

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° _____ /

**LA PREVALENCE DES MUTATIONS SUR LES GENES *Pfdhfr* et *Pfdhps*
DANS LA COMMUNE RURALE DE DIORO**

THESE

**Présentée et soutenue publiquement le 09/ 06/2018 devant la Faculté de Pharmacie
pour obtenir le Grade de**

DOCTEUR EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ETAT)

Par

M. TELLY Modibo

JURY

Président du jury : Professeur Mouctar DIALLO

Membres : Professeur Lansana SANGARE

Docteur Dade Ben Sidy HAIDARA

Co-directeur de thèse : Docteur Youssouf DIARRA

Directeur de thèse : Professeur Ousmane KOITA

Cette thèse a reçu le financement du programme ICERM/Tulane (U19 AI 0969801A2)

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/CHARGES DE RECHERCHE

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

ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

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

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

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. SAÏBOU	MAÏGA	Législation

Mme. ROKIA	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER
------------	--------	-----------------------------------

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

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

ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

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

Mme. Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

DER : SCIENCES DU MEDICAMENT

PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

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

MAITRES DE CONFERENCE/MAITRES DE RECHERCHE

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

MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

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

ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
M. Mody	CISSE	Chimie Thérapeutique
M. Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
M. Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
Mme. Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
M. Abdrahamane	DIARA	Toxicologie
M. Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique

M. Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique
M. Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

DER : SCIENCES FONDAMENTALES

PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

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

MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

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

MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

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

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

M. Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
M. Babou	BAH	Anatomie
M. Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
M. Souleymane	COULIBALY	Psychologie

M. Bouba	DIARRA	Bactériologie
M. Mamadou Lamine	DIARRA	Biologie Végétale, Botanique
M. Modibo	DIARRA	Nutrition
M. Moussa I.	DIARRA	Biophysique
M. Babacar	DIOP	Chimie
M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie
M. Yaya	KANE	Galénique
M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Aboubakary	MAÏGA	Chimie Organique
M. Massambou	SACKO	SCMP/SIM
M. Modibo	SANGARE	Anglais
M. Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
Mme. Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
M. Fana	TANGARA	Maths
M. Abdel Kader	TRAORE	Pathologies Médicales
M. Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

**DÉDICACES ET
REMERCIEMENTS**

DEDICACES

Je dédie cette thèse :

AU TOUT PUISSANT, LE TOUT MISERICORDIEUX, LE TRES MISERICORDIEUX

Pour la santé, le courage et la force que vous m'avez donnés et qui m'ont permis de surmonter les difficultés rencontrées lors de ma formation et l'élaboration de cette thèse.

A mon père pour son soutien qui me fut très utile.

A ma mère pour tous les services rendus sans rien attendre en retour.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent :

AU TOUT PUISSANT, LE TOUT MISERICORDIEUX, LE TRES MISERICORDIEUX

A mon père : Balougo TELLY

Pour ton soutien infaillible et inconditionnel depuis que j'ai vu le jour jusqu'aujourd'hui.

Le sens du sacrifice, la patience, l'amour des autres, l'humilité et la persévérance ont été et seront ma boussole comme tu me les as inculqué et surtout des valeurs du travail bien accompli. Il est clair et évident que jusqu'à la fin des temps, je ne pourrai jamais te récompenser pour ce que tu as fait pour moi. Que LE SEIGNEUR te récompense à ce titre.

J'espère de tout mon cœur que tu seras fier de moi comme je l'ai toujours été de toi !!!

A ma mère : Garibou TELLY

Que des souffrances et des souffrances endurées pour nous, tes enfants, l'amour et l'affection que vous avez pour nous sont inestimables.

Ce travail est le résultat de vos prières et bénédictions de tous les jours, il est clair et évident que jusqu'à la fin des temps je ne pourrai jamais vous récompenser pour ce que vous avez fait pour moi.

Tu as fait preuve d'amour maternel et irréprochable à mes frères et moi.

Que LE TRES HAUT vous récompense.

Mention spéciale à ma tante **Mariam TELLY**, tu as été plus qu'une tante pour moi, l'amour maternelle dont tu as fait preuve à mon égard m'a permis d'avoir confiance en moi et surmonter les obstacles de la vie. QUE LE TOUT PUISSANT TE RECOMPENSE POUR CELA.....

A ma sœur et à mes frères : Oumou, Issa, Ousmane, Ibrahim et, Ahamadoun TELLY.

Grace à vos conseils, j'ai toujours eu cette confiance en moi. Merci pour m'avoir aidé à nourrir et entretenir cette ambition de devenir pharmacien.

A tout le personnel du LBMA, grand merci pour tout ce que j'ai appris et ce que je continue d'apprendre avec vous.

A tout le personnel du CSCom de DIORO pour leur hospitalité profonde et sans pareil surtout pendant la période de cette étude.

A mes MAITRES de la Première Année Fondamentale jusqu'à la Faculté de Pharmacie pour leur enseignement édifiant et instructif.

Aux membres de la Promotion N'golo DIARRA, la neuvième promotion du numerus clausus ; j'ai tissé de bon lien avec vous et j'espère que nous continuerons cette sincère collaboration dans la vie professionnelle.

A mes amis : Mamoutou KOUREISSY, Fatoumata Mariam DAFPE, Souleymane KANADJI, Zakaria HAIDARA, Abdoulaye DIARRA, Mohamed El Moctar CISSE, Aly TEMBELY, j'ai passé tous ces moments de la faculté à vos côtés. J'avoue que j'ai partagé de ces instants de galère avec vous que je ne pourrais oublier. Ces moments m'ont aidé à me forger un caractère d'homme réaliste et optimiste, aussi, j'ai passé des moments très agréables avec vous qui vont sans nul doute me manquer. Avec vous, j'ai vu les défis de la vie se transformer en acquis. Grand merci à vous tous... Vous êtes plus que des amis, vous êtes de la famille.

A mes aînés de la faculté : Dr Youssouf KANSAYE, Dr Youssouf DIARRA, Dr ABDOUL KADER ISSOUFI, Dr Barou SOGOBA, je vous remercie pour avoir valablement joué votre rôle protecteur et affectif d'aîné.

A l'AEP, Amicale des Etudiants en Pharmacie et à la **FESPAO**, la Fédération des Etudiants en Sciences Pharmaceutiques de l'Afrique de l'Ouest que j'ai eu l'honneur de présider en 2016. Cette fédération fut pour moi un cadre idéal d'échanges intenses avec des camarades de la sous-région.

Au personnel de la Pharmacie KEBA TOURE, Pharmacie V2M, Pharmacie la REFERENCE

**HOMMAGES
AUX MEMBRES
DU JURY**

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du Jury

- **Professeur 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.**

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

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

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

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

A notre Maître et Juge

Professeur Lansana SANGARE

- **Maître 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.**

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

A notre Maître et Juge

Docteur Dade Ben Sidy 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 et Appliquée.**

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 à 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 ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AEP	Amicale des Etudiants en Pharmacie
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
CI₅₀	Concentration inhibitrice 50
CPN	Consultation prénatale
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
DTC	Vaccin antidiphtérique, antitétanique, anticoquelucheux
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)

ET	Ecart Type
FESPAO	Fédération des Etudiants en Sciences Pharmaceutiques de l'Afrique de l'Ouest
FRC	Formulaire de Report de Cas
G6PD	Glucose-6-Phosphate Deshydrogenase
Hb	Hémoglobine
HRM	Hight Resolution Melting
HRP2	Histidin Rich Protein 2 (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
MII LDA	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action
MOI	Multiplicité de l'infection
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
PABA	Acide para amino benzoïque
Pan-LDH	Malaria pan Lactate Dehydrogenase
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
PCT	Temps de clairance parasitaire
PEV	Programme élargi de vaccination
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pfprt</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> Cloroquine transporter
<i>Pfdhfr</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase
<i>Pfdhps</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydropteroate synthase
<i>Pfmdr1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> multi-drug resistance
PID	Pulvérisation intra-domiciliaire
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
PQ	Pipéraquline
PTME	Prévention de la Transmission Mère-Enfant
PVM	Projet Village du Millénaire
PYR	Pyriméthamine
QBC	Quantitative Buffy-Coat
QN	Quinine
RFLP	Restriction fragment length polymorphism

SP	Sulfadoxine Pyriméthamine
SSJ	Syndrome de Stevens-Johnson
TBE	Tris Borate EDTA
TCF	Temps de Clairance de la Fièvre
TCP	Temps de Clairance Parasitaire
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TPI	Traitement Préventif Intermittent
TPIe	Traitement Préventif Intermittent de l'enfant et
TPIg	Traitement Préventif Intermittent pendant la grossesse
TPIIn	Traitement Préventif Intermittent du nourrisson
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
V2M	Vision Médicale du Mali

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents faciès de transmission du paludisme au Mali [21].	13
Tableau 2 : Taxonomie du vecteur du paludisme.	15
Tableau 3 : Listing des examens faits par rendez-vous	47
Tableau 4 : Liste des amorces utilisées	52
Tableau 5 : Composition du mélange réactionnel 1	53
Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel 2	53
Tableau 7 : Concentration des amorces utilisées lors du HRM.	58
Tableau 8 : Composition du mix lors du HRM	58
Tableau 9 : Répartition des patients en fonction de l'année d'étude.	66
Tableau 10 : Fréquence du polymorphisme des allotypes de <i>msp-1</i>	70
Tableau 11 : Répartition des patients en fonction du <i>dhps</i> 436.	73
Tableau 12 : Répartitions des allotypes de <i>dhps</i> à la position 436 en fonction des parasitémies (N=172)	73
Tableau 13 : Répartitions des allotypes de <i>dhps</i> à la position 437 en fonction des parasitémies (N=172)	74
Tableau 14 : Corrélation entre la parasitémie et le gène <i>dhfr</i> N51I (N=163).	74
Tableau 15 : Corrélation entre la parasitémie et les mutations sur le gène <i>dhfr</i> à la position 59 (N=163)	75
Tableau 16 : Corrélation entre la parasitémie et l'apparition des mutations sur le gène <i>dhfr</i> à la position 108 (N=50).	75
Tableau 17 : Corrélation entre l'âge et les mutations sur le gène <i>dhps</i> à la position 436 (N=172)	76
Tableau 18 : Corrélation entre l'âge et les mutations sur le gène <i>dhps</i> à la position 437 (N=172)	76
Tableau 19 : Répartition des mutations sur le gène <i>dhfr</i> à la position 51 en fonction de l'âge (n=163)	77
Tableau 20 : Répartition des mutations sur le gène <i>dhfr</i> à la position 59 en fonction de l'âge (n=163)	77
Tableau 21 : Répartition des mutations sur le gène <i>dhfr</i> à la position 108 en fonction de l'âge	78
Tableau 22 : Evolution de l'apparition des mutations sur le gène <i>dhps</i> à la position 436 au cours de l'étude.	78
Tableau 23 : Evolution de l'apparition des mutations sur le gène <i>dhps</i> à la position 437 au cours de l'étude.	79
Tableau 24 : Evolution de la fréquence des mutations sur le gène <i>dhfr</i> à la position 51 au cours de l'étude. (N=163)	79
Tableau 25 : Evolution de la fréquence des mutations sur le gène <i>dhfr</i> à la position 59 au cours de l'étude.	80
Tableau 26 : Evolution de la fréquence des mutations sur le gène <i>dhfr</i> à la position 108 au cours de l'étude.	81
Tableau 27 : Evolution de la multiplicité de l'infection de 2012 à 2017	81
Tableau 28 : Evolution de la multiplicité de l'infection en fonction de l'âge des patients	82

Tableau 29 : Evolution de la multiplicité de l'infection en fonction de la parasitémie.....	82
Tableau 30 : Circulation des doubles mutations sur le gène <i>dhps</i> (N=172).....	83
Tableau 31 : Circulation des triples mutations sur le gène <i>dhfr</i> (N=50).	83
Tableau 32 : Circulation des quadruples mutations sur les gènes <i>dhps</i> et <i>dhfr</i> (N=163)	84
Tableau 33 : Circulation des quintuples mutations sur les gènes <i>dhps</i> et <i>dhfr</i> (N=50)	84

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Carte de répartition du paludisme dans le monde (OMS, 2016)	10
Figure 2 : Carte pourcentage de la population à risque protégé par PID ou ayant accès à une MII, Afrique subsaharienne, 2014.....	12
Figure 3 : Carte pourcentage des femmes ayant reçu un TPIP par nombre de doses, Afrique subsaharienne 2007- 2014	12
Figure 4 : Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'Homme et le moustique.....	21
Figure 5 : Schéma du mécanisme d'action des antipaludiques	25
Figure 6 : Structure chimique de la Sulfadoxine	26
Figure 7 : Structure chimique de la Pyriméthamine	27
Figure 8 : Structure chimique de la quinine.....	30
Figure 9 : Structure chimique de la Mefloquine	30
Figure 10 : Structure chimique de l'amodiaquine	31
Figure 11 : Structure chimique de l'artémisinine	31
Figure 12 : Structure chimique de l'artéméther et l'artésunate	32
Figure 13 : Structure chimique de la dihydroartémisinine, Artemimol.....	32
Figure 14 : Structure chimique de la luméfántrine	33
Figure 15 : Structure chimique de la primaquine	33
Figure 16 : Situation géographique de la commune rurale de Dioro au Mali	40
Figure 17 : Séquences des Tri peptides codant pour l'allèle K1 [32].....	50
Figure 18 : Séquences des Tri peptides codant pour l'allèle MAD20 [32]	50
Figure 19 : Séquences des Tri peptides codant pour l'allèle RO33 [32]	51
Figure 20 : Schéma de synthèse de la PCR Nichée <i>MSP1</i>	55
Figure 21 : Principe du HRM	59
Figure 22 : Principe de tracée des courbes de fusion.....	60
Figure 23 : Courbe de fusion d'un ADN normal et d'un ADN muté.....	60
Figure 24 : Dispositif du HRM au LBMA.....	61
Figure 25 : La température de fusion en fonction de la fluorescence au HRM.....	62
Figure 26 : Les courbes de fusion normalisées au HRM.....	62
Figure 27 : Pics de fusion au HRM.....	63
Figure 28 : Répartition des patients en fonction du genre (n=214).	64
Figure 29 : Répartition des patients par tranche d'âge (n=214).	65
Figure 30 : Répartition des patients par tranche de parasitémiés	67
Figure 31 : Image d'un gel de PCR <i>mSP1</i>	68
Figure 32 : Fréquence des allotypes de la <i>mSP1</i> chez les patients	69
Figure 33 : Pics de fusion de nos différentes souches après amplification du gène <i>dhps</i> aux positions 436/437.....	71
Figure 34 : Pics de fusion de nos différentes souches après amplification du gène <i>dhfr</i> aux positions 51 et 59.....	71
Figure 35 : Pics de fusion de nos différentes souches après amplification du gène <i>dhfr</i> à la position 108	72

LISTE DES EQUATIONS

Équation 1: Formule de calcul de la parasitémie	45
Équation 2: Formule de calcul du nombre d'hématies parasitées	45

Table des matières

1. INTRODUCTION	1
2. OBJECTIFS	5
2.1. Objectif Principal.....	5
2.2. Objectifs spécifiques	5
3. GENERALITES.....	6
3.1. Définition	6
3.2. Historique	8
3.3. Répartition géographique	9
3.3.1. Dans le Monde :.....	9
3.3.2. En Afrique	11
3.3.3. Au Mali	12
3.4. Biologie.....	14
3.4.1. Vecteur :.....	14
3.4.2. Systématique : [23].....	15
3.5. Agent pathogène.....	16
3.5.1. Systématique : [23].....	16
3.5.2. Les différentes espèces plasmodiales :.....	16
3.5.3. Cycle de vie des plasmodies :	18
3.6. Diagnostic Biologique	21
3.6.1. Diagnostic de présomption :.....	21
3.6.2. Diagnostic parasitologique : [27].....	21
3.6.3. Manifestation du paludisme : [14].....	23
3.7. Traitement du paludisme	24
3.7.1. Classification des antipaludiques : [27].....	24
3.7.2. Modes d'action des antipaludiques : [29]	29
3.7.3. Structure Chimique de quelques antipaludiques couramment utilisés en association [30].....	30
3.8. Politique de traitement	34
3.8.1. Traitement du paludisme simple à <i>Plasmodium falciparum</i> : [31]	34
3.8.2. Traitement du paludisme simple aux autres espèces plasmodiales : [31]	35
3.8.3. Traitement du paludisme grave [31]	35
3.9. Prophylaxie [27]	35
3.9.1. Lutte antivectorielle :.....	35
3.9.2. Chimio prophylaxie:	36
3.9.3. Résistance du <i>Plasmodium</i> aux antipaludiques :.....	38

4. METHODOLOGIE.....	40
4.1. Lieu d'étude.....	40
4.2. Période d'étude	41
4.3. Echantillonnage.....	41
4.3.1. Critères d'inclusion.....	41
4.3.2. Critères de non-inclusion	41
4.4. Interventions	42
4.4.1. Diagnostic du paludisme simple à <i>Plasmodium falciparum</i>	42
4.5. Prise de médicaments	45
4.6. Plan de suivi des patients.....	46
4.7. Traitement des échantillons	47
4.8. Le génotypage des échantillons.....	48
4.8.1. Extraction de l'ADN par le Chelex-100 à 5%	48
4.8.2. Mode opératoire.....	48
4.8.3. Amplification du gène <i>msp-1</i> par la PCR	49
4.8.4. Technique d'électrophorèse	55
4.9. Recherche des marqueurs de résistance	56
4.9.1. Réactifs HRM et matériels	57
4.9.2. PCR.....	57
4.9.3. High Resolution Melting HRM : Fusion à Haute Résolution	59
4.10. Considérations éthiques et déontologiques.....	63
4.11. Gestion des données :.....	64
5. RESULTATS.....	64
5.1. Facteurs démographiques	64
5.2. GENOTYPAGE.....	68
5.2.1. Polymorphisme de la <i>msp-1</i>	68
5.3. Mutations sur les gènes <i>dhfr</i> et <i>dhps</i>	70
5.4. Circulation des multiples mutations.....	83
5.4.1. Circulation des doubles mutations sur le gène <i>dhps</i> aux positions 436 et 437	83
5.4.2. Circulation des triples mutations sur le gène <i>dhfr</i> aux positions 51, 59 et 108	83
5.4.3. Circulation des quadruples mutations sur les gènes <i>dhps</i> et <i>dhfr</i>	84
5.4.4. Circulation des quintuples mutations sur les gènes <i>dhps</i> et <i>dhfr</i>	84
6. Commentaires et discussions	85
6.1. Lieu d'étude.....	85
6.2. Méthodologie	85
6.3. Résultats :	86

6.3.1. Facteurs démographiques :	86
6.3.2. Paramètres de polymorphisme génétique :	87
6.3.3. Les marqueurs de résistance à la SP :	88
7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	90
7.1. CONCLUSION	90
7.2. RECOMMANDATIONS	90
8. REFERENCES	92
9. ANNEXES	xxv

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie potentiellement mortelle due à des parasites du genre *Plasmodium*, transmis à l'Homme par des piqûres de l'Anophèle femelle appelés <<vecteur du paludisme>> [1].

Il existe plusieurs types de *Plasmodium* mais cinq (5) sont pathogènes pour l'Homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi* [1].

En Afrique, l'espèce *Plasmodium falciparum* est la plus répandue et la plus redoutable car elle est responsable de la plupart des cas de paludisme grave [1].

Selon les dernières estimations de l'OMS en 2017, il a été enregistré, en 2016, 216 millions de cas de paludisme (avec une marge d'incertitude comprise entre 196 millions et 263 millions) qui ont causé 445 000 décès [2].

La région Afrique supporte une part disproportionnée de la charge mondiale avec (90%) de cas, loin devant Asie du sud-Est (7%) et la région méditerranée orientale (2%) [2].

La plupart des cas de décès sont survenus dans la région Afrique (91%) de l'OMS loin devant la région Asie du sud-Est (6%). Par rapport à 2010, la mortalité liée au paludisme a diminué dans toutes les régions de l'OMS en 2016 sauf la région méditerranée où elle demeure quasiment inchangée. Les baisses les plus prononcées ont été observées dans les régions Asie du Sud (44%), Afrique (37%) et Amériques (27%) [2].

Les enfants de moins de 5 ans sont les plus exposés aux risques de développer des formes graves et compliquées du paludisme, les femmes enceintes en payent un lourd tribut [3].

En 2015 pour la première fois dans son histoire, la région Europe n'a signalé aucun cas de paludisme indigène [2].

Malgré les efforts consentis et renouvelés au Mali, le paludisme reste un problème majeur de santé publique.

En Afrique, des taux élevés de chloroquino-résistance dans certaines régions particulièrement au centre ont conduit certains pays comme le Malawi, la Tanzanie, et l'Afrique du Sud à l'utilisation de la SP comme traitement de première ligne.

Dans la plupart des pays d'endémie palustre, il existe un Programme National de Lutte contre le Paludisme qui édicte des directives pour le contrôle et la prise en charge des cas.

Le gouvernement du MALI s'est également engagé dans l'initiative Roll Back Malaria (faire reculer le paludisme) et a inclus dans ses objectifs de prévenir le paludisme chez au moins 60% des femmes enceintes avec les médicaments anti palustres et d'autres moyen de prévention aussi efficace tel que la lutte anti vectorielle qui passe par l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) et la pulvérisation des habitations avec les insecticides [4].

La chimio prévention du paludisme saisonnier par l'administration d'antipaludiques pendant la saison de haute transmission aux femmes enceintes et aux enfants de 3 à 59 mois adoptée par l'OMS a pour objectif de maintenir des concentrations thérapeutiques de médicaments antipaludiques dans le sang pendant la période où le risque de contracter le paludisme est plus élevé.

Des essais cliniques ont montré que la combinaison SP+AQ procurait une meilleure protection que d'autres associations médicamenteuses. L'utilisation de deux molécules en synergie limite le risque de sélection d'une résistance à la SP ou à l'AQ contrairement à l'utilisation de ces antipaludiques en monothérapie.

L'apparition de la résistance de *Plasmodium falciparum* a rendu plus difficile la lutte contre le paludisme. Ce phénomène a conduit plusieurs pays à modifier leurs politiques de lutte avec notamment le changement des médicaments de première intention [5].

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 [6].

La résistance aux médicaments en général, aux antipaludiques en particulier résulte de mutations spontanées qui ont pour effet de modifier la structure et l'activité, au niveau moléculaire, de la cible du médicament à l'intérieur du pathogène ou d'empêcher le médicament de parvenir à cette cible [7].

La résistance à la SP et d'autres antipaludiques a été notifiée depuis plusieurs années dans le monde et en Afrique en particulier [8].

Une forte réduction de la sensibilité à la SP a été mise en évidence dans le bassin de l'Amazone ainsi qu'un peu partout en Asie du sud-est, En Afrique le taux de résistance était variable, se situant dans une fourchette de 10 à 50% lors des essais d'efficacité thérapeutiques s'étendant sur 14 jours [7].

La résistance à la SP est actuellement un concept qui change relativement à certains paramètres. Dans les zones où la résistance à la SP est faible à modérée, ce médicament reste efficace aux fins de la prévention, même s'il n'est pas utile ou recommandé pour le traitement des cas cliniques. Son efficacité protectrice dépend de la demi-vie du principe actif et de la sensibilité du parasite à la SP. La résistance parasitaire à ce médicament sert donc de guide pour l'adoption des directives sur le TPIIn-SP [9].

La recommandation d'un seuil de prévalence de la mutation 540 du gène *Pfdhps* égal ou supérieur à 50% au-delà duquel l'utilisation du TPIIn n'est pas recommandée se fonde sur les éléments suivants :

La présence de mutations sur les codons 437 et 540 du gène *Pfdhps*, associée à une triple mutation du gène *Pfdhfr* (quintuple mutation) est un facteur prédictif significatif d'échec du traitement à la SP [10].

Le mutant *Pfdhps* 540 est un marqueur épidémiologique utile de la quintuple mutation en Afrique [3].

Un essai mené dans une zone de prévalence de la mutation 540 du gène *Pfdhps* d'environ 90% n'a pas mis en évidence d'effet protecteur démontrable du TPIIn-SP [9].

Ainsi des systèmes de surveillance ont été mis en place pour surveiller la sensibilité des espèces *Plasmodiales* aux antipaludiques [8].

Il existe diverses méthodes d'évaluations, 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* où le parasite est exposé à une concentration de médicament et indiquant la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀).

Enfin d'autres méthodes de biologie moléculaires telles que la recherche des points de mutation sur les gènes sont utilisées pour détecter les souches sauvages et les souches mutées.

Ce travail se base sur l'hypothèse qu'après l'utilisation massive de la SP comme TPI_n et TPI_g, il y a une possibilité d'augmentation considérable des mutations sur les gènes de *P. falciparum* codant pour la résistance du parasite à la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine.

C'est ainsi que nous avons conduit une étude dans la commune rurale de Dioro pour estimer la prévalence des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*, mutation qui peut être à l'origine de la non sensibilité des souches de *Plasmodium* à la SP.

OBJECTIFS

2. OBJECTIFS

2.1.Objectif Principal

Estimer la prévalence des allèles de résistance moléculaire à la SP de *Plasmodium falciparum* à partir d'isolats obtenus chez les enfants de 2 à 15 ans dans la commune rurale de DIORO.

2.2.Objectifs spécifiques

- Déterminer la multiplicité de l'infection.
- Estimer les fréquences des mutations ponctuelles.
- Déterminer les haplotypes de *Pfdhfr* et *Pfdhps* rencontrés.
- Analyser les caractéristiques épidémiologiques des enfants prélevés avec les marqueurs biologiques étudiés.

GENERALITES

3. GENERALITES

3.1. Définition

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).

P. falciparum dihydrofolate reductase (Pfdhfr) : ce gène situé sur un chromosome 4, code pour une enzyme intervenant dans la voie de synthèse des folates. Elle est la cible des médicaments anti-folates qui, en inhibant son activité enzymatique, entraînent le blocage de la synthèse des pyrimidines et la réplication de l'ADN parasitaire. L'accumulation de plusieurs mutations spécifiques au sein de cette protéine (codons 50N→R, 51C→I, 108S→N et 164I→L) entraînent la résistance clinique des parasites à l'action des anti-folates [11].

