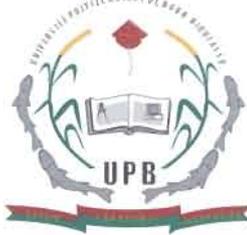


BURKINA FASO

Unité-Progress-Justice

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO (UPB)



INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES
DE LA SANTE (IN.S.SA)



Année universitaire 2012-2013

Mémoire N° 006....

**Evaluation de la sensibilité *in vitro* d'isolats de
Plasmodium falciparum à 5 antipaludiques
(DHA, LUM, MDAQ, MQ, PIP) à Nanoro
(Burkina Faso)**

Mémoire

Présenté et soutenu publiquement le ...06...Mai...2013..... pour l'obtention du diplôme de

Master de Parasitologie médicale

par

YARGA Sibiri

JURY

Président : Pr **GUIGUEMDE T. Robert**, Professeur titulaire, INSSA / UPB.

Membres : • Pr **TINTO Halidou**, Maître de recherche, IRSS / CNRST, Directeur du mémoire.

• Dr **BAMBA Sanata**, Maître assistant, INSSA / UPB.

DEDICACES

Je dédie ce travail

A mon père, feu Hahandou YARGA

Nous resterons fidèle aux valeurs de dignité, de probité, de mépris pour l'injustice et la vanité qui ont toujours été les tiennes et que tu nous as inculquées.

Que le tout-puissant t'accueille avec ceux qu'il a comblés de ses bienfaits parmi les prophètes, les martyrs et les véridiques.

A ma mère, Feue Datogsbamba DABILGOU

Tu nous as quitté prématurément mais nous avons gardé le souvenir de ton affection et de ta tendresse. Tous ceux qui t'ont connue témoignent de ta vertu et de ta générosité.

Puisse Le Tout-puissant t'admettre parmi ses élus.

A mes frères et sœurs: Boulougou, Baba, Diataga, Larba, Mariam, Fati, Pohouri (in memorium).

Puisse Allah vous faire reposer en paix dans ses vallées paisibles !

A mes frères et sœurs : Modeste, Justine, Estelle, Gisèle, Timbendi, Yolande.

Merci pour votre soutien inconditionnel à l'aboutissement de ce travail qui est aussi le vôtre. Restons unis et marchons sur les traces de l'honneur et de la probité en toute chose. Amour fraternel !

A mes amis: Pascal Zongo, Alexis Zongo, Amado Bikienga, Abdoulaye Semdé, Clément Zongo, Fidèle Yaméogo, Tapsoba. Merci pour tout !

*J'adresse une pensée reconnaissante à ma petite famille: à mon épouse **Evelyne**, à ma fille **Cynthia** et à mon petit garçon **Handy** pour m'avoir encouragé tout au long de ce projet et en particulier pour leur réconfort au cours de ces derniers mois.*

Remerciements

MES REMERCIEMENTS

Aux docteurs : Innocent Valéa, Herman Sorgho, William Kaboré.

Merci pour votre soutien et vos encouragements. Recevez à travers ce travail toute ma reconnaissance. Puisse Dieu vous le rendre au centuple !

Au Dr Marc Christian TAHITA

Pour avoir encadré ce travail avec autant de confiance, de respect et d'humanité,
Pour m'avoir supporté durant tout ce temps,
Pour votre précieuse contribution à ce travail,
Pour votre rigueur scientifique, votre pertinence et votre disponibilité,
Pour votre gentillesse, votre bonne humeur et votre attention.
Travailler avec vous a été un réel plaisir.
Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance.
Ce travail est aussi le vôtre.

Au Dr Maminata Traoré.

Merci pour vos conseils et votre disponibilité lors de la réalisation de ce travail, Soyez rassurée de notre profonde gratitude !

A toute l'équipe de l'étude PREGACT: Aux docteurs Isidore W Yerbanga, Daniel Zemba, Toussaint Rouamba, Seydou Diallo Nakanabo, Serges Henri Zango. A Dissa Moussa, Benjamin Kaboré, Cécile Rouamba, Madiata Coulibaly, Brama Ouattara, Karim Ouattara, Drissa Traoré.

A toute l'équipe de l'Unité de Recherche Clinique de Nanoro (URCN) particulièrement à l'équipe du laboratoire: Nana Ashmed Cheickh Bachirou, Garba Zakaria, Traoré Mah

Alima Esther, Hien Patrice, Traoré Ben Djibril K, Yonli L Rodrigue, Dabo Rasmata, Nikiema Mariam, Kaboré R Ibrahim, Diallo Salou, Sagnon S Yahacoub, Mien Fousséni. A Magloire Natama et Palpouguini Lompo.

A Adama Kazienga

Merci pour vos différentes contributions.

Au Directeur Général du Centre Muraz de Bobo-Dioulasso.

Au Directeur régional de l'IRSS/DRO.

A tout le personnel du Centre Muraz de Bobo-Dioulasso.

A tout le personnel de l'Unité de Recherche sur le Paludisme et les Maladies Tropicales Négligées (UR/PMTN) du Centre Muraz: Dr Léa N Bonkian, Dr Hervé Kpoda, Zampa H Odile, Traoré N Brigitte, Ouédraogo Ida, Sanou Roger, Semdé Barthélémy, Rouamba Icé, Bandaogo Ousséni, Guiguemdé Seydou, Niampa R Millogo, André Ouédraogo .

A tous le personnel de l'INSSA/UPB.

A tous nos encadreurs du master de parasitologie de l'INSSA/UPB:

Aux Professeurs: Jacques Simporé, Michel Develoux, Yves Traoré,...

Aux Docteurs : Roch Dabiré, Abdoulaye Diabaté, Hama Diallo, Léon Sawagogo, Issiaka Sombié, Maxime K. Drabo, Serges Sawodogo, Djakaridja Cissé, Ibrahim Sangaré, Adama Zida, Ali Ouary.

A tous mes collègues du master de parasitologie de l'INSSA/UPB

A tout le personnel du CMA de Nanoro

A toutes les femmes enceintes ayant participé à l'étude et leurs parents.

A toutes celles et tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce travail et qui n'ont pas pu être cités nommément.

A NOS MAITRES ET JUGES

Au Docteur Sanata BAMB, membre du jury.

- ✓ *Pharmacienne-biologiste,*
- ✓ *Chef de service de la parasitologie-mycologie médicale du CHUSS;*
- ✓ *Maître assistant à l'INSSA/UPB.*

Pour la qualité de l'enseignement, le soutien très précieux et la motivation dont nous avons bénéficiés durant cette formation. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Au Professeur Halidou TINTO

- ✓ *Pharmacien-biologiste,*
- ✓ *Maître de recherche à l'Institut de Recherche en Science de la Santé/Centre National de Recherche Scientifique et Technologique IRSS/CNRST,*
- ✓ *Maître de Conférences associé en parasitologie à l'INSSA/UPB,*
- ✓ *Chef de la thématique chimiorésistances et thérapeutiques alternatives à l'Unité de recherche sur le paludisme et les maladies tropicales négligées du Centre Muraz,*
- ✓ *Directeur scientifique du Centre Muraz,*
- ✓ *Responsable de l'Unité de Recherche Clinique de Nanoro (URCN),*
- ✓ *Moniteur d'étude clinique de l'OMS,*
- ✓ *Expert de la Coopération Technique Belge.*

C'est un honneur et un privilège immense que vous nous avez fait en nous confiant ce travail et en acceptant de nous guider malgré vos multiples occupations et sollicitations. Vous avez toujours su, par vos qualités humaines, pédagogiques et scientifiques, initier et communiquer la flamme et l'amour de la recherche à vos étudiants et à tous ceux qui vous approchent.

Honorable maître, par votre dynamisme, votre rigueur et votre amour pour le travail bien fait, vous êtes un modèle dans le monde de la recherche scientifique.

En ce jour solennel, vous nous donnez l'occasion de vous dire, tout simplement mais très sincèrement, merci.

Puisse Dieu vous vêtir de sa grâce abondante!

Au Professeur Tinga Robert GUIGUEMDE, Président du jury

- ✓ *Médecin parasitologiste,*
- ✓ *Professeur titulaire de la chaire de parasitologie-mycologie à l'Unité de Formation et de Recherche en Science De la Santé de l'Université de Ouagadougou (UFR/SDS/UO) et à l'Institut Supérieur des Sciences de la Santé de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso (INSSA/UPB),*
- ✓ *Directeur de l'INSSA/UPB,*
- ✓ *Chef de l'Unité de Recherche Paludisme et Maladies Tropicales Négligées (UR_PMTN) du Centre Muraz de Bobo-Dioulasso,*
- ✓ *Coordonnateur du Réseau II d'Afrique de l'Ouest pour le Traitement Antipaludique (RAOTAP II),*
- ✓ *Expert de l'OMS,*
- ✓ *Docteur Honoris Causa de l'Université de Bordeaux II,*
- ✓ *Membre de l'Académie Africaine des Sciences,*
- ✓ *Membre du Comité Exécutif de l'Inter Academy Medical Panel (IAMP),*

- ✓ *Président de la conférence Africaine des Doyens et des Facultés de médecine d'Expression Française (CADMEF),*
- ✓ *Général de division des Forces Armées Nationales Burkinabè.*

C'est un privilège et une fierté pour nous de compter parmi les étudiants ayant bénéficié de votre encadrement et de vos enseignements en parasitologie. Vous alliez avec perfection de grandes qualités humaines et pédagogiques à une rigueur scientifique qui forcent l'admiration des étudiants qui ont bénéficié de vos enseignements et de tous ceux qui vous approchent.

Honorable maître, permettez nous en ce jour solennel, de saluer votre immense savoir et votre remarquable expérience qui ennoblissent la profession médicale et imposent le respect.

Malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de juger ce travail.

Puisse Dieu vous combler de grâce et de bénédictions.

TABLE DES MATIÈRES

A. REVUE DE LA LITTÉRATURE

RESUME.....	14
I- INTRODUCTION ET ENONCE DU PROBLEME.....	17
II- GENERALITES SUR LE PALUDISME	20
II-1- LE PARASITE	20
II-2- LE CYCLE ÉVOLUTIF	23
II-3- LE VECTEUR.....	24
II-4- LA PHYSIOPATHOLOGIE DU PALUDISME	25
II.4.1. <i>L'incubation</i>	25
II.4.2. <i>L'accès de primo-invasion</i>	25
II.4.3. <i>Les accès palustres intermittents</i>	25
II-5- LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME.....	25
II.5.1. <i>Le diagnostic clinique</i>	26
II.5.2. <i>Le diagnostic indirect (diagnostic d'orientation)</i>	26
II.5.3. <i>Le diagnostic direct</i>	26
II.5.4. <i>Le diagnostic immunologique</i>	27
II.6. LA LUTTE CONTRE LE PALUDISME	27
II.6.1. <i>La prise en charge des cas (PEC)</i>	27
II.6.2. <i>La chimioprophylaxie</i>	29
II.6.3. <i>La lutte anti-vectorielle</i>	29
III. LES ANTIPALUDIQUES	32
III.1. <i>La classification des antipaludiques</i>	32
III.2. <i>Les molécules testées</i>	34
IV- LA CHIMIORÉSISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES	37
IV.1. <i>Définition de la chimiorésistance</i>	37
IV.2. <i>Les facteurs influençant la résistance</i>	37
IV.3. <i>Les mécanismes de résistance</i>	37
V. L'EVALUATION DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE ET DE LA RESISTANCE	39
V.1. <i>Les tests in vivo</i>	39
V.2. <i>Les marqueurs génomiques de résistance</i>	39
V.3. <i>Les tests in vitro(ex vivo)</i>	40

B. NOTRE ETUDE.....

I. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	45
I.1. <i>Objectif général</i>	45
I.2. <i>Objectifs spécifiques</i>	45
II. METHODOLOGIE.....	46
II.1. CADRE DE L'ÉTUDE	46
II.1.1. <i>Le Burkina Faso</i>	46
II.1.2. <i>Sites d'étude</i>	48
II.2. TYPE D'ÉTUDE.....	49
II.3. POPULATION ET MÉTHODES D'ÉTUDE	49
II.3.1. <i>Echantillonnage et taille d'échantillon</i>	49
II.3.2. <i>Population d'étude</i>	49
II.4. CONSIDÉRATIONS ÉTHIQUES	50
II.5. LA SÉLECTION DES PATIENTES.....	50

II.5.1. <i>La présélection</i>	50
II.5.2. <i>La sélection</i>	51
II.6. LES TESTS <i>IN VITRO</i> (<i>EX VIVO</i>).....	53
II.6.1. <i>La prise de sang veineux</i>	53
II.6.2. <i>La mise en culture des parasites</i>	54
II.7. LES TESTS ELISA	59
III. GESTION ET ANALYSE DES DONNEES	61
IV. RESULTATS	62
IV.1. <i>Les caractéristiques de l'échantillon</i>	62
IV.2. <i>La sensibilité aux antipaludiques in vitro (ex vivo)</i>	63
V. DISCUSSION	67
V.1. <i>De la méthodologie</i>	67
V.2. <i>De la technique utilisée</i>	67
V.3. <i>Des résultats obtenus</i>	68
VI. CONCLUSION	73
VII. RECOMMANDATIONS	74
VIII. REFFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	75
IX. ANNEXES	81
ANNEXE 1. FICHE DE TRAVAIL POUR CULTURE <i>IN VITRO</i>	81
ANNEXE 2. DRUG DILUTIONS HRPII ASSAY	82
ANNEXE 3. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE ELISA	84
ANNEXE 4. ETAPES DE REALISATION DE LA METHODE <i>IN VITRO</i> ELISA HRPII.....	85

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU-I- Classification des antipaludiques.....	33
TABLEAU-II- Dilution des solutions mères d'antipaludiques.....	56
TABLEAU-III- Plaques de culture à 96 puits cotées.....	58
TABLEAU-IV- Proportion (%) des tests interprétables à J0 et aux jours de recrudescence....	63
TABLEAU-V- Sensibilité <i>in vitro</i> des antipaludiques.....	64
TABLEAU-VI- Niveau de sensibilité des isolats de <i>P. falciparum</i> pour chaque antipaludique.....	64
TABLEAU-VII- Corrélation entre les différents antipaludiques pris 2 à 2.....	65

LISTE DES FIGURES

FIGURE-1: Hématie parasitée par un trophozoïte jeune de <i>Plasmodium sp.</i>	20
FIGURE-2: Organisation tridimensionnelle du mérozoïte de <i>Plasmodium falciparum</i>	21
FIGURE-3: Cycle évolutif de <i>Plasmodium falciparum</i>	23
FIGURE-4: Anopheles femelle prenant un repas sanguin.....	24
FIGURE-5: Répartition géographique de la résistance de <i>P. f</i> aux antipaludiques en 2004.....	38
FIGURE-6: Dosage d'un antigène par la méthode ELISA double sandwich	43
FIGURE-7: Situation géographique, zones climatiques et faciès du paludisme du BF.....	47
FIGURE-8: Profil de l'étude <i>in vitro</i> (<i>ex vivo</i>).....	62

LISTE DES ABREVIATIONS

AdHu35:	Adénovirus Humain sérotype 35
AMA1:	Apical Membrane Antigen-1
AQ:	Amodiaquine
ART:	Artémisinine
AS:	Artésunate
AS01/AS02:	Adjuvant System 01 / 02
ATM:	Artéméther
BF:	Burkina Faso
BSA:	"Bovin Serum Albumin" albumine de serum bovine
CI50:	Concentration Inhibitrice 50%
CM:	Centre Médical
CMA:	Centre Médical avec Antenne chirurgicale
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
CSP:	Circum Sporozoïte Protein
CSPS:	Centre de Santé et de Promotion Sociale
CQ:	Chloroquine
CTA:	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
DRS:	Direction Régionale de la Santé
DS:	District Sanitaire
DHFR:	Dihydrofolate - réductase
DHPS:	Dihydroptéroate - synthétase
EDTA:	Ethylène Diamine Tétra-Acétyle (anticoagulant)
ELISA:	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FMP1:	Falciparum Malaria Protein-1
FP9:	Fowlpox 9 (virus)
H:	Heure
HBsAg:	Hepatitis B surface Antigen

