait une étude sur l'estimation des prévalences des mutations sur les gènes *Pfdhfr* aux positions 51 et 59 et *Pfdhps* aux positions 436 et 437. L'étude s'est déroulée aux mêmes moments que les activités de la CPS 2017 dans les localités de Missira et Sélingué.

Nous avons remarqué que la prévalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* aux positions 51,59 et 437 était élevée, soit respectivement 66,83%, 65% et 54%.

Cependant, la prévalence était moins élevée à la position 436 du gène *Pfdhps* soit 22%. Cette position du gène *Pfdhps*, c'est néanmoins révélée très polymorphe. La mutation 436Y qui a été isolée chez un de nos patients reste rarement décrite dans la littérature scientifique.

Ces hautes prévalences témoignent de la pression médicamenteuse exercée par la SP sur les souches de *Plasmodium falciparum* dans ces deux localités. Ceci nécessite une exploration plus approfondie de ces deux gènes notamment aux positions 108 de *Pfdhfr* et 540 de *Pfdhps*.

RECOMMENDATIONS

8 RECOMMANDATIONS

Au vu des résultats de cette étude nous recommandons :

Au LBMA et ses partenaires

- De continuer la surveillance des mutations associées à la résistance à la SP régulièrement.
- D'inclure les positions 540 du gène *Pfdhps* et 108 de *Pfdhfr* aux futures études.
- De séquencer les échantillons ayant présenté les acides aminés non connus à travers le HRM.

Au PNLP et au Ministère de la santé et de l'hygiène publique

- De veillez à la bonne administration des doses de la CPS et au respect des intervalles de temps entre les différents passages.
- Prendre en comptes les besoins de formation et de développement des compétences sur les méthodes d'évaluation de la chimiorésistance notamment dans le cadre de la CPS.

REFERENCES

9 REFERENCES

1. World Health Organization, Global Malaria Programme. World malaria report 2017. [Internet]. 2017. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf?sequence=1>
2. Mvumbi D. Place de la biologie moléculaire dans l'épidémiologie, le diagnostic et l'évaluation de la chimiorésistance du paludisme en République Démocratique du Congo. :168. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01476881/document>
3. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. Parasitologie médicale. Généralités et définitions. 2014 [cité 9 juin 2018];(POLYCOPIE NATIONAL 2014):411. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/poly-parasitologie.pdf>
4. World Health Organization, Global Malaria Programme. Guidelines for the treatment of malaria. [Internet]. Genève; 2015 [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294440/>
5. OMS. Chimio-prévention du paludisme saisonnier par administration de sulfadoxine-pyriméthamine et d'amodiaquine aux enfants: guide de terrain [Internet]. 2013 [cité 7 juin 2018]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85727/9789242504736_fre.pdf?sequence=1
6. Campagne de Communication en matière de Chimio-prévention du Paludisme Saisonnier au Mali 2015 [Internet]. RBM CCoP Annual Meeting, Kampala 29-30 September 2015 présenté à; 2015; Kampala 29-30 September 2015. Disponible sur: http://www.rollbackmalaria.org/wp-content/uploads/2017/08/SMC-Mali_Mory-Camara.pdf
7. Ndiaye D, Dieye B, Ndiaye YD, Tyne DV, Daniels R, Bei AK, Mbaye A, Valim C, Lukens A, Mboup S, Ndir O, Wirth DF, Volkman S. Polymorphism in *dhfr/dhps* genes, parasite density and ex vivo response to pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria parasites in Thies, Senegal. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance [Internet]. déc 2013 [cité 29 mai 2018];3:135-42. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211320713000134>
8. régional de l'Afrique C. Cadre pour la mise en œuvre de la Stratégie Technique mondiale de Lutte contre le Paludisme 2016-2030 dans la Région africaine: rapport du Secrétariat. 2016; Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/251358>
9. Bras JL. Mécanismes et dynamique des chimiorésistances de *Plasmodium falciparum*. 1999;6. Disponible sur: <http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/T92-4-GMI-3.pdf>

