

BURKINA FASO

Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

Institut du Développement Rural
(IDR)



Année Universitaire 2008 - 2009

Mémoire N°.....

*Sensibilité in vitro de Plasmodium falciparum aux antipaludiques
cinq ans après le changement de la politique de traitement du
paludisme simple au Burkina Faso*

Mémoire

Présenté et soutenu publiquement le 14 Mai 2010

Pour l'obtention du

Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en

Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques (BA/MSB)

Par

BONKIAN Léa Nadège

JURY :

Directeur de Mémoire :
Dr Halidou TINTO

Président :
Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO

Membre :
Dr Maminata TRAORE

BURKINA FASO

Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

Institut du Développement Rural
(IDR)



Année Universitaire 2008 - 2009

Mémoire N°.....

*Sensibilité in vitro de Plasmodium falciparum aux antipaludiques
cinq ans après le changement de la politique de traitement du
paludisme simple au Burkina Faso*

Mémoire

Présenté et soutenu publiquement le 14 Mai 2010

Pour l'obtention du

Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en

Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques (BA/MSB)

Par

BONKIAN Léa Nadège

JURY :

Directeur de Mémoire :
Dr Halidou TINTO

Président :
Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO

Membre :
Dr Maminata TRAORE

Je dédie ce travail...

☞ **A mon seigneur et sauveur Jésus christ**

Tu restes toujours le même hier, aujourd'hui et éternellement ! Tu es le meilleur ami. Je te rends grâce parce ce que c'est toi qui bâti ma vie. Reçois la gloire!

☞ **A mon père et à ma mère**

Pour votre soutien, vos sacrifices, vos prières, vos encouragements, qui m'ont permis de réaliser ce travail. Que Dieu continue de vous bénir et vous donne longue vie.

☞ **A ma marraine Albibata**

Pour avoir accepté me soutenir pendant toutes ces années. Qu'aucun de tes bienfaits ne soit perdu. Que Dieu continue de te bénir, et qu'il te donne longue vie.

☞ **A mes frères et sœurs**

Bè, Prisca, Arnaud, Eméline, Fabrice. Que l'amour et l'unité règne toujours entre nous.

☞ **A mes amis Christine, Nina et Tani**

Vous avez été d'un grand soutien pour moi ! Que Dieu continue de vous bénir !

☞ **A mes camarades de classe :**

Vous m'avez soutenu quand je traversais des moments difficiles. Merci pour tout !

Remerciements...

A mon Directeur de mémoire Dr Halidou Tinto PharmD, Msc, PhD Chargé de Recherche :

Merci pour votre soutien inestimable. C'est grâce à votre aide que ce travail a pu être réalisé. Que Dieu continue de vous bénir.

Au Pr George Anicet Ouédraogo et au Pr Jean Bosco Ouédraogo,

Merci d'avoir mis à notre disposition ce cycle doctoral.

Au Pr Tinga Robert Guiguemdé, chef du département de Parasitologie Entomologie du centre Muraz

Merci pour vos encouragements et vos conseils.

Au Dr Innocent Valéa

Merci pour votre aide, vos conseils lors de la réalisation de ce travail.

Au Dr Guêkoun Lougué

Merci pour la collaboration lors de la réalisation de ce travail.

A Mme Zampa Odile

Merci pour votre aide lors de la réalisation de ce travail. Soyez assurée de notre profonde gratitude.

A l'équipe de recherche de la section parasitologie du Centre Muraz détaché au CMA du district de Dafra: Nana Louis Arnaud, Yerbanga isidore, Millogo Régis, Yameogo Zalissa, Major Tamboula Issiaka, Dissa Moussa, Sibalo Amadou, Djiguemdé Ousseni, Badini Mahamadi :

Merci pour tous les efforts que vous avez fourni pour mener à bien cette étude.

A Mr Laurent Sawadogo :

Merci pour le combat mené pour remettre en marche le compteur beta.

A Yvette et Judicael Zombré

Merci pour votre soutien.

Aux patients inclus dans l'étude et à leurs parents :

Merci d'avoir accepté participer à cette étude.

I. INTRODUCTION

Table des Matières

Sigles et abréviations	3
Liste des Tableaux et Figures	4
Liste des Tableaux	4
Liste des Figures	4
Résumé	5
I. INTRODUCTION	6
II. GENERALITES	7
2.1. L'EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME	7
2.2. LA PHYSIOPATHOLOGIE DU PALUDISME	11
2.3. LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME	12
2.3.1. Le diagnostic clinique	12
2.3.2. Le diagnostic biologique	12
2.4. LES ANTIPALUDIQUES	14
2.5. LA CHIMIORESISTANCE DANS LE PALUDISME	19
2.5.1. Définition	19
2.5.2. Les mécanismes de résistance aux amino-4-quinoleines	20
2.5.3. Facteurs favorisant l'émergence et la diffusion de la chimiorésistance ...	21
2.5.4. Les méthodes d'étude de la chimiorésistance	22
III. OBJECTIFS DE L'ETUDE	26
3.1. OBJECTIF GENERAL	26
3.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES	26
IV. METHODOLOGIE	27
4.1. CADRE DE L'ETUDE	27
4.2. Type et période d'étude	27
4.3. Critères d'inclusion et de non inclusion	28
4.4. La goutte épaisse et le frottis mince	28
4.5. Les tests <i>in vitro</i>	30
4.5.1. Matériel et réactifs	30
4.5.2. Préparation des milieux de culture	31
4.5.3. Mode opératoire du test isotopique	32

4.5.4. Expression et interprétation des résultats de comptage.....	35
4.6. Analyse des résultats	36
V. RESULTATS	38
5.1. RESULTATS GLOBAUX.....	38
5.2. RESULTATS DES TESTS <i>IN VITRO</i>	38
5.2.1. Répartition des CI50 selon l'antipaludique testé <i>in vitro</i>	38
5.3.2. Répartition des isolats selon leur degré de sensibilité	39
5.3.3. Résultats des échantillons du jour de récurrence	39
VI- DISCUSSIONS.....	42
6.1. Des résultats de sensibilité avant administration du médicament	42
6.1.1. La résistance à la quinine	42
6.1.2. La résistance à la chloroquine	42
6.1.3. La résistance à la monodéséthylamodiaquine	43
6.1.4. La sensibilité à la dihydroartémisinine	43
6.1.5. La sensibilité à la Luméfantrine	43
6.1.6. La sensibilité à la Pipéraquline	44
6.2. Des résultats de sensibilité au jour de recrudescence	44
CONCLUSION ET RECOMMANDATION	45
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	46

SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACT	: Artemisinin-based Combination therapies
ADN	: Acide Désoxyribo Nucléique
AQ	: Amodiaquine
AS	: Artésunate
CI50	: Concentration Inhibitrice 50%
CMA	: Centre Médical avec Antenne Chirurgicale
CPM	: coups par minute
CQ	: Chloroquine
DHA	: Dihydroartémisinine
Eau PPI	eau pour préparation injectable
EDTA	: Ethylène Diamine Tetra-acétique
ELISA	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GRP	: Globules rouges parasités
HRP-II	: Histidine Rich Protein
MDA	: Monodéséthyl amodiaquine
mg	: milligramme
nM	: nanomolaire
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCR	: Polymerase Chain Reaction
Pfcr1	: <i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
Pfmdr	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug résistant
Pip	Pipéraquline
Qn	quinine
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
µl	: microlitre
µm	: micromètre
WHO	: World Health Organization

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des Tableaux

Tableau I : Classification des principaux antipaludiques.....	15
Tableau II : Classification OMS 2005 de la réponse au traitement.....	23
Tableau III : solvant utilisé par médicament	32
Tableau IV : Concentrations des solutions filles selon les médicaments antipaludiques.....	33
Tableau V : Moyenne géométrique des CI50 selon l'antipaludique testé.....	38
Tableau VI : Répartition des réponses des isolats de <i>P. falciparum</i> par médicament.....	39
Tableau III : Tableau comparatif des valeurs de CI50 des médicaments au jour d'inclusion et au jour de recrudescence.....	40

Liste des Figures

Figure1: Répartition géographique du paludisme et des résistances médicamenteuses dans le monde.....	7
Figure 2 : Cycle de développement de Plasmodium sp.	9
Figure3: Photographie du collecteur de cellule contenant une plaque de culture..	34
Figure4: photographie d'un compteur beta couplé à un ordinateur.....	35
Figure 5: Courbe d'inhibition du parasite en fonction de la concentration du médicament	45

RESUME

Sensibilité in vitro de Plasmodium falciparum aux antipaludiques cinq ans après le changement de la politique de traitement du paludisme simple au Burkina Faso

La résistance du *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques usuels constitue le principal obstacle pour le contrôle du paludisme dans les pays endémiques. Cela a conduit le Burkina Faso à changer en 2005 sa politique de prise en charge du paludisme simple en passant de la CQ aux combinaisons artemether-lumefantrine et artesunate + amodiaquine. La présente étude, conduite à Bobo Dioulasso, a pour but d'étudier la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* vis-à-vis des différents composants des ACT utilisés au Burkina Faso et des antipaludiques courants après la mise en œuvre effective de l'utilisation de ces ACT.

L'étude s'est déroulée de juillet 2009 à février 2010. Des échantillons de sang ont été prélevés chez 40 patients ayant une parasitémie comprise entre 4000 et 200000 trophozoïtes/microlitres à l'inclusion et mis en culture en présence d'antipaludiques puis incubé sous 5% de CO₂ pendant 48 heures. Ces patients ont été traités à l'inclusion de façon randomisée aux combinaisons artemether-lumefantrine et artesunate + amodiaquine.

Nous avons obtenus comme résultats *in vitro*, des taux de résistance de 2,78% à la quinine, 6,06% à la monodéséthyl amodiaquine, 52,94% à la chloroquine. Les moyennes géométriques des concentrations Inhibitrices 50% de la luméfántrine, de la dihydroartémisinine et de la pipéraqúine étaient respectivement de 30,61 nM, 1,31 nM et de 8,58 nM.

A l'issu de cette étude, nous pouvons conclure que cinq (05) ans après l'adoption de la politique d'utilisation des ACT dans le traitement du paludisme simple au Burkina Faso, il ya une baisse du taux de résistance *in vitro* à la quinine et à la chloroquine. Pour ce qui concerne la dihydroartémisinine, il n'y a pas une grande variation de la moyenne géométrique des valeurs de CI50. Et enfin, nous avons une bonne activité antiplasmodique de la monodéséthyl amodiaquine, la luméfántrine et la pipéraqúine.

Mots clés: *Plasmodium falciparum*, *in vitro*, ACT, Burkina Faso.

II. GENERALITES

I. INTRODUCTION

La résistance du *Plasmodium* aux antipaludiques usuels constitue le principal obstacle pour le contrôle du paludisme dans les pays endémiques. En effet, la distribution géographique de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine (CQ), correspond presque à celle du parasite lui-même dans plusieurs pays (39). Cela a conduit, il y a quelques années, la plupart des pays de l'Afrique sub-saharienne à changer leur politique de traitement du paludisme en passant de la CQ à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et encore plus récemment aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT). Ces dernières, ont plusieurs avantages dans la mesure où elles entraînent non seulement une guérison clinique et parasitologique rapide mais elles réduisent également le taux de portage de gamétocytes et sont généralement bien tolérées.

Le Burkina Faso a changé en 2005 sa politique de prise en charge du paludisme simple en passant de la CQ aux combinaisons artemether-luméfantine (AL) et amodiaquine-artésunate (AQ-AS). Cependant il existe peu de données disponibles sur la sensibilité *in vitro* du parasite à ces combinaisons au Burkina Faso. Une étude de la sensibilité *in vitro* du parasite à la quinine, à la Dihydroartémisinine et à la chloroquine Phosphate avait été menée à Bobo Dioulasso en 2006 (8) alors que la politique de l'utilisation des ACT venait à peine d'être adoptée et donc sa mise en œuvre n'était pas encore effective. La présente étude, conduite dans la même ville, a pour but d'étudier la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* vis-à-vis des différents composants des ACT utilisés au Burkina Faso et des antipaludiques courants après la mise en œuvre effective de l'utilisation de ces ACT.