HEPES:	Acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique)
HRPII:	"Histidin Rich Protein II", protéine II riche en histidine
IRSS/DRO:	Institut de Recherche en Science de la Santé/ Direction Régionale de l'Ouest
LUM:	Luméfantrine
LSA-1:	Liver stage antigen-1
M:	Molaire
ME-TRAP:	Multi-epitope Thrombospondin-related Adhesive Protein
MQ:	Méfloquine
MSP1:	Merozoite Surface Protein-1
MVA:	Modified vaccina Virus Ankara
ml:	mililitre
µmole:	micromole
µL:	Microlitre
mn:	minute
N ₂ :	Azote
nM:	nanomole
O ₂ :	Oxygène
OMD:	Objectifs du Millénaire pour le Développement
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
PBS:	tampon phosphate salin "Phosphate Buffered Saline",
PCR:	réaction de polymérisation en chaîne "Polymerase Chain Reaction",
PSM:	Poste de sécurité microbiologique
<i>P. falciparum</i> :	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i> :	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i> :	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i> :	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>Pf</i> CP2.9:	<i>Plasmodium falciparum</i> Circum Sporozoite protein-2.9
<i>Pf</i> ert:	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter

<i>Pfmdr1</i> :	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1
<i>Pfs25</i> :	<i>Plasmodium falciparum</i> sexual stage surface antigen-25
<i>Pvs25</i> :	<i>Plasmodium vivax</i> sexual stage surface antigen-25
P/v:	Poids/volume
PNLP:	Programme National de Lutte contre le Paludisme
PQ:	Primaquine
Q:	Quinine
RGPH:	Recensement Général de la Population et de l'Habitat
RPMI:	milieu: "Rosewell Park Memorial Institute"
RPS:	Milieu complet de culture (RPMI de lavage + albumax ou sérum humain AB à 10%)
RTS,S:	Vaccin: fusion protéique [R epeat T cell epitopes H BsAg] co-exprimée + H BsAg
SNIS:	Système National d'Information Sanitaire
SP:	Sulfadoxine-Pyriméthamine
STATA:	Logiciel: Data analysis and statistical software
TPI:	Traitement Préventif Intermittent
WHO:	World Health Organisation

RESUME

La résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques constitue un obstacle majeur au contrôle du paludisme. En effet, apparue dans les années 60, cette résistance s'est propagée dans le temps et dans l'espace touchant la quasi-totalité des anciennes molécules. Récemment des baisses de sensibilité ont été constatées avec les nouvelles molécules que sont les dérivés à base d'artémisinine sur les quels repose l'espoir dans la lutte contre ce fléau. Ainsi il s'avère nécessaire que des mécanismes de surveillance de cette chimiorésistance soient continuellement entrepris. C'est dans ce cadre que nous avons entrepris de mesurer l'activité *in vitro* de cinq antipaludiques (dihydroartémisinine, pipéraquline, méfloquine, luméfantine et monodéséthylamodiaquine) sur des souches de *P. falciparum* par la méthode colorimétrique *HRPII ELISA*. L'étude a été menée d'Août 2011 à Juillet 2012 dans la zone de surveillance démographique de Nanoro (Burkina Faso).

La sensibilité a été appréciée en mesurant la quantité de la protéine II riche en histidine de *P. falciparum* produite au bout de 72 heures d'incubation à 37°C, 5% CO₂, 5% O₂ et 90% d'azote (N₂) dans une atmosphère humide en présence de concentrations croissantes d'antipaludiques. Tous les isolats testés ont présenté une bonne sensibilité à la dihydroartémisinine, à la pipéraquline et à la luméfantine avec une moyenne géométrique des *CI*₅₀ respectivement de 1,36 nM; 5,23 nM et 1,72 nM. Les profils de résistances observés étaient de 6,9% (10/146 isolats testés) et 9,1% (13/143 isolats testés) respectivement pour la monodéséthylamodiaquine et la méfloquine. Nous avons pu observer des corrélations statistiquement significatives entre les *CI*₅₀ des couples monodéséthylamodiaquine-méfloquine, monodéséthylamodiaquine-luméfantine et dihydroartémisinine-luméfantine. Les résultats de l'étude indiquent l'existence dans cette zone de souches de *P. falciparum* résistantes aux anciennes molécules (monodéséthylamodiaquine et méfloquine) mais présentant une bonne sensibilité à la dihydroartémisinine, métabolite actif des dérivés de l'artémisinine.

Mots-clés: Sensibilité *in vitro* - Plasmodium falciparum - dihydroartémisinine - pipéraquline, méfloquine - luméfantine - monodéséthylamodiaquine - Nanoro-Burkina Faso.

Abstract

Resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs is a major obstacle for malaria control. Indeed, appeared in 60s, this resistance has spread in time and space affecting almost all old molecules. Recent declines in sensitivity were observed with the new molecules and particularly the artemisinin derivatives on which is based the hope for a control of malaria. Thus it is necessary that mechanisms for monitoring this chemoresistance are continuously undertaken. In this context we assessed the *in vitro* activity of five antimalarial drugs (dihydroartemisinin, piperaquine, mefloquine, lumefantrine and monodesethylamodiaquine) on *P. falciparum* strains using the *HRPII ELISA* colorimetric method. The study was carried out from August 2011 to July 2012 in the demographic surveillance area of Nanoro (Burkina Faso).

Sensitivity was assessed by measuring the concentration of *P. falciparum* histidine-rich protein II produced after 72 hours of incubation at 37 ° C, 5% CO₂, 5% O₂ and 90% nitrogen (N₂) in a humidified atmosphere in the presence of increasing concentrations of antimalarials. All isolates tested showed good sensitivity to dihydroartemisinin, piperaquine in and lumefantrine with a geometric mean of IC₅₀ 1.36 nM, 5.23 nM and 1.72 nM respectively. Resistance rates were 6.85% (10/146 isolates tested) and 9.09% (13/143 isolates tested) for monodesethylamodiaquine and mefloquine respectively. We have observed statistically significant correlations between the IC₅₀ couples of monodesethylamodiaquine-mefloquine, monodesethylamodiaquine-lumefantrine and dihydroartemisinin- lumefantrine. The results of the study show the existence of *P. falciparum* resistant strains to monodesethylamodiaquine and mefloquine in this area but a good sensitivity to dihydroartemisinin, the active metabolite of artemisinin derivatives.

Keywords: In vitro sensitivity - Plasmodium falciparum - dihydroartemisinin - piperaquine, mefloquine - lumefantrine - monodesethylamodiaquine - Nanoro-Burkina Faso.

PREMIERE PARTIE:

REVUE DE LA LITTERATURE

A. REVUE DE LA LITTERATURE

I- INTRODUCTION ET ENONCE DU PROBLEME

Le paludisme ou malaria est dû à l'infection (présence et développement dans le foie puis dans les hématies) d'un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis par la piqûre d'un moustique femelle appartenant au genre *Anopheles*. La très grande majorité de la mortalité associée au paludisme survient en Afrique Sub-saharienne et est causée par *P. falciparum* dont le vecteur majeur est *Anopheles gambiae* (1,2).

Les femmes enceintes et les enfants de moins de cinq ans constituent la population la plus vulnérable. En effet seul ou associé à d'autres maladies, le paludisme tue un enfant toutes les 30 secondes dans le monde (OMS). En Afrique au Sud du Sahara, chaque enfant fait au moins un accès palustre par saison de transmission (OMS, 2005). Chez les femmes enceintes, le paludisme représente la principale cause des anémies maternelles et de faibles poids de naissance chez les nouveaux nés (3).

Malgré les nombreux efforts consacrés à la lutte contre le paludisme, cette maladie demeure toujours un problème majeur de santé publique. Selon l'OMS, en 2010, la moitié environ de la population mondiale était exposée au risque de contracter le paludisme (4,5) avec 219 millions de cas et 660.000 décès, dont 86 % concernant les enfants de moins de 5 ans (4,5). Globalement, près de 90% des cas surviennent en Afrique au sud du Sahara (6). A cela, s'ajoute le fardeau de la maladie sur la situation socio-économique des pays les plus pauvres des zones d'endémie (réduction estimée à 1,3% par an du développement socio-économique) qui annihile les efforts de lutte (7).

Au Burkina Faso (BF), le paludisme est une endémie stable dans tout le pays, avec une recrudescence saisonnière de Mai à Octobre (8). Il demeure un problème de santé publique majeur; et ce malgré la promotion des mesures préventives et curatives. On dénombre environ 700.000 à 5.000.000 de cas d'accès palustres chaque année (8). Selon les données statistiques du système national d'information sanitaire (SNIS), le paludisme est la première cause de consultation, d'hospitalisation et de décès dans les formations sanitaires (8). En 2011 par exemple, les structures de santé ont enregistré 5.467.275 cas de paludisme dont 388.621 cas de paludisme grave. Ce qui représente en moyenne, par rapport aux autres pathologies 44,27% des motifs de consultation et 61,75% des motifs d'hospitalisation avec un taux de létalité de 17% chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes (9).

Face à la menace que représente cette pathologie, des stratégies de lutte ont été entreprises au plan international et national telles que: le Programme mondial d'éradication du paludisme 1957-1972, les initiatives "Roll Back Malaria" 1998 "Multilateral Initiative on Malaria"(6) et "Medicines for Malaria Venture" (OMS, 1999). Tout cela dans le but de contribuer à l'amélioration de la santé des populations à risque par la réduction du fardeau lié au paludisme.

La lutte contre le paludisme dans sa phase actuelle constitue une priorité dans l'atteinte des Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD). Elle est basée sur le contrôle et l'élimination de la maladie.

Le contrôle du paludisme intègre la lutte contre le parasite et celle contre le vecteur. La lutte antiparasitaire consiste à utiliser des médicaments antipaludiques en chimiothérapie et en chimio-prophylaxie. Elle avait suscité de très bons espoirs pour l'éradication du paludisme dans le passé. Malheureusement des résistances du parasite vis-à-vis des antipaludiques disponibles sont apparues par la suite.

En effet, la résistance aux antipaludiques pose aujourd'hui un réel problème dans la prise en charge des cas (PEC) de paludisme.

Apparue pour la première fois vers les années 1960 en Colombie (résistance à la chloroquine), elle a atteint l'Afrique de l'Est en 1978 (10), puis l'Afrique centrale en 1983 et l'Afrique de l'Ouest à partir de 1986 (11). Apparue au Burkina Faso en 1988 (12), le phénomène s'est intensifié et s'est répandu au cours des 20 dernières années. On a noté également son extension quelques années plus tard à d'autres molécules (amodiaquine, sulfadoxine-pyrimétamine, etc.)(13–16).

Pour faire face à ce phénomène, l'OMS préconise depuis 2001 l'usage des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) en vue de freiner l'expansion de la résistance, (17). Cette stratégie a été adoptée au BF en 2005 (18).

Cependant, des cas de résistance aux CTA sont de plus en plus rapportés en Asie du sud-est (19–21). Même si ces cas de résistance n'ont pas encore été rapportés en Afrique, il est important que des stratégies de surveillance efficaces soient mises en place afin d'anticiper sur une survenue éventuelle du phénomène.

Toutefois, en l'absence d'outils moléculaires valides actuellement permettant de caractériser les échecs aux dérivés de l'artémisinine, les tests *in vitro* constituent un important moyen de surveillance de la sensibilité des souches de parasites circulantes vis-à-vis de ces antipaludiques.

C'est dans ce contexte que nous avons conduit la présente étude qui a pour but de tester la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* vis-à-vis de cinq antipaludiques (luméfantrine, monodéséthylamodiaquine, méfloquine, pipéraquine et dihydroartémisinine) utilisés dans les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine.

II GENERALITES SUR LE PALUDISME

Le paludisme (malaria en anglais) est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium*. Le parasite est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Le paludisme est caractérisé par des symptômes dont les plus courants sont: la fièvre, les céphalées, les frissons et les vomissements qui apparaissent entre 10 à 15 jours après l'infection.

Dans le règne animal, le genre *Plasmodium* est classifié de la sorte (22):

Eucaryote Chatton, 1925

- Présence d'un noyau « vrai » dans la cellule
- Phylum des Alveolata Cavalier-Smith, 1992
 - Présence d'un système de structure en forme de sacs (alveoli) à la surface interne de leur membrane plasmique
 - Sous phylum des Apicomplexa (Sporozoon) Levine, 1970
 - Caractérisé par un complexe apical dans la cellule : anneaux polaires, rhoptries, micronèmes, granules denses, microtubules subpelliculaires
 - Classe des Aconoidasida (Aconoidina, Haematozoa) Vivier, 1982
 - Haemosporida Danilewsky, 1885
 - Absence de conoïde, excepté dans l'ookinète de quelques espèces.
 - Ordre des Haemosporida Danilewsky, 1885
 - Développement indépendant du macrogamonte et du microgamonte
 - Famille des Plasmodiidae
 - Agent du paludisme et de maladies similaires
 - Genre Plasmodium Laveran, 1882
 - agent du paludisme

II-1- Le parasite

Les plasmodiums sont de forme amiboïde ou fusiforme et leurs dimensions varient de 1 à 70 microns selon le stade évolutif (figure 3).

La coloration au *May Grünwald-Giemsa* montre au microscope optique que ce parasite est constitué d'un cytoplasme bleu pâle entourant une vacuole nutritive claire et contenant un noyau rouge et souvent du pigment brun-doré ou noir (hémozoïne) (23) (figure 1).

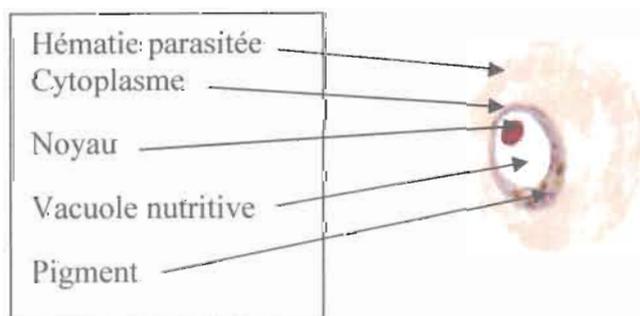


Figure 1: Hématie parasitée par un trophozoïte jeune de *Plasmodium sp.*

Source: OMS: Bench aid for malaria diagnosis (86).

L'ultra structure du *plasmodium* comporte trois éléments principaux (24) (figure 2):

- une membrane plasmique de nature lipoprotéique;
- un cytoplasme de forme annulaire, riche en protéases et renfermant des inclusions tels que les mitochondries (fonction métabolique), les ribosomes (lieu de synthèse protéique), des micronèmes, des rhoptries, des granules denses et des anneaux polaires qui interviennent dans l'invasion des hématies;
- un noyau entouré par le cytoplasme contenant un génome de quatorze chromosomes (25).

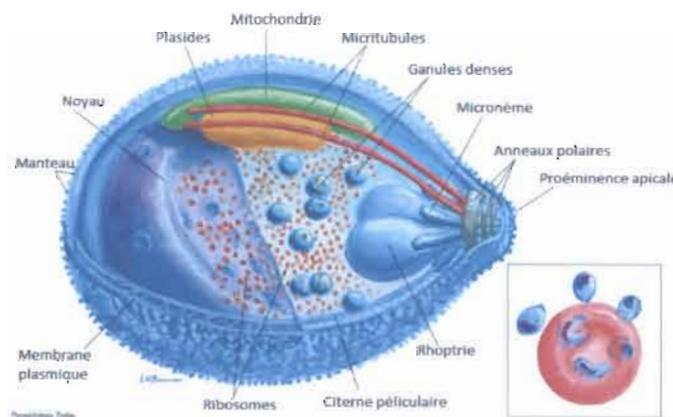


Figure 2. schéma de l'organisation tridimensionnelle du mérozoïte de *P. falciparum* (24).

Source: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475800017555>

Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (environ 156), touchant diverses espèces animales mais seulement cinq de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine. Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi* (26).

- ***Plasmodium falciparum*** : c'est l'espèce la plus largement répandue à travers le monde, qui développe des résistances aux antipaludiques et qui est responsable des formes cliniques potentiellement mortelles. Elle est présente dans les zones tropicales d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie.