10. OMS. METHODS FOR SURVEILLANCE OF ANTIMALARIAL DRUG EFFICACY [Internet]. 2009 [cité 6 juin 2018]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44048/9789241597531_eng.pdf?sequence=1
11. Ringwald P, Global Partnership to Roll Back Malaria. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring, 1996-2004. [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2005 [cité 6 juin 2018]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43302/9241593466_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
12. Gan LSH, Loh JP. Rapid identification of chloroquine and atovaquone drug resistance in *Plasmodium falciparum* using high-resolution melt polymerase chain reaction. 2010;5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881075/>
13. Maiga H, Lasry E, Diarra M, Sagara I, Bamadio A, Traore A, Coumare S, Bahonan S, Sangare B, Dicko Y, Diallo N, Tembely A, Traore D, Niangaly H, Dao F, Haidara A, Dicko A, Doumbo OK, Djimde AA. Seasonal Malaria Chemoprevention with Sulphadoxine-Pyrimethamine and Amodiaquine Selects *Pfdhfr*-*dhps* Quintuple Mutant Genotype in Mali. Sullivan DJ, éditeur. PLOS ONE [Internet]. 23 sept 2016 [cité 6 juin 2018];11(9):e0162718. Disponible sur: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0162718>
14. Konaté AT, Yaro JB, Ouédraogo AZ, Diarra A, Gansané A, Soulama I, Kangoyé DT, Kaboré Y, Ouédraogo E, Ouédraogo A, Tiono AB, Ouédraogo IN, Chandramohan D, Cousens S, Milligan PJ, Sirima SB, Greenwood B, Diallo DA. Intermittent Preventive Treatment of Malaria Provides Substantial Protection against Malaria in Children Already Protected by an Insecticide-Treated Bednet in Burkina Faso: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Rogerson SJ, éditeur. PLoS Medicine [Internet]. 1 févr 2011 [cité 6 juin 2018];8(2):e1000408. Disponible sur: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1000408>
15. Zakeri S, Afsharpad M, Raeisi A, Djadid N. Prevalence of mutations associated with antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum* isolates prior to the introduction of sulphadoxine-pyrimethamine as first-line treatment in Iran. Malaria Journal [Internet]. 2007 [cité 15 avr 2018];6(1):148. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-6-148>
16. Le Bras J, Musset L, Clain J. Les résistances aux médicaments antipaludiques. Médecine et Maladies Infectieuses [Internet]. 1 août 2006 [cité 12 juin 2018];36(8):401-5. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X06001314>
17. Institut Pasteur de Madagascar. Evolution de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux médicaments a... [Internet]. Santé & Médecine présenté à; 02:41:19 UTC [cité 12 juin 2018]. Disponible sur: https://fr.slideshare.net/atelier-paludisme/fac-2011-clainipm29avril2011?next_slideshow=1

18. OMS. Stratégie Technique Mondiale De Lutte Contre Le Paludisme 2016-2030. [Internet]. World Health Organization; 2015 [cité 9 juin 2018]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176720/9789242564990_fre.pdf?sequence=1
19. Diarra Y. Etude d'efficacité des antipaludiques : cas de l'artemether-lumefantrine et la chloroquine dans la commune rurale de Dioro [Internet] [thèse de pharmacie]. [Mali]: USTTB/Faculté de Pharmacie; 2016. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2016/pharma/pdf/16P05.pdf>
20. Daniels R, Ndiaye D, Wall M, McKinney J, Séné PD, Sabeti PC, Volkman SK, Mboup S, Wirth DF. Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. juin 2012 [cité 6 juin 2018];56(6):2976-86. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430961>
21. Médecine tropicale (6e éd.) - GENTILINI Marc, CAUMES Eric, DANIS Martin, BÉGUÉ Pierre - Pages liminaires [Internet]. [cité 5 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.calameo.com/read/00128213647ba851bb743>
22. OMS. l'utilisation des antipaludiques [Internet]. Genève: OMS; 2000 [cité 5 juin 2018]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67811/WHO_CDS_RBM_2001.3_3_fre.pdf?sequence=1
23. Institut Pasteur de Madagascar. Résistance de *Plasmodium falciparum* aux dérivés de l'artémisinine [Internet]. Santé & Médecine présenté à; 03:03:19 UTC [cité 12 juin 2018]. Disponible sur: <https://fr.slideshare.net/atelier-paludisme/app-2006-asani-s5>
24. OMS. status-rep-artemisinin-act-resistance-sept2015.pdf [Internet]. Genève; 2015 [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/status-rep-artemisinin-act-resistance-sept2015.pdf?ua=1>
25. OMS. RAPPORT SUR LE PALUDISME DANS LE MONDE 2016 [Internet]. Genève; 2017 [cité 7 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/malaria-report-response/fr/>
26. Menard_et_al, MS_2013.pdf [Internet]. [cité 8 nov 2015]. Disponible sur: http://publicationslist.org/data/didier.menard/ref-143/Menard_et_al,%20MS_2013.pdf
27. Koita OA, Sangaré L, Sango HA, Dao S, Keita N, Maiga M, Mounkoro M, Fané Z, Maiga AS, Traoré K, Diallo A, Krogstad DJ. Effect of Seasonality and Ecological Factors on the Prevalence of the Four Malaria Parasite Species in Northern Mali. *Journal of Tropical Medicine* [Internet]. 2012 [cité 30 mai 2018];2012:1-9. Disponible sur: <http://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/367160/>

