

BURKINA FASO
UNITE-PROGRES-JUSTICE

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE,
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL



MEMOIRE

Présenté par :

DA Dari Frédéric Yannick

Maître ès Sciences Biochimie- Microbiologie Appliquée

Pour l'obtention du :

Diplôme d'Etudes Approfondies en
Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques

Sur le Thème :

Etude de la relation entre les mutations du gène Pfmdr-1 de Plasmodium falciparum et la réponse au traitement avec deux combinaisons à base d'artémisinine

Soutenu le 11 / 06 / 2008 devant le Jury :

Président : Pr. Anicet Georges OUEDRAOGO

Directeur de mémoire: Dr Halidou TINTO

Membres : Dr. Roch K. DABIRE

N° d'ordre.....

DEDICACE

➤ *A mon Père et ma Mère*

Sans vos sacrifices, vos prières et bénédictions, les présents travaux n'auraient pas pu être réalisés. A travers ceci, trouvez un début de récompense à toutes ces années de sacrifices. Que le bon Dieu vous garde encore longtemps auprès de nous.

➤ *A mes oncles Ernest et Romaric, mes tantes Augustine et Fatou*

Vous qui m'aviez compris et qui aviez su me guider ; Votre soutien multiforme a été un atout majeur pour le succès de ce travail. Trouvez à travers ce modeste travail, un encouragement de vos efforts consentis. Que le seigneur veille sur vous et vous comble de toutes ses grâces.

➤ *Clément*

Tu as toujours demeuré pour moi un frère exemplaire ; tes encouragements et aides ont considérablement contribué à la stabilité de l'esprit. Que le tout Puissant raffermisse cet esprit d'union fraternelle et le repende davantage dans la famille

➤ *A mes cousins et cousines, neveux et nièces*

Tout en vous interpellant à plus d'effort dans le travail je vous souhaite un avenir brillant

➤ *A ma bien aimée Aminata Natacha*

Ta compagnie m'a été un grand réconfort lors des circonstances pénibles ; à toi je renouvelle mon sincère amour. Que Dieu nous unisse pour l'éternité.

➤ *A ma partenaire de lutte Rosalie*

Nous parvenons sûrement au terme d'une première étape de notre carrière. Que l'esprit de collaboration règne et se consolide davantage.

REMERCIEMENTS

- **A mon Directeur de mémoire Dr Tinto Halidou PharmD PhD chargé de recherche;**
 Homme de grande simplicité, sérieux et respectueux, votre rigueur dans le travail, votre passion de la science, votre esprit critique, votre constante disponibilité sont autant de qualités et de compétences qui vous couronnent dans votre carrière de chercheur. En dépit de votre agenda chargé, vous avez accepté nous accueillir et nous encadrer dans votre structure dans les conditions adéquates; A vous je ne saurais quoi dire ; simplement merci
 Après ce mémoire, fruit de notre première relation, vous resterez toujours une source inestimable pour me guider dans la vie.

- **Au Pr. George Anicet Ouédraogo et au Pr. Jean Bosco Ouédraogo,**
 Soucieux de la formation des étudiants, vous aviez mis à leur disposition un cycle doctoral ; L'initiative est noble et mérite d'être soutenue. Votre constante disponibilité à écouter les étudiants et votre parfaite collaboration avec les institutions d'accueil, demeurent un atout majeur pour le déroulement harmonieux de la formation.
 Au nom de l'ensemble des étudiants et à mon nom propre je vous présente nos sincères remerciements.

- **A Madame Zampa Odile,**
 Votre constante disponibilité, vos précieux conseils ont été d'un apport indispensable pour l'aboutissement de ce travail. Soyez rassurée de notre profonde gratitude.

- **Au personnel de la session Entomologie-Parasitologie**
Dr Innocent VALEA, Dr Hervé KPODA et tous les techniciens : Vos soutiens multiformes ont vivement contribué à la réalisation de ce travail ; à vous mes sincères remerciements.

- **Au personnel de l'IRSS,**
 La disponibilité du service et l'équipement, la bonne collaboration ont permis de réaliser ce travail avec succès. A vous, merci

- **A l'équipe de Séguédin Sibalo Amadou, Tinto Sanata, le personnel du CSPS de Séguédin**
 Votre soutien et votre intervention ont été un acte louable de solidarité lors des dures épreuves et mésaventures du terrain ; je vous adresse mes sincères remerciements.

Title: Relationship between the *Plasmodium falciparum* *Pfmdr-1* gene mutations and the responses to the treatment with two artemisinin-based combinations.

Abstract

Malaria treatment and control have been compromised by the spread of *Plasmodium falciparum* resistance to commonly used antimalarial drugs in several areas. Therefore, many African countries, including Burkina Faso, have changed their drug policy with the adoption of combination therapies with artemisinin derivatives. However, such choice has been done without knowing the local effectiveness of these drugs. We therefore propose to study the effectiveness of two combinations, artesunate plus amodiaquine (COARSUCAM™) and arthemeter-lumefantrine (Coartem®) in Burkina Faso, by investigating the relationship between the responses to treatments and the *Pfmdr-1* gene mutations.

The study was carried out in Nanoro Medical Center, Burkina Faso. We enrolled 165 children aged 6–59 months with symptoms of uncomplicated malaria including axillary temperature ≥ 37.5 °C; mono infection with *P. falciparum*; and parent's willingness to give consent. Patients were randomly assigned to receive standard doses of either artemether-lumefantrine or amodiaquine + Artesunate and followed up during 42 days. Primary endpoints were the treatment outcome adjusted by genotyping to distinguish recrudescence from new infection. Afterwards, we evaluated polymorphisms in the *Pfmdr-1* gene and their relationship with treatment failures. Clinical evaluation of patients showed that cumulative PCR-corrected cure rates were 79,75% for AS+AQ and 78,05% for AL. For the *pfmdr-1* gene, there was no mutation at position 1034. However, 34,36% and 6,25% of mutant alleles were found at position 86 and at position 1246 respectively. We found no relationship between the mutant genotypes and treatment failures to AL and AS+AQ.

Key words: *Plasmodium falciparum*; drug resistance; *Pfmdr-1*; Artemisinin derivatives.

Titre : Etude de la relation entre les mutations du gène *Pfmdr-1* de *Plasmodium falciparum* et la réponse au traitement avec deux combinaisons à base d'artémisinine

Résumé

Le traitement et le contrôle du paludisme sont compromis par l'expansion de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques usuels dans plusieurs régions. Par conséquent, plusieurs pays africains y compris le Burkina Faso ont changé leur politique de traitement avec l'adoption des combinaisons à base d'artémisinine. Cependant, ce choix a été fait sans information sur l'efficacité de l'utilisation locale de ces traitements. C'est dans ce contexte que nous avons conduit la présente étude sur l'efficacité de l'utilisation de deux combinaisons, artesunate plus amodiaquine (COARSUCAM™) et arthemeter-lumefantrine (Coartem®) au Burkina Faso, en investiguant la relation entre la réponse aux traitements et les mutations du gène *Pfmdr-1*.

L'étude a été conduite dans le Centre Médical de Nanoro au Burkina Faso. Nous avons inclus 165 enfants âgés de 6–59 mois présentant des symptômes de paludisme simple avec une température axillaire $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$; une mono infection à *P. falciparum*; et dont les parents consentaient à leur participation. Il était administré aux patients de façon aléatoire des doses standard de arthemeter-lumefantrine ou amodiaquine + Artesunate et ceux-ci étaient ensuite suivis pendant 42 jours. Le critère primaire d'efficacité était la réponse au traitement ajustée par la PCR pour distinguer les recrudescences des nouvelles infections. Ensuite, nous avons évalué le polymorphisme du gène *Pfmdr-1* et sa relation avec les échecs au traitement. L'évaluation clinique des patients a rapportée un taux de guérison de 79,75% pour la AS+AQ et 78,05% pour le AL. Pour le gène *pfmdr-1*, nous n'avons noté aucune mutation à la position 1034. Cependant, 34,36% et 6,25% d'allèles mutants ont été identifiés respectivement à la position 86 et à la position 1246. Nous n'avons noté aucune relation entre les génotypes mutants et les échecs au traitement à AL et AS+AQ.

Mots clés: *Plasmodium falciparum*; Chimiorésistance ; *Pfmdr-1*

Table des Matières

Sigles et Abréviations	viii
Liste des Tableaux et Figures	ix
I. INTRODUCTION.....	1
II. GENERALITES SUR LE PALUDISME	2
1. Agent pathogène et ses vecteurs	2
2. Cycle biologique du parasite.....	2
3. Physiopathologie du paludisme	4
4. Formes cliniques du paludisme à <i>P. falciparum</i>	4
5. Diagnostic biologique du paludisme.....	5
a. Les schizonticides sanguins	6
b. Les antifolates	7
c. Les associations médicamenteuses à base d'artémisinine	8
7. Détermination de la chimiorésistance.....	8
a. les facteurs liés aux antipaludiques.....	8
b. les facteurs liés à l'immunité de l'hôte	9
c. les facteurs liés aux parasites et aux vecteurs	9
8. Méthodes d'études de la chimiorésistance de <i>Plasmodium falciparum</i>	9
a. Tests <i>in vitro</i>	9
b. Tests <i>in vivo</i>	9
c. Tests moléculaires.....	10
9. Polymorphisme génétique de <i>Plasmodium falciparum</i>	10
10. Caractéristiques du gène <i>Pfmdr-1</i> et de son produit d'expression.....	10
III. OBJECTIFS DE L'ETUDE	12
1. Objectif général.....	12
2. Objectifs spécifiques.....	12
IV. METHODOLOGIE.....	13
1. Site et population d'étude	13
2. Sélection des patients et administration des traitements.....	13
3. Etudes moléculaires	14
a. Extraction de l'ADN génomique de <i>Plasmodium</i>	15
b. Amplification des séquences spécifiques d'ADN	15
c. Détermination du polymorphisme génétique de <i>mssl et msp2</i>	15
d. Génotypage des allèles <i>Pfmdr1-86, Pfmdr1-1034, Pfmdr1-1246</i>	17
4. Analyse des données et interprétation des résultats	22
VI. RESULTATS	24
1. Caractéristiques de la population d'étude.....	24
2. Résultats cliniques et parasitologiques	24
3. Prévalence des allèles du gène <i>Pfmdr-1</i>	25
4. Relation entre les mutations du gène <i>Pfmdr-1</i> et la réponse au traitement.....	26
VI. DISCUSSION	28
1. De l'efficacité thérapeutique de AL et AS+AQ	28
2- De la réalisation des tests de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	28
3. De la prévalence des allèles du gène <i>Pfmdr-1</i> dans la population de parasites étudiés.....	29
4. De la relation entre les mutations du gène <i>Pfmdr-1</i> et la réponse au traitement	29
VII. CONCLUSION	30
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	31

