

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° _____/

Test d'efficacité des combinaisons Thérapeutiques Artémether plus Luméfantrine et Artésunate plus Amodiaquine dans le traitement du paludisme simple à *P.falciparum* à Sélingué et à Missira en 2016

THESE

Présentée et soutenue publiquement le __/06/2018 devant la Faculté de Pharmacie pour obtenir le Grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)

Par

M. Hamadou BOUARE

JURY

Président du Jury : Professeur Mouctar Diallo

Membres : Professeur Lansana Sangaré

Docteur Dade Ben Sidy Ben Bouye Haidara

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	H AidARA	Législation
M. Moussa	Feu HARAMA	Chimie Organique (décédé)
M. Gaoussou	KANOUTE	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 CONFERENCE/MAITRE DE RECHERCHE

M. Flabou	BOUGOUDOGO	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/CHARGE 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/ATTACHE DE RECHERCHE

M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie 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/DIRECTEUR 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/CHARGE DE RECHERCHE

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

ASSISTANTS/ATTACHE 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/DIRECTEUR DE RECHERCHE

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

MAITRES DE CONFERENCE/MAITRE DE RECHERCHE

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

MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

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

ASSISTANTS/ATTACHE 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/DIRECTEUR 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/CARGE DE RECHERCHE

ASSISTANTS/ATTACHE 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	BAGAYOGO	Informatique
M. Babou	BAH	Anatomie
M. Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
M. Souleymane	COULIBALY	Psychologie
M. Boubou	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	Maths
M. Abdel Kader	TRAORE	Pathologies Médicales
M. Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

Dédicaces et remerciements :

Je dédie ce travail

A ALLAH, le tout Puissant, le tout Miséricordieux, le clément pour m'avoir donné la santé le courage et l'endurance de réaliser cette thèse.

A ma mère qui par ses soutiens jusqu'ici m'a permis d'être tout ce que je suis aujourd'hui, MAMAN les mots me manquent pour exprimer ma gratitude je dirai tout simplement qu'il n'existe pas de mot dans mon dictionnaire pour te qualifier, que le TOUT PUISSANT te donne longue vie amen...

A mon père pour avoir tout donné pour notre épanouissement mes frères et moi, PAPA de là où tu es j'espère que tu serais fier de moi, sache également que nous sommes fier de toi pour tout ce que tu nous as montré signifiant les valeurs du travail bien fait

A mes frères, sœurs et amis pour leur conseil et encouragement inconditionnels à mon égard.

Aux victimes du paludisme et à sa population cible.

Remerciements :

Je remercie le TOUT PUISSANT, le TOUT MISERICORDIEUX, le TRES HAUT L'OMNISCIENT et l'OMNIPOTENT.

A ma mère

Tout ce que je dirai sera faible pour représenter ma gratitude mais sache que pour nous tu as toujours été une mère digne de ce nom, tu nous as prodigué le courage le respect l'amour et la bonté, tu as toujours mis le bonheur de tes enfants au-devant de tout. MERCI donc pour ces souffrances endurées.

Ce travail est le fruit, le labeur de l'assistance que tu m'as apporté, puisse ALLAH t'apporter santé bonheur et longévité.

A mon père

Tes conseils et ton soutien inconditionnel m'ont permis de comprendre cette phrase que tu n'as jamais cessé de me répéter « Ne baisse jamais les bras et tu atteindras l'objectif... »

Je ne pourrai jamais te récompenser pour tout ce que tu as fait pour moi.

J'espère que de là où tu es, tu seras fier de moi comme je l'ai toujours été pour toi, puisse ALLAH t'accepter dans son paradis. Amen.

A mon frère et ami Dr Moctar Bouare

Il **est claire** que je crois en la génétique et au lien du sang mais je crois également qu'un ami peut devenir un frère plus qu'un frère biologique.

Tu n'as jamais cessé de me surprendre par tes nombreuses qualités humaines, les mots me manquent aujourd'hui pour exprimer toute ma gratitude à ton égard.

Je dirai tout simplement MERCI à la vie de t'avoir mis sur mon chemin. Ce travail est le tien.

A mon aîné Dr Youssouf Diarra vous êtes pour nous un exemple à suivre sincèrement dit les mots nous manquent pour vous qualifier, MERCI pour tous !!

A mes frères et sœurs

FOUSSEYNI, ABOU, ABDOULAYE, YAYA, OUSMANE, BOUBACAR, FATOUMATA, BACONE, AWA FANA et TOUS LES MEMBRES DE LA FAMILLE BOUARE

Vous m'avez toujours soutenu avec vos conseils et votre affection. Que le Tout Puissant vous assiste en toutes circonstances. Amen

A mon oncle: merci pour l'éducation que vous m'avez donnée avant votre disparition. Cela m'a permis de supporter les différentes difficultés que j'ai rencontrées dans ma vie. Que ton âme repose en paix.

A mes grands frères à BAMAKO : **Yacouba Sadio Mamoutou Brehima Sidi Madou** : Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect pour le soutien que vous m'avez apporté durant ce travail.

A mes nièces, neveux : **Alimatou Kadi Aminata Fatoumata Mohamed Bibatou** et Toute la Famille BOUARE à BAMAKO : **Merci pour l'amour, le soutien et l'entretien que Dieu vous donne longue vie.**

A mes amis : Mme Guindo Fatoumata Telly dite Tiguem, Mamadou A Diarra, Yacouba Dansoko, Issa Doumbia, Alassane Diarra, Yssouf Diarra, Keou, Fousseyni Samassekou, Tall, Siaka Bagayogo : Ce travail est le fruit de votre collaboration durant laquelle vos conseils et soutiens ne m'ont jamais manqué. Qu'Allah vous assiste en tout lieu et en toute circonstance. Amen.

A mon promoteur d'école fondamentale Adama Ballo : vous m'avez aidé, soutenu et guidé pour atteindre ce niveau. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respect.

A tout le personnel du LBMA : Merci pour votre collaboration et votre enseignement que je continu de bénéficier jusqu'aujourd'hui.

A tout le personnel du Csref de Selingué et tout le Staff PMI de Missira : pour leur agréable hospitalité pendant la période de cette étude.

A tous les joueurs et membres du bureau de l'ADERS : Merci pour ces moments de fraternité et d'amitié partagés. Je suis fier d'être un des votre.

A tous mes camarades de la neuvième promotion du numerus clausus :

**HOMMAGES
AUX MEMBRES
DU JURY**

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du Jury

Pr Mouctar Diallo

- **PhD en Parasitologie Entomologie médicale ;**
- **Professeur 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. Soyez rassuré honorable maître de notre reconnaissance.

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

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

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

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

A notre Maître et Jury

Professeur Lansana SANGARE

- **Maitre de conférences en Parasitologie à la FST ;**
- **Chargé des cours de biologie moléculaire au département de biologie à la FST**
- **Chef de l'unité de Parasitologie au LBMA.**

Cher Maître,

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

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

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

Soyez-en félicité pour ce caractère !!!

A notre Maître et juge

Docteur Dade Ben Sidy Ben Bouye Haidara

- **Docteur en Médecine ;**
- **Médecin épidémiologiste à la direction régionale de la santé de Sikasso,**
- **Ancien médecin chef du centre de santé de référence de Sélingué,**

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

A notre Maître et co-directeur de thèse

Docteur Youssouf Diarra

- **Docteur en pharmacie**
- **Assistant de recherche au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliqué**

Cher Maître,

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

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

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

Soyez-en félicité pour ce caractère !!!!

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Ousmane KOITA

- **Pharmacien Biologiste ;**
- **Professeur en parasitologie moléculaire ;**
- **Chargé de cours de biologie moléculaire appliquée à la FST et de biologie animale à la faculté de Pharmacie ;**
- **Ancien Directeur-Adjoint du SEREFO ;**
- **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Appliquée de la FST.**

Cher Maître,

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

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

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

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

Que LE TOUT PUISSANT vous accorde santé et longue vie afin que d'autres générations d'apprenants puissent bénéficier de la qualité de votre enseignement.

Amen !!!

Liste des sigles et Abréviations

ADERS	Amicale des Etudiants Ressortissants de Sikasso
ADN	Acide Desoxyribonucleique
ASAQ	Artesunate- Amodiaquine
AL	Artémether-Luméfantrine
AMD	Amodiaquine
<i>An. Arabiensis</i>	<i>Anopholes arabiensis</i>
<i>An. gambiae</i>	<i>Anopholes gambiae</i>
ARS	Artesunate
ART	Artémisinine
CPS	Chimiothérapie du Paludisme Saisonnier
CQ	Chloroquine
CSCom	Centre de Santé Communautaire
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
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)
ET	Ecart Type
FRC	Formulaire de Report de Cas
G6PD	Glucose-6-Phosphate Deshydrogenase
Hb	hémoglobine
HRP2	Histidin Rich Protein 2 (Proteine Riche en Histidine 2)
ICEMR	International Center of Excellence for Malaria Research (Centre d'Excellence International de Recherche sur le Paludisme)
IFI	ImmunoFluorescence Indirecte
INRSP	Institut National de Recherche en Santé Publique
IP	Indice Plasmodique

JC	Jésus Christ
LBMA	Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée
LUM	Luméfantrine
MFQ	Méfloquine
MILDA	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action
MSP-1	Merozoite Surface Protein-1
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Institut National d'Allergologie et des Maladies Infectieuses)
NIH	National Institutes of Health (Instituts Nationaux de la Santé)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
Pan-LDH	Malaria pan Lactate Dehydrogenase
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
PCT	Temps de clairance parasitaire
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquine Resistance Transporter
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
PQ	Pipéraquine
PYR	Pyriméthamine
QBC	Quantitative Buffy-Coat
QN	Quinine
SP	Sulfadoxine Pyriméthamine
TCF	Temps de Clairance de la Fièvre
TCP	Temps de Clairance Parasitaire
TBE	Tris Borate EDTA
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TPI	Traitement Préventif Intermittent
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
V2M	Vision Médicale du Mali

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
2. OBJECTIFS :.....	5
2.1. Objectif Principal :	5
2.2. Objectifs spécifiques :	5
3. GENERALITES :	6
3.1. Définitions :.....	6
3.2. Historique :.....	6
3.3. Répartition géographique du paludisme :	8
3.3.1. Dans le monde :	8
3.3.2. En Afrique :	9
3.3.3. AU MALI.....	9
3.4. BIOLOGIE.....	10
3.4.1. VECTEUR.....	10
3.4.2. SYSTEMIQUE.....	11
3.4.3. Agent pathogène.....	12
3.4.4. Cycle de vie des plasmodies.....	16
3.5. Diagnostic biologique	18
3.5.1. Diagnostic de présomption	18
3.5.2. Les tests rapides de diagnostic : TDR	19
3.5.3. La Polymerase chain reaction (PCR)	20
3.6. Manifestations du paludisme	20
3.7. Traitement du paludisme.....	21
3.7.1. Classification des antipaludiques	21
3.7.2. Associations d'antipaludiques à effet synergique schizonticide :	22
3.2.1. Modes d'action des antipaludiques : (Pr Pichard E. Semaine thématique paludisme	23
3.7.3. Pharmacocinétique des antipaludiques couramment utilisés en association....	24

3.7.4. La sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar®) : (Pharmacocinétique des antipaludiques)	32
3.7.5. Association atovaquone + proguanil (Malarone®) : (Pharmacocinétique des)	32
3.7.6. Association artéméther + luméfantrine (Coartem®/Riamet®) : (Pharmacocinétique des)	32
3.7.7 Association artésunate + amodiaquine : (Pharmacocinétique des antipaludiques)	32
3.7.8 Association artésunate + méfloquine : (Pharmacocinétique des antipaludiques)	32
3.8. Politique de traitement :	33
3.8.1. Traitement du paludisme simple à <i>Plasmodium falciparum</i> : (World Health ...)	33
3.8.2. Traitement du paludisme simple aux autres espèces plasmodiales : (World ...)	34
3.8.3. Traitement du paludisme grave : (World Health Organization, World Health ...)	34
3.9. Prophylaxie: (Pharmacocinétique des antipaludiques couramment utilisés en.....)	34
3.9.1. Lutte antivectorielle :	34
3.9.2. Chimio prophylaxie :	35
3.10. Résistance du <i>Plasmodium</i> aux antipaludiques :	37
3.10.1. Les aminoquinoléines : la chloroquine.....	37
3.10.2. Le temps de clairance parasitaire comme paramètre de contrôle des CTA: ..	37
4. MATERIELS ET METHODE.....	39
4.1. Site et Population d'étude	39
4.2. PERIODE D'ETUDE :	41
4.3. Echantillonnage :	41
4.4. Critères d'inclusion :	42
4.5. Critères d'exclusion :	43
4.6. Diagnostic du paludisme simple à <i>Plasmodium falciparum</i>	43
4.6.1. Diagnostic clinique :	43
4.6.2. Diagnostic biologique.....	43
4.7. Schéma thérapeutique	46
4.8. Le suivi des patients :	47
4.9. Analyse des échantillons	48
4.9.1. Analyses moléculaires	48
4.9.2. Amplification des séquences spécifiques de <i>P. falciparum</i>	52

4.9.3. Analyse des produits de la PCR :	58
5. RESULTATS :	60
5.1. Paramètres démographiques.....	60
5.2. GENOTYPAGE :	65
6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION :	69
6.1. Lieu d'étude :	69
6.2. Méthodologie :	70
6.3. Résultats	71
7. Conclusion :	74
8. Recommandation :	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents faciès de transmission du paludisme au Mali[35].....	10
Tableau 2 : taxonomie du vecteur du paludisme	12
Tableau 3 : Protocole d'administration des molécules AL en fonction du poids	47
Tableau 4 : Protocole d'administration des molécules ASAQ en fonction du poids.....	47
Tableau 5 : liste des examens par visite	48
Tableau 6 : Les composants des mélanges réactionnels	53
Tableau 7 : Les composants des mélanges réactionnels	54
Tableau 8 : Répartition des patients selon le sexe (n=480)	60
Tableau 9 : Répartition des patients en fonction de la tranche d'âge (n=480).....	60
Tableau 10 : Répartition des patients en fonction de la tranche de parasitémie à J0 (n=480).....	61
Tableau 11 : Répartition des patients en fonction de la survenue d'échec thérapeutique lors du suivi (n=480)	61
Tableau 12 : Répartition des cas d'échecs thérapeutiques en fonction de leur période de survenue (n=81).....	62
Tableau 13 : Répartition des patients en fonction de la clairance parasitaire (n=480).....	62
Tableau 14 : Multiplicité de l'infection selon <i>msp1</i> (n=151)	66
Tableau 15 : Multiplicité de l'infection selon <i>msp2</i> (n=153)	66
Tableau 16 : Multiplicité de l'infection selon <i>glurp</i> (n=110)	67
Tableau 17 : Multiplicité de l'infection (MOI) selon les trois marqueurs	67
Tableau 18 : Evolution de la multiplicité de l'infection en fonction de la parasitémie	68
Tableau 19 : Cas de Recrudescence Vs Nouvelle infections après la correction moléculaire	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition du paludisme dans le monde (OMS, 1999)	8
Figure 2: Séquences nt codant pour le tripeptide de l'allèle KI.....	14
Figure 3: Séquences nt codant pour le tripeptide de l'allèle MAD20.	14
Figure 4: Alignement des séquences du bloc 2 de l'allèle RO33 par 9 nt (colonne de gauche) et séquences d'acides aminés correspondantes (colonne de droite).....	14
Figure 5 : Gene <i>msp2</i> de <i>P. falciparum</i>	15
Figure6 : Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'homme et le moustique	18
Figure 7 : mécanisme d'action des antipaludiques	21
Figure 8 : Structure chimique de la quinine	24
Figure 9 : Structure chimique de la Mefloquine.....	26
Figure 10 : Structure chimique de l'amodiaquine	27
Figure 11 : Structure chimique de l'artémisinine.....	28
Figure 12 : Structure chimique de l'artéméther et l'artésunate.....	28
Figure 13 : Structure chimique de la dihydroartémisinine.....	29
Figure 14 : Structure chimique de la luméfantrine.....	30
Figure 15 : Structure chimique de la primaquine.....	31
Figure 16 : Carte sanitaire de la zone de Sélingué.	40
Figure 17: situation géographique du village de Missira dans la commune de Sebekoro I	40
Figure 18 (a et b): Algorithme de discrimination des cas de recrudescence des cas de nouvelle infection.....	49
Figure 19 : Comparaison du taux d'hémoglobine au début (J0) et à la fin (J42) du suivi (n=266).....	63
Figure 20 : Corrélation entre l'âge et le TCP (n=480).....	64
Figure 21 : Clairance parasitaire en fonction des deux bras	64
Figure 22 : Corrélation entre la parasitémie initiale et le PCT (n=480).....	65
Figure 23 : Image d'une PCR <i>msp2</i> sur gel d'agarose.....	66

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Le paludisme est une erythrocytopathie fébrile due à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques *Anophèles* infectés.

Ces moustiques qui sont les vecteurs du paludisme piquent principalement entre le crépuscule et le petit matin [1]. C'est une maladie tropicale, endémo-épidémique et pose un problème majeur de santé publique dans les pays en développement avec de nombreuses conséquences socio- économique [2]. Dans un rapport publié par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en décembre 2017, 216 millions de cas de paludisme et 445 000 cas de décès ont été enregistrés en 2016 [3].

En 2016, on estime que l'incidence du paludisme a reculé dans la population exposée de 18% au niveau mondial tandis que le taux de mortalité a baissé de 29%. On estime que 6,8 millions de décès dus au paludisme ont été évités dans le monde depuis 2001 [1].

L'Afrique représente 60% des cas de paludisme qui surviennent dans le monde. Approximativement 75% des cas sont dus à *Plasmodium falciparum*. Plus de 80% des décès par le paludisme se produisent en Afrique subsaharienne et 18% de ces cas de décès surviennent chez les enfants de moins de 5 ans [3]

L'espèce *Plasmodium falciparum* prédomine avec environ 90% de la formule parasitaire, suivie des espèces *Plasmodium malariae* (au tour de 14%) ; *Plasmodium ovale* avec (1%), et un cas de *plasmodium vivax* au nord[1]. L'Afrique subsaharienne supporte une part disproportionnée de la charge mondiale du paludisme[4]. En 2015, 90% des cas de paludisme et 92% des décès dus à cette maladie sont survenus dans cette région, 76% des cas de paludisme et 75% des décès dus à cette maladie surviennent dans treize pays principalement en Afrique subsaharienne[4].

Dans les régions où la transmission du paludisme est intense, les enfants de moins de 5 ans risquent tous particulièrement de contracter le paludisme, de tomber malade et de mourir ; plus de deux tiers (70%) des décès dus au paludisme surviennent dans cette tranche d'âge[4].

Au MALI, en 2014 un rapport du PNL (Programme National de Lutte contre le Paludisme) a fait ressortir plus de 2500000 cas suspects de paludismes dont 1700000 cas

simples et 800000 cas graves avec 2309 décès[5]. Le paludisme sévit sur tout le territoire national du Mali.

Le paludisme est la première cause de mortalité (13 %) et de morbidité (15,6 %) dans la population générale[6]. Il constitue en outre la première cause de consultation dans les services de santé maternelle et infantile et dans les services de pédiatrie à l'Hôpital Gabriel Touré soit 49,7%[7]. Il occupe la deuxième place dans les étiologies des syndromes fébriles en médecine interne à l'Hôpital du point G soit 12,8%[8]. La mortalité spécifique liée à cette érythrocytopathie dans la population des enfants de moins de 5 ans est estimée entre 25 et 35% de la mortalité infanto-juvénile globale[9]. Ces décès sont imputables à deux complications principales : le neuropaludisme et l'anémie.

Au Mali parmi les cinq espèces de parasites qui infectent l'homme, *Plasmodium falciparum* est la plus virulente et est responsable des formes cliniques graves et de la majorité de la mortalité associée au paludisme[10].