28. Djimdé AA, Fofana B, Sagara I, Sidibe B, Toure S, Dembele D, Dama S, Ouologuem D, Dicko A, Doumbo OK. Efficacy, Safety, and Selection of Molecular Markers of Drug Resistance by Two ACTs in Mali. 2008 [cité 6 juin 2018];7. Disponible sur: <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/78/3/0780455.pdf?expires=1528335159&id=id&accname=guest&checksum=9E43B1E0A987D6F494EF2ABF0D0EDFB1>
29. Mitigating the threat of artemisinin resistance in Africa: improvement of drug-resistance surveillance and response systems. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23099083>
30. Samaké S, Traoré SM. Enquête Démographique et de Santé du Mali 2006. 2006;535.
31. Pyramide des âges -Mali - [Internet]. [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: <http://perspective.usherbrooke.ca/bilan/servlet/BMPPagePyramide?codePays=MLI&annee=2015>
32. Doumbo O. Epidémiologie du paludisme au Mali: étude de la chloroquinorésistance, essai de stratégie de contrôle basée sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associée au traitement systématique des accès fébriles [Internet]. Montpellier 2; 1992 [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/1992MON20039>
33. Professeur Pierre Aubry, Docteur Bernard-Alex Gaüzère. paludisme Actualités 2017 [Internet]. 2017 [cité 5 juin 2018]. Disponible sur: <http://medecinotropical.free.fr/cours/paludisme.pdf>
34. Jean Mouchet, Pierre Carnevale, Marc Coosemans, Didier Fontenille, Charles Ravaonjanahary, Alain Richard,, Vincent Robert. Typologie du paludisme en Afrique. Cahiers Santé 1993 ; 3: 220-38 [Internet]. 1993; Disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_33-34/39002.pdf
35. Toure Y. Étude de la sensibilité d'*Anopheles funestus* et d'*Anopheles gambiae* sensu lato aux insecticides dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali. 1982 [cité 5 juin 2018];7. Disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/cahiers/entomo/02302.pdf
36. Didier Fontenille, Philippe Deloron. Vaincre le paludisme (3) Les systèmes vectoriels. In France; 2012. p. 25. Disponible sur: http://www.suds-en-ligne.ird.fr/paludisme/pdf/3-systemes_vectoriels.pdf
37. [PDF] Guide pratique de lutte contre le paludisme en entreprise | Business & Human Rights Resource Centre [Internet]. [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.business-humanrights.org/fr/pdf-guide-pratique-de-lutte-contre-le-paludisme-en-entreprise>
38. Prevention C-C for DC and. CDC - Malaria - About Malaria - Biology [Internet]. 2018 [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>