P. falciparum dihydroptéroate synthase (Pfdhps) : la *dihydroptéroate synthase dhps* est une enzyme intervenant dans la synthèse des folates (le gène correspondant est situé sur le chromosome 8). Elle est inhibée par les sulfamides. Les mutations se situant au niveau des codons 436 (S→A/F), 437 (K→G), 540 (K→E), 581 (A→G), 613 (A→S/T) confèrent une résistance à la sulfadoxine. L'analyse groupée des mutations au niveau des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* permet de prévoir l'efficacité clinique de l'association Sulfadoxine-Pyriméthamine, largement utilisée en Afrique chez la femme enceinte en traitement préventif TPI, traitement préventif intermittent ou en association avec l'artésunate en traitement curatif [11].

Le traitement préventif intermittent (TPI_n) consiste à délivrer une dose thérapeutique d'un médicament antipaludique aux nourrissons à des moments préétablis au cours de la première année de vie, que les enfants soient ou non infectés par *Plasmodium falciparum*. On applique une stratégie similaire pour la prévention du paludisme chez le jeune enfant et pendant la grossesse (TPI_g).

La recherche a montré que le TPI_n à la SP peut être désormais administré sans danger et avec efficacité aux moments de la vaccination. Actuellement la Sulfadoxine-Pyriméthamine est le

médicament recommandé pour les femmes enceintes (TPI_n-SP) comme pour les nourrissons (TPI_g-SP) [9].

Dans les zones où ce traitement est mis en vigueur, la SP est donnée à chaque enfant trois fois pendant la première année de vie, aux moments du PEV (programme élargi de vaccination), selon le calendrier suivant :

- Première dose (TPI-SP1) 8 à 10 semaines : Au moment de la vaccination DTC2/Penta2 (ou vaccin associant plusieurs antigènes).
- Deuxième dose (TPI-SP2) 12 à 14 semaines : Au moment de la vaccination DTC3/Penta3.
- Troisième dose (TPI-SP3) à partir de 9 mois : Au moment de la vaccination contre la rougeole.

Le traitement préventif intermittent chez les enfants (TPI_e) réduit la prévalence de l'infection palustre. La chimiothérapie du paludisme saisonnier (CPS) est recommandée chez les nourrissons de 3 à 11 mois et les enfants de 12 à 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.

Le TPI_g quant à lui, consiste à administrer au moins deux (2) doses de SP aux deuxième et troisième trimestres de la grossesse.

Avec moins de 1% de la population réagissant à la SP, les réactions indésirables aux TPI_n, TPI_e, TPI_g sont généralement rares. Les plus graves étant d'ordre dermatologique, précisément [9]:

- L'érythème multiforme
- Le syndrome de Stevens-Johnson (SSJ)
- La nécrolyse épidermique toxique

Néanmoins, la SP ne doit pas être administrée aux nourrissons recevant (ou ayant reçu au cours des quatre semaines précédentes) une médication à base de sulfamide, comme traitement ou en prophylaxie dont le cotrimoxazole couramment utilisé chez les nourrissons exposés au VIH ou infectés par ce virus, en prévention de la transmission mère-enfant (PTME).

Chez *P. falciparum*, la résistance à la Sulfadoxine–Pyriméthamine est essentiellement acquise à la suite de mutations ponctuelles successives au niveau de *dhfr* parasite, c'est à dire du gène codant pour la *dihydrofolate reductase (dhfr)*, qui constitue l'enzyme cible, ainsi que par d'autres mutations du *dhps*, gène qui code pour une autre enzyme la *dihydropteroate synthase (dhps)* [9].

Des mutations sur ces gènes ont été largement identifiées dans certains pays d'Afrique tels que : le Burkina Faso, le Niger, le Sénégal et la Tanzanie.

3.2. Historique

Le paludisme a sans doute accompagné l'Homme au cours de son expansion à la surface de la terre.

Cependant la plus part des antipaludiques utilisés de nos jours l'ont été de façon empirique. Ainsi la date de naissance exacte de ces molécules est difficile à préciser. Les Antifolates ne constituent pas une classe chimique homogène, ils se caractérisent par un même mode d'action : Inhibition de la synthèse de l'acide folique.

La découverte de l'activité bactérienne des sulfamides en 1936 par G. DOGMAGK et des sulfones par deux équipes indépendantes en 1937 a été le point de départ des antifolates. En effet, en 1937 Diaz De Léon a été le premier à signaler l'activité des sulfamides dans le traitement du paludisme, mais n'ont été reconnus qu'en thérapeutique qu'en 1943 comme inhibiteur compétitif de l'acide para amino benzoïque (PABA) [12].

Certains dérivés non spécifiques de la *dihydrofolate réductase (dhfr)* (Aminoptérine methotrexate ont vu le jour mais n'ont été utilisés qu'exceptionnellement dans le traitement du paludisme. En 1951 FERONE a démontré que les 2,4 diaminopyridine et le cycloguanil ont le même site d'action sur l'inhibition de la *dihydrofolate réductase*. Les sulfonamides agissent en amont de la chaîne de synthèse de l'acide folique par inhibition de la *dihydropteroate synthétase (dhps)*.

Cependant son historique peut se présenter en plusieurs étapes :

- en 400 ans avant JC, Hippocrate décrivait le paludisme du kyste hydatique en Grèce [13] ;
- en 1630 Don Francisco Lopez apprenait des Indiens du Pérou les vertus de l'écorce du quinquina [14]
- en 1820 Pelletier et Caventou isolent l'alcaloïde actif, la quinine [14] ;
- en 1830 Maillot utilise la quinine dans la campagne d'Algérie [14] ;

- en 1880 l'agent pathogène est découvert par Laveran à Constantine [14]
- en 1880 Marchiafana et Golgi décrivaient trois espèces de plasmodium parasite de l'Homme : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* [12] ;
- de 1895 à 1897, Ross suspecta la transmission de la maladie par le moustique du genre Anophèles avant que la confirmation ne soit faite par Grassi en 1898 [12] ;
- en 1943 la chloroquine, premier antipaludique de synthèse fut obtenue [7]
- en 1957 la chloroquine résistance est constatée en Asie et en Amérique du sud [7].
- en 1970 le Professeur Zhenxing Wei (Chine) réalisait un extrait de l'artémisinine [15];
- en 1977 un chercheur de l'entreprise pharmaceutique Guilin synthétisa l'artésunate [15] ;
- en 1978 le Professeur LiYin produisait pour la première fois l'artéméther [15] ;
- en 1979 en Afrique, la résistance à la chloroquine a été observée pour la première fois en Tanzanie [12] ;
- en 1992 la firme Rhône-poulenc aujourd'hui Aventisen accord avec l'OMS et l'usine pharmaceutique de Kunming produisirent de l'artéméther injectable [15] ;
- En 2001, en Asie du Sud-est, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine est suspectée [6];
- En 2006 au Cambodge, la résistance du *Plasmodium* à l'artémisinine a été identifiée pour la première fois [6].

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

3.3. Répartition géographique

3.3.1. Dans le Monde :

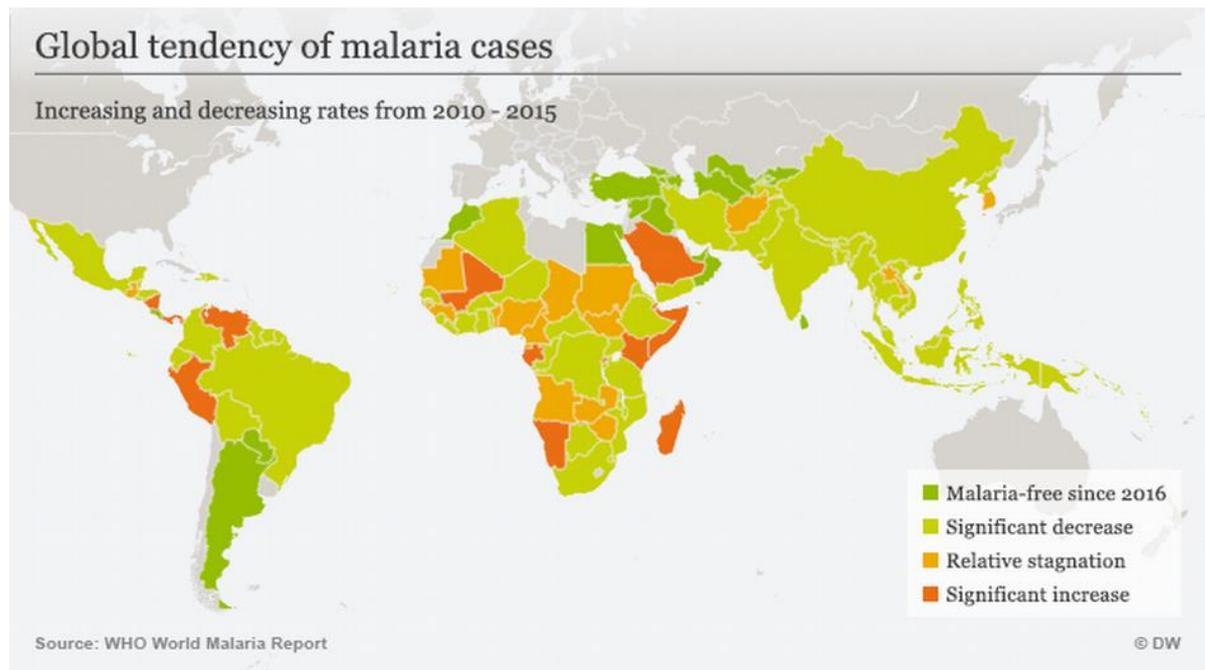


Figure 1 : Carte de répartition du paludisme dans le monde (OMS, 2016)

Source :

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

Malgré que le paludisme ne soit plus la première cause de mortalité infantile en Afrique [16], il reste cependant la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. Il est au premier rang des priorités de l'OMS pour ses ravages directs et pour ses conséquences socio-économiques. Selon l'OMS en 2016 près de la moitié de la population mondiale est exposée au paludisme [1].

La résistance aux médicaments antipaludiques a des répercussions considérables sur le contrôle du paludisme et la santé publique au niveau mondial.

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) [17]. La chloroquine est présentement retirée de la liste des médicaments pour la prise en charge du paludisme à *P.falciparum*.

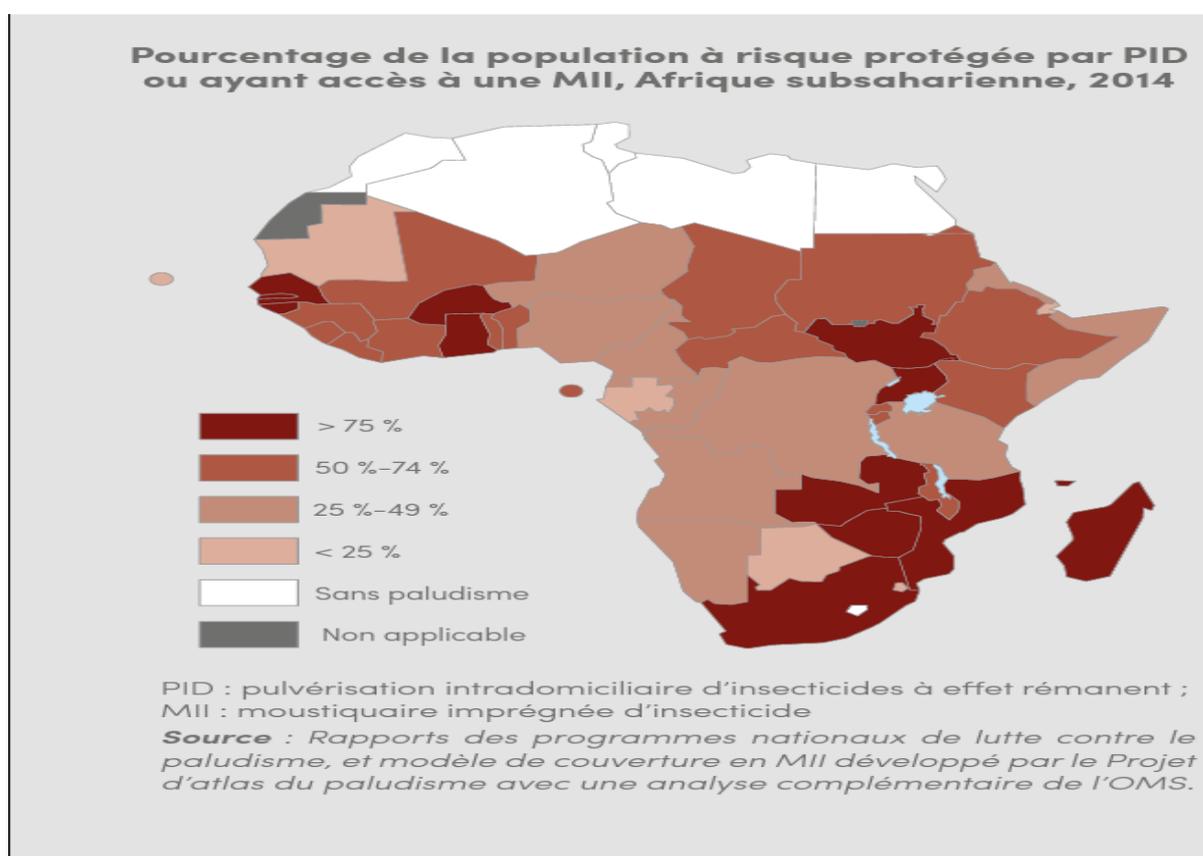
La résistance du parasite *P. falciparum* à l'artémisinine a été détectée dans cinq pays de la sous-région du Grand-Mékong. Malgré les changements observés en termes de sensibilité des parasites, les patients continuent de répondre aux combinaisons thérapeutiques, dans la

mesure où le médicament associé conserve son efficacité. L'artéméther-luméfantrine reste très efficace en Afrique et en Amérique du Sud, tout comme l'arteunate-amodiaquine en Afrique. L'artesunate-méfloquine requiert un suivi attentif en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud. L'efficacité de la dihydroartémisinine-pipéraquline est faible dans les régions où une résistance a été détectée. Pour le paludisme à *P. vivax*, l'échec du traitement par la chloroquine a été observé dans 24 pays [16].

3.3.2. En Afrique

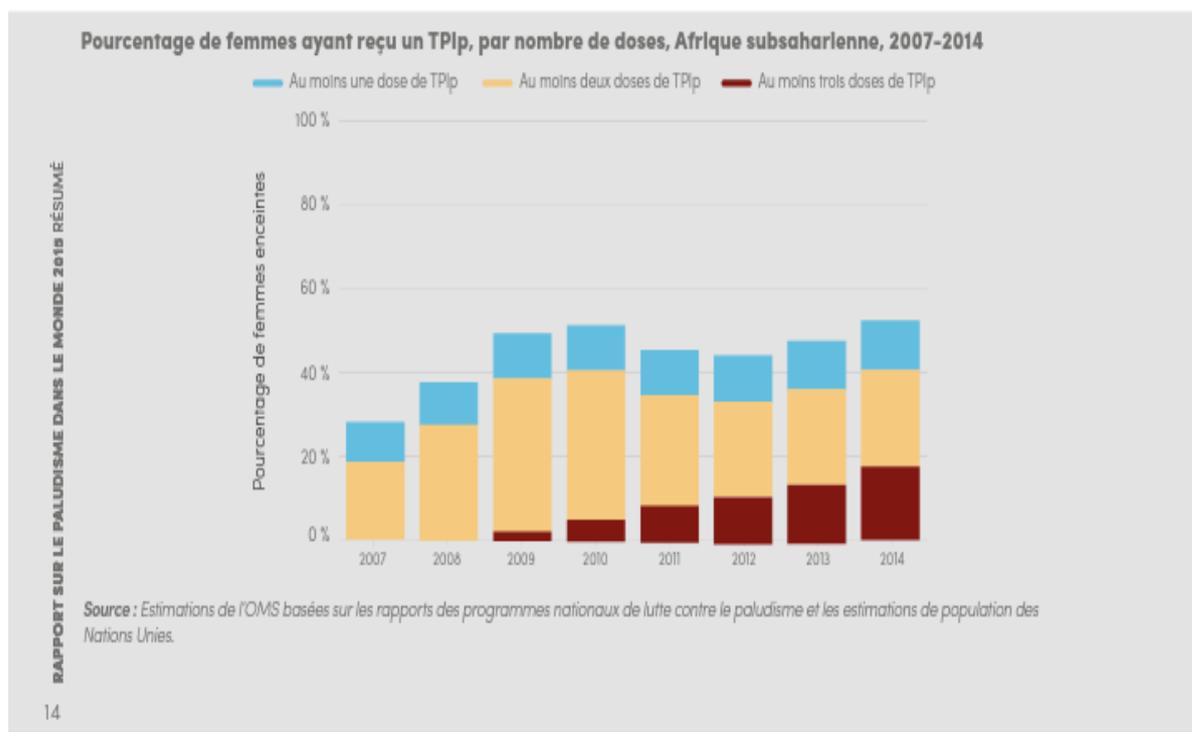
Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituent les groupes à risque.

La chimio prévention du paludisme saisonnier par l'administration d'antipaludiques pendant la saison de haute transmission aux femmes enceintes et aux enfants de 3 à 59 mois s'est avérée être une arme efficace dans l'arsenal de prévention contre le paludisme même si certains études en Afrique ont révélé des mutations sur les gènes du *P. falciparum* à la SP [18].



Source : rapports des programmes nationaux de lutte contre le paludisme, et modèle de couverture en MII développé par le projet d'atlas du paludisme avec une analyse complémentaire de l'OMS : www.who.int/report-2016.

Figure 2 : Carte pourcentage de la population à risque protégé par PID ou ayant accès à une MII, Afrique subsaharienne, 2014



Source : Estimations de l'OMS bases sur les rapports des programmes nationaux de lutte contre le paludisme et les estimations des populations des nations unies : www.who.int/report-2016.

Figure 3 : Carte pourcentage des femmes ayant reçu un TPIP par nombre de doses, Afrique subsaharienne 2007- 2014

Actuellement, aucun cas de résistance à l'artémisinine et ses dérivés n'a été confirmé en Afrique [19]. Cependant, une réduction de la sensibilité à l'artémisinine est présente dans certaines zones endémiques en Afrique [20].

Beaucoup d'études sur l'efficacité des CTAs sont en cours dans la plupart des zones endémiques. De nos jours, aucun cas de mutation K13 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 [6].

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.

Tableau 1: Les différents faciès de transmission du paludisme au Mali [21].

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

La chloroquinorésistance a été rapportée depuis les années 1990, ce qui a conduit en 2006 au retrait de la chloroquine dans le traitement du paludisme à *P.falciparum*.

Au Mali, l'état est fidèle à sa campagne d'exécution de la CPS et cela contribue fortement à une baisse considérable du nombre de cas de paludisme chez les enfants et les femmes enceintes.

3.4. Biologie

Le paludisme est dû à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques *Anopheles* infectés, appelés «vecteurs du paludisme», qui piquent principalement entre le crépuscule et le petit matin [1].

3.4.1. Vecteur :

Le paludisme est transmis exclusivement par les piqûres de moustiques *Anophèles*. Parmi plus de 500 espèces d'*Anophèles* reconnues à ce jour, 41 sont des vecteurs majeurs du paludisme, dont le plus grand nombre (39%) se trouve en Asie du Sud-Est, alors que les vecteurs les plus compétents, *An. gambiae* et *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 [22].

Toutes les espèces importantes de vecteurs piquent la nuit.

Les *Anophèles* se reproduisent dans l'eau et chaque espèce a ses préférences ; certaines par exemple préfèrent l'eau douce de faible profondeur comme les flaques, les rizières et les empreintes laissées par les sabots d'animaux.

La transmission est plus intense aux endroits où les espèces de vecteurs ont une durée de vie relativement longue (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 [23].

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*, celui-ci est composée de 3 formes chromosomiques dénommées Bamako, Savane et Mopti. La forme

Mopti se rencontre fréquemment dans les zones d'inondation du fleuve Niger, elle coexiste avec la forme Bamako dans les régions humides du sud, avec des fréquences faibles. La forme Savane se rencontre dans les zones du sud et du centre.

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 succède 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 [24].

3.4.2. Systématique : [23]

Il existe plus de 3 500 espèces répertoriées à ce jour au sein de la famille des Culicidae qui regroupent 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, Cella, Nyssorhynchus, Kerteszia	

3.5. Agent pathogène

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

3.5.1. Systématique : [23]

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

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

3.5.2. 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 avéré 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 [14].

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

➤ ***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 [14].

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

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

➤ ***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) [14].

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 les 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 [14].

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.

➤ ***Plasmodium knowlesi* [25] :**

Découvert en 1930 chez un macaque.

En 1965 premier cas de transmission naturelle à l'Homme Malaisie/ CDC Atlanta.

Les formes âgées ressemblent à *P. malariae* et les formes jeunes ressemblent beaucoup plus à *P. falciparum*.

Cycle érythrocytaire de 24 heures et pas d'hypnozoïte dans le foie.

3.5.3. Cycle de vie des plasmodies :

Le cycle de développement du *plasmodium* nécessite deux hôtes obligatoires : l'Homme et le moustique. Chez l'Homme s'effectue la multiplication asexuée ou schizogonie. Chez l'anophèle femelle s'effectue le cycle sexué ou sporogonie [14].

Chez l'Homme : [21] ; [26]

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* où 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 corpsenrosace 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 intra érythrocytaire. Au cours de la multiplication dans les hématies, le parasite va produire au dépend de l'hémoglobine un pigment appelé l'hémozoiné. 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 corpsenrosace 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 : [21] ;[26]**

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 exflagellation 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.

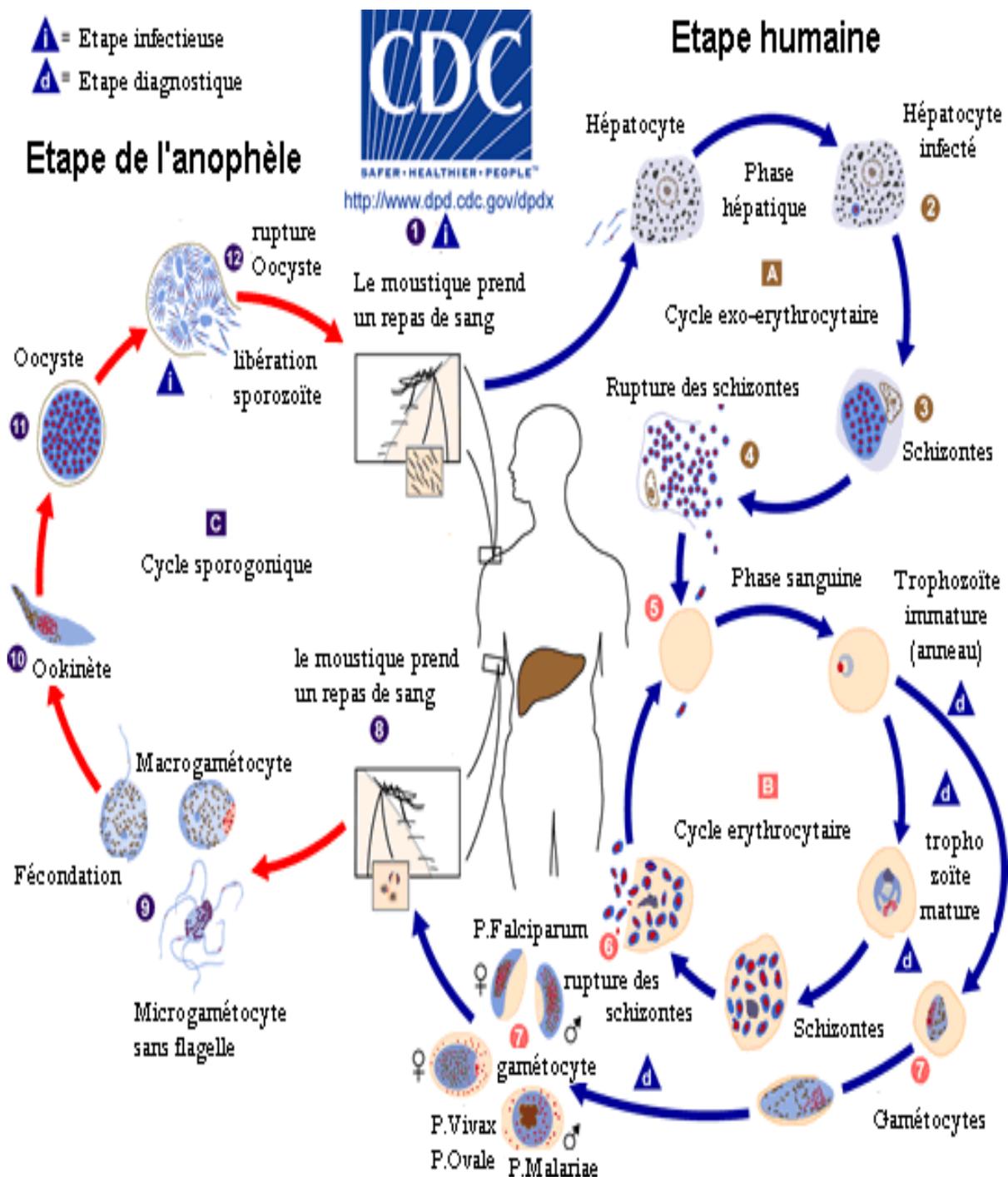


Figure 4 : Cycle biologique des espèces plasmodiales chez l'Homme et le moustique

3.6. Diagnostic Biologique

3.6.1. 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 pernicleux, 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 [26]

3.6.2. Diagnostic parasitologique : [27]

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

Toutes ces techniques sont des méthodes de diagnostic direct.

3.6.2.1. Le frottis mince et la goutte épaisse:

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

➤ **Le frottis mince** permet :

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

➤ **La goutte épaisse** :

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

3.6.2.2. Quantitative Buffy-coat :

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

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

3.6.2.3. Diagnostic immunologique : ELISA et IFI

Ces méthodes constituent le diagnostic indirect du paludisme.

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

Quant au principe d'ELISA, il consiste à fixer sur un support solide des éléments contenus dans le liquide biologique. Ensuite, les antigènes solubles sont détectés à l'aide d'un complexe immun marqué par l'enzyme, et sera révélé par addition d'un substrat spécifique de l'enzyme. Ces techniques apportent des informations précieuses qui permettent de confirmer le paludisme, lorsque la parasitémie a été réduite par exemple par un traitement anti palustre. Elles permettent également de suivre la guérison par la décroissance du taux des anticorps, et ont aussi un intérêt en zone d'endémie.

Le diagnostic immunologique ne peut remplacer le diagnostic parasitologique direct, du fait que les anticorps apparaissent avec un retard de plusieurs jours sur la parasitémie et disparaissent plutard. Ne peuvent être utilisés pour un diagnostic de routine, mais surtout plus à des fin de recherches [28].