La prise en charge du paludisme nécessite un diagnostic précoce et un traitement de la maladie au moyen d'antipaludéens efficaces[11]

Les combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine constituent actuellement l'arme la plus puissante pour traiter le paludisme à *Plasmodium falciparum*[11]

Des preuves de la résistance aux artémisinines ont été trouvées puis confirmées à la frontière entre la Thaïlande et le Cambodge[11]. D'autres foyers suspects ont été signalés dans la sous-région du Grand Mékong, mais n'ont pas été encore confirmés[11]. Selon l'OMS, la vérification de la baisse de la sensibilité du *plasmodium* aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine CTA doit se référer sur la proportion des patients qui porteront une parasitémie après leur troisième jour (J3) du traitement à base de CTA (basée sur le temps de clairance parasitaire, TCP) ; aussi le changement de la politique de traitement antipaludique d'une zone doit se référer sur la proportion des cas d'échecs thérapeutiques à base de CTA sur une période de suivi allant 28 à 42 jours selon la combinaison[12].

Actuellement l'OMS recommande aux pays d'endémie du paludisme de procéder à un suivi régulier de l'efficacité des médicaments antipaludiques tous les 24 mois au niveau des sites sentinelles, afin de détecter des modifications de leur efficacité thérapeutique[13]

Au Mali, une étude déjà menée sur la baisse de la sensibilité du *Plasmodium* à l'artésunate a prouvé l'efficacité de cette dernière sans clairance parasitaire retardée[14]

Cependant, il existe peu de données récentes sur la réponse du *Plasmodium* aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine.

La résistance d'un pathogène en général du *Plasmodium* en particulier à une molécule s'acquiert par suite d'une pression thérapeutique forte et conduit à la sélection des mutants. Elle peut aussi s'acquérir lorsqu'il y a une mauvaise observance durant le traitement. Ainsi, l'évaluation de l'efficacité thérapeutique est nécessaire et devrait être conduite d'une manière régulière pour détecter une menace sur la réponse du *Plasmodium* aux antipaludiques (cas du paludisme). Il y a plusieurs types d'évaluation, elle peut se faire *in vivo* par suite d'administration d'antipaludiques et le suivi du patient jusqu'à la clairance parasitaire, elle peut être conduite *ex vivo (in vitro)* ou le parasite est exposé à une concentration de médicament et indiquant la concentration inhibitrice 50 (CI50). Enfin, avec des techniques moléculaires, utilisant des mutations ponctuelles de bases nucléotidiques associées à une molécule antipaludique, il est possible de détecter les souches résistantes ou sensibles.

En effet, cette espèce (*P. falciparum*) présente une large diversité antigénique. Ce polymorphisme conduit à des différences de profil génétique entre les souches plasmodiales.

L'utilisation récente des techniques immunologiques et de biologie moléculaire ont ouvert une nouvelle dimension de la complexité de l'épidémiologie du paludisme. Ces techniques ont démontré que les souches de *P. falciparum* peuvent se différencier par leur profil antigénique[15] et par leur sensibilité ou résistance aux antimalariques[16]. Ces dernières années, des marqueurs polymorphiques obtenus à partir du génome ont permis d'identifier par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) des micro-organismes appartenant à la même espèce mais avec des profils génétiques différents.[10]. En plus, il a été observé que ces micro-organismes génétiquement différents peuvent coexister dans le sang lors d'une infection[10].

Nous pensons que chaque micro-organisme avec un répertoire antigénique différent présente un potentiel pathogénique spécifique due à sa propre dynamique d'induire ou de créer des manifestations morbides spécifiques.

En effet, le séquençage du gène de la protéine majeure de la surface du mérozoite (MSP-1) des isolats de *P. falciparum* provenant de différentes zones géographiques a montré un grand polymorphisme génétique, surtout au niveau du Bloc2[17]. Au niveau de ce bloc, trois allotypes ont été identifiés. L'allotype K1 a été mis en évidence en Thaïlande dans le village de Karnjanaburi[18], le MAD20 à Madang en Papouasie

Nouvelle Guinée[18] et le RO33 au Ghana[19] Une forme hybride entre le MAD20 et le RO33 a été mise en évidence au Mali[20]. Ces 4 formes du gène de *msp1* peuvent exister simultanément au cours d'une infection de paludisme à *P. falciparum*[21] Ainsi, des études ont montré des infections de plus de 6 allotypes par patient (Parasites), chez les enfants de moins de 9 ans au moment du prélèvement sanguin [10] d'où la notion d'infection polyclonale. La signification de cette infection polyclonale n'est pas encore élucidée, il est probable que chaque allotype puisse être associé ou est à l'origine des symptômes palustres spécifiques observés au cours de la maladie.

L'étude de polymorphisme des gènes Merozoite Surface Protein1 et 2 et les protéines riche en glutamate (*msp1,msp2 ,glurp*) permet de connaître le niveau de transmission du paludisme, mais aussi dans le cadre de la surveillance du traitement de distinguer les recrudescences des infections nouvelles parmi les cas d'échecs thérapeutiques [22].

La probabilité pour un patient, en particulier dans les zones de transmission intense, d'être nouvellement infecté par un parasite possédant un génotype identique à celui de l'ancienne infection est faible]. Par conséquent, le fait de comparer les génotypes des trois locus au départ et au moment de l'échec thérapeutique devrait être discriminatoire entre recrudescences et nouvelles infections [22].

La commune de Sélingué et le village de Missira ont bénéficié de la stratégie intégrée de lutte contre le paludisme par la couverture universelle de l'usage des moustiquaires imprégnées d'insecticides, du traitement gratuit du paludisme simple par la combinaison thérapeutique à base d'artémisinine et le traitement présomptif intermittent avec la sulfadoxine + Pyriméthamine.

Ainsi, ces deux sites apparaissent comme des lieux propices pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de la combinaison thérapeutique à base d'artémisinine utilisant à la fois les techniques de détection de la résistance des Plasmodies.

Ce travail se base sur l'hypothèse qu'après 9 ans d'utilisation des CTA, au Mali il y a une possibilité de baisse de la sensibilité des souches de *P. falciparum* à la combinaison thérapeutique à base d'artémisinine.

C'est ainsi que nous avons conduit une étude dans la commune rurale de Sélingué et à Missira pour tester l'efficacité des CTAs (artéméther + luméfantrine) et (artésunate+ amodiaquine) dans le traitement du paludisme simple à *P.falciparum* et évaluer la dynamique de la population de *P.falciparum* selon le portage des allèles pour les marqueurs *msp1,msp2* et *glurp*.

OBJECTIFS

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif Principal

Examiner l'efficacité parasitologique et clinique de l'Artéméther plus la Luméfantrine et Artesunate plus Amodiaquine, à Selingué et à Missira en 2016

2.2. Objectifs spécifiques

- Evaluer l'efficacité des CTAs sur une période de 42 jours de suivi ;
- Evaluer la clairance parasitaire après traitement avec la combinaison AL et ASAQ ;
- Estimer la multiplicité de l'infection à *P.falciparum* à partir des cas d'échecs thérapeutiques ;
- Discriminer les cas de recrudescence des cas de nouvelles infections.

GENERALITES

3. GENERALITES

3.1. Définitions

Le paludisme connu aussi sous le nom de « *malaria* » (un mot italien qui veut dire mauvais air) est une érythrocytopathie provoquée par 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).

3.2. Historique

De l'italien pour « mauvais air », le paludisme a probablement influencé dans une large mesure les populations humaines et l'histoire humaine.

Les symptômes du paludisme ont été décrits dans les anciens écrits médicaux chinois. En 2700 av. J.-C., plusieurs symptômes caractéristiques de ce que l'on appellerait plus tard le paludisme ont été décrits dans le « *Nei Ching* ». Le *Nei Ching* a été édité par l'empereur Huang Ti. Le paludisme est devenu largement reconnu en Grèce au 4ème siècle avant notre ère, et il était responsable du déclin de nombreuses populations.

Quinine (début du 17ème siècle)[23]

Après leur arrivée dans le Nouveau Monde, les missionnaires jésuites espagnols ont appris des tribus indiennes indigènes d'une écorce médicinale utilisée pour le traitement des fièvres. L'écorce de l'arbre s'appelait alors *l'écorce péruvienne* et l'arbre s'appelait Cinchona d'après la comtesse. Le médicament de l'écorce est maintenant connu comme l'antipaludéen, la quinine. Avec les artémisinines, la quinine est l'un des médicaments antipaludiques les plus efficaces disponibles aujourd'hui.

Découverte du parasite du paludisme (1880)[23]

Charles Louis Alphonse Laveran, chirurgien de l'armée française stationné à Constantine, en Algérie, a été le premier à remarquer des parasites dans le sang d'un patient atteint de paludisme. Cela s'est produit le 6 novembre 1880. Pour sa découverte, Laveran a reçu le prix Nobel en 1907.

Différenciation des espèces de paludisme (1886)[23]

Camillo Golgi, un neurophysiologiste italien, a établi qu'il y avait au moins deux formes de la maladie, une avec une périodicité tierce (fièvre tous les deux jours) et une avec une périodicité quarte (fièvre tous les trois jours). Il a également observé que les formes produisaient un nombre différent de mérozoïtes (nouveaux parasites) à maturité et que la

fièvre coïncidait avec la rupture et la libération de mérozoïtes dans le courant sanguin. Il a reçu un prix Nobel de médecine pour ses découvertes en neurophysiologie en 1906.

Désignation des parasites du paludisme humain (1890, 1897) [23]. Les enquêteurs italiens Giovanni Batista Grassi et Raimondo Filetti ont d'abord introduit les noms *Plasmodium vivax* et *P. malariae* pour deux des parasites du paludisme qui affectent l'homme en 1890. Laveran avait cru qu'il n'y avait qu'une seule espèce, *Oscillaria malariae*. Un Américain, William H. Welch, a passé en revue le sujet et, en 1897, il a nommé le parasite malin du paludisme de Tertian, *P. falciparum*. Il y avait beaucoup d'arguments contre l'utilisation de ce nom; cependant, l'utilisation était tellement répandue dans la littérature que le changement de nom donné par Laveran n'était plus considéré comme possible. En 1922, John William Watson Stephens a décrit le quatrième parasite du paludisme humain, *P. ovale*. *P. knowlesia* été décrite par Robert Knowles et Biraj Mohan Das Gupta en 1931 chez un macaque à longue queue. La première infection humaine documentée avec *P. knowlesi* était en 1965.

Découverte que les moustiques transmettent des parasites du paludisme (1897-1898) [23]

Le 20 août 1897, Ronald Ross, un officier britannique du service médical indien, fut le premier à démontrer que les parasites du paludisme pouvaient être transmis des malades infectés aux moustiques. Dans ses travaux ultérieurs sur le paludisme aviaire, Ross a montré que les moustiques pouvaient transmettre les parasites du paludisme d'un oiseau à l'autre. Cela a nécessité un cycle sporogonique (l'intervalle de temps pendant lequel le parasite s'est développé chez le moustique). Ainsi, le problème de la transmission du paludisme a été résolu. Pour sa découverte, Ross a reçu le prix Nobel en 1902.

Chloroquine (Resochin) (1934, 1946) [23] La chloroquine a été découverte par un Allemand, Hans Andersag, en 1934 dans les laboratoires de Bayer IG Farbenindustrie AG à Eberfeld en Allemagne. Il a nommé son composé resochin. Grâce à une série de défaillances et de confusion provoquées pendant la guerre, la chloroquine fut finalement reconnue et établie comme un antipaludique efficace et sûr en 1946 par des scientifiques britanniques et américains.

Resistance aux antipaludiques (1957 à nos jours)

En 1957 la chloroquinorésistance est constatée en Asie et en Amérique du sud [24].

En 1970 le Professeur Zhenxing Wei (Chine) réalisait un extrait de l'artémisinine [25].

1979 en Afrique, la résistance à la chloroquine a été observée pour la première fois en Tanzanie [26], en Asie du Sud-est, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine est suspectée [13]

En 2006 au Cambodge, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine a été identifiée pour la première fois [13] La même année, la chloroquine a été retirée du traitement du paludisme simple à *P. falciparum* au Mali [27].

Actuellement, la recherche demeure orientée vers la lutte anti vectorielle, le traitement curatif et prophylactique, la vaccination. La lutte anti vectorielle est confrontée à un problème technique.

3.3. Répartition géographique du paludisme

3.3.1. Dans le monde

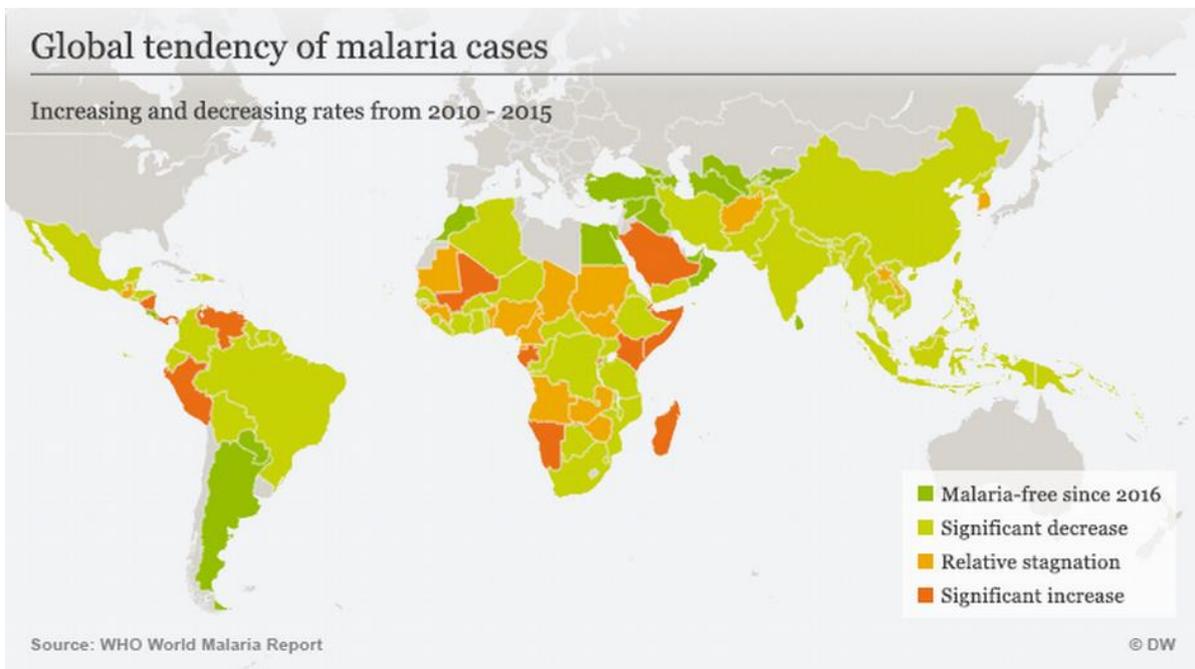


Figure 1 : Répartition du paludisme dans le monde (OMS, 2016)

Source: https://www.google.com/search?q=carte+paludisme+2017&tbm=isch&source=iu&iactx=1&fir=HY5AfInG4hc3IM%253A%252CLVn_dXxADc-ioM%252C_&usg=__uqLYO3vunFI1SrPaYXJMwABAPeo%3D&sa=X&ved=0ahUKEwj80ayurcraAhUMPBQKHR39CMoQ9QEIKDAA#imgsrc=AnAQxPntQa2r9M

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. Il est au premier rang des priorités de l'OMS pour ses ravages directs et conséquences socio-économiques. Selon l'OMS près de la moitié de la population mondiale est exposée au paludisme[4]

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) [28]. La résistance s'est peu à peu propagée dans les zones d'endémie.

La chloroquine est présentement retirée de la liste des médicaments pour la prise en charge du paludisme à *P.falciparum* au Mali.

En Amérique du Sud, des cas de parasitémie ont été récemment relevés au troisième jour du traitement aux CTAs. Toutefois, le génotypage du gène K13 n'a révélé aucune mutation

La résistance à l'artémisinine sévit actuellement en Asie du sud-est, notamment au Cambodge depuis 2006, à Lao PDR depuis 2013, à Myanmar depuis 2008, en Thaïlande depuis 2008 et au Viêtnam depuis 2009 [13].

3.3.2. En Afrique

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne [29].

Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituent les groupes à risque [30]. La résistance de *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 [31]. Cependant, une réduction de la sensibilité à l'artémisinine est présente dans certaines zones endémiques en Afrique [32].

Beaucoup d'études sur l'efficacité des CTAs sont en cours dans la plupart des zones endémiques. De nos jours, aucun cas de mutation sur le gène *Pfk13* n'a été signalé associé à une clairance parasitaire retardée. Les résultats des différentes études menées montrent que les CTAs sont encore efficaces en Afrique [13]

3.3.3. Au Mali

Au Mali, le paludisme est de type saisonnier c'est à dire que la transmission est endémique avec un pic saisonnier pendant la saison des pluies. Le tableau ci-dessous décrit les facies de paludisme qui sévissent au Mali ainsi que les niveaux de transmission.

Tableau 1 : Les différents faciès de transmission du paludisme au Mali[33]

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.

Source : <http://www.theses.fr/1992MON20039>

3.4. BIOLOGIE

3.4.1. Vecteur

Le paludisme est transmis exclusivement par les piqûres de moustiques *Anophèle*. Parmi plus de 500 espèces d'*Anophèle* reconnues à ce jour, 41 sont des vecteurs majeurs du paludisme, dont le plus grand nombre (39%) se trouve en Asie du Sud-est, alors que les vecteurs les plus compétents, *An. gambiae* et *An. arabiensis*, sont en Afrique. Chaque espèce vectrice présente ses caractéristiques comportementales, géographiques et écologiques qui lui sont spécifiques et qui déterminent l'épidémiologie locale du paludisme [34].

Toutes les espèces importantes de vecteurs piquent la nuit.

Les *Anophèle* 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 (ce qui permet au parasite de compléter son cycle de développement à l'intérieur du moustique) et piquent plutôt les êtres humains que les animaux. Par exemple, la longue durée de vie et la forte préférence pour l'homme des espèces africaines de vecteurs expliquent que près de 90% des décès par paludisme enregistrés dans le monde surviennent en Afrique [34].

Au Mali, des études conduites par **Touré en 1983** ont montré qu'*An. gambiae s.l* est composé de 3 sous espèces qui sont : *An. gambiae s.s*, *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s*, celle-ci est composée de 3 formes chromosomiques dénommées Bamako, Savane et Mopti [35]. La forme Mopti se rencontre fréquemment dans les zones d'inondation du fleuve Niger, elle coexiste avec la forme Bamako dans les régions humides du sud, avec des fréquences faibles. La forme Savane se rencontre dans les zones du sud et du centre.

La transmission du paludisme est assurée en saison sèche froide (Novembre –Février) par *An. arabiensis* et la forme Mopti de *An. gambiae s.s* lui succèdent en période sèche chaude (Mars-Juin). Les formes Savane et Bamako de *An. gambiae s.s* deviennent les principaux vecteurs pendant la saison des pluies (Juillet-Octobre). Ainsi, le long de l'année les vecteurs se relayent dans la transmission du plasmodium [35].

3.4.2. Systémique

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	

3.4.3. Agent pathogène

Le plasmodium est responsable du paludisme. C'est un parasite intracellulaire, amiboïde, colonisant les hématies et produisant un pigment.

3.4.3.1. Systématique

Les Plasmodium sont des protozoaires appartenant à l'embranchement des Apicomplexa. Cet embranchement est caractérisé par la présence d'un complexe apical généralement constitué d'un conoïde, qui aide à la pénétration dans la cellule hôte, d'un anneau polaire et de rhoptries, qui probablement sécrètent une enzyme protéolytique ainsi que des microtubules sous membranaires, qui assurent la mobilité de la cellule. Ils sont tous des parasites [36].

Embranchement : APICOMPLEXA, Classe : SPOROZOEIA, Sous-classe : COCCIDIA, Ordre : EUCCOCCIDA, Sous-ordre : HAEMOSPORINA, Famille : PLASMODIDAE, Genre : Plasmodium

3.4.3.2. 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.

□ *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[2].