Sigles et Abréviations

µmol/L: micro moles/litre

ADN: Acide désoxyribonucléique

AL : Arthémeter-Luméfantrine

AS+AQ : Artésunate plus Amodiaquine

ATP: Adénosine triphosphate

BET: Bromure d'Ethidium

bp: base paire

dNTPs: Désoxyribonucléotides triphosphates

EPP: Echech Parasitologique Précoce

EPT: Echech Parasitologique Tardif

ETP: Echech Thérapeutique Précoce

ETT: Echech Thérapeutique Tardif

mA: milliampère

ml/j: millilitre par jour

***m*sp1, 2:** Merozoite Surface Protein 1, 2

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

***Pf*ert:** *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene

***Pf*CRT:** *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter protein

***Pf*dhfr:** *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase

***Pf*dhps:** *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthetase

***Pf*mdr-1 :** *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1

***Pgh*1:** *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 protein

RCPA : Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate

SP: Sulfadoxine–pyrimethamine

TBE: Trizma acid-Boric EDTA

V: volt

WHO: World Health Organisation

Liste des Tableaux et Figures

Tableaux

Tableau 1 : Substitution des amino-acides aux différents points de mutation	11
Tableau 2 : Posologie du Coartem®.....	13
Tableau 3 : Posologie du COARSUCAM™	14
Tableau 4 : Tableau de suivi des patients pendant les 42 jours.....	14
Tableau 5 : Composition des mélanges réactionnels pour la première et la deuxième PCR pour l'amplification des <i>msp1</i> et <i>msp2</i>	16
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des programmes d'amplifications des gènes <i>msp1</i> et <i>msp2</i>	16
Tableau 7 : Exemple non exhaustif d'interprétation des gels.....	17
Tableau 8 : Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR de <i>Pfmdr-1 86</i>	18
Tableau 9 : Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR de.....	19
Tableau 10 : Programmes d'amplification et séquences des primers pour analyse de.....	20
Tableau 11 : Tableau récapitulatif de la digestion enzymatique	21
Tableau 12 : Mélanges réactionnels pour la digestion enzymatique	21
Tableau 13 : Caractéristiques démographiques et cliniques des deux groupes de traitement	24
n (%)	24
Tableau 14 : Réponse au traitement par AL et AS+AQ avant et après PCR [%(<i>n/N</i>)].....	25
Tableau 15 : Prévalence des allèles par point de mutation [%(<i>n/N</i>)].....	25
Tableau 16 : Association entre les différents allèles et la réponse au traitement avec AL.....	26
Tableau 17 : Association entre les différents allèles et la réponse aux traitement : AS+AQ.....	27

Figures et photo

Figure 1 : Cycle de vie du <i>Plasmodium falciparum</i>	3
Figure 2 : Structure de la protéine <i>pfmdr-1</i> indiquant les différents points de mutation	11
Photo1 : Profil électrophorétique de l'ADN après digestion pour la détection des allèles du <i>Pfmdr-1 1246</i>	22

I. INTRODUCTION

Le paludisme ou malaria est une endémie redoutable dont l'agent et le mode de transmission sont connus depuis la fin du XIX^e siècle. Pendant longtemps, la monothérapie dans le traitement du paludisme simple a généré des résultats satisfaisants. Cependant, de nos jours, la capacité à traiter et à contrôler les infections à *Plasmodium* par la monothérapie est compromise par l'émergence et l'expansion de la résistance aux antipaludiques usuels. Face à ces difficultés de prise en charge thérapeutique, plusieurs pays ont modifié leur politique de traitement du paludisme (Shretta et al, 2000). En effet, il est généralement convenu que les pays endémiques devraient opter pour des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) comme meilleure alternative dans le traitement du paludisme, réduire l'émergence et l'extension de la résistance (Nosten F et al. 2000, Adjuik et al, 2002). C'est ainsi que le Burkina Faso a adopté depuis Février 2005 l'association Artemeter-Lumefantrine (AL ou Coartem®) et l'association Amodiaquine + Artésunate (AS+AQ, COARSUCAMTM) comme médicaments de première intention dans le traitement du paludisme simple. Toutefois, Il a été rapporté dans une étude conduite en Ouganda que le traitement à l'artemether-lumefantrine ou artesunate + amodiaquine est suivi de symptômes d'un paludisme récurrent avant 28 jours après le traitement, dans 27% et 42% des cas respectivement (Bukirwa et al, 2006). De tels résultats montrent la nécessité de collecter plus d'informations sur l'efficacité de ces ACTs surtout lorsque qu'ils sont utilisés en condition réelle. Cependant au Burkina Faso, peu de données sont disponibles dans ce sens et notamment celles qui concernent la sensibilité du parasite vis-à-vis de ces nouveaux types de traitement. Les recherches dans le domaine de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques ont permis d'identifier les mutations des gènes *Pfmdr-1* et *Pfcr1* comme causes déterminantes de la résistance du parasite vis-à-vis des amino-4-Quinoléines (Cortese et al, 2002 ; Talisuna et al, 2004 ; Hastings et al, 2004). Cependant, le rôle de ces deux gènes, notamment celui du *Pfmdr-1*, dans la baisse de l'efficacité thérapeutique des ACTs est très discuté (Martensson et al, 2005 ; Holmgren et al, 2007). C'est dans ce contexte, que nous avons conduit la présente étude pilote afin d'évaluer la relation entre les mutations du gène *Pfmdr-1* et la réponse au traitement avec les combinaisons AL et AS+AQ lorsqu'elles sont utilisées en condition réelle en milieu rurale du Burkina Faso.

II. GENERALITES SUR LE PALUDISME

1. Agent pathogène et ses vecteurs

L'agent pathogène du paludisme est un protozoaire endoparasite de la classe des Sporozoaires du genre *Plasmodium*. Estimées à environ 140 espèces, seulement quatre sont impliquées dans les pathologies humaines. Il s'agit notamment de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*. De ces quatre, l'espèce falciparum apparaît la plus répandue, la plus virulente, responsable d'environ 74% des formes cliniques potentiellement mortelles (**Korenromp, 2004**).

La transmission du parasite à l'homme est assurée par un moustique dont la systématique se présente comme suit : Embranchement des Arthropodes, classes des Insectes, ordre des Diptères, famille des *Culicidae*, genre *Anopheles*. On retrouve parmi 32 espèces, 4 impliquées dans la transmission du paludisme au Burkina Faso. Ce sont *Anopheles gambiae* ss, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles funestus* ss et *Anopheles nili* repartis selon les différentes zones climatiques du pays (**Diabate et al, 2004 ; Dabiré et al, 2007**). Leur reproduction requiert certaines conditions climatiques : l'eau, la température, la nature du sol, la végétation naturelle; ce qui explique la forte prévalence de la maladie en hivernage. Avec un maximum d'activité entre 23 heures et 6 heures, l'anophèle femelle, hématophage, inocule le parasite à l'homme pendant son repas sanguin.

2. Cycle biologique du parasite

Le cycle biologique du *Plasmodium* exige deux hôtes : l'hôte intermédiaire (homme ou autres mammifères) et l'hôte définitif (l'anophèle femelle).

➤ Chez l'homme

Il se déroule la reproduction asexuée ou développement schizogonique subdivisé en deux phases.

- La phase hépatique ou pré-érythrocytaire ou exo-érythrocytaire : en effet l'homme s'infecte par la piqûre de l'anophèle au cours de son repas qui lui inocule les sporozoïtes. Après une trentaine de minutes, les sporozoïtes, véhiculés par le sang, parviennent au niveau du foie. Dans les hépatocytes, ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires qui après quelques jours de maturation éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes dans le sang.

- La phase érythrocytaire : Une fois les mérozoïtes libérés, ils pénètrent dans les érythrocytes, subissent une maturation en trophozoïtes, puis en schizontes et conduisent à leur destruction

libérant 8 à 32 nouveaux mérozoïtes. Ce cycle érythrocytaire se poursuit de façon synchrone à partir de ces nouveaux mérozoïtes. Après un certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes subissent une maturation d'une dizaine de jours, accompagnée d'une différenciation sexuée : ils se transforment en gamétocytes mâles et femelles.

➤ **Chez l'anophèle femelle**

Les gamétocytes ingérés par le moustique lors de son repas sanguin chez un sujet infecté se transforment en gamètes mâles et femelles qui fusionnent en un œuf libre, mobile appelé ookinète. Ce dernier quitte la lumière du tube digestif, se fixe ensuite à la paroi externe de l'estomac et se transforme en oocyste. Les cellules parasitaires se multiplient à l'intérieur de cet oocyste, produisent des centaines de sporozoïtes qui migrent ensuite vers les glandes salivaires du moustique. Les sporozoïtes sont les formes infestantes, prêtes à être inoculées avec la salive du moustique lors de son prochain repas sanguin sur un sujet sain. Cette phase qualifiée de développement sporogonique est d'une durée variable selon l'espèce, et fonction des conditions climatiques.

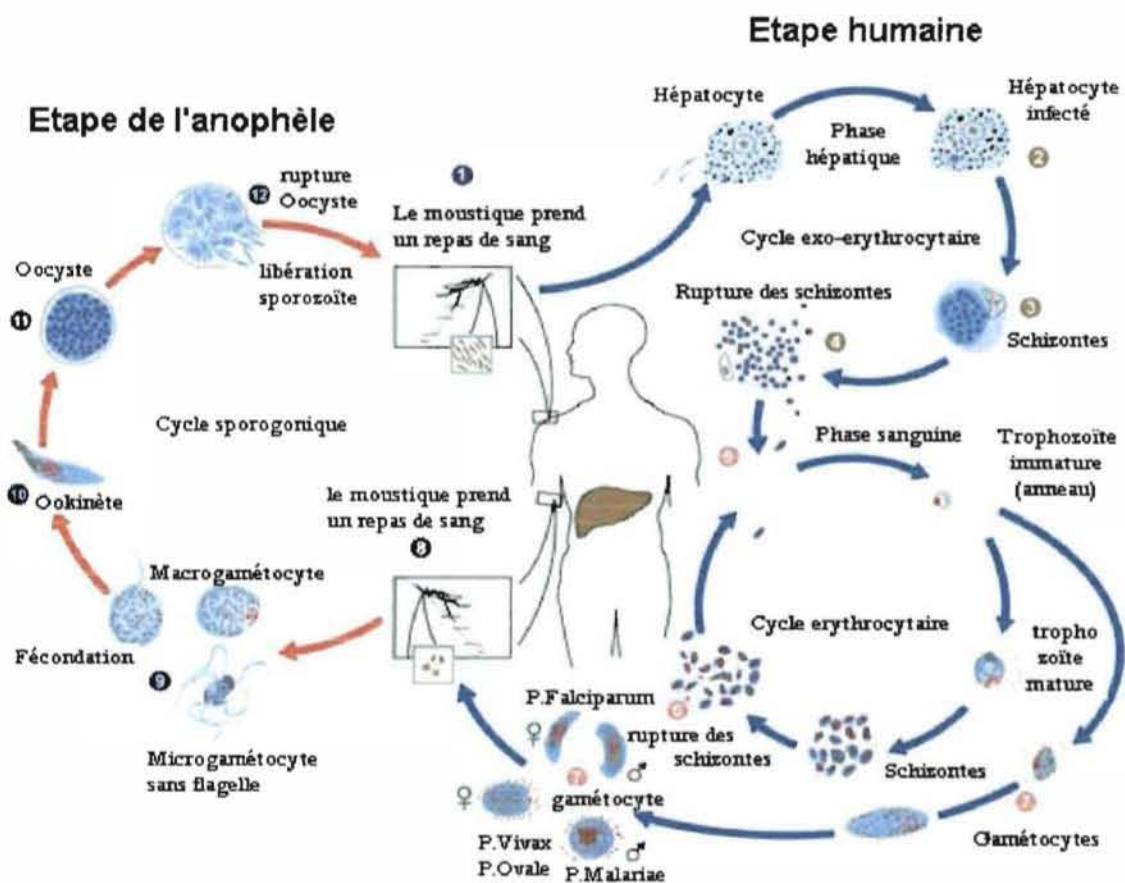


Figure 1: Cycle de vie du *Plasmodium falciparum*

Source : <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

3. Physiopathologie du paludisme

La physiopathologie du paludisme n'est pas encore clairement élucidée, mais les répercussions de l'infection palustre sur certains organes ont été bien décrites.