- *Plasmodium malariae* : il a une distribution mondiale mais très inégale. Il sévit en Afrique, de manière beaucoup plus sporadique. L'infection est bénigne mais peut entraîner des rechutes jusqu'à vingt ans après la primo infection.
- *Plasmodium ovale* : Il sévit en Afrique intertropicale du Centre et de l'Ouest ainsi que dans certaines régions du Pacifique provoquant une fièvre tierce bénigne. Son incubation est de 15 jours au minimum mais peut être beaucoup plus longue, jusqu'à 4 ans. Son évolution est bénigne avec souvent des rechutes tardives (5 ans).
- *Plasmodium vivax* : il est très largement répandu en Amérique du Sud et en Asie, il est beaucoup plus rarement observé en Afrique. Les érythrocytes du groupe sanguin *Duffy* négatif (observés chez la majorité des sujets originaires d'Afrique de l'Ouest) ne possèdent pas le récepteur membranaire nécessaire à l'infection par *P. vivax*. Sa transmission s'arrête en dessous de 15°C. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours, mais on peut observer des rechutes (accès de reviviscence) pendant 3 à 4 ans. L'infection par *P. vivax* est classiquement considérée comme bénigne (fièvre tierce bénigne). De plus on commence à voir surgir quelques résistances médicamenteuses à *P. vivax*.
- *P. knowlesi* : c'était un parasite seulement simien (macaque) de l'Asie du Sud-Est. Actuellement, plusieurs centaines de cas ont été rapportés chez l'homme dont 4 mortels. Au microscope, il ressemble à *P. malariae*. Il est jusque-là sensible à la chloroquine (27).

II-2- Le cycle évolutif

Le cycle des *Plasmodium sp.* humains se déroule successivement chez l'Homme, l'hôte intermédiaire chez lequel a lieu la multiplication asexuée (schizogonie) et chez l'anophèle femelle, l'hôte définitif chez lequel a lieu la multiplication sexuée (sporogonie) (figure 3).

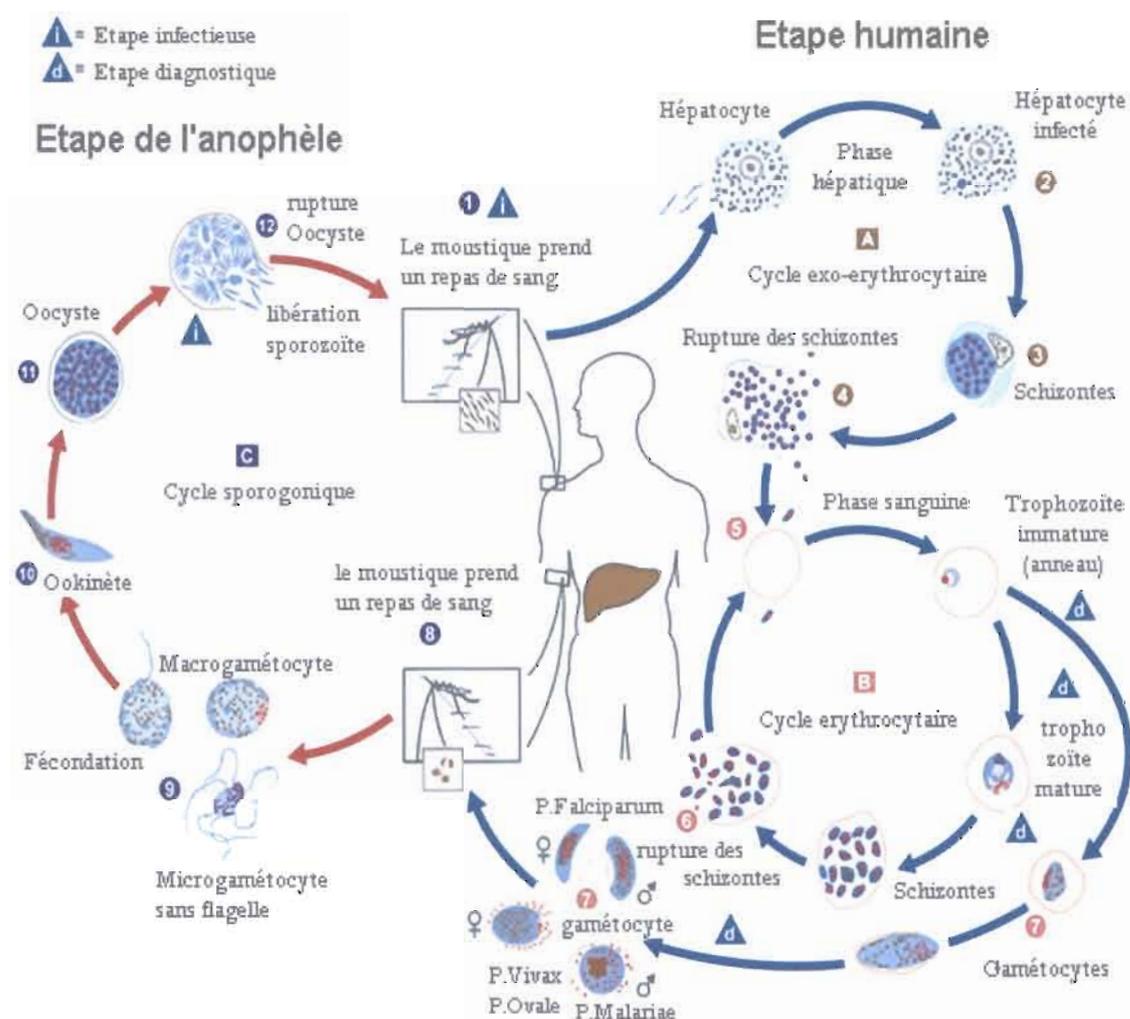


Figure 3: Cycle évolutif des *Plasmodium sp.*

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

II-3- Le vecteur

Le paludisme est une maladie transmissible et le vecteur est un moustique femelle du genre *Anopheles*, qui fait partie de l'ordre des Diptères de la famille des *Culicidae*. Les *Culicidae* regroupent l'ensemble des insectes connus sous le nom de moustiques. Comme tous les diptères, ce sont des holométaboles, c'est à dire qu'ils présentent des métamorphoses complètes et passent, au cours de leur vie par 4 stades successifs: œufs, larves, nymphes et adultes. Les 3 premiers stades sont aquatiques, les adultes menant une vie aérienne. Les mâles se nourrissent uniquement de jus sucrés; ils ne piquent pas. Les femelles ont besoin de protéines pour assurer le développement de leurs ovaires; elles les puisent dans le sang qu'elles prélèvent sur les vertébrés dont l'homme: seule la femelle est donc hémaphage (figure 4) et est incriminée dans la transmission (28) . Le développement des anophèles dure en moyenne 12 jours.

Sur 400 espèces d'anophèles répandues dans le monde, seulement une soixantaine sont des vecteurs du paludisme, et une vingtaine sont à l'origine de la plupart des cas (28). *An. gambiae s.l* est responsable de plus de 90% de la transmission du paludisme en Afrique (1).

Grâce à des études de cytogénétique, il a été démontré que certaines espèces comme *An. gambiae* , *An. funestus* et *An. maculipennis* comportaient plusieurs sous-espèces qui jouent des rôles différents dans la transmission du paludisme; d'où la notion de complexes d'espèces.

Ainsi le complexe *A. gambiae s.l* est composé de 7 sous-espèces : *An gambiae s.s*, *An. arabiensis*, *An. melas*, *An. merus*, *An. bwambe*, *An. quadrianulatus A.* et *An. quadrianulatus B.* (28).



Figure 4: *Anopheles* femelle prenant un repas sanguin

Source : <http://schools-wikipedia.org/images/85/8549.jpg.htm>

II-4- La physiopathologie du paludisme

Après la piqûre infectante de l'anophèle femelle, l'évolution schématique du paludisme comporte:

II.4.1. L'incubation

Elle est totalement asymptomatique et correspond à la durée de la phase hépatocytaire. Pour *P. falciparum*, elle est de 7 à 15 jours.

II.4.2. L'accès de primo-invasion

Il s'agit des premières manifestations lors de la première piqûre infectante. Il s'agit le plus souvent de signes généraux (fièvre, céphalées, courbatures, malaise général) associés à des signes digestifs (anorexie, nausées, vomissements, diarrhée) avec à l'examen physique une légère hépatomégalie.

II.4.3. Les accès palustres intermittents

Ils succèdent à l'accès de primo-invasion en prenant une allure de plus en plus régulière avec la synchronisation du développement des parasites.

Ils se caractérisent par la succession de frissons avec une fièvre, la splénomégalie, et des sueurs.

Ils se répètent selon le rythme régulier de fièvre tierce ou quarte: Fièvre tierce (chaque troisième jour) bénigne pour *P. vivax*, et *P. ovale*, fièvre tierce maligne pour *P. falciparum* et fièvre quarte (quatrième jour) bénigne pour *P. malariae*.

Les formes symptomatiques du paludisme sont variables. On note: le paludisme viscéral évolutif, la fièvre bilieuse hémoglobinurique, l'accès grave.

Les formes selon le terrain: le paludisme de l'enfant, le paludisme et la grossesse et le paludisme congénital.

II-5- Le diagnostic du paludisme

La prise en charge efficace de la maladie requiert qu'un bon diagnostic soit posé sans délai. Le diagnostic repose sur la suspicion clinique d'un paludisme et la recherche des hématozoaires dans le sang.

II.5.1. Le diagnostic clinique

C'est un diagnostic présomptif car la symptomatologie du paludisme n'est pas spécifique (symptômes communs à certaines viroses). 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, céphalées, lassitude, gêne abdominale, douleurs musculaires et articulaires, anorexie, vomissements et malaise générale.

II.5.2. Le diagnostic indirect (diagnostic d'orientation)

Il permet la mise en évidence de désordres biologiques non spécifiques tels que:

- l'anémie hémolytique qui est présente dans tous les cas de paludisme. C'est une anémie normocytaire, souvent normochrome, parfois hypochrome;
- une thrombopénie qui est presque toujours observée;
- la fonction hépatique qui est souvent altérée de même que celle rénale.

II.5.3. Le diagnostic direct

Le diagnostic de certitude est apporté par la mise en évidence du parasite ou de ses antigènes dans un prélèvement sanguin effectué de préférence avant tout traitement antipaludique, au moment des pics fébriles.

Les techniques les plus utilisées sont:

II.5.3.1. La goutte épaisse et le frottis sanguin:

Cette technique constitue jusqu'à présent le test de référence pour le diagnostic du paludisme. Elle se réalise par l'examen direct au microscope optique après coloration au Giemsa. Elle a pour avantage de permettre la visualisation directe du parasite permettant sa quantification et la spécification de l'espèce plasmodiale.

II.5.3.2. La technique du QBC (Quantitative Buffy Coat):

C'est une technique de concentration dont le principe est basé sur une centrifugation du sang et la coloration des parasites (noyaux) par un fluorochrome (l'acridine orange).

II.5.3.3. La PCR (Polymerase Chain Reaction):

C'est une technique d'amplification génique permettant de repérer un fragment d'acide désoxyribonucléique (*ADN*) du parasite et de le multiplier. Son principe est basé sur la capacité des *ADN* polymérase à synthétiser des brins complémentaires d'*ADN* à partir de couples d'amorces (29).

Le *QBC* et la *PCR* sont surtout utilisés dans le cadre de la recherche.

II.5.4. Le diagnostic immunologique

II.5.4.1. Les méthodes détectant les anticorps circulants

Elles ont peu d'intérêt diagnostique en zone d'endémie palustre car tous les sujets ont des anticorps antipalustres. Les différentes techniques utilisées sont: l'immunofluorescence indirecte, l'immuno-électrophorèse, l'immuno-enzymologie, l'hémagglutination et l'immuno-diffusion.

II.5.4.2. Les méthodes détectant les antigènes circulants du parasite

Ce sont les tests de diagnostic rapide (*TDR*) basés sur la détection de l'antigène *HRPII* (*Histidine Rich ProteineII*) et/ou de l'enzyme Lactate Déshydrogénase (*pLDH*) du parasite. Ils sont d'utilisation récente, destinés aux centres de santé périphériques et à la prise en charge du paludisme à domicile. Leur principe est basé sur l'immuno-chromatographie.

II.6. La lutte contre le paludisme

La stratégie mondiale de lutte antipaludique actuelle repose sur 3 composantes majeures: la prise en charge des cas (traitement des malades), la chimioprophylaxie et la lutte antivectorielle.

II.6.1. La prise en charge des cas (PEC)

Elle consiste en la prise en charge des cas de paludisme simple et celle du paludisme grave.

II.6.1.1. Le traitement de l'accès palustre simple:

Selon les directives de l'OMS 2010 (30), les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) sont les antipaludiques recommandés comme traitements de première ligne pour le paludisme non compliqué à *P. falciparum* (30). Les CTA suivants sont recommandés par l'OMS: (30).

Artéméther + luméfantrine

Artésunate + amodiaquine

Artésunate + méfloquine

Artésunate + sulfadoxine-pyrimétamine

Dihydroartémisinine + pipéraquline

Le choix d'une CTA dans un pays ou une région donnée sera basé sur le niveau de résistance aux constituants de la combinaison (30). L'artémisinine et ses dérivés ne doivent pas être utilisés en monothérapie pour le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* (30).

Au Burkina Faso :

Depuis février 2005, un nouveau schéma thérapeutique pour le traitement du paludisme simple au Burkina Faso a été adopté (18). Les médicaments proposés sont les combinaisons suivantes:

- Artéméther (20 mg) + Luméfantrine (120 mg)
- Artésunate (100 mg) + Amodiaquine (270 mg)

II.6.1.2. Le traitement du paludisme grave:

Dans les formes sévères de paludisme à *P. falciparum*, il est recommandé que l'évaluation clinique rapide et la confirmation du diagnostic soient faites, suivie par l'administration de doses complètes de traitement antipaludique parentéral sans délai avec n'importe quel antipaludique efficace disponible (30).

Chez l'adulte, l'artésunate à raison de 2,4 mg/kg de poids corporel en intraveineuse ou en intramusculaire administré dès l'admission (temps zéro), puis au bout de 12 et 24 heures et ensuite une fois par jour, constitue le traitement recommandé. L'artéméther ou la quinine sont des options acceptables, si l'on ne dispose pas d'artésunate injectable (30).

Chez l'enfant, l'artésunate à raison de 2,4 mg/kg de poids corporel en intraveineuse ou en intramusculaire administré dès l'admission (temps zéro), puis au bout de 12 et 24 heures et ensuite une fois par jour, constitue le traitement recommandé. L'artémether ou la quinine sont des options acceptables, si l'on ne dispose pas d'artésunate injectable (30).

Au Burkina Faso:

L'antipaludique utilisé pour le traitement du paludisme grave au Burkina Faso selon la politique nationale est la quinine par voie parentérale.

La posologie recommandée est de 16 mg de Quinine base / kg de poids corporel en dose de charge puis 8 mg de Quinine base / kg de poids corporel en dose d'entretien toutes les 8 heures chez l'adulte et toutes les 12 heures chez l'enfant (31).

II.6.2. La chimioprophylaxie : elle est indiquée pour:

- La protection de sujets non immunisés voyageant vers une zone d'endémie palustre, par la prise de médicaments efficaces sur les souches plasmodiales de la zone de voyage.
- La protection des populations sensibles en zones d'endémie palustre, notamment les femmes enceintes: traitement préventif intermittent (*TPI*) à la Sulfadoxine-Pyriméthamine à raison de 3 comprimés administrés aux 2^{ème} et 3^{ème} trimestres de la grossesse (18).

II.6.3. La lutte anti-vectorielle

Elle a pour objectif d'éviter la transmission des parasites à une population en s'attaquant aux vecteurs à différents stades de leur développement.

Pour cela, plusieurs méthodes sont utilisées, basées sur une bonne connaissance de la biologie de l'anophèle.

II.6.3.1. La lutte contre les larves d'anophèles : elle consiste:

- En la destruction des gîtes larvaires et à la modification de l'environnement (drainage, assèchement, assainissement du milieu);
- La lutte chimique: l'épandage d'insecticide (Téméphos) dans les gîtes larvaires;
- La Lutte biologique: basée sur l'utilisation de poissons larvivores (*Gambusia*) ou de bacilles (*Bacillus sphaericus*).