III. OBJECTIFS DE L'ETUDE

II. GENERALITES

2.1. L'EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME

Le paludisme sévit actuellement dans la ceinture dite de la pauvreté du globe terrestre. En effet, il se rencontre dans tout le monde intertropical : l'Asie du sud est, l'Amérique du sud, au Moyen orient et l'Afrique subsaharienne (Figure 1).

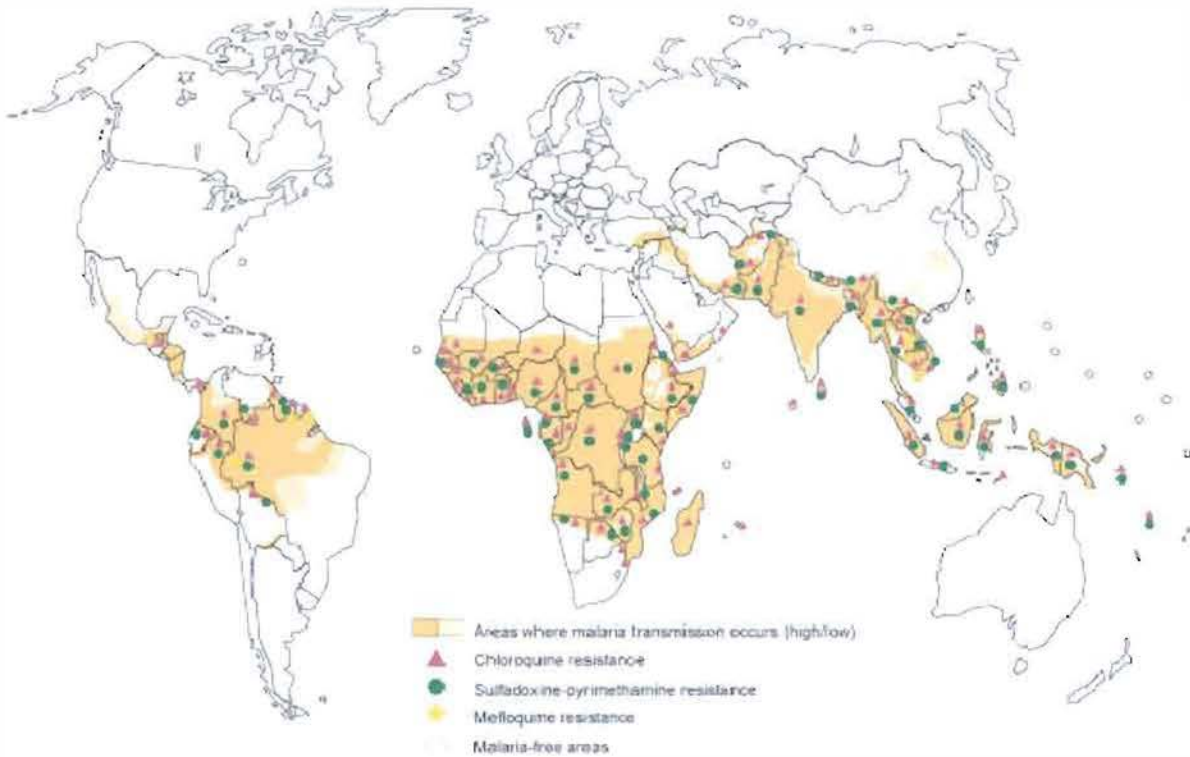


Figure 1: Répartition géographique du paludisme et des résistances médicamenteuses dans le monde.

Source : <http://www.rbm.who.int/wmr2005/html/map5.htm>

On estime à 2,7 millions le nombre annuel de morts attribués au *Plasmodium falciparum*, 80% à 90% d'entre eux sont africains, et dans la grande majorité, des enfants et des femmes enceintes (35), chez qui il provoque des anémies sévères.

Trois éléments participent à la transmission du paludisme : le vecteur, l'agent pathogène et l'homme.

2.1.1. Le vecteur

Le paludisme est transmis principalement par un vecteur qui est l'anophèle femelle, accessoirement par voie transplacentaire et par voie transfusionnelle.

L'anophèle est un moustique appartenant à la famille des *Culicidae* et à la sous-famille des *Anophelinae*. Une soixantaine d'espèces ont été identifiées

comme véhiculant le parasite, mais en Afrique subsaharienne trois espèces seulement sont responsables de la transmission palustre : *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus* et *Anopheles arabiensis*. Ces espèces ont un tropisme pour l'espèce humaine. En effet, lorsque l'anophèle femelle est fécondée, elle ne peut pondre qu'après un repas sanguin pris sur l'Homme ou sur l'animal et dans certaines conditions de température (entre 16 et 37°C). L'eau est nécessaire à l'éclosion des œufs et au développement des larves. Ainsi après éclosion, les œufs vont donner des larves qui vont devenir des nymphes puis des imagos (formes adultes) au bout de dix jours.

2.1.2. L'agent pathogène

Le *Plasmodium* fait partie de l'embranchement des *Apicomplexa*, de la famille des *Plasmodiidae* et du genre : *Plasmodium*.

Quatre espèces plasmodiales sont responsables du paludisme chez l'Homme : *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* et *P. ovale*. Ils ont une longévité variable selon l'espèce :

- Deux mois et exceptionnellement six à douze mois pour *P. falciparum* ;
- Trois à quatre ans pour *P. vivax*;
- Dix à vingt ans pour *P. malariae* ;
- Trois ans pour *P. ovale*.

P. falciparum est répandu à l'ensemble de la zone intertropicale. *P. vivax* possède lui aussi une large répartition mais il est absent en Afrique noire. *P. malariae* présente une répartition plus clairsemée grossièrement superposable à celle de *P. falciparum*. Enfin, *P. ovale* est essentiellement retrouvé en Afrique noire.

➤ La structure du Plasmodium (20)

Le *Plasmodium* est un protozoaire intracellulaire annulaire dont la structure comporte trois principaux éléments :

- Une membrane plasmique : Elle est de nature lipoprotéique. Les protéines ancrées dans cette membrane varient en fonction des stades évolutifs du parasite.

- Un cytoplasme : C'est un cytoplasme de forme annulaire riche en protéases qui digèrent l'hémoglobine en fractions nécessaires à la croissance de l'hématozoaire. Il renferme aussi des mitochondries pour les fonctions métaboliques, des ribosomes pour la synthèse protéique, des micronèmes, des rhoptries, des granules denses des anneaux polaires qui interviennent dans l'invasion des hématies.
- Le noyau : Il est situé à la périphérie du cytoplasme et contient un génome de quatorze chromosomes. On y dénombre environ 5000 gènes qui codent pour la synthèse des protéines dont certaines sont exprimées à la surface de la membrane (20).

Plasmodium falciparum est le parasite dont le génome connaît beaucoup de mutations responsables de la résistance aux antipaludiques courants.

2.1.3. Le Cycle évolutif du parasite

Le *Plasmodium* a un cycle à deux hôtes : l'homme qui est l'hôte intermédiaire et le moustique, qui est l'hôte définitif (Figure 2).

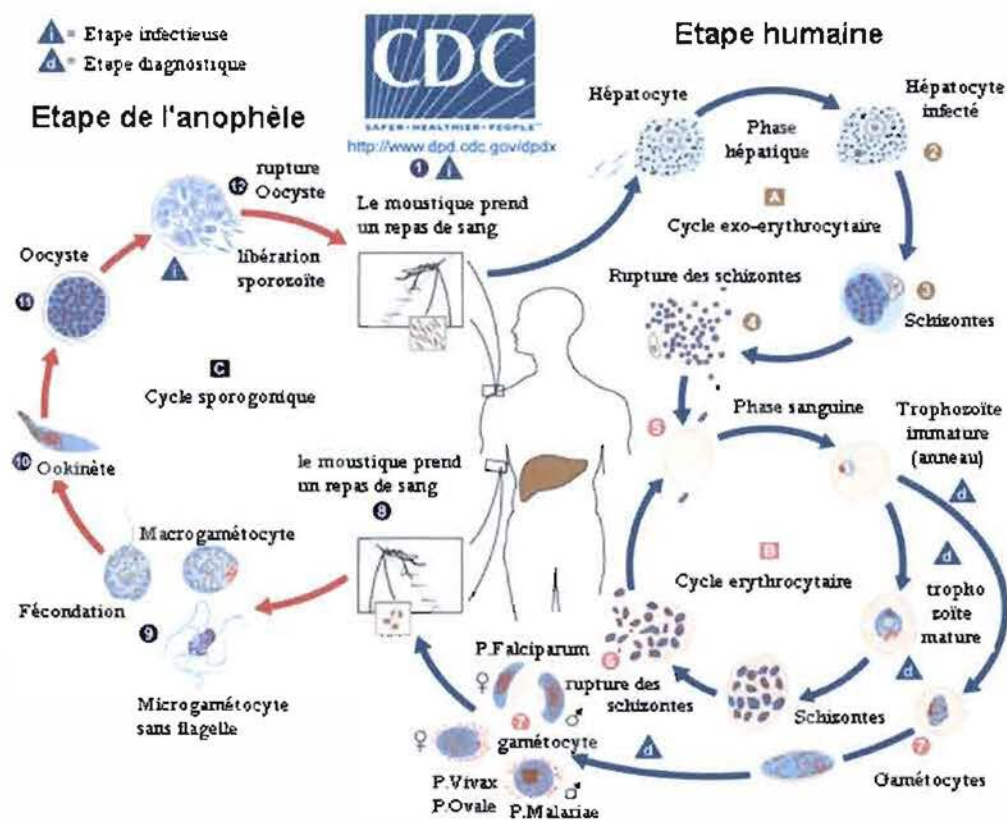


Figure 2 : Cycle de développement de *Plasmodium* sp.

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

Cycle chez l'Hôte intermédiaire l'homme

L'homme est infecté par la piqûre de l'anophèle femelle. Lors de cette piqûre, il reçoit une dose de sporozoïtes qui sont les formes infectantes et mobiles du *Plasmodium* contenues dans les glandes salivaires du moustique. Ces sporozoïtes passent environ quarante cinq minutes dans le sang avant d'atteindre le foie où chacune d'elles pénètre dans un hépatocyte.

La Schizogonie hépatique ou exo érythrocytaire

Dans l'hépatocyte parasité, le sporozoïte se transforme en un trophozoïte endocytosomique qui grossit et dont le noyau se divise plusieurs fois. Après une durée moyenne de 8 à 15 jours, le cytoplasme de l'hépatocyte est envahi par une masse contenant plusieurs milliers de noyaux : le schizonte. Les noyaux du schizonte prennent très fortement la coloration du Giemsa et en anatomopathologie l'hépatocyte parasité sera dilaté et ponctué de milliers de points bleus d'où son appellation de "corps bleu". A maturité, chaque noyau s'individualise avec un peu de cytoplasme du parasite pour donner plusieurs milliers de mérozoïtes (ou cryptozoïtes). L'hépatocyte parasité éclate et les mérozoïtes libérés pénètrent dans la circulation des capillaires puis chacun va pénétrer dans une hématie.

La durée du cycle de reproduction asexuée dans l'hépatocyte est variable suivant les espèces, le processus de reproduction se déclenche immédiatement dans tous les hépatocytes parasités pour les espèces *P. malariae* et *P. falciparum*. Ce processus peut être retardé dans certains hépatocytes qui restent en attente entre 1 à 18 mois (d'où leur nom d'hypnozoïtes), pour les espèces *P. vivax* et *P. ovale*.

La Schizogonie érythrocytaire ou endo-érythrocytaire

Ce cycle a une durée de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et 72 heures pour *P. malariae*. Dans les hématies, les mérozoïtes vont évoluer sous plusieurs formes : trophozoïte jeune en forme d'anneaux, trophozoïte âgé, schizonte jeune (nombre variable de noyaux) puis schizonte mûr à nombre de noyaux défini. A l'issue de chaque cycle, les hématies parasitées éclatent et les mérozoïtes libérés envahissent des hématies saines.