- Pendant la phase érythrocytaire, il se produit une hémolyse, responsable d'une anémie. L'hémoglobine issue de l'hémolyse se métabolise entraînant la présence de l'hémoglobinurie et une hausse de la bilirubine, d'où l'installation quelque fois de l'ictère. Aussi, la digestion de l'hémoglobine par le parasite occasionne dans son cytoplasme une précipitation de granules de pigments appelées hémozoïnes. L'hémozoïne et l'hémoglobine transformées par les histiocytes donnent lieu à l'hémosidérine de couleur jaune sombre.
- La rate est également l'un des organes cibles du paludisme ; on note une hypertrophie, cause d'une augmentation de la pulpe blanche. Elle devient molle et congestive, sa couleur caractéristique rouge foncé parfois brune est due à une accumulation de pigments internalisés dans les phagocytes.
- Au niveau du foie, il se produit la destruction d'un certain nombre de cellules parenchymateuses, mais sans aucune lésion inflammatoire dans la plupart des cas.
- Pour le neuropaludisme, complication majeure du paludisme à *P. falciparum*, plusieurs théories probablement complémentaires, prônent une séquestration d'hématies parasitées par des formes mûres de *Plasmodium* adhérents aux cellules endothéliales des micro- vaisseaux et l'internalisation des cytokines et autres médiateurs.

4. Formes cliniques du paludisme à *P. falciparum*

En fonction des symptômes, de l'immunité du sujet et de certains facteurs génétiques liés aux parasites, on distingue plusieurs types d'accès palustres :

- L'accès palustre de primo invasion à *P. falciparum*

Il s'agit de l'incubation correspondant à la durée de la phase hépatocytaire (7 à 12 jours) : il est totalement asymptomatique.

- Le paludisme simple

Il se caractérise par des accès palustres classiques sans signe de malignité. Marquée par la phase d'invasion, elle se manifeste par une fièvre continue (température > 37, 5°C) accompagnée de céphalées, de nausée et de vomissement. La phase d'état survient par la suite et se caractérise par une intensification de la fièvre (39 à 40 °C), des sueurs et des frissons, la persistance des céphalées et des vomissements et parfois d'une hépatomégalie.

➤ Le paludisme grave

Généralement conséquence d'une absence de traitement ou d'une défaillance thérapeutique, le paludisme grave est sa forme avancée, observée surtout chez les sujets immuns (jeunes enfants, femmes enceintes, voyageurs...). L'OMS a défini des critères de gravité du paludisme, et la présence d'un seul de ces critères cliniques ou biologiques associés à la présence de *P. falciparum* dans le sang fait porter le diagnostic d'accès palustre grave (WHO, 2003).

5. Diagnostic biologique du paludisme

C'est un diagnostic de certitude basé sur la mise en évidence du parasite de ses métabolites ou des anticorps. Selon l'élément recherché on distingue : le diagnostic direct et le diagnostic indirect.

Le diagnostic direct

- le diagnostic par la microscopie : sur une lampe porte objet on prélève quelques gouttes de sang, puis on effectue la goutte épaisse et le frottis mince. Après fixation du frottis mince à l'alcool (méthanol) on procède à la coloration soit au Giemsa soit au Fiel, ayant la capacité de se fixer soit sur le cytoplasme pour donner une coloration bleue et sur le noyau pour donner une coloration rouge. La lecture se fait au microscope optique à fond clair à l'objectif 100 avec de l'huile à immersion.

- la détection d'acide nucléique spécifique : certaines techniques de la biologie moléculaire notamment la Réaction de Polymérisation en Chaîne (P.C.R) permettent une détection inter ou intra spécifique de *Plasmodium* avec un seuil inférieur à 5 parasites par microlitre de sang (Moody, 2002). Cette technique apparaît exacte, mais est onéreuse et requiert des plus de temps.

Pour simplifier le diagnostic biologique du paludisme, d'autres techniques ont été développées dont les tests rapides par immunochromatographie sur bandelette.

Le diagnostic indirect

La recherche d'anticorps sériques biosynthétiques contre les parasites est souvent utilisé pour diagnostiquer, une infection à *Plasmodium*. Cependant d'autres anticorps sériques persistent après infection ; ce qui constitue une limite de cette technique.

6. Médicaments antipaludiques - Mode d'action - Mécanisme de résistance du parasite

Suivant leur mode d'action et leur cible, on distingue plusieurs familles d'antipaludiques. Chacun d'eux agit spécifiquement sur une cible bien déterminée, et d'éventuelles modifications des cibles peuvent conduire dans la plupart des cas à un défaut d'interaction antipaludique – *Plasmodium*. La chimiorésistance parasitaire est donc l'aptitude d'une souche de parasite à survivre et/ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un antipaludique donné, à des doses thérapeutiques supérieures ou égales à la dose tolérable par un sujet humain (WHO, 1965). Notons que cet antipaludique doit être en contact direct avec le parasite ou les érythrocytes infectées pendant un certain temps nécessaire pour l'action normale du médicament (Bruce- Chwatt et al, 1986).

a. Les schizonticides sanguins

Ce sont la chloroquine, la méfloquine, l'amodiaquine, l'artémisinine, la quinine

- L'efficacité sélective des schizonticides sanguins est le fait de leur concentration très élevée atteintes dans les hématies parasitées par rapport aux hématies non parasitées (Warhurst et al, 2002). Une fois dans l'hématie, le *Plasmodium* se nourrit d'hémoglobine dont la dégradation produit la ferriprotoporphyrine (FP) substance toxique pour le parasite. Pour détoxifier cette substance, le *Plasmodium* sécrète une protéine qui se lie à la FP, la rendant inactive. Dans la vacuole digestive, certains antipaludiques comme les amino-4 quinoléines s'y concentrent grâce à un gradient de pH et se fixent à FP. Le complexe antipaludique-FP formé demeure toujours toxique pour le parasite, et par ce processus les amino-4 quinoléines inhibent la digestion de l'hémoglobine (Bray et al, 1998)

- Pour la résistance aux amino-4-quinoléines, toutes les théories s'accordent à reconnaître que la caractéristique commune des parasites résistants est une altération de l'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive. Autrement dit, lorsqu'un parasite est résistant il y a un flux rapide de l'antipaludique de la vacuole digestive, ce qui lui permet de survivre. Si cette conception est un consensus, il naît cependant des divergences en ce qui concerne le mécanisme. Pour certains le défaut d'accumulation des schizonticides est provoqué par une altération des gradients de pH et/ou donc de la perméabilité membranaire (Le Bras et al, 2003). D'autres par contre décrivent le mécanisme, reposant sur une stimulation de l'échange sodium /proton (Na⁺/H⁺) (Wünsch et al, 1998) chez les parasite sensibles, et de ce fait augmente le transport du médicament chez ces parasites. Cependant, les travaux récents de

Bray et al sur la question se fondent essentiellement sur un déficit de la liaison CQ-FP inhérent à une altération dans l'environnement local de la FP, plutôt qu'à l'implication d'un mécanisme de stimulation de l'échange Na^+/H^+ ou une altération du gradients de pH. Cette théorie, la plus plausible est liée à une protéine transmembranaire localisée sur la membrane de la vacuole digestive (Bray et al, 1999). Précédemment admis qu'il s'agissait de la protéine *pfmdr1*, codée par un gène muté situé sur le chromosome 5 et d'un autre gène situé sur le chromosome 7 (PfCg2) ((Foote et al, 1990 ; SU et al, 1997)), d'autres études ont par la suite réfuté ces 2 théories (Grobusch et al, 1998 ; Durand et al, 1999). Récemment un gène (PfCRT) situé à proximité de PfCg2 a été identifié chez les souches résistantes.

b. Les antifolates

Les principaux antifolates utilisés dans le traitement du paludisme sont la pyriméthamine, la sulfadoxine, le cycloguanil et bien d'autres. Les *Plasmodium* humains ne peuvent pas utiliser la pyrimidine de l'hôte, précurseur des acides nucléiques pour se multiplier. Pour synthétiser ses propres pyrimidines, les *Plasmodium* utilisent l'acide folique, un cofacteur enzymatique essentiel de la biosynthèse des l'ADN. Le principe actif des antifolates est donc principalement une inhibition enzymatique compétitif de l'ADN du parasite. En exemple, la pyriméthamine et le cycloguanil analogues structuraux du dihydrofolate réductase (DHFR) sont des inhibiteurs compétitifs de cette enzyme du *P. falciparum*. Les mutations ponctuelles du gène codant pour la dihydrofolate réductase (*Pfdhfr*) sont les bases moléculaires de résistance à ces antipaludiques.

Quant à la sulfadoxine, analogue structurale de l'acide para-amino benzoïque (PABA), elles inhibent spécifiquement l'activité de la dihydroptéroate synthétase (*dhps*) du parasite. Les mutations ponctuelles du gène de la dihydroptéroïte synthétase sont également les bases moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine en association avec la pyriméthamine. (fansidar^R).

Ces inhibitions enzymatiques de la synthèse de l'ADN ont donc pour conséquence un arrêt de la multiplication des parasites.

c. Les associations médicamenteuses à base d'artémisinine

L'OMS a préconisé depuis 2002 l'utilisation des associations d'antipaludiques schizonticides à effet synergique comportant un dérivé d'artémisinine. L'artémisinine est une molécule extraite de *l'Artemisia annua*, une plante médicinale chinoise, dont la vertu thérapeutique a été prouvée par plusieurs études (**Adjuik et al, 2002**). Cette molécule et ses dérivés que sont l'artéméther et l'artésunate, sont parmi les antipaludiques les plus efficaces. En effet ils éliminent plus rapidement les parasites à différents stades d'évolution (**Faye et al, 2002**) ainsi que les gamétocytes (**Kofoed et al, 2002**) présents dans le sang. Cependant ils ont une demi-vie courte d'environ 1 heure à 2 heures (**Dinis et al, 1990**). Pour augmenter leur effet, mais aussi retarder l'apparition de résistances, ils sont administrés en association avec autres molécules à longue demi-vie telles que l'amodiaquine ou la luméfantrine : ce sont les ACTs ou combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine.

7. Détermination de la chimiorésistance

Plusieurs facteurs contribuent à l'apparition et à l'émergence de la chimiorésistance.

a. les facteurs liés aux antipaludiques

La fréquence et l'usage massif des antipaludiques entraînent une émergence de la chimiorésistance soit par la sélection d'individus résistants, soit par induction de mutation. En effet, plus la pression médicamenteuse est forte et constante, plus les parasites s'évertuent à s'adapter et à se multiplier malgré cette pression. Cette adaptation se manifeste par une émergence de la chimiorésistance. (**Payne, 1988 ; Diourte et al, 1999**). Les antipaludiques à demi-vie longue (méfloquine, sulfadoxine-Pyriméthamine 95-180h) éliminent les parasites sensibles et protège l'organisme contre de nouvelles infections. Cependant, lorsque leur concentration est inférieure au seuil thérapeutique on assiste à une recrudescence, voire un envahissement de l'organisme par les souches résistantes (**Hasting et al, 2002**).

b. les facteurs liés à l'immunité de l'hôte

L'immunité de prémunition améliore l'efficacité thérapeutique d'un antipaludique.