3.6.2.4. Les tests rapides de diagnostic: TDR

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

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

espèces plasmodiales. La sensibilité et la spécificité revendiquées par les constructeurs de ces tests sont comparables.

La forme la plus simple est celle d'une bandelette qui est placée dans des puits contenant du sang et/ou une solution tampon. La bandelette de nitrocellulose peut être placée dans une cassette en plastique ou sur une carte. Les tests rapides antigéniques sont simples d'utilisation, rapides et d'un apport précieux en poste isolé. Cependant, les tests rapides ont des limites :

- les faux négatifs sont dus à une faible parasitémie de l'ordre de 100 parasites par μL ,
- soit 0,002% d'hématies infectées. Or, il est fréquent de mettre en évidence en pathologie d'importation ou chez le voyageur non immun en zone d'endémie sous chimioprophylaxie non ou mal adaptée des parasitémies très faibles. Le résultat des TDR peut donc être faussement négatif.
- les faux positifs, moins bien connus, sont dus à une lecture trop tardive après le dépôt des réactifs, à la présence d'auto anticorps ou de facteur rhumatoïde à des taux élevés. De plus, la persistance de la circulation de *l'HRP2* après disparition des parasites du sang circulant est trouvée jusqu'à 15 jours après négativité des tests microscopiques.

Ces tests ne doivent pas être employés seuls.

3.6.2.5. La Polymerase Chain Reaction (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.

3.6.3. Manifestation du paludisme : [14]

3.6.3.1. La forme "classique":

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

3.6.3.2. Accès pernicieux:

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

3.6.3.3. Fièvre bilieuse hémoglobinurique :

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

3.6.3.4. Rechute:

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

3.7. 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 : [27]

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

En fonction du mode d'action, les antipaludiques peuvent être classés en deux groupes : Les SCHIZONTICIDES qui sont actives sur les formes endoérythrocytaires asexuées et les GAMETOCYTOCIDES qui sont actifs sur les formes sexuées et hépatocytaires.

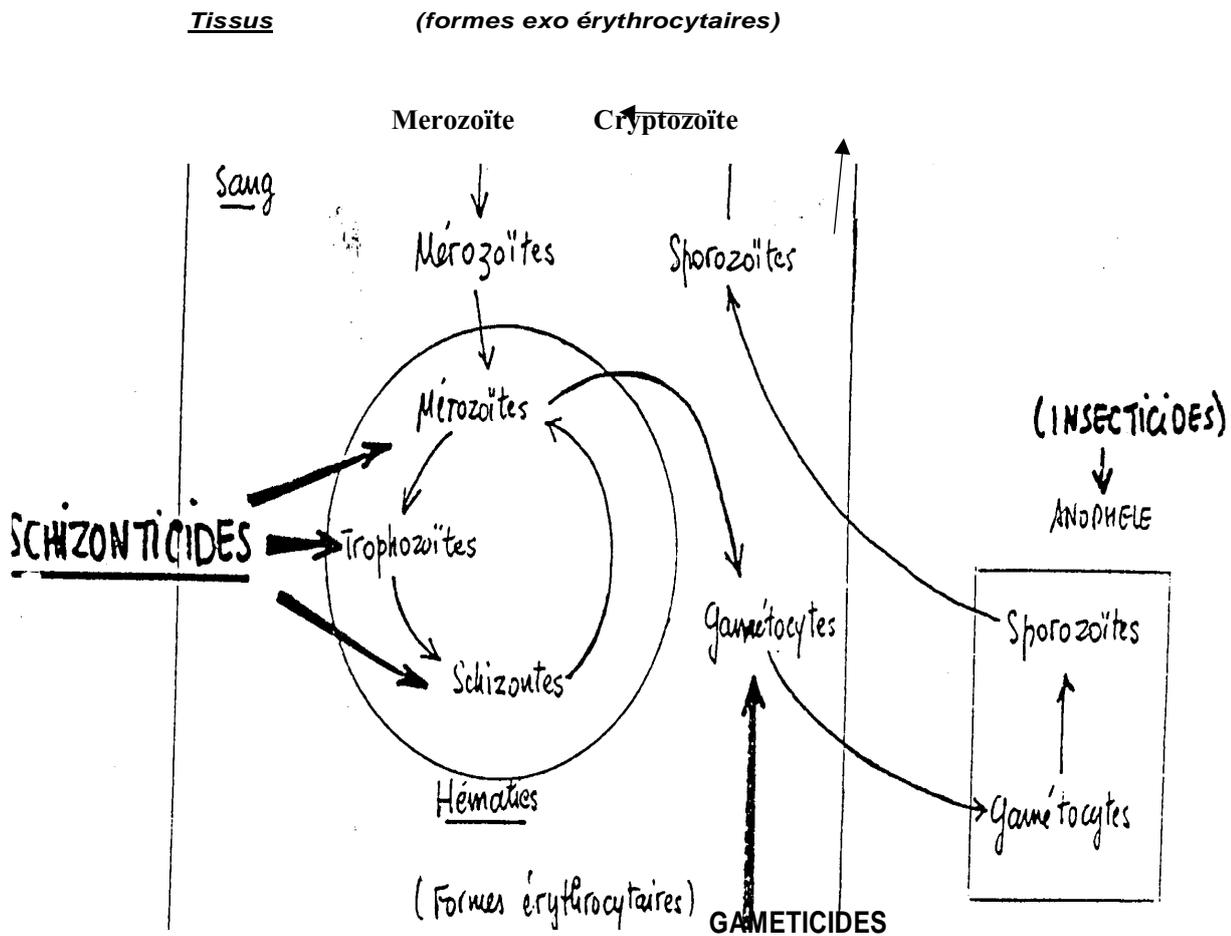


Figure 5 : Schéma du mécanisme d'action des antipaludiques

Source : www.kenya.net/fmpos/theses/2016/pharma/pdf/16P05.pdf

3.7.1.1.SCHIZONTICIDES

Actives sur les endoérythrocytaires asexués, on peut les classer en 4 catégories selon leur origine.

3.7.1.1.1. Les schizontocides de synthèse:

- Les sulfonamides : Sulfadoxine :

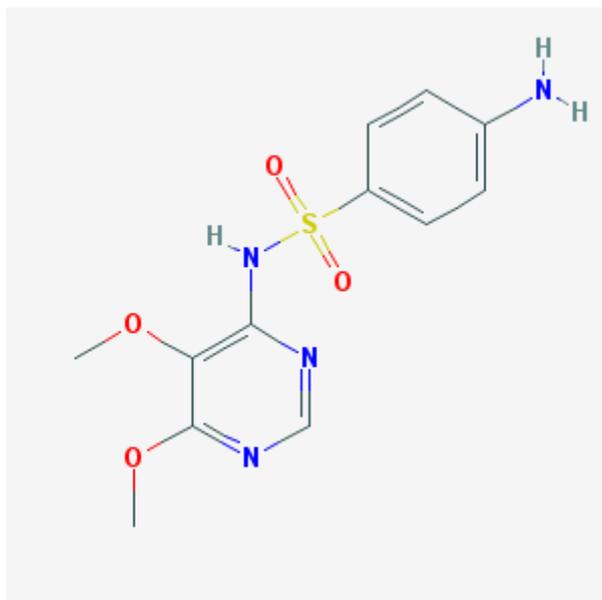


Figure 6 : Structure chimique de la Sulfadoxine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17134#section=2D-Structure>

- Élément de pharmacologie

Actuellement les sulfamides à longue demi-vie (sulfadoxine dans FANAZIL et sulfalène dans KELFINE) sont les plus utilisés, surtout associé à un antifolique. La sulfadoxine a une bonne absorption, une demi-vie d'élimination plasmatique de 7 à 8 jours.

Les sulfamides retard sont presque totalement absorbés puis ils se fixent partiellement sur les protéines plasmatiques. Une prise orale de 1500mg, donne au bout de 3 heures un taux plasmatique de 15 à 20mg. Ce taux décroît lentement avec une demi-vie de 120 à 180 heures pour la sulfadoxine. Ce taux sérique est maintenu pendant une semaine, cependant on note des variations individuelles qui paraissent dépendre de l'acétylation rapide ou lente.

L'élimination se fait après acétylation hépatique par les urines, en grande partie (80%) sous forme libre et le reste sous forme acétylée ou glucuronoconjuguée.

Son activité sur les schizontes érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* est bonne, quelques fois peu lente, mais nulle sur *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*. La tolérance est bonne, cependant elle détermine des allergies cutanées limitées à un simple érythème dans la plupart des cas, mais parfois s'étendant aux toxidermies bulleuses graves (syndrome de Lyell ou de Stevens Jonson) engageant le pronostic vital. Les manifestations graves surviennent un cas pour 5000 traitements après prises répétées et on déplore 1 mort pour 20000 lors d'utilisation prophylactique.

Autres familles : les sulfones (Promine, Dapsone).

Dans ce groupe on retient également la Sulfalène et la Sulfométhoxazole.

➤ **Les diaminopyrimidiques : la Pyriméthamine**

- **Structure :**

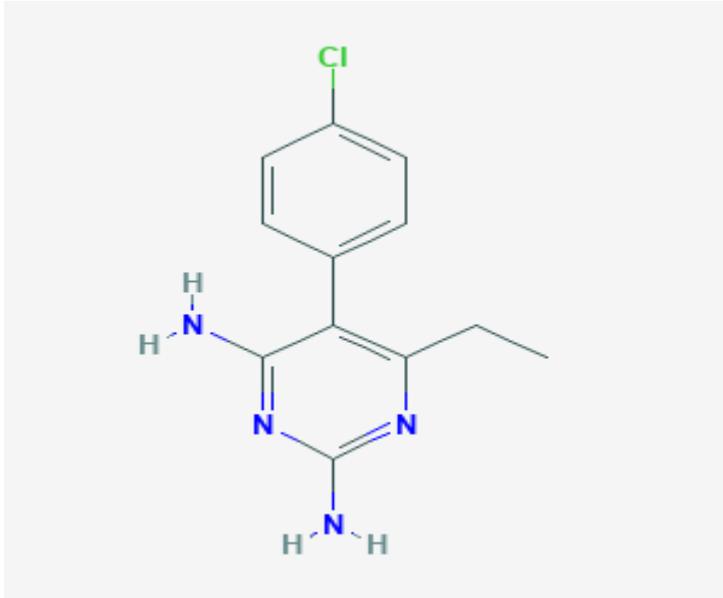


Figure 7 : Structure chimique de la Pyriméthamine

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4993#section=2D-Structure>

- **Éléments pharmacologiques :**

La pyriméthamine est un schizontocide sanguin d'action lente et un sporotocide.

Mais elle est sans action sur les formes intra-hepatiques. Cependant son activité schizonticide est plus marquée que celle du proguanil, parce qu'il agit directement et non par l'intermédiaire d'un métabolite. Elle est active également sur *Toxoplasma gondii* et *Pneumocystis carinii*. A la différence du triméthoprime elle n'a pas de propriétés antibactériennes.

Une prise unique de 100mg donne un taux plasmatique d'environ 0,60ng/ml à la 24ème heure et des traces 30 jours après.

Elle est bien absorbée avec un pic plasmatique obtenu 2 à 3 heures après l'administration une demi-vie longue de 4 à 5 jours. Son efficacité sur les schizontes érythrocytaires des plasmodies est lente mais bonne.

Le taux plasmatique efficace sur les souches sensibles est de 10 ug/ml.

Cette concentration est présente dans le sérum pendant environ 15 jours. Elle a une cinétique voisine de celle des sulfamides retard, il apparaît donc licite de les associer.

La pyriméthamine est généralement bien tolérée aux doses préconisées en prophylaxie en raison de 25 à 50mg par semaine chez l'adulte. Cependant lors de l'administration prolongée, chez les enfants malnutris, des anémies mégalo-blastiques peuvent être observées.

Chez la femme enceinte le risque d'anémie est très important. L'élimination très prolongée se fait par voie urinaire et fécale sous forme métabolisée. La pyriméthamine passe dans le lait maternel et traverse la barrière placentaire. Les dérivés les plus intéressants sont la METOPRIME et TRIMETHOPRIME qui sont plutôt des antibactériens que des antimalariques.

Autres familles : les quinazolines : WR158122, les triazines : cycloguanil

- **Amino 4-Quinoleine** : chloroquine et Amodiaquine
- **Aryl amino alcools** : Luméfantrine, Mefloquine et Halofantrine

3.7.1.1.2. Les schizontocides hémisynthétique :

- **Artémether** :
- **Artésunate** :
- **Artéether** :

3.7.1.1.3. Les schizontocides naturels

- **Alcaloïdes du quinquina** : Quinine
- **Sesquiterpènes lactoniques de *Artemisia annua*** : Artémésinine

3.7.1.1.4. Les schizontocides Antibiotiques :

- **Macrolides** : Erythromycine, Spiramycine et la Clindamycine
- **Cyclines** : Doxycycline et la Tétracyclines

3.7.1.2. GAMETOCYTOCIDES

Actifs sur les formes sexuées et hépatocytaires.

- **Dérivés de l'Artémisinine**: DHA, Artésunate, Artémether, Artéether
- **Amino-8-quinoléines** : Primaquine, Tafénoquine (*en cours de développement*)

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

3.7.2. Modes d'action des antipaludiques : [29]

3.7.2.1. Blocage de la fabrication des acides nucléiques

- **Cytochrome bc** → baisse d'ATP : atovaquone
- **Inhibition de la *dhps*** : sulfadoxine, dapsone (antifoliques)

La sulfadoxine est un antifolique inhibant la *dihydroptéroate synthase* « *dhps* » par compétition avec son substrat, l'acide para-amino-benzoïque (PABA). Il est inactif sur les gamétocytes et les formes pré érythrocytaires, peu actif sur les trophozoites, modérément actifs sur les schizontes érythrocytaires. Son rôle essentiel est la potentialisation des antifoliques, notamment de la pyriméthamine (qui est un antifolique d'action lente, inhibant la *dihydrofolate réductase* « *dhfr* »).

- **Inhibition de la *dhfr*** : pyriméthamine, cycloguanil (antifoliques)

C'est un schizontocide sanguin avec un mode d'action antimétabolique. La pyriméthamine a une action gaméticide vis à vis de *Plasmodium vivax*. Elle s'est montrée la plus intéressante parmi toutes les Diaminopyrimidines utilisées. Elle est la plus efficace des inhibiteurs de la *dihydrofolate réductase* utilisable. Un produit voisin, le triméthoprime s'est révélé surtout être un antibactérien et n'est pas retenu comme un antipaludique.

3.7.2.2. Inhibition de la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive du *plasmodium*

- Chloroquine, amodiaquine, pipéraquine

Quinine, méfloquine, halofantrine, luméfantrine

3.7.2.3. Alkylation des métabolites de l'hémoglobine, production de radicaux libres :

- artémisinines et dérivés

3.7.3. Structure Chimique de quelques antipaludiques couramment utilisés en association [30]

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

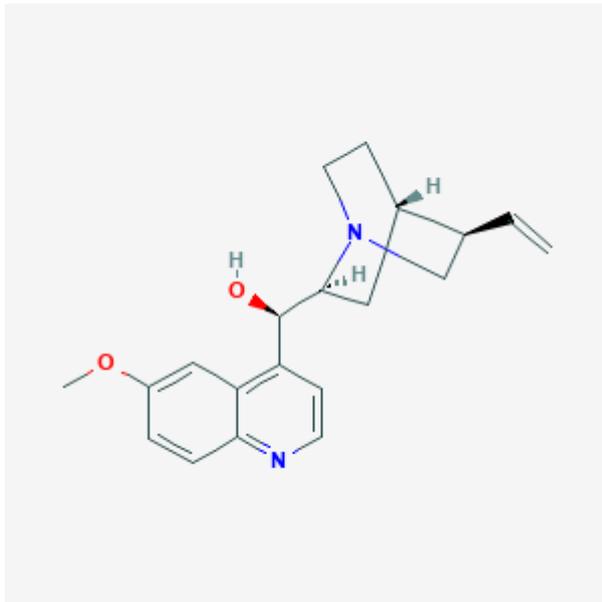


Figure 8 : Structure chimique de la quinine

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

- Méfloquine :

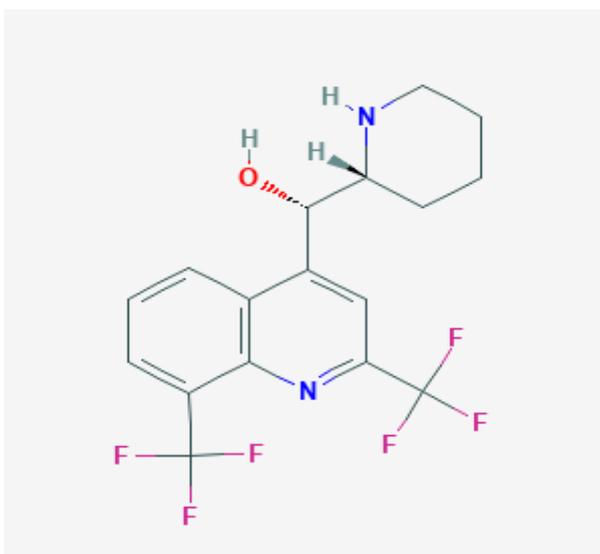


Figure 9 : Structure chimique de la Mefloquine

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

➤ **Amodiaquine :**

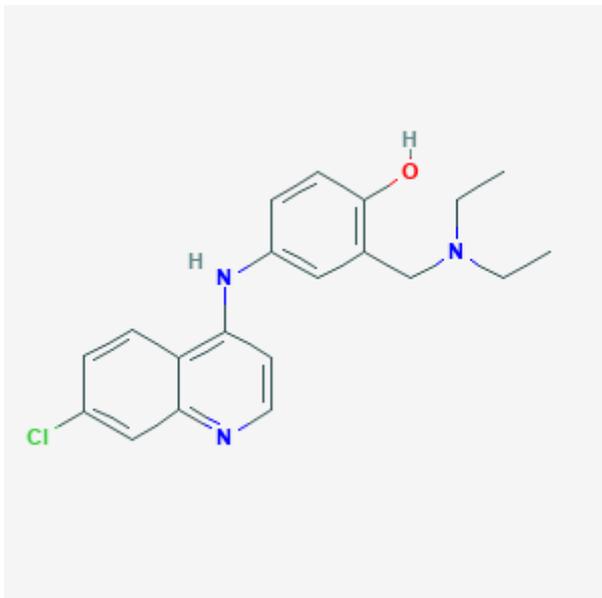


Figure 10 : Structure chimique de l'amodiaquine

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

➤ **Dérivés de l'artémisinine :** artéméther, artésunate, dihydroartémisinine

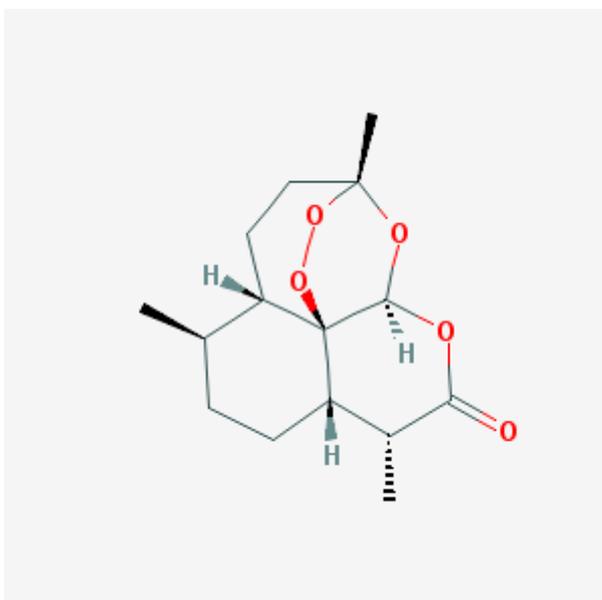


Figure 11 : Structure chimique de l'artémisinine

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

➤ **Artéméther et Artésunate**

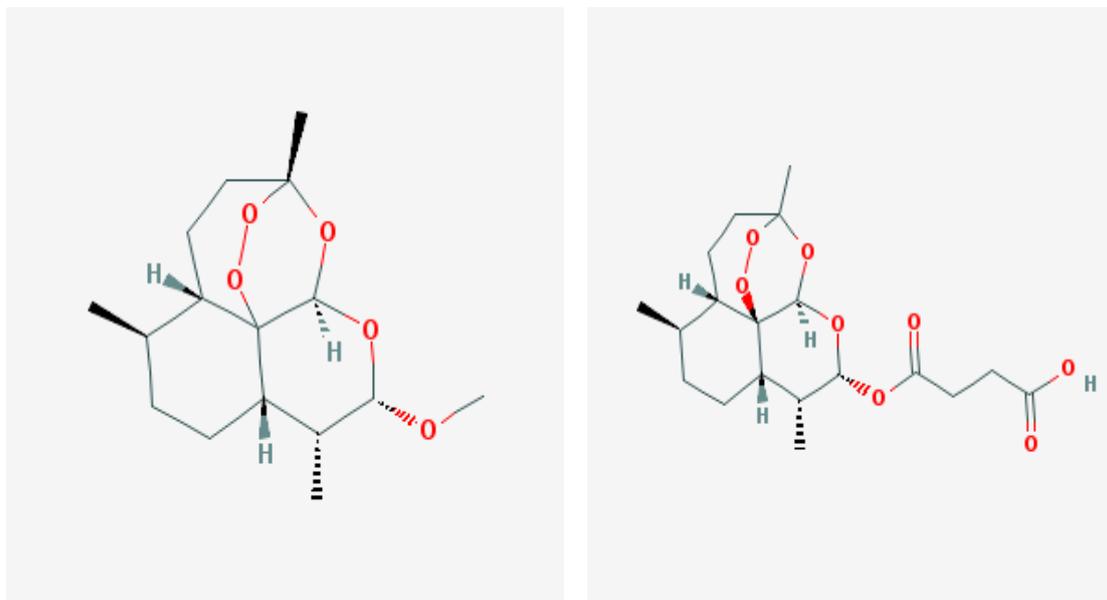


Figure 12 : Structure chimique de l'artéméther et l'artésunate

Source : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/45357887#section=2D-Structure>

➤ **dihydroartémisinine, Artenimol**

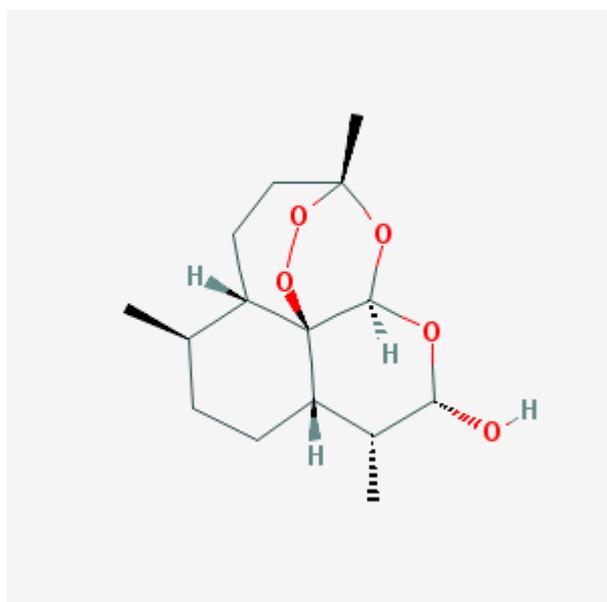


Figure 13 : Structure chimique de la dihydroartémisinine, Artenimol

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

➤ **La Luméfantrine :**

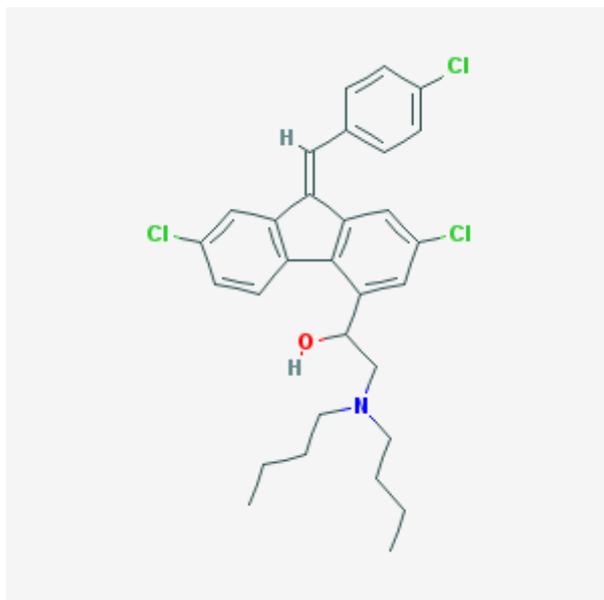


Figure 14 : Structure chimique de la luméfantrine

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

➤ **La Primaquine (Primaquine®) :**

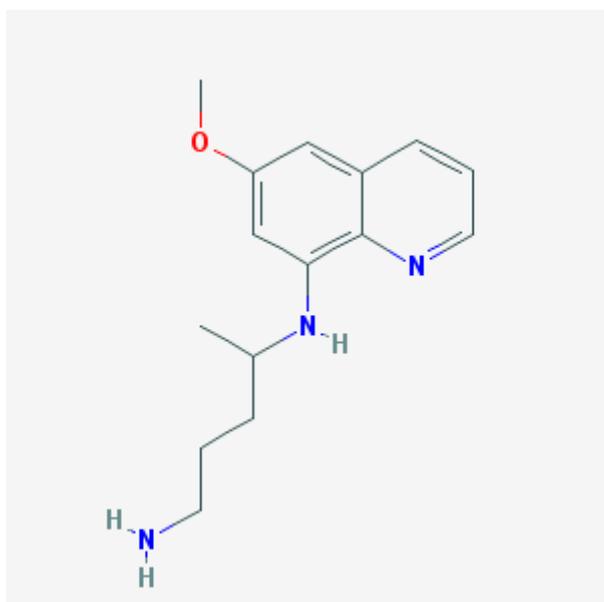


Figure 15 : Structure chimique de la primaquine

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

3.8. Politique de traitement

On entend par politique de traitement un ensemble de recommandations et de réglementations relatives à la disponibilité et à l'utilisation rationnelle des antipaludiques dans un pays donné. Elle doit s'inscrire dans la politique nationale relative aux médicaments essentiels et à la lutte contre le paludisme, en conformité avec la politique générale adoptée par le pays dans le domaine de la santé [7].

La lutte anti vectorielle qui passe par l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) et la pulvérisation d'insecticides à l'intérieur des habitations (PID), l'adoption de la chimio prévention chez les enfants et les femmes enceintes et le traitement par des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) constituent la pierre angulaire de la stratégie technique édictée par l'OMS et la communauté antipaludiques qui ont pour objectif de créer un monde sans paludisme.