Plusieurs cycles se succèdent et environ une semaine après, certains mérozoïtes vont se distinguer en gamétocytes mâle ou femelle et commencer le cycle sexué du parasite. La durée de vie des gamétocytes est de quelques jours et de nouveaux gamétocytes sont produits à la fin de chaque schizogonie érythrocytaire.

Cycle Chez l'anophèle femelle

Au cours de la piqûre, l'anophèle ingère des hématies parasitées de plasmodies sous différents stades évolutifs. Chez le moustique, seuls les gamétocytes évolueront. Ainsi, dès l'arrivée dans l'estomac de l'anophèle, les gamétocytes mâles subissent une exflagellation pour donner des gamètes mâles mobiles et chaque gamétocyte femelle mûrit pour donner un gamète femelle volumineux et immobile.

La fécondation de chaque gamète femelle par un gamète mâle donne autant de zygotes d'aspect vermiforme ($10\ \mu\text{m} \times 3 - 4\ \mu\text{m}$) appelés ookinètes. Les ookinètes passent entre les cellules de la paroi stomacale du moustique et vont se localiser à la face externe de l'estomac, et deviennent des oocystes. La durée totale entre le repas contaminant du moustique et la sortie des ookinètes est de l'ordre de 24 heures.

Des sporocystes vont se former à l'intérieur de l'oocyste et donner plusieurs centaines de sporozoïtes. L'oocyste est sphérique, sa taille passe d'environ $8\ \mu\text{m}$ à environ $60 - 80\ \mu\text{m}$ pendant sa maturation (ou sporogonie) qui dure de 4 à 21 jours. A maturité, les oocystes éclatent et les sporozoïtes sont libérés dans l'hémolymphe, en 24 heures environ. La majorité d'entre eux va se concentrer dans les glandes salivaires. Les sporozoïtes sont mobiles et mesurent $12 \times 1\ \mu\text{m}$. Leur durée de vie est en générale de 2 à 3 semaines dans les glandes salivaires (maximum 2 mois). L'anophèle injectera plusieurs dizaines de sporozoïtes lors de son repas sanguin.

2.2. LA PHYSIOPATHOLOGIE DU PALUDISME

Le paludisme évolue schématiquement en trois phases :

- **La phase d'incubation**

Elle est silencieuse et dure une à plusieurs semaines après la piqûre infectante. Elle correspond à la schizogonie hépatique et aux premiers cycles érythrocytaires.

- **La phase d'invasion**

On observe un syndrome pseudo grippal avec une fièvre continue, au début accompagnée de myalgies, céphalées, courbatures. Chez l'enfant, on a des troubles digestifs: nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales et hépatomégalie.

- **La phase d'état**

Elle correspond aux schizogonies érythrocytaires. La fièvre est intermittente, rythmée par l'éclatement des schizontes mûrs et le déversement du pigment palustre pyrogène dans le sang. On a une fièvre tierce avec un rythme d'apparition de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* ou une fièvre quarte avec un rythme d'apparition de 72 heures pour *P. malariae*.

Chaque accès palustre est caractérisé par une succession de "frisson puis chaleur puis sueur", l'ensemble dure de 10 à 12 heures et est suivi d'une apyrexie.

2.3. LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME

2.3.1. Le diagnostic clinique

C'est un diagnostic présomptif. Il consiste à rechercher chez le patient, la présence d'un accès fébrile décrit classiquement avec sa périodicité et sa séquence de frissons, chaleur et transpiration, asthénie, anorexie, courbatures, troubles digestifs. La fièvre est fréquente mais elle peut être absente.

2.3.2. Le diagnostic biologique

Le diagnostic de certitude du paludisme doit être basé sur les tests biologiques. Le diagnostic biologique peut s'effectuer par examen microscopique (goutte épaisse et frottis sanguin) ou au moyen de tests immunologique ou de biologie moléculaire.

2.3.2.1. Diagnostic direct

- La goutte épaisse et le frottis sanguin

Les techniques de référence pour le diagnostic du paludisme sont la goutte épaisse et le frottis sanguin. Ce sont ces techniques que nous avons utilisées lors de notre étude. Ils consistent en une mise en évidence du parasite dans le sang par l'examen microscopique d'une goutte épaisse et/ou d'un frottis. Il se déroule en plusieurs étapes :

- **Le prélèvement :**

Il doit se faire dans des conditions d'asepsie rigoureuses, avec du matériel stérile à usage unique et si possible, avant toute prise d'antipaludique et au moment de la fièvre. Le prélèvement peut être fait au bout du doigt avec confection immédiate du frottis et de la goutte épaisse, soit par ponction veineuse avec prélèvement dans un tube contenant un anticoagulant (par exemple EDTA) puis réalisation secondaire des lames d'examen. Le frottis doit être effectué avec soin de manière à ne comporter qu'une couche cellulaire.

- **La coloration et lecture des lames préalablement séchées**

Elle consiste à fixer dans un premier temps le frottis avec du méthanol, puis à recouvrir les lames d'une solution de Giemsa diluée au dixième. Au bout de dix à vingt minutes, les rincer avec de l'eau tamponnée puis sécher les lames.

La lecture des lames se fait au microscope optique à l'objectif 100.

Il est important de noter que la goutte épaisse ne doit pas être fixée.

-QBC (quantitative buffy coat)

C'est une technique de concentration. Son principe est basé sur une centrifugation du sang et le fait, que l'acridine orange colore les cellules contenant de l'acide nucléique. Il n'est pas spécifique au *plasmodium*.

-La PCR (polymerase chain reaction)

Il s'agit d'une technique d'amplification génique qui permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis et de le multiplier rapidement. C'est une technique moléculaire dont le principe est basé sur la capacité des ADN

polymérase à synthétiser des brins complémentaires d'ADN à partir de couples d'amorces (23). Cette technique est très sensible (peut détecter 1 parasite/ μL) mais son coût très élevé et son délai d'exécution limitent son utilisation dans la pratique de routine.

2.3.2.2. Diagnostic indirect

- Le diagnostic immunologique

Il n'a pas d'intérêt diagnostic en zone d'endémie palustre car tous les sujets ont des anticorps palustres. Il est surtout utilisé pour les enquêtes épidémiologiques afin de caractériser le niveau d'endémicité d'une région donnée. Les techniques utilisées sont :

- l'immunofluorescence indirecte (IFI) (17), l'immunoélectrophorèse, l'ELISA, l'hémagglutination, l'immunodiffusion,...

- Le parasight F[®]: c'est une méthode de diagnostic rapide dont le principe repose sur la détection d'un antigène, l'Histidine Rich Protein (HRP-II) spécifique de *P. falciparum* sur sang total. Cette méthode utilise des "bandelettes d'essai" qui permettent la détection du complexe antigène soluble-anticorps sous forme d'une bande colorée visible à l'œil nu.

- Les dysfonctionnements biologiques non spécifiques

L'anémie hémolytique est présente dans tous les cas de paludisme. Il s'agit d'une anémie normocytaire, le plus souvent normochrome, parfois hypochrome. On observe le plus souvent une thrombopénie, une altération de la fonction hépatique et rénale.

2.4. LES ANTIPALUDIQUES

2.4.1. Classification des antipaludiques

Cette classification a été faite selon quatre critères :

- Le point d'impact : on a les schizonticides et les gamétocides.
- L'origine du principe actif : naturelle ou synthétique.
- La caractéristique de l'action : rapide ou lente.
- La famille chimique (Tableau I)

Tableau I : Classification des principaux antipaludiques

Point d'impact	Mode d'action	Médicaments	Origine
Schizontocides	Action rapide, (résistance longue et difficile à apparaître)	<ul style="list-style-type: none"> - Quinine - Artémisinine (Qinghaosu) • Amino-4 - quinoléines <ul style="list-style-type: none"> - Chloroquine - Amodiaquine • Amino-alcools <ul style="list-style-type: none"> - Méfloquine - Halofantrine • Dérivés artémisinine <ul style="list-style-type: none"> - Artémether - Artésunate - Artéether 	Naturelle
	Action lente (résistance rapide à apparaître)	<ul style="list-style-type: none"> • Antifoliques <ul style="list-style-type: none"> - Sulfones - Sulfamides • Antifoliniques <ul style="list-style-type: none"> - Biguanides - Diaminopyrimidines 	Synthétique
Gamétocides	Action lente	<ul style="list-style-type: none"> • Amino-8-quinoléines <ul style="list-style-type: none"> - Primaquine 	

2.4.1.1. Les schizontocides

2.4.1.1.1. Mécanisme d'action des schizontocides

Ces médicaments ont la particularité de se concentrer fortement dans la vacuole digestive du parasite et l'empêchent de ce fait de digérer l'hémoglobine. Le mécanisme d'action de ces antipaludiques n'est pas encore bien élucidé néanmoins plusieurs théories développées par certains auteurs tentent de l'expliquer.

- **Théorie des récepteurs**

- l'ADN : pendant longtemps, on a cru à une éventuelle interaction entre amino-4-quinoléines et nucléoprotéines. Cette hypothèse, évoquée dans les

années 1950 et 1960 fut abandonnée par la suite jusqu'à la fin des années 1980, et puis réexaminée par Kwakye-Berko et Meshinck compte tenu de l'affinité de la liaison entre la chloroquine et l'ADN *in vitro* (22).

- La ferriprotoporphyrine (FP) IX membranaire: le mécanisme de toxicité membranaire.

Les interactions entre la chloroquine et la FP jouent un rôle capital dans la concentration des schizonticides dans les vacuoles des parasites (15; 11). Fitch et Chou ont identifié la FP comme étant le récepteur à forte affinité et spécificité pour la chloroquine, la quinine et la méfloquine *in vitro*. La FP (constituant à 90% de l'hémozoïne) est un produit de dégradation toxique (lytique) de la digestion de l'hémoglobine. Celle-ci se lie normalement à une protéine formée par le parasite (protéine liant l'hème), pour donner le pigment malarique non toxique (héméine). Les amino-4-quinoléines entrent en compétition avec la protéine parasitaire et empêche la fixation et donc la détoxification de la FP, celle-ci pouvant alors exercer son effet cytotoxique sur le parasite.

- **Le gradient de pH**

Cette théorie est basée principalement sur l'hypothèse de Krogstad selon laquelle les bases faibles pénètrent par diffusion simple dans les trois compartiments de l'hématie parasitée (21). Une fois à l'intérieur de la vacuole parasitaire, dont le pH acide est maintenu par une pompe à protons dépendant de l'ATP, les bases faibles subissent une protonation au niveau de leurs atomes d'azote, qui les rend 100 à 1000 fois moins diffusibles, expliquant l'accumulation des amino-4-quinoléines et des amino-alcools dans la vacuole. En même temps, le pH vacuolaire augmente, à la suite de la consommation de protons et du dépassement de la capacité de la pompe à protons et du tampon. En conséquence, les fonctions de la vacuole plasmodiale sont arrêtées, en particulier la dégradation de l'hémoglobine. En fait, l'augmentation du pH vacuolaire est moindre que prévue par le modèle, ce qui explique qu'un autre mécanisme soit mis en jeu. Pour Krogstad, un effet non base faible compléterait les effets des bases faibles, ceci pourrait impliquer, soit un transporteur situé dans la membrane érythrocytaire, soit un récepteur qui pourrait être la FP. Les deux mécanismes, complémentaires,

assureraient un taux élevé de médicaments dans la vacuole, l'augmentation du pH vacuolaire restant le phénomène clé qui agirait sur le parasite.

2.4.1.1.2. Les alcaloïdes des quinquinas

Les quinquinas sont des arbustes de la famille des *Rubiaceae*, originaires de la Cordillère des Andes (Pérou, Bolivie) et connus depuis la nuit des temps pour leur activité antipyrétique. Trois espèces de quinquinas sont utilisées à des fins thérapeutiques, *Cinchona succirubra*, *C. calysaya* et *C. officinalis* (46). De ces plantes est obtenu un extrait appelé totum alcaloïdique composé de quinine, quinidine, cinchonine, cinchonidine. Ce totum possède une activité antipaludique puissante mise à profit dans la prise en charge des cas de paludisme grave à *P. falciparum*. Le composant le plus actif est la quinine. On la retrouve dans les spécialités telles que Quinimax[®], Quinine[®] Lafran, Quinoforme[®], Arsiquinoforme[®].