Les personnes naïves aux paludismes développent une immunité non spécifique contre les parasites et sont donc des réservoirs de multiplications et de propagation des souches plasmodiales chimiorésistantes (Alène et Bennett, 1996).

c. les facteurs liés aux parasites et aux vecteurs

Indépendamment de toute pression médicamenteuse, des mutations spontanées susceptibles d'induire une résistance peuvent survenir au niveau des génomes plasmodiales. Moins le nombre de mutations requis pour la chimiorésistance est élevé, plus vite celle-ci intervient (White, 1999). De plus, certaines souches résistantes se reproduisent plus facilement chez certains vecteurs (*Anopheles dirus*) que les souches chimiosensibles (Wernsdorfer, 1994).

8. Méthodes d'études de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*

a. Tests *in vitro*

Les tests *in vitro* sont basés sur la capacité de certains médicaments à inhiber la croissance de *Plasmodium* en milieu de culture. Les tests les plus couramment utilisés sont :

- Le microtest de l'OMS qui permet au moyen d'un microscope de dénombrer les trophozoïtes.
- Le microtest isotopique qui permet la mesure de la croissance parasitaire par l'évaluation de la quantité d'hypoxanthine radioactive incorporée dans les molécules d'ADN du parasite.

b. Tests *in vivo*

Standardisé par l'OMS, ces tests rendent compte de la nature biologique des traitements antipaludiques. Des patients souffrant de paludisme sont sélectionnés, traités avec un antipaludique puis sont suivis sur le plan clinique et biologique pendant 28 ou 42 jours suivant le régime thérapeutique reçu. Les résultats sont définis en termes d'échec thérapeutique précoce (ETP), échec clinique tardif (ECT), échec parasitologique tardif (EPT), réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) de réponse clinique et parasitologique.

c. Tests moléculaires

Les techniques de biologie moléculaire, ont permis l'élucidation des mécanismes moléculaires de la chimiorésistance et l'identification de marqueurs moléculaires de la chimiorésistance de *Plasmodium* aux antipaludiques.

9. Polymorphisme génétique de *Plasmodium falciparum*

Le matériel génétique de *Plasmodium* comporte 3 types d'acides nucléiques : mitochondriale, nucléaire et plastidique, utilisés pour l'étude de la diversité génétique du parasite. Son caryotype possède 14 chromosomes de taille différente, allant de 25.10^6 à 30.10^6 paires de bases. Pour la différenciation des clones recrudescent des clones de nouvelle infection, on utilise généralement les protéines de surface des mérozoïtes (*msp1*, *msp2*).

Les brassages inter et intrachromosomiques affectant certains gènes et les pressions immunitaires sont les principales sources de l'émergence du polymorphisme au niveau des antigènes, origine des résistances. La protéine *pfert*, codée par un gène muté et impliquée dans la résistance à la chloroquine en est un exemple.

10. Caractéristiques du gène *Pfmdr-1* et de son produit d'expression

Situé sur le chromosome 5 du *Plasmodium falciparum*, le gène *Pfmdr-1* comporte 4260 paires de bases et code pour une protéine dénommée « *pfmdr* protéine ». C'est un polypeptide transmembranaire au niveau de la vacuole digestive du parasite (figure 2), d'environ 162kDa et comportant 1419 acides aminés. Cette protéine intervient dans la régulation de la concentration intravacuolaire des médicaments antipaludiques (Cowman et al, 1991).

Le gène *Pfmdr-1* subit souvent des mutations ponctuelles dont la conséquence immédiate est la synthèse de la protéine mutée capable de lui conférer une résistance aux antipaludiques. Les polymorphismes de la protéine sont observés au niveau des positions 86, 184, 1034, 1042 et 1246 où s'est effectuée une substitution d'acides aminés comme l'indique le tableau 1.

Tableau 1 : Substitution des amino-acides aux différents points de mutation

génotype	Amino-acides et positions mutationnelles				
	86	184	1034	1042	1246
Sauvage	N (asparagine)	Y (Tyrosine)	S (Sérine)	N (asparagine)	D (acide aspartique)
mutant	Y (Tyrosine)	F (Phényl alanine)	C (cystéine)	D (acide aspartique)	Y (Tyrosine)

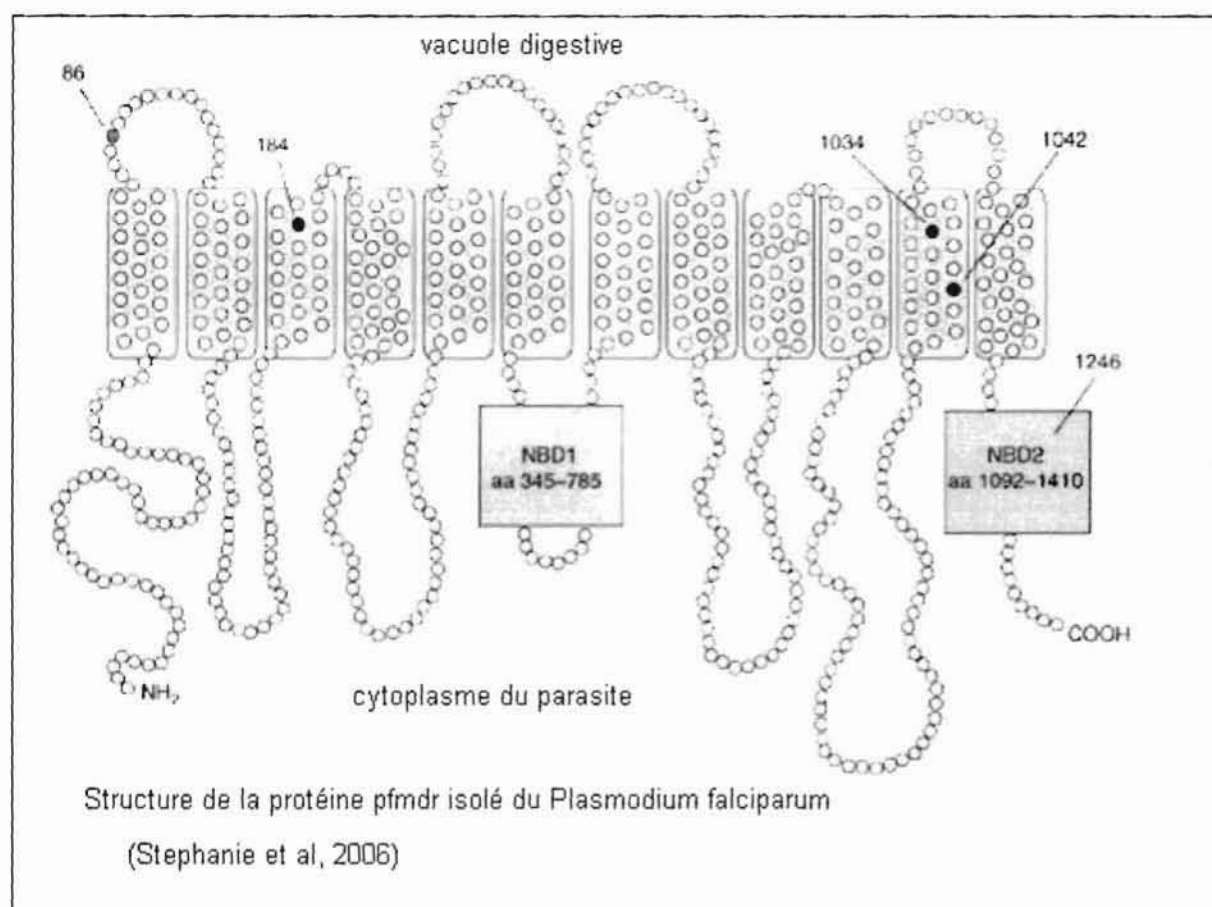


Figure 2 : Structure de la protéine *pfmdr-1* indiquant les différents points de mutation

III. OBJECTIFS DE L'ETUDE

1. Objectif général

- Etudier la relation entre les mutations du gène *Pfmdr-1* et les échecs thérapeutiques aux combinaisons AL et AS+AQ lorsqu'elles sont utilisées en condition réelle en milieu rural du Burkina Faso.

2. Objectifs spécifiques

- Déterminer la prévalence des échecs thérapeutiques cliniques et parasitologiques ;
- Déterminer la fréquence des mutations *Pfmdr-1 86Y*, *Pfmdr-1 1034C* et *Pfmdr-1 1246Y* dans la population d'étude,
- Vérifier l'association entre la présence de ces mutations et les échecs thérapeutiques aux combinaisons AL et AS+AQ

IV. METHODOLOGIE

1. Site et population d'étude

L'étude a été menée de Septembre à Décembre 2006 au Centre Médical Saint Camille de Nanoro qui relève de la province du Boulkiemdé et est situé au centre du Burkina Faso, à 85km de Ouagadougou. Sa population est estimée à 131.710 habitants. Le paludisme y sévit de façon holoendémique avec une transmission maximale pendant l'hivernage (Mai-Octobre). La population d'étude était constituée d'enfants de 6 à 59 mois des deux sexes habitant la localité de Nanoro.

2. Sélection des patients et administration des traitements

Les procédures de sélection des patients ainsi que les critères d'inclusion sont détaillés dans un protocole standard défini par l'OMS en 2003 pour les études d'efficacité thérapeutique des antipaludiques (WHO, 2003).

Les traitements étaient administrés aux patients selon une liste de randomisation définie à l'avance. La première dose du traitement a été administrée par les infirmiers sur place au centre de santé afin d'expliquer aux mères en charge des enfants la bonne pratique d'administration. Ensuite, le reste du traitement leur a été remis pour une administration à domicile conformément aux pratiques standard.

La combinaison AL a été utilisée sous sa forme de spécialité Coartem®. La dose de Coartem® a été administrée de façon journalière en fonction du poids pendant 3 jours (tableau 2). Les comprimés contiennent 20 mg d'Artemether et 120 mg de Luméfantrine.

Tableau 2 : Posologie du Coartem®

Poids en kg	Nombre de comprimés par dose
5 to < 15 kg	1 comprimé par dose
15 to < 25 kg	2 comprimés par dose
25 to < 35 kg	3 comprimés par dose

La combinaison AS+AQ a été utilisée sous sa forme de spécialité COARSUCAM™. La dose de COARSUCAM™ était administrée en fonction du poids corporel une fois par jour pendant 3 jours (tableau 3).

Tableau 3 : Posologie du COARSUCAM™

Poids	Formulation	Comprimés/jour
<9 Kg	COARSUCAM™ 25 mg/67,5 mg	1
9-17.9Kg	COARSUCAM™ 50 mg/135 mg	1
18-35.9 Kg	COARSUCAM™ 100 mg/270 mg	1

Le suivi clinique et biologique des patients s'est déroulé pendant 42 jours conformément au tableau 4.

Tableau 4 : Tableau de suivi des patients pendant les 42 jours

Jour	J0	J1	J2	J7	J14	J21	J28	J3 5	J4 2	Autres jours
Température et poids	X									
Examen clinique	X			X	X	X	X	X	X	X
Lame (GE et parasitémie)	X			X	X	X	X	X	X	X
Hématologie (Hb)	X				X		X		X	X
Consentement éclairé	X									
Confettis pour PCR	X				X	X	X	X	X	X
Thérapie	X	X	X							
Événements indésirables	X			X	X	X	X	X	X	X
Visite	V1			V2	V3	V4	V5	V6	V7	

3. Etudes moléculaires

Ces études moléculaires avaient deux composantes essentielles qui étaient :

1- l'étude du polymorphisme génétique de *msh1* et *msh2* de *Plasmodium falciparum* pour la distinction entre les recrudescences et les nouvelles infections.

2- le génotypage pour la détection des allèles *Pfmdr1-86*, *Pfmdr1-1034* et *Pfmdr1-1246*.