39. Association française des professeurs de parasitologie. Parasitologie, mycologie Ann O'Fel Association française des professeurs de parasitologie [Internet]. 2014 [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: <http://bibliotheque.bordeaux.fr/in/faces/details.xhtml?id=mgroup%3A9782910657079>
40. OMS. Paludisme [Internet]. World Health Organization. 2018 [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
41. Pr Pichard E. et Danis M. Antipaludiques [Internet]. Semaine thématique paludisme IFMT Vientiane Laos présenté à: Semaine thématique paludisme IFMT Vientiane Laos; 2003 [cité 5 juin 2018]; France. Disponible sur: <https://natyinfirmiere.files.wordpress.com/2010/10/les-anti-paludiques.pdf>
42. Institut Pasteur de Madagascar. Mécanismes de résistance de Plasmodium aux antifolates [Internet]. Santé & Médecine présenté à; 2011 [cité 15 juin 2018]; Madagascar. Disponible sur: https://fr.slideshare.net/atelier-paludisme/app-2011s2-noromalalanoelisoa?next_slideshow=2
43. Dr D Filisetti & Pr L Monassier. LES ANTIPALUDEENS [Internet]. 2012 [cité 5 juin 2018]. Disponible sur: http://udsmmed.u-strasbg.fr/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco_Chap16-Antipaludeens_2012.pdf
44. Jongwutiwes S, Tanabe K, Nakazawa S, Yanagi T, Kanbara H. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in P190 (MSA-1) of Plasmodium falciparum from field isolates. Molecular and Biochemical Parasitology [Internet]. mars 1992 [cité 6 juin 2018];51(1):81-9. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016668519290203V>
45. Institut Pasteur de Madagascar. Séquence complète du génome de Plasmodium falciparum: intérêts pour l... [Internet]. Santé & Médecine présenté à; 07:30:41 UTC [cité 25 juin 2018]. Disponible sur: <https://fr.slideshare.net/atelier-paludisme/app-2007-safious2>
46. Institut Pasteur de Madagascar. Mécanismes de résistance des plasmodies aux antipaludiques [Internet]. Santé & Médecine présenté à; 01:48:28 UTC [cité 15 juin 2018]; Madagascar. Disponible sur: https://fr.slideshare.net/atelier-paludisme/app-2007-abdallis5?next_slideshow=1
47. WORLDWIDE ANTIMALARIAL RESISTANCE NETWORK. Résistance aux médicaments antipaludiques: Vue d'ensemble | WorldWide Antimalarial Resistance Network [Internet]. [cité 9 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.wwarn.org/fr/propos-de-nous/resistance-aux-medicaments-antipaludiques-vue-densemble>
48. OMS. Concentrations en hémoglobine permettant de diagnostiquer l'anémie et d'en évaluer la sévérité [Internet]. 2011 [cité 11 juin 2018]. Disponible sur: http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin_fr.pdf
49. Mei JV, Zobel SD, Hall EM, De Jesús VR, Adam BW, Hannon WH. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. Bioanalysis [Internet].

- août 2010 [cité 4 juin 2018];2(8):1397-403. Disponible sur: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.10.73>
50. Yavo W, Konaté A, Mawili-Mboumba DP, Kassi FK, Mbuyi T, L M, Angora EK, Menan EIH, Bouyou-Akotet MK. Genetic Polymorphism of *msp1* and *msp2* in *Plasmodium falciparum* Isolates from Côte d'Ivoire versus Gabon [Internet]. *Journal of Parasitology Research*. 2016 [cité 5 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/jpr/2016/3074803/>
 51. OMS. Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. [Internet]. Genève: World Health Organization; 2008 [cité 6 juin 2018]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43824/9789241596305_eng.pdf?sequence=1
 52. Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: Detection of Polymorphisms in the Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthetase Genes by PCR and Restriction Digestion. *Experimental Parasitology* [Internet]. 1 mai 1998 [cité 4 juin 2018];89(1):1-8. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489498942746>
 53. High prevalence of mutation in the *Plasmodium falciparum dhfr* and *dhps* genes in field isolates from Sabah, Northern Borneo | *Malaria Journal* | Full Text [Internet]. [cité 4 juin 2018]. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-198>
 54. Ihle MA, Fassunke J, König K, Grünewald I, Schlaak M, Kreuzberg N, Tietze L, Schildhaus H-U, Büttner R, Merkelbach-Bruse S. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer* [Internet]. 10 janv 2014 [cité 4 juin 2018];14:13. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-13>
 55. Cisse M, Awandare GA, Soulama A, Tinto H, Hayette M-P, Guiguemdé RT. Recent uptake of intermittent preventive treatment during pregnancy with sulfadoxine-pyrimethamine is associated with increased prevalence of *Pfdhfr* mutations in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Malaria Journal* [Internet]. 23 janv 2017 [cité 5 juin 2018];16:38. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1695-1>
 56. Cellule de Planification et de Statistiques (CPS/SSDSPF), Institut National de la Statistique (INSTAT), Centre d'Études et d'Information Statistiques (INFO-STAT). Mali Enquête Démographique et de Santé (EDSM-V) 2012-2013 [Internet]. Bamako, Mali; 2014 mai [cité 9 juin 2018] p. 577. Disponible sur: <http://mail.cnom.sante.gov.ml/docs/FR286.pdf>
 57. Djimde M. Efficacité in vivo de trois antipaludiques (Sulfadoxine-Pyriméthamine, Méfloquine et Artéméther-Luméfantrine) dans le traitement du paludisme non compliqué chez les enfants de 6 – 59 mois à Koro (Mopti) [Internet] [thèse de médecine]. [Koro/Mopti]: FMPOS; 2008 [cité 21 avr 2018]. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2008/med/pdf/08M258.pdf>