Les CTAs constituent désormais le meilleur traitement contre le paludisme simple à *P.falciparum* [31].

3.8.1. Traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* : [31]

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

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

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

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

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

Chez les nourrissons de moins de cinq (05) kilogrammes, le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* se fait avec les CTAs avec les mêmes dosages que chez les enfants.

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

- Artesunate + SP si le patient est traité avec du Cotrimoxazole (triméthoprime plus sulfaméthoxazole) ;
- 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 : [31]

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 [31]

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, puis compléter le traitement par la voie orale pendant 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'artéméthér injectable à la quinine dans les cas de paludisme grave chez l'enfant et l'adulte.

3.9. Prophylaxie [27]

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 aspersions 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. Cependant 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 (2) 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 durant tout le séjour et après le retour pendant une durée variant avec l'antipaludique.

➤ Schéma prophylactique pour l'adulte suivant les groupes 1, 2 ou 3 :

- **Pays du groupe 1** : chloroquine (Nivaquine®) 100 mg/j, séjour + 4 semaines après,
- **Pays du groupe 2** : association chloroquine (100 mg/j) + proguanil (200 mg/j) (Savarine®) 1 comprimé par jour, séjour + 4 semaines après; ou association atovaquone + proguanil (Malarone®) : dose chez les sujets de plus de 40 kg : 1 comprimé adulte (250 mg/100 mg) par jour, séjour + une semaine après.
- **Pays du groupe 3** : trois choix sont possibles :
 - ✓ **choix n°1** : Lariam®, comprimés à 250 mg, 1 comprimé par semaine, 10 jours avant + séjour + 3 semaines après,
 - ✓ **choix n°2** : Malarone® : même dose que pour les pays du groupe 2, séjour + une semaine après,
 - ✓ **choix n°3** : doxycycline (Doxypalu®, Granulodoxyl®Gé), comprimés à 100 et 50 mg: 100 mg chez l'adulte et chez l'enfant de plus de 8 ans ou pesant plus de 40 kg, 50 mg chez l'enfant de plus de 8 ans pesant moins de 40 kg, séjour+ 4 semaines après.

➤ Schéma prophylactique chez la femme enceinte suivant les groupes 1, 2 ou 3 :

- **pays du groupe 1** : Nivaquine®
- **pays du groupe 2** : Savarine® ou Malarone®,
- **pays du groupe 3** : séjour déconseillé, si séjour indispensable : Lariam® ou Malarone®

➤ **Schéma prophylactique Nivaquine chez l'enfant**

- **pays du groupe 1** : Nivaquine®
- **pays du groupe 2** : association chloroquine (Nivaquine®) 1,5 mg/kg/j + proguanil (Paludrine®) 3 mg/kg/j (la Savarine® n'étant prescrite qu'à partir de 15 ans) ou Malarone®, comprimé enfant (62,5 mg/25 mg) suivant poids : 1 cp/j de 11 à 20 kg, 2 cp/j de 21 à 30 kg, 3 cp/j de 31 à 40 kg à heure fixe et en prise unique.
- **pays du groupe 3** : si poids > 15 kg ou âge > 3 ans : Lariam®; alternative : doxycycline si > 8 ans ou Malarone® si poids entre 11 kg et 40 kg : de 11 à 20 kg 1cp/j, de 21 à 30 kg : 2cp/j, de 31 à 40 kg : 3 cp/j. Si enfant < 11 kg, ½ cp/j de 5 < 7 kg (hors AMM), ¾ cp/j de 7 < 11kg (hors AMM).

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

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

Le traitement préventif intermittent (TPIp) consiste à l'administration intermittente et systématique d'antipaludiques : amodiaquine ou sulfadoxine-pyriméthamine (SP) chez les femmes enceintes à titre prophylactique. La chimioprophylaxie est recommandée par l'OMS pendant la grossesse, associée aux moustiquaires imprégnées, dans les zones de haute transmission d'endémie palustre. La SP est utilisée préférentiellement lors des visites prénatales (femmes enceintes ayant plus de 16 semaines d'aménorrhée). Il faut prescrire deux doses de TPIp séparées d'au moins un mois, 3ème dose si la femme enceinte est séropositive, trois comprimés de SP en prise unique.

Le traitement préventif intermittent chez les enfants (TPIe) réduit la prévalence de l'infection palustre. La 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 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.

3.9.3. Résistance du *Plasmodium* aux antipaludiques :

La résistance aux médicaments antipaludiques a des répercussions considérables sur le contrôle du paludisme et la santé publique au niveau mondial.

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 [6].

3.9.3.1. Le temps de clairance parasitaire comme paramètre de contrôle des CTAs

Le contrôle de routine de l'efficacité thérapeutique des CTAs 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 CTAs. L'OMS recommande un monitoring récurrent de l'efficacité

des CTAs dans les pays endémiques à *P. falciparum*. Les résultats de ces études d'efficacité thérapeutique des CTAs 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 CTAs.
- 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 [6] :

- Résistance suspecte à l'artémisinine : une haute prévalence des phénotypes à clairance parasitaire retardée ou une haute prévalence des mutants K13 [6].
- Résistance à l'artémisinine confirmée : une combinaison de la clairance parasitaire retardée et de mutations K13 chez le même patient [6].

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

3.9.3.2. La détection de la quintuple mutation comme paramètre de contrôle des SP

La présence de mutations sur les codons 437 et 540 du gène *Pfdhps*, associée à une triple mutation du gène *Pfdhfr* (quintuple mutation) est un facteur prédictif significatif d'échec du traitement à la SP. Le mutant *Pfdhps* 540 est un marqueur épidémiologique utile de la quintuple mutation en Afrique [9].

3.9.3.3. La détection de la double mutation comme paramètre de contrôle de l'amodiaquine

Des rapports récents ont montré qu'une double mutation *Pfcr1* et *Pfmdr1* est un bon marqueur de résistance à l'AQ [9].

METHODOLOGIE

4. METHODOLOGIE

Nos échantillons ont été collectés lors d'une étude portant sur l'efficacité du Coartem dans le traitement du paludisme.

4.1. Lieu d'étude

L'étude s'est déroulée dans la commune rurale de Dioro qui relève du District sanitaire de Markala dans la région de Ségou. Dioro est une commune rurale située dans une zone inondée à vocation rizicole et peuplée de 47.836 habitants. Cette situation géographique favorise le paludisme par millier de cas surtout pendant la saison pluvieuse. Le paludisme touche pratiquement toutes les couches de la société, mais les enfants sont les plus touchés pour multiples raisons.

La commune rurale de Dioro dispose d'un CSCom bien doté (en ressources matérielles et humaines) et accessible pour tous les villages environnants.

Le CSCom dispose d'un laboratoire équipé dont les capacités ont été renforcées par le LBMA dans le cadre de l'exécution du programme ICEMR en Afrique de l'Ouest.

Ces caractéristiques font de Dioro un des sites qui répondent les mieux à nos attentes dans cette étude.

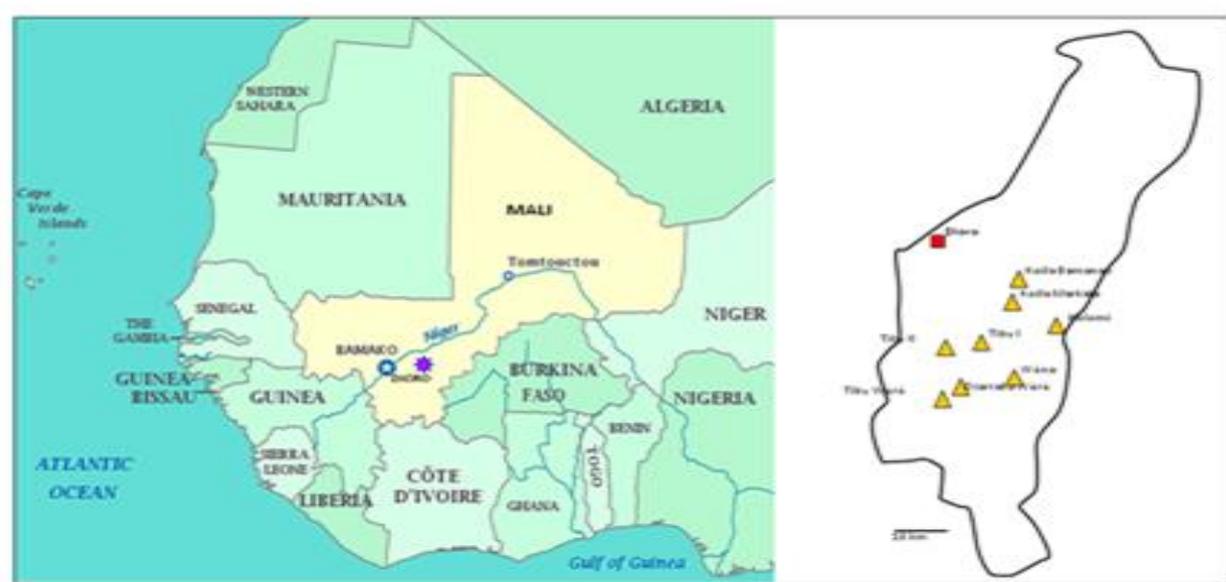


Figure 16 : Situation géographique de la commune rurale de Dioro au Mali

4.2. Période d'étude

Cette étude s'est déroulée du 10 Mai 2012 au 22 Mars 2017. Pendant les cinq (05) années de l'étude, les activités étaient beaucoup plus concentrées sur la période de transmission intense du paludisme c'est-à-dire entre Mai et Novembre de chaque année.

4.3. Echantillonnage

La population cible de cette étude était tous des enfants âgés de 2 à 15 ans.

A leur arrivée au centre de santé, les enfants sont soumis à un examen clinique puis à un test de diagnostic rapide (TDR) et en fin une goutte épaisse / frottis mince pour confirmer l'accès palustre simple à *Plasmodium falciparum*.

Après l'obtention de l'assentiment de l'accompagnant du malade ou des parents du malade, un prélèvement capillaire au bout des doigts est fait pour la confection des confettis. Ces confettis ont servi à faire les différents tests *in vitro*.

4.3.1. Critères d'inclusion

- Lame positive à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 2.000 et 199.999 p/ μ l ;
- Patients vivant dans un rayon de 5 km ;
- Patients âgés de 2 à 15 ans ;
- Diagnostic d'accès palustre simple (pas d'évidence de paludisme sévère ou de paludisme cérébral) ;
- Patients pouvant potentiellement rester dans l'étude jusqu'à 42 jours ;
- Assentiment des parents ou tuteurs pour les enfants mineurs <18 ans, plus consentement des enfants < 18 ans ou < 16 ans si l'enfant sait lire.

4.3.2. Critères de non-inclusion

- Prise antérieure d'antipaludiques dans les 4 jours précédents ;
- Patients vivant dans un rayon supérieur à 5 km ;
- Patients ayant un poids corporel inférieur à 8 kg ;
- Co-infection avec d'autres espèces plasmodiales ;
- Evidence de paludisme sévère (glycémie \leq 2,2 mM, Hb \leq 5 g/dl, densité parasitaire \geq 200.000 par μ l, signes de perte de mémoire durant les dernières 24 heures) (OMS, 2000)
- Prostration (incapacité à marcher, à s'asseoir) ;
- Participation antérieure à la même étude ;

- Infection au VIH détectée par interrogatoire ;
- Antécédents d'hypersensibilité à l'artéméter et, à la luméfantrine ;
- Incapable d'avaler oralement des médicaments, vomissement de la première dose et de la dose administrée à 30 minutes d'intervalle, autres infections telle la pneumonie, ou une malnutrition sévère ;
- Insuffisances cardiaques ou rénales chroniques, cancer, diabète, maladie chronique compromettant la vie.

4.4. Interventions

4.4.1. Diagnostic du paludisme simple à *Plasmodium falciparum*

4.4.1.1. Clinique

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

4.4.1.2. Diagnostic biologique

➤ Le Test de Diagnostic Rapide (TDR)

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

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

La sensibilité de ce test est estimée à 99,7% avec une spécificité de 99,5%.

L'utilisation de ces TDRs requiert à chaque fois certains matériaux comme :

- Un nouveau sachet de test non ouvert ;
- Un nouveau tampon imbibé d'alcool à 70° non ouvert ;
- Une nouvelle lancette stérile de la solution de tampon ;
- Une nouvelle paire de gants d'examen jetables ;
- Un chronomètre ;
- Un container pour évacuer les déchets tranchants et pointus ;
- Une poubelle pour les déchets non pointus et non tranchants ;

Les TDRs étaient utilisés immédiatement après leur ouverture selon le schéma qui suit :

- D'abord la vérification de la date de péremption ;
- Enfiler la nouvelle paire de gant d'examen ;
- Ouvrir et sortir la cassette du sachet ;
- Ecrire l'identifiant du patient sur la cassette ;
- Nettoyer le 4^{ème} ou le 3^{ème} 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 gouttes de la solution tampon dans l'alvéole ronde marquée de la lettre B ;
- Observer 5 à 10 minutes puis lire ;
- 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 apparaît 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 et **apparition** d'une ligne dans la fenêtre de test.

➤ **La goutte épaisse et le frottis mince**

Cet examen microscopique se faisait en 4 étapes :

- **Etape 1 : Prélèvement du malade**

Matériel nécessaire

- Lames d'examen de microscope
- Lancettes stériles à usage unique
- Méthanol ou éthanol
- Coton hydrophile
- Crayon gras ou stylo graveur

Méthode :

- Chez les enfants la pique se faisait au niveau du 3^{ème} ou 4^{ème} 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
- Piquer d'un coup sec et rapide
- Déposer les premières gouttes de sang sur du papier filtre (confettis)
- Tenir de la main droite une lame par les bords et de la main gauche le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang qui sera déposé sur une première lame
- Ensuite prendre une 2^{ème} lame pour la même opération.

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

La goutte épaisse se préparait comme suit :

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

Le frottis mince se préparait comme suit :

- On tient la lame d'une main. De l'autre main, poser le bord de la lame rodée juste en avant de la goutte de sang.
- Puis faire glisser la lame jusqu'à ce qu'elle touche la goutte de sang et laisser le sang se répartir tout le long du bord de la lame rodée.
- Ensuite pousser la lame rodée jusqu'au bout de la lame d'étalement, d'un mouvement doux et régulier
- Au bout de la lame d'étalement, on collait l'étiquette identifiant le patient.

La goutte épaisse et le frottis mince se coloraient comme suit :

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

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

On dépose une goutte d'huile à immersion sur la goutte épaisse, puis on amène l'objectif à 100 au-dessus de la goutte épaisse. On abaisse l'objectif jusqu'à ce qu'il entre en contact avec l'huile à immersion ensuite faire la mise au point et observer les parasites. A l'aide d'un compteur on comptait les parasites vus et aussi les leucocytes.

Le nombre de parasites se comptait sur 300 leucocytes.

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

La densité parasitaire est estimée afin de voir le niveau de gravité de l'infection palustre lié au taux d'hématies parasitées.

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

Vu l'estimation que le nombre moyen de leucocyte par μl est 8.000 :

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

$$\text{Nombres de parasites par } \mu\text{l} = \frac{7.500 \times \text{Nombres de parasites comptés}}{\text{Nombre de leucocytes comptés}}$$

Équation 1: Formule de calcul de la parasitémie

Le pourcentage d'hématies parasitées était aussi déterminé pour la culture *in vitro* des parasites.

$$\text{Nombres d'hématies parasitées} = \frac{\text{Nombres de parasites par } \mu\text{l}}{45.000}$$

Équation 2: Formule de calcul du nombre d'hématies parasitées

4.5. Prise de médicaments

Les patients enrôlés recevaient des doses d'artéméther plus la luméfantine. Les doses administrées étaient toutes de la firme pharmaceutique NOVARTIS donc **Coartem®**.

L'administration se faisait en fonction du poids du patient :

- Les enfants ayant un poids compris entre 5 et 15 Kg ont reçu six (06) comprimés de Coartem® dosés à 20mg d'artéméther sur 120mg de luméfantrine, soit un (01) comprimé à la première dose et un second comprimé huit (8) heures plus tard puis un (01) comprimé matin et soir ou soir et matin jusqu'à épuisement des six (06) doses de Coartem® ;
- Les enfants dont le poids est compris entre 15 et 25 Kg ont reçu 12 comprimés de Coartem® dosés à 20 mg d'artéméther sur 120 mg de luméfantrine, soit deux (02) comprimés par dose d'administration. La première et la seconde dose sont espacées de huit (8) heures de temps puis les autres doses sont administrées le matin et le soir ;
- Les sujets avec un poids corporel compris entre 25 et 35 Kg ont reçu dix-huit (18) comprimés de Coartem®, soit trois (03) comprimés par dose. La première et la seconde dose sont espacées de huit (8) heures de temps ensuite trois (03) comprimés le matin et le soir ;
- Les enfants pesant plus de 35 kg ont reçu 24 comprimés de Coartem® repartis entre six (6) prises, soit quatre (04) comprimés par prise. La première et la seconde prise sont espacées de huit (8) heures.

Après l'administration de la première dose, le sujet est observé pendant trente (30) minutes avant d'être libéré, s'il vomit au cours de ces trente (30) minutes la même dose de Coartem® est ré-administrée.

4.6. Plan de suivi des patients

Les patients enrôlés dans l'étude ont été suivis pendant au total 42 jours.

Durant ces 42 jours, ils viennent au CSCom les J0 ; J1 ; J2 ; J3 ; J7 ; J14 ; J21 ; J28 ; J35 et J42 soit dix (10) rendez-vous. Pendant les J0 ; J1 et J2 les patients prennent leurs doses de Coartem® puis subissent des examens cliniques. Le tableau ci-dessous illustre les examens effectués lors du suivi des sujets par rendez-vous.

Tableau 3 : Listing des examens faits par rendez-vous

Visites	J0	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42
Examen Clinique	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Prise de température	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Goutte épaisse	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Frottis mince	X									
Traitement pat ART+LUM	X	X	X							
Prélèvement sang veineux	X				*	*	*	*	*	*
Confettis	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Glycérolyte/Cryoconservation	X									
Taux d'hémoglobine	X							X		
Glycémie	X									

* : en cas de parasitémie, un prélèvement veineux est effectué.

4.7. Traitement des échantillons

Les lames des gouttes épaisses et des frottis minces étaient lues par deux lecteurs différents et un troisième dans les cas où la différence entre les parasitémies trouvées par les deux premiers lecteurs valait 20%. Après la lecture des lames, ces dernières sont arrangées dans des 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 ses informations. Après le dépôt des gouttes de sang dans les cercles de spots, on les laissait s'assécher avant de les introduire dans des enveloppes afin de les protéger de la poussière. Nous faisons au minimum trois (03) spots par confetti et par patient.

On écrivait les identifiants des patients sur les cassettes des TDRs, puis on les conservait dans une boîte.

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

Au total 8 ml de sang sont prélevés et repartis entre une vingtaine de cryotubes. Certains tubes contenaient du Glycérolyte et d'autres non. Après l'aliquotage, les cryotubes sont conservés dans l'azote liquide avant d'être envoyés au LBMA.

Une partie du sang prélevé est utilisée pour le test de résistance *in vitro* (*test-DAPI*).

4.8. 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 de *plasmodium* à Jx (jour de retour avec le paludisme).

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 au Coartem® ?

4.8.1. Extraction de l'ADN par le Chelex-100 à 5%

Le papier confetti de chaque patient a été incubé dans 1% de saponine (Sigma, StLouis, Mo) pour permettre la lyse des membranes des globules rouges et du parasite durant une nuit à 4°C. Après centrifugation, le culot a été lavé avec le tampon 1X PBS (Sigma, StLouis, Mo) 3 fois afin d'enlever l'hémoglobine qui est un facteur d'inhibition de la réaction d'amplification enzymatique. Ensuite, le culot a été ré-suspendu dans 200 µL de Chelex (chélateur des ions polyvalents, Biorad, Hercules, CA), après incubation à 56°C pendant 15 minutes. La suspension a été portée à ébullition pendant 8 minutes à 100°C. Le chauffage entraîne le détachement de l'ADN qui reste en suspension et le complexe Chelex-ion bivalent se dépose au fond du tube après centrifugation à 12000g pendant 3 minutes. Le surnageant contenant l'ADN est récupéré dans un nouveau tube stérile et placé dans le congélateur à - 20 °C jusqu'à son utilisation.

4.8.2. Mode opératoire

- Couper le morceau de papier filtre séché qui est imbibé de sang et le placer dans un tube de 1,5ml. Ajouter 1ml de saponine 1% et laisser incuber à 4°C durant la nuit (au minimum 12 heures d'incubation). La saponine permet la lyse des membranes érythrocytaires et parasitaires avec la libération de l'hémoglobine et des enzymes, telles que la DNase dans le tube de 1,5ml, qui sont inactivées à 4°C. Centrifuger à 12000g pendant 3mn puis rejeter le surnageant. Laver le papier filtre imbibé de sang avec la solution de PBS1X à pH 7, 2 trois fois. Ce lavage permet d'enlever

l'hémoglobine qui est un inhibiteur de la réaction PCR. Ajouter 200 μ L 5% chelex-100 en utilisant un embout à bout élargi.

- Chauffer à 56°C pendant 15mn et triturer le papier filtre avec le bout de l'embout jusqu'à ce que le papier devienne mou ;
- Bouillir à 100°C pendant 8 mn ;
- Presser le papier filtre contre la paroi du tube pour extraire toute la suspension de chelex-100 et rejeter le papier ;
- Centrifuger à 12000g pendant 3 mn ;
- Transférer le surnageant qui contient l'ADN dans un autre tube ;
- Conserver à -20°C la suspension d'ADN jusqu'à son utilisation.

4.8.3. Amplification du gène *msh-1* par la PCR

➤ Amorces utilisées

Nous avons utilisé la technique de «Nested PCR » ou PCR nichée afin d'optimiser la réaction surtout dans les situations de faible parasitémie. Deux groupes d'amorces ont été utilisés dans cette étude. Le premier groupe est constitué d'une paire d'amorces identifiées à partir des séquences de nucléotides conservées au niveau des blocs 1 et 3. Ces amorces peuvent ainsi amplifier le fragment du gène de la protéine de la membrane de surface-1(*msh-1*) entre les blocs 1 et 3. Cette amplification initiale permet l'obtention des fragments de 200 à 500 pb qui seront ensuite utilisés pour la seconde amplification avec les amorces spécifiques K1, MAD20 et RO33. Ces amorces amplifient d'une manière spécifique les parasites de *P. falciparum* présentant les allèles K1, MAD20 et RO33 au niveau du bloc2.

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

Figure 17 : Séquences des Tri peptides codant pour l'allèle K1 [32]

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
SGG	SVT	SGG	SVT	SGG	SVT	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SGG
SKG	SVT	SGG	SVT	SGG	SVT	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SGG
SGG	SVT	SGG	SVT	SGG	SVT	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SGA
SGG	SVT	SGG	SVT	SGG	SGG	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SGG	
SGG	SVT	SGG	SVT	SGG	SVT	SVA	SVA	SVA	SVA	SVA	SGG	
SSG	SVA	SGG	SVA	SVA	SGG	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SGG	
SSG	SVT	SGG	SVA	SVA	SVA	SGG	SGG	SVA	SGG	SGG	SGG	
SKG	SGA	SGG	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	
SGG	SVT	SGG	SGG	SVA	SVA	SGG	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG	
SSG	SVT	SGG	SGG	SVA	SVA	SGA	SGG					
SKG	SVA	SGG	SGG	SVA	SGG	SVA	SGG					
SKG	SVA	SSG	SVA	SGG								

Figure 18 : Séquences des Tri peptides codant pour l'allèle MAD20 [32]

	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 T³²</u>	ALA LYS PRO
4	<u>G C³²A G³²A³²T 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

Figure 19 : Séquences des Tri peptides codant pour l'allèle RO33 [32]

➤ Réactions d'amplification pour la première PCR:

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées

Amorces	Séquences	Taille (pb)	Référence
<i>msp-1</i>	5'-ACTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTA-3' 5'-AGTACGTCTAATTCATTTGCACGAA-3'	256- 522	.KOITA
<i>msp-1</i> allotype- spécifique block2, amorce K1	5'- CTTAAATGAAGAAGAAATTACAAAAGGT GC-3' 5'-GAGGGCTTGCACCAFARGAAGT-3'	140- 266	Molecular studies on clonality, severe disease and transmission in malaria [Pharma] USA: Tulane University 2000
<i>msp-1</i> allotype- spécifique block2, amorce MAD20	5'- GTATTAAATGAAGGAACAAGTGGAACAG -3' 5'- TATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATT- 3'	151- 193	
<i>msp-1</i> allotype- spécifique block2, amorce RO33	5'- AATAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTT GT-3' 5'-TCTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGA- 3'	153	

Nous avons utilisé la paire d'amorces *msp-1* pour effectuer la première réaction. Les tableaux ci-dessous (**Tableau 5 et 6**) montrent la composition des différents mélanges réactionnels.

Première amplification par la Technique de PCR : amplification avec les amorces spécifiques conservées pour les blocs 1 et 3 du gène *msp-1*.

Tableau 5 : Composition du mélange réactionnel 1

Concentration initiale	Réactifs	Volumes	Concentration finale
-	Eau pure	15,5µl	-
10X	Buffer	2,5µl	1X
50Mm	Mgcl ₂	1,25µl	2Mm
10Mm	dNPTs	2µl	0,2mM
50Nm	A-5'	0,5µl	1nM
50nM	A-3'	0,5µl	1nM
25U	Taq	0,25µl	0,05U
-	ADN	2,5µl	
TOTAL	-	25µl	-

Deuxième amplification par la technique de PCR : amplification avec les amorces internes spécifiques pour les allotypes K1, MAD20 et RO33.

Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel 2

Concentration. initiale	Réactifs	Volumes	C. finale
-	Eau pure	15,5µl	-
10X	Buffer	2,5µl	1X
50Mm	MgCl ₂	1,25µl	2Mm
10Mm	DNTPs	2µl	0,2mM
50nM	A-5'	0,5	1nM
50nM	A-3'	0,5	1nM
25U	Taq	µl	0,05U
-	ADN	2,5µl	-
TOTAL	-	25µl	-

Le volume réactionnel final du mélange est de 22.5µl auxquels seront ajoutés 2.5µl d'extraits d'ADN soit un volume final de 25µl. Ensuite l'amplification enzymatique s'effectuera dans un thermocycler de type Applied Biosystem en fonction du programme suivant :

- Une dénaturation initiale de 2 minutes à 95°C suivie de 35 cycles de :
- Une dénaturation pendant 30 secondes à 94°C ;

- Un appariement pendant 30 secondes à 55°C ;
- Une extension pendant 1 minute à 72°C.