II.6.3.2. Lutte contre les adultes d'anophèles

- La protection collective consiste en l'usage de rideaux imprégnés et de grillages placés aux portes et fenêtres et la pulvérisation intra et extra domiciliaire d'insecticides organochlorés (*DDT*, *HCH*) et organo-phosphorés (malathion), carbamates (propraxur), pyréthriinoïdes (perméthrine, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine).

- La protection individuelle consiste en l'usage des moustiquaires imprégnées d'insecticides à effet rémanent tels que les pyréthriinoïdes, l'usage de crèmes répulsives et le port de vêtements protecteurs surtout la nuit.

II.6.3.3. Les vaccins antipalustres

Différents types de vaccins sont à l'étude, visant chacun des stades de développement du parasite chez l'Homme. Quelques-uns d'entre eux sont:

Vaccins anti stades hépatiques (32–34):

- Anti-sporozoïtes (antigène *CSP*): vaccin *RTS,S-AS01/AS02* en phase III par *GSK*
- Anti hépatocytes (antigènes *ME-TRAP*, *LSA-1*, *CSP*): vaccins *FP9/MVA*, *ME-TRAP*, *LSA-1-AS02*, *AdHu35*

Vaccins anti stades érythrocytaires (anti mérozoïtes) (32,33):

- *FMP1-AS02*,
- *AMA1-SA02*,
- *MSP1-Alum*, bi-allelic,
- *PfCP2.9*, etc.

Vaccins anti-multi stades (anti sporozoïtes, hépatocytes, mérozoïtes, anti gamétocytes)

(32,33):

- *FP9/MVA* polyprotein,
- Adenovirus 5.

Vaccins bloquant la transmission (anti-gamétocytes) (32,33):

- *Pfs25* et *Pvs25*.

Parmi ces vaccins, le vaccin *RTS, S* est aujourd'hui le candidat vaccin antipaludique le plus avancé en termes de développement clinique (<http://www.malariavaccine.org>).

En effet, les résultats d'une étude de phase II « Proof-of-Concept » menée au Mozambique ont montré pour la première fois qu'il était possible d'obtenir une protection partielle contre le paludisme chez des enfants vivant en zone d'endémie palustre (35) et que le bénéfice clinique durait pendant au moins 42 mois après la vaccination initiale (36). Par ailleurs, une étude menée au Kenya et en Tanzanie chez des enfants âgés de 5 à 17 mois a montré que le candidat vaccin antipaludique *RTS,S* avait un profil d'innocuité et de tolérance acceptable et réduisait le risque pour les enfants de développer un épisode de paludisme clinique de 39% sur une période de suivi de 12 mois (37,38). Les résultats d'une étude menée au Gabon, au Ghana et en Tanzanie chez des nourrissons âgés de 6 à 10 semaines ont montré également un profil d'innocuité acceptable lorsque ce même candidat vaccin est co-administré avec les vaccins pédiatriques courants utilisés dans les programmes nationaux de vaccination dans le cadre du Programme élargi de vaccination (*PEV*) de l'Organisation Mondiale de la Santé (*OMS*) (39). Les résultats de l'étude d'efficacité de phase III sur 11 sites dans 7 pays africains indiquent que l'efficacité du vaccin *RTS,S/AS01* était de 55,1% contre les accès de paludisme clinique, 34,8% contre les cas de paludisme grave chez les enfants de 5 à 17 mois (40) d'une part et d'autre part, chez les nourrissons de 6 à 12 semaines il assure une protection de 32,9% contre les épisodes de paludisme simple et de 26 à 36,6% contre les épisodes de paludisme grave (41).

Les résultats sur la protection à plus long terme devraient être disponibles en 2014.

Le candidat vaccin antipaludique *RTS,S* poursuit son développement et l'évaluation de son innocuité, de sa qualité, de son efficacité, et du rapport bénéfices/risques et si tout cela est satisfaisant pour les autorités réglementaires et sanitaires ce vaccin pourrait être mis à disposition du public d'ici 2015 (34).

III. Les antipaludiques

III.1. La classification des antipaludiques

La classification a été faite selon quatre critères (tableau I):

- Le point d'impact: les schizonticides et les gamétocytocides,
- L'origine du principe actif: naturelle ou synthétique,
- La caractéristique de l'action: rapide ou lente,
- La famille chimique.

Tableau I: classification des antipaludiques

Point d'impact	Mode d'action	Famille chimique/Médicaments	Origine
Schizonticides	<p><u>Groupe I</u> (Action rapide, résistance longue et difficile à apparaître)</p>	<p>- Quinine</p> <p>- Qinghaosu (artémisinine)</p>	Antipaludiques naturels
		<p>- <i>Amino-4-quinoléines</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • chloroquine • amodiaquine <p>- <i>Amino-alcools</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • méfloquine • halofantrine- • Lumefantrine <p>- <i>Dérivés de l'artémisinine</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • artémether • artésunate • artéether 	Antipaludiques de synthèse
	<p><u>Groupe II</u> (Action lente, résistance rapide aisée à obtenir)</p>	<p>- <i>Antifoliques</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • sulfones • sulfamides <p>- <i>Antifoliniques</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • biguanides • diaminopyrimidines 	
Gamétocytocides	Action lente	<p>- <i>Amino-8-quinoléines</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Primaquine 	

III.2. Les molécules testées

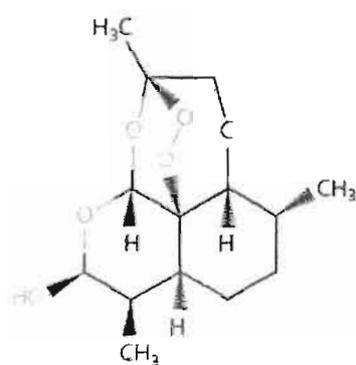
- La dihydroartémisinine (DHA)(30)

L'artémisinine (ART) également connue sous le nom de *qinghaosu*, est une lactone sesquiterpénique extraite des feuilles d'*Artemisia annua* (armoise de Chine). C'est un puissant schizonticide sanguin à action rapide.

Les dérivés de l'artémisinine (artéméther, artémotil et artésunate) sont transformés en **dihydroartémisinine** *in vivo*. Ces médicaments doivent être administrés sous forme d'associations avec d'autres molécules antipaludiques à mode d'action différente pour les mettre à l'abri d'une pharmacorésistance éventuelle (17).

La dihydroartémisinine est le principal métabolite actif des dérivés de l'artémisinine, mais elle peut également être administrée en tant que telle par voie orale ou rectale. Elle est relativement insoluble dans l'eau et doit être formulée avec des excipients convenables pour être correctement absorbée. Elle permet d'obtenir des taux de guérison analogues à ceux que donne l'artésunate administré par voie orale. Une association fixe avec la pipéraquline actuellement en cours d'évaluation semble être prometteuse en tant qu'association thérapeutique à base d'artémisinine (CTA) (30).

C'est un pont endopéroxyde (O-O) qui est à la base de l'activité de l'ART et de ses dérivés. En présence du fer de l'hème, ces ponts se rompent pour former un radical libre de type alkyl qui forme un lien covalent avec l'hème toxique pour le parasite. L'ART peut donc être considéré comme un composé pro-oxydant.



Dihydroartémisinine (DHA)

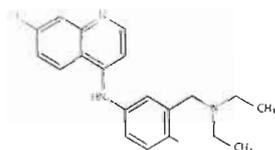
Masse moléculaire : 284.4

Les amino-4-quinoléines:

Ils ont une absorption digestive très rapide, une biodisponibilité élevée et une biotransformation hépatique qui fournit des métabolites. Leur demi-vie est de 2 à 3 jours pour la chloroquine et de 3 à 7 jours pour l'amodiaquine. Leur élimination urinaire est lente.

- L'amodiaquine (AQ) ou monodéséthylamodiaquine(30)

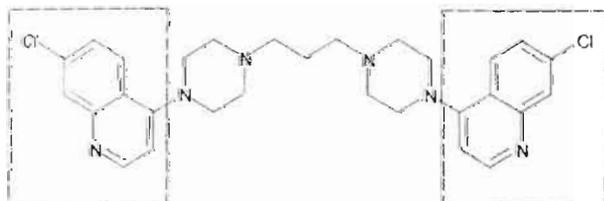
L'amodiaquine est une base de Mannich comportant un noyau amino-4-quinoléine. Elle a récemment connu un regain d'intérêt, dans le traitement de l'accès simple, en association avec les dérivés de l'artémisinine (ACT) et plus particulièrement en association avec l'artésunate, leur combinaison ayant un pouvoir synergique puissant. Le mode d'action de l'AQ semble être le même que celui de la CQ (perturbation de la détoxification de l'hème par le parasite).



Amodiaquine (AQ) Masse moléculaire : 355.9

- La pipéraquline (PQ) (42):

La PQ est un antipaludique bisquinoléine (1,3-bis-[4-(7-chloroquinoly)-4]-piperaziny-1]-propane), appartenant à la famille des amino-4-quinoléines. Elle a été synthétisée pour la première fois dans les années 60, et utilisée intensivement en Chine et en Indochine comme prophylaxie et traitement pendant au moins 20 ans (42). Plusieurs groupes de recherche chinois ont documenté que la PQ était efficace et mieux tolérée que la chloroquine contre le paludisme à *P. falciparum* et à *P. vivax*. Son utilisation a diminué pendant les années 80 en raison de l'apparition de souches résistantes. Pendant la décennie suivante, la pipéraquline a été redécouverte par des scientifiques Chinois comme un des composants appropriés dans une combinaison avec un dérivé d'artémisinine (43).

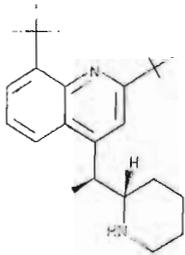


Structure moléculaire de la pipéraquline (PQ); poids moléculaire: 535.5 g/mol),

Les amino-alcools :

- La méfloquine (MQ) (30)

La méfloquine est une méthanol-4-quinoléine apparentée à la quinine. Elle est soluble dans l'alcool mais très légèrement soluble dans l'eau. Elle doit être tenue à l'abri de la lumière. Elle est efficace contre toutes les formes de paludisme. C'est l'une des molécules recommandées pour la prophylaxie en zone de poly-chimio résistance. Des études ont montré une association entre la résistance à la MQ et une mutation sur le gène *pfmdr1* (44).

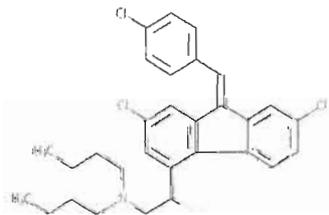


La méfloquine (MQ),

Masse moléculaire : 378.3

- La luméfántrine (LUM) (benflumétol) (30)

La luméfántrine appartient au groupe des aryl-amino-alcools. Elle a le même mode d'action que les autres composés amino-alcools. C'est un dérivé racémique du fluorène qui a été mis au point en Chine. Elle n'existe que sous forme de préparation pour la voie orale en association avec l'artéméther. Cette association thérapeutique à base d'artémisinine est très efficace contre *P. falciparum* poly-chimio résistant.



Structure moléculaire de la luméfántrine ; Masse moléculaire : 528.9

IV- La chimiorésistance aux antipaludiques

IV.1. Définition de la chimiorésistance

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit la résistance aux antipaludéens comme la capacité d'une souche plasmodiale à survivre et/ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un médicament donné à des doses égales ou supérieures à celles qui sont habituellement recommandées mais comprises dans les limites tolérées par le sujet (45), sous réserve que l'exposition au principe actif soit suffisante au niveau du site d'action (46).

IV.2. Les facteurs influençant la résistance

Plusieurs facteurs favorisant la propagation de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques ont été identifiés. Ce sont essentiellement:

- la pression médicamenteuse par un usage massif,
- les mouvements de populations humaines et/ou anophéliennes,
- le niveau de transmission,
- l'immunité de la population,
- les mutations géniques.

IV.3. Les mécanismes de résistance

Deux grands types de mécanismes de résistance ont été identifiés:

- pour les lysosomotropes, une perte du mécanisme d'accumulation dans la vacuole digestive.
- pour les antimétabolites, une modification de la cible par acquisition de mutations ponctuelles.

En général, la chimiorésistance est due à une mutation génétique au niveau de l'ADN du parasite. L'apparition de souches mutantes peut survenir de façon spontanée. Elle se traduit par une diminution de l'affinité des récepteurs membranaires de l'hématie parasitée pour le médicament, ou par l'impossibilité du médicament à pénétrer dans la vacuole nutritive du parasite pour perturber le métabolisme vacuolaire qui devient inapte à digérer l'hémoglobine et à cristalliser l'hème ou en activant le stress oxydatif (lysosomotropes) ou encore par inhibition des acides nucléiques (antimétabolites) (47). Actuellement elle pose un problème de prise en charge de la maladie car elle touche à la plupart des antipaludiques d'usage courant dans toutes les régions où sévit le paludisme (figure 5).

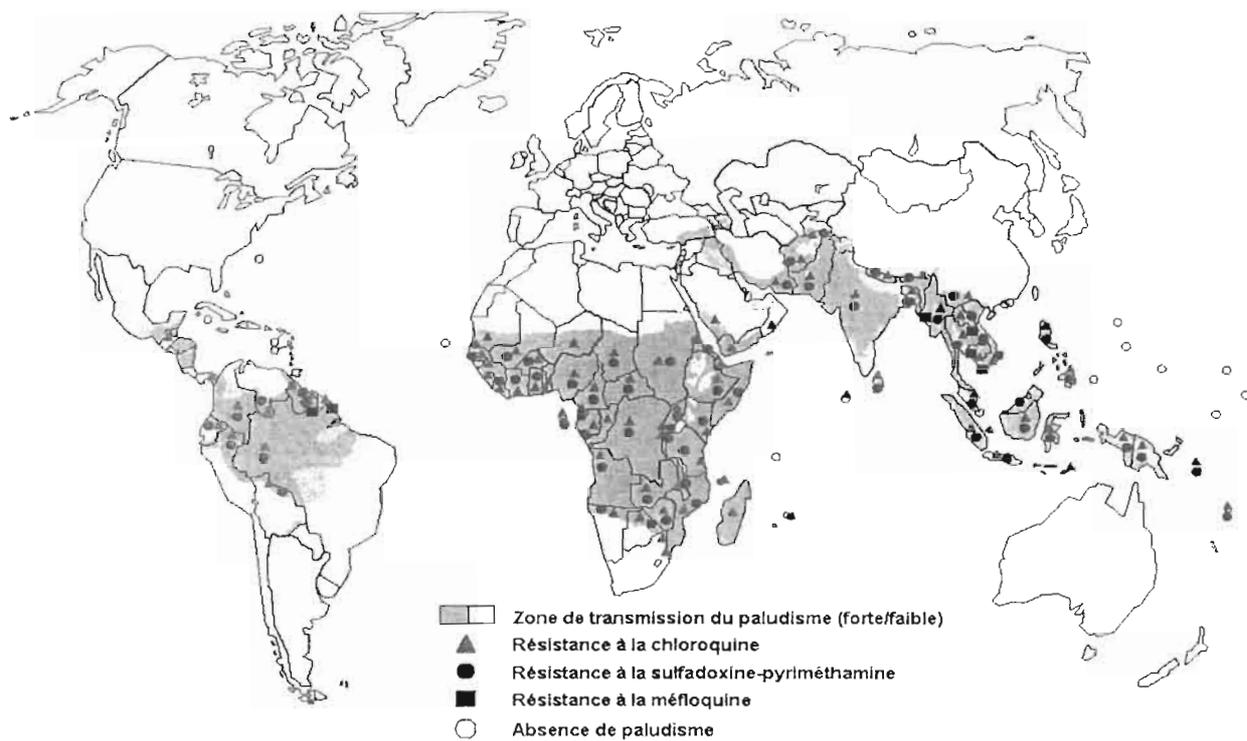


Figure 5: Situation de la résistance de *P. falciparum* aux différentes molécules utilisées en 2004. (Source: <http://www.rbm.who.int/wmr2005/html/map5.htm>)

V.3. Les tests *in vitro* (*ex vivo*)

Ces tests permettent un suivi épidémiologique des résistances en déterminant :

- le niveau de sensibilité de base de *P. falciparum* à une molécule dans une région donnée avant son utilisation et de suivre son évolution au cours du temps sous la pression médicamenteuse,
- les profils de résistance croisée entre les molécules,
- ou en validant des marqueurs moléculaires de résistance.