La Quinine est un antipaludique majeur et schizonticide endoérythrocytaire.

2.4.1.1.3. Les extraits de l'armoise chinoise (*Artemisia annua* ou *Qinghao*) et ses dérivés

Le principal principe actif extrait de *Artemisia annua*, plante de la famille des *Asteraceae* est l'artémisinine ou *Qinghaosu* en chinois. Il s'agit d'une lactone géante sesquiterpénique présentant un groupement peroxyde support de l'activité pharmacologique. L'efficacité de l'artémisinine est reconnue mais son action est fugace (temps de demi-vie courte). Cela a conduit à la mise au point de produits dérivés. Ainsi à partir de cette molécule on a obtenu des dérivés hémisynthétiques intéressants utilisés dans la prise en charge du paludisme grave. Les dérivés de l'artémisinine, les plus utilisés sont l'artéméther (Paluther[®]), la dihydroartémisinine (Cotecxin[®]) et l'artésunate (Arinate[®], Arsumax[®], Plasmotrim[®]).

2.4.1.1.4. Les amino-4-quinoléines

Ils font partie des premiers antipaludiques de synthèse. Cette classe d'antipaludiques regroupe la chloroquine (Nivaquine[®], Resochine[®]) et l'amodiaquine (Flavoquine[®], Camoquin[®]). Actuellement, seul l'amodiaquine est encore utilisée surtout en association avec les dérivés de l'artémisinine. La

chloroquine est de nos jours abandonnée à cause de la chloroquino-résistance ayant atteint un niveau très élevé.

2.4.1.1.5. Les aryl-amino-alcools

On distingue dans ce groupe la méfloquine (Lariam®) et l'halofantrine (Halfan®).

2.4.1.1.6. Les antimétabolites

Le groupe des antimétabolites est constitué par :

- Les Antifoliques : sulfadoxine
- Les Antifoliniques : pyriméthamine (Daraprim®), proguanil (Paludrine®)

Les antifoliques (sulfamides et sulfones) et les antifoliniques (di-amino pyrimidine et biguanides) agissent sur la voie de biosynthèse de l'acide folique chez le *Plasmodium* comme dans le cas des bactéries. Les antifoliques sont des analogues de l'acide para-amino-benzoïque (PAB) et sont donc en compétition avec le PAB pour la même enzyme; ils inhibent l'enzyme de la première étape de synthèse de l'acide folique, la dihydrofolate synthétase. Les antifoliniques inhibent l'enzyme de la deuxième étape de la synthèse, la dihydrofolate réductase. Les deux sous-familles des antimétabolites combinés agissent séquentiellement sur la même voie métabolique du parasite.

La spécificité d'action des antimétabolites, contre les plasmodies est basée sur la haute affinité de ces antipaludiques, pour les enzymes plasmodiales par rapport aux enzymes des cellules hôtes (24).

Leur inconvénient est que leur action est assez lente, ce qui favoriserait l'apparition des phénomènes de chimiorésistance.

2.4.1.1.7. Les antibiotiques

Certains antibiotiques sont souvent utilisés comme antipaludiques en association avec d'autres antipaludiques. Les cyclines, les macrolides, les aminosides et les quinolones sont faiblement schizonticides ; on les associe parfois à la quinine dans certaines régions où la sensibilité de *P. falciparum* à la quinine est diminuée. La rifampicine est active, mais risque de sélectionner des résistances bactériennes (27).

2.4.1.1.8. Les associations courantes d'antipaludiques

Leur objectif est d'augmenter l'efficacité tout en minimisant les risques de survenue de chimiorésistance. Les plus usuelles sont :

- L'association sulfadoxine + pyriméthamine dans les spécialités telles que Fansidar[®], Maloxine[®], Combimal[®].

La sulfadoxine pyriméthamine est utilisée dans le traitement présomptif intermittent (TPI) pour la prévention du paludisme chez la femme enceinte.

- L'association sulfadoxine (500 mg) + pyriméthamine (25 mg) + méfloquine (250 mg) dans Fansimef[®].
- l'association chloroquine (100 mg) + proguanil (200 mg) dans Savarine[®]

2.4.1.1.9. Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT)

Les ACT les plus courantes et les plus utilisés sont :

- Artésunate (AS) +amodiaquine (AQ) (Arsucam[®], Arsuamoon[®]) Il s'agit d'une combinaison thérapeutique efficace dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum*, surtout dans les zones où l'AQ a un taux de résistance très faible (3).
- Artemether+lumefantrine (CoArtem[®], Riamet[®]) : c'est une association fixe.

2.4.1.2. Les gamétocytocides

Les gamétocytocides actuellement connus sont les amino-8-quinoléines (Primaquine[®]), toutes toxiques, donc peu employées. Néanmoins, elles sont les seules à avoir réellement un effet sur les gamétocytes de *P. falciparum*.

2.5. LA CHIMIORESISTANCE DANS LE PALUDISME

2.5.1. Définition

La résistance aux antipaludiques est définie comme « l'aptitude d'une souche de parasites du paludisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé, à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées, mais comprises dans les limites de tolérance du sujet » (33).

2.5.2. Les mécanismes de résistance aux amino-4-quinoléines

Plusieurs théories ont été émises pour expliquer la résistance de *P. falciparum* aux amino-4-quinoléines. Toutes 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 efflux rapide de l'antipaludique de sa vacuole digestive, ce qui lui permet de survivre. Les théories dominantes stipulaient que ces défauts d'accumulation étaient dus à une altération des gradients de pH et/ou de la perméabilité membranaire (26). Plus tard, les travaux de Würnsch *et al.* décrivent un autre mécanisme de résistance à la chloroquine reposant sur une stimulation de l'échange sodium-proton (Na^+/H^+) (47). Ils ont pu en effet démontrer que la chloroquine stimulait mieux l'échange sodium proton chez les parasites sensibles et augmentait de ce fait le transport du médicament chez ces parasites, alors que le contraire se produisait chez les parasites résistants. Mais, assez récemment, les derniers travaux de Bray *et al.*, sur la question se fondent essentiellement sur un déficit de la liaison chloroquine-ferritoporphyrine (chloroquine-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 à une altération des gradients de pH (9).

Par ailleurs il a été démontré que la chloroquino-résistance est réversible par le vérapamil, un modulateur de la résistance dans les cellules cancéreuses multi résistantes de mammifères (MDR). Cela a permis par analogie d'aboutir à la localisation de la protéine responsable de la résistance de *P. falciparum*. Des mutations ponctuelles du gène situé sur le chromosome 5 et codant pour une protéine, le *Pfmdr-1*, et celle d'un second gène situé cette fois ci sur le chromosome 7 (*Pfcdg2*) seraient responsables de la résistance (16,38).

Cependant, d'autres études viendront réfuter ces théories (18,13). Récemment, un troisième gène, le *Pfcrt*, situé sur le chromosome 7 à proximité du *Pfcdg2* a été identifié et des mutations ponctuelles de ce gène sont retrouvées chez des souches résistantes *in vitro* (14). Il est donc assez clair de nos jours que les résistances des parasites aux médicaments sont l'œuvre des mutations génétiques observées chez ces parasites.

2.5.3. Facteurs favorisant l'émergence et la diffusion de la chimiorésistance

Plusieurs facteurs peuvent être à la base de l'apparition de la chimiorésistance. Il y a les facteurs liés à l'utilisation du médicament, le phénomène de mutation génique spontanée du parasite, l'immunité de la population et le vecteur.

2.5.3.1. Les facteurs liés au médicament

La fréquence et l'utilisation massive des antipaludiques pour la prophylaxie ou pour le traitement curatif entraînent une sélection de souches parasitaires résistantes (36). A cela il faut ajouter les traitements à visée curative avec posologie insuffisante et répétée (10). Les médicaments à temps de demi-vie long tels que la sulfadoxine pyriméthamine et la méfloquine, augmentent la sélection de souches résistantes (43,19).

2.5.3.2. Les facteurs liés au parasite

Indépendamment de toute pression médicamenteuse, des mutations spontanées susceptibles d'induire une résistance peuvent survenir au niveau du génome plasmodial. Moins le nombre de mutations requises pour la chimiorésistance sont nombreuses, plus vite, interviennent ces mutations (44).

2.5.3.3. Les facteurs liés à l'immunité et le mouvement de population

L'immunité de prémunition améliore l'efficacité thérapeutique d'un antipaludique. Les personnes naïves au paludisme développent une immunité non spécifique contre les parasites et sont donc, des réservoirs de multiplication et de propagation des souches plasmodiales chimiorésistantes (2). Un voyageur non immun peut véhiculer des gamétocytes de mutants résistants d'une zone de chimiorésistance à une autre indemne de ce phénomène.

2.5.3.4. Les facteurs liés au vecteur

L'anophèle joue un rôle dans la diffusion de la résistance. Elle intervient de plusieurs manières :

- l'intensité de la transmission,
- la durée de la transmission ;
- l'avantage sélectif des souches chloroquino-résistantes chez le vecteur;
- la compatibilité vecteur-parasite ;
- la recombinaison chez les vecteurs.

2.5.4. Les méthodes d'étude de la chimiorésistance

Leur but de ces méthodes est de proposer aux thérapeutes des traitements efficaces et rationnels afin d'avoir une meilleure politique sanitaire, et de surveiller l'évolution du phénomène de la résistance au sein des populations. De nombreuses méthodes existent et peuvent être appliquées. L'évaluation de la chimiorésistance a été standardisée par l'OMS pour l'espèce *P. falciparum* en 1973 et modifiée en 1997 puis en 2002 (45). On distingue deux grandes méthodes d'étude: l'étude *in vivo* et l'étude *in vitro*. L'apport de la biologie moléculaire permet une meilleure approche sur les connaissances des variations génétiques pouvant être impliquées dans le déclenchement de la résistance.

2.5.4.1. Les tests *in vivo*

Les tests *in vivo* consistent en l'évaluation directe de l'efficacité thérapeutique de l'antipaludique chez le patient. Le seuil de densité parasitaire minimal pour l'inclusion dans un test *in vivo* est habituellement de 1000 et 2000 parasites/ μ l respectivement pour les régions à transmission faible à modérée et les régions à transmission élevée du paludisme (34). Après la détermination de la densité parasitaire chez le malade dont la température axillaire est égale ou supérieure à 37,5°C ou ayant une histoire fébrile des 24 heures précédentes, la dose normale d'antipaludique lui est administrée. Ensuite, l'évolution de la température et de la parasitémie est suivie pendant 14 ou 28 jours selon le mode de suivi choisi (34). On distingue ensuite la réponse parasitologique de la réponse clinique dans l'interprétation des résultats.

Le tableau II nous montre la classification de la réponse au traitement.

Tableau II : Classification OMS 2005 de la réponse au traitement

ETP (Echec thérapeutique précoce) : entre J0 et J3
<ul style="list-style-type: none">- Développement de signes de danger ou de paludisme grave en présence d'une parasitémie- Parasitémie au J3 avec une température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$- Parasitémie au J3 $>$ à 25% J0
ECT (échec clinique tardif) jour 4 à 42
<ul style="list-style-type: none">- Développement de signes de danger ou de paludisme grave après le J3 en présence d'une parasitémie, sans répondre aux critères d'échec thérapeutique précoces.- Température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$; ou histoire fébrile dans les 24heures précédentes entre le J4 et J42 en présence d'une parasitémie sans répondre aux critères d'échec thérapeutique précoce.
EPT (Echec parasitologiques tardif) jour 42
Présence d'une parasitémie à J42 avec une température axillaire $< 37,5^{\circ}\text{C}$, sans critères ECT ou EPT.
RCPA (réponse clinique et parasitologique adéquate)
Absence d'une parasitémie au jour 42 indépendamment de la température sans répondre aux critères d'ETP ou d'ECT ou d'EPT.