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

➤ Réactions d'amplification pour la deuxième PCR

Elle consiste à amplifier le produit de la première amplification par les paires d'amorces spécifiques de **K1, MAD20 et RO33** (voir **Tableau 4**). Le produit amplifié est utilisé comme matrice. Le volume réactionnel 23 µl de mix auxquels seront ajoutés 2µl d'extrait de l'amplifiât soit un volume final de 25µl. Ensuite l'amplification enzymatique s'effectuera dans un **thermocycler de type Applied Biosystem** en fonction du programme suivant:

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

Après les 35 cycles, l'extension continue pendant 10 mn à 72°C.

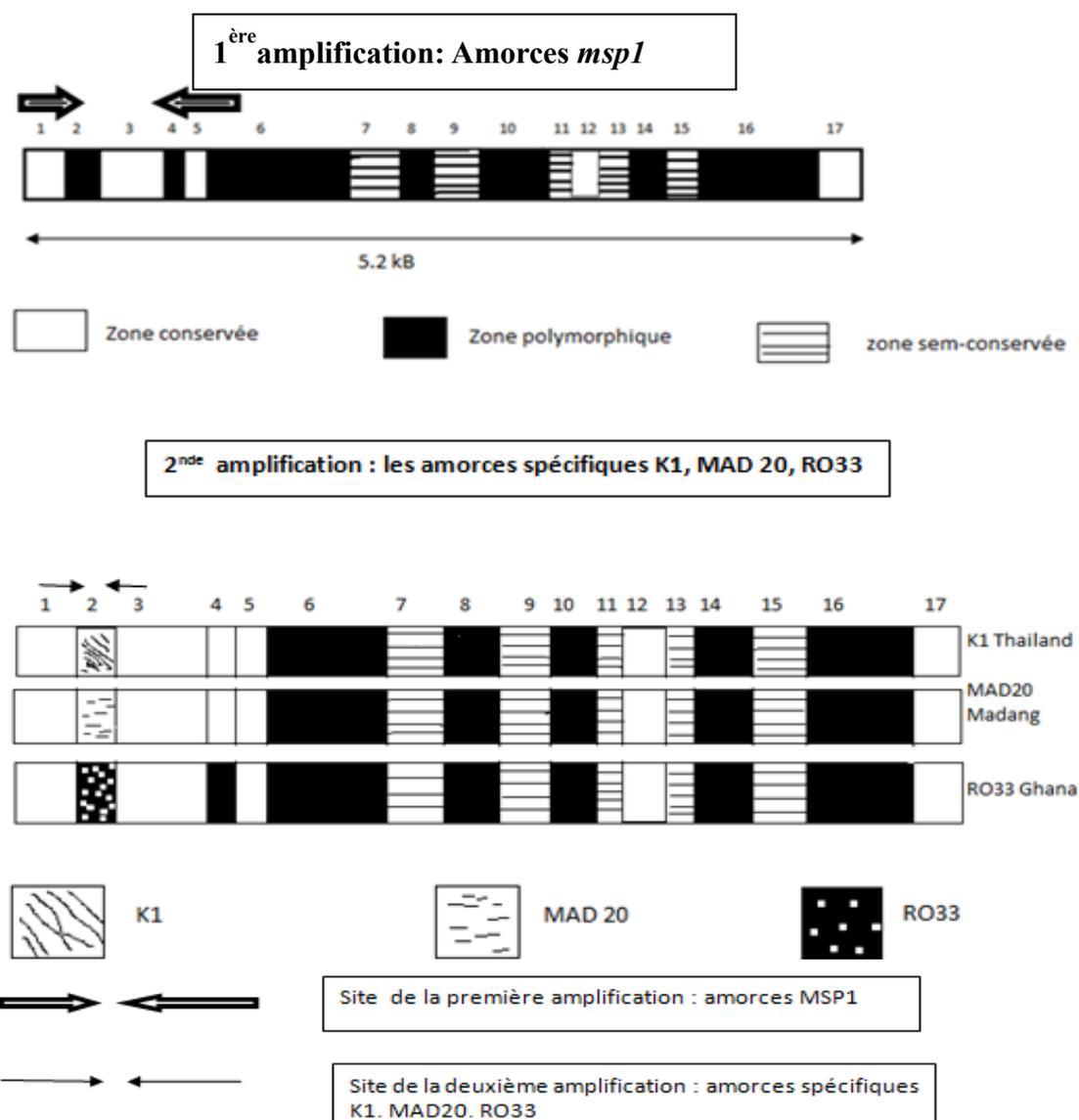


Figure 20 : Schéma de synthèse de la PCR Nichée *MSP1*

4.8.4. Technique d'électrophorèse

➤ Procédure:

- Préparer une solution d'agarose à 2% de TBE0,5x au four micro-onde pendant environ 1,30mn ;
- Ajouter 30µl de bromure d'éthidium, mélanger puis mouler dans un bac monté d'un peigne sur une surface plane bien équilibrée, laisser le gel se polymériser pendant environ 30mn à 1 heure ;
- Placer le gel dans le bac à électrophorèse submergé d'une solution de TBE 0,5x
- Loger les échantillons à tester et les contrôles en mélangeant 13 µl d'ADN et 2µl 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 90 mn à 100 volts et à 2 ampères ;
- Révéler les bandes en scannant le gel à l'aide de l'appareil photo kodak 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 EDAS290 (Kodak1D, version3.5) sur l'ordinateur. La présence d'une bande de taille spécifique sur le gel d'agarose traduit la présence d'un allotype de *P.Falciparum*. La présence de plus d'une bande pour un même échantillon signifie que la personne est infectée par plus d'un parasite. Ensuite, les bandes identifiées pour chaque paire d'amorces étaient ensuite enregistrées dans le tableau Excel sur Windows 2000. Le programme Kodak1D (EDAS290) nous permet d'estimer la taille de chacun des fragments amplifiés afin de mettre en évidence aussi bien le polymorphisme de taille que celui de séquence au niveau des différents allotypes utilisés.

➤ **Détermination de la taille des bandes :**

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

4.9. Recherche des marqueurs de résistance

Nous avons fait la recherche des marqueurs de résistance de la SP par High Résolution Melting (HRM). Cette méthode nous donne les résultats sous forme de courbe en fonction de la température. Le remplacement d'un acide aminé par un autre au niveau des différentes positions des gènes *dhps* et *dhfr* est interprété par la machine sous forme de pic de fusion.

- Le remplacement de la serine (S) par : l'alanine (A), phenylalanine (F) ou la **tyrosine (Y)** confère une résistance à la position 436 du gène *dhps*. Ce dernier bien qu'il soit connu, a été rarement retrouvé dans les différentes études de détection de mutation à la position 436. **Rachel F Daniels** et coll ont identifié une souche portant l'acide aminé **Y** lors d'une étude menée au Sénégal en 2012.
- Le remplacement de l'alanine (A) par la glycine (G) confère une résistance à la position 437 du gène *dhps*.

- Le remplacement de : l'asparagine (N) par isoleucine (I), de la cystéine (C) par l'arginine (R) et de la sérine (S) par l'asparagine (N) confèrent une résistance respectivement à la position 51, 59 et 108 du gène *dhfr*.

Nous avons utilisé comme souches de références 3D7 (souches sauvages) et Dd2 (souches mutées). Les températures de fusion de ces 2 souches étant connues, elles nous servaient donc de guide pour différencier les profils sauvages des profils mutés de nos échantillons. Il est des fois possible qu'une même souche présente les 2 profils qu'on appelle profils mixtes.

4.9.1. Réactifs HRM et matériels

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

4.9.2. PCR

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

Les séquences des amorces que nous avons utilisées sont :

S436/A437 *Forward* : GAATGTTTGAAATGATAAATGAAGGTGCTA

Reverse : CAGGAAACAGCTATGACGAAATAATTGTAATACAGG TACTACTAAATCTCT

Probe : ATCCTCTGGTCCTTTTGTATACC-block

N51/C59 *Forward* : ACATTTAGAGGTCTAGGAAATAAAGGAGT

Reverse : ATATTTACATCTCTTATATTTCAATTTTTCATATTT TGATTCATTCAC

Probe : AAATGTAATCCCTAGATATGAAATATTTTTGTG CAG-block

S108 *Forward* : CTGTGGATAATGTAAATGATATGCCTAATTCTA

Reverse : GACAATATAACATTTATCCTATTGCTTAAAGGT

Probe : GGAAGAACAAGCTGGGAAAGCAT_{-block}

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

Tableau 7 : Concentration des amorces utilisées lors du HRM

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

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

Le volume réactionnel pour la PCR est constitué comme suit :

Tableau 8 : Composition du mix lors du HRM

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

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

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

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

1. Dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes ;
2. Dénaturation à 94°C pendant 15 secondes ;
3. Appariement pendant 30 secondes ;
 - 52°C pour le *dhfr 108*
 - 63°C pour le *dhfr 51*, *dhfr 59*, *dhps 436* et *dhps 437*
4. Extension à 60°C pendant 1 minute.

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

4.9.3. High Resolution Melting HRM : Fusion à Haute Résolution

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

Principe :

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

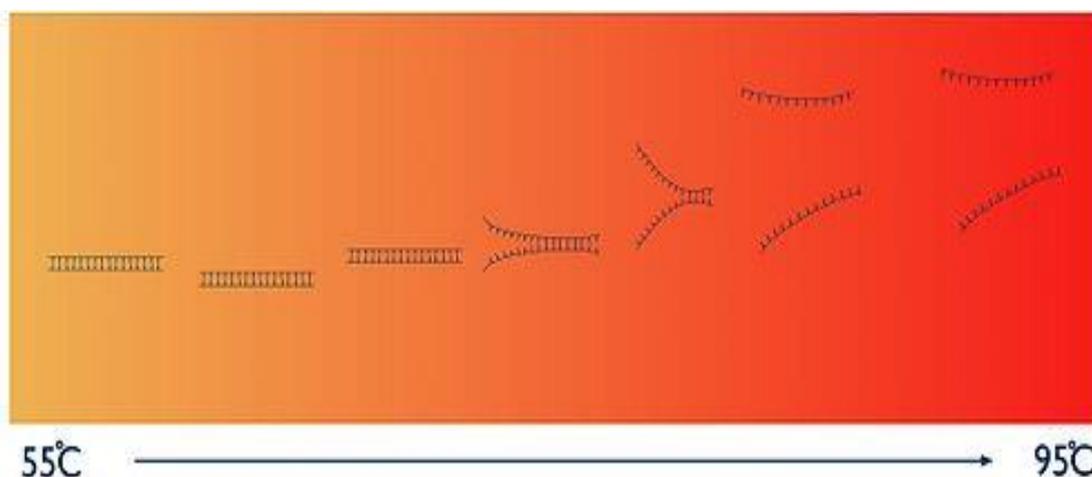


Figure 21 : Principe du HRM

Cela est possible grâce à des composés particuliers, appelés colorants intercalants, qui

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

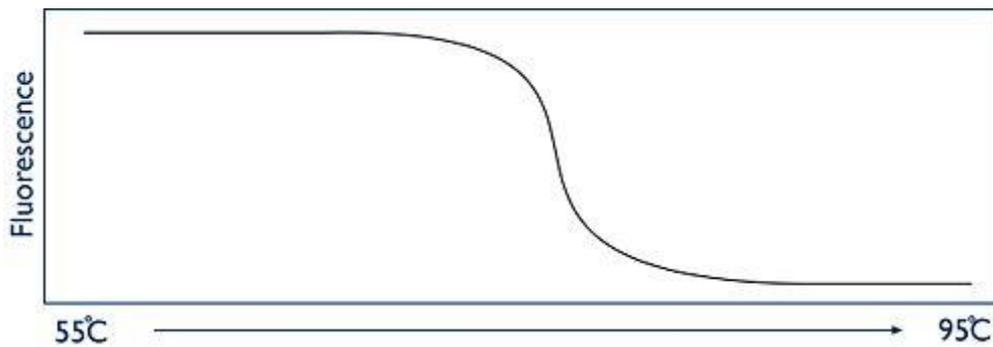


Figure 22 : Principe de tracée des courbes de fusion

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

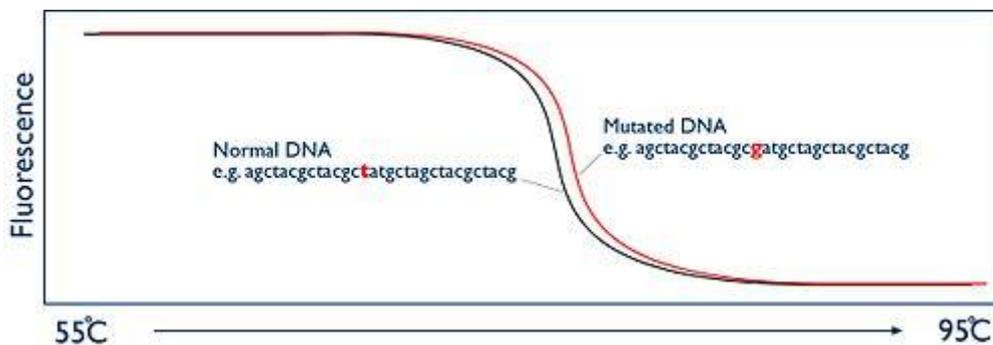


Figure 23 : Courbe de fusion d'un ADN normal et d'un ADN muté

Description du dispositif :

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

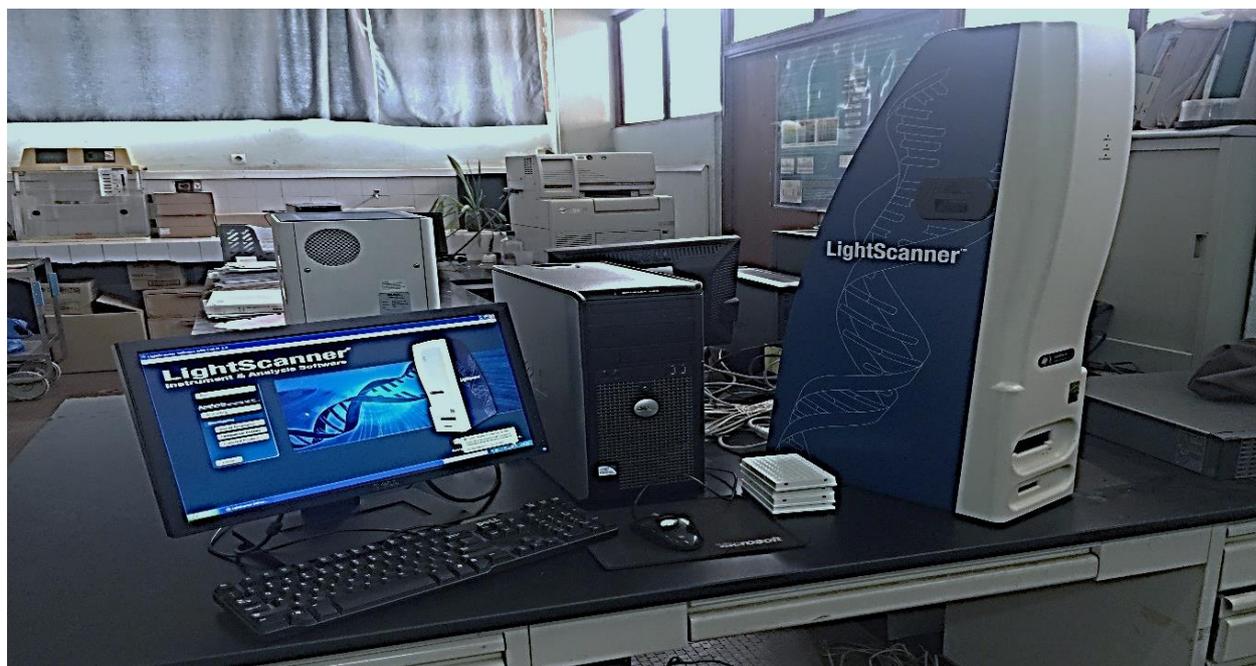


Figure 24 : Dispositif du HRM au LBMA

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

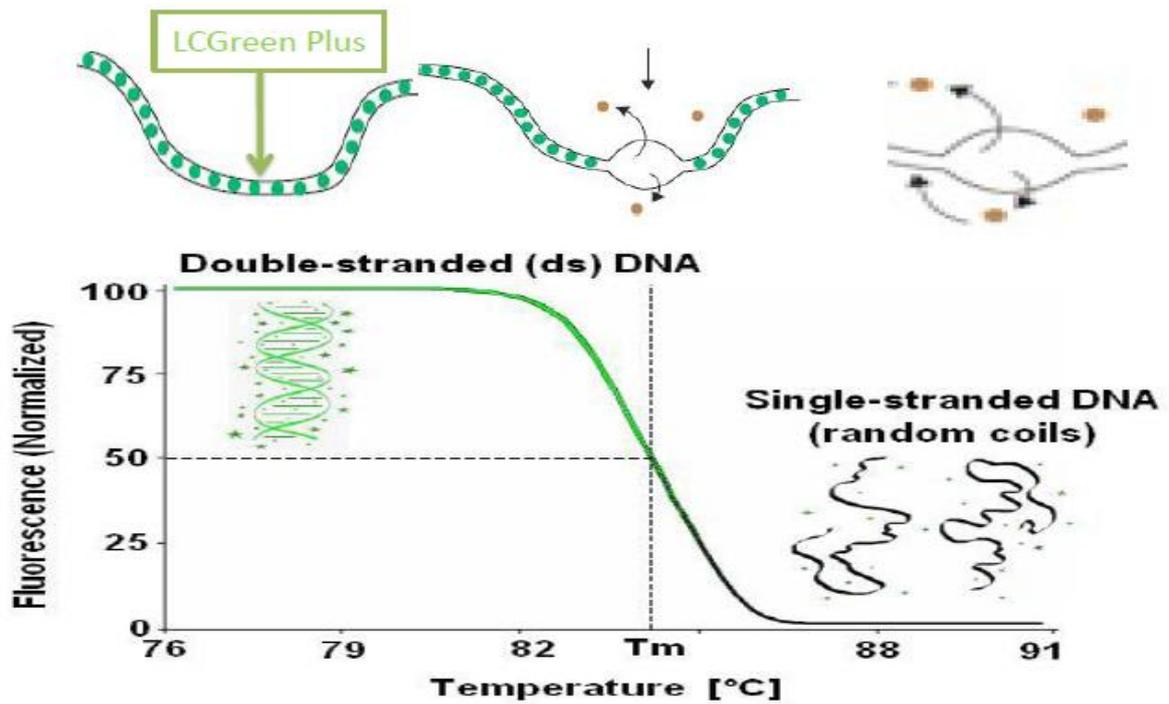


Figure 25 : La température de fusion en fonction de la fluorescence au HRM

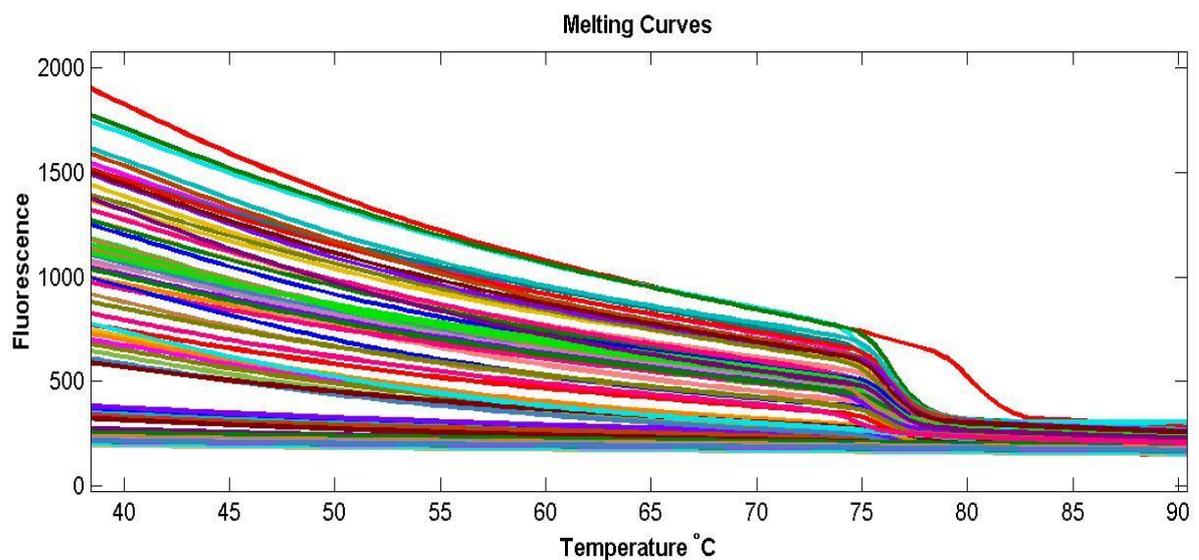


Figure 26 : Les courbes de fusion normalisées au HRM

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

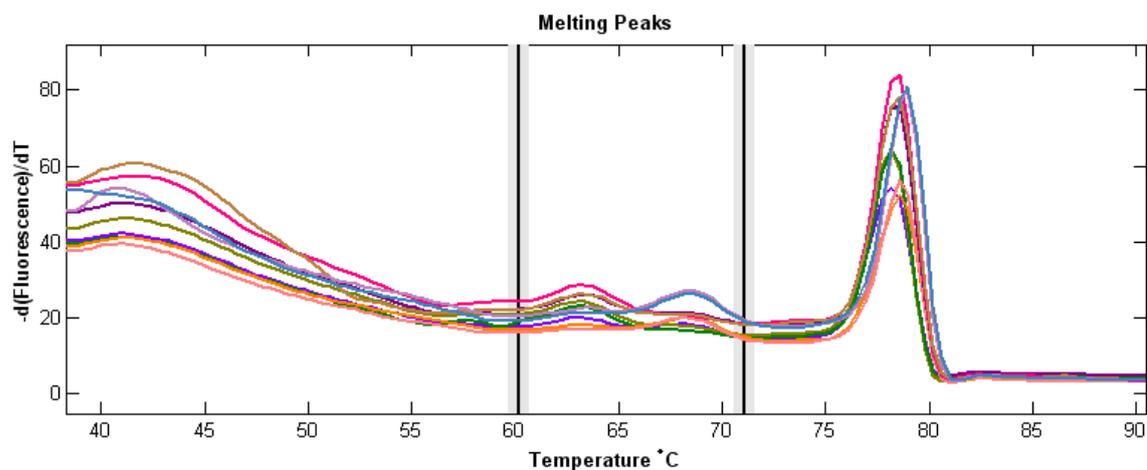


Figure 27 : Pics de fusion au HRM

4.10. 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). Le protocole a été revu et approuvé par le comité institutionnel d'éthique de Tulane University (Nouvelle Orléans, Louisiane, États-Unis d'Amérique) et du NIAID/NIH (le sponsor de cette étude). Tout changement ultérieur du protocole sera soumis à l'approbation de ces comités 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 qui d'ailleurs n'excède pas le volume recommandé. Il faudra noter que le volume total proposé (8 ml) se trouve dans l'intervalle des quantités admises par le NIH et autres agences, lesquelles sont $\leq 3,0$ ml par kg dans un intervalle de temps ≥ 8 semaines. Pour cela un consentement libre et éclairé (assentiment) de la prise du sang et de la participation volontaire au suivi des 42 jours (jours 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35 et 42) fut obtenu des patients répondant aux critères d'enrôlement. Nous, investigateurs, avons eu à :

- Expliquer le protocole à chaque patient ou au parent ;
- Répondre aux questions des patients ou des parents ;
- Obtenir un consentement/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 2500fCFA par visite.

4.11. Gestion des données :

La positivité des tests de diagnostic rapide (TDRs) a été estimée en fonction des données du fabricant, **SD Bioline**. La positivité des gouttes épaisses, l'estimation de la parasitémie était faite en fonction des normes de l'OMS sur la goutte épaisse et le frottis mince.

La base des données, le calendrier du suivi et les autres fichiers électroniques étaient gérés avec Excel et Word. L'analyse des données a été faite avec **GraphPad Prism3** et **Excel** et nous avons utilisé le test de **Pearson Chi-Square** pour faire les tests de corrélation entre les différents facteurs.

Lors de nos calculs de pourcentage, nous avons ajouté le pourcentage des profils mixtes (**sauvage + muté**) à celui des profils mutés pour en déduire la fréquence globale des souches mutées.

RESULTATS

5. RESULTATS

5.1. Facteurs démographiques

Notre étude a porté sur les enfants (garçons et filles) allant de 2 à 15 ans, tous de la commune rurale de Dioro.