Sur un frottis sanguin à *P. 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. A la différence de la goutte épaisse, le frottis mince permet de mettre en évidence tous les détails morphologiques du parasite et de l'hématie parasitée.

Polymorphisme allélique de *P. falciparum* :

Chez *Plasmodium falciparum*, de nombreux antigènes codés par des gènes en copie unique possèdent un très grand nombre d'allèles, pouvant parfois être regroupés en familles alléliques de séquence primaire très différentes telles que *msp1* et *msp2*.

Gène *msp1* (Merozoïte Surface Protein) :

MSP1 est une protéine localisée sur le chromosome 9 de *Plasmodium falciparum*. Elle est composée de 17 blocs dont le plus variable est le bloc 2. Ce dernier par sa variabilité permet de distinguer les clones de *P. falciparum*. Le bloc 2 comprend les allèles K I, Mad20 et RO33.

L'alignement des séquences de répétition 9 nt et les séquences du bloc 2 a révélé que ces 25 clones de gènes peuvent être divisés en 3 types: MAD20 (9 allèles dans 16 clones); K1(3 allèles dans 6 clones); et RO33 (2 allèles dans 3 clones) [37].

```

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
SAQ SGT SGT SGT SGT SGT SGT SGT SAQ SGT SGT SAQ SGT SGT SAQ SGT SGT SGT SGT
SAQ SGA SAQ SGA SAQ SGA SAQ SGA SAQ SGA SAT SAQ SGP SGT SAP SG SGT
SAQ QS SGP SGT P SGT SGP SGT SGP SGT SGP SGT
SAQ SGA SAQ SGA SAQ SGA SAQ SGT SGP SGP SGT
SAQ SGT SGT SGT SGT SGT SGT SGP SGP SGT
SAQ SGT SGT SGT SGP SGP SGT
SAQ SGT SGT SGP SGP SGT
SAQ SGT SGT SGP SGT
    
```

Figure 2: Séquences nt codant pour le tripeptide de l'allèle KI [37].

```

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
SKG SVA SGG SGG SVA SGG SGG SVA SGG SVA SGG SVA SGG
SKG SVA SGG SGG SVA SGG SVA SGG SVA SGG SVA SGG

SGG SVT SGG SVT SGG SVT SVA SVA SVA SVA SVA SGG
SKG SVT SGG SVT SGG SVT SVA SVA SVA SVA SVA SGG
SGG SVT SGG SVT SGG SVT SVA SVA SVA SVA SVA SGA
SGG SVT SGG SVT SGG SGG SVA SVA SVA SVA SGG
SGG SVT SGG SVT SGG SVT SVA SVA SVA SVA SGG
SSG SVA SGG SVA SVA SGG SGG SVA SGG SVA SGG
SSG SVT SGG SVA SVA SVA SGG SGG SVA SGG
SKG SGA SGG SGG SVA SGG SVA SGG SVA SGG
SGG SVT SGG SGG SVA SVA SGG SGG SVA SGG
SSB SVT SGG SGG SVA SVA SGA SGG
SKG SVA SGG SGG SVA SGG SVA SGG
SKG SVA SGG SVA SGG
    
```

Figure 3: Séquences nt codant pour le tripeptide de l'allèle MAD20 [37].

	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^H</u>	ALA LYS PRO
4	<u>G C^HA G^HA^HT 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	A A A G G T G C T	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

Figure4:Alignement des séquences du bloc 2 de l'allèle RO33 par 9 nt (colonne de gauche) et séquences d'acides aminés correspondantes (colonne de droite) [37].

Gene *msp2* (Merozoïte Surface Protein2) :

MSP2 est une protéine située sur le chromosome 2 de *P. falciparum* et comprend 5 blocs. Le bloc 3 de ce chromosome est très variable et comporte les allèles FC27 et 3D7 qui permettent de différencier les clones de ce parasite.

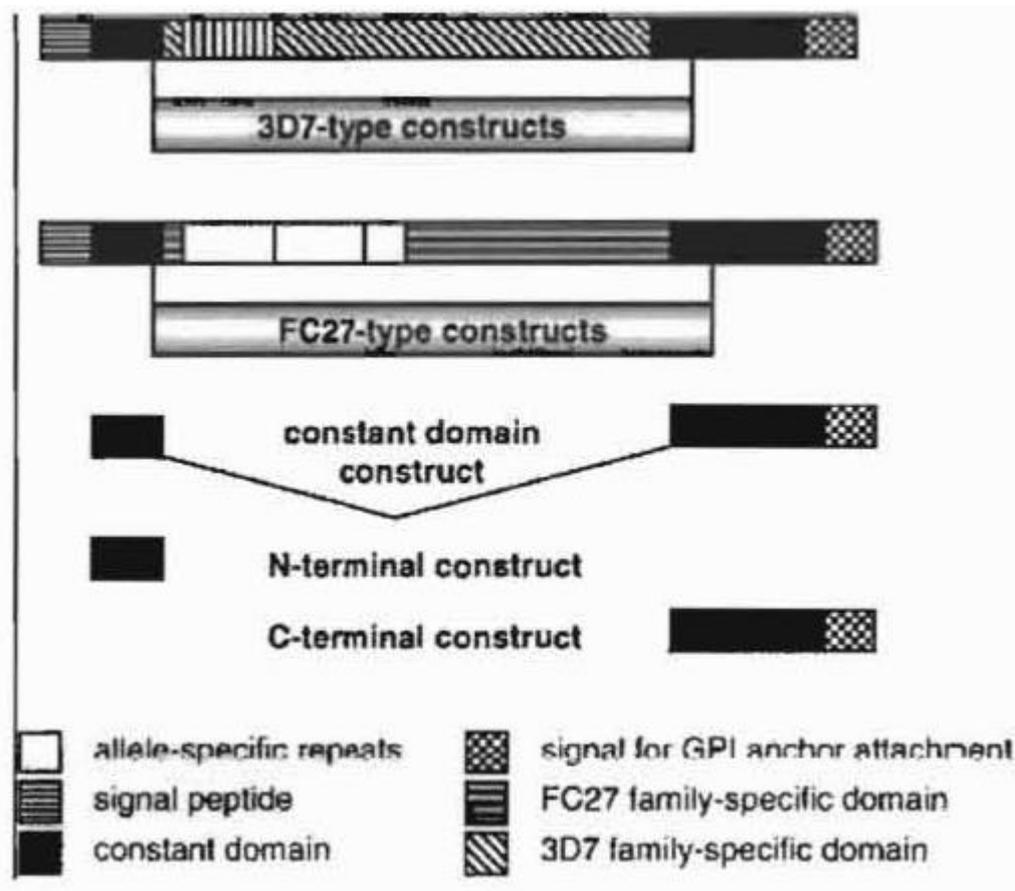


Figure 4 : Gene *msp2* de *P. falciparum*

□ *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[2].

Son frottis sanguin se caractérise par une parasitemie réduite, 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.

□ *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 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) [2]

Le frottis sanguin montre un panachage de toutes les formes évolutives. L'hématie hôte est jeune, le pluriparasitisme est fréquemment observé (2 à 3 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.

□ *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 [2] 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.

3.4.4. 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 [2]

□ **Chez l'homme :**

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 dans le sang, le parasite sous forme de sporozoïtes. Ceux-ci restent dans la circulation sanguine pendant une demi-heure avant de pénétrer dans les cellules du foie.

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

- **La phase sanguine :**

La rupture des corps bleus libère des mérozoïtes qui pénètrent les globules rouges par endocytose, et se transforment en trophozoïte. 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**

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 macro gamétocyte) se transforme et devient immobile. Le gamétocyte mâle (micro gamétocyte) va subir une ex flagellation qui l'allongera et le rendra mobile.

La fécondation du macro gamétocyte par le micro gamétocyte 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.

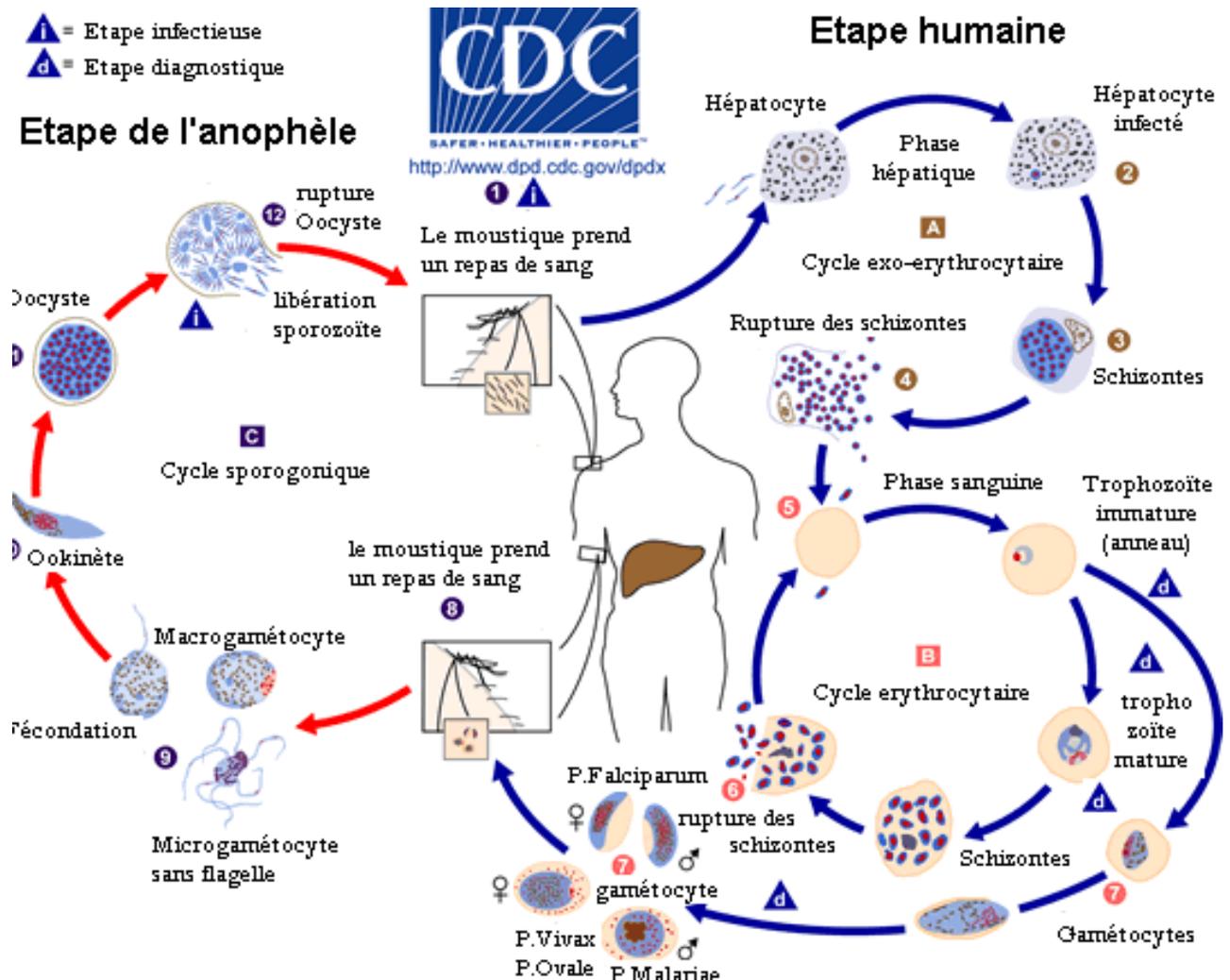


Figure 5 : Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'homme et le moustique [38]

(Source : <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology>) consulté le 18.05.2018

3.5. Diagnostic biologique

3.5.1. 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 pernicieux, 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.

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

3.5.2. Les tests de diagnostics rapides : TDR

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) : P. f 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.

3.5.3. La réaction de polymérisation en chaîne (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

3.6. Manifestations du paludisme

➤ Les formes classiques

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

- **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.

- **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.

- **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.

3.7. Traitement du paludisme

Les antipaludiques ou antimalariques sont des médicaments de synthèse chimique ou extraits de plantes destinés 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, ...).

3.7.1. Classification des antipaludiques

Les antipaludiques sont classés en fonction de leur mode d'action ou la structure chimique.

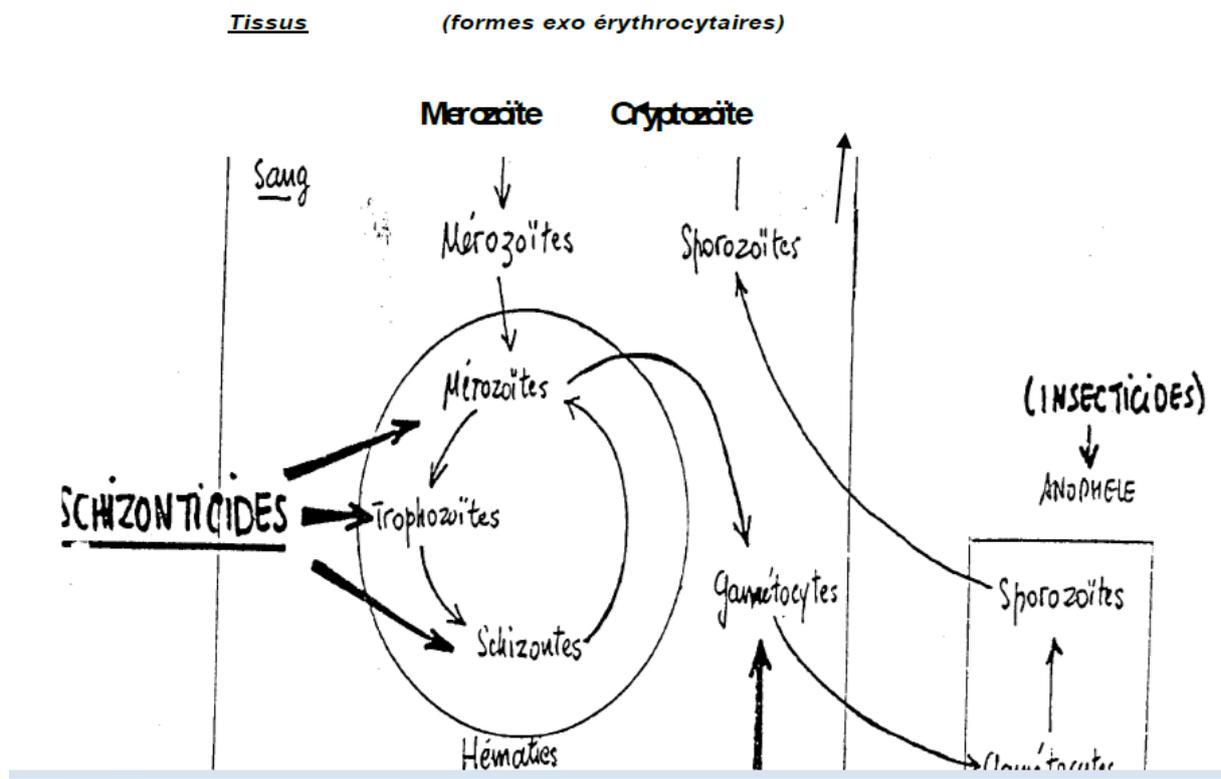


Figure 6 : mécanisme d'action des antipaludiques

3.7.1.1. Schizonticide érythrocytaires :

□ **Amino-4-quinoléines** : chloroquine (Nivaquine®), amodiaquine (Flavoquine®), pipéraquline.

Amino-alcools : quinine (Quinimax®, Surquina®, Quinine Lafranc®), méfloquine (Lariam®), halofantrine (Halfan®), luméfantrine.

Sesquiterpènes : artémisinine et ses dérivés : dihydroartémisinine, artéméther, artésunate.

Antimétabolites :

o **Antifoliques** : sulfadoxine, dapsonne,

o **Antifoliniques** : proguanil (Paludrine®), pyriméthamine (Malocide®),

o **Antibiotiques** : cyclines (Doxypalu®, Granudoxy®Gé, Vibraveineuse®), clindamycine (Dalacine®, Zindacine®),

o **Analogues de l'ubiquinone** : atovaquone.

3.7.1.2. Schizonticides intrahépatiques :

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

Antimétabolites : proguanil, cyclines.

3.7.1.3. Gamétocytocides :

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

3.7.2. 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 + dapsonne (Lapdap®), artéméther + luméfantrine (Coartem®/Riametâ), artésunate + amodiaquine (AS/AQ®, Coarsucam®), artésunate + méfloquine (AS/MQ®).

3.2.1. Modes d'action des antipaludiques : [39]

□ **Inhibition de la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive du plasmodium :**

- Chloroquine, amodiaquine, pipéraquline

- Quinine, méfloquine, halofantrine, luméfantrine

□ **Alkylation des métabolites de l'hémoglobine, production de radicaux libres :**
artémisinines

□ **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 (antifoliques)

3.7.3. Pharmacocinétique des antipaludiques couramment utilisés en association [40]

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

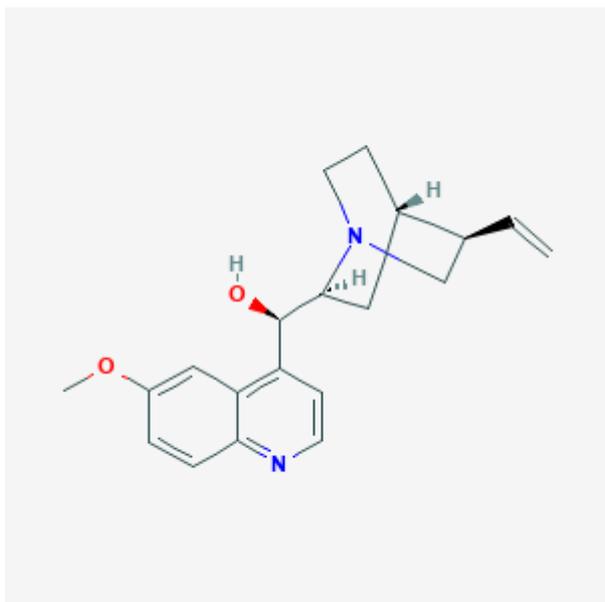


Figure 7 : Structure chimique de la quinine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3034034#section=2DStructure>

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 différents :

□ En cas d'accès simple : posologie classique de 24 mg/kg/j. (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%, $T_{1/2} \approx 11h$.

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 adaptation de posologie chez les insuffisants rénaux [41]

Effets indésirables : [41]

Fréquent, peu grave : cinchonisme (acouphènes, vertiges, céphalées, troubles de la vision, baisse aigüe de l'acuité auditive, troubles digestifs, vasodilatation périphérique).

Hypoglycémie par augmentation de la sécrétion d'insuline.