Ils évaluent la réponse parasitaire au traitement par contact direct parasite-principe actif *in vitro* ce qui permet d'éliminer deux cofacteurs majeurs de l'efficacité d'un antipaludique: l'immunité du patient et les variations pharmacocinétiques interindividuelles (30). Des trophozoïtes jeunes étant mis au contact de concentrations croissantes de principe actif, il est alors possible de déterminer la concentration d'antipaludique inhibant 50% (CI_{50}) la croissance parasitaire (maturation en formes schizontes). Lorsque l'isolat est polyclonal, la CI_{50} est le reflet de la sensibilité moyenne des différents parasites composant l'isolat. Pour déterminer si un isolat est chimio sensible ou chimio résistant, on compare alors sa valeur de CI_{50} à une valeur seuil définie pour chaque molécule.

Les différents types de tests se distinguent par le marqueur de croissance parasitaire qu'ils utilisent. Après le macrotest mis au point par l'OMS (1960) et vite abandonné, ce sont les microtests qui sont actuellement utilisés. Les principales techniques utilisées sont: le macrotest de Rieckman (1968), le microtest de Trager et Jensen (48), le semi microtest de Deloron et de Le Bras (1983) ou test isotopique (incorporation de l'hypoxanthine tritiée), les tests colorimétriques de détection du lactate déshydrogénase (*pLDH*) et de la protéine² riche en histidine (*HRPII*) et les tests fluorimétriques (*Syber Green 1*, *Pico Green*).

V.3.1. Les tests optiques

Il s'agit du microtest OMS (*Payne, 1990*) et du semi-microtest de Le Bras (49) 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 du parasite en schizontes, lorsque le prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI supplémenté en sérum humain et incubé à 37°C, dans une atmosphère humide en présence de 5% de CO_2 et 5% d' O_2 pendant 24 à 48 heures.

V. L'EVALUATION DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE ET DE LA RESISTANCE

Le contrôle de l'endémie palustre repose également sur les médicaments antipaludiques.

L'évaluation permanente de leurs niveaux d'efficacité est indispensable pour optimiser les recommandations thérapeutiques et prophylactiques nationales en fonction des résistances parasitaires observées. Pour pouvoir comparer les résultats dans le temps et permettre un suivi épidémiologique mondial des résistances, une standardisation des méthodes est nécessaire. Cette standardisation est coordonnée par l'OMS qui recommande régulièrement des protocoles à mettre en œuvre. Pour évaluer l'efficacité d'un antipaludique, trois approches sont aujourd'hui disponibles (30):

- Les tests *in vivo*,
- L'étude des marqueurs génomiques de la résistance,
- Les tests de sensibilité *in vitro (ex vivo)*.

V.1. Les tests *in vivo*

Ils consistent en un suivi clinique et parasitologique pendant 28 ou 42 jours chez le porteur de parasites après administration d'un médicament.

Il y a un succès thérapeutique si à la fin du suivi, le sujet n'a ni parasites ni signes cliniques.

Il y a échec parasitologique, s'il présente des parasites sans signes cliniques.

V.2. Les marqueurs génomiques de résistance

Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, de nombreuses connaissances ont été acquises ces dernières années sur les mécanismes de résistance aux antipaludiques et les déterminants moléculaires associés. Les génotypes de résistance sont déterminés après amplification de l'ADN par PCR. Ils permettent de distinguer une ré-infestation d'une recrudescence parasitaire. Ces méthodes sont très sensibles et ne nécessitent que très peu de sang. De plus, excepté les méthodes utilisant des digestions enzymatiques, elles sont également très coûteuses. La présence de ces marqueurs est également peu prédictive de la réponse thérapeutique. Pour beaucoup d'antipaludiques, avec un mécanisme de résistance du parasite assez complexe, les génotypes de résistance souvent observés ne sont pas toujours corrélés avec les résultats des tests *in vitro*.

Les résultats sont exprimés en concentration minimale inhibitrice (*CMI*) pour le microtest *OMS* et en concentration inhibitrice 50% (*CI₅₀*) ou 90% (*CI₉₀*) pour le semi-microtest.

V.3.2. Les tests radio isotopiques

V.3.2.1. Le microtest isotopique

IL s'agit du microtest isotopique de Desjardins (50), du semi-microtest isotopique de Le Bras et Deloron (49) et du semi-microtest de Rieckman. Ce sont des modifications, respectivement, du microtest *OMS* et du semi-microtest optique, par l'adjonction au mélange cellulaire mis en culture d'un radio-isotope, l'hypoxanthine tritié. Comme alternative à l'utilisation de l'hypoxanthine radioactive, Elabbadi avait proposé l'utilisation de l'éthanolamine (51). Plusieurs autres précurseurs tels que le palmitate, la serine, la choline, l'inositol et l'isoleucine ont été proposés. Cette technique peut se réaliser selon sa version complète (mise en culture des parasites en présence de doses croissantes d'antipaludiques) ou selon sa version simplifiée (culture en présence de la concentration seuil d'antipaludiques). La maturation des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites au cours de leur développement. La mesure de la radioactivité se fait après 42 à 48 heures d'incubation, à l'aide d'un compteur (bêta) à scintillation. Les résultats sont donnés en coups par minute (*CPM*) ou en désintégration par minute (*DPM*) et l'activité du médicament est exprimée en *CI₅₀* ou en *CI₉₀*.

V.3.2.2. Le test de Krogstad

Ce test est fondé sur la capacité d'un inhibiteur calcique, le vérapamil, à bloquer l'excrétion et l'exocytose de la chloroquine de la vacuole parasitophore des souches chloroquinorésistantes de *P. falciparum*. Pour cela, les souches plasmodiales du malade sont incubées dans une solution de chloroquine marquée à l'hydrogène tritié (*3H*), avec et sans vérapamil (52). La radioactivité des deux échantillons est comptée au compteur bêta à scintillation liquide. La différence de désintégration par minute (*DPM*) entre les deux échantillons permet d'affirmer la sensibilité ou non d'une souche de *P. falciparum* en deux heures et de déterminer le niveau "RI ou RIII" selon la classification établie par l'auteur d'après qui les résultats préliminaires permettent de situer les niveaux de résistance suivantes :

- De 0 à 10%, présence de souches résistantes avec un bas niveau *RI*
- $\geq 30\%$, présence de souches résistantes avec un bas niveau élevé *RIII*

- Entre 10 et 30%, présence de souches résistantes mais le niveau est encore mal défini (à l'état actuel de nos données existantes).

V.3.2.3. Le test Mark III de l'OMS

Décrite en 2000 (53), cette technique consiste en la mise en culture des parasites en présence de doses croissantes d'antipaludiques et l'incubation à 37°C dans une cloche à bougie pendant 24 à 30 heures. La croissance parasitaire est estimée par le comptage des schizontes par la microscopie.

V.3.3. Les tests enzymatiques

V.3.3.1. Le test enzymatique de Makler ou test du lactate déshydrogénase parasitaire (pLDH)

Ce test a été mis au point par Makler (54). Il est fondé sur la capacité de l'enzyme 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 vise à détecter et à quantifier par une technique enzymatique, la *LDH* produite par *P. falciparum* en présence de l'antipaludique étudié. Il existe une corrélation entre la densité parasitaire et l'activité de la *LDH* plasmodiale. Les limites associées à ce test ont amené à l'élaboration d'un nouveau test *pLDH* basé sur la mesure du taux de la *pLDH* par la technique *ELISA* double-site (*DELI*).

V.3.3.2. Le DELI- microtest (Double-site Enzyme-linked Lactate dehydrogenase Immunosorbent assay)

Le *DELI*-microtest est une méthode d'immunodétection en *ELISA* double sandwich décrite par Druilhe en 2001 (55,56) qui utilise deux anticorps monoclonaux *17EA* et *19G7* (Flow Laboratories Portland, OR, USA) dirigés contre deux épitopes différents de la lactate déshydrogénase spécifiques de *P. falciparum* (*pLDH*). La mise en culture se fait comme pour la technique de Desjardins dans du *RPMI 1640* mais sans hypoxanthine tritié.

V.3.4. Les tests fluorimétriques

Il s'agit du *SYBER green I* et du *Pico Green fluorescent*. Le principe de ces tests est basé sur une réaction de *PCR* effectuée en présence d'un fluorochrome spécifique de l'*ADN*, le *SYBER Green I* ou *Pico Green* qui s'intercale dans l'*ADN* génomique du parasite au cours de son

développement et émet une fluorescence qui peut être mesurée en continu au cours de la *PCR* (57).

V.3.5. Le test de détection de la protéine II riche en Histidine

Mis au point en 2002 par Harald Noedl (58), la méthode *HRPII* est l'une des techniques les plus récentes dans les tests *in vitro*. Comme tous les autres tests colorimétriques, il a l'avantage d'éviter les risques et coûts élevés liés à l'utilisation des isotopes.

Principe: C'est un test colorimétrique qui dose par une technique immuno-enzymatique (*ELISA*) la protéine 2 riche en histidine (*HRPII*) comme marqueur de la croissance parasitaire (58).

Méthode: Du sang frais parasité (*P. falciparum*) est collecté et mis en culture pendant 72 heures sur des plaques de 96 puits cotées avec les antipaludiques à tester. La croissance du parasite est ainsi déterminée par la mesure de la production de la protéine *HRPII* par *ELISA* sandwich double-site.

La protéine *HRPII* est une protéine soluble, la première à être utilisée dans les tests de diagnostic rapide. Il s'agit d'une glycoprotéine spécifique de *Plasmodium falciparum* exposée à la surface du globule rouge parasité, activement sécrétée par les formes asexuées et les jeunes gamétocytes au cours du cycle érythrocytaire avec un pic au moment de la rupture des schizontes (59). Il existe une circulation prolongée d'*HRPII* détectable une quinzaine de jours après la disparition des parasites du sang circulant (60).

La technique *ELISA* (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection. Elle permet de visualiser une réaction antigène-anticorps (*Ag-Ac*) grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. Dans le cas de l'*ELISA* sandwich, à la fin de la réaction, l'antigène recherché est pris entre 2 anticorps monoclonaux spécifiques reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène (Figure 6).

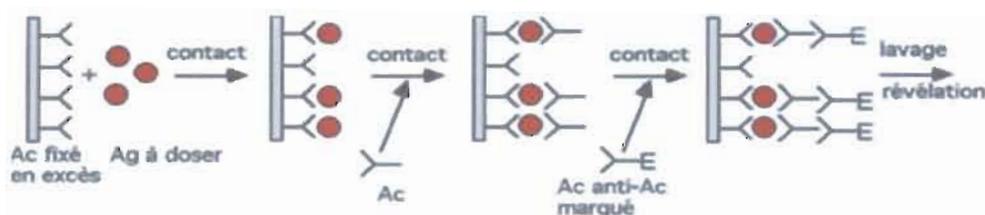


Figure 6: dosage d'un antigène par la méthode *ELISA* double sandwich

Source : (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>)

DEUXIEME PARTIE:
NOTRE ETUDE.

B. Notre étude

I. Objectifs de l'étude

I.1. Objectif général

Etudier la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à différents antipaludiques entrant dans la composition des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA).

I.2. Objectifs spécifiques

I.2.1. Déterminer les concentrations inhibitrices 50% de *P. falciparum* à la luméfantine; la monodéséthylamodiaquine; la méfloquine; la pipéraquine et la dihydroartémisinine.

I.2.2. Déterminer la sensibilité des souches testées.

I.2.3. Identifier les résistances croisées entre ces antipaludiques pris deux à deux.

II. METHODOLOGIE.

II.1. Cadre de l'étude

Notre étude a eu pour cadre le district sanitaire de Nanoro dans la région sanitaire du Centre Ouest du Burkina Faso. Le département de Nanoro est situé dans la Province du Boulkiemdé à 85 Km de Ouagadougou, capitale du Burkina Faso.

II.1.1. Le Burkina Faso

Le BF est un pays sahélien enclavé situé au cœur de l'Afrique Occidentale. Il est limité au Nord et à l'Ouest par le Mali, au Nord-Est par le Niger, au Sud-Est par le Bénin et au Sud par le Togo, le Ghana et la Côte d'Ivoire (8). Avec une superficie d'environ 274.200 km², le pays comptait 14.017.262 habitants au dernier recensement de la population en Décembre 2006, soit une densité d'environ 51 habitants au kilomètre carré (RGPH 2006). Le climat est tropical de type soudano-sahélien, rythmé par deux saisons: une saison pluvieuse de Mai à Octobre et une saison sèche de Novembre à Avril marquée par l'harmattan. Ce sont ces facteurs climatiques (pluviométrie, température) et environnementaux (couvert végétal) qui influencent la prolifération des vecteurs associés à l'endémicité du paludisme. La durée de la saison des pluies et la pluviométrie totale annuelle permettent de distinguer trois zones climatiques correspondant aux différents faciès de la transmission du paludisme (figure 7):

- Une zone de transmission permanente caractérisée par une recrudescence pendant la saison des pluies qui correspond à la partie sud-ouest du pays. Zone soudanienne, plus arrosée avec une pluviométrie comprise entre 1000 et 1300 mm avec une saison qui s'étale sur au moins 5 mois. La végétation est composée de forêts claires et de galeries forestières en bordure des cours d'eau permanents (61) ;
- Une zone de transmission saisonnière longue, d'une durée de 4 à 6 mois, qui correspond à la partie centrale du pays. Zone soudano-sahélienne, recevant une pluviométrie comprise entre 600 et 1000 mm pour une saison d'environ 4 à 5 mois. La végétation est une juxtaposition de formations arbustives et herbeuses (61) ;
- Une zone de transmission saisonnière courte (2-3 mois) qui est influencée par les aléas

climatiques. Ce type de transmission correspond à la zone sahélienne située dans la partie Nord du pays. zone caractérisée par une pluviométrie annuelle comprise entre 400 et 600 mm pour une durée de 3 à 4 mois. La bande sahélienne est caractérisée par une steppe arborée de *balanites* et *acacias radia* avec un tapis de graminées sur les dunes et le long des dépressions (61).

Le réseau hydrographique du Burkina s'organise en trois bassins internationaux qui sont le bassin de la Volta, le bassin de la Comoé et le bassin du Niger qui globalement drainent annuellement environ huit milliards de m³ d'eau (8).