58. BERTHE MM. ETUDE DU PALUDISME ET DE L'ANEMIE CHEZ LES ENFANTS D'AGE SCOLAIRE DANS 5 COMMUNES RURALES DE SIKASSO [Internet] [thèse de médecine]. [SIKASSO]: FMPOS; 2012 [cité 9 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2012/pharma/pdf/12P28.pdf>
59. Atroosh WM, Al-Mekhlafi HM, Mahdy MA, Saif-Ali R, Al-Mekhlafi AM, Surin J. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates from Pahang, Malaysia based on MSP-1 and MSP-2 genes. *Parasit Vectors* [Internet]. 13 déc 2011 [cité 4 juin 2018];4:233. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3264521/>
60. Huang B, Tuo F, Liang Y, Wu W, Wu G, Huang S, Zhong Q, Su X, Zhang H, Li M, Bacar A, Abdallah KS, Mliva AMSA, Wang Q, Yang Z, Zheng S, Xu Q, Song J, Deng C. Temporal changes in genetic diversity of *msp-1*, *msp-2*, and *msp-3* in *Plasmodium falciparum* isolates from Grande Comore Island after introduction of ACT. *Malaria Journal* [Internet]. déc 2018 [cité 5 juin 2018];17(1). Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-018-2227-3>
61. Arzika I, Lamine MM, Mahamadou A, Ibrahim M. ETUDE DU POLYMORPHISME GENETIQUE DES SOUCHES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* AU NIGER. *Revue CAMES SANTE*. 1 juill 2017;5.
62. Mohammed H, Mindaye T, Belayneh M, Kassa M, Assefa A, Tadesse M, Woyessa A, Mengesha T, Kebede A. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates based on MSP-1 and MSP-2 genes from Kolla-Shele area, Arbaminch Zuria District, southwest Ethiopia. *Malar J* [Internet]. 14 févr 2015;14:73. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889847>
63. Mawili-Mboumba DP, Mbondoukwe N, Adande E, Bouyou-Akotet MK. Allelic Diversity of MSP1 Gene in *Plasmodium falciparum* from Rural and Urban Areas of Gabon. *Korean J Parasitol*. août 2015;53(4):413-9.
64. Diawara F, Steinhardt LC, Mahamar A, Traore T, Kone DT, Diawara H, Kamate B, Kone D, Diallo M, Sadou A, Mihigo J, Sagara I, Djimde AA, Eckert E, Dicko A. Measuring the impact of seasonal malaria chemoprevention as part of routine malaria control in Kita, Mali. *Malar J*. 10 août 2017;16(1):325.
65. Woï L, Amambua NA, Laouali MM, Grais RF. Evaluation de la résistance moléculaire de *plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine chez les enfants de moins de 5 ans, Madarounfa, région de Maradi au Niger. :1. Disponible sur: http://www.epicentre.msf.org/sites/preprod.epicentre.actency.fr/files/WOI%20ME SSE_poster.pdf
66. Wurtz N, Fall B, Pascual A, Diawara S, Sow K, Baret E, Diatta B, Fall KB, Mbaye PS, Fall F, Diémé Y, Rogier C, Bercion R, Briolant S, Wade B, Pradines B. Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Dakar, Senegal. *Malaria Journal* [Internet]. 2012 [cité 5 juin 2018];11(1):197. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-197>