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, 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

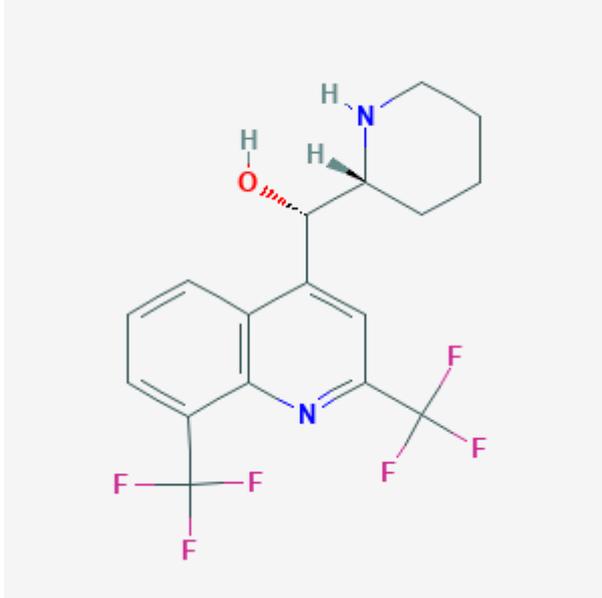


Figure 8 : Structure chimique de la Mefloquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40692#section=2D-Structure>

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} ≈15-22 jours [41]

Effets indésirables : [41] 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 :**

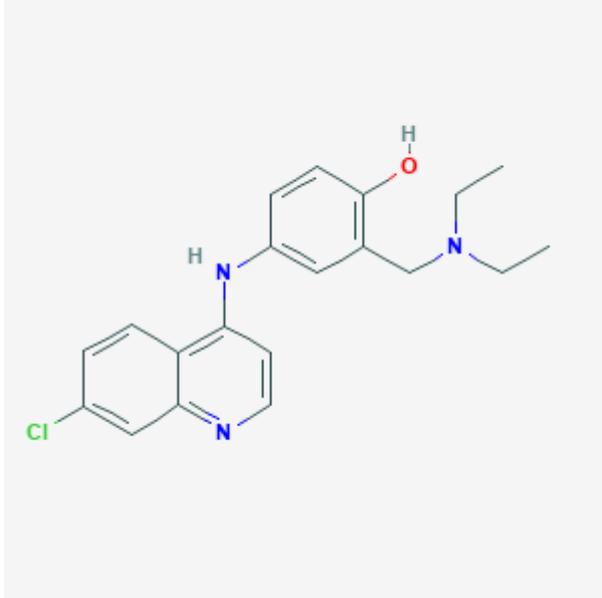


Figure 9 : Structure chimique de l'amodiaquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2165#section=2D-Structure>

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 : [41] 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** : artéméter, artésunate, dihydroartémisinine

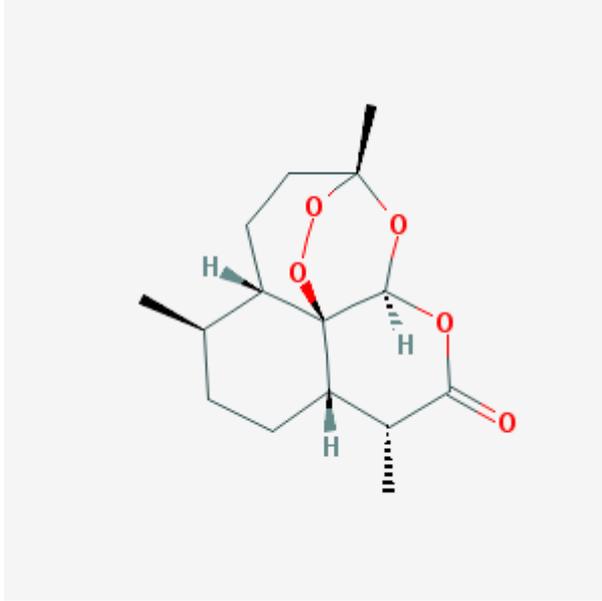
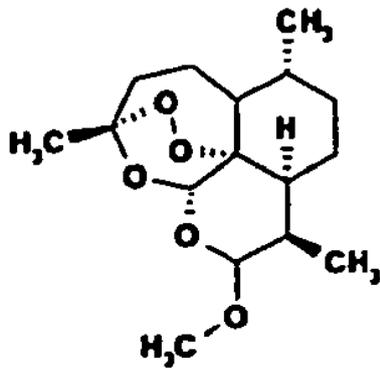
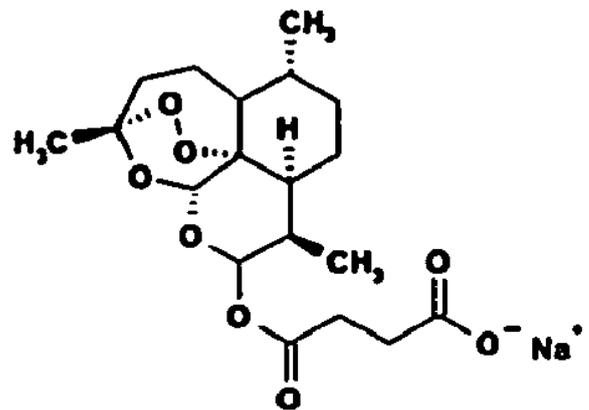


Figure 10 : Structure chimique de l'artémisinine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68827#section=2D-Structure>



Arthéméter



Artésunate de sodium

Figure 11 : Structure chimique de l'artéméter et l'artésunate

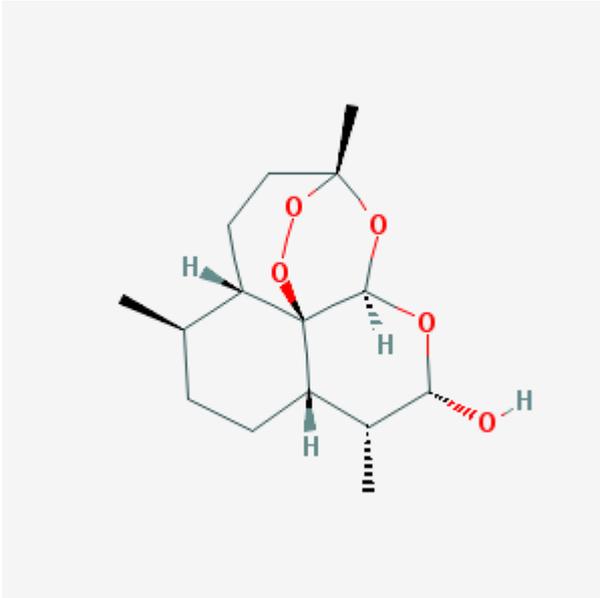


Figure 12 : Structure chimique de la dihydroartémisinine

Source: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3000518#section=2D-Structure>

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'artéméther induit son propre métabolisme.

Élimination : Ils sont éliminés sous formes de métabolites dans les urines et les fèces. Le temps de demi-vie $T_{1/2}$ de l'artéméther et la dihydroartémisinine est d'environ 2 heures[41]

Effets indésirables : [41]

- 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

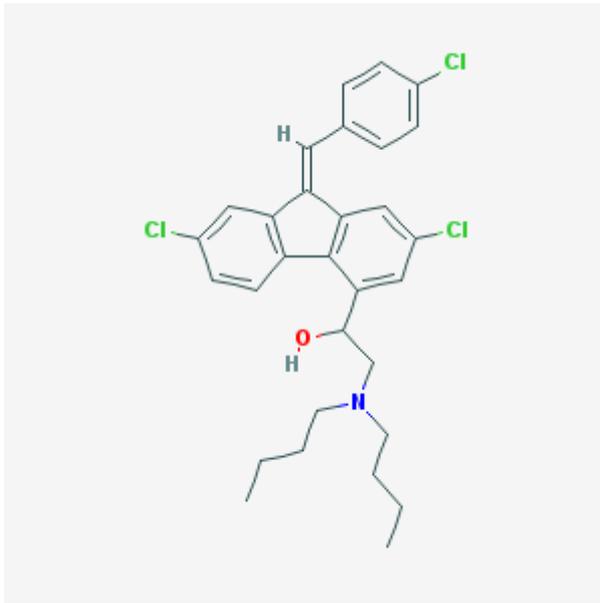


Figure 13 : Structure chimique de la luméfantrine

Source: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6437380#section=2D-Structure>

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 5-6 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 $T_{1/2}$ = 2-3 jours.

Effets indésirables : [41]

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

La Primaquine (Primaquine®) :

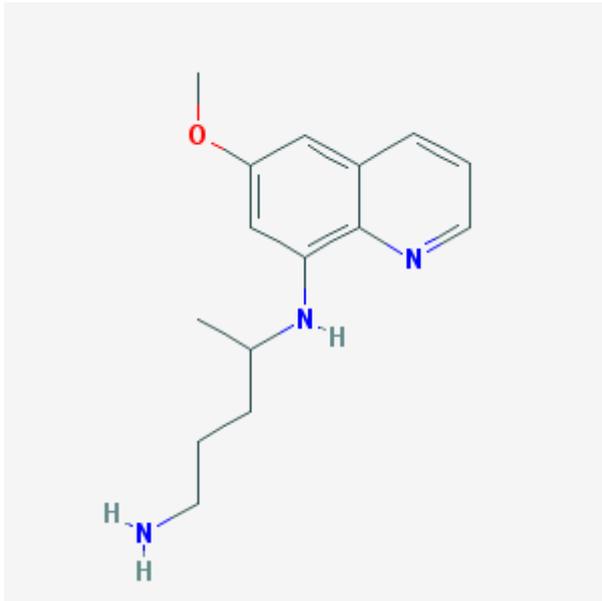


Figure 14 : Structure chimique de la primaquine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4908#section=2D-Structure>

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 [41]

Dérivés de l'artémisinine en monothérapie: [40]

□ **Artéméther**(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** : 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.

3.7.4. La sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar®):[40]

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

3.7.5. Association atovaquone + proguanil (Malarone®) :[40]

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;

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

3.7.6. Association artéméther + luméfantrine (Coartem®/Riamet®): [40]

Cette association se présente en comprimés à 20 mg d'artéméther 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). 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.

3.7.7 Association artésunate + amodiaquine :[40]

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).

3.7.8 Association artésunate + méfloquine [40]

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.

3.8. Politique de traitement

Depuis 2006, la plupart des pays où *Plasmodium Falciparum* est endémique ont progressivement actualisé leur politique de traitement, passant de la chloroquine (CQ) et de la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) qui sont en situation d'échec, aux associations thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) actuellement recommandées.

Ces dernières constituent désormais le meilleur traitement contre le paludisme simple à *p falciparum* [42].

3.8.1. Traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum*: [43]

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
- Artesunate + Amodiaquine
- Artesunate + Mefloquine
- Dihydroartémisinine + Pipéraquline
- Artesunate + 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 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

- o Artesunate + SP si le patient est traité avec du Cotrimoxazole (triméthoprime plus sulfaméthoxazole) ;

- o Artesunate + 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.

3.8.2. Traitement du paludisme simple aux autres espèces plasmodiales :[43]

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.

3.8.3. Traitement du paludisme grave :[43]

L'adulte, 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'artéméther injectable que la quinine dans les cas de paludisme grave chez l'enfant et l'adulte.

3.9. Prophylaxie:[40]

3.9.1. Lutte antivectorielle :

La lutte antivectorielle est essentiellement basée sur :

- L'aménagement de l'environnement destiné à diminuer le nombre de gîtes anophéliens,
- 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 aspersion intra-domiciliaires d'insecticides à effet rémanent,
- Les moustiquaires imprégnées d'insecticides : outil majeur de prévention du paludisme au niveau communautaire, 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.

3.9.2. Chimio prophylaxie :

3.9.2.1. Chimio prophylaxie des expatriés et des voyageurs :

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 :

o **Pays du groupe 1** : chloroquine (Nivaquine®) 100 mg/j, séjour + 4 semaines après,

o **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.

o **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 :

o **pays du groupe 1** : Nivaquine®

o **pays du groupe 2** : Savarine® ou Malarone®,

o **pays du groupe 3** : séjour déconseillé, si séjour indispensable : Lariam® ou Malarone®

Schéma prophylactique Nivaquine chez l'enfant

o **pays du groupe 1** : Nivaquine®

o **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.

o **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.

3.9.2.2. Traitement Préventif Intermittent (TPI) des femmes enceintes et des enfants des pays en développement

Le traitement préventif intermittent (TPIp) consiste dans 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 utilisé 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 chimiothérapie du paludisme saisonnier (CPS) est recommandée chez les nourrissons de 3-11 mois et les enfants de 12-69 mois. Elle associe amodiaquine et sulfadoxine-pyriméthamine. Chez les nourrissons : un demi-comprimé de 153 mg d'AQ 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'AQ 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 le paludisme maladie, le paludisme infection et l'anémie. La mise en œuvre du traitement préventif

Hamadou BOUARE
Thèse de Pharmacie 2018
LBMA

intermittent du paludisme chez les enfants de moins de 5 ans (TPIe) est très lente : sur les 16 pays auxquels l'OMS a recommandé d'adopter le TPIe, 6 seulement l'ont fait.

3.9.2.3. 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.

3.10. Résistance du *Plasmodium* aux antipaludiques

3.10.1. 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 PfCRT conduit à la mutation qui joue un grand rôle dans ce mécanisme de résistance à la chloroquine [44] *P. falciparum* **chloroquine transporter (PfCRT)** [28] Ce gène situé sur le chromosome 7 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. PfCRT 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.

3.10.2. Le temps de clairance parasitaire comme paramètre de contrôle des CTA:

Le contrôle de routine de l'efficacité thérapeutique des CTA est un facteur essentiel dans le changement de la politique de traitement et la détection précoce des changements de *P. falciparum* vis-à-vis des CTA. L'OMS recommande un monitoring récurrent de

l'efficacité des CTA dans les pays endémiques à *P. falciparum*. Les résultats de ces études d'efficacité thérapeutique des CTA ont permis aux chercheurs de déterminer :

□ La proportion des patients qui ont une parasitémie au troisième jour de leur traitement (J3), ce qui est récemment considéré comme indicateur de choix pour l'identification d'une résistance suspecte de *P. falciparum* aux CTA.

□ La proportion des échecs thérapeutiques sur un suivi de 28 ou 42 jours selon la CTA administrée.

La résistance à l'artémisinine est actuellement un concept qui change relativement à certains paramètres. Un marqueur de résistance à l'artémisinine a été récemment identifié. Les mutations dans la région Kelch 13 (K13) propeller sont associées à la clairance parasitaire retardée *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*. La liste de ces mutations s'allonge de plus en plus, ce qui affecte directement la définition du concept de « résistance à l'artémisinine ». Actuellement elle se définit comme

□ Résistance suspecte à l'artémisinine : une haute prévalence des phénotypes à clairance parasitaire retardée ou une haute prévalence des mutants K13 [13]

□ Résistance à l'artémisinine confirmée : une combinaison de la clairance parasitaire retardée et de mutations K13 chez le même patient[13]

Le temps de clairance parasitaire s'avère donc un paramètre important dans le test d'efficacité des antipaludiques et plus particulièrement les CTA.

**MATERIEL ET
METHODES**

4. MATERIEL ET METHODES

4.1. Site et Population d'étude

Notre étude s'est déroulée d'une part dans la commune rurale de Sélingué qui relève du cercle de Yanfolila région de SIKASSO et représentatif de l'un des faciès épidémiologiques du paludisme au Mali. Avec une population de 111 469 habitants, Sélingué est un district sanitaire qui de par sa situation géographique héberge le paludisme pendant la saison des pluies mais aussi pendant la saison sèche à cause de l'existence du barrage de Sélingué qui lui confère le caractère de transmission bimodale du paludisme. Pendant cette période toute la population est exposée au paludisme mais les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes sont les plus touchés.

Le district sanitaire de Sélingué regorge un Centre de Santé de Référence et sept (7) aires de santé organisées en centre de santé communautaire (CSCoM) et gérées par des associations de santé communautaire (ASACO).

Le Centre de Santé de Référence de Sélingué dispose d'un laboratoire bien équipée. Ce laboratoire a été aussi renforcé en termes de capacité (formation et équipements de laboratoire) par le LBMA dans le cadre du programme PMI ;

Et d'autre part dans le village de Missira : le second site d'étude, faisant partie de la sous-préfecture de Kolokani. Il est situé sur la rive droite de la rivière Baoulé qui marque la limite entre les préfectures de Kolokani et de Kita. En fait, la zone de Missira est située dans l'entité géographique nommée « Boucle de Baoulé ».

Ce village a fait l'objet d'une thèse de doctorat sur l'onchocercose [45]. Il n'y a aucun poste de santé dans le village. Le centre le plus proche est à 8 km. C'est le centre de santé communautaire de SebekoroI vers lequel sont acheminés les malades.

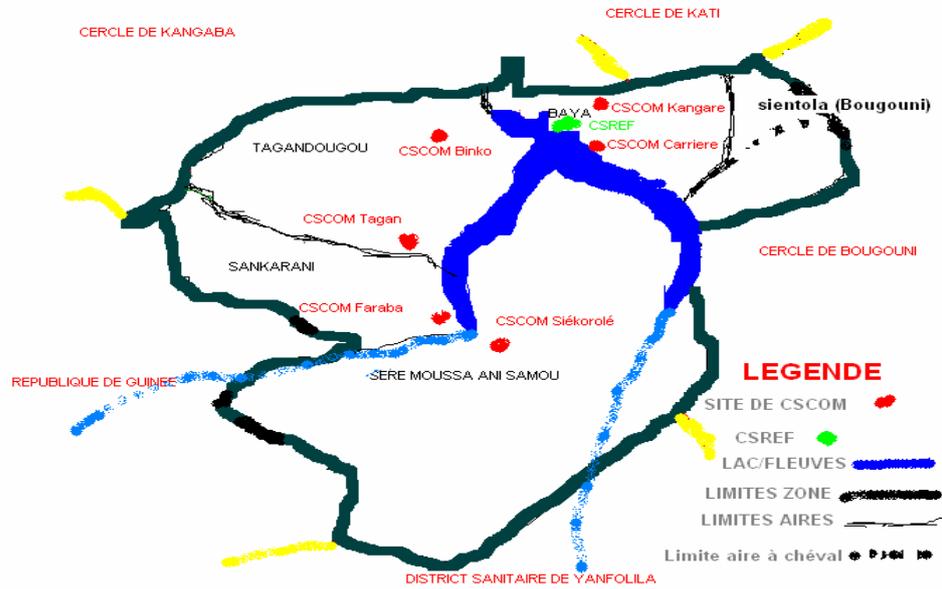
La prévalence du paludisme dans le village de Missira était de 52% dans la population générale 2004 [45]. La population de Missira est estimée à 1200 habitants.

Elle se compose de sédentaires et de nomades et comprend différentes ethnies.

Ce qui fait de ces deux zones des sites qui répondaient à nos attentes dans le cadre de cet étude.

- Carte sanitaire de la zone de Selingué et Missira :

S



CARTE SANITAIRE DE LA ZONE DE SELINGUE/CERLE DE YANFOLILA

Source : Mairie de Selingué

Figure 15 : Carte sanitaire de la zone de Sélingué.



Figure 16: situation géographique du village de Missira dans la commune de Sebekoro I

4.2. Période d'étude

Notre étude s'est déroulée entre Octobre 2015 et Janvier 2017.

4.3. Échantillonnage

Nos patients étaient des enfants de tous sexes âgés de 6 à 59 mois qui se présentaient avec un accès palustre simple.

Nous avons fait un dépistage général dans la population cible pour pouvoir inclure 480 enfants comme l'avait demandé le protocole. Des équipes mobiles faisaient le tour des quartiers pour dépister sur place tous les enfants de notre tranche d'âge. Les lames étaient amenées au centre le même jour et le guide partait chercher les cas de goutte épaisse positive et qui répondaient favorablement aux critères d'inclusions. Mais aussi tous les enfants volontairement amenés pour une consultation au centre.

Nous faisons ensuite un TDR et une goutte épaisse pour confirmer le diagnostic clinique dans le dernier cas.

Les enfants étaient ensuite enrôlés après obtention de l'assentiment de leurs parents.

La taille d'échantillon estimée dans chaque bras de l'étude est supposée être égale à l'autre.

Considérations éthiques et déontologiques :

Le protocole de recherche de cette étude a été soumis à l'accord du Comité d'éthique de l'INRSP, (Ministère de la Santé, Mali). Tout changement ultérieur du protocole sera 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. Mais il y a des problèmes liés à la longueur de l'étude (6 semaines) et la quantité de sang prélevé sur les papiers confettis. Pour cela un assentiment libre et éclairé de la prise du sang et de la participation volontaire au suivi des 42 jours (jours 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35 et 42) fut obtenu des parents dont les enfants répondaient aux critères d'enrôlement. Nous, investigateurs, avons eu à :

- Expliquer le protocole à chaque parent ;
- Répondre aux questions des parents ;
- Obtenir un assentiment libre, éclairé et signé ;

- Prélever le sang ;
- Remettre une copie originale du consentement/assentiment signé au sujet lui-même ou au parent.

La décision de participer ou de ne pas participer relevait exclusivement du patient ou du parent de l'enfant. Chaque patient 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) qui sont gardés dans un lieu sécurisé, et les échantillons de sang sont étiquetés avec un code unique sans le nom du patient. Seuls les membres du personnel de recherche avaient accès aux mots de passe.