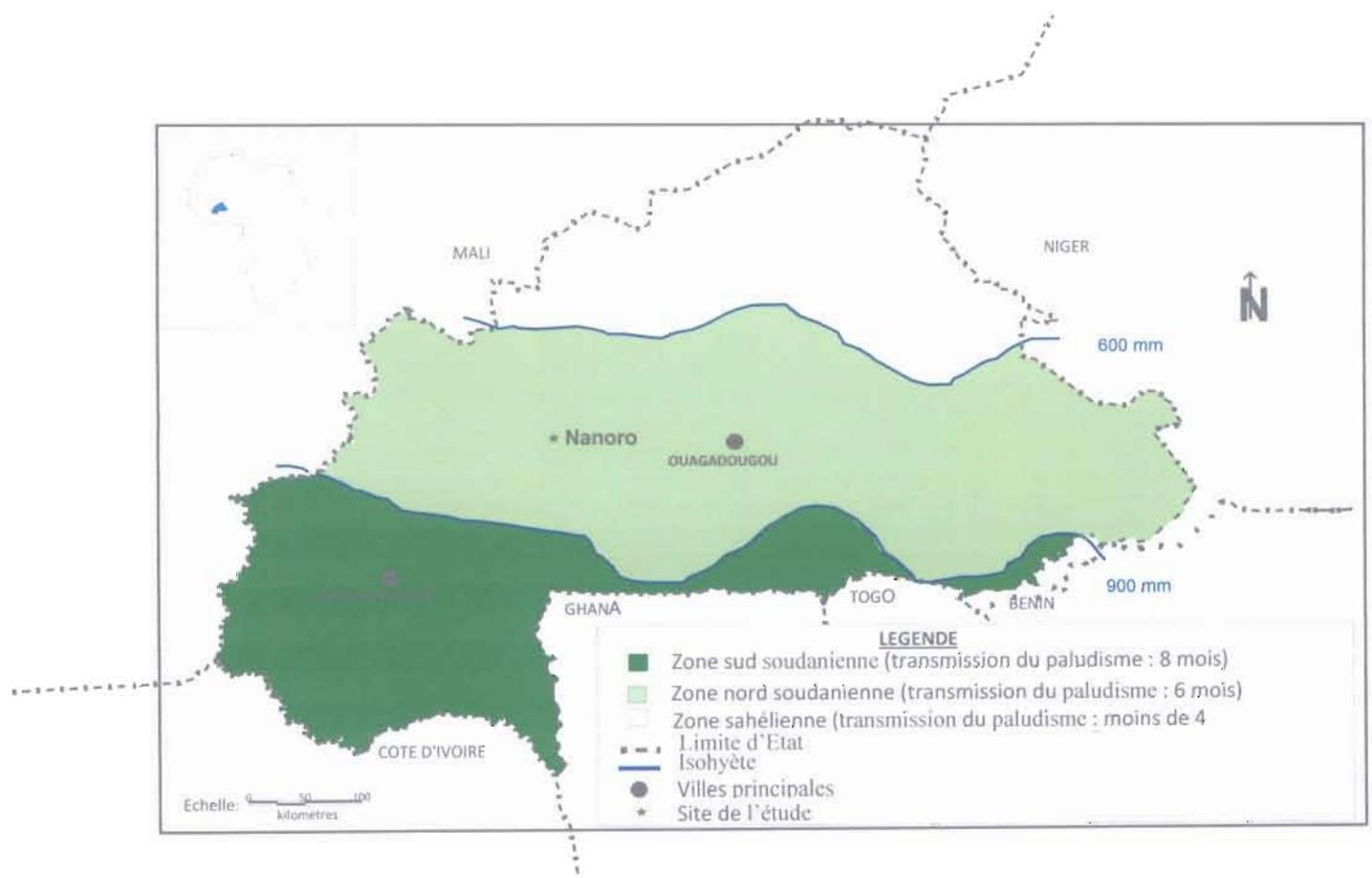


Figure 7: Situation géographique, zones climatiques et faciès du paludisme du Burkina Faso.

Source : <http://napa-napa.org/worshops/burkina>

II.1.2. Sites d'étude

L'étude s'est déroulée à Nanoro et Nazoanga, deux sites faisant partie de la zone de surveillance démographique de l'Unité de Recherche Clinique de Nanoro (URCN). La zone de surveillance démographique (SSD) couvre 24 villages avec 6 centres de santé et une population générale d'environ 54.781 habitants en 2010.

Le paludisme est hyper endémique avec une transmission saisonnière pendant la saison des pluies. Les vecteurs les plus courants sont *Anopheles gambiae*, *A. funestus* et *A. arabiensis*. *P. falciparum* est le principal agent pathogène (90%), suivi de *P. malariae* (3-8%) et de *P. ovale* (0,5-2%) (PNLP). La morbidité palustre est élevée et en 2007, elle a constitué presque la moitié (48,6%) de toutes les consultations, suivies par les infections des voies respiratoires (19,4%), les affections cutanées (8,8%), les diarrhées (7,8%) et les autres maladies parasitaires (5,6%) (rapport annuel 2007 du DSN).

II.1.2.1. Le CMA de Nanoro

Le CMA de Nanoro est une structure de santé privée à caractère confessionnel. Il appartient à la congrégation des religieux Camilliens.

II.1.2.2. Le CSPS de Nazoanga

Il est situé à 14km de Nanoro et composé d'un dispensaire, d'une maternité et d'un dépôt MEG.

II.1.2.3. L'Unité de Recherche Clinique de Nanoro (URCN)

Nos travaux de laboratoire se sont déroulés à l'URCN. L'unité a été créée en 2009 avec pour ambition d'être un pôle de référence pour la recherche clinique en Afrique. Actuellement plusieurs projets de recherche y sont en cours.

Sur le plan de son apport à la formation, l'URCN a déjà accueilli et formé plus d'une dizaine de thésards en médecine ou pharmacie et master. Actuellement cinq (05) étudiants *PhD* sont en cours de formation. L'URCN emploie 215 personnes et est dirigée par un Maître de Recherche, le Dr TINTO Halidou.

II.2. Type d'étude

Notre étude était une étude expérimentale qui a consisté à tester la sensibilité *in vitro* des souches de *P. falciparum* collectées chez des femmes enceintes, à différents antipaludiques.

II.3. Population et méthodes d'étude

II.3.1. Echantillonnage et taille d'échantillon

L'étude *PREGACT* a une taille d'échantillon totale de 870 femmes à recruter. Nous avons procédé à un échantillonnage systématique de toutes les femmes enceintes participant à cette étude et dont les densités parasitaires étaient comprises dans les limites définies par nos critères d'inclusion. Cependant notre travail a porté sur les échantillons qui ont été collectés au cours de la première année de l'étude.

II.3.2. Population d'étude

Notre étude s'inscrit dans le cadre d'une étude multicentrique d'efficacité et d'innocuité des CTA (*PREGACT*) chez les femmes enceintes au 2^e et 3^e trimestre de la grossesse dans quatre pays africains (Burkina Faso, Ghana, Malawi et Zambie) avec une composante *in vitro*. Notre travail a concerné l'ensemble des femmes enceintes qui résidaient dans notre zone d'étude et qui répondait aux critères d'inclusion définis par le protocole de la composante *in vitro* de l'étude.

II.3.2.1. Les critères d'inclusion

Ont été incluses dans notre étude, les femmes enceintes ayant :

- une mono infection à *P. falciparum*,
- une densité parasitaire d'au moins 2500 trophozoïtes / μ L de sang,
- accepté de donner leur consentement éclairé (écrit, signé et daté).

II.3.2.2. Les Critères de non inclusion

N'étaient pas incluses dans l'étude, les patientes ayant présenté un des critères suivants:

- patiente ayant reçu un traitement récent (moins d'une semaine) avec un antipaludique ou un antibiotique à activité antipaludique (clindamycine; azythromycine, etc.)
- patiente ayant une infection palustre mixte.

II.4. Considérations éthiques

Le projet *PREGACT*, dans lequel s'inscrit notre étude, a obtenu l'approbation du Comité d'Éthique pour la Recherche en Santé (*CERS*) du Burkina Faso, de l'Institutional Review Board (*IRB*) de l'*IMT* et du Comité d'Éthique de l'*UZA* à Anvers.

Toutes les patientes ou leurs représentants légaux (pour les moins de 18 ans) ont signé un consentement libre et volontaire pour leur participation à l'étude après avoir reçu toutes les informations sur l'étude (buts, procédures, risques et bénéfices, etc).

II.5. La sélection des patientes

II.5.1. La présélection

Elle s'est déroulée dans les services de maternité où les femmes enceintes venaient pour leur consultation prénatale (*CPN*).

Pour éviter les longues files d'attente, un système de présélection a été instauré en utilisant un test de diagnostic rapide (*TDR*).

II.5.1.1. Prélèvement de sang au bout du doigt pour la réalisation du TDR:

Matériel nécessaire :

- Lancette stérile
- Gants d'examen
- Ethanol à 70%
- Coton hydrophile
- *TDR* (kits)
- Marqueur indélébile
- Poubelles
- Boîtes à objets tranchants

La ponction au niveau de la pulpe du troisième ou du quatrième doigt de la main gauche était réalisée après désinfection à l'éthanol à 70%.

II.5.1.2. Réalisation du test de diagnostic rapide (TDR):

Nous avons utilisé le test *SD BIOLINE® Malaria Antigen P. f.* Le principe de ce test est la recherche de l'antigène *HRPII* de *P. falciparum*. Le *TDR* a été effectué conformément aux recommandations du fabriquant.

Lorsque le *TDR* s'avérait positif, un frottis sanguin et une goutte épaisse étaient alors réalisés pour une confirmation du diagnostic, l'identification de l'espèce plasmodiale et la détermination de la densité parasitaire.

II.5.2. La sélection

Elle s'est déroulée en partie dans les services de la maternité et du laboratoire de l'*URCN*. Il s'agissait de confirmer l'infection palustre par la microscopie optique chez les patientes ayant présentées un *TDR* positif.

La goutte épaisse (*GE*) et le frottis mince (*FM*) ont été préparés, séchés et colorés au Giemsa selon les Procédures Opérationnelles Standards (*POSs*) du laboratoire de l'*URCN*.

Dans le cadre du contrôle de qualité, le système de double lecture a été adopté. Une troisième lecture était faite en cas de discordance (rapport des résultats > 2) entre les deux premiers lecteurs.

II.5.2.1. La réalisation de la goutte épaisse et frottis sanguin:

Matériel nécessaire:

- Lames porte objet
- Pissettes
- Portoirs à lames
- Séchoir
- Colorant de Giemsa
- Crayon gras
- Boîtes à rangement de lames
- Méthanol
- Poubelles et boîtes à objets tranchants

Pour la réalisation de la *GE/FS*, deux gouttes de sang ($\approx 2 \mu\text{l}$) étaient déposées sur une lame porte-objet et une autre lame servait à étaler la goutte et à tirer le frottis mince.

Les frottis minces étaient fixés au méthanol absolu et les lames colorées au Giemsa dilué au $1/10^{\text{ème}}$ pendant 10 minutes. Après lecture, les lames étaient conservées dans des boîtes à rangement.

II.5.2.2. La lecture des lames de goutte épaisse et frottis sanguin

Matériel nécessaire:

- Microscope optique
- Lames de goutte épaisse colorées
- Huile à immersion
- Compresse
- Coton hydrophile
- Compteurs manuels

Les lames colorées au Giemsa ont été lues au microscope optique à l'objectif à immersion (100X) pour la recherche des parasites, l'identification des espèces et le calcul de la densité parasitaire (*DP*). Les formules utilisées sont ci-dessous.

❖ Sur la goutte épaisse:

$$DP = \frac{\text{Nombre de parasites comptés} \times 8000}{\text{Nombre de leucocytes comptés}} = \text{Nombre de parasite}/\mu\text{L de sang}$$

Pour 200 leucocytes comptés, lorsque le nombre de parasites atteint 10, la *DP* peut être calculée. En dessous de 10 parasites pour 200 leucocytes comptés, il faut nécessairement compter au moins 500 leucocytes avant de calculer la *DP*.

Au delà de 100 parasites pour 200 leucocytes comptés, la *DP* doit être estimée à partir du frottis mince.

❖ Sur le frottis mince:

$$DP = \frac{\text{Nombre d'hématies parasitées} \times 5.000.000}{\text{Nombre de globules rouges comptés}} = \text{Nbre de parasites}/\mu\text{L de sang}$$

Sur le frottis mince, il faut compter simultanément les hématies parasitées et le nombre de champs microscopiques. Il faut compter au moins 21 hématies parasitées avant d'établir la *DP*. Le nombre de globules rouges comptés est égale au nombre de champs parcourus multiplier par le « Facteur de Multiplication » du microscope utilisé.

II.6. Les tests *in vitro* (*ex vivo*)

Pour les tests de sensibilité *in vitro*, toutes les manipulations se sont déroulées dans la salle de culture de l'URCN sauf la prise du sang veineux qui était effectuée dans les services de maternité (dans une salle aménagée à cet effet).

Nous avons réalisé la culture des isolats de *P. falciparum* dans des concentrations croissantes d'antipaludiques pendant 72 heures à 37 °C en atmosphère humide enrichie de 5% CO₂; 5% O₂ et 90% N₂. Après cela la technique du "Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay" (ELISA) basée sur la détection et la quantification de la protéine² riche en histidine HRPII de *P. falciparum* a été réalisée.

II.6.1. La prise de sang veineux

Un prélèvement de 3 à 4 ml de sang dans des tubes avec anticoagulant EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétyle) a été réalisé chez des patientes avec une mono-infection à *P. falciparum* et une densité parasitaire d'au moins 2500 trophozoïtes/μL. Les échantillons étaient acheminés au laboratoire dans des glacières et lorsqu'ils n'étaient pas immédiatement mis en culture, nous les avons conservés au réfrigérateur à + 4°C pour une manipulation dans les 6 heures maximum.

Matériel nécessaire:

- tubes à EDTA et tubes à héparine-lithium
- dispositifs vacuteiner ou seringues à usage unique
- garrot
- tampon d'alcool (éthanol à 70%)
- portoirs pour tubes
- poubelles et boîtes à objets tranchants

La procédure pour la prise de sang veineux consiste à identifier le contenant (inscrire les initiales de la patiente, numéro d'inclusion, date et jour de visite dessus), bien attacher le garrot pour repérer la veine. Après avoir désinfecter l'aire de prélèvement à l'éthanol, prélever 4 à 5 ml de sang.

II.6.2. La mise en culture des parasites

Matériel nécessaire:

Gros matériel:

- Incubateur à CO_2/O_2
- Centrifugeuse électrique
- Congélateur ($\leq -20^\circ C$)
- Poste de sécurité microbiologique (hôte à flux laminaire)
- Réfrigérateur (2 à $4^\circ C$)
- Microscope.

Petit matériel:

- Pipettes multicanaux (20-200 μL)
- Pipettes 1000 μL
- Pipettes de 20 μL
- Distributeur Eppendorf et combitips de 5 ml
- Flacons en verre stériles de 500 et 1000 ml
- Système de filtration stérile avec membrane filtrante de 0,22 μm de diamètre des pores.
- Vortex
- Portoirs
- Agitateur électromagnétique et barreau aimanté ;
- Bêchers de 200 ml, 600 ml, 800 ml et 5 litres ;
- Balance de précision.

Réactifs et consommables :

- Plaques de culture de 96-puits
- *RPMI-1640 MEDIUM R8758 SIGMA*
- *HEPES*
- Gentamycine
- Albumax II
- *NaHCO3*
- Hématies de groupe sanguin O saines
- Ethanol à 70°
- Eau de javel
- Papier buvard
- Cônes jetables
- Pipettes Pasteur stériles
- Tubes à essai stériles de 5 ml

Les médicaments testés :

Nous avons testé cinq (05) molécules: la monodéséthylamodiaquine (**MDAQ**) (*SIGMA-ALDRICH*), la méfloquine (**MQ**) (*SIGMA-ALDRICH*), la dihydroartémisinine (**DAH**) (*SIGMA-TAU*), la pipéraquline (**PIP**) (*SIGMA-TAU*) et la luméfántrine (**LUM**) (*NOVARTIS*).

II.6.2.1. La préparation des milieux de culture:

II.6.2.1.1. La préparation du milieu complet de culture (RPS):

Pour 1 litre de milieu *RPS*, nous avons mélangé à du *RPMI* complet 1640 (10,43g de poudre de *RPMI* 1640 + 6 g de *HEPES* + 25 mg de gentamicine + 2,8 ml de 7,5% *NaHCO₃* pour 100ml de milieu) avec 0,5% p/v d'albumax II et de l'eau distillée en quantité suffisante pour 1litre. Des aliquotes de 25 ml de ce mélange ont été faites pour une conservation à -20 °C pendant 30 jours.

II.6.2.1.2. La préparation des hématies saines du groupe O rhésus positif:

Du sang prélevé sur tube à lithium-héparine d'un sujet O Rhésus+ et testé négatif au paludisme, a été centrifugé à 3500 tours/mn pendant 10mn. Le culot d'hématies obtenu est ensuite lavé trois fois avec du *RPMI* (mélange à volume égal culot d'hématies / *RPMI* et centrifugation 10mn à 3500 tours/mn). Après le dernier lavage, le culot d'hématies a été remis en suspension dans un volume égal de *RPMI* de façon à obtenir un taux d'hématocrite à 50%. Ces hématies ont été conservées un mois entre 4 et 8°C.

II.6.2.1.3. Le lavage des hématies parasitées:

Le lavage des échantillons de sang parasité a suivi la même procédure que celle utilisée pour la préparation des hématies saines (voir plus haut). Un frottis mince du culot d'hématies a été réalisé à la fin du lavage afin de déterminer la densité parasitaire après le lavage.

II.6.2.1.4. La préparation des solutions mères (sm) d'antipaludiques:

Pour la préparation des solutions concentrées d'antipaludiques, 1mg d'antipaludique a été dissout dans un ml du solvant adéquat (éthanol pour la *DHA* et eau pour préparation injectable pour les autres médicaments). Après une homogénéisation, nous avons procédé à une

filtration quand le solvant était autre que l'éthanol. Ces solutions mères étaient ensuite diluées pour obtenir les concentrations de travail appelées solutions filles (Tableau II).