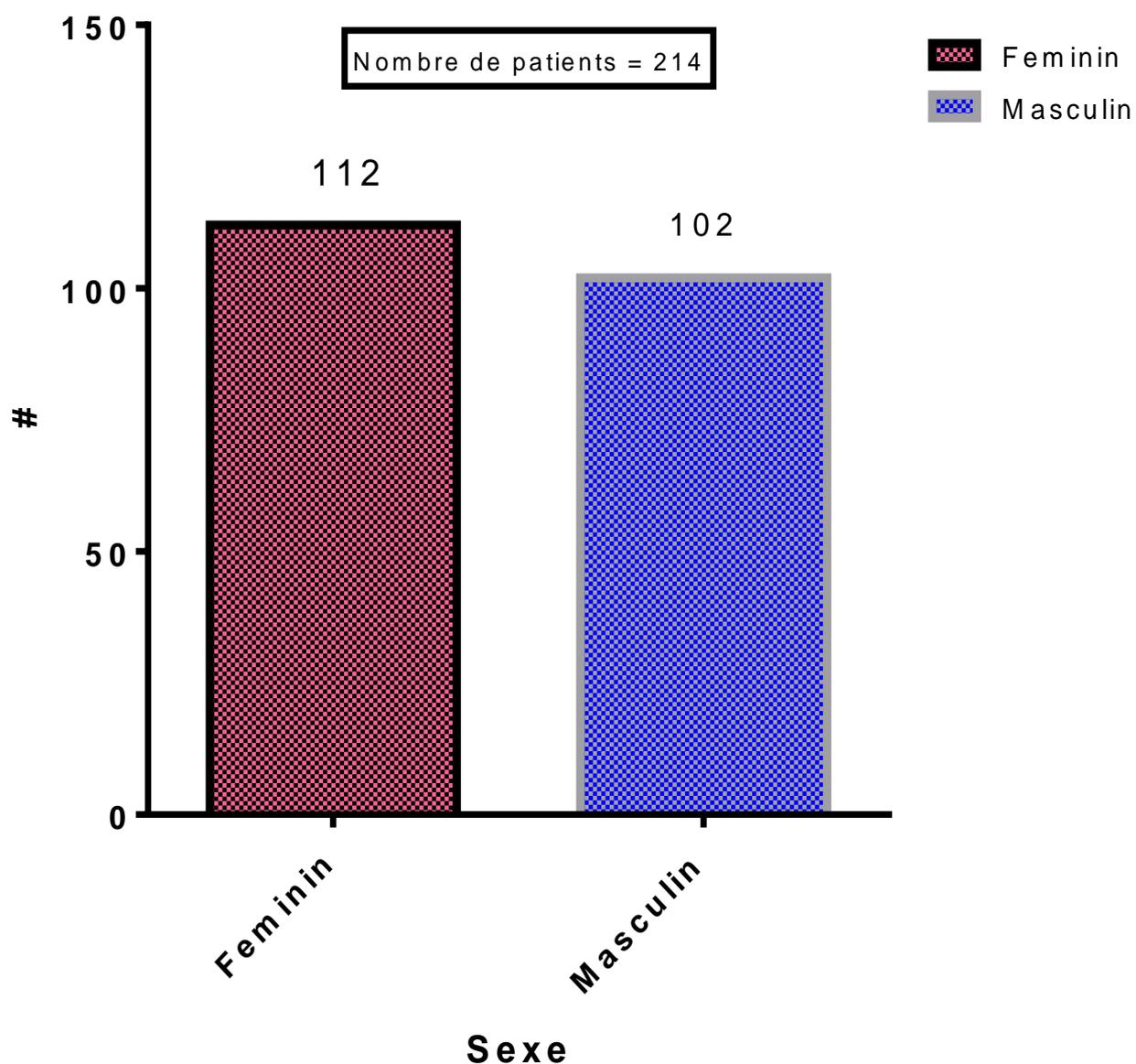


Figure 28 : Répartition des patients en fonction du genre (n=214).

Au total 214 patients ont participé à cette étude dont 52,3% de ces sujets étaient du sexe féminin. Le sexe Ratio était de 1,098 en faveur du genre féminin.

Nous avons reparti nos patients ayant participé à cette étude par tranche d'âge afin qu'on puisse observer l'impact de l'âge sur l'apparition de mutations.

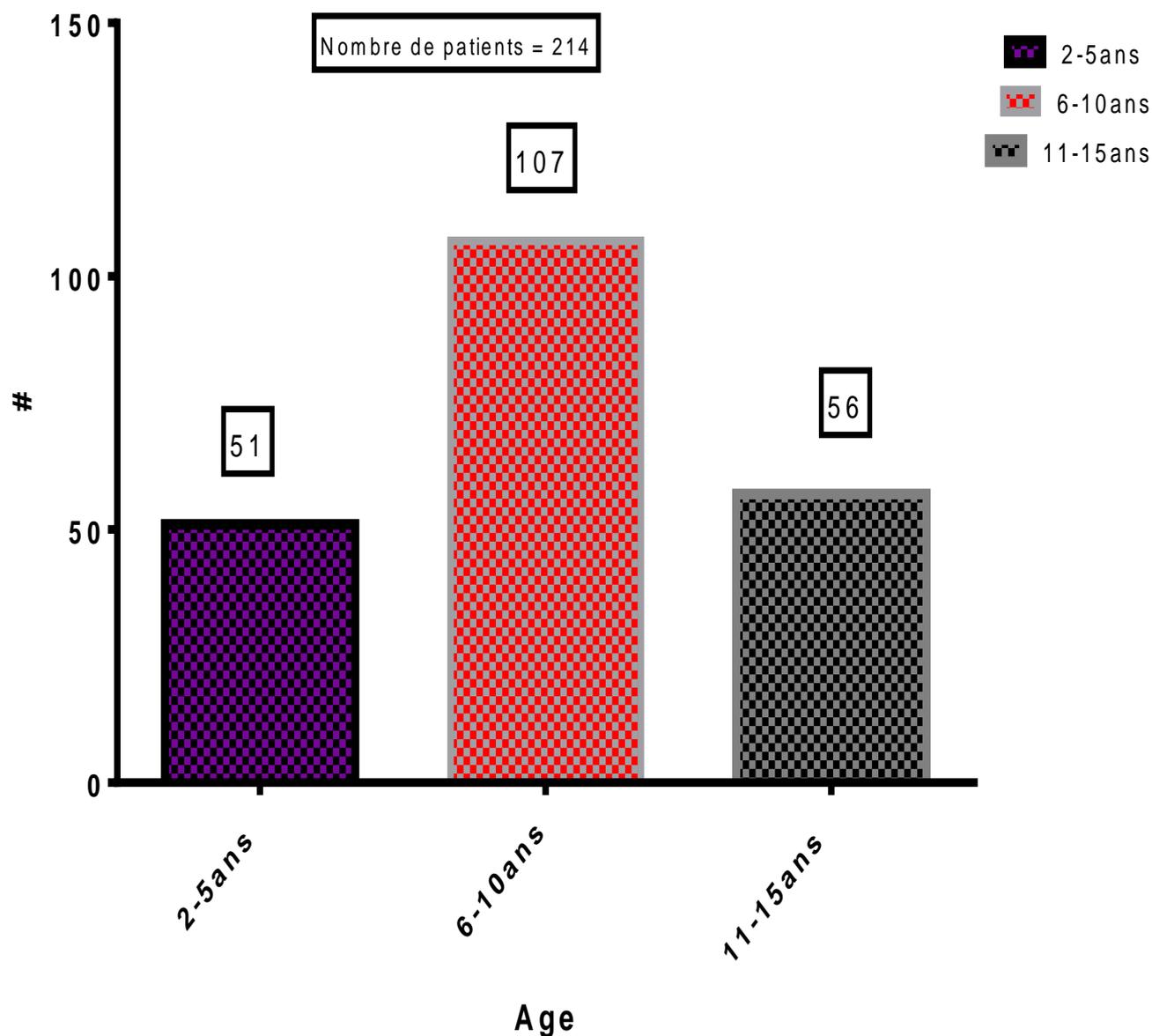


Figure 29 : Répartition des patients par tranche d'âge (n=214).

L'âge Minimum était 2 ans et le maximum 15 ans. La tranche d'âge [6-10 ans] était la plus représentée avec 50,0% (n = 107).

Nous avons reparti nos patients en fonction de l'année d'inclusion dans l'étude afin d'observer la dynamique d'inclusion des patients ainsi qu'étudier les paramètres de résistance aux antipaludiques dans le temps.

Tableau 9: Répartition des patients en fonction de l'année d'étude

Année d'étude	Fréquence	Pourcentage
2012	38	17,8
2013	3	1,4
2014	48	22,4
2015	99	46,3
2016	22	10,3
2017	4	1,9
TOTAL	214	100

Cette étude s'est déroulée de 2012 à 2017. La majorité des patients soit **46,3%** (n=99) a été incluse en 2015.

La totalité des patients qui ont participé à cette étude ont été répartis par tranche de parasitémie afin de voir l'impact de la charge parasitaire sur certains facteurs démographiques et sur les mutations.

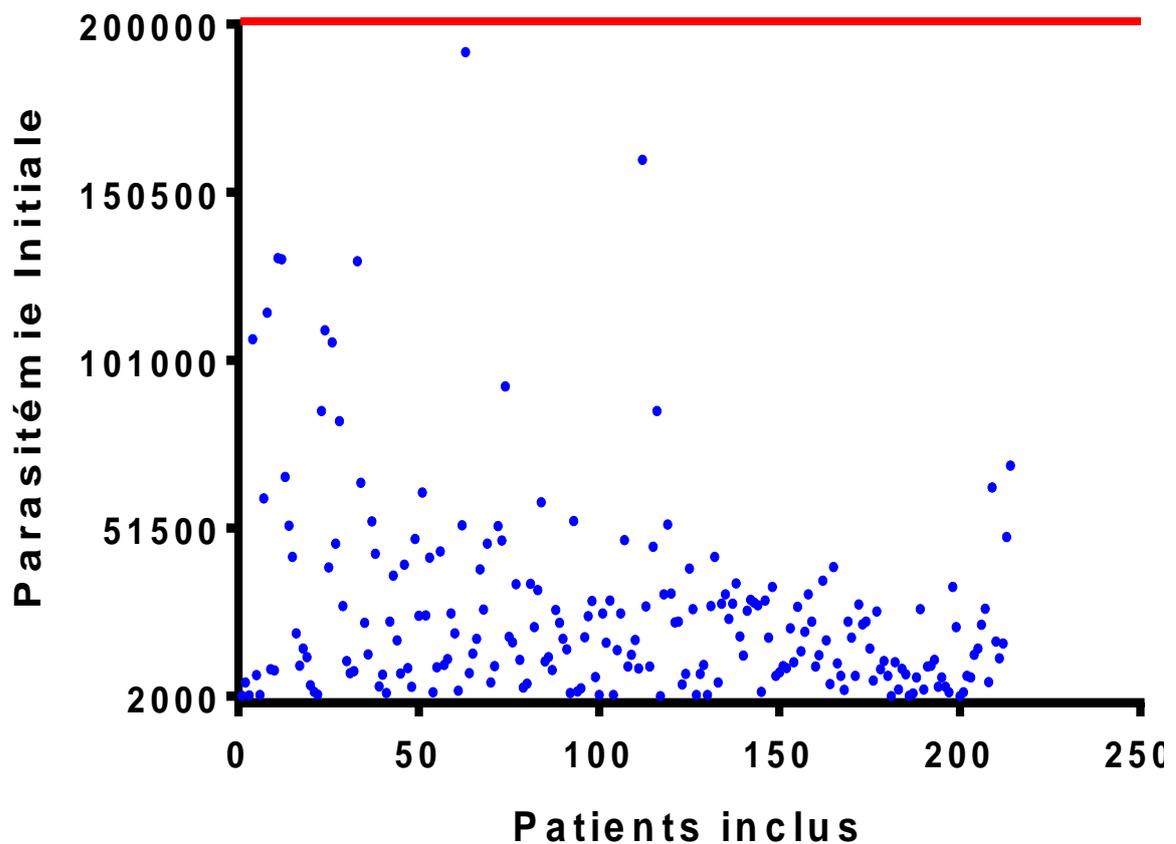


Figure 30 : Répartition des patients par tranche de parasitémies

La plupart de nos patients se présentait avec une parasitémie comprise entre [2000-50000 Tf/ μ L] (n=188). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que leurs parents se présentaient avec eux au centre avec l'apparition des premiers signes cliniques. Cependant certains patients (n=10) se présentaient avec des parasitémies très élevées, comprises entre 100000 et 200000 trophozoïtes / μ L de sang. Certains de ces patients se présentaient au centre avec des symptômes apparents.

5.2. GENOTYPAGE

5.2.1. Polymorphisme de la *msp-1*

En utilisant le marqueur polymorphique de *msp1*, nous avons examiné la multiplicité de l'infection chez les 214 patients afin de calculer le nombre moyen de génotype de *msp1* par patient. Nous avons estimé la prévalence des allèles de résistance des souches de *P.falciparum* à la SP par HRM (High Resolution Melting)

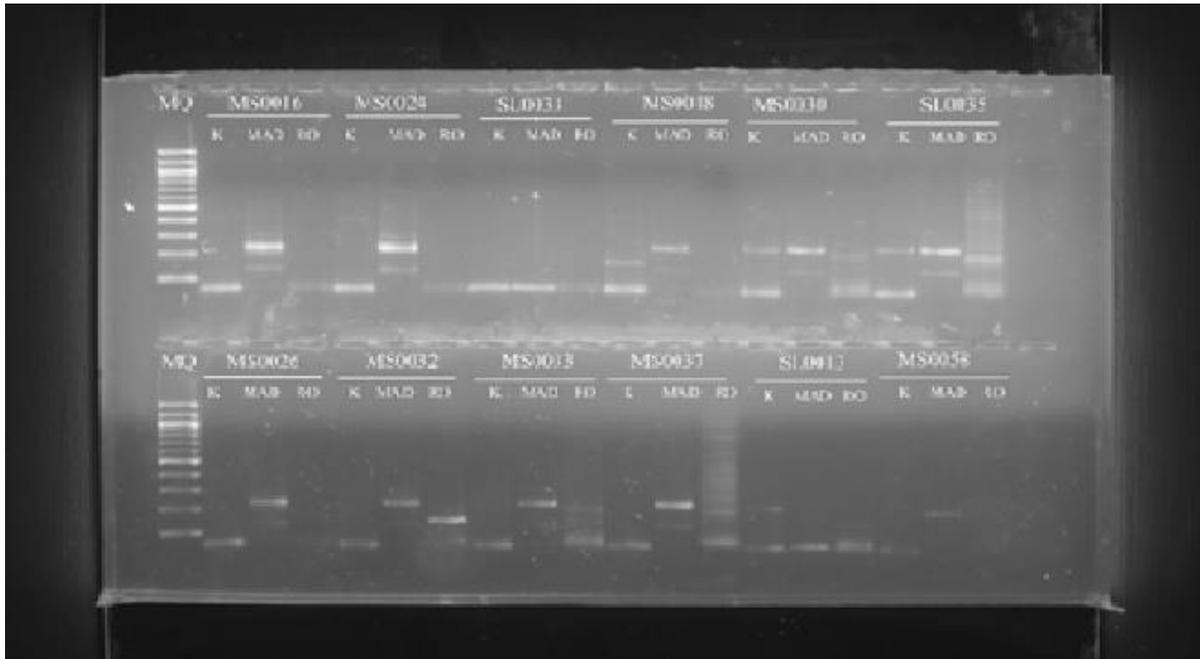


Figure 31 : Image d'un gel de PCR *msp1*.

La multiplicité de l'infection était élevée ≥ 1 chez certains patients inclus dans cette étude. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que Dioro est une zone à forte transmission du paludisme.

n = 282

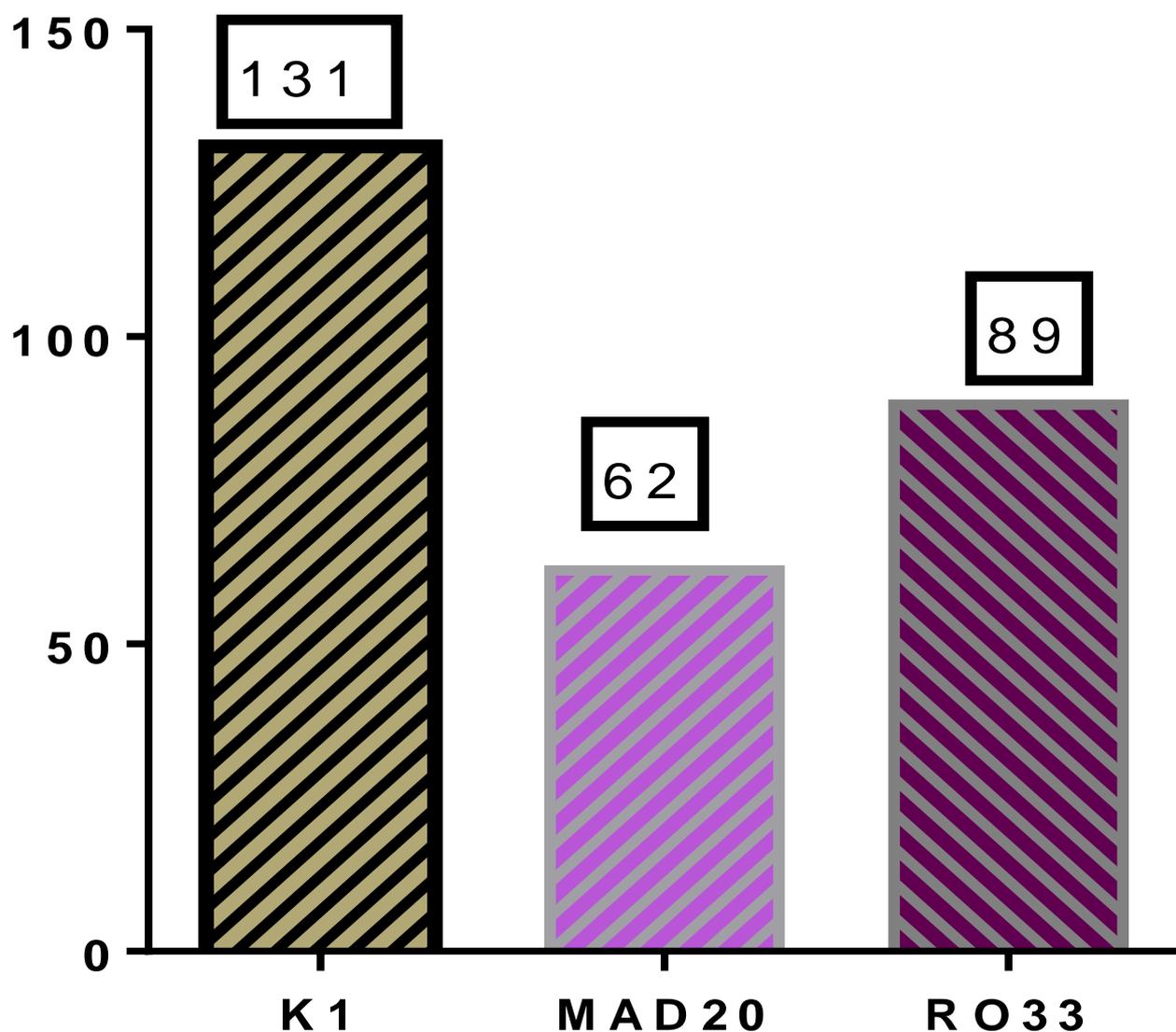


Figure 32: Fréquence des allotypes de la *msp1* chez les patients

L'allotype K1 était le plus représenté avec un pourcentage de 46,45% suivi de RO33 31.56% et MAD20 21.98%.

Tableau 10 : Fréquence du polymorphisme des allotypes de *msp-1*

Allotypes Type D'amplicon	K1	MAD20	RO33
	n(%)	n(%)	n(%)
Monoclonal	123 (93,90)	62 (100)	89 (100)
Polyclonal	8 (6,10)	0 (0)	0 (0)
Total	131 (100)	62 (100)	89 (100)

Seul l'allotype K1 était polymorphique à 6,1%. RO33 et MAD20 étaient tous deux monoclonal.

5.3. Mutations sur les gènes *dhfr* et *dhps*

L'étude des marqueurs de résistance à la SP en position **436, 437, 51, 59 et 108** ont permis de faire la distinction entre les génotypes sauvages et mutés (**objectif 2 de l'étude**). Selon le gène, nous avons réparti les patients en trois groupes : ceux qui portent la souche sauvage, la souche mutée et les profils mixtes (circulation des 2 génotypes simultanément dans le sang du patient).

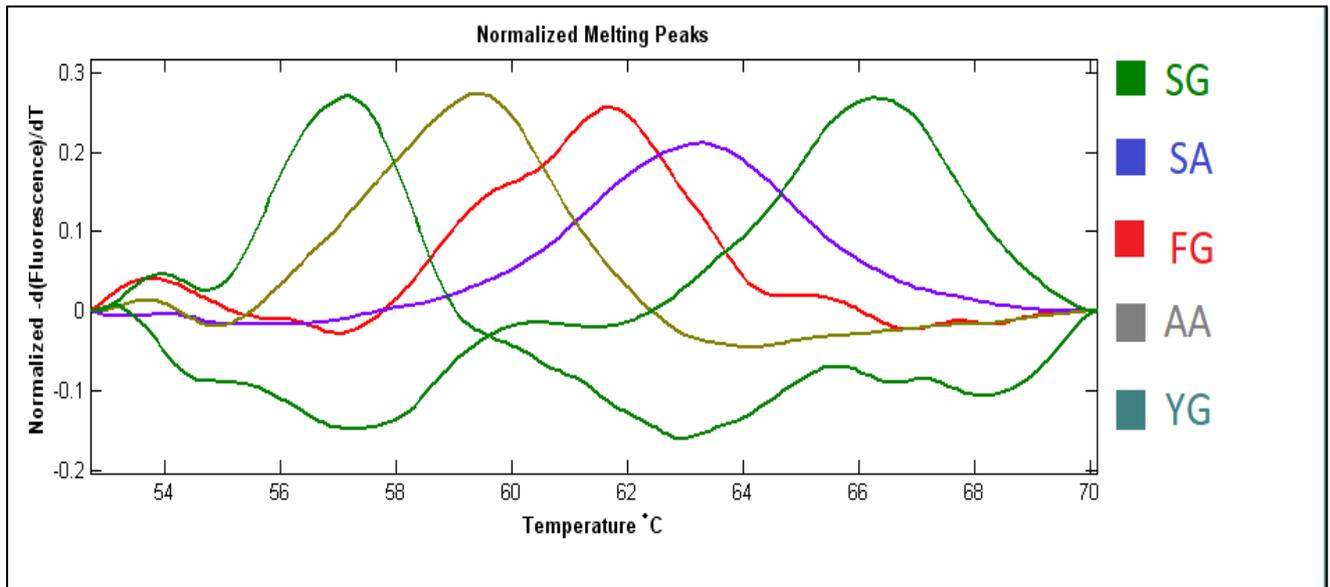


Figure 33 : Pics de fusion de nos différentes souches après amplification du gène *dhps* aux positions 436/437

Tous les échantillons qui ont à peu près la même température de fusion que 3D7 (**63,8°C**) sont des souches sauvages, c'est à dire des souches sensibles à la SP, de même, ceux qui ont la même température de fusion que Dd2 (**56,0°C**) sont des souches mutées liées à la résistance.

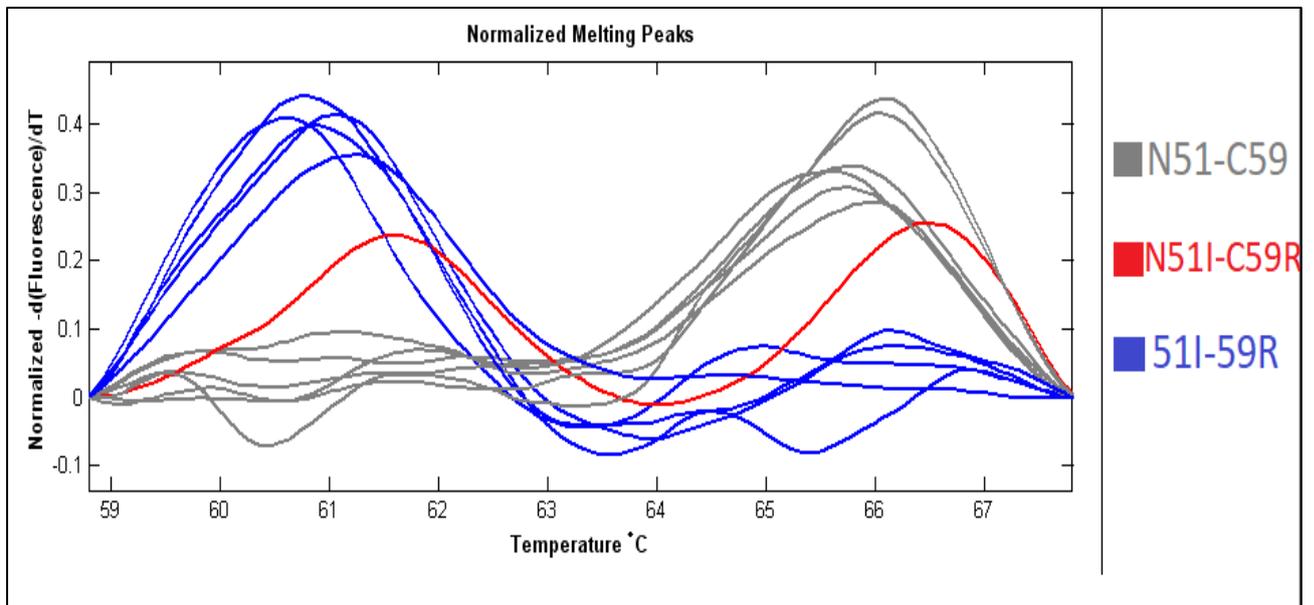


Figure 34 : Pics de fusion de nos différentes souches après amplification du gène *dhfr* aux positions 51 et 59.

La température de fusion de la souche sauvage (3D7) utilisée pour repérer les souches sauvages était de **67,5°C** et celle de la souche mutée (Dd2) était de **62,8°C**.

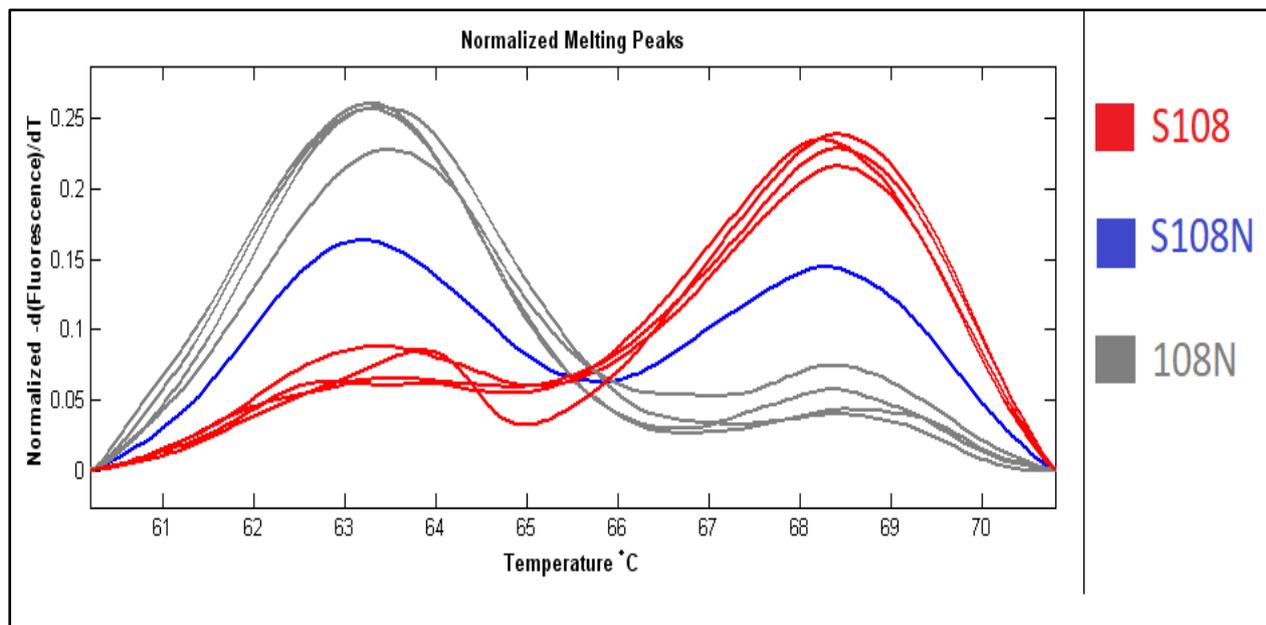


Figure 35 : Pics de fusion de nos différentes souches après amplification du gène *dhfr* à la position 108

Tous les échantillons qui ont à peu près la même température de fusion que 3D7 (**66,5°C**) sont des souches sauvages, c'est à dire des souches sensibles à la SP, de même, ceux qui ont la même température de fusion que Dd2 (**61,0°C**) sont des souches mutées liées à la résistance.