2.5.4.2. Les tests *in vitro*

Ils consistent à mesurer l'inhibition de la maturation en schizontes des parasites isolés chez un sujet, en présence de doses croissantes d'un antipaludique donné.

Après le macro-test mis au point par l'OMS et vite abandonné, ce sont les micro-tests qui sont actuellement utilisés. On distingue :

2.5.4.2.1. Les tests optiques

Le micro-test OMS et le semi-microtest de Le Bras (25) ont été mis au point à la fin des années 1970 afin d'évaluer la sensibilité de *P. falciparum* à certains médicaments. Ils sont basés sur la capacité des doses croissantes d'antipaludiques testés à empêcher la maturation des trophozoïtes de *P. falciparum* en schizontes, lorsque le prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) supplémenté en sérum humain et incubé à 37°C, en présence du gaz carbonique (CO₂) à (5%), pendant 24 à 48 heures. Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI), pour le microtest OMS, et en concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) ou 90% (CI₉₀) pour le semi-microtest.

2.5.4.2.2. Les tests isotopiques

Il s'agit du microtest isotopique de Desjardins (12) et du semi-microtest isotopique de Le Bras et Deloron (25). Ce sont des modifications, respectivement, du microtest OMS et du semi-microtest optique, par l'adjonction dans chaque cupule d'un radio-isotope, l'hypoxanthine tritiée. La maturation des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites. La mesure de la radioactivité se fait après 42 à 48 heures d'incubation, à l'aide d'un compteur à scintillation. Les résultats sont donnés en coups par minute (CPM) et l'activité du médicament est exprimée en CI₅₀ ou en CI₉₀.

➤ Les nouveaux tests:

- Le test enzymatique de Makler : C'est un test fondé sur la capacité du lactate déshydrogénase (LDH) de *P. falciparum* à utiliser rapidement la 3-acétylpyridine adénine dinucléotide dans la réaction aboutissant à la formation du pyruvate à partir du L-lactate.
- Le test de Krogstad : Ce test est fondé sur la capacité d'un inhibiteur calcique, la vérapamil, à bloquer l'excrétion et l'exocytose de la chloroquine de la vacuole parasitophore des souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum*.
- Le SYBR Green : son principe est basé sur une réaction de PCR effectuée en présence d'un fluorochrome spécifique de l'ADN (SYBR Green I). Le SYBR

Green se lie à l'ADN synthétisé et la fluorescence augmente et est mesurée en continu au cours de la PCR.

- **Méthode DELI (Double-site Enzyme-Linked LDH Immunodetection assay) (29).**

La méthode colorimétrique ou DELI-microtest est basée sur la détection du lactate deshydrogénase spécifique de *Plasmodium falciparum* (pLDH) par 2 anticorps monoclonaux reconnaissant 2 sites différents de l'enzyme. L'anticorps monoclonal Mab17E4 spécifique de la pLDH de *Plasmodium falciparum*, préalablement fixé dans les puits d'une microplaque pour ELISA, va capter la pLDH libérée au cours de la culture du parasite. L'addition d'un second anticorps monoclonal Mab 19G7 biotinylé va assurer sa fixation sur un second site de la pLDH. L'addition d'une streptavidine marquée à la peroxydase permet d'évaluer l'activité enzymatique par addition de son substrat (3,3',5,5'-tetra-methymbenzidine) en présence de peroxyde d'hydrogène. La réaction enzymatique est ensuite bloquée par l'acide phosphorique et l'intensité de la coloration jaune développée est évaluée en densité optique au spectrophotomètre à 450 nm (1).

2.5.4.3. Les tests moléculaires

Il s'agit essentiellement de la polymérase chain reaction (PCR). C'est une technique qui permet, à partir d'un fragment d'ADN, d'obtenir une quantité importante de fragments identiques visualisables à la lumière Ultraviolet (UV). Cette technique est couramment utilisée pour la mise en évidence des marqueurs de résistance.

Les variantes de la PCR sont essentiellement la MS-PCR ou PCR par mutation spécifique, le dot blot qui conjugue la PCR à l'hybridation par utilisation de sondes radio-marquées et la PCR par restriction enzymatique, RFLP (restriction fragment length polymorphism)

III. OBJECTIFS DE L'ETUDE

3.1. OBJECTIF GENERAL

Etudier la sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques dans la ville de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso).

3.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES

- Tester la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux médicaments suivants : dihydroartémisinine, luméfantrine, Monodéséthyl amodiaquine, quinine, chloroquine et Pipéraquline.
- Comparer la sensibilité de *P. falciparum* à ces antipaludiques étudiés avant traitement aux combinaisons Artémether-Luméfantrine et Amodiaquine + Artesunate.
- Comparer la sensibilité de *P. falciparum* à ces antipaludiques étudiés après traitement (parasitémies récurrentes) aux combinaisons Artémether-Luméfantrine et Amodiaquine + Artesunate.

IV. METHODOLOGIE

IV. METHODOLOGIE

4.1. CADRE DE L'ETUDE

L'étude s'est déroulée à Bobo-Dioulasso, ville située à 365 km de Ouagadougou, la capitale du Burkina Faso. La transmission du paludisme dans cette région du pays est saisonnière de Juin à Décembre. En 2000, le nombre de piqûres infectantes / personne / année (Taux d'Inoculation Entomologique, TIE) était d'environ 60 dans la ville de Bobo-Dioulasso(41). Les vecteurs les plus couramment rencontrés sont *Anopheles gambiae*, *A. funestus* et *A. arabiensis*. Le parasite prédominant est *P. falciparum* (41). Le paludisme représente la principale raison de consultation dans les centres de santé et la 1^{ère} cause d'hospitalisation avec un taux de létalité de 5% à 20% (41). Les patients ont été recrutés au Centre Médical avec antenne chirurgicale (CMA) du district de Dafra dans la ville de Bobo-Dioulasso et les tests *in vitro*, réalisé au laboratoire de parasitologie du Centre Muraz.

4.2. TYPE ET PERIODE D'ETUDE

Notre travail s'est inscrit dans le cadre d'un essai clinique randomisé ouvert couplé à des tests *in vitro*. Cependant, nous nous sommes intéressés dans notre analyse surtout aux données des tests *in vitro*.

Cet essai clinique comparait l'efficacité thérapeutique de l'association artéméther-luméfantrine (Riamet[®]) et de la combinaison Artésunate + amodiaquine (Arsuamoon[®]) dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum*.

Pour les tests *in vitro* les médicaments étudiés étaient : La chloroquine diphosphate (sigma-aldrich), la quinine hydrochloride (sigma-aldrich), la monodéséthyl amodiaquine, le dihydroartémisinine (Sigma-tau), la Luméfantrine (Novartis), la pipéraquline phosphate (Sigma-tau).

Les procédures de l'étude étaient basées sur le protocole, de l'OMS, d'étude de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques. Les patients ont été suivis pendant 42 jours. L'étude s'est déroulée de juillet 2009 à février 2010.

NB : le protocole de l'étude a reçu l'accord du comité d'éthique institutionnel du centre Muraz.

4.3. CRITERES D'INCLUSION ET DE NON INCLUSION

Le recrutement des patients s'est effectué au centre médical avec antenne chirurgical du district de Dafra. Pour être inclus dans l'étude les patients devaient remplir les conditions suivantes :

- Etre âgé de 6 mois à 15 ans ;
- Avoir un poids au delà de 5 kg
- Avoir une Température $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ou une fièvre des 24 heures précédentes
- Avoir une Infection mono spécifique à *P. falciparum* ;
- Avoir une densité parasitaire comprise entre 4000 et 200 000 parasites asexués / μl
- Avoir un taux d'hémoglobine $\geq 5,0$ g/dl
- Consentement éclairé signé par les parents ou les personnes en charge de l'enfant;
- Volonté des parents ou les personnes en charge de l'enfant d'adhérer aux exigences du protocole pendant toute la durée de l'étude.

Ils ne seront pas inclus, s'ils ont au moins l'un des critères suivants :

- Participation à tout autre essai dans les 30 jours précédents
- Hypersensibilité connue aux médicaments de l'étude
- Paludisme grave (référés au service de Pédiatrie de l'hôpital universitaire Sourou Sanon de Bobo-Dioulasso pour une prise en charge appropriée)
- Signe de danger, Malnutrition grave
- Maladie intercurrente connue ou tout autre condition (cardiaque, rénal, maladie hépatique) pouvant constituer un risque pour le sujet ou interférer avec les résultats de l'étude.

4.4. LA GOUTTE EPAISSE ET LE FROTTIS MINCE

➤ Matériel

Il se composait essentiellement de : Séchoir, Microscope optique et Lames porte-objets, Consommables médicaux.

➤ Réactifs : Alcool à 70° , méthanol, Colorant de Giemsa, huile à immersion.

➤ Réalisation de la goutte épaisse et du frottis mince

- La goutte épaisse

On dépose une goutte de sang sur une lame porte-objet propre. Le sang est rapidement défibriné par un mouvement en spirale à l'aide d'un coin d'une autre lame.

- **Le frottis mince**

Il s'agit d'un étalement mince d'une goutte de sang sur une lame porte-objet. Le frottis sert principalement à l'identification de l'espèce plasmodiale. Le mode opératoire pour la réalisation de la goutte épaisse et du frottis mince a déjà été décrit dans les généralités.

- **La lecture de la goutte épaisse et du frottis mince :**

Sur l'étalement épais, les parasites ont été comptés par rapport aux leucocytes. Sur la base de 8000 leucocytes/mm³ de sang sur un bon étalement, l'expression de la densité parasitaire (DP) est la suivante :

$$DP = \frac{\text{Nombre de parasites comptés} \times 8000}{\text{Nombre de leucocytes comptés}}$$

Sur le frottis mince nous avons compté le nombre de globules rouges parasités pour un nombre de champs microscopiques examinés.

Sur la base de 4000000 d'hématies/mm³ de sang, et sachant que sur un bon frottis mince où les hématies sont juxtaposées sans chevauchement ni espacement on estime à 400 le nombre d'éléments par champ microscopique, l'expression de la densité parasitaire est la suivante :

$$DP = \frac{\text{Nombre d'hématies parasités} \times 400000}{\text{Nombre de champs examinés} \times 400}$$

Après toutes ces étapes, les sujets répondant aux critères d'inclusion définis ci-dessus ont bénéficié d'un prélèvement de 5 à 10 ml de sang veineux sur EDTA et d'un enregistrement sur une fiche de travail prévue à cet effet (voir Annexe 1).

Ces prélèvements sont ensuite acheminés au laboratoire pour la mise en œuvre des tests de culture cellulaire le jour même.

4.5. LES TESTS *IN VITRO*

Nous avons effectué le test isotopique complet.

Son principe est basé sur la culture d'une souche plasmodiale en présence de concentrations variables d'un antipaludique, et de déterminer ensuite la concentration inhibant 50% (CI50) de la croissance de la souche testée.

NB : Toutes les manipulations se sont déroulées sous une hotte à flux laminaire et avec du matériel stérile pour éviter toute contamination.