Ces analyses ont été réalisées en utilisant la méthode de «polymerase chain reaction» (PCR) ou réaction de polymérisation en chaîne. Cette méthode comporte trois grandes étapes qui sont l'extraction du matériel génétique, l'amplification et la révélation des produits d'amplification.

a. Extraction de l'ADN génomique de *Plasmodium*

L'ADN a été extrait à partir des papiers confettis selon la méthode de chelex-100 (Plowe et al, 1995). Brièvement, les érythrocytes sont lysés dans une solution de saponine 0,5% puis l'ADN est séparé des autres composants cellulaires grâce à une résine de chelex 5%.

b. Amplification des séquences spécifiques d'ADN

Nous avons utilisé la méthode de «Nested PCR» ou PCR nichée pour l'amplification des séquences d'ADN de *P. falciparum*. Cette variante de la PCR, consiste en une série de deux PCR au moyen de deux paires différentes d'amorces. Les fragments d'ADN amplifiés au cours de la première PCR contiennent les séquences qui seront appariées avec la deuxième paire d'amorces. Cette deuxième amplification dite «nichée» rend la technique très sensible.

c. Détermination du polymorphisme génétique de *mSP1* et *mSP2*

La polyclonalité des infections à *P. falciparum* a été déterminée par une nested PCR des gènes *mSP1* et *mSP2*.

➤ Mélange réactionnel et programme d'amplification de *mSP1* et *mSP2*

Pour *mSP1* et *mSP2*, les constituants (volume et concentration des réactifs) sont identiques hormis les séquences des paires d'amorces. Les composants des mélanges réactionnels pour la première et la deuxième PCR de *mSP1* et *mSP2* sont présentées dans le Tableau 5. Le produit de la première amplification a servi de source d'ADN pour la deuxième amplification.

Tableau 5 : Composition des mélanges réactionnels pour la première et la deuxième PCR pour l'amplification des *msp1* et *msp2*

Réactifs	Concentration de la solution stocke	Concentration finale	Volume (µL) à prélever
H2O ultra pure	-	-	16.05
Primer sens	10 µM	0.2µM	0.5
Primer antisens	10 µM	0.2µM	0.5
Buffer	10x	1x	2.5
dNTPs	2mM each	200µM each	2.5
MgCl	50 mM	1.5mM	0.75
Taq polymérase	5 U/µL (INV)	1 Unit	0.2
Extrait d'ADN	--	--	2.0
Volume final = 25 µL			

Lors de la première PCR les couples d'amorces utilisés étaient : O1/O2 pour *msp1* et S2/S3 pour *msp2* ; au cours de la seconde PCR les amorces N1/N2 et S1/S4 ont été respectivement utilisés pour le *msp1* et le *msp2*.

Les 25 µl, contenus dans un micro tube stérile, ont été incubés dans un thermocycler (*Master cycler gradient*) sous un programme spécifique à chaque gène (Tableau 6).

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des programmes d'amplification des gènes *msp1* et *msp2*.

Gènes		Amorce et séquences (5'-3')	Programme d'amplification
<i>msp1</i>	1 ^{ère} amplification.	O1:5'-CACATGAAAGTTATCAAGAAGCTTGTC3' O2 :5'-GTACGCTAATTCATTGACACG 3'	94°C x 3min;(94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x 30; 72°C x 3min
	2 ^{ème} amplification.	N1: 5'-GCAGTATTGACAGGTTATGG-3' N2: 5'-GATTGAAAGGTATTTGAC-3'	94°C x 3min;(94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x30; 72°C x 3min
<i>msp2</i>	1 ^{ère} amplification.	S3: 5'-GAAGGTAATTAACATTGTC-3' S2 :5'-GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 42°C x 1min; 65°C x 2min,) x30; 72°C x 3min
	2 ^{ème} amplification.	S1: 5'-GAGTATAAGGAGAAGTATG-3' S4 :5'-CTAGAACCATGCATATGTCC-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 1min; 70°C x 2min,) x30; 72°C x 3min

➤ Analyse des produits de la PCR nichée

Les produits obtenus après la PCR nichée sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2,5 % mélangé à du bromure d'éthidium (5-éthyl-3,8-diamino-6-phénylphénanthidine).

Dans les puits du gel placé dans une cuve à électrophorèse contenant un tampon TBE (Trizma Boric acid EDTA) 0.5X, 5µl de chaque produit de la PCR nichée est déposé. L'électrophorèse est réalisée à une intensité de 400mA sous une tension de 80 volts pendant 1 heure 30 minutes. Le bromure d'éthidium a la propriété de s'intercaler entre les fragments des molécules d'ADN, et d'émettre une fluorescence à 622 nm quand il est excité aux rayons ultra- violets. Sous illumination ultra violet, les fragments d'ADN apparaissent sous forme de bandes à différentes positions sur le gel. Pour un même patient, on compare le nombre et la position des bandes de fragments d'ADN du jour d'inclusion (J0) et du jour d'échec thérapeutique (J-échec). Les résultats sont exprimés en terme de recrudescence, nouvelle infection, ou indéterminé. On détermine le statut à partir du polymorphisme de la *msp1* et *msp2* (tableau 7).

Tableau 7 : Exemple non exhaustif d'interprétation des gels

Statut	Caractéristiques
Nouvelle infection	Nombre et taille des bandes à J0 et J-échec sont différents
Recrudescence	Taille de certaines bandes à J0 et J-échec sont identiques
Indéterminé	PCR négative pour J0 ou J-échec

d. Génotypage des allèles *Pfmdr1-86*, *Pfmdr1-1034*, *Pfmdr1-1246*

➤ Amplification

La détermination du statut sauvage ou mutant des l'allèles *Pfmdr-1 86*, *Pfmdr-1 1034* *Pfmdr-1 1246* a été effectuée par nested PCR. Les amorces utilisées pour chaque allèle ainsi que les milieux réactionnels ont été résumés dans le tableau 8 et 9 :

Tableau 8: Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR de *Pfmdr-1 86*

	Réactifs	Concentration de la solution stocke	Concentration Final	Volume (en μL)
PCR 1	H ₂ O	-	-	12,8
	Primer sens: MDR-A1	10 μM	0,2 μM	0,5
	Primer antisens:MDR-A3	10 μM	0,2 μM	0,5
	Tampon	5X	1X	5
	dNTP	2mM chacun	200 μM	2,5
	MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
	Taq (INV)	5U/ μL (INV)	1 U	0,2
	Extrait d'ADN	inconnue	Inconnue	2
	volume Final		25	
PCR 2	H ₂ O	-	-	12,8
	Primer sens:MDR-A2	10 μM	0,2 μM	0,5
	Primer antisens:	10 μM	0,2 μM	0,5
	Tampon:MDR-A4	5X	1X	5
	dNTP	2mM chacun	200 μM	2,5
	MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
	Taq (INV)	5U/ μL (INV)	1 U	0,2
	Extrait d'ADN	inconnue	Inconnue	2
	volume Final		25	

Tableau 9: Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR de *Pfmdr-1-1034* et *Pfmdr-1-1246*

	Réactifs	Concentration de la solution stocke	Concentration Final	Volume à prélever (en μL)
PCR 1	H ₂ O	-	-	12,8
	Primer sens: MDR-O1	10 μM	0,2 μM	0,5
	Primer antisens:MDR-O2	10 μM	0,2 μM	0,5
	Tampon	5X	1X	5
	dNTP	2mM chacun	200 μM	2,5
	MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
	Taq (INV)	5U/ μL (INV)	1 U	0,2
	Extrait d'ADN	inconnue	Inconnue	2
	volume Final = 25			
PCR 2	H ₂ O	-	-	12,8
	Primer sens:1034F	10 μM	0,2 μM	0,5
	Primer antisens:1042R	10 μM	0,2 μM	0,5
	Tampon	5X	1X	5
	dNTP	2mM chacun	200 μM	2,5
	MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
	Taq (INV)	5U/ μL (INV)	1 U	0,2
	Extrait d'ADN	inconnue	Inconnue	2
	volume Final = 25			

N.B. Pour l'allèle *Pfmdr-1-1246* les primers sens (1246F) et les primers antisens (MDR-02) ont été utilisés pour la nested PCR (tableau 10).

Ces mélanges réactionnels ont été incubés dans un thermocycler sous un programme spécifique à chaque point de mutation décrit dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Programmes d'amplification et séquences des primers pour analyse de *Pfmdr-1* 86 *Pfmdr-1* 1034 *Pfmdr-1* 1246

Gène et étape de la PCR	Primers (5' → 3')	Programmes d'amplification
<i>Pfmdr-1</i> 86 PCR 1	MDR-A1: (30 bp) TGTTGAAAGATGGGTAAAGAGCAGAAAGAG MDR-A3: (33 bp) TACTTCTTATTACATATGACACCACAAACA	Dénaturation initiale 94°C x 2m PCR 30 cycles; 94°C x 1m, 45°C x 1m, 72°C x 45s élongation finale 72°C x 5 m Conservation à 4 °C
<i>Pfmdr-1</i> 86 PCR 2	MDR-A4: (30 bp) AAAGATGGTAACCTCAGTATCAAAGAAGAG MDR-A2: (33 bp) GTCAAACGTGCATTTTTTTATTAATGACCATTTA	Dénaturation initiale 94°C x 2m PCR 30 cycles; 94°C x 1m, 52°C x 1m, 72°C x 45s élongation finale 72°C x 5 m Conservation à 4 °C
<i>Pfmdr-1</i> 1034, 1246 PCR 1	MDR-O1 (33 bp) AGAAGATTATTTCTGTAATTTGATACAAAAAGC MDR-O2 (30 bp) ATGATTCGATAAATTCATCTATAGCAGCAA	Dénaturation initiale 94°C x 2m PCR 30 cycles; 94°C x 1m, 52°C x 1m, 72°C x 45s élongation finale 72°C x 5 m Conservation à 4 °C
<i>Pfmdr-1</i> 1034 PCR 2	1034F (33 bp) AGAATTATTGTAATGCAGCTTTATGGGGACTC 1042R (33 bp) AATGGATAATATTTCTCAAATGATAACTTAGCA	Dénaturation initiale 94°C x 2m PCR 30 cycles; 94°C x 1m, 52°C x 1m, 72°C x 45s élongation finale 72°C x 5 m Conservation à 4 °C
<i>Pfmdr-1</i> 1246 PCR 2	1246F (35 bp) ATGATCACATTATATTAATAAATGATATGACAAAT MDR-O2 (30 bp) ATGATTCGATAAATTCATCTATAGCAGCAA	Dénaturation initiale 94°C x 2m PCR 30 cycles; 94°C x 1m, 52°C x 1m, 72°C x 45s élongation finale 72°C x 5 m Conservation à 4 °C

Afin de servir de témoins, l'ADN d'une souche sauvage 3D7 et de souches mutantes DD2 pour l'allèle *Pfmdr-1* 86, 7G8 pour les allèles *Pfmdr-1* 1034 et *Pfmdr-1* 1246 ont été parallèlement amplifiés avec les échantillons.

➤ **Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction et Electrophorèse du produit de la digestion**

Pour la digestion des produits de la nested PCR, les enzymes de restriction AflIII, DdeI, EcoRV ont été utilisés respectivement pour les point 86, 1034, 1246. Ces enzymes, toutes

extraites des clones de *Echerishia coli* ont des sites de reconnaissance et de coupure, spécifiques comme l'indique le tableau 11. Il indique également la taille attendue des bandes.