67. Gama BE, Pereira-Carvalho GA, Lutucuta Kosi FJ, Almeida de Oliveira NK, Fortes F, Rosenthal PJ, do Rosário VE, Daniel-Ribeiro C, Fátima Ferreira-da-Cruz M. Molecular markers of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Luanda, Angola. *Malaria Journal* [Internet]. 2011 [cité 5 juin 2018];10(1):248. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-10-248>
68. Huang F, Tang L, Yang H, Zhou S, Liu H, Li J, Guo S. Molecular epidemiology of drug resistance markers of *Plasmodium falciparum* in Yunnan Province, China. *Malaria Journal* [Internet]. 2012 [cité 4 juin 2018];11(1):243. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-243>
69. Amor A, Toro C, Fernández-Martínez A, Baquero M, Benito A, Berzosa P. Molecular markers in *Plasmodium falciparum* linked to resistance to anti-malarial drugs in samples imported from Africa over an eight-year period (2002-2010): impact of the introduction of artemisinin combination therapy. *Malaria Journal* [Internet]. 2012 [cité 5 juin 2018];11(1):100. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-100>

ANNEXES

10 ANNEXES

Fiche de Recensement

Fiche de Recensement CPS (PMI/LBMA)			
Région :	District :	Centre de Santé :	Village :
Numéro d'enregistrement :		Nom et prénom de l'enfant :	
Nom et prénom de la mère :		Numéro de téléphone :	
Age (en mois) :	Sexe (M/F) :	Résident (O/N) :	
Carte d'enregistrement (O/N) :		Cycle (CPS1, CPS2, CPS3, CPS4) :	
Date CPS1 :	Date CPS2 :	Date CPS3 :	Date CPS4 :
Nom du responsable d'équipe :		Contact du Responsable :	
Nom et Contacts du superviseur de proximité :			
Date de visite au Centre :			
Résultat TDR :	Résultat Goutte épaisse:		Traitement (O/N) :
Photo et empreinte digitales de l'enfant			

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : THIAM

Prénom : Nouhoum

Tel : (00223) 66 31 75 56 /78 45 9 1 83 **E-mail** : noethiam@gmail.com

Titre de la thèse : Prévalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* dans les localités de Missira et Sélingué au Mali en 2017

Nationalité : Malienne

Année Universitaire : 2017-2018

Ville de soutenance : Bamako-Mali

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

Secteur d'intérêt : Epidémiologie, Pharmacologie, Biologie

RESUME

L'administration massive et continue de la SP crée une pression médicamenteuse qui peut engendrer l'apparition des mutations sur les *Pfdhfr* et *Pfdhps*. D'où la recommandation par l'OMS de procéder à la surveillance des molécules inscrites dans le traitement du paludisme dans les zones d'endémies palustres. Nous avons mené une étude prospective de la distribution des mutations sur les gènes *Pfdhfr* 51/59 et *Pfdhps* 436/437 dans les localités de Missira et de Sélingué au Mali en 2017. L'étude s'est déroulée durant la période des campagnes de chimioprevention du paludisme saisonnier en 2017 chez des enfants de moins de 5 ans ayant reçu les doses d'amodiaquine plus la sulfadoxine-pyriméthamine. Les enfants âgés de 3 à 59 mois ont été recensés et identifiés en amont de la CPS. Tous les patients se présentant au centre de santé et appartenant à cette cohorte ont été dépistés par goutte épaisse à la recherche d'éventuels cas de paludisme. Pour les cas positifs à la goutte épaisse, un prélèvement veineux a été effectué et conservé à -80°C pour les tests *in vitro* puis sur papiers confettis. L'ADN du parasite a été extrait à partir du papier confettis. La multiplicité de l'infection a été estimée en utilisant le marqueur polymorphique *msp1* et la recherche des marqueurs de résistance a été faite par HRM. Sur un total de 5247 enfants suivis, 3919 ont été dépistés pour cause de paludisme et 202 positifs à la