4.5.1. Matériel et réactifs

➤ Matériel

Nous avons utilisé comme matériel:

- des Flacons en verre stériles de 500 et 1000 ml;
- un système de filtration stérile avec membrane filtrante 0,22 micromètre;
- des pipettes graduées stériles (2, 5,10 et 25 ml) ;
- un agitateur électromagnétique et un barreau aimanté;
- des béchers de 200 ml, 600 ml, 800 ml et 5 litres ;
- des plaques de 96 puits stériles (NUNCLON*);
- des tubes à centrifuger de 14 et 50 ml stériles ;
- une centrifugeuse;
- des pipettes pasteur stériles;
- des micropipettes Gilson de 20, 200, 1000 microlitres;
- des cônes : jaunes (10 et 200 µl et bleus (200 et 1000 µl) stériles;
- des distributeurs Eppendorf et combitips de 1,25 et 5 ml;
- des tubes stériles, microtubes et cryotubes de conservation;
- balance de précision SARTORIUS micro;
- réfrigérateur et congélateur;
- microscope et lames pour microscopie;
- hotte à flux laminaire;
- vortex;
- incubateur à CO₂;

➤ Réactifs

- RPMI 1640 déshydraté avec de l'HEPES (25 mM), Sigma;
- bicarbonate de sodium (Na H CO₃), Sigma;

- eau minérale;
- serum humain;
- antibiotique (Gentamicine), Sigma;

➤ **Les médicaments :** nous avons étudié la sensibilité *in vitro* de six médicaments antipaludiques:

- chloroquine diphosphate (sigma-aldrich),
- quinine hydrochloride (sigma-aldrich),
- monodéséthyl amodiaquine,
- dihydroartémisinine (Sigma-tau),
- Luméfantrine (Novartis),
- pipéraquline phosphate (Sigma-tau).

NB : La stérilisation de la verrerie et des tips se fait à l'autoclave en présence d'un témoin de stérilité.

4.5.2. Préparation des milieux de culture

➤ **préparation de la solution de RPMI 1640 pour culture Cellulaire**

Pour un litre de solution de RPMI 1640 tamponné il faut :

- 10,4g de poudre de RPMI 1640 avec HEPES;
- 2,1g de bicarbonate (25 millimoles NaHCO_3);
- 1ml de Gentamicine (10 mg/ml).

Pour la préparation proprement dite, nous avons dissout dans un Becher et à l'aide d'un agitateur magnétique, le RPMI1640 et le bicarbonate de sodium dans environ 500ml d'eau minérale et complété à 1litre. Nous avons ensuite, vérifié le pH de la solution qui devrait être compris entre 7,2 et 7,4. Dans le cas contraire, il fallait l'ajuster avec une solution de soude (NaOH 1M) ou de l'acide phosphorique. La solution a été stérilisée par la suite à l'aide d'une unité filtrante sous une hotte à flux laminaire puis conservée dans des flacons stériles à -20° C.

➤ **Préparation du milieu complet ou RPS 10%**

Pour préparer 10 ml de milieu complet il faut : 9 ml de RPMI + 1 ml de sérum humain.

➤ **Préparation des hématies saines de groupe O Rhésus positif**

- Transférer stérilement sous une hotte le sang total (O Rh+) de la poche de transfusion dans des tubes à centrifuger de 50 ml en quantité adéquate pour le lavage et centrifuger à 2000 tours/minute pendant 10 minutes.
- Recueillir le plasma puis ôter la couche leuco-plaquettaire.
- Laver trois (3) fois en excès de milieu incomplet (2000 tours/minutes pendant 10 minutes).
- Remettre en suspension avec un même volume de milieu complet pour obtenir un hématoците à 50%.
- Contrôler la stérilité des hématies au bout de 3 à 4 jours

Ainsi préparées, les hématies peuvent être conservées pendant un mois entre 4 et 8°C.

➤ Préparation de l'échantillon de globules rouges parasités (GRP)

Le culot de globules rouges parasité a été lavé par ajout du RPMI de lavage au 2/3, homogénéisation du mélange puis centrifugation pendant cinq minutes à 2000 tours par minute à la température ambiante. L'opération a été répétée trois fois.

La parasitémie du sang à mettre en culture, doit être comprise entre 0,1% (4000GRP/ μ l) et 0,5%(20000 GRP/ μ l). Lorsqu'elle est supérieure à 0,5%, on effectue une dilution avec des globules rouges sains du groupe O Rhésus positif.

4.5.3. Mode opératoire du test isotopique

➤ Préparation des solutions d'antipaludiques

Pour chaque médicament, nous avons préparé une solution mère à 5 mg/ml.

Le tableau ci-dessous nous montre le solvant utilisé par médicament.

Tableau III : solvant utilisé par médicament

Médicament	Solvant utilisé	Concentration de la solution mère
Quinine	Méthanol pure	5 mg/ml
chloroquine	Eau PPI	5 mg/ml
Monodéséthylamodiaquine	Eau PPI	5 mg/ml
Dihydroartémisinine	Méthanol pure	5 mg/ml
Luméfantrine	Ethanol absolu	5 mg/ml
Pipéraquine	Acide lactique	5 mg/ml

➤ **Cottage des plaques avec les médicaments**

Nous avons reparti 50 µl des solutions filles dans les puits réservés à cet effet et pour les puits témoins, nous avons mis 50 µl de RPS.

Les concentrations des solutions filles selon les médicaments sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau IV : Concentrations des solutions filles selon les médicaments antipaludiques

Mda	Cq	Lum	Qn	DHA	Pip
0	0	0	0	0	0
7,5	12,5	1,25	13,02	0,25	6,25
15	25	2,5	6,04	0,5	12,5
30	50	5	52,08	1	25
60	100	10	104,16	2	50
120	200	20	208,31	4	100
240	400	40	416,63	8	200
480	800	80	833,25	16	400
960	1600	160	1666,5	32	800
1920	3200	320	3333	64	1600

Les concentrations des médicaments sont exprimées en nanomolaire (nM).

➤ **Préparation et distribution de la suspension globulaire dans les puits**

Elle a consisté à faire le mélange suivant dans un tube conique de 50 ml : 39,1ml de RPS+ 900 µl de GRP + 80 µl d'hypoxanthine tritiée.

NB : Il faut répartir les témoins optiques avant d'ajouter l'hypoxanthine tritiée. Après homogénéisation, un volume de 200µl de la suspension globulaire a été distribué dans chaque puits des plaques contenant les solutions de médicament. Ensuite la date, l'heure et le numéro d'identification de l'échantillon, ont été marqués sur le couvercle de la plaque. La plaque ainsi prête est placée après agitation dans un incubateur à 5% de gaz carbonique (CO₂) à 37°C pendant 48 heures.

Au bout de ce temps, nous avons confectionné une goutte épaisse avec un témoin optique que nous avons examiné au microscope après coloration. A l'examen il faut noter s'il y a maturation (présence de schizontes) puis arrêter

l'incubation de la plaque et la congeler à -20°C après l'avoir emballée dans du papier aluminium.

➤ **La collecte cellulaire**

Le matériel utilisé est composé d'un collecteur Unifilter-96 Packard et de plaques de lecture Unifilter.

L'opération consiste à collecter les cellules des plaques de culture préalablement décongelées, sur des plaques de lecture Unifilter. Une fois la collecte terminée les plaques de lecture sont mis à sécher à l'air libre.



Figure 3: Photographie du collecteur de cellule contenant une plaque de culture

➤ **Le comptage**

Le matériel est composé de :

- un compteur bêta Microbeta® 1450 Trilux (Perkin Elmer Wallac, Turku Finlande),
- liquide scintillant Betaplate scint.

Description du compteur bêta

Le compteur bêta est un appareil qui sert à mesurer la radioactivité par un système de scintillation liquide. Le liquide scintillant joue le rôle de révélateur de radioactivité. Le compteur est utilisé couplé à un ordinateur.

Principe du comptage par le compteur bêta

Il consiste à détecter et à compter la décroissance radioactive par scintillation liquide.

Le tritium est un élément radioactif émettant un rayonnement bêta faible (quelques centimètres dans l'air et quelques micromètres dans l'eau) qui n'est pas mesurable par détection directe. Il faut ajouter un liquide dit scintillant qui va être excité par les particules bêta émises, ce qui aura pour effet une émission photonique. Le compteur à scintillation contient un à plusieurs photomultiplicateurs, qui vont compter le nombre de photons émis pendant un temps précis. Suivant le rendement du compteur, on pourra obtenir un chiffre en coup par minute (CPM) ou en désintégration par minute (DPM) qui sont directement proportionnel au nombre de particules bêta émises dans le milieu et donc à la radioactivité du corps.



Figure 4: photographie d'un compteur beta couplé à un ordinateur

4.5.4. Expression et interprétation des résultats de comptage

➤ Représentation graphique

Les résultats de lecture obtenus en coup par minute (CPM), ont servi à la détermination des CI50. Ainsi, dans un premier temps, nous avons calculé le nombre de CPM moyen et ensuite nous avons représenté les courbes d'inhibition. Ces courbes présentent deux plateaux de comptage : un plateau supérieur (PS) indiquant une inhibition de la croissance des parasites et un plateau inférieur (PI) indiquant une absence d'inhibition.

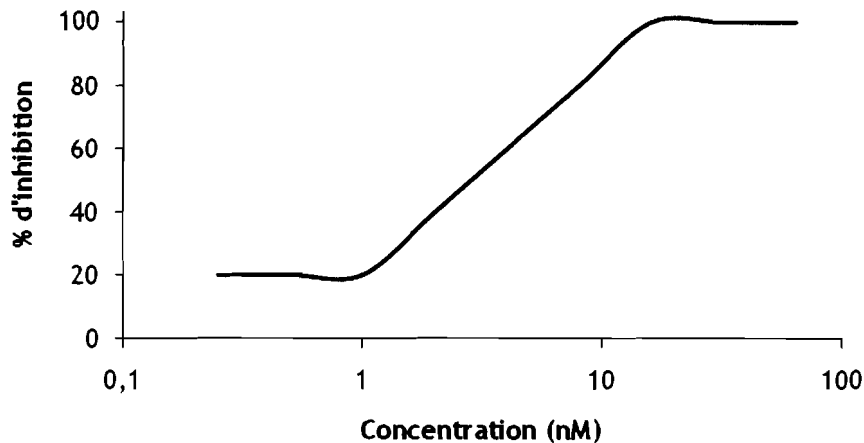


Figure 5: Courbe d'inhibition du parasite en fonction de la concentration du médicament

- **Détermination de la concentration inhibant 50% de la souche testée (CI50)**
Pour calculer la CI50, on détermine d'abord la CPM50 = Y.

$$CPM50 = Y = \frac{PS - PI}{2} + PI \quad \text{soit} \quad Y = \frac{PS + PI}{2}$$

Il faut remarquer que PI n'est jamais nul en raison du bruit de fond.

Soit y_1 , le nombre de CPM immédiatement inférieur à la CPM50

X_1 , la concentration de drogue correspondant à y_1

y_2 , le nombre de CPM immédiatement supérieur à la CPM50

X_2 , la concentration de drogue correspondant à y_2

$$\text{On a : } CI50 = X_1 - \frac{(Y - y_1)(X_1 - X_2)}{y_1 - y_2}$$

4.6. ANALYSE DES RESULTATS

Pour ce qui concerne la culture du *Plasmodium*, les résultats de la prolifération après comptage au micro bêta est donné en coups par minute (CPM) sur page Excel. Les différents calculs ont été effectués sur le logiciel Excel 2007. Pour déterminer la concentration de médicament inhibant 50% des parasites (CI50), nous avons utilisé le logiciel icestimator (<http://www.antimalarial-icestimator.net/>). La concentration inhibitrice 50 % (CI50) est définie comme la

concentration permettant 50 % de l'incorporation d'hypoxanthine tritiée des puits témoins sans antipaludique.

Le seuil de résistance *in vitro* est estimée à : une valeur de CI50 supérieure ou égale à 100 nanomolaire (nM) pour la chloroquine, une valeur de CI50 supérieure ou égale à 60 nM pour la monodésethylamodiaquine et $CI50 \geq 800nM$ pour la quinine (06,37).

Pour ce qui concerne la dihydroartémisinine, luméfantine et pipéraquine, les valeurs seuils de résistance ne sont pas déterminées.

V. RESULTATS

V. RESULTATS

5.1. RESULTATS GLOBAUX

Comme présenté plus haut, notre travail s'inscrivait dans le cadre global d'un essai clinique randomisé ouvert couplé à des tests *in vitro*. Cependant pour notre mémoire de DEA, nous nous sommes intéressés aux données des tests *in vitro*. Le nombre total de patients pour lesquels nous avons pu lire les plaques de culture dans le cadre de notre travail était de 40. L'âge moyen des patients était de 5 ans et les limites d'âges étaient comprises entre 06 mois et 15 ans. La moyenne des parasitémies à l'inclusion était de 79028,25 GRP/ μ l.