Une compensation pour le temps perdu pour le travail journalier et les coûts liés au transport (aller-retour) vers le centre pour des visites de suivi a été assurée et le montant s'élevait à 1000fCFA par visite.

Confidentialité :

Pour des raisons de confidentialité cette étude a été rendue mono aveugle.

Une fois inclus dans l'étude le patient était mis sur un des bras de traitement selon une liste de randomisation. Seul le dispensateur savait tels patients à travers son numéro d'identification, étaient sur tels bras de traitement et avait accès à la liste de randomisation.

La clinique, le laboratoire, et les parents étaient mis à l'aveugle c'est à dire qu'ils n'avaient aucune idée du médicament qui était administré aux patients après être inclus par nos critères.

Les autres suppositions utilisées étaient un alpha de 2,5%, erreurs bêta de 10% et 20%, et la perte de vue 0,10% et 20% au cours de l'étude.

Basée sur une non infériorité, l'approche standard est de tester l'hypothèse nulle.

4.4. Critères d'inclusion

- Patients âgés de 6 à 59 mois
- Patients ayant un poids supérieur ou égal à 9kg.
- Patients vivant dans un rayon de 5 km.
- Patients diagnostiqués d'accès palustre simple.
- Lames positives à *P. falciparum* avec une parasitemie comprise entre 2000 et 199999 trophozoites / μ L de sang.

- Taux d'hémoglobine supérieur à 5g/dL.
- Assentiment des parents du patient. Patients pouvant rester dans l'étude jusqu'à 42 jours.

4.5. Critères d'exclusion

- Patients vivant dans un rayon de plus de 5km.
- Prise antérieure d'antipaludiques dans les 4 jours précédents le premier jour de visite.
- Patients ayant un poids corporel inférieur à 9kg
- Co-infection avec d'autres espèces plasmodiales
- Avoir une évidence de paludisme sévère ou cérébral.
- Prostration (incapacité de se tenir debout)
- Notion d'exposition connue au VIH après interrogatoire.
- Hypersensibilité connue à un composant des CTAs utilisées
- Incapable d'avaler oralement des médicaments, vomissement de la première dose et de la dose administrée à 30 minutes d'intervalle.
- Autres affections telles que la pneumonie, ou une malnutrition sévère.

4.6. Diagnostic du paludisme simple à *Plasmodium falciparum*

4.6.1. Diagnostic clinique :

Arrivés au centre ou après dépistage mobile les patients étaient soumis à un examen clinique qui était confirmé par un test immunologique (TDR) puis parasitologique (GE) au laboratoire.

Après confirmation le médecin cherche le consentement des parents, procède à la mesure de certains paramètres comme la fréquence respiratoire, le pouls, la taille, le poids et le patient revient au laboratoire pour la prise de sang sur les papiers confettis destinés à l'analyse moléculaire et la seconde goutte épaisse.

4.6.2. Diagnostic biologique

➤ Test de diagnostic rapide (TDR)

Matériaux nécessaires

- Un nouveau sachet de test non ouvert ;
- o Un nouveau tampon imbibé d'alcool à 70° non ouvert ;
- o Une nouvelle lancette stérile de la solution de tampon ;
- o Une nouvelle paire de gants d'examen jetables ;
- o Un chronomètre ;

- o Un container pour évacuer les déchets tranchants et pointus ;
- o Une poubelle pour les déchets non pointus et non tranchants

Méthode

D'abord la vérification de la date de péremption

- Enfiler la nouvelle paire de gant d'examen ;
 - Puis ouvrir et sortir la cassette du sachet ;
 - Ensuite écrire l'identifiant du patient sur la cassette
 - Puis nettoyer le 4ème ou le 3ème doigt du patient avec le tampon imbibé d'alcool ;
 - Laisser le doigt se sécher à l'air libre ;
 - Piquer le doigt d'un coup sec avec la lancette et jeter cette dernière dans la boîte de sécurité ;
 - Prélever une goutte de sang avec l'anse de prélèvement et placer la goutte de sang dans l'alvéole de la cassette destinée à recevoir la goutte de sang (carrée marquée de la lettre A) ;
- Ajouter 5 à 6 goutte de la solution tampon dans l'alvéole ronde marquée de la lettre B ;
- Observer 5 à 10 minutes puis lire le résultat

- Le test est dit **positif** si des lignes apparaissent dans les deux fenêtres (du test et du contrôle)
- Le test est dit **négatif** si une ligne apparait dans la fenêtre de contrôle et pas de ligne dans la fenêtre de test
- Le test est dit **invalide** s'il n'y a pas de ligne dans la fenêtre de contrôle mais il y a une ligne dans la fenêtre de test.

➤ **La goutte épaisse**

Elle se fait en plusieurs étapes.

Matériel nécessaire

- Lames d'examen de microscope
- Lancette stériles à usage unique
- Méthanol ou éthanol
- Coton hydrophile
- Crayon gras ou stylo graveur
- Lames pour étaler la goutte
- Une solution de Giemsa à 10%
- Une cuve à coloration
- Un chronomètre

- De l'huile à immersion
- Un microscope optique

Méthode

Chez les enfants la piqure se faisait au niveau du 3ème ou 4ème doigt et se faisait sur le côté qui est moins sensible

- 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 piquait d'un coup sec et rapide ; On déposait les premières gouttes de sang sur du papier filtre (confettis) ;
- De la main droite on tenait une lame par les bords et de la main gauche le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang ;
- Ensuite on prenait une 2ème lame et on recueillait une seconde goutte de sang en la mettant délicatement avec une extrémité de la lame.

Préparation de la goutte

- o On faisait un étalement épais au centre de la lame.
- o On étalait le sang avec le bout d'une lame propre jusqu'à épaissement uniforme
- o Au bout de la lame à l'aide du crayon gras on notait les identifiants des patients.
- o On a laissé sécher les lames à l'air libre pendant 10 minutes à l'intérieur du laboratoire, dans les conditions d'hygiène et de sécurité.

Coloration de la goutte épaisse

Pour la coloration nous avons utilisé une solution (Giemsa) concentrée à 10% pour cela nous avons pris 45ml d'eau distillée plus 5ml de solution concentrée de Giemsa et bien mélanger.

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 distillée et laisser sécher pendant quelques minutes.

Examen microscopique :

On déposait de l'huile à immersion sur la goutte et on l'amène à l'objectif 100 au microscope

On a mis l'objectif en contact avec l'huile à immersion, on a fait la mise au point et observé les parasites.

Nous avons compté les parasites vus et les leucocytes (pour les lames positives) à l'aide d'un compteur.

Et nous avons estimé le nombre de parasite sur 300 leucocytes.

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 parasités.

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 8.000 :

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

$$\text{Nombre de parasites par } \mu\text{l} = \frac{7500 \times \text{nombre de parasites comptés}}{\text{nombre de leucocytes comptés}}$$

4.7. Schéma thérapeutique

Nous avons mené une étude mono-aveugle avec deux bras thérapeutiques à savoir le bras Artéméther + luméfantrine [AL] et le bras Artesunate + Amodiaquine [ASAQ].

Les traitements étaient administrés aux patients selon une liste de randomisation définie à l'avance

Une partie de nos sujets enrôlés était sur le bras AL et l'autre sur le bras ASAQ respectivement de la firme pharmaceutique NOVARTIS et DENK.

- **Protocole d'administration des molécules (AL et ASAQ)**

- **Artéméther [A] + luméfantrine [L], pendant 3 jours consécutifs**

La combinaison AL a été utilisée sous sa forme de spécialité Coartem® (Novartis).

La dose de Coartem ® a été administrée de façon journalière en fonction du poids pendant 3 jours.

Le schéma d'administration en fonction du poids corporel est le suivant :

Tableau 3 : Protocole d'administration des molécules AL en fonction du poids

Tranches de poids corporel	Posologie et durée de traitement
5 - 14 kg	1 comprimé x 2 fois par jour pendant 3 jours
15 - 24 kg	2 comprimés x 2 fois par jour pendant 3 jours
25 - 34 kg	3 comprimés x 3 fois par jour pendant 3 jours
≥ 35 kg	4 comprimés x 4 fois par jour pendant 3 jours

- **Asaq 100/270 : Artésunate [AS] + Amodiaquine [AQ], pendant trois jours consécutifs**

Le schéma d'administration en fonction du poids corporel est le suivant :

Tableau 4: Protocole d'administration des molécules ASAQ en fonction du poids

Tranches de poids corporel	Dosages ASAQ Comprimés	Posologie et durée de traitement
Petit enfant 9 - 17 kg	100/270 mg	½ comprimé x 1 fois par jour pendant 3 jours (24 heures intervalles entre les prises).
18 – 36 kg	100/270 mg	1 comprimé x 1 fois par jour pendant 3 jours (24 heures intervalles entre les prises).

Après l'administration du médicament si le sujet vomissait dans les 30 minutes qui suivent la même dose était ré-administrée.

4.8. Le suivi des patients

Les enfants enrôlés dans notre étude ont été suivis pendant 42 jours avec un total de 9 visites sur les 42 jours soit j1, j2, j3, j7, j14, j21, j28, j35, j42.

Durant les trois premiers jours de visite à savoir j1, j2, j3 les enfants recevaient leurs doses de CTA conformément au protocole de traitement.

Les examens cliniques et biologiques effectués lors des suivis sont illustrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : liste des examens par visite

Visite	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42
Examen clinique	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Prise de température	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Goutte épaisse	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Traitement par CTA	X	X	X						
Confettis	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Taux d'hémoglobine	X								X

4.9. Analyse des échantillons

Transport et conservation des échantillons

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

Comme l'illustre le tableau ci-dessus, un confetti se faisait à chaque visite. Sur le confetti du patient se trouvaient également son identifiant. Après le dépôt des gouttes de sang dans les cercles de spots, on les laissait 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.

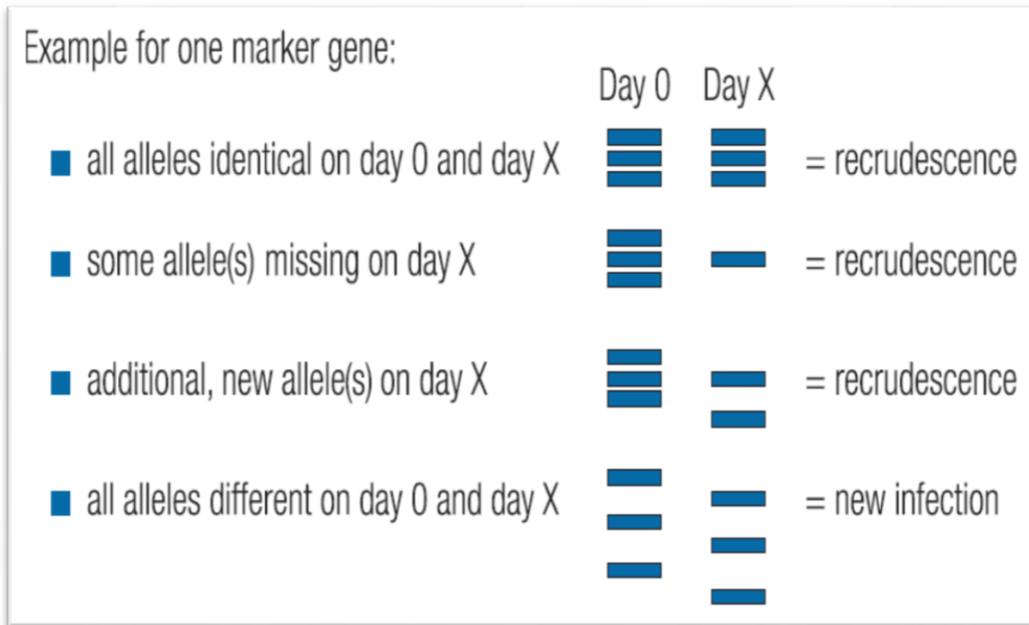
Quant aux cassettes des TDRs, on écrivait les identifiants des patients dessus puis on les conservait dans une boîte.

4.9.1. Analyses moléculaires

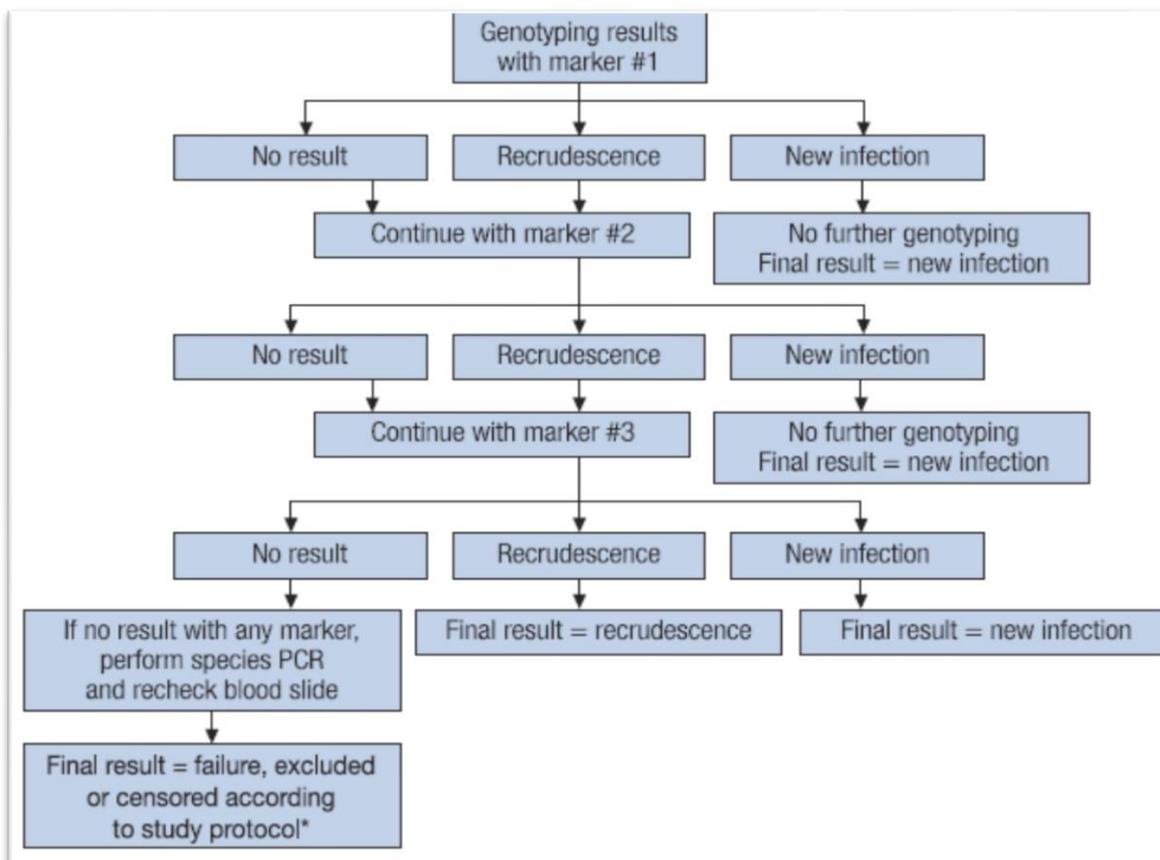
✓ Le génotypage des échantillons

Le génotypage est fait dans le but de pouvoir comparer les profils génétiques des souches de plasmodium à J0 et ceux des souches du jour de l'échec thérapeutique.

Nous avons utilisé la PCR pour discriminer les cas de recrudescence des cas de nouvelle infection. Pour cette discrimination nous avons utilisé cet algorithme



(a)



(b)

Figure 17 (a et b): Algorithme de discrimination des cas de recrudescence des cas de nouvelle infection [22]

Cette comparaison permettra d'apporter une réponse à la question :

Est-ce que le retour du patient avec le paludisme est dû à une réinfection ou une résistance des souches de J0 à une des molécules de CTA utilisées ?

✓ **Extraction d'ADN de *Plasmodium falciparum* avec le kit Quiagen**

Ce kit est reconnu pour sa sensibilité et la pureté de l'ADN obtenu.

Nous l'avons utilisé pour l'extraction de nos échantillons selon le protocole du fabriquant.

Découpage des papiers confettis

Matériels

Puncheur ;

Plaque de découpage de confetti, de tubes 1,5ml

Kimwipes

D'alcool 70°C à 100 %,

Portoir de tube 1,5ml,

Tubes 1,5ml

De tubes 50ml.

Procédures

Les tubes et les colonnes sont rangés par ordre en fonction des numéros d'échantillon.

Chaque colonne correspond au tube qui porte le même numéro d'échantillon

Découper 3 spots de sang puis les placer dans les tubes 1,5ml de l'une des rangés de tubes 1,5ml.

Lors du découpage pour passer d'un échantillon à un autre, le puncheur doit être trempé dans la solution d'alcool puis dans de l'eau distillée ensuite nettoyé avec le kimwipes. Il faut s'assurer que le puncheur est débarrassé de toute la trace d'alcool. La plaque de découpage doit être nettoyée aussi à l'alcool. Il faut aussi s'assurer que la plaque n'est pas mouillée par l'alcool au moment de découper les confettis.

Extraction proprement dite

Matériels

Il faut disposer de : au moins 3 bains marie, portoir de tube 1,5ml, de portoir de tube 1,5ml pour bain marie, vortexeuses éthanol 96°C 100%, pipettes de (20 ,200, 1000µL) centrifugeuse de tube 1.5ml.

Avant de commencer l'extraction il faut s'assurer que

Les bains marie sont à 85°C pour l'étape 2, 56°C pour l'étape 3 et 70°C pour l'étape 4.

Equilibrer le buffer AE ou l'eau distillée à la température ambiante pour 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.

Procédure

1. Dans les tubes de 1,5ml contenant les 3 spots de sang déjà découpés ajouter 180µL de buffer ATL,
2. Incuber à 85°C pendant 10mn puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.
3. Ajouter 20µl de protéinase K de la solution de stock. Vortexer, puis incuber à 56°C pendant une heure. Centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.
4. Ajouter 200µL de buffer AL aux échantillons. Centrifuger bien et incuber à 70°C pendant 10mn puis centrifuger brièvement pour faire descendre les gouttelettes de solution se trouvant sur les parois du tube.
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,
6. Soigneusement transférer la solution de l'étape 5 dans les colonnes. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1mn. Transférer dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat, bien fermer les colonnes pour éviter la formation des aérosols lors de la centrifugation.
7. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 µL du buffer AW1. Fermer les colonnes puis centrifuger à 8000rpm pendant 1mn. Transférer les colonnes dans de nouveaux tubes de collection et jeter les tubes de collection qui contiennent le filtrat.
8. Ouvrir soigneusement les colonnes puis ajouter 500 µL de buffer AW2. Fermer les colonnes puis centrifuger à 14000rpm pendant 3mn.
9. 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 1mn. 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°C à 25°C) pendant 1mn puis centrifuger à 8000rpm pendant 1mn.

Après l'extraction, l'ADN obtenu était conservé à -20°C

4.9.2. Amplification des séquences spécifiques de *P. falciparum* :

Réaction de polymérase en chaîne (PCR) :

Définition :

La PCR ou amplification génique est une technique qui utilise les propriétés que possède l'ADN. Celui-ci est composé de deux brins complémentaires d'orientation inverse et appariés deux à deux. Elle consiste à repérer le fragment d'ADN ou de gène, d'intérêt et l'amplifier d'une manière exponentielle.

Pour amplifier l'ADN plasmodial et pour une bonne sensibilité, nous avons utilisé la nested –PCR pour les gènes *msp1*, *msp2* et la semi-nested pour le gène *glurp*.

La nested- PCR ou PCR nichée consiste en une série consécutive de deux PCR au moyen de deux paires différentes d'amorces. Les fragments d'ADN amplifiés au cours de la première PCR contiennent les séquences qui seront appariées avec la deuxième paire d'amorce et amplifiées. Ce qui rend la technique très sensible même dans les cas de faibles parasitémie.