II.6.2.1.5. La préparation des solutions filles (sf):

Les solutions mères d'antipaludiques ont été diluées avant leur utilisation finale dans les plaques de culture (Cf annexe 2 : Drug dilutions *HRPII* assay sheet).

Tableau II : Dilution des solutions mères d'antipaludiques.

	MDAQ (PM=61)	MQ (PM=127)	DHA (PM=134)
1 ^{ère} dilution (sm)	10 mg + 10 ml eau PPI	10 mg + 10 ml eau PPI	10 mg + 10 ml éthanol
Concentration C1	1mg / ml	1 mg / ml	1mg / l
2 ^{ère} dilution (sf)	25 µl + 4890 µl eau bidistillée	25 µl + 8650 µl eau bidistillée	5µl + 9765,6 µl eau bidistillée
Concentration C2	568 ng/ml - 189 nM	305 ng/ml - 127 nM	510 ng/ ml - 134 nM

	LUM (PM=287.3)	PIP (PM=1424)
1 ^{ère} dilution (sm)	10 mg + 10 ml eau PPI	10 mg + 10 ml eau PPI
Concentration C1	1 mg / ml	1 mg / ml
2 ^{ère} dilution (sf)	10 µl + 7340 µl eau bidistillée	50 µl + 3850 µl eau bidistillée
Concentration C2	152 ng/ml – 287,3 nM	1424ng/ ml - 1424 nM

Eau PPI = eau pour préparation injectable

II.6.2.1.6. La préparation de la suspension globulaire:

Nous avons mélangé 560µl de culot d'hématies parasités lavées avec 37,28 ml de *RPS* (dans des tubes de 50 ml) afin d'obtenir un milieu cellulaire mixte (*CMM*) avec approximativement un taux d'hématocrite de 1,5%. Deux cent (200) microlitre de ce mélange ont été distribués dans chaque puits de la plaque de culture.

II.6.2.1.7. La préparation du contrôle négatif:

Le contrôle négatif était constitué d'un mélange de 60µl d'hématies saines de groupe O Rhésus+ dans 4 ml de *RPS* pour 2 plaques de culture.

II.6.2.1.8. La distribution de la suspension globulaire dans les plaques de culture:

Après avoir préparé le mélange cellulaire et le contrôle négatif, nous avons procédé à leur distribution dans les plaques de culture.

Une fois la plaque identifiée (la date, les initiales de la patiente, le numéro d'inclusion et les différents antipaludiques), nous avons distribué 50 µl de la solution fille d'antipaludique dans les puits de la première colonne en doublets et 25µl d'eau bi-distillée stérile (à Ph7.2) dans les puits de la colonne 2 à la colonne 12.

Nous avons ensuite transféré à l'aide d'une pipette multicanaux 25µl de la solution de médicament de la colonne 1 à la colonne 2 et mélangé soigneusement par aspiration-refoulement avant de transférer 25µl de cette colonne à la colonne suivante et ainsi de suite.

Ce procédé a été conduit jusqu'à la colonne 10 et après, nous avons éliminé les 25µl de cette colonne dans une poubelle. Ainsi à la fin de la distribution, la 1^{ère} colonne contenait la plus forte concentration d'antipaludique et la colonne 10 la plus faible concentration. Les colonnes 11 et 12 qui ne contenaient que de l'eau bi-distillée sans médicament servaient respectivement de colonne de contrôle positif et celle de contrôle négatif.

Après cette étape, nous avons distribué 200µl du mélange cellulaire dans les puits de la colonne 11 à la colonne 1 (des concentrations les plus faibles aux concentrations les plus élevées) et 200µl de contrôle négatif dans les puits de la 12^{ème} colonne (Tableau III).

A la fin de la distribution, l'heure était inscrite sur le couvercle, les plaques étaient soigneusement agitées et incubées pendant 72 heures à 37 °C dans une étuve en atmosphère humide enrichie de 5% CO_2 , 5% O_2 et 90% N_2 .

Tableau III : plaque de culture à 96 puits cotée

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
											-	+
											-	+
MQ	127 nM	63,5	31,75	15,87	7,93	3,96	1,98	0,99	0,49	0,24	-	+
MQ	127 nM	63,5	31,75	15,87	7,93	3,96	1,98	0,99	0,49	0,24	-	+
	134 nM	67	33,5	16,75	8,37	4,18	2,09	1,04	0,52	0,26	-	+
	134 nM	67	33,5	16,75	8,37	4,18	2,09	1,04	0,52	0,26	-	+
	287,3 nM	143,65	71,82	35,91	17,95	8,98	4,49	2,24	1,12	0,56	-	+
	287,3 nM	143,65	71,82	35,91	17,95	8,98	4,49	2,24	1,12	0,56	-	+

Fortes concentrations \leftarrow \rightarrow Faibles concentrations

(-) contrôles négatifs (+) contrôles positifs

II.7. Les tests *ELISA*

Après 72 heures de culture, la croissance parasitaire a été déterminée par l'*ELISA* en mesurant la densité optique d'une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de la protéine *HRP2* produite.

Matériel nécessaire:

Equipements et consommables:

- Plaques d'*ELISA* à 96 puits
- Lecteur *ELISA THERMO MULTISCAN FC*
- Un jet de pipette ajustable
- Pipette multicanaux (20-200 μ L)

Solutions et tampons :

- Tampon *PBS, PH 7.4, Sigma-Aldrich, P3813*
- Solution de lavage *Tween20, Sigma-Aldrich, P1379* (*PBS+0,1% Tween 20: 235ml/plaque*)
- Solution d'arrêt *BSA, Sigma-Aldrich, A9647* (2% de *BSA* dans du *PBS: 10ml/plaque*)
- Chromogène *TMB, Zymed Laboratories, Inc*
- Acide Sulphurique 1M
- Solution d'anticorps primaire (*MPFM-55A, Immunology Consultants Laboratories, Inc, Newberg, OR, USA*)
- Solution d'anticorps secondaire (*MPFG-55P Conjugate, Immunology Consultants Laboratories, Inc, Newberg, OR, USA*)

Procédures: pour la réalisation de la technique *ELISA*, nous avons procédé à plusieurs étapes successives:

II.7.1. Le "coating" des plaques *ELISA*:

Nous avons distribuer 100 μ l d'anticorps primaire (*MPFM-55A*) dilué dans du *PBS* à 9,4mg/ml dans des plaques *ELISA* et incubé toute une nuit à 4°C. Après cette incubation, nous avons rejeté le contenu des plaques et lavé 3 fois avec du *PBS/Tween* (200 μ l/puits) et asséché à l'aide d'un papier buvard.

II.7.2. Le blocage des anticorps primaires sur les parois des plaques:

Pour cela nous avons ajouté 100 µl de la solution de blocage et incubé pendant 2 heures. Après cette incubation, leur contenu était rejeté et les plaques étaient lavées 3 fois avec du *PBS/Tween* (200 µl/puits), asséchées à l'aide d'un papier buvard et conservées à -20°C.

II.7.3. L'hémolyse des échantillons de culture:

Nous avons procédé à une plasmolyse des hématies après décongélation par une dilution au 1/2 avec de l'eau distillée.

II.7.4. L'ajout de l'échantillon de culture hémolysée:

Nous avons transféré 100 µL de lysat de l'échantillon de culture dans les plaques préalablement sensibilisées à l'anticorps primaire et incubé pendant 1 heure à la température ambiante dans une chambre humide. Après incubation nous les avons de nouveau lavé 3 fois dans du *PBS/Tween* (200µl/puits) et séché à l'aide du papier buvard.

II.7.5. La dilution et l'ajout de l'anticorps conjugué (Ac2):

A cette étape, nous avons introduit 100 µl de second anticorps dilué à 0,2 µg/mL dans une solution de 2% de *BSA*, 1% de *Tween 20* dans 97 ml de *PSB* par puits de la plaque *ELISA*, incubé pendant une heure à la température ambiante dans une chambre humide et lavé 3 fois dans du *PBS/Tween* (200 µl/puits) puis assécher avec du papier buvard.

II.7.6. L'ajout du substrat:

Nous avons introduit 100 µl de chromogène *TMB* par puits et incubé pendant 5 à 10 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière.

II.7.7. L'arrêt de la réaction et lecture des densités optiques (DO):

Pour terminer, nous avons arrêté la réaction colorée produite en ajoutant 50 µl d'acide sulfurique 1M et procédé à la lecture des densités optiques au spectrophotomètre (*MULTISKAN FC*) à 450 nanomètre (nm).

III. GESTION ET ANALYSE DES DONNEES

- Les données ont été enregistrées sur ordinateur à l'aide du logiciel *Excel 2007*,
- analysées à l'aide du logiciel *STATA version 10.0*.
- Les CI_{50} ont été calculées et les courbes tracées à l'aide du logiciel *IC₅₀ Estimator VERSION 1.2* (62,63).
- Pour la comparaison des valeurs de CI_{50} , nous avons utilisé le test de corrélation de Spearman (la valeur de $p < 0,05$ a été retenue comme seuil de significativité).

IV. RESULTATS

IV.1. Les caractéristiques de l'échantillon

Au total 187 isolats de *P. falciparum* ont été collectés chez des femmes enceintes sur une période de 12 mois allant de Août 2011 à Juillet 2012 sur l'ensemble des deux sites. Deux échantillons hémolysés ont été retirés et 5 échantillons dont les contrôles microscopiques n'ont révélé aucune croissance parasitaire n'ont pas été testés à l'*ELISA*. Ainsi donc 180 échantillons après culture ont été analysés à l'*ELISA* dont 151 étaient interprétables (Figure 8).

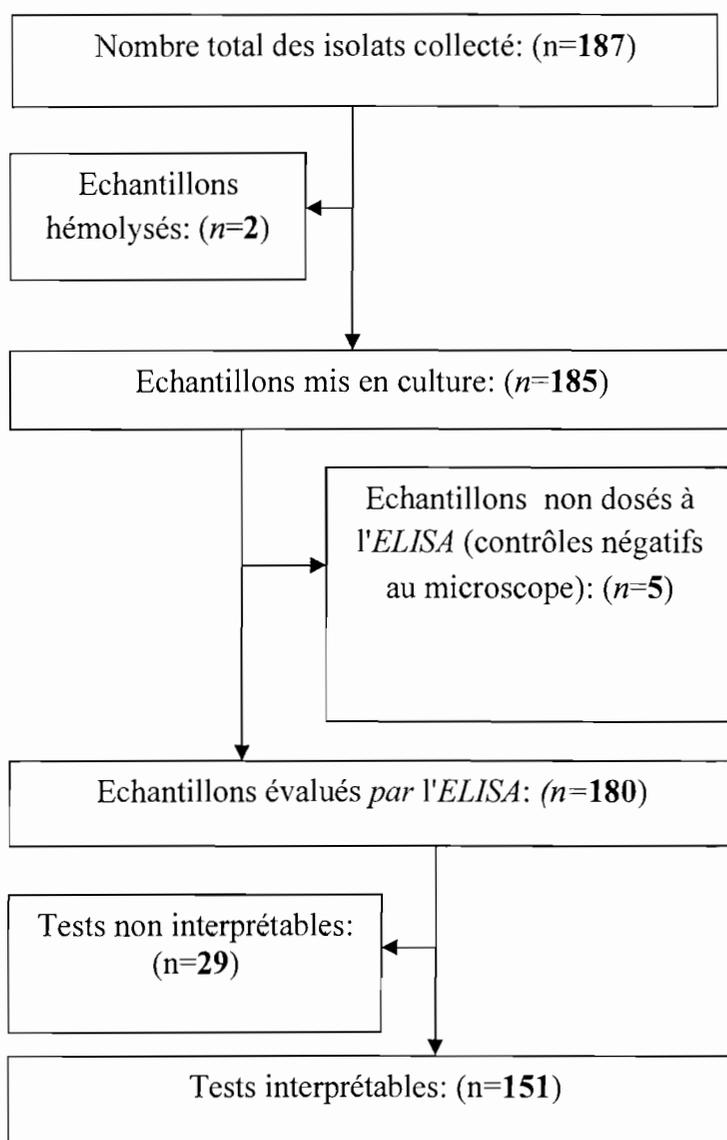


Figure 8: Profil des tests *in vitro* réalisés.

IV.2. La sensibilité aux antipaludiques in vitro (ex vivo)

IV.2.1. Les proportions (%) des tests interprétables

Les proportions des tests interprétables sont résumées dans le Tableau IV.

Pour la monodéséthylamodiaquine, la proportion des tests interprétables était de 81,32% au J0 et 80,89% aux jours de suivi. La luméfantrine avait sensiblement la même proportion de tests interprétables au J0 et aux jours de suivi.

Tableau IV: Proportion (%) des tests interprétables au Jour 0 et aux jours de recrudescence

Médicaments	Jour 0 n (%)	Jours de suivi +VNP n (%)
MDAQ	74 (81,32)	72 (80,89)
PIP	72 (79,12)	67 (75,28)
LUM	72 (79,12)	71 (79,77)
DHA	72 (79,12)	74 (83,74)
MQ	74 (81,32)	69 (77,52)

VNP: Visite Non Programmée

IV.2.2. La sensibilité aux différents médicaments

Les activités des antipaludiques ont été testées avec succès sur 146 isolats pour la MDAQ et la DHA, 137 isolats pour la PIP, 142 isolats pour la LUM, et 143 isolats pour la MQ.

Le tableau V ci-dessous présente la moyenne géométrique des CI50 selon l'antipaludique utilisé et la proportion des isolats résistants.

Tableau V: Sensibilité *in vitro* des antipaludiques

Médicaments	Nb d'isolats	CI50 (moyennes géométriques)	IC95%	Extrêmes Min - Max	Isolats résistants (%)
MDAQ	146	1,647	1,239 - 2,190	1 - 158,72	10 (6,9%)
PIP	137	5,231	4,335 - 6,312	0 - 70,56	0
LUM	142	1,725	1,249 - 2,382	0 - 122,19	0
DHA	146	1,361	1,096 - 1,691	0,11 - 10,2	0
MQ	142	1,319	0,978 - 1,780	0,02 - 111,13	13 (9,1%)

Valeurs seuils de résistance: MDAQ: CI50 \geq 60 nM (Ringwald *et al.*, 1999), MQ: CI50 \geq 30 nM (Brasseur *et al.*, 1990), DHA: CI50 \geq 12 nM (Basco & Le Bras, 1993), LUM: CI50 \geq 150 nM (Pradines *et al.*, 1999), Pip: CI50 \geq 80 nM (Basco & Ringwald, 2003).

Nous n'avons observé aucun cas de résistance pour la luméfantine, la pipéraquline et la DHA. Par contre nous avons pu observer 10 (6,9%) isolats résistants pour la MDAQ et 13 (9,1%) pour la méfloquine.

IV.2.3. La répartition des isolats selon leur degré de sensibilité

Le tableau VI présente les niveaux de sensibilité décroissante des isolats pour chaque médicament.

Tableau VI: Niveau de sensibilité des isolats de *P. falciparum* pour chaque antipaludique.

Molécules	Sensibilité: isolats (%)		
	Sensibles	Intermédiaires	Résistants
LUM	142 (99,30%)	1 (0,70%)	-
DHA	120 (82,19%)	26 (17,81%)	-
MQ	125 (87,41%)	5 (3,50%)	13 (9,09%)
PIP	139 (100%)	-	-
MDAQ	136 (93,15%)	-	10 (6,85%)

DHA: Isolat sensible : $CI_{50} < 6nM$, Isolat de sensibilité intermédiaire : $6nM < CI_{50} < 12nM$, Isolat de sensibilité diminuée : $CI_{50} > 12nM$ (64).

MQ: Isolat sensible: $CI_{50} < 15nM$, Isolat de sensibilité intermédiaire : $15nM < CI_{50} < 30nM$, Isolat de sensibilité diminuée: $CI_{50} > 30nM$ (64).

LUM: Isolat sensible: $CI_{50} < 100nM$, Isolat de sensibilité intermédiaire : $100nM < CI_{50} < 150nM$, Isolat de sensibilité diminuée: $CI_{50} > 150nM$ (65).