Chaque patient avait reçu après randomisation soit de l'Artésunate amodiaquine soit de l'artemether luméfantrine comme traitement.

Le nombre total de patients ayant présenté un échec parasitologique parmi les 40 sujets que nous avons analysés était de 08.

5.2. RESULTATS DES TESTS *IN VITRO*

5.2.1. Répartition des CI50 selon l'antipaludique testé *in vitro*

Le Tableau IV résume la moyenne géométrique des CI50 selon l'antipaludique testé.

Tableau V : Moyenne géométrique des CI50 selon l'antipaludique testé

Antipaludiques	Résultats interprétables	Moyenne des CI50 (nM)	CI50 minimum (nM)	CI50 maximum (nM)
Quinine	36 (90%)	146,11	11,99	1920,23
Chloroquine	34 (85%)	77,81	11,02	721,08
Monodéséthylamodiaquine	33 (82,5%)	20,28	5,13	627,88
Luméfantrine	36 (90%)	30,61	1,19	158,89
Dihydro artémisinine	34 (85%)	1,31	0,23	46,9
Pipéraquine	33 (82,5%)	8,58	3,18	648,83

5.3.2. Répartition des isolats selon leur degré de sensibilité

La distribution des valeurs des CI50 montre que 2,78% sont au delà du seuil de résistance pour la quinine, 52,94% pour la chloroquine et 6,06% pour la monodéséthylamodiaquine. Pour ce qui concerne la dihydroartémisinine, la luméfantine et la pipéraquline, nous n'avons pas pu déterminer le taux de résistance du fait que nous n'avons pas les valeurs seuils de résistance.

Le tableau suivant nous montre la répartition des isolats selon le degré de sensibilité des antipaludiques ayant un seuil de résistance déterminé:

Tableau VI : Répartition des réponses des isolats de *P. falciparum* par médicament

Antipaludiques	Isolats sensibles	Isolats résistants
Quinine	35(97,22%)	1(2,78%)
Chloroquine	16(47,06%)	18(52,94%)
Monodéséthylamodiaquine	31(93,94%)	2(6,06%)

Nous avons observé une différence significative entre les taux de résistance à la quinine, à la Monodéséthylamodiaquine et à la chloroquine ($p < 0,001$). En effet le taux de résistance à la quinine est moins important que le taux de résistance à la Monodéséthylamodiaquine et à la chloroquine. Le taux de résistance à la monodéséthylamodiaquine est moins important que le taux de résistance à la chloroquine.

5.3.3. Résultats des échantillons du jour de récurrence

Au total 08 patients ont présentés des parasitémies récurrentes au cours du suivi : 05 (63,5%) ont été traités à l'inclusion à l'artémether luméfantine et 3 (37,5%) à l'artésunate + amodiaquine. Après mise en culture et lecture des échantillons du jour de parasitémie récurrente, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VII.

Tableau IIIII : Tableau comparatif des valeurs de CI50 des médicaments au jour d'inclusion et au jour de recrudescence

Numéro d'inclusion	médicament administré	Jour	IC50Lum	IC50Mda	IC50Dha
30	AS-AQ	J0	158.89	5.13	2.19
30		J42	28.07	18.46	0.84
64	AL	J0	11.29	67	1.21
64		J28	40.56	15.34	1.18
72	AS-AQ	J0	47.62	41.12	0.7
72		J35	22.03	22.56	0.5
104	AL	J0	24.18	25.19	1.1
104		J35	36.73	12.73	1.28
107	AL	J0	102.25	17.51	2.5
107		J21	75.92	9.36	0.89
124	AS-AQ	J0	18.3	21.86	0.58
124		J21	3.7	34.58	0.24
131	AL	J0	56.41	11.95	0.58
131		J28	73.63	14.94	0.89
134	AL	J0	60.7	9.62	0.81
134		J28	51.41	17.79	1.35

Pour les résultats des tests *in vitro* au jour de parasitémies récurrentes, nous avons tenu compte uniquement des résultats de la dihydroartémisinine (métabolite majeur des dérivés de l'artémisinine), de la luméfantrine et de la monodéséthyl amodiaquine (métabolite de l'amodiaquine) car ce sont ces composants ou des métabolites majeurs de ces composants que nous avons utilisés pour traiter les patients à l'inclusion.

Pour les patients traités à l'artésunate + amodiaquine, deux des trois patients ayant présentés un échec parasitologique avait une CI50 plus élevé au jour de

parasitémies récurrentes pour la monodéséthylamodiaquine alors que tous les trois présentaient une baisse de la valeur de CI50 pour la dihydroartémisinine.

Pour ce qui concerne les patients traité à l'artemether luméfantrine,

-02 patients présentaient une élévation de la valeur de CI50 des parasites au jour de parasitémies récurrentes pour la luméfantrine et la dihydroartémisinine.

-01 présentait une CI50 de la luméfantrine plus élevé le jour de parasitémies récurrentes et une baisse de la CI50 de la dihydroartémisinine.

-01 patient présentait une CI50 de la dihydroartémisinine plus élevé le jour de parasitémies récurrentes et une baisse de la CI50 de la luméfantrine.

-01 patient présentait une baisse des valeurs de CI50 du parasite à la dihydroartémisinine et de la luméfantrine.

VI- DISCUSSIONS

VI- DISCUSSIONS

6.1. DES RESULTATS DE SENSIBILITE AVANT ADMINISTRATION DU MEDICAMENT

Les résultats des tests *in vitro* ont révélé la présence de parasites résistants à la quinine, à la monodéséthylamodiaquine et à la chloroquine avec un taux de résistance plus élevé pour la chloroquine. Pour la dihydroartémisinine, la luméfantine et la pipéraquine dont le seuil de résistance n'était pas défini, leur taux de résistance, n'a pas été déterminé.

6.1.1. La résistance à la quinine

Notre étude nous a révélé que *Plasmodium falciparum* était très sensible *in vitro* à la quinine. En effet nous avons observé un faible taux de résistance à cette molécule. En 2006, dans une étude similaire, nous avons trouvé un taux de résistance de 11,9% dans la ville de Bobo Dioulasso (8). Un taux de résistance de 2,4 % avait été enregistré par Zabré en 1998 dans la même zone (48). Ces résultats nous montrent qu'en 2006 il y avait une augmentation de la résistance à la quinine comparée à 1998 et 2010. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'avant l'adoption de la politique d'utilisation des ACT dans le traitement du paludisme, les populations utilisaient systématiquement la quinine face à la résistance à la chloroquine. La baisse de la résistance de la quinine dans notre étude pourrait donc s'expliquer par le fait que depuis la mise en œuvre effective de la nouvelle politique, les populations utilisent en routine d'autres molécules tel que les ACT au lieu de la quinine comme par le passé, pour traiter le paludisme.

6.1.2. La résistance à la chloroquine

Nous avons observé un taux de résistance élevé à la chloroquine dans la ville de Bobo Dioulasso. Cependant, ce taux est plus bas que celui observé en 2006 lors d'une étude dans la même ville, qui révélait un taux de résistance de 70,5 % (8). Une autre étude menée en 1997 par Tinto et collaborateurs dans la ville de Bobo-Dioulasso donnait un taux de résistance *in vitro* à la chloroquine de 24,6% (40). Si l'on compare nos résultats à ceux de 2006, nous observons une baisse de la résistance à la chloroquine. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la baisse de

l'utilisation de la chloroquine, liée à la mise en œuvre effective de la nouvelle politique de traitement du paludisme avec les ACT adopté en 2005, aurait réduit la chloroquinorésistance. En effet, des études réalisées au Malawi et au Kenya ont démontré qu'il y avait une réversion de la chloroquino-résistance quelques années après son retrait du marché (32,31).

6.1.3. La résistance à la monodéséthylamodiaquine

Nous avons observé un taux de résistance de 6,06%. Ce résultat assez faible nous montre que ce médicament a toujours une bonne sensibilité *in vitro* dans la ville de Bobo Dioulasso. Tinto avait trouvé au Rwanda un taux de résistance de 7% (42). Le taux de résistance bas de la monodéséthyl amodiaquine nous amène à dire que cette molécule est un bon médicament partenaire à utiliser dans les ACT dans notre région. Cela justifie pleinement le bon choix du Burkina Faso pour la combinaison Amodiaquine + Artésunate dans son arsenal thérapeutique actuel pour le traitement du paludisme simple.

6.1.4. La sensibilité à la dihydroartémisinine

Nous avons observé une moyenne géométrique des valeurs des concentrations inhibitrices 50% (CI50) de 1,31 nM à la dihydroartémisinine dans la ville de Bobo Dioulasso. Notre résultat est comparable à celui d'une étude menée dans la même ville en 2006 et qui révélait une moyenne géométrique des valeurs des CI50 de 1,5 nM à la dihydroartémisinine (8).

Une étude menée au Rwanda rapportait une moyenne des valeurs de CI50 plus élevée que la notre avec une valeur de 2,6 nM (42). La différence entre ces résultats pourrait s'expliquer par le fait que le Rwanda est une zone de multirésistance. Au regard de tous ces résultats, nous pouvons donc dire que la dihydroartémisinine a une bonne sensibilité dans la ville de Bobo Dioulasso.

6.1.5. La sensibilité à la Luméfantrine

Au cours de notre étude, nous avons observé que la luméfantrine était active sur les souches de *Plasmodium falciparum*.

Une étude menée au Cameroun par Basco et ses collaborateurs révélait une moyenne géométrique des CI50 de 11,9 nM (5). En Thaïlande, une autre étude

révélaient une moyenne géométrique de CI50 de 11,7nM (4). La différence de ces valeurs avec les notre pourrait s'expliquer par la différence de répartition de la sensibilité du *Plasmodium* dans le temps et dans l'espace.

6.1.6. La sensibilité à la Pipéraquline

Les résultats obtenus au cours de notre étude nous révèlent que la pipéraquline est très active contre le *Plasmodium falciparum* dans notre région d'étude. En effet, au Cameroun, Basco avait trouvé une moyenne géométrique de CI50 d'une valeur de 38,9nM (7). Cette différence de résultats pourrait s'expliquer par la différence de zone géographique. Cette valeur de moyenne géométrique de CI50 basse que nous avons obtenu, nous permet de dire que la pipéraquline est un bon médicament partenaire à utiliser dans les ACT pour traiter le paludisme dans nos régions. La dihydroartémisine-Pipéraquline pourrait donc représenter une alternative intéressante pour notre pays.

6.2. DES RESULTATS DE SENSIBILITE AU JOUR DE RECRUESCENCE

Les résultats obtenus pour les deux patients traités à l'artésunate + amodiaquine et ayant présentés un échec parasitologique avec une CI50 plus élevée au jour de parasitémies récurrentes pourraient suggérer une baisse de la sensibilité de ces parasites à la monodéséthylamodiaquine. Cela pourrait signifier que ce sont les mêmes parasites qui sont toujours présent dans le sang du patient ce qui nous amène à dire qu'il pourrait s'agir de souches résistantes.

Face à la diversité de combinaisons des résultats des patients traités avec l'arthemether-luméfantrine et ayant présenté un échec parasitologique, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une réinfection de ces patients c'est-à-dire, la présence de nouveaux parasites dans leur sang. En effet des études ont montré que le taux de réinfection chez les patients traité à l'arthemether luméfantrine était quelque fois assez élevé (28).

Toutes ces hypothèses pourraient être confirmées par la PCR qui nous permettra de distinguer les recrudescences des nouvelles infections. Cependant à l'étape actuelle, nous ne disposons pas de ressources matérielles nécessaires à sa réalisation.

***CONCLUSION ET
RECOMMANDATION***

CONCLUSION

A l'issu de cette étude, nous pouvons conclure que cinq (05) ans après l'adoption de la politique d'utilisation des ACT dans le traitement du paludisme simple au Burkina Faso, il ya une baisse du taux de résistance *in vitro* à la quinine et à la chloroquine. Pour ce qui concerne la dihydroartémisinine, principal métabolite des dérivés de l'artémisinine, il n'y a pas une grande variation de la moyenne géométrique des valeurs de CI50 en comparaisons avec les résultats des années antérieures. Et enfin, nous avons une bonne activité antiplasmodique pour ce qui concerne la monodéséthyl amodiaquine, la luméfantrine et la pipéraquine.