✓ Amplification du gène *msp1*

Première réaction d'amplification :

Amplification avec les amorces spécifiques conservées pour les blocs 1 et 3 du gène de *msp1*, et dont l'amplicon sera utilisé pour amplifier la deuxième PCR

Pour la première PCR nous avons utilisé la liste d'amorce suivante

Amorces

Amorce sens M1-OF: 5'- CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG -3'

Amorce anti-sens M1-OR : 5'- CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA -3'

Les composants des mélanges réactionnels de ce gène sont présentés dans le tableau ci-dessous:

Tableau 6: Les composants des mélanges réactionnels

Réactifs	Concentration initiale	Pour 1 réaction (µL)	Concentration finale
Buffer	10X	2.5	1X
dNTP	(2mM)	2.5	0.2mM
MgCl ₂	(25mM)	2	2mM
Amorce sens M1-OF	(10µM)	2.5	1µM
Amorce antisens M1-OR	(10µM)	2.5	1µM
Taq solis	5U/µL	0.4	2.5U/réact ⁰
ADN		3	
Eau (Biosedra)		qsp25	

Deuxieme reaction d'amplification :

Amplification avec les amorces internes spécifiques pour les allotypes K1, MAD20 et RO33.

Pour la deuxième PCR les amorces KF/KR, MF/MR, RF/RR ont été respectivement utilisé pour amplifier KI, Mad20, et Ro33

La liste suivante des amorces a été utilisée ;

Amorces:

Les amorces suivantes ont été utilisées pour amplification de la deuxième réaction

- Amorce sens M1-KF: 5'- AAATGAAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC -3'
- Amorce sens M1-MF: 5'- AAATGAAGGAACAAGTGGAACAGCTGTTAC -3'
- Amorce sens M1-RF: 5'- TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG -3'
- Amorce anti-sens M1-KR: 5'- GCTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGA -3'
- Amorce anti-sens M1-MR: 5'- ATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATTACC3'
- Amorce anti-sens M1-RR: 5'- CATCTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGATC 3'

Les composants et les volumes du mélange réactionnel sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7: Les composants des mélanges réactionnels

1. Réactifs	Concentration initiale	Pour 1 réaction (µL)	Concentration finale
Buffer	10X	2.5	1X
Dntp	(2mM)	2.5	0.2mM
MgCl ₂	(25mM)	2	2mM
Amorce sens	(10µM)	2.5	1µM
Amorce anti sens	(10µM)	2.5	1µM
Taq solis	5U/µl	0.4	2.5U/réact⁰
Produit PCR		2	
Eau (Biosedra)		qsp25	

Nous avons utilisé un volume 20µL de mélange réactionnel auquel nous avons ajouté 5µL d'ADN pour la première réaction et 5µL d'amplicon de la première réaction pour la seconde PCR, soit un volume final de 25µL. Nous avons effectué l'amplification enzymatique dans un thermo cycler en fonction d'un programme spécifique à chaque gène et à chaque réaction :

Pour la première réaction :

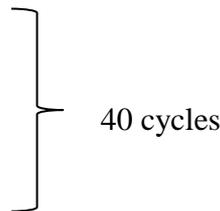
Programme

Une dénaturation initiale de 95⁰C, pendant 5 min

Une dénaturation de 95⁰C, pendant 1 min

Un appariement à 59⁰C, pendant 2 min

Une extension à 72⁰C, pendant 2 min



Extension finale après les 40 cycles à 72⁰C, pendant 10 min.

Et la conservation se fait à 4⁰C.

Pour la deuxième réaction

Programme

Une dénaturation initiale de 95⁰C, pendant 5 min suivi

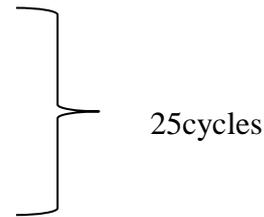
Une dénaturation de 95⁰C, pendant 1 min

Un appariement de 59⁰C, pendant 2 min

Une extension de 72⁰C, pendant 2 min

Une extension finale de 72⁰C, pendant 10 min

Et la conservation à 4⁰C.



✓ Amplification du gène *MSP2*

Pour le gène *msp2* le même protocole pour le mélange réactionnel a été utilisé mais cette fois avec des amorces aussi spécifique au gène *msp2*

Pour la première réaction la paire d'amorce utilisée était

Amorce sens M2-OF: 5'- ATGAAGGTAATTAACATTGTCTATTATA -3'

Amorce anti-sens M2-OR : 5'- CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT -3'

Pour la seconde PCR : les amorces suivantes ont été respectivement utilisées pour 3D7 et FC27

Amorce sens M2-FcF: 5'- AATACTAAGAGTGTAGGTGCARATGCTCCA -3'

Amorce sens M2-IcF: 5'- AGAAGTATGGCAGAAAGTAAKCCTYCTACT -3'

Amorce sens M2-FcR: 5'- TTTTATTTGGTGCATTGCCAGAACTTGAAC -3'

Amorce sens M2-IcR: 5'- GATTGTAATTCGGGGGATTCAGTTTGTTCG -3'

Un volume total de 25 de mélange réactionnel a été utilisé dans les mêmes conditions que la *msp1* Reparti dans les micros tubes stériles.

L'amplification enzymatique a été également faite dans le thermocycler suivant les programmes ci-dessous :

Première PCR :

Une dénaturation initiale à 95⁰C, pendant 5 min

Une dénaturation à 95⁰C, pendant 1 min

Un appariement à 59⁰C, pendant 2 min

Une extension à 72⁰C, pendant 2 min

Une extension finale de 72⁰C, pendant 10 min

Et la conservation à 4⁰C.

} 40 cycles

Deuxième PCR :

Programme

Une dénaturation initiale de 95⁰C, pendant 5 min

Une dénaturation de 95⁰C, pendant 1 min

Un appariement de 59⁰C, pendant 2 min

Une extension de 72⁰C, pendant 2 min

Extension finale de 72⁰C, pendant 10 min

La conservation à 4⁰C.

} 25 cycles

✓ **Amplification du gène GLURP**

Pour glurp à la différence des deux précédentes nous avons utilisé la « semi-nested PCR » c'est à dire lors de la deuxième PCR l'amorce Reverse de la première est maintenue mais le forward est remplacée par une nouvelle.

L'amplicon de la première PCR est toujours utilisé comme ADN pour la deuxième PCR

Dans les deux réactions la composition des mélanges réactionnels est la même que pour MSP1, MSP2 et est indiquée dans le tableau ci-dessus

La liste suivante d'amorce a été utilisée

Première PCR :

Amorces

- Amorce sens G-OF: 5'- TGAATTTGAAGATGTTCCACTGAAC -3'
- Amorce anti-sens G-OR : 5'- GTGGAATTGCTTTTTCTTCAACTAA -3'

Deuxième PCR :

Amorces

- Amorce sens Glurp F: 5'- ATGAATTTGAAGATGTTCCACTGAAC -3'
- Amorce anti-sens G-OR : 5'- GTGGAATTGCTTTTTCTTCAACTAA -3'

L'amplification enzymatique a été faite dans les mêmes conditions mais avec un programme spécifique à *glurp* qui suit :

Première réaction ;

Programme

Une dénaturation: initiale de 95⁰C, pendant 5 min

Une dénaturation de 95⁰C, pendant 1 min

Un appariement de 59⁰C, pendant 2 min

Une extension de 72⁰C, pendant 2 min

} 40 cycles

Une extension finale de 72⁰C, pendant 10 min

La conservation à 4⁰C.

Deuxième PCR

Programme

Une dénaturation initiale de 95⁰C, pendant 5 min

Une dénaturation de 95⁰C, pendant 1 min

Un appariement de 59⁰C, pendant 2 min

Une extension de 72⁰C, pendant 2 min

} 25cycles

Une extension finale 72⁰C, pendant 10 min

La conservation à 4⁰C.

4.9.3. Analyse des produits de la PCR :

Nous avons utilisé la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose analyser les produits obtenus après chaque technique de PCR.

- **Procédure**

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

Ajouter 30 µL de bromure d'éthidium, mélanger puis mouler dans un bac monté d'un peigne sur une surface plane bien équilibrer, couler et laisser le gel se polymériser pendant environ 30 mn à 1 heure ;

Placer le gel dans le bac à électrophorèse submergé d'une solution de TBE 0,5x
Loger les échantillons (produits de PCR) à tester et les contrôles en mélangeant 13 µL d'ADN et 2 µL de Dye dans les puits du peigne en commençant par le marker VI (DNA Molecular Weight Marker VI, Roche, Allemagne) ;

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 High performance uv transilluminator relié à l'ordinateur, sauvegarder le fichier et analyser les paramètres moléculaires ;

➤ **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 camera du système UVP (UV TRANSILLUMINATOR) sur l'ordinateur. La présence d'une bande de taille spécifique sur le gel d'agarose traduit la présence d'un allotypes 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 ensuite enregistrées dans Excel sur Windows 2000. Le programme UVP (UV TRANSILLUMINATOR) nous permet d'estimer la taille de chacun des fragments amplifiés afin de mettre en évidence aussi bien le polymorphisme de taille que celui des séquences au niveau des différents allotypes utilisés.

Le polymorphisme des gènes se caractérise par le nombre de clones (bandes) des différents allèles, plus un allèle a de bande plus le gène est polymorphe.

Pour la classification de la réponse au traitement à partir des résultats du *msp1*, *msp2* et *glurp* nous avons comparé chez un même patient la position des clones du jour d'inclusion (J0) à celle du jour de ré-apparition des parasites (J-échec).

➤ **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.

Nous avons exprimé les résultats en termes de recrudescence et de nouvelle infection

RESULTATS

5. RESULTATS

5.1. Paramètres démographiques

Tableau 8: Répartition des patients selon le sexe (n=480)

Sexe	Effectifs	%
Féminin	224	46,7
Masculin	256	53,3
Total	480	100

Au total 480 patients ont été enrôlés dans cet étude dont **256** du sexe masculin soit un pourcentage de **53,3%**.

Tableau 9: Répartition des patients en fonction de la tranche d'âge (n=480)

Age (mois)	Effectifs	%
[06-12]	30	6.3
[13-24]	84	17.5
[25-36]	129	26.9
[37-48]	155	32.3
[49-59]	82	17
Total	480	100.0

L'âge minimum était de 6 mois et le maximum 59 mois, la tranche d'âge [**37-48 mois**] était la plus représentée avec **155** patients soit un pourcentage de **32,3%**

Tableau 10: Répartition des patients en fonction de la tranche de parasitémie à J0 (n=480)

Parasitémie Tf/uL	Effectifs	%
[2000-50000]	404	84.2
[50005-100000]	53	11.0
[100005-150000]	9	1.9
[150005-200000[14	2.9
Total	480	100.0

Parmi les patients enrôlés, 404 avaient une parasitémie comprise entre [2000-50000] Tf// μ L à J0, soit un pourcentage de 84,2%.

Tableau 11: Répartition des patients en fonction de la survenue d'échec thérapeutique lors du suivi (n=480)

Échec thérapeutique	Effectifs	%
NON	399	83.1
OUI	81	16.9
Total	480	100.0

Sur un total de 480 enfants inclus dans cette étude, **81** ont fait un second épisode de paludisme sur les 42 jours de suivi. Ce chiffre permet d'estimer le taux d'échecs thérapeutiques à **~17%**.

Tableau 12 : Répartition des cas d'échecs thérapeutiques en fonction de leur période de survenue (n=81)

Période de survenue de l'échec thérapeutique	Effectifs	%
J7-J28	37	45,68
J29-J42	44	54.32
Total	81	100

Parmi les 81 cas d'échecs thérapeutiques observés, **37 (soit 45,68%)** ont fait un second épisode de paludisme avant le 29^{ème} jour de leur suivi.

Le temps de clairance parasitaire a été calculé par intervalle de 24 heures. Ainsi les patients qui ont une parasitémie de 0 Tf// μ L de sang à J1 ont un TCP = 24 heures ; à J2 le TCP = 48heures et à J3 le TCP = 72 heures.

Nous avons fait le test χ^2 avec $p=0,4406$ et un degré de liberté égal à 1 ($\chi^2=0,59$).

Tableau 13: Répartition des patients en fonction de la clairance parasitaire (n=480)

TCP en heures	Effectifs	%
24H	217	45.2
48H	214	44.6
72H	24	5.0
ND	24	5.0
PCP	1	0.2
Total	480	100.0

Parmi nos 480 patients enrôlés, **217 (soit 45,2%)** patients ont fait leur clairance parasitaire **24** heures après le début de leur traitement. Nous avons cependant eu un patient qui n'a jamais fait sa clairance parasitaire (PCP). Nous n'avons pas pu déterminer le TCP chez 24 patients sur les 480 enrôlés (ND).

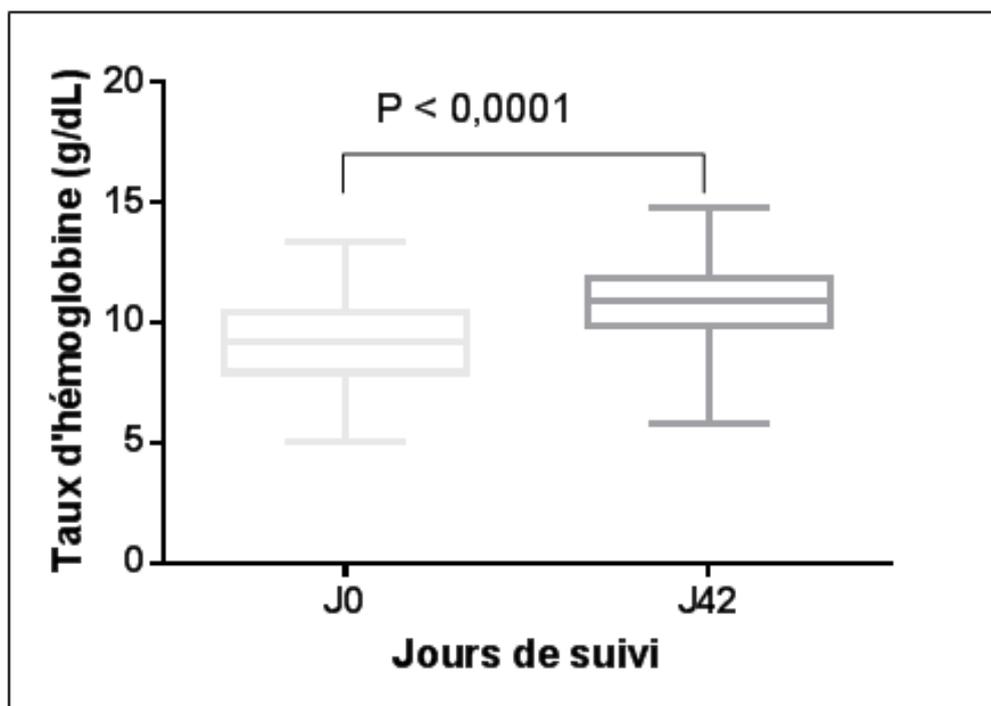


Figure 18 : Comparaison du taux d'hémoglobine au début (J0) et à la fin (J42) du suivi (n=266)

Cette figure montre que la moyenne du taux d'hémoglobine était plus élevée à J42 qu'à J0.

Aussi, il existait une différence statistiquement significative entre le taux d'Hb avant (J0) et après le traitement ($P < 0,0001$ t-test)

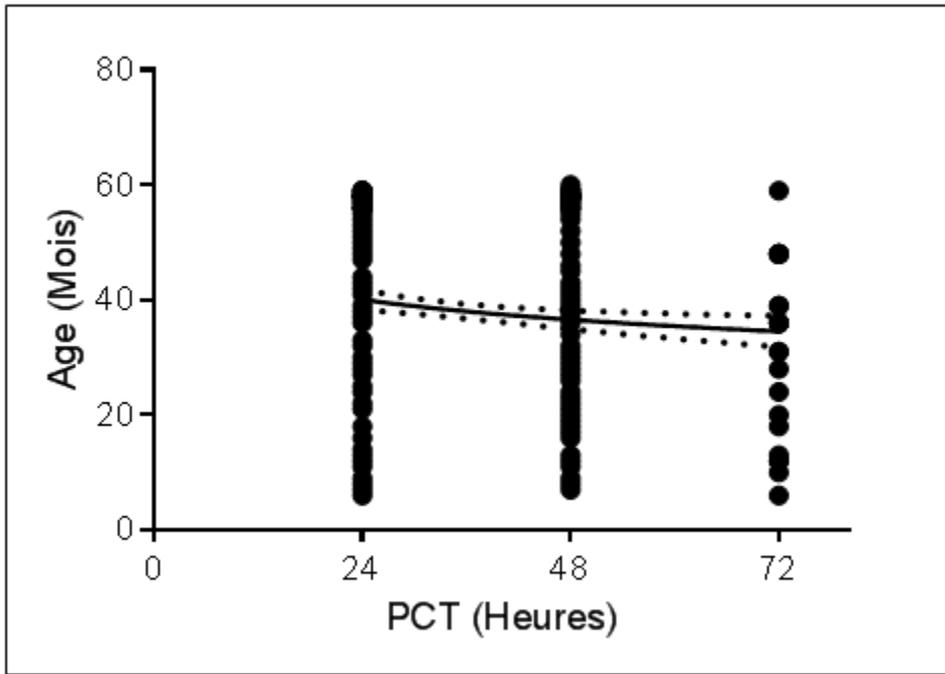


Figure 19 : Corrélation entre l'âge et le TCP (n=480)

Le temps de clairance parasitaire variait en fonction de la tranche d'âge. L'âge avait une corrélation négative sur la clairance parasitaire ($p=0,002$; $r=-0.1447$; Test de Pearson). Ces valeurs statistiques nous permettent de conclure que plus l'âge augmentait plus le temps de clairance diminuait.

Proportions de survie: Survie de deux groupes

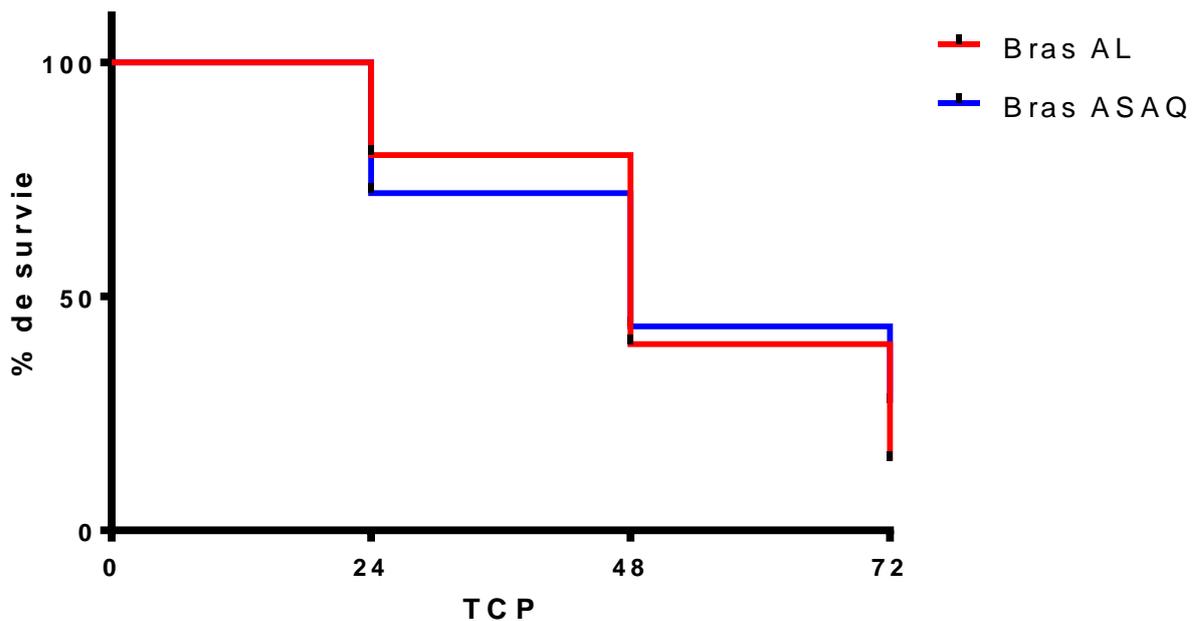


Figure 20 : Clairance parasitaire en fonction des deux bras

Les profils d'élimination des parasites par les deux CTAs montrent que les combinaisons que nous avons utilisés lors de cette étude étaient semblables. Cependant, la majorité des patients qui ont fait leur clairance parasitaire au bout de 24heures était du groupe ASAQ.