Tableau 11 : Tableau récapitulatif de la digestion enzymatique

Enzyme	Site de reconnaissance et de coupure	Nombre et taille (en pb) des bandes des sauvages	Nombre et taille (en pb) des bandes des mutants
Afl III	5'...A [↓] CRYGT...3' 3'...TGYRCA [↓] ...5'	Pas de coupure : 500	2 bandes : 232, 328
Dde I	5'...C [↓] TNAG...3' 3'...GANT [↓] C...5'	2 bandes : 60, 172	2 bandes : 27, 205
EcoR V	5'...GAT [↓] ATC...3' 3'...CTA [↓] TAG...5'	Pas de coupure : 344	2 bandes : 153, 191

Afin de digérer le produit de la nested PCR, un mélange réactionnel de chaque enzyme a été préparé conformément aux indications du tableau 12 et incubé à la température optimale de 37°C pendant au moins 1,5 heure.

Tableau 12 : Mélanges réactionnels pour la digestion enzymatique

Point de mutation	Réactifs	Concentration du stocke	Concentration finale	Volume à prélever (µL)
<i>Pfmdr-1</i> 86	H ₂ O	-	-	7.4
	NEB3	10X	1X	2.0
	BSA	100X	1X	0.2
	Afl III (NEB)	5 U/µL	2 U	0.4
	Produit de Nested PCR	inconnue	inconnue	10.0
Final volume 20.0				
<i>Pfmdr-1</i> 1034	H ₂ O	-	-	7.8
	NEB3	10X	1X	2.0
	Dde I (NEB)	10U/µL	2 U	0.2
	Produit de Nested PCR	inconnue	inconnue	10.0
Final volume 20.0				
<i>Pfmdr-1</i> 1246	H ₂ O	-	-	7.7
	NEB3	10X	1X	2.0
	BSA	100X	1X	0.2
	EcoR V (NEB)	20 U/µL	2 U	0.1
	Produit de Nested PCR	inconnue	inconnue	10.0
volume Final 20.0				

A l'issue de la digestion, 10µL du produit final est déposé sur gel d'agarose 2,5 % contenant 7,5 µL de BET pour 100 µL de TBE 1X. L'électrophorèse a été réalisée à une intensité de 400 mA sous une tension de 90 V pendant un temps de 1 heure 30 minutes

Parallèlement à l'ADN des patients, un marqueur de poids 100pb et les témoins sauvages et mutants ont été migrés pour l'interprétation des bandes. Le caractère sauvage ou mutant d'un échantillon est déterminé en fonction de la position des bandes par rapport à celles de DD2 / 7G8 ou 3D7, tout en se référant au marqueur de poids comme l'indique la photo 1



Photo1 : Profil électrophorétique de l'ADN après digestion pour la détection des allèles du *Pfm-dr-1* 1246.

L : marqueur de poids 100 paires de bases ; 3D7 (344 pb) : contrôle sauvage ; 7G8 (153 et 191 pb) : contrôle mutant ; 3 et 17 : souches mutantes ; 1, 2, 4 ... 16, 18 ... 24 : souches sauvages

4. Analyse des données et interprétation des résultats

Les données ont été saisies sur le logiciel EXCEL 2003 et analysées avec le logiciel Epi Info 6.04. Le test de Chi 2 a été utilisé pour comparer les variables catégorielles et mesurer leur association avec un niveau de significativité de 5% ($p < 0,05$).

Les résultats de l'efficacité thérapeutique sont exprimés en terme de:

- Echec Thérapeutique Précoce (ETP) qui correspond à l'un des cas suivants :
 - (i) Développement de signes de danger ou de paludisme grave au jour 0, jour 1, jour 2 ou jour 3, en présence de parasitémie ;
 - (ii) Densité parasitaire au jour 2 > à celle du jour 0, indépendamment de la température axillaire ;
 - (iii) Présence de parasitémie au jour 3 avec fièvre (température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$) ;
 - (iv) Parasitémie au jour 3 $\geq 25\%$ à celle du jour 0.
- Echec Thérapeutique Tardif (ETT)

- L'ETT est divisé en Echech clinique tardif et en Echech parasitologique tardif

Echech Clinique Tardif (ECT) :

- (i) Développement de signes de danger ou de paludisme grave après le jour 3 en présence de parasitémie.
- (ii) Présence de parasitémie et fièvre n'importe quel jour après le jour 3 sans avoir répondu aux critères de la ETP

Echech Parasitologique Tardif (EPT) :

Réapparition de la parasitémie après le jour 3 en l'absence de fièvre (Température axillaire < 37,5°C) sans avoir précédemment répondu aux critères d'ETP ou d'ECT.

Le taux d'échech thérapeutique constitue la somme des ETP et des ETT rapportés à l'ensemble de l'échantillon.

- La réponse clinique et parasitologique adéquate (**RCPA**).

Elle est définie comme l'absence de parasitémie à la fin de la période de suivi, indépendamment de la température axillaire sans avoir répondu précédemment à aucun de ces critères d'échech thérapeutique précoce ou tardif. Dans les estimations ajustées, les patients qui auront une réapparition tardive de parasite (avec ou sans fièvre) seront considérés comme RCPA si l'analyse de la PCR montre une nouvelle infection plutôt qu'une recrudescence.

VI. RESULTATS

1. Caractéristiques de la population d'étude.

Du 26 Septembre au 16 Décembre 2006, sur la base des critères décrits dans le protocole (WHO, 2003), cent soixante cinq (165) patients ont été inclus dans l'étude. Pour cet effectif, la moyenne d'âge était de 26,02 mois avec pour valeurs extrêmes 6 mois et 59 mois, et le sexe ratio (masculin /féminin) était de 1,54. Parmi les cent soixante cinq patients, quatre vingt trois (83) ont reçu la combinaison Artemether-Lumefantrine (AL) comme traitement et quatre vingt deux (82), la combinaison Artésunate + Amodiaquine (AS + AQ) (tableau 13). Au terme de l'étude nous avons enregistré au total 3 perdus de vue et un décès. Au total cent soixante un (161) patients ont bénéficié d'un suivi complet durant 42 jours dont quatre vingt deux (82) dans le bras AL et soixante dix neuf (79) dans le bras AS+AQ.

Tableau 13: Caractéristiques démographiques et cliniques des deux groupes de traitement
n (%)

	Groupe AL 83 (50,30)	Groupe AQ+AS 82 (49,70)
- Sexe : féminin	30 (36,14)	35 (42,68)
- Sexe : masculin	53 (63,86)	47 (53,32)
Age moyenne (en mois)	26,21	25,67
Température moyenne à J0 (en °c)	37,96	38,02
Densité Parasitaire à J0 : Moyenne géométrique [95%CI]	29067	33757
Poids moyen à J0 (en kg)	10,00	10,12

2. Résultats cliniques et parasitologiques

L'analyse des résultats cliniques et parasitologiques a porté sur les 161 patients qui ont terminé leur suivi de 42 jours. Sur la base des observations cliniques et microscopiques, les taux d'échecs thérapeutiques bruts (avant correction par la PRC) étaient de 60,07% et de 53,16% respectivement pour AL et pour AS+AQ. La différence entre ces 2 taux n'était pas statistiquement significative [OR = 1,79 ; IC 95% (0,90 – 3,58)] P = 0,07]. Par la suite, ces

résultats ont été ajustés après l'interprétation des résultats de la PCR (*m_{sp} 1/m_{sp} 2*) afin de distinguer les recrudescences des nouvelles infections. Cela a donné des taux de 21,95% et 20,25% respectivement pour AL et pour AS+AQ. Là également, la différence observée entre ces 2 taux n'était pas statistiquement significative [OR = 1,11 ; IC 95% (0,49 – 2,53)] P = 0,7]

Tableau 14 : Réponse au traitement par AL et AS+AQ avant et après PCR [%(*n*/*N*)]

Classification non corrigée par la PCR	AL (N=82)		AS+AQ (N=79)		p
	ETT	RCPA	ETT	RCPA	
	67,07 (55/82)	32,93 (27/82)	53,16 (42/79)	46,84 (37/79)	0,7
Classification corrigée par la PCR	21,95 (18/82)	78,05 (64/82)	20,25 (16/79)	79,75 (63/79)	0,7

3. Prévalence des allèles du gène *Pfmdr-1*

Pour déterminer la prévalence des différents allèles dans la population des parasites étudiés, les 165 échantillons prélevés au jour d'inclusion avant l'administration du traitement (J0), ont été analysés par la PCR. Nous avons obtenu 163 résultats interprétables (98.79%). Nous n'avons noté aucune mutation ponctuelle de gène *Pfmdr-1* à la position 1034. Cependant le génotypage a révélé des mutations ponctuelles aux proportions de 34,36% [IC 95% (27,10 – 42,18)] et 6,75 % [IC 95% (3,46 – 11,90)] respectivement pour la position 86 et la position 1246. La différence observée entre ces deux taux était statistiquement significative ($p < 0.00001$).

Tableau 15 : Prévalence des allèles par point de mutation [%(*n*/*N*)]

génotype	<i>Pfmdr-1</i> 86	<i>Pfmdr-1</i> 1034	<i>Pfmdr-1</i> 1246
Sauvage	65,64 (107/163)	100 (163/163)	93,25 (152/163)
mutant	34,36 (56/163)	00 (0/163)	6,75 (11/163)

4. Relation entre les mutations du gène *Pfmdr-1* et la réponse au traitement

En vue d'établir la relation entre les échecs thérapeutiques et les mutations du gène *Pfmdr-1*, nous nous sommes intéressés aux différents allèles de la population et procéder à la détermination de leur proportion en fonction des réponses aux traitements administrés.

Par la suite nous avons effectué une comparaison entre les ETT et les RCPA (y compris les NI) pour chaque allèle de la population, puis par combinaison d'allèles.

Pour ce qui est de la relation entre la réponse au traitement avec AL et la présence des différents allèles du gène *Pfmdr-1 86*, nous avons noté que la prévalence de l'allèle mutant *Pfmdr-1 86Y* était similaire à celle de l'allèle sauvage *Pfmdr-1 N86* aussi bien dans la population des ETT que dans celle des RCPA (tableau 16). Nous n'avons pas pu établir de relation entre la présence de la mutation *Pfmdr-1 86Y* et l'échec au traitement [OR = 0,96 (0,31 - 2,91) ; P = 0,9]. En ce qui concerne le gène *Pfmdr-1 1246*, nous avons noté une forte prévalence de l'allèle sauvage *Pfmdr-1 D1246* aussi bien dans la population des ETT que dans celle des RCPA. Là également, nous n'avons pas pu établir de relation entre la présence de la mutation 1246Y et l'échec au traitement [OR = 1,28 (0,0 - 7,33) ; P = 0,09]. Le résultat de l'étude de la combinaison des différents allèles des deux gènes suit la même tendance. En effet nous avons noté une forte proportion des allèles sauvage/sauvage (*Pfmdr-1 N86 / Pfmdr-1 D1246*) comparée aux allèles mutant/mutant (*Pfmdr-1 86Y / Pfmdr-1 1246Y*) aussi bien dans la population des ETT que dans celle des RCPA. Nous avons également noté une prévalence plus importante des allèles mutant/sauvage (*Pfmdr-1 86Y / Pfmdr-1 D1246*) comparée à celle des allèles sauvage/mutant (*Pfmdr-1 N86 / Pfmdr-1 1246Y*) aussi bien dans la population des ETT que dans celle des RCPA.