goutte épaisse avec une parasitémie supérieure à 1000 Tf/ μ L de sang. La multiplicité de l'infection a été estimée à environ 2 génotypes par patient. La prévalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* aux positions 51, 59 et 436, 437 étaient respectivement 66,83% ; 65% ; 22% et 54%. La fréquence des doubles sur *Pfdhfr* et *Pfdhps* étaient respectivement 56% et 14%. Les fréquences des triples et quadruples mutations étaient faibles avec respectivement 8% et 6%. La position 436 de *Pfdhps* s'est révélée très polymorphique avec la détection de l'acide aminé Y qui est rare.

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

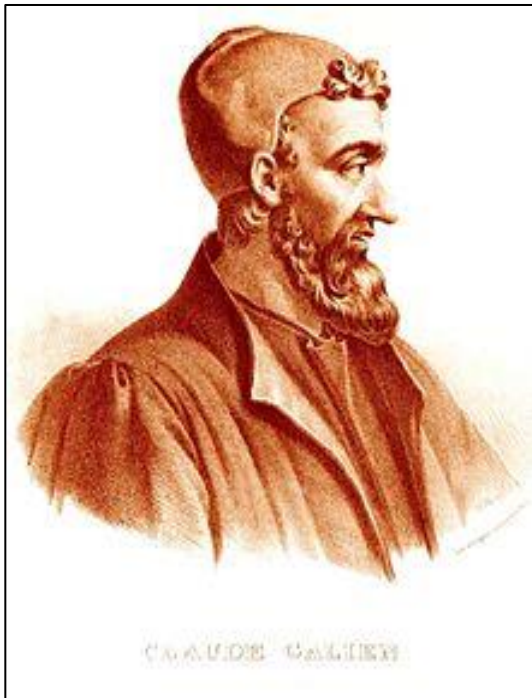
IDENTIFICATION SHEET**Last Name:** THIAM**First Name:** Nouhoum**TEL :** (00223) 66 31 75 56 / 78 45 91 83**E-mail:** noethiam@gmail.com**Title:** Prevalence of mutations on *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes in Sélingué and Missira localities in 2017, Mali**Academic Year:** 2017-2018**City of defense:** Bamako-Mali**Place of deposit:** Library of Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology**Focus area:** Epidemiology, Pharmacology and Biology**ABSTRACT**

The massive and continuous administration of SP creates a drug pressure that can lead to the observation of mutations on *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes. Hence, it is recommended by WHO to continue drugs resistance monitoring for the molecules listed in the treatment of malaria cases in endemic areas. We conducted a prospective study of the distribution of mutations on the *Pfdhfr* 51/59 and *Pfdhps* 436/437 genes in the localities of Missira and Sélingué in Mali in 2017. The study was conducted during the period of the Seasonal malaria chemoprevention campaigns in 2017 within children less than 60 months of age who received doses of amodiaquine and sulphadoxin-pyrimethamine. Children from 3 to 59 months were identified prior to SMC. All patients coming at the health centers and belonging to this cohort were screened by thick smear for possible episode of malaria. For positive smear cases, a venous sample was taken and stored at -80°C for *in vitro* tests and then dried blood spots are made using filter papers. Parasite DNA was extracted from filter paper using Qiagen®. The multiplicity of infection has been estimated using the *msp1* polymorphic marker and samples have been scanned for resistance mutations using the HRM method. Of a total of 5247 children monitored, 3919 were screened for malaria and 202 have a positive thick smear with a parasitaemia greater than 1000 Tf/μL of blood. The multiplicity of infection has been estimated at about 2 genotypes per patient. The prevalence of mutations on the *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes at positions 51, 59 and 436, 437 were respectively 66.83%; 65% then 22% and 54%. The frequency of double mutations on *Pfdhfr* and

Pfdhps were respectively 56% and 14%. The frequencies of the triple and quadruple mutations were low with 8% and 6% respectively. The *Pfdhps* at the position 436 was very polymorphic with the detection of the rare amino acid Y.

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

SERMENT DE GALIEN



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

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

D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique ma profession avec conscience et de respecter

non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

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

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

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

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

Je le jure !