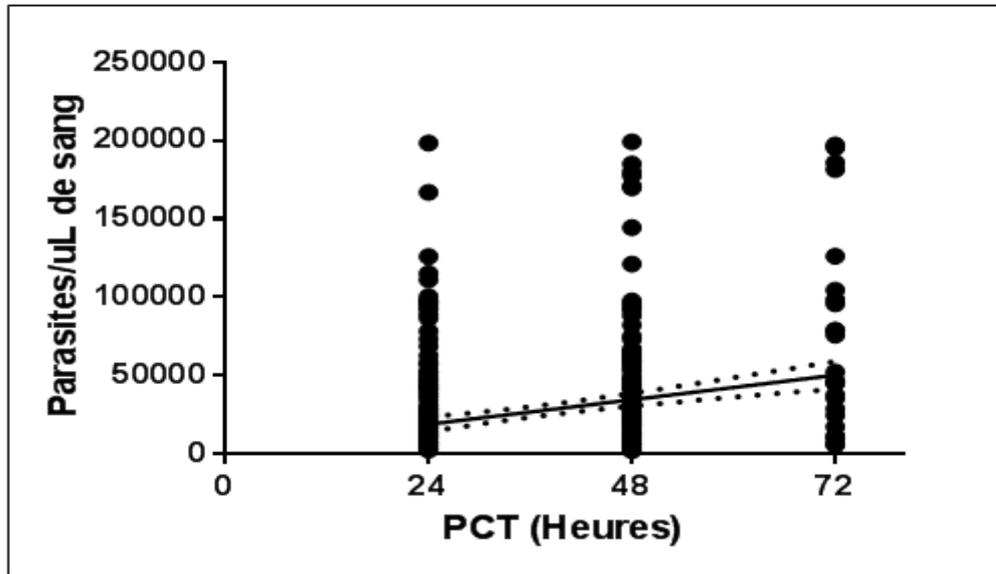


Figure 21 : Corrélation entre la parasitémie initiale et le PCT (n=480)

La parasitémie avait un impact sur le temps de clairance parasitaire. La parasitémie avait une corrélation positive sur la clairance parasitaire ($p < 0,0001$; $r = 0,2464$; Test de Pearson). Les résultats du test de Pearson montrent que plus la parasitémie était élevée plus la clairance parasitaire était retardée.

5.2. Génotypage

Pour déterminer la multiplicité de l'infection (MOI) chez nos 81 cas d'échecs thérapeutiques, nous avons calculé le nombre moyen de génotypes par patient en utilisant les marqueurs polymorphiques *msh1*, *msh2* et *glurp*.

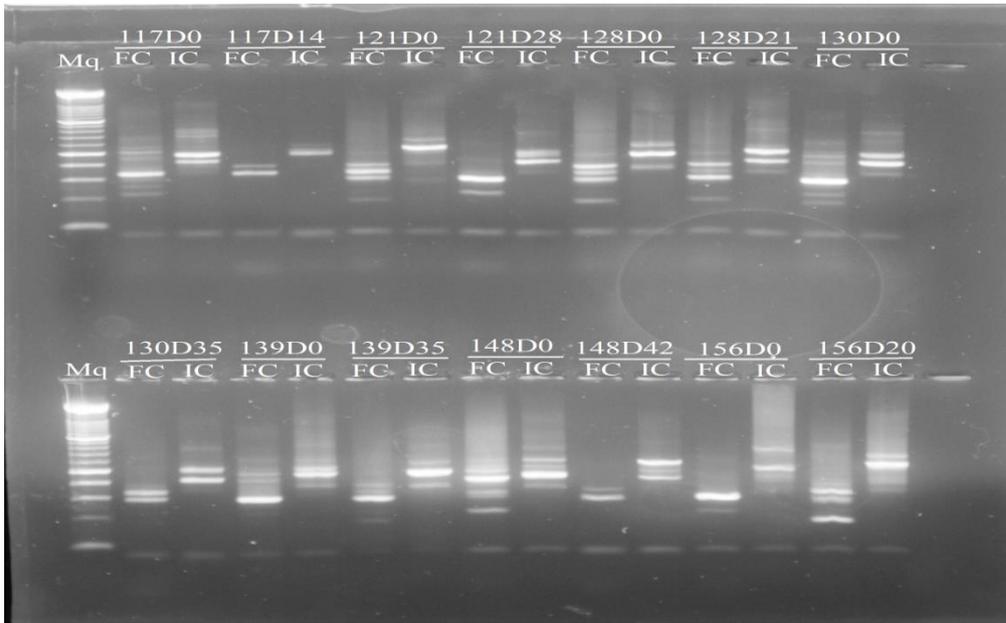


Figure 22 : Image d'une PCR *msp2* sur gel d'agarose.

Polymorphisme de la *msp1*

Tableau 14: Multiplicité de l'infection selon *msp1* (n=151)

Nombre d'allotypes de <i>msp1</i> par patient	Nombre de patient	%
1	75	49,7
2	49	32,4
3 et plus	27	17,9
Total	151	92,6

Après l'étude du gène *msp1*, **49,7% (75 patients)** de nos sujets portaient un génotype. Toutefois, 17,9% (27 patients) de nos patients souffrait d'un épisode de paludisme avec au moins 3 souches en cause.

Polymorphisme de la *msp2*

Tableau 15: Multiplicité de l'infection selon *msp2* (n=153)

Nombre d'allotypes de <i>msp2</i> par patient	Effectifs	%
1	23	15,0
2	53	34,6
3 et plus	77	50,3
Total	153	92,6

Le génotypage du gène *msp2* montre que **34,6%** (53patients) de nos sujets portaient **deux (2)** génotypes. Il faut noter que plus de la moitié (50,3% ; 77patients) des échantillons comportait au moins 3 génotypes

Tableau 16: Multiplicité de l'infection selon *glurp*(n=110)

Nombre d'allotypes de <i>glurp</i> par patient	Effectifs	%
1	100	90,9
2	10	9,1
Total	110	100

Basé sur le polymorphisme de *glurp*, la plupart de nos patients (**90,9% ; soit 100 patients**) portait un génotype.

Tableau 17: Multiplicité de l'infection (MOI) selon les trois marqueurs

Gene	<i>msp1</i>	<i>msp2</i>	<i>glurp</i>	MOI global
Nombre de génotypes	257	403	120	
Nombre de patients	151	153	110	
MOI	1,79	2.62	1,07	1,82

La multiplicité de l'infection lors de cette étude était de ~ 2 génotypes par patient :

Tableau 18: Evolution de la multiplicité de l'infection en fonction de la parasitémie

Parasitémies	MOI par marqueur			MOI (<i>msp1</i> + <i>msp2</i> + <i>glurp</i>)
	<i>msp1</i>	<i>msp2</i>	<i>glurp</i>	
[25-2000]	1,63	2,55	1,14	1,77
[2005-50000]	1,66	2,43	1,07	1,72
[50005-100000]	2	2,66	1,14	1,93
[100005-150000]	2	3	1	2
[150005-200000]	1,66	2,5	1	1,72
	1,79	2.62	1,07	1,82
MOI par patient				

Après le génotypage, nous avons obtenu respectivement pour *msp1*, *msp2* et *glurp* 2, 3 et 1 allotype par patient. La multiplicité de l'infection était ~2 pour toutes les tranches de parasitémies.

Tableau 19: Cas de Recrudescence Vs Nouvelle infections après la correction moléculaire

Cas d'échecs Thérapeutiques	Effectifs	%
Recrudescences	5	6,17
Nouvelles infections	76	93,83
Total	81	100

Des 81 cas d'échecs thérapeutiques obtenus lors de cette étude, 6,17% (5 cas) se sont révélés des cas de recrudescence.

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Notre étude avait pour but d'examiner l'efficacité parasitologique et clinique des combinaisons Artéméther + Luméfantrine et Artésunate + Amodiaquine, dans différentes zones endémiques du Mali. A cet effet nous avons mené une étude prospective mono-aveugle entre Octobre 2015 et Janvier 2017 dans la commune rurale de Sélingué et le village de Missira qui sont deux zones d'endémie palustre de par leur situation géographique, les conditions écologiques et les activités hivernales des habitants (riziculture, élevage ...).

6.1. Lieu d'étude

Nos deux sites ont été choisis sur la base que Sélingué et Missira sont tous deux des sites d'endémie palustre. Aussi, ces deux localités ont des modes de transmission du paludisme différents.

A Sélingué, la transmission est assurée par la pluviométrie et le Barrage de Sélingué. Le Barrage crée beaucoup de gîtes larvaires exposant ainsi aux piqûres infestantes par les moustiques les habitants des ménages tout autour de l'eau. En plus de ces gîtes larvaires créés par le barrage, il y a formation de poches d'eau suite à la pluviométrie qui est assez élevée à Sélingué.

Dans la localité de Sélingué, cette transmission ne s'interrompt pratiquement pas tout le long de l'année car pendant la saison sèche les niches écologiques créées par le Barrage de Sélingué persistent.

Différemment de Sélingué, Missira a un mode dont la transmission est assurée uniquement par la pluviométrie. La zone de Missira est située dans l'entité géographique nommée « Boucle de Baoulé » sur la rive droite de la rivière Baoulé. Missira et ses villages environnants abritent beaucoup de marres. Ceci a pour conséquence une rétention de l'eau pendant la saison des pluies aux voisinages de ces villages. Ainsi mener cette étude, nous a permis de tester l'efficacité de ces CTAs dans deux localités dont l'une a un mode de transmission continu et l'autre pendant une période donnée de l'année.

Aussi, la zone de Sélingué n'a pas bénéficié de chimioprophylaxie en 2016 contrairement à Missira et environs. En plus du critère basé sur le mode de transmission vient s'ajouter la notion de contexte (recommandation de l'OMS pour les tests d'efficacité des CTAs chaque deux ans).

6.2. Méthodologie

Le protocole qui a été exécuté lors de cette étude a été validé par le comité d'éthique de l'INRSP. Ce protocole n'a connu aucune modification lors de l'étude. Cette étude s'inscrivait dans le cadre des recommandations de l'OMS à savoir tester les médicaments de première et de deuxième ligne utilisés pour la prise en charge des cas de paludisme simple au moins une fois chaque 24 mois [46].

Pendant notre étude nos équipes de collecte des données sur le terrain étaient toujours supervisées par une mission du laboratoire pour prévenir la survenue d'erreurs. Comme dans les recommandations de l'OMS sur les essais cliniques [46], les données ont été collectées et saisies sur des supports durs puis enregistrées à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2010 avec vérification des données saisies. Cela nous a permis de générer des données de qualités et exploitables.

Le dépistage commençait par la clinique puis le laboratoire (TDR et goutte épaisse) et le sujet était enrôlé s'il répondait favorablement aux critères d'inclusion. Les critères d'inclusion lors de cette étude étaient en concordance avec ceux recommandés par l'OMS pour les tests d'efficacité des médicaments antipaludiques [46].

Les patients étaient suivis jusqu'au J42 ou tout au long de la durée de leur suivi puisqu'il n'y avait pas de suivi de 42 jours pour les cas d'échec thérapeutique. Les cas d'échec thérapeutique étaient traités par une perfusion à la quinine.

Beaucoup d'études des tests d'efficacité des antipaludiques ont un suivi basé sur 28 jours [46]. Ces dernières sont supposées enregistrer moins de cas de perte de vue ou de refus que celles basées sur 42 jours de suivi puisque beaucoup de parents refusent d'amener les enfants une fois qu'ils sont guéris, toutefois 42 jours de suivi est considéré comme optimal pour les tests d'efficacité de la plupart des antipaludiques sauf la méfloquine et la piperaquine [31,46,47]. Nous avons un guide qui partait chercher les patients lorsqu'ils prenaient du retard à se présenter au centre pendant leurs jours de suivi. Cela nous permettait de diminuer les cas de perte de vue.

Nos tests de dépistage rapide avaient tous de bonne date de péremption et leurs résultats ont tous été confirmés par les gouttes épaisses.

Les lames de goutte épaisse étaient lues par un technicien de laboratoire puis par un pharmacien biologiste ensuite par un parasitologue si la différence entre les deux premières était supérieure à 25%.

Nos échantillons de sang collectés sur du papier confetti étaient asséchés pendant 12 heures et conservés individuellement dans des sachets plastiques (Minigrip RedLine) contenant des dessiccants et munies de l'identité de chaque patient. Cette méthode de

collecte est similaire à celle indiquée dans le SOP du WWARN concernant la collecte de sang sur le papier confetti[48]. Ceci nous a permis de collecter des papiers confettis de qualité qui ont été utilisés pour la correction moléculaire des cas d'échecs thérapeutiques. Durant les trois jours de traitement, les patients prenaient leurs doses de CTA au centre sous le contrôle du dispensateur. La même dose de médicament était réadministrée dans le cas où le patient vomissait dans les trente minutes qui suivent l'administration. Tous les patients étaient convoqués au centre deux fois par jour dans le but de pouvoir maintenir les investigateurs à l'aveugle.

Nos CTAs utilisées : COARTEM et ASAQ étaient respectivement de la firme pharmaceutique NOVARTIS et DENK, et les lots que nous avons utilisés étaient fabriqués en 03/2015 et s'expiraient en 03/2017.

Ces CTAs sont recommandées par l'OMS pour le traitement en première ligne du paludisme simple à *p. falciparum* [42].

Parmi nos 480 enfants enrôlés, 240 étaient sur le bras AL et 240 du bras ASAQ selon la liste de randomisation

Nous avons fait la correction moléculaire en amplifiant par PCR nichée les marqueurs *msp1*, *msp2*, *glurp* pour déterminer la fréquence des différents génotypes mais aussi pour discriminer les recrudescences des cas de nouvelles infections. Cette approche de correction moléculaire est largement utilisée dans les études de test d'efficacité et considérée comme une méthode standardisée et recommandée par l'OMS [3,22,49].

6.3. Résultats

Facteurs démographiques

Notre étude s'est portée sur une population de 480 enfants tous âgés de 6 à 59 mois.

La majorité de ces enfants était de la tranche d'âge [37-48 mois], soit 32,3% de la population d'étude. (Tableau 9). Cette tranche d'âge se retrouve dans la tranche [0-14 ans], qui représente 47,3% dans la pyramide des âges de la population du Mali.

Le genre masculin était le plus représenté avec 53,3%.

Taux d'hémoglobine (Objectif 2):

Pour déterminer l'anémie nous avons utilisé la méthode de la spectrophotométrie à l'aide d'un appareil portable HEMOCUE pour évaluer le taux d'hémoglobine au début de l'étude d'un patient (J0) et à la fin de son suivi (J42 ou jour de recrudescence).

La moyenne du taux d'hémoglobine à J0 était 9,18g/dL tandis que la moyenne du taux d'hémoglobine à la fin du suivi (J42) était de 10,71g/dL. Cette différence du taux

d'hémoglobine entre J0 et J42 était statistiquement significative ($P < 0,0001$; test de Mann Whitney). Cette augmentation du taux d'hémoglobine au cours du suivi pourrait s'expliquer par le fait que la plupart des enfants sont admis avec un taux d'hémoglobine bas qui par la suite corrigé par le traitement.

Paramètres parasitologiques et cliniques (Objectif 2)

Les temps de clairance parasitaire le plus bas et le plus élevé étaient respectivement de **24h** et **72h**. Toutefois, la plupart de nos patients ont fait leur clairance parasitaire entre 24 heures et 48 heures après le début du traitement antipaludique. La médiane du temps de clairance parasitaire était de 48 heures. Ce résultat est légèrement supérieur à celui (40 heures) d'une étude menée entre 2012 et 2015 à Diaro sur l'efficacité de la combinaison AL [27]. La médiane du temps de clairance obtenue lors de notre étude était largement inférieure à celle d'une étude menée en Asie du Sud-Est en 2009 par *Dondorp et al* [50]. La moyenne du temps de clairance parasitaire était de 40 heures contre 36 heures pour respectivement le groupe AL et ASAQ. Lors de cette étude, nous avons enregistré un cas où le patient n'a jamais fait sa clairance parasitaire lors du suivi.

Dans cette étude nous n'avons remarqué aucune corrélation entre l'âge et le temps de clairance parasitaire ($P \text{ value} = 0,2239$; test de Mann Whitney).

Nous avons cependant constaté une corrélation entre la parasitémie initiale et le TCP; la parasitémie initiale avait un impact sur le temps de clairance parasitaire. Plus la parasitémie était élevée plus le temps de clairance parasitaire était allongé ($P \text{ value} < 0,0001$; $r = 0,2464$; test de Pearson). Ce résultat concorde avec celui d'une étude similaire menée au Mali par **Djimde et al en 2008** dans la région Sikasso ($P = 0,0116$) [14].

La clairance parasitaire a été obtenue avant le 7^{ème} jour chez presque la totalité de nos patients ; cela montre l'efficacité des deux CTAs (AL et ASAQ) utilisées lors de cette étude. Après correction moléculaire par PCR, le taux de guérison était d'environ 99, 8% (**Objectif 4**). Malgré l'efficacité de ces CTAs, l'étude a tout de même enregistré 81 cas d'échecs thérapeutiques (~17% des patients) avec un taux de guérison de 83,12% avant correction moléculaire. La majorité de ces cas d'échecs thérapeutiques est survenue entre J29 et J42. Ceci nous laisse conclure qu'en dépit de l'efficacité des dérivés de l'Artémisinine qui se trouvent dans ces combinaisons, les médicaments partenaires n'ont pas pu empêcher les patients de contracter de nouvelles parasitémies avant le 42^{ème} jour du traitement (**Objectif 1**) cela pourrait s'expliquer par le fait qu'à partir de J28 il n'y a

plus de métabolites de ces médicaments partenaires dans le sang vu que les ACTs sont conçus de telle sorte que le dérivé d'artémisinine a une demi-vie relativement courte et agit rapidement pour réduire la charge parasitaire et le partenaire médicamenteux a été sélectionné pour avoir une demi-vie plus longue et capable d'éliminer la parasitémie pendant des semaines après le traitement.

Nous avons déterminé la multiplicité de l'infection chez nos 81 cas d'échecs thérapeutiques en estimant le nombre moyen de génotype par patient. La multiplicité de l'infection a été déterminée à partir des données des marqueurs polymorphiques *msh1*, *msh2* et *glurp* par la nested-PCR pour donner plus de fiabilité à nos résultats, ce qui n'était pas le cas dans une étude menée au Sénégal en 2017 par MAKHTAR NIANG et al qui avait utilisé seulement *msh1* et *msh2* [51].

Pour le gène *msh1*, nous avons constaté que 32,4% des patients portaient deux allotypes et 17,9% avait au moins trois allotypes. Avec *msh2* nous avons eu un taux de 34,6% avec deux allotypes et 50,3% portant au moins trois allotypes. Avec le gène *glurp* seulement 9,1% des patients portaient **deux** allotypes. Selon les gènes *msh1*, *msh2* et *glurp*, la multiplicité de l'infection était respectivement 1,79 ; 2,62 et 1,07 génotypes par patient. Ronal I. et al. avait eu respectivement 2,8 ; 2,6 pour *msh1* et *msh2* légèrement supérieures à *glurp* comme dans notre cas, dans leur étude menée au Nigeria en 2017 sur ces trois marqueurs [52].

De façon globale, la multiplicité de l'infection était de 2 génotypes par patient lors de cette étude (**Objectif 3**). *Mwingira, felista et Al.* avaient obtenu des résultats similaires dans leur étude menée sur la diversité et la fréquence des allèles de *P.falciparum* en Afrique sub-Saharienne en 2011 avec respectivement (1,48 ; 2,24 et 1,4 allotypes) pour les gènes *msh1*, *msh2* et *glurp* [53].