Tableau 16 : Association entre les différents allèles et la réponse au traitement avec AL

	Pfmdr-1 N86Y (n=82)		Pfmdr-1 D1246Y (n=82)		Pfmdr-1 N86Y/D1246Y (n=82)			
	Sauvage N86	Mutant 86Y	Sauvage D1246	Mutant 1246Y	Sau/sauvage N86/D1246	Sau/mutant N86/1246Y	Mut/sauvage 86Y/D1246	Mut/mutant 86Y/1246D
RCPA (n=64)	56,25% (36/64)	43,75% (28/64)	90,63% (58/64)	09,37% (6/64)	54,69% (35/64)	01,56% (1/64)	35,94% (23/64)	07,81% (5/64)
ETT (n=18)	55,56% (10/18)	44,44% (8/18)	88,89% (16/18)	11,11% (2/18)	55,56% (10/18)	00% (0/18)	33,33% (6/18)	11,11% (2/18)
NI (n=37)	51,35% (19/37)	48,65% (18/37)	91,89% (34/37)	08,11% (3/37)	51,35% (19/37)	00% (0/37)	40,54% (15/37)	08,11% (3/37)

Pour ce qui est de la relation entre la réponse au traitement avec AS+AQ et la présence des différents allèles du gène *Pfmdr-1 86*, nous avons noté une forte prévalence de l'allèle sauvage *Pfmdr-1 N86* comparativement à l'allèle mutant aussi bien dans la population des ETT que dans celle des RCPA (tableau 17). Nous n'avons pas pu établir de relation entre la présence de la mutation *Pfmdr-1 86Y* et l'échec au traitement [OR = 0,54 (0,11 - 2,29) ; P = 0,5]. En ce qui concerne le gène *Pfmdr-1 1246*, comme dans le cas de AL, nous avons noté une forte prévalence de l'allèle sauvage *Pfmdr-1 D1246* aussi bien dans la population des RCPA que dans celle des ETT. Elle était même de 100% pour ce dernier. Là également, nous n'avons pas pu établir de relation entre la présence de la mutation *1246Y* et l'échec au traitement (P = 0,9). Le résultat de l'étude de la combinaison des différents allèles des deux gènes suit la même tendance. En effet nous avons noté une forte proportion des allèles sauvage/sauvage (*Pfmdr-1 N86 / Pfmdr-1 D1246*) comparée aux allèles mutant/mutant (*Pfmdr-1 86Y / Pfmdr-1 1246Y*) aussi bien dans la population des ETT que dans celle des RCPA. Nous avons également noté une prévalence plus importante des allèles mutant/sauvage (*Pfmdr-1 86Y / Pfmdr-1 D1246*) comparée à celle des allèles sauvage/mutant (*Pfmdr-1 N86 / Pfmdr-1 1246Y*) aussi bien dans la population des ETT que dans celle des RCPA.

Tableau 17: Association entre les différents allèles et la réponse au traitement : AS+AQ

	<i>Pfmdr-1 N86Y</i> (n=77)		<i>Pfmdr-1 D1246Y</i> (n=77)		<i>Pfmdr-1 N86Y/D1246Y</i> (n=77)			
	Sauvage N86	Mutant 86Y	Sauvage D1246	Mutant 1246Y	Sau/sauvage N86/D1246	Sau/mutant N86/1246Y	Mut/sauvage 86Y/D1246	Mut/mutant 86Y/1246Y
RCPA (n=61)	73,77% (45/61)	26,23% (16/61)	95,08% (58/61)	04,92% (3/61)	72,13% (44/61)	1,64% (1/61)	22,95% (14/61)	3,28% (2/61)
ETT (n=16)	81,25% (13/16)	18,75% (3/16)	100% (16/16)	0% (0/16)	81,25% (13/16)	0% (0/16)	18,75% (3/16)	0% (0/16)
NI (n=26)	61,54% (16/26)	38,46% (10/26)	92,30% (24/26)	07,70% (2/26)	61,54% (16/26)	0% (0/26)	30,77% (8/26)	07,69% (2/26)

VI. DISCUSSION

1. De l'efficacité thérapeutique de AL et AS+AQ

Dans cette étude, la discrimination entre les recrudescences et les nouvelles infections a permis d'établir le taux des échecs thérapeutiques à 21,95% et 20,25% pour AL et AS+AQ respectivement. Ces taux d'échecs similaires pourraient s'expliquer non seulement par une similarité dans le mode d'action thérapeutique des dérivés de l'artémisinine, mais également une similarité dans l'efficacité thérapeutique des 2 molécules partenaires associées à l'artémisinine qui sont la Luméfantrine et l'Amodiaquine. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Zongo et *al* lors d'une étude réalisée à Bobo-Dioulasso avec 28 jours de suivi où il a été rapporté des taux de 18,8% pour AL (Issaka et *al*, 2007). Par contre des études réalisées par d'autres auteurs ont rapporté des taux de RCPA statistiquement plus élevés. En effet des taux de 100% aussi bien pour AL que pour AS+AQ ont été rapportés au Ghana (Kwadwo et *al*, 2005), tandis qu'au Comores il a été rapporté 100% de RCPA avec AS+AQ (Adama et *al*, 2007) et 98.3% avec AL au Mali (Abdoulaye et *al*, 2008). Les différences observées entre ces résultats et les nôtres pourraient s'expliquer par la différence dans l'administration du traitement. En effet, dans notre étude, seule la première dose du traitement était administrée sous observation directe, par l'infirmier de l'étude, les autres doses étant confiées aux parents pour une administration à domicile. Alors que dans toutes les études citées plus haut, toutes les doses des traitements étaient administrées sous observation directe. Dans notre cas, il est possible que les traitements n'aient pas été administrés conformément aux prescriptions indiquées. Cela nous amène à émettre l'hypothèse selon laquelle le non respect strict de la prescription dans le cadre d'un traitement ambulatoire peut constituer un facteur important de risques pour la survenue des échecs thérapeutiques.

2- De la réalisation des tests de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Bien qu'ayant suivi scrupuleusement le protocole de manipulation PCR, nous avons obtenus quelques discordances dans nos résultats. En effet, alors que chez deux patients la microscopie révélait une goutte épaisse positive, nous n'avons noté aucune présence de bande à la révélation après la PCR. Ces discordances de résultats pourraient s'expliquer par une erreur dans la lecture des lames de microscopie au cours de l'étude. Un accès au contrôle de qualité des lames ou une relecture des lames concernées par un second microscopiste nous aurait permis de répondre à cette question, mais nous n'avons pas pu accéder à ces lames du fait de leur non disponibilité immédiate.

3. De la prévalence des allèles du gène *Pfmdr-1* dans la population de parasites étudiés

Cette étude nous a permis de déterminer la prévalence du gène *Pfmdr-1* pour les trois points étudiés dans la zone de Nanoro. La prévalence de 0% de l'allèle mutant *Pfmdr-1 1034C* nous révèle l'absence de cette mutation dans la population de parasites circulant à Nanoro. Nos résultats confirment la rareté de ce gène rapportée par plusieurs études (Ursing et al, 2006 ; F de Monbrison et al, 2003).

Pour la mutation ponctuelle *Pfmdr-1 86Y*, nos résultats corroborent ceux des études conduites au Burkina et au Nigéria qui ont rapporté des taux similaires (Tinto et al, 2008 ; HAPPI et al, 2006). Par contre, une autre étude au Soudan a rapporté des taux plus élevés allant jusqu'à 84% (Maha et al, 2007). Etant donné que la chloroquine a été utilisée dans cette localité beaucoup plus longtemps que dans la nôtre, ces forts taux pourraient s'expliquer par une sélection beaucoup plus importante de cette mutation dans cette localité.

Enfin pour la mutation ponctuelle 1246, le faible taux de prévalence que nous avons obtenu dans notre étude est similaire à ceux obtenus dans d'autres études conduites au Cameroun, et en Asie du Sud-Est (F. de Monbrison et al, 2003)

4. De la relation entre les mutations du gène *Pfmdr-1* et la réponse au traitement

Une étude conduite par Sisowath et al à Zanzibar en Tanzanie avait démontré une implication du génotype sauvage *Pfmdr-1 86N* dans les échecs thérapeutiques à AL (Sisowath et al, 2005) et avait avancé l'hypothèse de l'implication de celui-ci dans la résistance à la luméfántrine. Dans la présente étude, nous avons en effet noté une forte prévalence du génotype sauvage dans les échecs thérapeutiques à AL. Cependant nous n'avons pas observé de différence entre cette proportion et celle des RCPA. En effet, la proportion de génotype sauvage parmi les RCPA à AL était également similaire à celle des ETT.

Plusieurs publications ont rapporté une relation entre la mutation *Pfmdr-186Y* et la résistance à l'amodiaquine (Tinto et al, 2008 ; Happi et al, 2006). Toutefois il a été démontré que des souches mutantes *Pfmdr-186Y* et *Pfmdr-11246Y* bien que présentant des échecs à l'amodiaquine étaient sensibles aux combinaisons AL et AQ+AS (Nsobya et al, 2007 ; Humphreys et al, 2007). Nos résultats corroborent cette observation. En effet nous n'avons pas observé de relation entre ces deux mutations et les échecs à ces deux médicaments. Ces résultats comme d'autres publications confirment le bon choix des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) comme meilleure alternative pour la réduction de l'émergence et de l'extension de la résistance aux antipaludiques.

VII. CONCLUSION

Au terme de cette étude sur la relation entre les mutations du gène *Pfmdr-1* et la réponse au traitement avec les combinaisons AL et AS+AQ, nous avons noté des taux d'échecs thérapeutiques assez élevés pour ces deux médicaments lorsqu'ils sont utilisés en condition réelle. Ceci constitue un risque d'échec de la nouvelle politique de traitement du Burkina Faso qui a fait le choix de ces deux combinaisons comme médicament de première ligne dans le traitement du paludisme simple. Toutefois une autre étude actuellement en cours dans la même localité et utilisant une combinaison fixe de AS+AQ permettra de confirmer nos résultats. Nous avons également noté une absence de la mutation *Pfmdr-11034*. Cependant nous avons révélé une présence de la mutation *Pfmdr-11246Y* à une faible proportion et celle de la mutation *Pfmdr-186Y* à une proportion plus importante. Par ailleurs, les proportions de souches sauvages étaient plus importantes comparées aux souches mutantes dans les deux cas. Dans tous les cas, nous n'avons pas pu établir une relation entre les différents allèles et la réponse au traitement avec les deux combinaisons étudiées.

PERSPECTIVE :

Si le niveau des échecs thérapeutiques tel qu'il ressort dans cette étude est confirmé par l'étude en cours, il sera nécessaire de procéder à la détermination des polymorphismes des autres mutations ponctuelles du *Pfmdr1* (*Pfmdr-1184*, *Pfmdr-1 1042*) ainsi que celles du gène *PfCRT-76*, afin de compléter les résultats de la présente étude et d'avoir des données plus exhaustives pour une meilleure explication des échecs à ces deux combinaisons.