RECOMMANDATION

Nous encourageons les prescripteurs burkinabè à continuer la prescription des combinaisons thérapeutique à base d'artémisinine pour le traitement du paludisme simple.

VII. REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Agnamey P, Moyou SR, Brasseur P, Galega PF, 2002. Un foyer de paludisme multi-résistant en zone forestière au Cameroun revisité 14 ans après. *Med Trop.* 62: 141-144.
2. Alene GD, Bennett S, 1996. Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* malaria in Ethiopia and Eritrea. *Tropical Medicine and International Health*, 1, 810-815.
3. Barennes H, Nagot N, Valéa I, Koussoubé-Balima T, Ouédraogo A, Sanou T, Yé S, 2004. A randomized trial of amodiaquine and artesunate alone and in combination for the treatment uncomplicated *falciparum* malaria in children from Burkina Faso. *Tropical Medicine and International Health*, 9, 4, 438-444.
4. Barends M, Jaidee A, Khaohirun N, Singhasivanon P, Nosten F, 2007. *In vitro* activity of ferroquine (SSR 97193) against *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Burmese border. *Malaria Journal*, 1-5.
5. Basco LK, Bickii J, Ringwald P, 1998. *In Vitro* Activity of Lumefantrine (Benflumetol) against Clinical Isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde', Cameroon. *American Society for Microbiology*, 2347-2351.
6. Basco LK, Ringwald P, 2002. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon X. Evaluation of *Pfmdr1* mutations as genetic markers for résistance to amino alcohols and artemisinin derivatives. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66, 6, 667-671.
7. Basco LK, Ringwald P, 2003. *In vitro* activities of piperazine and other 4-aminoquinolines against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1391-1394.
8. Bonkian LN, 2008. Etude *in vitro* et analyse moléculaire de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques dans la ville de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Thèse d'Etat en Pharmacie. Ouagadougou, FSS, 109.
9. Bray PG, Janneh O, Raynes KJ, Mungthin M, Ginsburg H, Ward SA, 1999. Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferritin and is independent of NHE activity in *P. falciparum*, *Journal of Cell Biology*, 145, 363-376.

10. Charmot G, Coulaud JP, 1988. Actualités sur l'extension de la chimiorésistance de *P. falciparum*, *Médecine et Maladies Infectieuses*, 11, 655-662.
11. Chou AC, Chevli R, Fitch CD, 1980. Ferriprotoporphyrin IX fulfils the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Biochemistry*, 19, 1543-1549.
12. Desjardin RE, Canfield CJ, Haynes JP, Chnulay JD, 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16, 710-847.
13. Durand R, Gabbett E, Di Piazza JP, Delabre JF, Le Bras J, 1999. Analysis of kappa and omega repeat of the cg2 gene and chloroquine susceptibility in isolates of *P. falciparum* from sub-saharian African, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 101, 185-97.
14. Fidock D, Nomura T, Fidck D, Nomura T, 2000. Mutation in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance, *Molecular Cell*, 6, 861-871.
15. Fitch CD, 1984. *Mode of action of antimalarial drugs In: Malaria and the red cell. Ciba foundation. Symposium 94, London, Pitman Ed., 222-232*
16. Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AM, Forsyth K, Kemp DJ, Cowman AF, 1990. Several alleles of the multidrug-resistant gene are closely linked to chloroquine resistance in *P. falciparum*, *Nature*, 345, 255-258.
17. Gentilini M, Duflo B, 1986. *Maladies parasitaires: Paludisme, Médecine Tropicale*. Flammarion-méd. Sciences 4^{ème} éd., p850.
18. Grobusch MP, Adagu IS, Kremsner PG, Warhurst DC, 1998. *P. falciparum*: *in vitro* susceptibility and allele-specific PCR detection of Pfmdr-1 Asn86Tyr polymorphism in Lambarene, Gabon, *Parasitology*; 116: 211-7
19. Hasting IM, Watkins WM, White NJ, 2002. The evolution of drug resistance malaria: the role of drug elimination half-life. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 357, 505-519.
20. Hoffman SL, 1998. *Deux chromosomes du parasite ont été séquencés*. Thèse, Stockholm, 71p.
21. Krogstad DJ, Schlesinger PH, 1987. The basis of antimalarial action: Non-weak base effect of chloroquine on acid vesicle pH. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36, 2, 213-220.

22. Kwakye- Berko F, Meshnick SR, 1989. Binding of chloroquine to DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 35, 51-56.
23. Laudénbach V, Mantz J, Desmonts JM, 1999. Comprendre la biologie moléculaire. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 18, 725-747.
24. Le Bras J, Basko KL, 1991. *Chimiorésistance des plasmodiums*. In paludisme Universités francophones "UREF".
25. Le Bras J, Deleron P, 1993. *In vitro* study of drug sensitivity of *P. falciparum* : Evaluation of a new semi-microtest, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32, 447-53.
26. Le Bras J, Durand R, 2003. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *P. falciparum*. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 17, 147-53.
27. Malvy D, Djossou F, Thiebaut R, Le Bras M, 2000. *Plasmodies-Malaria. Formes cliniques et diagnostic dans Encyclopédie médicochirurgicale*. Paris, Elsevier, 8-507-A-20.
28. Mårtensson A, Strömberg J, Sisowath C, Msellem MI, Gil JP, Montgomery SM, Olliaro P, Ali AS, Björkman A, 2005. 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*. 41(8):1087-8.
29. Moreno A, Brasseur P, Cuzin-Ouattara N, Blanc C, Druilhe P, 2001. Evaluation underfield conditions of the colourimetric DELI-microtest for the assessment of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95, 1, 100-103.
30. Moreno A, Cuzin-Ouattara N, Nebie I, Sanon S, Brasseur P, Druilhe P, 2001. Use of the DELI-microtest to determine the drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 95, 309-312.
31. Mwai L, Ochong E, Abdirahman A, Kiara SM, Ward S, Kokwaro G, Sasi P, Marsh K, Borrmann S, Mackinnon M, Nzila A, 2009. Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. *Malaria Journal*, 8:106.
32. Nkhoma S, Molyneux M, Ward S, 2007. *In vitro* antimalarial susceptibility profile and Pfcrt/PfMDR genotypes of *Plasmodium falciparum*. Field isolate from Malawi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(6), pp. 1107-1112.

33. OMS, 1973. Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. Série de Rapports techniques. n° 529, Genève : Organisation mondiale de la santé, p128.
34. OMS, 2003. Loin de s'avouer vaincu, le paludisme tue chaque jour plus de 3000 enfants en Afrique. Centre des medias, 1.
35. OMS, 2005. *Paludisme*. Rapport de secrétariat. Genève, 7.
36. Payne D, 1988. Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*, 4, 112-115.
37. Ringwald P, Meche FS, Bickii J, Basco LK, 1999b. *In vitro* culture and drug sensitivity assay of *Plasmodium falciparum* with non serum substitute and acute-phase sera. *J. Clin. Microbiol.* 37,700–705.
38. Su X, Kirkman LA, Fujioka H, Wellems TE, 1997. Complex polymorphisms in an approximately 330kDa protein are linked to chloroquine resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa, *Cell*, 91, 593-603.
39. Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U, 2004. History, dynamics and public health importance of malaria parasite resistance. *Clinical Microbiology Review.* 17:235-254.
40. Tinto H, Ouedraogo JB, Traoré B, Coulibaly SO, Guiguemde TR, 2000. Étude de la sensibilité *in vitro* de 232 isolats de *Plasmodium falciparum* aux antipaludéens au Burkina Faso (Afrique de l'Ouest). *Parasitologie*, 188-191.
41. Tinto H, Zoungrana EB, Coulibaly SO, Ouédraogo JB, Traoré M et al, 2002. Chloroquine and sulphadoxine efficacy for uncomplicated malaria treatment and haematological recovery in children in Bobo Dioulasso, Burkina Faso, during a 3-year period 1998-2000. *Trop Med Int Health.* 7: 925-930.
42. Tinto H, Rwagacondo C, Karema C, Mupfasoni D, Vandoren W, Rusanganwa E, Erhart A, Van Overmeir C, Van Marck E, D'Alessandro U, 2006. *In-vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to monodesethylamodiaquin, dihydroartemisinin and quinine in an area of high chloroquine resistance in Rwanda, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 509-514.
43. Watkins WM, Mosobo M, 1993. Treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with sulfadoxine-pyrimethamine: Selection in pressure in the function of the

long elimination half life. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75-78.

44. White NJ, 1999. Antimalarial drug resistance and combination therapy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 354, 739-749.
45. WHO, 2003. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria. <http://www.who.int/malaria/docs/ProtocolWHO.pdf>.
46. Willcox M, Bodeker G, Rasanavo P. 2004. *Traditional medicinal plants and malaria*. CRC Press. 552 p.
47. Wunsch S, Sanchez CP, Gekle M, Grosse-Wortmann L, Wiesner J, Lanzer M, 1998. Differential stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum*. *J Cell Biol.*, 140, 335-45.
48. Zabré SE, 1998. *Etude couplée in vivo/in vitro de la sensibilité de Plasmodium falciparum à l'Amodiaquine versus Chloroquine en milieu péri-urbain de Bobo-Dioulasso*. Thèse d'Etat en Médecine. Ouagadougou, FSS, 125.

ANNEXE

Annexe

FICHE DE TRAVAIL POUR ETUDE *IN VITRO*

Date :.....

Numéro d'enregistrement :.....

Site d'étude:.....

Nom :.....

Prénoms :.....

Age :..... Sexe : M / _ / F / _ /

Poids :.....

Stade clinique :.....

Lieu d'habitation :.....

Prophylaxie antipaludique :.....

Traitement avant prélèvement :.....

Densité parasitaire : / μ l

Espèce plasmodiale :.....

Prélevé sur EDTA le : Heure :.....

Parasitémie après lavage par RPMI :..... / μ l

Confetti fait le :.....

Médicaments étudiés :

Dihydroartémisinine

Chloroquine

Quinine

Luméfantrine

Monodéséthylamodiaquine

Pipéraquine

Contrôle microscopique le :.....

Plaque congelée le :.....

Plaque collectée le :.....

Lecture au compteur bêta le :.....

Abstract

In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs five years after the change of uncomplicated malaria treatment policy in Burkina Faso

Resistance to commonly used antimalarial drugs represents the major drawback and obstacle for controlling malaria in endemic countries. Burkina Faso has changed in 2005 its antimalarial drug policy for the treatment of uncomplicated malaria from CQ to AL and AQ+AS. This study was carried out in Bobo Dioulasso in order to compare the *in vitro* susceptibility of different ACTs' components used in Burkina Faso and some antimalarial drugs after the implementation of the new policy.

The study was conducted from July 2009 to February 2010. Blood samples were collected from 40 patients with a parasitemia comprised between 4000 and 200000 trophozoites / μ l. Patients were treated either with artemether-lumefantrine or artesunate + amodiaquine. The culture was performed in presence of antimalarial drugs and incubated in 5% CO₂ for 48 hours.

Rates of *In vitro* resistance were 2.78% for quinine, 6.06% for monodéséthyl amodiaquine and 52.94% for chloroquine. The IC₅₀s geometric mean of luméfántrine, dihydroartémisinine and pipéraqúine were 30.61 nM, 1.31 nM and 8.58 nM respectively.

From the results obtained, we conclude that five (05) years after the implementation of the new policy of uncomplicated malaria treatment in Burkina Faso, there is a decrease of *in vitro* resistance rate to quinine and chloroquine. Regarding dihydroartémisinine, there is no great change in the IC₅₀s geometric mean values. And finally, we have a good activity for monodéséthyl amodiaquine, lumefantrine and piperazine.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, *in vitro*, Burkina Faso.