La multiplicité de l'infection variait très peu en fonction de la parasitémie et était ~2 pour toutes les branches de parasitémie sauf avec le gène *glurp*.

Ce résultat est comparable à celui d'une étude menée par *Hypolite Muhindo Mavoko et al* qui ont trouvé au Congo Démocratique en 2016 une MOI égale à 3 [54]. Cette différence peut s'expliquer par la taille de l'échantillon 865 contre 480 dans notre cas mais aussi le niveau de transmission qui diffère d'une localité à une autre.

CONCLUSION

7. CONCLUSION

Au terme de cette étude nous avons obtenu un taux de guérison d'environ 99,8%. Ceci prouve l'efficacité des CTAs utilisées lors de cette étude. Les 81 cas d'échecs thérapeutiques observés au cours d'un suivi basé sur 42 jours remettent en cause l'efficacité de ces molécules partenaires aux dérivés de l'artémisinine. Cette étude nous a aussi montrée que le niveau de transmission est très élevé à Sélingué et Missira. Les 81 cas d'échecs thérapeutiques observés associés aux 5 cas de recrudescences après correction moléculaire par la PCR suggèrent une nécessité absolue de continuer à tester l'efficacité de ces CTAs et d'envisager déjà l'introduction de nouvelles molécules dans la composition des CTAs.

RECOMMENDATIONS

8. RECOMMANDATIONS

Au LBMA :

De séquencer tous les cas d'échecs thérapeutiques à la recherche d'éventuelles mutations associées à la résistance des molécules constituant les CTAs.

Au PNLP et ses partenaires :

- De mobiliser plus de moyens et d'effort pour continuer le monitoring de l'efficacité des CTAs mais aussi d'étendre ces études sur tout le territoire afin d'avoir des données assez consistantes ;
- D'envisager l'introduction dans le traitement du paludisme à *P.falciparum*, des molécules autres que les molécules partenaires actuelles aux dérivés de l'artémisinine.

Au Centre de Santé de Référence de Sélingué :

- De sensibiliser la population par rapport au paludisme et par rapport à la lutte contre son vecteur de transmission.
- D'adopter les bonnes manières d'utilisation des médicaments antipaludiques pour une bonne observance de ces molécules.

REFERENCES

9. REFERENCES

1. Unicef. World malaria report: 2005. 2005; Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43213/9241593199_eng.pdf?sequence=1
2. Marc Gentilini, CAUMES Eric, DANIS Martin, BÉGUÉ Pierre. Médecine tropicale (6e éd.) gentilini marc, caumes eric, danis martin, bégué pierre [Internet]. Librairie Lavoisier. [cité 1 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.lavoisier.fr/livre/medecine/medecine-tropicale-6e-ed/gentilini/descriptif-9782257203960>
3. world health organization. world malaria report 2017. [Internet]. S.l.: WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2018. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf?sequence=1>
4. WHO-HTM-GMP-malaria report 2016.4-fre.pdf [Internet]. [cité 17 mai 2018]. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254913/WHO-HTM-GMP-2017.4-fre.pdf;jsessionid=3EC62E7A060B30F14534944A432BE9FB?sequence=1>
5. PNL. Enquete sur les Indicateurs du Paludisme (EIPM) 2015 [Internet]. 2015 [cité 6 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.dhsprogram.com/pubs/pdf/MIS24/MIS24.pdf>
6. Saade MOH. Le paludisme au mali: Bilan de dix huit années d'Activités de recherche et de lutte [Internet] [PhD Thesis]. Thèse De La Faculté De Médecine, De Pharmacie Et d'OdontoStomatologie Pour Obtenir Le Grade De Docteur En Médecine (Diplôme d'Etat); 2005. Disponible sur: <http://www.kenya.net/fmpos/theses/2005/med/pdf/05M92.pdf>
7. Diawara S. HemoglobinoPathie C et paludisme chez les enfants dans les services de pediatrie du CHU Gabriel TOURE de Bamako [These de Medecine]. [Bamako]: USTTB; 1997.
8. Haidaro SA, Doumbo O, Traore AH, Koita O, Dembele M, Dolo A, et al. La place du paludisme dans les syndrome fébriles en médecine interne. Médecine Afr Noire

- [Internet]. 1991;38(2). Disponible sur:
<http://www.santetropicale.com/Resume/23804.pdf>
9. Kayentao.K. Epidémiologie du paludisme et évaluation du traitement de l'accès palustre simple a la chloroquine dans le village de Donéguébougou. [These de Medecine]. [Bamako]: USTTB; 1997.
 10. Darar HY. Etude épidémio-clinique et moléculaire du Paludisme à Plasmodium falciparum par la MSP-1 à Missira (Cercle de Kolokani) [Internet] [PhD Thesis]. Tulane University; 2004. Disponible sur:
http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/Thesis_Bamako/04M99.PDF
 11. artemisinin_resistance_containment_2011.pdf [Internet]. Disponible sur:
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin_resistance_containment_2011.pdf
 12. status_rep_artemisinin_resistance_sep2014.pdf [Internet]. [cité 1 mai 2018].
Disponible sur:
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/status_rep_artemisinin_resistance_sep2014.pdf
 13. status-rep-artemisinin-resistance-sept2015.pdf [Internet]. [cité 1 mai 2018].
Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/status-rep-artemisinin-resistance-sept2015.pdf>
 14. Maiga AW, Fofana B, Sagara I, Dembele D, Dara A, Traore OB, et al. No Evidence of Delayed Parasite Clearance after Oral Artesunate Treatment of Uncomplicated Falciparum Malaria in Mali. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2 juill 2012 [cité 1 mai 2018];87(1):23-8. Disponible sur:
<https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2012.12-0058>
 15. Wang P, Lee CS, Bayoumi R, Djimde A, Doumbo O, Swedberg G, et al. Resistance to antifolates in Plasmodium falciparum monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. Mol Biochem Parasitol [Internet]. nov 1997;89(2):161-77. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364963>
 16. Frueh K, Doumbo O, Müller HM, Koita O, McBRIDE J, Crisanti A, et al. Human antibody response to the major merozoite surface antigen of Plasmodium falciparum

- is strain specific and short-lived. *Infect Immun* [Internet]. 1991;59(4):1319–1324. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC257845/>
17. al ML et. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 2 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8515771>
 18. Mackay M, Goman M, Bone N, Hyde JE, Scaife J, Certa U, et al. Polymorphism of the precursor for the major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites: studies at the genetic level. *EMBO J* [Internet]. 1985;4(13B):3823–3829. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3004972>
 19. Corcoran LM, Thompson JK, Walliker D, Kemp DJ. Homologous recombination within subtelomeric repeat sequences generates chromosome size polymorphisms in *P. falciparum*. *Cell* [Internet]. 3 juin 1988;53(5):807-13. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3286016>
 20. Certa U, Rotmann D, Matile H, Reber-Liske R. A naturally occurring gene encoding the major surface antigen precursor p190 of *Plasmodium falciparum* lacks tripeptide repeats. *EMBO J* [Internet]. 20 déc 1987 [cité 4 mai 2018];6(13):4137-42. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC553896/>
 21. O.KOITA. Molecular studies of clonality, transmission and severe disease in malaria. [Internet]. 2000 [cité 4 mai 2018]. Disponible sur: http://catalog.xmu.edu.cn/opac/item.php?marc_no=0003297576
 22. Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. [Internet]. Genève: World Health Organization; 2008. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241596305/en/>
 23. Prevention C-C for DC and. CDC - Malaria - About Malaria - History [Internet]. 2017 [cité 13 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/index.html>
 24. L' utilisation des antipaludiques : rapport d'une consultation informelle de l' OMS, 13-17 novembre 2000 [Internet]. [cité 4 mai 2018]. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/67811>

25. SERGE KK. Contrôle de qualité de trois antipaludiques dérivés de l'artémisinine (artéméter, artesunate, dihydroartémisinine). Th Ph Bamako [Internet]. 2005; Disponible sur: http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/Thesis_Bamako/05P33.PDF
26. WHO. utilisation des antipaludiques rapport d'une consultation informelle WHO/CDS/RBM/2001.33 [Internet]. [cité 4 mai 2018]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67811/WHO_CDS_RBM_2001.33_fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y
27. Diarra Y. Etude d'efficacité des antipaludiques : cas de l'artéméter-luméfantrine et la chloroquine dans la commune rurale de dioro [Internet]. 2015 [cité 5 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2016/pharma/pdf/16P05.pdf>
28. Ménard D, Ariey F, Mercereau-Puijalon O. Étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (RIIP-Palu). médecine/sciences [Internet]. 1 juin 2013 [cité 5 mai 2018];29(6-7):647-55. Disponible sur: <https://www.medecinesciences.org/articles/medsci/abs/2013/08/medsci2013296-7p647/medsci2013296-7p647.html>
29. Koita OA, Sangaré L, Sango HA, Dao S, Keita N, Maiga M, et al. Effect of Seasonality and Ecological Factors on the Prevalence of the Four Malaria Parasite Species in Northern Mali [Internet]. Journal of Tropical Medicine. 2012 [cité 5 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/367160/>
30. christian,georges,tra@sor Tumuinimo mambu,Ngoy batala,Baka nduku,Mampangula takeba D. Memoire Online - Mortalité hospitalière due au paludisme grave chez les enfants de moins de cinq ans - Dimitri,christian,georges,tra@sor Tumuinimo mambu,Ngoy batala,Baka nduku,Mampangula takeba [Internet]. Memoire Online. [cité 5 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.memoireonline.com/12/08/1704/mortlite-hospitalirere-due-a-paludisme-grave-chez-les-enfants-de-moins-de-cinq-ans.html>
31. Djimé AA, Fofana B, Sagara I, Sidibe B, Toure S, Dembele D, et al. Efficacy, safety, and selection of molecular markers of drug resistance by two ACTs in Mali. Am J Trop Med Hyg [Internet]. mars 2008;78(3):455-61. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337343>

32. Talisuna AO, Karema C, Ogutu B, Juma E, Logedi J, Nyandigisi A, et al. Mitigating the threat of artemisinin resistance in Africa: improvement of drug-resistance surveillance and response systems. *Lancet Infect Dis* [Internet]. nov 2012;12(11):888-96. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23099083>
33. 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] [Thèse de doctorat]. [1970-2014, France]: Université des sciences et techniques de Montpellier 2; 1992. Disponible sur: www.sudoc.abes.fr/DB=2.1/SRCH?IKT=12&TRM=012079162.
34. 3-systemes_vectoriels.pdf [Internet]. [cité 18 mai 2018]. Disponible sur: http://www.suds-en-ligne.ird.fr/paludisme/pdf/3-systemes_vectoriels.pdf
35. Y.-T. TOURO. Étude de la sensibilité d'*Anopheles funestus* et d'*Anopheles gambiae* sensu lato aux insecticides dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali [Internet]. [cité 5 mai 2018]. Disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/cahiers/entomo/02302.pdf
36. Suds en ligne : Systématique des Plasmodium (1) [Internet]. [cité 18 mai 2018]. Disponible sur: http://www.suds-en-ligne.ird.fr/paludisme/systemes/syst_plasmodium01.html
37. 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. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. mars 1992;51(1):81-9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373473>
38. CDC - DPDx - Malaria [Internet]. [cité 18 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
39. Pr. M. Danis. PEP. Semaine thématique paludisme IFMT Vientiane Laos Antipaludiques [Internet]. 2003 [cité 5 mai 2018]. Disponible sur: <https://natyinfirmiere.files.wordpress.com/2010/10/les-anti-paludiques.pdf>

40. V. Jullien. Pharmacocinétique des antipaludiques couramment utilisés en association.pdf [Internet]. Disponible sur: <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/19130.pdf>
41. (Dr Filisetti D, PML. DCEM3-Pharmaco_Chap16-Antipaludeens_2012.pdf [Internet]. [cité 5 mai 2018]. Disponible sur: http://udsmed.u-strasbg.fr/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco_Chap16-Antipaludeens_2012.pdf
42. WHO. Directives pour le traitement du paludisme 2011 [Internet]. [cité 18 mai 2018]. Disponible sur: http://epivacplus.org/sites/default/files/articles/437_1-20110728-130851.PDF
43. World Health Organization, World Health Organization, Global Malaria Programme. Guidelines for the treatment of malaria. [Internet]. [cité 5 mai 2018]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf?sequence=1
44. Gan LSH, Loh JP. Rapid identification of chloroquine and atovaquone drug resistance in Plasmodium falciparum using high-resolution melt polymerase chain reaction. Malar J [Internet]. 21 mai 2010 [cité 5 mai 2018];9:134. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881075/>
45. Matali S. Evaluation de la reponse in vivo des souches de plasmodium falciparum a la chloroquine a missira (kolokani). [Internet]. 2006. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2006/med/pdf/06M130.pdf>
46. Organization WH. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. 2009; Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241597531/en/>
47. Laminou IM, Fatouma S, Maman D, Mainassara HB, Maazou A, Zamanka H, et al. Comparaison de l'efficacité thérapeutique et de la tolérance des combinaisons artemether-lumefantrine et artesunate-amodiaquine au niger. Mali Méd [Internet]. 2016;31(1). Disponible sur: <https://www.researchgate.net/publication/275965837>
48. collection-of-blood-on-filter-paper.pdf [Internet]. [cité 5 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.wwarn.org/sites/default/files/attachments/procedures/collection-of-blood-on-filter-paper.pdf>

49. Snounou G, Beck HP. The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial drug treatment. *Parasitol Today Pers Ed* [Internet]. nov 1998;14(11):462-7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040849>
50. Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, et al DA. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria | *NEJM* [Internet]. [cité 5 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0808859>
51. Niang M, Loucoubar C, Sow A, Diagne MM, Faye O, Faye O, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates from concurrent malaria and arbovirus co-infections in Kedougou, southeastern Senegal. *Malar J* [Internet]. 11 mars 2016 [cité 15 mai 2018];15. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4788873/>
52. Funwei, Bolaji N. Thomas, Catherine O. Falade and Olusola Ojurongbe RI. Extensive diversity in the allelic frequency of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins and glutamate-rich protein in rural and urban settings of southwestern Nigeria | *Malaria Journal* | Full Text [Internet]. [cité 19 mai 2018]. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-2149-5>
53. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck H-P, Snounou G, et al. *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. *Malar J* [Internet]. 6 avr 2011;10:79. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-10-79>
54. Mavoko HM, Kalabuanga M, Delgado-Ratto C, Maketa V, Mukele R, Fungula B, et al. Uncomplicated Clinical Malaria Features, the Efficacy of Artesunate-Amodiaquine and Their Relation with Multiplicity of Infection in the Democratic Republic of Congo. *PLOS ONE* [Internet]. juin 2016 [cité 20 avr 2018];11(6):e0157074. Disponible sur: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157074>

ANNEXES

FICHE SIGNALITIQUE

NOM : BOUARE

PRENOM : HAMADOU

TEL : +223 65814351 / +223 76725972

Email : bouarea0110@gmail.com

Titre de la thèse : Test d'Efficacité de l'Artéméther plus Luméfantrine et Artésunate plus Amodiaquine dans le traitement du paludisme simple à Sélingué et à Missira en 2016.

Nationalité : Malienne

Année Universitaire : 2017- 2018

Ville de soutenance : BAMAKO- MALI

Lieu de dépôt : bibliothèque de la faculté de pharmacie et de médecine et d'odontostomatologie.

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

RESUME

Malgré les efforts consentis de part et d'autre dans le monde le paludisme continue d'être un problème majeur de santé publique. L'OMS dans son rapport de Décembre 2017 sur le paludisme a enregistré en 2016, 216 millions de cas de paludisme avec 445000 cas de décès. Plus de 80% des décès par le paludisme se produisent en Afrique subsaharienne, les enfants de moins de 5ans et les femmes enceintes sont les plus touchés et approximativement 75% des cas sont dus à *Plasmodium falciparum*. Aujourd'hui, la mise en place d'un système de surveillance régulière de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* est primordiale et recommandé par l'OMS pour l'ensemble des antipaludiques dans les zones d'endémie palustre. C'est dans ce cadre que nous avons mené une étude de la sensibilité de *P.falciparum* aux deux CTAs de 1^{ère} ligne (AL et ASAQ) à Sélingué et à Missira entre Novembre 2015 et Décembre 2016 chez les enfants de 6 à 59 mois ayant une parasitémie à *P.falciparum* comprise entre 2000 et 199.999/uL de sang. Les patients ont été traités avec les 2 CTAs et suivis pendant 42 jours avec un rendez-vous chaque semaine après les trois jours de traitement. Le taux de guérison non corrigé a été déterminé en se basant sur le nombre d'échecs thérapeutiques et la correction a été faite par PCR à l'aide des marqueurs moléculaires *msp1*, *msp2* et *glurp*. Nous avons au total inclus 480 enfants. Tous les patients ont fait leur clairance parasitaire avant J7 sauf dans un cas où le patient n'avait pas fait de clairance parasitaire. La médiane du temps de clairance parasitaire était de 48 heures. La multiplicité de l'infection était de 2 géotypes par patient. Nous avons observé 81 cas de parasitémies récurrentes parmi les 480 patients inclus, ce qui nous a permis d'estimer un taux de guérison de 83,12% avant correction moléculaire et un taux de guérison de 99,8% après correction moléculaire par la PCR. Les combinaisons Artéméther + Luméfantrine et artésunate + amodiaquine s'avère donc efficace de nos jours à Sélingué et à Missira dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum*.

Test d'efficacité de la combinaison Artéméther + Luméfantrine et Artesunate + Amodiaquine, 2016

Mots clés : Antipaludiques, Artéméther-Luméfantrine, Artesunate- Amodiaquine, CTAs, MOI, Efficacité.

IDENTIFICATION SHEET

Last Name: BOUARE

First Name: HAMADOU

Phone: +223 65814351 / +223 76725972

Email: bouarea0110@gmail.com

Title: Study of efficacy of Artemether-Lumefantrine and Artesunate- Amodiaquine in the treatment of uncomplicated malaria in Sélingué and Missira in 2016.

Academic Year: 2017-2018

City of defense: Bamako-Mali

Place of deposit: Library of Faculty of Medicine, Pharmacy and Odonto-stomatology

Focus area: Molecular Parasitology, Public Health, Pharmacology.

ABSTRACT

Despite the efforts of both sides in the world, malaria continues to be a major public health problem. The WHO in its December 2017 report on malaria recorded in 2016, 216 million cases of malaria with 445,000 cases of death. More than 80% of deaths from malaria occur in sub-Saharan Africa, children under 5 years and pregnant women are the most affected and approximately 75% of these cases are due to *Plasmodium falciparum*. Today, the establishment of a regular monitoring system testing the susceptibility of parasites to antimalarial drugs is essential and recommended by WHO for all antimalarials in malaria-endemic areas. It is within this framework that we conducted a study of the susceptibility of *P.falciparum* to the two ACTs of the first line treatment (AL and ASAQ) in Sélingué and Missira between November 2015 and December 2016 within children from 6 to 59 months having *P.falciparum* with parasitemias between 2000 and 199.999 / μL of blood. Patients were treated with both ACTs and followed for 42 days with an appointment every week after the three days of treatment. The uncorrected cure rate was determined based on the number of treatment failures and the correction was made by PCR using the *msh1*, *msh2* and *glurp* molecular markers. We have included a total of 480 children. All patients did their parasite clearance before Day7 except in one case where the patient still had parasites on Day7. The median of parasite clearance time was 48 hours. The multiplicity of infection was 2 genotypes per patient. We observed 81 cases of recurrent parasitemias among the 480 patients included, which allowed us to estimate a cure rate of 83.12% before molecular correction and a cure rate of 99.8% after molecular correction by PCR. AL and ASAQ combinations are therefore effective today in Sélingué and Missira for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria.

Keywords: antimalarials, Artemether+Lumefantrine, Artesunate+Amodiaquine, MOI, efficacy

SERMENT DE GALIEN



CLAUDE 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!