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abdoulaye A. Djimdé, Bakary Fofana, Issaka Sagara, Bakary Sidibe, Sekou Toure, Demba Dembele Souleymane Dama, Dinkorma Ouologuem, Alassane Dicko, and Ogobara K. Doumbo.** Efficacy, Safety, and Selection of Molecular Markers of Drug Resistance by Two ACTs in Mali
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene., 2008; **78** (3): 455–461
2. **Adama Tall, L'éon P. Rabarijaona, Vincent Robert, Said Ahmed Bedja, Frédéric Arieu, Milijaona Randrianarivejosia.** Efficacy of artesunate plus amodiaquine, artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine, and chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* in the Comoros Union
Acta Tropica. 2007; 102: 176–181
3. **Adjuik M, Agnamey P, Babiker A et al.** Amodiaquine-artésunate versus Amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum malaria* in African children: a randomised, multicentre trial.
Lancet. 2002; **359**: 1365-1372.
4. **Alene G.D. and S. Bennett.** Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* malaria in Ethiopia and Eritrea.
Tropical Medicine and International Health. 1996; **1**: 810-815.
5. **Barenes H., N. Nagot, I. Valea, T. Koussoubé-Balima, A. Ouedraogo, T. Sanou and S. Yé.** A randomized trial of amodiaquine and artésunate alone and in combination for the treatment uncomplicated *falciparum* malaria in children from Burkina Faso.
Tropical Medicine and International Health. 2004; **9**, (4) 438–444.
6. **Bray PG, Ward SA.** A comparison of the phenomenology and genetics of multidrug resistance in cancer cells and quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*.
PharmacolTher 1998 ; **77** : 170-9.

7. **Le Bras J, Durand R.** The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*.
Fundam Clin Pharmacol 2003 ; 17 : 147-53.
8. **Bruce-Chwatt L.J., R.H. Black, C.J. Canfield, D.F. Clyde, W. Peters and W. Wernsdorfer.** Chemotherapy of malaria.
WHO Monogr Ser. 1986. 2 (27).
9. **Bukirwa H, Yeka A, Kanya MR, Talisuna A, Banek K, Bakyaite N, Rwakimari JB, Rosenthal PJ, Wabwire-Mangen F, Dorsey G, Staedke SG**
Artemisinin combination therapies for treatment of uncomplicated malaria in Uganda.
PLoS Clin Trials. 2006
10. **C. T. Happi, G. O. Gbotosho, O. A. Folarin, O. M. Bolaji, A. Sowunmi, D. E. Kyle, W. Milhous, D. F. Wirth, and A. M. J. Oduola.** Association between mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and *P. falciparum* multidrug resistance 1 genes and *in vivo* amodiaquine resistance in *P. falciparum* malaria-infected children in Nigeria
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene., Jul 2006; 75: 155 – 161
11. **Cortese J.F., A. Caraballo, C.E. Contreras and C.V. Plowe.** Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America.
Journal of Infectious Diseases. 2002; 186 : 999–1006.
12. **Cowman, A.F., Karcz, S., Galatis, D., Culvenor, J.G.,** A Pglycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole.
J. Cell Biol. 1991; 113: 1033–1042.
13. **Dabiré K. R., Baldet T., Diabaté A., Dia I., Costantini C., Cohuet A., Guiguemdé T. R., and Fontenille D.** *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a Humid Savannah Area of Western Burkina Faso: Bionomics, Insecticide Resistance Status, and Role in Malaria Transmission
Journal of medical entomology. 2007 44 (6): 990-997

14. **Debaert M.** Traité de chimie thérapeutique, principaux antifongiques et antiparasitaires
TEC& DOC. Antipaludique. Paris: ed médicales Internationales, 2000: 13- 137
15. Diabate A., Brengues C., Baldet T., Dabiré K. R., Hougard J. M., Akogbeto M., Kengne P., Simard F., Guillet P., Hemingway J., Chandre The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and *de novo* phenomena
Tropical Medicine and International Health. 2004 9 (12), 1267–1273.
16. **Dinis D.V., Scharpa A.** Comparative study of the efficacy and side-effects of two therapeutic regimens against chloroquine-resistance *falciparum* malaria in Maputo, Mozambique.
Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1990; **83**: 521-528
17. **Durand R, Gabbett E, Di Piazza JP, Delabre JF, Le Bras J.** Analysis of kappa and omega repeats of the cg2 gene and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum* from subsaharian Africa.
Molecular and Biochemical Parasitology. 1999 ; **101** : 185-97.
18. **F. de Monbrison, D. Raynaud, C. Latour-Fondanaiche, C. Angei, K. Kaisier, F. Peyron, S. Picot.** Détection des marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum*.
Pathologie Biologie. 2003 ; **51** : 528-533
19. **Faye B., Gaye O., Dieng Y.** Etude comparative évaluant l'efficacité d'une association libre amodiaquine+ sulfadoxine- pyriméthamine versus amodiaquine versus sulfadoxine pyriméthamine dans le traitement de l'accès palustre simple à *plasmodium falciparum* au Sénégal.
La troisième conférence panafricaine de la MIM sur le paludisme. Arusha, Tanzanie ;
2002 : **67** p 392

20. **Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, et al.** Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*.
Nature. 1990; **345**: 255-8.
21. **Grobusch MP, Adagu IS, Kremsner PG, Warhurst DC.** *Plasmodium falciparum* : *in vitro* chloroquine susceptibility and allele-specific PCR detection of Pfm^{dr}-1 Asn86Tyr polymorphism in Lambarene, Gabon.
Parasitology 1998 ; **116** : 211-7.
22. **Halidou Tinto, Lougué Guekoun, Issaka Zongo, Robert Tinga Guigemdé, Umberto D'Alessandro and Jean Bosco Ouédraogo.** Chloroquine-reistance molecular markers (*Pfprt* T76 and *Pfmdr1* Y86) and amodiaquine resistance in BurKina Faso
Tropical Medicine and International Health. 2008; **13**: 238-240
23. **Hastings I.M., W.M. Watkins and N.J. White. 2002.** The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half life.
Philosophical Transaction of the Royal Society of London Ser. B, **357**, 505-519
24. **Hastings I.M.** The origins of antimalarial drug resistance.
Trends in Parasitology 2004. **20**, (11) 512-518.
25. **Holmgren G, Hamrin J, Svärd J, Mårtensson A, Gil JP, Björkman A.** Selection of *pfmdr1* mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa.
Infect Genet Evol. 2007 Sep; **7** (5): 562-9.
26. **Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJ, Mutabingwa TK, Sutherland CJ, Hallett RL.** Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum mdrl* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria.
Antimicrob Agents Chemother. 2007; **51** (3): 991-7

27. **Issaka Zongo, Grant Dorsey, Noel Rouamba, Christian Dokomajilar, Yves Séré , Philip J. Rosenthal, and Jean Bosco Ouédraogo.** Randomized Comparison of Amodiaquine plus Sulfadoxine-Pyrimethamine, Artemether-Lumefantrine, and Dihydroartemisinin-Piperaquine for the Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Burkina Faso. Clinical Infectious Diseases. 2007; 45:1453–61
28. **Ittarat I., W. Asawamahasakda, S.R. Meshnick.** The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. Experimental Parasitology. 1994; 79 : 50-56.
29. **Kofoed P.E., Poulsen A., Co F.** Artesunate combiné à la chloroquine pour le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* en Guinée-Bissau. La troisième conférence panafricaine de la MIM sur le paludisme. Arusha, Tanzanie ; 2002 ; 75 p 392
30. **Korenromp E.L.** for the Roll Back Malaria Monitoring and Evaluation Reference Group & MERG Task Force on Malaria Morbidity. Malaria incidence estimates at country level for the year 2004—proposed estimates and draft report. Geneva, Roll Back Malaria, World Health Organization, 2004.
31. **Kwadwo A. Koram, Benjamin Abuaku, Nancy Duah, Neils Quashie.** Comparative efficacy of antimalarial drugs including ACTs in the treatment of uncomplicated malaria among children under 5 years in Ghana Acta Tropica. 2005; 95: 194–203
32. **Lau H, Ferlan JT, Brophy VH, Rosowsky A, Sibley CH.** Efficacies of Lipophilic inhibitors of dihydrofolate reductase against parasitic protozoa. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 187-95.
33. **J. Ursing, S. Zakeri, J.P. Gil, A. Björkman.** Quinoline resistance associated polymorphism in the *pfcr1*, *pfmdr1* and *pfmpr* genes of *Plasmodium* in Iran. Acta Tropica. 2006; 97: 352-356

34. **Maha E. Osman, Frank P. Mockenhaupt, Ulrich Bienzle, Mustafa I. Elbashir, Hayder A. Giha.** Field-based evidence for linkage of mutations associated with chloroquine (*pfcr1/pfmdr1*) and sulfadoxine–pyrimethamine (*pfdhfr/pfdhps*) resistance and for the fitness cost of multiple mutations in *P. falciparum*
Infection, Genetics and Evolution. January 2007 7 (1): 52-59
35. **Molyneux D.H., K.Floyd, G. Barnish and E.M. Fevre.** Transmission control and drug resistance in malaria: a crucial interaction.
Parasitology Today. 1999; **15**, **6**, **1**: 238-240.
36. **Martensson A, Strömberg J, Sisowath C, Msellem MI, Gil JP, Montgomery SM, Olliaro P, Ali AS, Björkman A.** Efficacy of artesunate plus amodiaquine versus that of artemether lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania.
Clin Infect Dis. 2005; **41**: 1079–1086.
37. **Moody A.** Rapid diagnostic tests for malaria parasites.
Clinical Microbiology Reviews. 2002; **15**, **1**: 66-78.
38. **Nsoby SL, Dokomajilar C, Joloba M, Dorsey G, Rosenthal PJ.** Resistance-mediating *Plasmodium falciparum* *pfcr1* and *pfmdr1* alleles after treatment with artesunate-amodiaquine in Uganda.
Antimicrob Agents Chemother. 2007; **51** (8):3023-5.
39. **Nosten F. Van-Vugt M, Price R et al.** Effect of Artesunate- mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: Prospective study.
Lancet. 2000; **356**: 297-302.
40. **Payne D. 1988.** Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*?
Parasitology Today, **4**, 112-115.

41. **Plowe C.V., A. Djimde, M. Bouare, O. Doumbo, T.E. Wellems, 1995.** Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **52**, 565–568.
42. **Shretta R, Omumbo J, Rapuoda B & Snow RW** Using evidence to change antimalarial drug policy in Kenya.
Tropical Medicine and International Health. 2000; **5**: 755-764.
43. **Sisowath C, Strömberg J, Mårtensson A, Msellem M, Obondo C, Björkman A, Gil JP.** In vivo selection of *Plasmodium falciparum* *pfmdr1* 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem).
J Infect Dis. 2005 Oct 1;**192** (7):1303-4
44. **Stephanie G. Valderramos and David A. Fidock.** Transporters involved in resistance to antimalarial drugs.
Pharmacological Sciences. 2007; 27 (11)
45. **SU X, Kirkman LA, Fujioka H, Wellems TE.** Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa.
Cell 1997 ; **91** : 593-603.
46. **Talisuna A.O., P. Bloland and U. D'Alessandro.** History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance.
Clinical Microbiology Reviews. 2004; **17**, 1: 235–254.
47. **Warhurst DC, Craig JC, Adagu IS.** Lysosome and drug resistance in malaria.
Lancet 2002; **360**: 1527-9.
48. **Wernsdorfer W.H.** Epidemiology of drug resistance in malaria.
Acta Tropica 1994; **56**:143-156

49. **White N.** Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy.
Philosophical Transaction of the Royal Society of London Ser. B. 1999; **354**: 739-749.
50. **White N.J.** Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy.
Parasitologia. 1999; **41**: 301-308.
51. **World Health Organisation,** Resistance of malaria parasites to drugs.
WHO. Technical Report, Ser. 1965; **296**:1-65
52. **The world health report:** shaping the future.
Geneva, World Health Organization, 2003
53. **Wünsch S, Sanchez CP, Gekle M, Grosse-Wortmann L, Wiesner J, Lanzer M.**
Differential stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger determines chloroquine uptake in
Plasmodium falciparum.
J Cell Biol. 1998; **140**: 335-45.