La souche mutée (Dd2) avait une température de fusion plus basse que celle de la souche sauvage (3D7).

Comme toute méthode de recherche, cette méthode a été au préalable optimisée. Nous avons fait le HRM avec les deux souches contrôles deux fois, ceci nous a permis d'estimer la température moyenne de fusion de l'ADN de ces souches.

Tableau 11 : Répartition des patients en fonction du *dhps* 436

<i>dhps</i> S436 F,A,Y	Fréquence	Pourcentage
S	103	59,88
F/A	54	31,4
Y	15	8,72
TOTAL	172	100

La position 436 du gène *dhps* a une particularité, car contrairement aux autres positions du même gène, elle peut être porteuse de 3 acides aminés conférant une résistance à la sulfadoxine. Il s'agit de l'alanine A, phénylalanine F et la tyrosine Y. Les deux premiers ont déjà été identifiés par plusieurs chercheurs et ne sont pas inconnus. La tyrosine Y reste cependant très rare. Au cours de notre étude, nous avons retrouvé cet acide aminé dans 15 échantillons soit une fréquence de 8,72%.

Tableau 12 : Répartitions des allotypes de *dhps* à la position 436 en fonction des parasitemies (N=172)

Parasitemie /UL	<i>dhps</i> S436 F, Y, A			TOTAL
	S n(%)	S/F, Y, A n(%)	F, Y, A n(%)	
[2000-50000]	93(62,41)	12(8,05)	44(29,53)	149(100)
[50005-100000]	5(33,33)	1(6,66)	9(60)	15(100)
[100005-150000]	4(66,66)	0(0)	2(33,33)	6(100)
[150005-200000]	1(50)	0(0)	1(50)	2(100)
TOTAL	103(59,88)	13(7,55)	56(32,55)	172(100)

172/214 ont donné des résultats interprétables à la position 436 du gène *dhps*. L'acide aminé **F, Y, A** responsable de résistances a été identifié sur 69 échantillons soit un pourcentage de 40%. Nous n'avons eu aucune corrélation entre la parasitemie et l'apparition des mutations sur le gène *dhps* à la position 436 (*valeur de p* =0,978).

Tableau 13 : Répartitions des allotypes de *dhps* à la position 437 en fonction des parasitémies (N=172)

***dhps* A437G**

Parasitémie / μ L	A n(%)	A/G n(%)	G n(%)	TOTAL n(%)
[2000-50000]	66(44,3)	13(8,72)	70(46,98)	149(100)
[50005-100000]	3(20)	2(13,33)	10(66,67)	15(100)
[100005-150000]	4(66,67)	0(0)	2(33,33)	6(100)
[150005-200000]	1(50)	0(0)	1(50)	2(100)
TOTAL	74(43,02)	15(8,72)	83(48,26)	172(100)

Sur les 214 échantillons collectés 172 ont donné des résultats interprétables à la position 437 du gène *dhps*. L'acide aminé **G** la glycine responsable de résistances a été identifié sur 98 échantillons soit un pourcentage de 57%.

Dans toutes les classes de parasitémies, les allotypes mutés étaient plus fréquents que les allotypes sauvages avec une répartition similaire entre les classes de parasitémies. Nous n'avons donc eu aucune corrélation entre la parasitémie et l'apparition des mutations sur le gène *dhps* à la position 437 (*valeur de p* =0.524).

Tableau 14 : Corrélation entre la parasitémie et le gène *dhfr* N51I (N=163)

***dhfr* N51I**

Parasitémie /UL	I n(%)	N n(%)	N/I n(%)	TOTAL n(%)
[2000-50000]	107(73,80)	27(18,62)	11(7,58)	145(100)
[50005-100000]	9(69,24)	2(15,38)	2(15,38)	13(100)
[100005-150000]	2(66,67)	1(33,33)	0(0)	3(100)
[150005-200000]	1(50)	1(50)	0(0)	2(100)
TOTAL	119(73)	31(19,01)	13(7,99)	163(100)

Sur les 214 échantillons collectés, 163 ont donné des résultats interprétables à la position 51 du gène *dhfr*. L'acide aminé **I** responsable de résistance a été identifié sur 132 échantillons soit un pourcentage de 80,98%.

Nous n'avons pas obtenu de différence statistiquement significative dans la répartition des mutations sur le gène *dhfr* à la position 51 entre les classes de parasitémie (*valeur de p = 0.814*)

Tableau 15 : Corrélation entre la parasitémie et les mutations sur le gène *dhfr* à la position 59 (N=163)

Parasitémie /UL	<i>dhfr C59R</i>			TOTAL
	C n(%)	C/R n(%)	R n(%)	
[2000-50000]	30(20,69)	10(6,90)	105(72,41)	145(100)
[50005-100000]	2(15,38)	2(15,38)	9(69,24)	13(100)
[100005-150000]	1(33,33)	0(0)	2(66,67)	3(100)
[150005-200000]	1(50)	0(0)	1(50)	2(100)
TOTAL	34(20,87)	12(7,36)	117(71,77)	163(100)

Sur les 214 échantillons collectés 163 ont donné des résultats interprétables à la position 59 du gène *dhfr*. L'acide aminé **R** responsable de résistance a été identifié sur 129 échantillons soit un pourcentage de 79,14%.

Nous notifions cependant qu'il n'y avait aucune corrélation entre la parasitémie et les mutations sur le gène *dhfr* à la position 59 (*valeur de p = 0,817*).

Tableau 16 : Corrélation entre la parasitémie et l'apparition des mutations sur le gène *dhfr* à la position 108 (N=50)

Parasitémie /UL	<i>dhfr S108N</i>			TOTAL
	N n(%)	S n(%)	S/N n(%)	
[2000-50000]	25(65,79)	6(15,79)	7(18,42)	38(100)
[50005-100000]	6(75)	0(0)	2(25)	8(100)
[10005-150000]	1(33,33)	2(66,67)	0(0)	3(100)
[150005-200000]	0(0)	1(100)	0(0)	1(100)
TOTAL	32(64)	9(18)	9(18)	50(100)

Sur les 214 échantillons collectés 50 ont donné des résultats interprétables à la position 108 du gène *dhfr*. L'acide aminé **N** responsable de résistance a été identifié sur 41 échantillons soit un pourcentage de 82%. Cependant nous n'avons eu aucune corrélation entre la parasitemie et l'apparition des mutations sur le gène *dhfr* à la position 108 (*valeur de p* =0.076)

Tableau 17 : Corrélation entre l'âge et les mutations sur le gène *dhps* à la position 436 (N=172)

dhps S436F,Y,A

Age	S n(%)	S/F, Y, A n(%)	F, Y, A n(%)	TOTAL
[2-5]	30(69,76)	2(4,65)	11(25,58)	43(100)
[6-10]	47(57,31)	8(9,75)	27(32,92)	82(100)
[11-15]	26(55,31)	3(6,38)	18(38,29)	47(100)
TOTAL	103(59,88)	13(7,55)	56(32,55)	172(100)

Les mutations étaient également réparties entre les tranches d'âge, l'acide aminé **F, Y, A** responsable de résistances a été identifié sur 69 échantillons soit un pourcentage de 40%. Nous n'avons pas constaté une corrélation entre l'âge et l'apparition des mutations sur le gène *dhps* à la position 436 (*valeur de p* =0,628).

Tableau 18 : Corrélation entre l'âge et les mutations sur le gène *dhps* à la position 437 (N=172)

dhps A437G

Age	A n(%)	A/G n(%)	G n(%)	TOTAL
[2-5ans]	24(57,14)	1(2,38)	17(40,48)	42(100)
[6-10ans]	33(40,25)	8(9,75)	41(50)	82(100)
[11-15ans]	17(35,41)	6(12,5)	25(52,09)	48(100)
TOTAL	74(43,02)	15(8,72)	83(48,26)	172(100)

Les mutations étaient également réparties entre les tranches d'âge. Nous n'avons donc pas constaté une corrélation entre l'âge et l'apparition des mutations sur le gène *dhps* à la position 437 (*valeur de p* =0,179).

Tableau 19 : Répartition des mutations sur le gène *dhfr* à la position 51 en fonction de l'âge (n=163)

Age	<i>dhfr</i> N51I			TOTAL
	I n(%)	N n(%)	N/I n(%)	
[2-5ans]	31(73,81)	7(16,67)	4(9,52)	42(100)
[6-10ans]	57(69,52)	20(24,39)	5(6,09)	82(100)
[11-15ans]	31(79,50)	4(10,25)	4(10,25)	39(100)
TOTAL	119(73)	31(19)	13(8)	163(100)

Nous n'avons pas constaté une corrélation entre l'âge et l'apparition des mutations sur le gène *dhfr* à la position 51 (*valeur de p* =0,399).

Tableau 20 : Répartition des mutations sur le gène *dhfr* à la position 59 en fonction de l'âge (n=163)

Age	<i>dhfr</i> C59R			TOTAL
	C n(%)	C/R n(%)	R n(%)	
[2-5ans]	8(19,05)	4(9,52)	30(71,43)	42(100)
[6-10ans]	22(26,83)	4(4,87)	56(68,30)	82(100)
[11-15ans]	4(10,25)	4(10,25)	31(79,50)	39(100)
TOTAL	34(20,86)	12(7,36)	117(71,78)	163(100)

Aucune corrélation n'a été constatée entre l'âge et l'apparition des mutations sur le gène *dhfr* à la position 59 (*valeur de p* =0,246).

Tableau 21 : Répartition des mutations sur le gène *dhfr* à la position 108 en fonction de l'âge

Age	<i>dhfr</i> S108N			TOTAL
	N n(%)	S n(%)	S/N n(%)	
[2-5ans]	8(61,53)	3(23,08)	2(15,39)	13(100)
[6-10ans]	16(64)	6(24)	3(12)	25(100)
[11-15ans]	8(66,67)	0(0)	4(33,33)	12(100)
TOTAL	32(64)	9(18)	9(18)	50(100)

Nous n'avons pas eu de différence statistiquement significative dans la répartition des mutations 108N entre les différentes tranches d'âge (*valeur de p* =0,288).

Tableau 22 : Evolution de l'apparition des mutations sur le gène *dhps* à la position 436 au cours de l'étude.

Année d'étude	<i>dhps</i> S436F,Y,A			TOTAL
	S n(%)	S/F, Y, A n(%)	F, Y, A n(%)	
2012	12(40)	4(13,33)	14(46,66)	30(100)
2013	1(33,33)	0(0)	2(66,66)	3(100)
2014	16(45,71)	3(8,57)	16(45,71)	35(100)
2015	60(66,66)	6(6,66)	24(26,66)	90(100)
2016	13(100)	0(0)	0(0)	13(100)
2017	1(100)	0(0)	0(0)	1(100)
TOTAL	103(59,88)	13(7,55)	56(32,55)	172(100)

Les mutations sur le gène *dhps* à la position 436 se rencontraient tout le long de cette étude à de hautes proportions. Avec une *valeur de p* =0,077 il n'existait pas de différence

statistiquement significative dans la répartition des mutations entre les années au cours desquelles s'est tenue cette étude.

Tableau 23 : Evolution de l'apparition des mutations sur le gène *dhps* à la position 437 au cours de l'étude.

Année d'étude	<i>dhps</i> A437G			TOTAL
	A n(%)	A/G n(%)	G n(%)	
2012	11(35,48)	7(22,59)	13(41,93)	31(100)
2013	1(33,33)	0(0)	2(66,67)	3(100)
2014	19(54,29)	3(8,57)	13(37,14)	35(100)
2015	40(44,94)	5(5,62)	44(49,44)	89(100)
2016	3(23,07)	0(0)	10(76,93)	13(100)
2017	0(0)	0(0)	1(100)	1(100)
TOTAL	74(43,02)	15(8,73)	83(48,25)	172(100)

En 2015, nous avons inclus le plus grand nombre (n=89) de patients dans l'étude. Les mutations sur le gène *dhps* à la position 437 se rencontraient tout le long de cette étude à de hautes proportions. Avec une valeur de $p = 0,082$, il n'existait pas de différence statistiquement significative dans la répartition des mutations entre les années au cours desquelles s'est tenue cette étude.

Tableau 24 : Evolution de la fréquence des mutations sur le gène *dhfr* à la position 51 au cours de l'étude. (N=163)

Année d'étude	<i>dhfr</i> N51I			TOTAL
	I n(%)	N n(%)	NI n(%)	
2012	13(68,42)	4(21,06)	2(10,53)	19(100)
2013	1(33,33)	2(66,67)	0(0)	3(100)
2014	27(71,05)	11(28,95)	0(0)	38(100)
2015	65(73,03)	13(14,61)	11(12,36)	89(100)
2016	9(90)	1(10)	0(0)	10(100)
2017	4(100)	0(0)	0(0)	4(100)
TOTAL	119(73)	31(19,02)	13(7,98)	163(100)

La majorité des souches mutées (57,57%) du gène *dhfr* à la position 51 a été identifiée en 2015 (n=76). Il n'existait pas de différence statistiquement significative entre les années au cours desquelles s'est tenue cette étude en termes de répartition des mutations sur le gène *dhfr* à la position 51 (*valeur de p* =0,103).

Tableau 25 : Evolution de la fréquence des mutations sur le gène *dhfr* à la position 59 au cours de l'étude

Année d'étude	<i>dhfr</i> C59R			TOTAL
	C n(%)	C/R n(%)	R n(%)	
2012	4(21,05)	2(10,52)	13(68,43)	19(100)
2013	2(66,66)	0(0)	1(33,33)	3(100)
2014	11(28,94)	0(0)	27(71,06)	38(100)
2015	16(17,98)	10(11,23)	63(70,79)	89(100)
2016	1(10)	0(100)	9(90)	10(100)
2017	0(0)	0(0)	4(100)	4(100)
TOTAL	34(20,86)	12(7,36)	117(71,78)	163(100)

La majorité des souches mutées (soit 56,58%) sur le gène *dhfr* à la position 59 a été identifiée en 2015 (n=73). Nous n'avons eu aucune corrélation dans la répartition des mutations 59R au fil des années de l'étude (*valeur de p* =0,189).

Tableau 26 : Evolution de la fréquence des mutations sur le gène *dhfr* à la position 108 au cours de l'étude

Année d'étude	<i>dhfr</i> S108N			TOTAL
	N n(%)	S n(%)	S/N n(%)	
2012	5(55,55)	3(33,33)	1(11,12)	9(100)
2013	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2014	13(68,42)	3(15,79)	3(15,79)	19(100)
2015	14(63,63)	3(13,63)	5(22,72)	22(100)
2016	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2017	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
TOTAL	32(64)	9(18)	9(18)	50(100)

La majorité des souches mutées (46,34%) du gène *dhfr* à la position 108 a été identifiée en 2015 (n=19). Cependant nous n'avons obtenu aucune corrélation positive dans la répartition des mutations 108N au fil du temps (*valeur de p = 0,703*).

Tableau 27 : Evolution de la multiplicité de l'infection de 2012 à 2017

Années d'étude	Multiplicité de l'infection			TOTAL
	1 parasite n(%)	2 parasites n(%)	3 parasites et + n(%)	
2012	24(72,72)	7(21,21)	2(6,07)	33(100)
2013	2(66,67)	0(0)	1(33,33)	3(100)
2014	32(66,66)	5(10,42)	11(22,92)	48(100)
2015	72(74,23)	22(22,68)	3(3,09)	97(100)
2016	8(40)	12(60)	0(0)	20(100)
2017	0(0)	3(75)	1(25)	4(100)
TOTAL	138(67,32)	49(23,90)	18(8,78)	205(100)

La plupart de nos patients souffrait d'un épisode de paludisme causé par une seule souche de *P. falciparum*. La multiplicité de l'infection était pratiquement la même chose tout le long des années au cours desquelles s'est tenue cette étude.

Tableau 28 : Evolution de la multiplicité de l'infection en fonction de l'âge des patients

Age	Multiplicité de l'infection			TOTAL
	1 parasite n(%)	2 parasites n(%)	3 parasites et + n(%)	
[2-5ans]	36(72)	11(22)	3(6)	50(100)
[6-10ans]	66(65,35)	25(24,75)	10(9,90)	101(100)
[11-15ans]	36(66,66)	13(24,08)	5(9,26)	54(100)
TOTAL	138(67,31)	49(23,91)	18(8,78)	205(100)

Au cours de cette étude, nous avons remarqué que la multiplicité de l'infection était similaire dans toutes tranches d'âge.

Tableau 29 : Evolution de la multiplicité de l'infection en fonction de la parasitémie

Parasitémie/ μ L	Multiplicité de l'infection			TOTAL
	1 parasite n(%)	2 parasites n(%)	3 parasites et + n(%)	
[2000-50000]	122(67,4)	44(24,3)	15(8,3)	181(100)
[50005-100000]	12(75)	2(12,5)	2(12,5)	16(100)
[100005-150000]	3(50)	3(50)	0(0)	6(100)
[150005-200000]	1(50)	0(0)	1(50)	2(100)
TOTAL	138(67,31)	49(23,90)	18(8,79)	205(100)

L'évolution de la multiplicité de l'infection en fonction de la parasitémie n'était pas linéaire.

5.4. Circulation des multiples mutations

On parle de multiple mutation lorsqu'un même parasite présente simultanément des variations génétiques sur différentes positions d'un même gène. Le nombre de positions détermine l'appellation de la multiple mutation.

5.4.1. Circulation des doubles mutations sur le gène *dhps* aux positions 436 et 437

Tableau 30 : Circulation des doubles mutations sur le gène *dhps* (N=172)

Double mutation sur <i>dhps</i>	n	%
436 F,Y,A/437G	27	15,70

Les doubles mutations sur le gène *dhps* aux positions 436 et 437 ont été retrouvées dans nos échantillons chez 27 patients avec une fréquence de **15,70%**.

5.4.2. Circulation des triples mutations sur le gène *dhfr* aux positions 51, 59 et 108

Tableau 31 : Circulation des triples mutations sur le gène *dhfr* (N=50).

Triple mutation sur <i>dhfr</i>	n	%
108N/59R/51I	33	66

Les triples mutants *dhfr* 108N, 59R et 51I ont été retrouvés chez 33 patients avec une fréquence de 66%.

5.4.3. Circulation des quadruples mutations sur les gènes *dhps* et *dhfr*

Tableau 32 : Circulation des quadruples mutations sur les gènes *dhps* et *dhfr* (N=163)

Quadruple mutation	n	%
437G/436 F, Y, A /59R/51I	17	10,43

De nos échantillons qui ont été traités avec succès au HRM, 17 patients portaient les mutations sur les gènes *dhps* et *dhfr* respectivement aux positions 436 + 437 et 51+59, soit un pourcentage de 10,43%.

5.4.4. Circulation des quintuples mutations sur les gènes *dhps* et *dhfr*

Tableau 33 : Circulation des quintuples mutations sur les gènes *dhps* et *dhfr* (N=50)

Quintuple mutation	n	%
436 F, Y, A/437G/51I/59R/108N	8	16

Les quintuples mutations étaient présentes chez 8 patients avec une fréquence de 16%.

**COMMENTAIRES
ET DISCUSSIONS**

6. Commentaires et discussions

Le but de notre étude était d'évaluer dans une zone d'endémie palustre la fréquence des mutations de la *Dihydrofolate Réductase* et de la *Dihydroptéroate Synthase* de *Plasmodium falciparum* qui sont associées à la résistance aux médicaments anti-folates (antifoliques et antifoliniques) notamment la sulfadoxine-pyriméthamine (SP).

Ainsi nous avons mené une étude de type transversal qui s'est déroulée dans la commune rurale de DIORO entre 2012 et 2017.

6.1. Lieu d'étude

La commune rurale de DIORO a été choisie pour la réalisation de cette étude. Ce choix de site est dû au fait que DIORO est une zone d'endémie palustre due à la riziculture faisant beaucoup de gîtes larvaires d'anophèles dans la localité pendant pratiquement toutes les saisons de l'année.

6.2. Méthodologie

Les données de notre étude ont été recueillies lors d'une étude portant sur l'efficacité de la combinaison Artemether + Lumefantrine ce qui exigeait à ce que les patients soient cliniquement observés par un médecin généraliste depuis leur premier jour au CSCom jusqu'au 42^{ème} jour du suivi pour ceux qui l'ont complété ou alors à leur jour de retrait de l'étude.

Les données ont été collectées sur les formulaires de report de cas (FRC) et saisies avec le logiciel Microsoft Excel 2010. Cette méthode nous a permis de collecter des données fiables et exploitables.

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

Le dépistage se faisait par la clinique et la parasitologie, puis l'enrôlement si le sujet venait à remplir les critères d'inclusion et n'est concerné par aucun critère de non inclusion.

La lecture de lames de gouttes épaisses et de frottis minces se faisait d'abord par un technicien de laboratoire, puis une deuxième fois par un pharmacien biologiste et en fin une dernière lecture par un parasitologue si besoin était de répartir les deux premiers lecteurs.

Les tests de diagnostic rapide utilisés étaient de la firme BIOLINE SD. Ces TDRs étaient tous utilisables de par leur date de péremption et leur apparence. Les résultats des TDRs ont été tous confirmés par la lecture des gouttes épaisses.

6.3. Résultats :

6.3.1. Facteurs démographiques :

Notre étude s'est portée sur une population de 214 enfants, tous âgés de 2 à 15 ans. Cette tranche d'âge se trouve comprise dans les différentes tranches d'âge sur lesquelles d'autres chercheurs se sont focalisés pour des tests d'efficacité des antipaludiques. **Lynda Woi-Messé et al** ont mené leur étude sur des échantillons qui provenaient des enfants de moins de 5 ans pour la détection des mêmes mutations [8]. **Yaye Dié Ndiaye et al** [33] ont mené leur étude sur des patients de 2 à 20 ans pour la détection des mutations sur certains gènes codant pour la résistance aux antipaludiques. La majorité des enfants de notre étude était de la tranche d'âge de [6-10ans] soit **50%** de la population. (**Tableau 10**)

La plupart des enfants qui ont participé à cette étude étaient du genre féminin avec **52,3%**. (**Tableau 9**)

De 2012 à 2017, la majorité de nos patients a été incluse dans l'étude en 2015 avec un pourcentage de 46,3%. Les débuts de cette étude ont connu certaines difficultés notamment vers 2012-2013 ce qui a considérablement diminué le nombre d'enfants inclus dans l'étude pendant cette période. Toutefois, nous avons inclus un nombre (n=214) statistiquement interprétable d'après le guide de l'OMS qui traite des méthodes pour la surveillance de l'efficacité des antipaludiques [34]. La majorité de nos patients, soit 87,9%, avait une parasitémie comprise entre [2000-50000] ce qui pourrait témoigner de l'engagement de certains parents dans la prise en charge rapide du paludisme. Il faut aussi noter que certains de nos patients avaient de fortes parasitémies. Ces derniers peuvent-être décrits comme des

enfants qui ont développé une certaine prémunition au paludisme même si cette prémunition se perd facilement [35].

Beaucoup d'investigations ont été faites sur la détection des marqueurs de résistance des SP, notamment par : **Omar A. A. Bamaga et coll [36]** ; **Yaye Dié Ndiaye et coll [33]**; **Noor Rain Abdullah et coll [37]** ; **Mwiche NP Siame et coll [38]** ; **Lynda Woi-Messé et coll** ; **Sankar Sridaran et coll [39]**

6.3.2. Paramètres de polymorphisme génétique :

Au cours de notre étude, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'année d'étude, l'âge, le sexe des patients et l'apparition de certaines mutations sur les gènes *dhps* et *dhfr* étudiées.

L'utilisation des marqueurs de *m_{sp}1*, elle avait pour but de voir si la multiplicité de l'infection (le nombre de type de parasites en cause de l'infection palustre) avait un lien avec les mutations rencontrées. La multiplicité de l'infection peut être un indicateur pour l'émergence des souches résistantes à la SP [40].

Nos résultats montrent que certains patients avaient plus d'un génotype circulant dans le sang. Cependant, aucune corrélation n'a été trouvée entre cette multiplicité de l'infection et les mutations rencontrées sur les gènes étudiés. **Talisma AO et coll** avaient trouvé une relation entre la multiplicité de l'infection et l'évolution de certaines mutations sur les gènes qui codent pour la résistance à la SP [41].

Avec les amorces du bloc conservé et des allotypes K1, MAD20, RO33 nous avons fait la PCR nichée qui nous a permis de déterminer les fréquences des différents allotypes de la *m_{sp}1*. Sur les 214 échantillons, 205 échantillons ont été positifs à la PCR *m_{sp}1*.

Nous avons remarqué la présence de tous les allotypes parmi nos échantillons. L'allotype K1 était le plus représenté avec **46,45%** suivi de l'allotype RO33 avec **31,56 %** puis l'allotype MAD20 avec **21,98 %**. Notre résultat était similaire à celui de Diarra et al mené de 2012 à 2015 avec 44,55% de K1 suivi de l'allotype RO33 avec 30,69% puis l'allotype MAD20 avec 24,75% [17].

Nous avons obtenu au total 282 allotypes sur les 205 patients, ce qui nous donne une infection moyenne de 1,37 parasite par patient.

L'allotype K1 était le seul polymorphique avec 6,10%. En revanche, l'allotype MAD20 et l'allotype RO33 n'ont montré aucun cas de polymorphisme.

6.3.3. Les marqueurs de résistance à la SP :

Pour pouvoir estimer la prévalence des mutations associées à la résistance des SP, nous avons recherché les mutations par HRM. Notre hypothèse était qu'avec l'utilisation massive de la SP comme chimioprévention du paludisme saisonnier chez les jeunes enfants et les femmes enceintes, il est possible, voire même probable que les parasites subissent une pression médicamenteuse pouvant entraîner des variations génétiques sur les gènes *dhfr* et *dhps* responsables de résistance à la SP. La technique utilisée, celle du HRM est une innovation technologique qui à partir de la température de fusion des brins d'ADN permet de détecter les mutations ponctuelles qui seraient associées à un phénotype donné. Certains comme recherchent les marqueurs de résistance par d'autres techniques comme la PCR-RFLP [37] et d'autres carrément par séquençage du gène d'intérêt [39]. Actuellement, beaucoup d'études utilisent cette technique pour la détection des SNPs [33].

Nous avons utilisé les souches 3D7, 7G8 et IndoChina (Dd2) comme références. Les souches 3D7 et Dd2 sont respectivement sensible et résistante à la SP et ne comporte donc pas les mêmes acides aminés aux positions étudiées. Ces souches ont été utilisées comme références dans beaucoup d'études de recherche des mutations notamment par **Rachels F_Daniels et coll** [42].

Nous avons remarqué que l'ADN de la souche mutée (Dd2) fond avant celui de la souche sensible 3D7.

Les températures de fusion associées à la mutation des deux 2 gènes étudiés nous ont permis de détecter pour le gène *dhps* : **31,5%** de 436 **F, A** et **8,72 %** de 436 **Y** à la position 436 et **48,3%** de 437**G** et **8,7%** de profils mixtes à la position 437. Après avoir traité tous nos échantillons, la fréquence des mutations à la position 436 et 437 étaient respectivement donc de **40%** et de **57%**.

La position 51 du gène *dhfr* portait plus de mutations que la position 59 soit respectivement **81%** et **79%**. Les mutations au niveau de la position 108 du gène *dhfr* étaient de **82%**.

Les doubles mutants *dhps* 436F/437G, Les triples mutants *dhfr* 108N/59R/51I, les quadruples mutants 436F/437G+59R/51I et les quintuples mutants 436F/437G+108N/59R/51I étaient présents dans la population avec respectivement une prévalence de **15,70%**, **66%**, **10,43%** et **16%**.

Au cours de notre étude, nous avons détecté 15 souches portant l'amine aminé Y à la position 436, cet acide aminé connu pour son association à la résistance du gène *dhps* a été rarement identifié. Rachels F Daniels et coll en 2012 à DAKAR ont identifié une seule souche portant cet acide aminé[42]. Cet écart pourrait s'expliquer par le fait qu'ils avaient mené leur étude sur un échantillon plus petit (n=67).

La prévalence de nos mutations était légèrement en dessous de celle de **Felix Koukouikila-Koussounda et coll** [43] qui ont mené une étude similaire sur des femmes enceintes au Congo Brazzaville en **2015** dont la prévalence de la mutation à la position 436 et 437 était de **67,1%** et **98,5%** et celle du gène *dhfr* à la position 51, 59 et 108 était respectivement de **88%**, **85%** et **79,1%**, ils ont aussi obtenu une prévalence de **59 %** pour le triple mutant *dhfr*.

En 2017 dans le cercle de KITA au Mali, **Fatou Diawara et coll** ont mis en évidence des fortes prévalences de mutation sur le gène *dhfr* aux positions 51,59 et 108 respectivement 79,2%, 81,2% et 87,5% avec une fréquence de quintuple mutation de 4,2% incluant la position de 540 [44]. Ce taux pourrait s'expliquer par la faible prévalence de la position 540 (constat général dans de nombreux pays africains)

Les résultats de nos multiples mutations avoisine celui de **Patrícia Salgueiro et coll** [45] qui ont enregistré en Island comme prévalence de la triple mutation *dhfr* 51/59/108 : 66%, double mutation *dhps* 436/540 : 11%, quintuple mutation *dhps* 436/540+ *dhfr* 51/59/108 : 9%.

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par **Lynda Woi-Messé et coll** qui avaient mené une étude sur des enfants de moins de 5 ans dans la région Maradi au Niger : **60,2 %** de 436 **F** ; **82,5 %** de 437**G** ; **67.5%** de 51**I** ; **60.8%** de 59**R** ; **69.5%** de 108**N** ; 49,5% de doubles mutations *dhps* 436/437 et **56.8%** de triples mutations *dhfr* 108/59/51.

Noor Rain Abdullah et coll [37] ont trouvé des fortes prévalences des mutations sur les positions 59 et 108 *dhfr* soit respectivement de **100% et 58.6%** et celle de la position 437 *dhps* était de **100%**.

Dans une étude menée en **2015** par **Mwiche NP Siame et coll [38]** sur des femmes enceintes en Zambie, ils ont obtenus 68% pour la prévalence des triples mutations *dhfr* 59/51/108.

Dans une autre étude faite en **2017** sur des échantillons provenant du Sénégal et de la Tanzanie par **Yaye Dié Ndiaye et coll [33]** les prévalences étaient respectivement au Sénégal et en Tanzanie de 44% et 48% pour les triples mutations *dhfr* avec 52% et 58% pour les quadruples mutations 437 *dhps* + 51,59,108 *dhfr*.

Les mutations sur le gène *dhps* à la position 540 qui est un marqueur majeur connu pour son association à la résistance de la sulfadoxine en Afrique n'a pas fait partie de nos investigations ce qui constitue une faiblesse de cette étude. Aussi, la position 108 du gène *dhfr* n'a pas pu être explorée avec tous nos échantillons.

Toutes fois, les données nous suggèrent une forte prévalence des variations génétiques pouvant conférer une résistance qui peut prédire l'échec du traitement avant de devenir évident dans la commune de DIORO. Ces données nécessitent donc, un suivi continu et régulier de l'efficacité de la politique nationale de prévention du paludisme au Mali.

CONCLUSION
ET
RECOMMENDATIONS

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1. CONCLUSION

Cette étude nous a permis d'estimer la prévalence des marqueurs de résistance sur les deux gènes étudiés. Nous avons observé des fortes fréquences des mutations sur le gène *Pfdhfr* aussi bien que le gène *Pfdhps*. Ces mutations témoignent encore de la pression médicamenteuse que crée la CPS ou l'utilisation continue de la SP. Une grande prévalence des mutations sur le gène *Pfdhfr* à la position 108 montre que nous pourrions rencontrer des cas de résistance à la Pyriméthamine. Les données de cette étude nous montrent qu'il faut continuer le suivi des marqueurs de résistance aux antipaludiques surtout dans les zones d'endémie palustre ou la prévalence du paludisme est élevée.

7.2. RECOMMANDATIONS

Au terme de notre étude, nous recommandons :

❖ **Au centre de santé de Dioro**

De donner le maximum d'information aux populations sur les méthodes de prévention de lutte contre le paludisme.

De continuer à veiller à la bonne dispensation des SP lors de la CPS et CPN.

❖ **Au LBMA**

De continuer cette étude en incluant la position 540 de *Pfdhps*.

❖ **Au programme national de lutte contre le paludisme PNLP**

De mener et soutenir des études de ce genre pour une meilleure prise en charge du paludisme chez les enfants et les femmes enceintes hautement à risque dans notre pays.

REFERENCES

8. REFERENCES

1. OMS. Paludisme [Internet]. 2017 [cité 10 avr 2018]. Disponible sur: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/fr/
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WORLD MALARIA REPORT 2017. [Internet]. S.l.: WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2018 [cité 1 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/en/>
3. Organización Mundial de la Salud. OMS. World Malaria Report [Internet]. Ginebra (Suiza): World Health Organization; 2009 [cité 11 mars 2017]. Disponible sur: <https://www.google.com/search?q=World+Health+Organization%3B+2009.&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab>
4. PNL. POLITIQUE NATIONALE DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME [Internet]. Ministère de la sante - MALI; [cité 4 févr 2018]. Disponible sur: <http://mail.cnom.sante.gov.ml/docs/pdf/politiquepnl.pdf>
5. Tinto H, Sanou B, Erhart A, D'Alessandro U, Ouédraogo JB, Guiguemdé TR. Sensibilité in vivo de Plasmodium falciparum à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine dans la région de Bobo Dioulasso (1998-2001) : étude des facteurs de risque associés aux échecs thérapeutiques de ces deux médicaments. Bull Soc Pathol Exot [Internet]. 2006 [cité 5 févr 2018];5. Disponible sur: <https://www.google.com/search?q=Tinto+H%2C+Sanou+B%2C+Erhart+A%2C+D%E2%80%99Alessandro+U%2C+Ou%C3%A9draogo+JB%2C+Guiguemd%C3%A9+TR.>
6. OMS. status-rep-artemisinin-act-resistance-sept2015.pdf [Internet]. OMS; 2015 [cité 18 déc 2017]. Disponible sur: www.who.int/malaria/publications/atoz/status-rep-artemisinin-act-resistance-sept2015.pdf?ua=1
7. Organisation Mondiale de Sante. L'utilisation des antipaludiques. Rapport de consultation (archive) [Internet]. OMS; 2000 [cité 18 avr 2018]. Disponible sur: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_rbm_2001_33/fr/
8. Woï L, Amambua NA, Laouali MM, Grais RF. Evaluation de la résistance moléculaire de plasmodium falciparum à la sulfadoxine-pyriméthamine chez les enfants de moins de 5 ans, Madarounfa, région de Maradi au Niger. [cité 12 déc 2017];1. Disponible sur: <https://www.google.com/search?q=Evaluation+de+la+r%C3%A9sistance+mol%C3%A9culaire+de+plasmodium+falciparum+%C3%A0+la+sulfadoxine+E2%80%90pyrim%C3%A9thamine+chez+les+enfants+de+moins+de+5+ans%2C+Madarounfa%2C+r%C3%A9gion+de+Maradi+au+Niger.+%3A&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab>
9. OMS. Traitement préventif intermittent du nourisson à la sulfadoxine-pyriméthamine (TPIIn-SP) pour lutter contre le paludisme en Afrique: GUIDE DE LA MISE EN OEUVRE SUR LE TERRAIN [Internet]. OMS; [cité 18 avr 2018]. Disponible sur:

http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70807/WHO_IVB_11.07_fre.pdf;jsessionid=01F8706132821D92CCE79B22AFF2BE2A?sequence=1

10. A-Elbasit IE, Alifrangis M, Khalil IF, Bygbjerg IC, Masuadi EM, Elbashir MI, et al. The implication of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase gene mutations in modification of Plasmodium falciparum characteristics. *Malar J* [Internet]. 2007 [cité 18 avr 2018];6(1):108. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-6-108>
11. Ménard D, Ariey F, Mercereau-Puijalon O. Étude de la résistance de Plasmodium falciparum. 2013 [cité 20 avr 2018];29:9. Disponible sur: publicationslist.org/data/didier.menard/ref-143/Menard_et_al,%20MS_2013.pdf
12. DEAP /Malaria Research and training center. Project paludisme urbain-péri-urbain : impact des supports imprégnés perméthrine sur l'anémie de la grossesse et morbidité palustre chez les enfants en milieu péri-urbain. [Internet]. 1996 [cité 18 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.google.com/search?q=DEAP+%2FMalaria+Research+and+training+center.+Project+paludisme+urbain->
13. Garba Mamata O. Contrôle de qualité de certains antiparasitaires (Métronidazole, Mébendazole, Niclosamide, Praziquantel) au Laboratoire National de la Santé. [Internet] [these de Pharmacie]. [BAMAKO]: Université de Bamako; 2005 [cité 16 déc 2017]. Disponible sur: www.hsd-fmsb.org/index.php/hsd/article/view/525
14. GENTILINI M, CAUMES Eric, DANIS Martin. *Medecine Tropicale*. 5ème édition-1993. [Internet]. Edition 5. librairie Lavoisier; 1993 [cité 5 févr 2018]. Disponible sur: <https://www.lavoisier.fr/livre/medecine>
15. F. Herwig Jansen. Artésunate et artéméther vers l'éradication du paludisme 2002. [Internet]. 2002 [cité 10 avr 2018]. Disponible sur: <https://fr.slideshare.net/atelier-paludisme/app-2006-asani-s5>
16. World Health Organization. World Malaria Report 2015. [Internet]. World Health Organization; 2016 [cité 3 oct 2017]. Disponible sur: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4778804>
17. Youssouf MD. DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT). 2015 [cité 12 nov 2017];123. Disponible sur: www.keneya.net/fmpos/theses/2016/pharma/pdf/16P05.pdf
18. Ruizendaal E, Tahita MC, Geskus RB, Versteeg I, Scott S, d'Alessandro U, et al. Increase in the prevalence of mutations associated with sulfadoxine–pyrimethamine resistance in Plasmodium falciparum isolates collected from early to late pregnancy in Nanoro, Burkina Faso. *Malar J* [Internet]. déc 2017 [cité 19 avr 2018];16(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-1831-y>
19. Djimdé 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. *Pub Med*

- [Internet]. 2008 [cité 2 mars 2108];7. Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337343>
20. 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. [Internet]. Europe Pubmed central; 2013 [cité 3 avr 2018]. Disponible sur: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3555126/
 21. Doumbo OK. 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 [Thèse de doctorat]. [France]: Montpellier II; 1992.
 22. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Fontenille D, Ravaonjanahary C, Richard A, et al. Typologie du paludisme en Afrique. [cité 11 avr 2018];19. Disponible sur: horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes.../39002.pdf
 23. Les dossiers thématiques de l'IRD. Vaincre le paludisme Les systèmes vectoriels [Internet]. [cité 12 avr 2018]. Disponible sur: http://www.suds-en-ligne.ird.fr/paludisme/pdf/3-systemes_vectoriels.pdf
 24. Y-T. TOURE. Etude 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 14 févr 2018]. Disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/cahiers/entomo/02302.pdf
 25. Antoine Berry. Plasmodium knowlesi La 5 ème espèce de Plasmodium humain [Internet]. Service de Parasitologie-Mycologie CHU Toulouse; [cité 21 avr 2018]. Disponible sur: <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/JNI/JNI11/CT/JNI2011-knowlesi-BERRY.pdf>
 26. J. Bonneville, C. Defrance, T. Miklaveč. GUIDE PRATIQUE DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME EN ENTREPRISE [Internet]. IRD; 2018 [cité 1 févr 2018]. Disponible sur: <http://docplayer.fr/13312311-Guide-pratique-de-lutte-contre-le-paludisme-en-entreprise-j-bonneville-c-defrance-t-miklaveč-avec-le-soutien-de.html>
 27. Professeur Pierre Aubry, Docteur Bernard, -, Alex Gaüzère. Médecine Tropicale : Paludisme [Internet]. 2017 [cité 10 déc 2017]. Disponible sur: www.medecinetropicale.com
 28. Tchomtchoua AS. Etude de la réinfection à Plasmodium falciparum chez les enfants âgés de 1-9 ans de Missira après clairance parasitaire en zone endémique nord saharienne du Mali. [Thèse de Pharmacie]. [Bamako]: USTT-B; 2008.. [Internet] [these de Pharmacie]. [BAMAKO]: Fmpos; 2008 [cité 19 avr 2018]. Disponible sur: <http://www.kenya.net/fmpos/theses/2016/pharma/pdf/16P05.pdf>
 29. Pr. E. Pichard. Semaine thématique paludisme IFMT Vientiane Laos [Internet]. Faculté de Médecine d'Angers; 2003 [cité 10 janv 2018]. Disponible sur:

- <http://docplayer.fr/21375046-Antipaludiques-semaine-thematique-paludisme-ifmt-vientiane-laos-8-12-decembre-2003-pr-e-pichard-faculte-de-medecine-d-angers.html>
30. NCBI. PubChem Coupoud [Internet]. [cité 20 avr 2018]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17134#section=2D-Structure>
 31. Organización Mundial de la Salud. Directives pour le traitement du paludisme. Genève: Organisation mondiale de la santé; 2011.
 32. 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 [cité 2 juin 2018];51(1):81-9. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016668519290203V>
 33. Ndiaye YD, Diédhiou CK, Bei AK, Dieye B, Mbaye A, Mze NP, et al. High resolution melting: a useful field-deployable method to measure dhfr and dhps drug resistance in both highly and lowly endemic Plasmodium populations. Malar J [Internet]. déc 2017 [cité 19 avr 2018];16(1). Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-1811-2>
 34. World Health Organization. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy Authors: [Internet]. OMS; 2009 [cité 11 avr 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241597531/en/>
 35. Rogier C1. Childhood malaria in endemic areas: epidemiology, acquired immunity and control strategies. [Internet]. pubmed; 2003 [cité 20 avr 2018]. Disponible sur: https://scholar.google.com/scholar?q=Rogier+C1.+Childhood+malaria+in+endemic+areas:+epidemiology,+acquired+immunity+and+control+strategies.+pubmed%3B+2003.&hl=fr&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar
 36. Bamaga OAA, Mahdy MAK, Lim YAL. Frequencies distribution of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase mutant alleles associated with sulfadoxine–pyrimethamine resistance in Plasmodium falciparum population from Hadhramout Governorate, Yemen. Malar J [Internet]. déc 2015 [cité 19 avr 2018];14(1). Disponible sur: <http://www.malariajournal.com/content/14/1/516>
 37. Abdullah N, Norahmad N, Jelip J, Sulaiman L, Mohd Sidek H, Ismail Z, et al. High prevalence of mutation in the Plasmodium falciparum dhfr and dhps genes in field isolates from Sabah, Northern Borneo. Malar J [Internet]. 2013 [cité 19 avr 2018];12(1):198. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-198>
 38. Siame MN, Mharakurwa S, Chipeta J, Thuma P, Michelo C. High prevalence of dhfr and dhps molecular markers in Plasmodium falciparum in pregnant women of Nchelenge district, Northern Zambia. Malar J [Internet]. déc 2015 [cité 19 avr 2018];14(1). Disponible sur: <http://www.malariajournal.com/content/14/1/190>
 39. Sridaran S, McClintock SK, Syphard LM, Herman KM, Barnwell JW, Udhayakumar V. Anti-folate drug resistance in Africa: meta-analysis of reported dihydrofolate

- reductase (*dhfr*) and dihydropteroate synthase (*dhps*) mutant genotype frequencies in African *Plasmodium falciparum* parasite populations. *Malar J* [Internet]. 2010 [cité 19 avr 2018];9(1):247. Disponible sur: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-9-247>
40. Kumar A, Singh V. The scenario of evolution in sulfadoxine-pyrimethamine resistance and diversity of multiplicity of infection in *msp2* clone of *Plasmodium falciparum* in Indian isolates strain. [cité 8 mars 2018];2. Disponible sur: https://www.escmid.org/.../escmid_elibrary
 41. Talisuna AO1, Langi P, Mutabingwa TK, Van Marck E, Speybroeck N, Egwang TG, Watkins WW, Hastings IM, D'Alessandro U. Intensity of transmission and spread of gene mutations linked to chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine resistance in *falciparum* malaria. [Internet]. pubmed; 2003 [cité 21 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13129527>
 42. Daniels R1, Ndiaye D, Wall M, McKinney J, Séne PD, Sabeti PC, Volkman SK, Mboup S, Wirth DF. Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with drug resistance in *Plasmodium falciparum* [Internet]. 2002 [cité 21 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430961>
 43. Koukouikila-Koussounda F, Bakoua D, Fesser A, Nkombo M, Vouvougui C, Ntoumi F. High prevalence of sulphadoxine-pyrimethamine resistance-associated mutations in *Plasmodium falciparum* field isolates from pregnant women in Brazzaville, Republic of Congo. *Infect Genet Evol* [Internet]. juill 2015 [cité 19 avr 2018];33:32-6. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713481500132X>
 44. Fatou Diawara,¹ Laura C. Steinhardt,² Almahamoudou Mahamar,¹ Tiangoua Traore,¹ Daouda T. Kone,¹ Halimatou Diawara,¹ Beh Kamate,³ Diakalia Kone,⁴ Mouctar Diallo,¹ Aboubacar Sadou,⁵ Jules Mihigo,^{2,5} Issaka Sagara,¹ Abdoulaye A. Djimde,¹ Erin Eckert,⁶ and Alassane Dicko corresponding author¹. Measuring the impact of seasonal malaria chemoprevention as part of routine malaria control in Kita, Mali.htm [Internet]. *Malaria journal*; 2017 [cité 17 mai 2018]. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-1974-x>
 45. Patrícia Salgueiro¹, José L Vicente¹, Conceição Ferreira², Vânia Teófilo¹, André Galvão¹, Virgílio E do Rosário¹, Pedro Cravo¹ and João Pinto*¹. Tracing the origins and signatures of antifolate resistance in island population of *plasmodium falciparum*. [Internet]. 2010 [cité 8 août 2017]. Disponible sur: <http://www.biomedcentral.com>

ANNEXES

9. ANNEXES

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : TELLY

Prénom : Modibo

Tel : (00223)-76644095/97821137 **E-mail** : modibopalmer@gmail.com

Titre de la thèse : Prévalence des mutations sur les gènes *pf dhfr* et *pf dhps* dans la commune rurale de DIORO

Nationalité : Malienne

Année Universitaire : 2017-2018

Ville de soutenance : Bamako-Mali

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

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

RESUME

L'apparition de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques a rendu plus difficile la lutte contre le paludisme. Ce phénomène a conduit plusieurs pays à modifier leurs politiques de lutte avec notamment le changement des médicaments de première intention. L'OMS recommande contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* une intervention ciblant les groupes à haut risque : Le traitement préventif intermittent à la sulfadoxine-pyriméthamine (TPIIn-SP) chez le nourrisson et le traitement préventif Intermittent pendant la grossesse (TPIg), consistant à administrer au moins deux doses de sulfadoxine-pyriméthamine (SP) aux deuxièmes et troisièmes trimestres de la grossesse. Une forte réduction de la sensibilité à la SP a été mise en évidence dans le bassin de l'Amazone ainsi qu'un peu partout en Asie du sud-est, En Afrique le taux de résistance était variable, se situant dans une fourchette de 10 à 50% lors des essais d'efficacité thérapeutiques s'étendant sur 14 jours. L'analyse groupée des mutations au niveau des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* permet de prévoir l'efficacité clinique de l'association Sulfadoxine-Pyriméthamine, largement utilisée en Afrique. C'est dans ce souci que nous avons effectué une étude de détection de mutations sur les gènes *pf dhfr* et *pf dhps* dans la commune rurale de Dioro entre Mai 2012 et Mars 2017. Cette étude concernait les enfants allant de 2 ans à 15 ans ayant une infection palustre à *P.falciparum* avec une parasitémie comprise entre 2000 et 200000 Tf/uL de sang. L'étude s'est tenue parallèlement à une autre étude portant sur

l'efficacité de la combinaison Artemether+Lumefantrine et les patients ont de ce fait reçu des doses de Coartem® et ont été suivi pendant une période de 42 jours, à J1, J2, J3, J7, J14, J21, J28, J35 à J42. Le HRM a été utilisé pour la détection de mutations. La multiplicité de l'infection a été estimée en utilisant le marqueur polymorphique *msp1*. Au total 214 enfants ont participé à cette étude. L'allotype K1 s'est révélé le plus fréquent dans cette localité avec **46,45%** suivi de l'allotype RO33 avec **31,56 %** puis l'allotype MAD20 avec **21,98 %**. Nous avons pu estimer la multiplicité de l'infection à **1.37** génotypes par patient. Les fréquences des mutations sur les gènes *dhfr* et *dhps* étaient supérieures à 50% sauf à la position 436 (40%). Cependant les mutations multiples avaient une prévalence faible inférieure à 20% sauf la triple mutation sur le gène *Pfdhfr* (66%). L'acide aminé Y (rarement identifié) a été retrouvé à la position 436 dans 15 échantillons avec une fréquence de 8,72%. Cette étude nous montre un nombre élevé de mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*, ce qui suggère aux acteurs de la santé un suivi continu de l'efficacité de ces molécules utilisées par le Programme nationale dans la prévention du paludisme au Mali.

Mots clés : Antipaludiques, *Sulfadoxine-Pyrimethamine*, Mutations, *Plasmodium falciparum* *msp1*, HRM

IDENTIFICATION SHEET**Last Name:** TELLY**First Name:** MODIBO**Tel:** (00223)-76644095 / 97821137**E-mail:** modibopalmer@gmail.com**Title:****Academic Year:** 2017-2018**City of defence:** Bamako-Mali**Place of deposit:** Library of Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology**Focus area:** Molecular Parasitology, Public Health, Pharmacology.**ABSTRACT**

The appearance of *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs has made the fight against malaria more difficult. This phenomenon has led several countries to change their policies of malaria treatment with notably the change of the first-line drugs. WHO recommended an intervention for *Plasmodium falciparum* malaria targeting high-risk groups: Intermittent Preventive Treatment in Infant with Sulphadoxine-Pyrimethamin (IPTi), and Intermittent Preventive Treatment during Pregnancy (IPTp), consisting of giving at least two doses of Sulphadoxine-Pyrimethamin (SP) in the second and third trimesters of pregnancy. A significant reduction in SP susceptibility was found in the Amazon Basin and throughout Southeast Asia. In Africa, the resistance rate was variable, falling within a range of 10 to 50% in therapeutic efficacy trials lasting 14 days. The pooled analysis of mutations at the level of the *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes makes it possible to predict the clinical efficacy of the Sulphadoxine-Pyrimethamin combination, widely used in Africa. It is in this concern that we carried out a mutation detection study on the *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes in the rural commune of Dioro between May 10, 2012 and March 22, 2017. This study concerned children ranging from 2 to 15 years old having *P.falciparum* malaria infection with parasitemia between 2000 and 200000 Tf / μ L of blood. The study was conducted in conjunction with another study of the efficacy of the combination of Artemether + Lumefantrine, thus patients received doses of Coartem® and were followed during 42 days on Day1, Day2, Day3, Day7, Day14, Day21, Day28, Day35 and Day42. HRM method has been used for the detection of mutations. The multiplicity of infection was estimated using the *msp1* polymorphic marker. A total of 214 children were included in this study. The K1 allotype was the most frequent in this locality with 46.45% followed by the RO33 allotype with 31.56% then the MAD20 allotype with 21.98%.

We were able to estimate the multiplicity of infection at 1.37 genotypes per patient. The frequencies of mutations on the *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes are greater than 50% except at position 436 (40%). The amino acid Y, rarely identified at the position 436 was found in 15 samples with a frequency of 8.72%. However, the multiple mutations had a low prevalence of less than 20% except for the triple mutation on the *Pfdhfr* gene (66%). This study showed us a high number of mutations on the *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes, which suggests to the actors of the health a continuous follow-up of the effectiveness of these molecules used by the National Program in the prevention of Malaria in Mali.

Keywords: antimalarial drugs, Sulphadoxine-Pyrimethamin, Mutation, *Plasmodium falciparum*, *msp1*, HRM.

SERMENT DE GALIEN



CLAUDIUS GALIENUS

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!