PIP: Isolat sensible: $CI_{50} < 80nM$, Isolat de sensibilité diminuée : $CI_{50} > 80nM$ (66).

MDAQ: Isolat sensible: $CI_{50} < 60nM$, Isolat de sensibilité diminuée : $CI_{50} > 60nM$ (67).

IV.2.4. La corrélation entre les résultats des CI_{50} des antipaludiques

La recherche de résistances croisées *in vitro* par le test de corrélation de Spearman entre les différents antipaludiques pris deux à deux est résumé dans le tableau VII.

Tableau VII: Corrélation entre les différents antipaludiques pris deux à deux.

		MDAQ	PIP	LUM	DHA	MQ
MDAQ	r	1				
	p-value					
PIP	r	-0.06	1			
	p-value	0.47				
LUM	r	0.17	0.066	1		
	p-value	0.040	0.45			
DHA	r	-0.019	0.017	0.28	1	
	p-value	0.81	0.84	0.0008		
MQ	r	0.41	-0.036	0.028	-0.0001	1
	p-value	<0.0001	0.67	0.74	0.98	

r = coefficient de corrélation de Spearman

Il existe une corrélation positive entre les valeurs des CI50 de certains médicaments pris deux à deux. Cette corrélation est significative entre la DHA et la LUM, entre la LUM et la MDAQ et en fin entre la MQ et la MDAQ.

V. Discussion

V.1. De la méthodologie

Cette étude de la sensibilité *in vitro* est une composante de l'étude multicentrique PREGACT.

Seul le site de Nanoro à été choisi pour les tests *in vitro* du fait que:

- ✓ les infrastructures pour la réalisation de ces tests étaient disponibles.
- ✓ L'équipe de Nanoro avait l'expérience des tests de sensibilité *in vitro* aux antipaludiques plus particulièrement avec le micro-test isotopique.

V.2. De la technique utilisée

Les tests *in vitro* permettent d'étudier simultanément la sensibilité de *P. falciparum* à plusieurs antipaludiques en faisant abstraction des facteurs liés au patient comme l'immunité naturellement acquise, l'état nutritionnel, l'observance du traitement et la pharmacocinétique du médicament. Ils sont cependant chers et complexes à mettre en œuvre car nécessitant des infrastructures importantes, du personnel qualifié et spécialisé et des parasites vivants. Ce dernier implique des délais courts de réalisation des tests après le prélèvement des souches et le respect de règles strictes de biosécurité. Par ailleurs, leurs résultats n'ont pas toujours été corrélés aux résultats des tests *in vivo* et ne sont pas toujours reproductibles d'une équipe à l'autre en raison de différences entre les techniques et les protocoles utilisés. Pour ces raisons, les tests *in vitro* sont utilisés pour la surveillance de la chimiosensibilité mais n'ont pas d'utilité en clinique.

La technique de l'ELISA que nous avons utilisée dans cette étude est une première expérience pour notre équipe. En effet, jusqu'à nos jours nous avons toujours utilisé la technique isotopique (68). Comparée à la technique isotopique, la technique ELISA comporte des avantages dont ceux liés à sa facilité de réalisation et à son faible coût économique car ne nécessitant pas de compteur bêta (69,70). De plus, notre technique utilisée ne génère pas des déchets radioactifs comme dans la technique isotopique.

V.3. Des résultats obtenus

Les taux de tests interprétables rapportés dans notre étude étaient inférieurs à ceux rapportés par Tinto et *al.* au Rwanda (71) et Nsobya et *al.* en Ouganda (72). En effet Tinto rapportait 83% de tests interprétables pour chaque médicament testé, alors que Samuel rapportait 86% de tests interprétables pour la MDAQ, 83% pour la luméfantrine, et 88% pour la DHA. Ces faibles taux de tests interprétables dans notre étude comparés à ceux rapportés par Tinto et Nsobya pourrait s'expliquer par l'inclusion de patients ayant au moins 2500 parasites/ μ l de sang plutôt que 4000 parasites/ μ l de sang comme valeur recommandée dans notre étude. Un taux nettement plus élevé aurait pu être obtenu si nous avions inclus toutes nos patientes sur la base de 4000 parasites/ μ l de sang.

Nos taux étaient, cependant plus élevés que ceux rapportés par Offianan et *al.* en Côte d'Ivoire (73) et Makthar au Sénégal (74). En effet, Offianan rapportait des taux plus faibles de tests interprétables de 60 % pour l'artésunate et Makthar retrouvait un taux de 45 % pour l'amodiaquine avec le microtest isotopique. Le fait de mettre nos parasites en culture dans un délai maximum de 6 heures pourrait expliquer le meilleur taux de tests interprétables obtenu dans notre étude comparé à ceux rapportés par ces deux études.

Quelle que soit la technique utilisée, ces différents taux de succès indiquent que la culture *in vitro* de *P. falciparum* reste un test très délicat dont la réussite dépend de plusieurs facteurs difficiles à maîtriser, notamment la maturation des schizontes, les contaminations, la qualité de la chaîne de froid, la densité parasitaire et le délai entre la collecte des échantillons et leur mise en culture.

V.3.1. De la résistance de *P. falciparum* à la MDAQ

Le faible taux de résistance à la monodéséthylamodiaquine, métabolite actif de l'amodiaquine montre qu'elle garde toujours une bonne efficacité dans la zone de Nanoro. Cela vient corroborer le bon choix du PNLP avec la combinaison AS+AQ comme combinaison de 1^{er} choix pour le traitement du paludisme simple.

Nos résultats sont comparables à ceux d'autres études réalisées en Afrique qui ont rapporté des taux de résistance à la monodéséthylamodiaquine compris entre 2 et 7% (71,75–77)

Par contre, ils diffèrent de ceux de Ringwald P et *al.* en 1995 au Cameroun qui rapportaient une résistance de 28% à la MDAQ avec une moyenne géométrique de la CI50 de 17,3 nM (78). De même en 2006, une étude d'efficacité couplée *in vivo* et *in vitro* effectuée au Kenya (79) a montré un taux de résistance de 26% (17/66) à la MDAQ. Une autre étude menée en Ouganda en 2008 (72), utilisant la même méthode que la nôtre, a rapporté un taux de résistance de 21,3% (13/61) en prenant une CI50 \geq 60 nM comme valeur seuil de résistance.

Tous ces résultats montrent l'existence d'une résistance *in vitro* à la MDAQ dans la région africaine. Toutefois son niveau réel reste encore à déterminer. En effet, certains auteurs soutiennent que si la valeur seuil de résistance de 60 nM est maintenue, cette résistance tourne autour de 7% (71,76,77). Par contre lorsqu'une valeur limite de résistance plus faible (25 nM) est admise, la résistance à la MDAQ serait plus élevée (66,71,80) et cette situation pourrait compromettre l'efficacité des ACT contenant l'amodiaquine comme médicament partenaire. Cependant dans notre étude, même si l'on ramenait le seuil de résistance à 25 nM, le taux de résistance reste le même. Face à cette situation nous suggérons que des études d'efficacité *in vivo* et de biologie moléculaire soient effectuées pour que leurs résultats puissent être corrélés à ceux des tests *in vitro* afin de dégager une valeur seuil de résistance standard validée pour cette molécule.

V.3.2. De la résistance de la MQ

Dans notre étude, nous avons observé un taux de résistance de 9,1% (13/143) à la méfloquine avec une moyenne géométrique des CI50 de 1,31 nM. En 1988 à Bobo-Dioulasso, Ouédraogo J.B. et *al.*, avaient observé une diminution de la sensibilité d'une souche sur 23 avec une CI50 de 36 nM à cette molécule (12). En 1995, Pradines B et *al.*, ont rapporté un taux de résistance de 22% au Sénégal (81). En 2000, Tinto et *al.*, ont rapporté une bonne sensibilité de la MQ à 232 isolats avec une moyenne géométrique de la CI50 de 5,4 nM (valeurs extrêmes: 0,35 - 27,5 nM/l).

D'autres études beaucoup plus récentes réalisées dans la sous-région et notamment en Côte d'Ivoire ont rapporté des résultats comparables aux nôtres, à savoir 15,2% de résistance (80). La méfloquine est l'une des trois molécules utilisées en prophylaxie pour les voyageurs. Des essais cliniques se poursuivent actuellement pour évaluer son efficacité comme alternative pour le Traitement Préventif Intermittent (TPI) chez les enfants et les femmes enceintes. La combinaison AS+MQ utilisée en Asie reste très peu utilisée au Burkina Faso. En dépit de sa faible utilisation comparativement aux autres antipaludiques, la méfloquine présente tout de même une baisse de la sensibilité. Ceci pourrait être lié à un phénomène naturel d'une part (82). D'autre part, la méfloquine possède des similarités structurales avec les antipaludiques de type quinoléine (quinine, amodiaquine et chloroquine). Ainsi une résistance de *P. falciparum* à ces anciennes molécules pourrait induire une augmentation de la CI50 de la MQ et même compromettre son efficacité. Cela est confirmé par la corrélation positive statistiquement significative que nous avons rapportée dans notre étude entre ce médicament et la MDAQ.

V.3.3. De la sensibilité de la DHA

Pour cette molécule appartenant à une nouvelle classe d'antipaludiques à base d'artémisinine, nous avons observé que tous les isolats testés étaient sensibles avec une moyenne géométrique de 1,36 nM. Cela confirme les résultats rapportés par la plupart des études réalisées en Afrique qui ont montré une sensibilité élevée à l'artémisinine. En effet en 2006, Tinto H et *al.* ont rapporté que cette molécule était la plus active parmi quatre molécules testées au Rwanda

avec une moyenne géométrique des CI50 de 2,6 nM (71). Cette valeur est légèrement plus élevée que la nôtre. Cette différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par la différence des techniques utilisées. A cela il faut ajouter la variabilité du phénomène de la chimiorésistance dans le temps et dans l'espace.

Nos résultats sont comparables à ceux de Bonkian Léa en 2007 à Bobo-Dioulasso qui avait rapporté une moyenne géométrique des CI50 de 1,5 nM (83). Une autre étude menée en Ouganda donnait une moyenne de 0,55 nM (72).

Au vue de tous ces résultats nous pensons que malgré qu'une baisse de la sensibilité à cette molécule soit constatée en Asie du Sud-est (19–21), elle présente toujours une bonne activité *in vitro* sur les souches de *P. falciparum* dans notre sous-région.

V.3.4. De la sensibilité de la PIP et de la LUM

Pour ces deux molécules entrant dans la composition des ACT, nous n'avons constaté aucune résistance. Les moyennes géométriques des CI50 étaient de 5,23 nM et de 1,72 nM pour la PIP et la LUM respectivement.

Des études déjà réalisées utilisant la méthode isotopique pour la plupart, ont révélé une bonne sensibilité *in vitro* des souches de parasites à la LUM: 11,9 nM au Cameroun (84) et 7,3 nM en France (souches importées)(85). Ces résultats bien que différents des nôtres, montrent tout de même une bonne activité *in vitro* de la LUM.

Pour la PIP, des résultats antérieurs indiquaient des concentrations inhibant 50% la croissance parasitaire (IC50) *in vitro* comprises entre 7,8 et 78,3 nM (66). Sur des souches importées de 19 pays africains (y compris le Burkina Faso), l'Inde et la Thaïlande, Pascual et *al.* ont trouvé en France des valeurs de CI50 comprises entre 11,8 nM et 217,3 nM (moyenne géométrique = 66,8 nM) pour la PIP (85). La variation des valeurs des CI50 est probablement due à une différence de susceptibilité des souches et des conditions expérimentales. Une autre étude réalisée en 2008 en Ouganda, utilisant la même méthode que la nôtre, a rapporté une moyenne géométrique des CI50 de 0,51 nM pour la LUM et 6,1 nM pour la PIP (72). Ces données sont superposables aux nôtres malgré la différence de zone géographique.

V.3.5. De la résistance croisée (poly chimiorésistance)

Dans notre étude nous avons observé une corrélation significative entre les valeurs de CI50 des antipaludiques.

1. Entre la DHA et la LUM,
2. Entre la LUM et la MDAQ,
3. Entre la MQ et la MDAQ.

1. Entre la DHA et la LUM: nous avons observé une corrélation positive entre les réponses à la dihydroartémisinine et à la luméfantine ($r = 0,28$; $p = 0,0008$). Cela signifie que 28% de la variation dans la réponse à la DHA pourrait s'expliquer par la variation dans la réponse à la LUM (85). La corrélation significative est en désaccord avec celle constatée par Nsohya et *al.* en 2008 ($r = 0,018$; $p = 0,80$) en Ouganda. Par contre nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Pascual et *al.*, 2012 ($r = 0,18$; $p < 0,00001$). Pour suggérer qu'un mécanisme d'action identique à deux molécules puissent induire une résistance croisée, le coefficient de corrélation doit être assez élevé ($r \geq 0,60$) (85). Nos données suggèrent qu'il n'existe pas de résistance croisée entre ces deux molécules ($r = 0,18$); de plus tous les isolats étaient sensibles à ces deux antipaludiques.

2. Entre la LUM et la MDAQ: nos résultats indiquent l'existence d'une faible corrélation entre la LUM et la MDAQ ($r = 0,17$; $p = 0,040$). Ces valeurs sont si faibles qu'elles ne pourraient expliquer l'existence d'une résistance croisée. Cette constatation rejoint celle de Nsohya et *al.*, 2010 et de Pascual et *al.*, 2012.

3. Entre la MQ et la MDAQ: entre ces deux molécules, nous avons observé une corrélation assez forte ($r = 0,41$; $p < 0,0001$) comparativement aux autres couples d'antipaludiques. Peu de données existent sur la corrélation entre ces deux antipaludiques. Nos résultats ne concordent pas avec ceux de Pascual et *al.* ($r = 0,014$; $p = 0,030$). Comme ces deux molécules sont tous lysosomotrophes, nos résultats pourraient signifier l'existence d'une résistance croisée du fait de leur mécanisme d'action commun.

VII. RECOMMANDATIONS

Pour contrôler le phénomène de la résistance aux antipaludiques, nous recommandons:

Au Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP)

- la mise en place d'une campagne de sensibilisation de nos populations sur la gravité du phénomène de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques et surtout les causes liées aux comportements tels que la non observance au traitement, l'auto médication et l'utilisation des médicaments de la rue.
- Promouvoir la conduite régulière d'études sur la surveillance de l'efficacité des antipaludiques d'usage courant au Burkina Faso.

Aux partenaires bilatéraux et multilatéraux:

Consolider et assurer un engagement durable des soutiens financier et technique dans la lutte contre le paludisme à travers un financement conséquent de la recherche sur les nouveaux antipaludiques.

A la population générale:

Utiliser davantage les services de santé qui sont de plus en plus accessibles en consultant dès l'apparition des premiers signes afin de contribuer à faire baisser la pression médicamenteuse pourvoyeuse de résistance.

VI. CONCLUSION

La susceptibilité de 181 isolats de *P. falciparum* de la zone de Nanoro a été testée sur cinq antipaludiques (LUM, MQ, MDAQ, PIP et DHA) entrant dans la composition des ACT par la méthode colorimétrique HRP2 ELISA double-sandwich. Les résultats de cette étude indiquent que les souches de *P. falciparum* de la zone de Nanoro présentent une bonne sensibilité à la dihydroartémisinine, à la luméfántrine et à la pipéraqúine. On observe par contre une résistance de 6,85% à la monodéséthylamodiaquine et 9,09% à la méfloquine. Une corrélation significative existe entre les réponses des couples d'antipaludiques DHA/LUM, LUM/MDAQ et MQ/MDAQ. Même si une baisse de la sensibilité de *P. falciparum* aux dérivés à base d'artémisinine a été constatée en Asie du Sud-Est, cela n'est pas le cas pour la dihydroartémisinine dans notre zone d'étude. Toutefois, la sensibilité *in vitro* de ces différentes molécules doit être continuellement évaluée.

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hay SI, Guerra CA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ et al. A World Malaria Map: *Plasmodium falciparum* Endemicity in 2007. *PLoS Medicine*. 2009;6(3):0286–302.
2. Joel G. Breman, Anne M, Robert W. Snow et al. Disease Control Priorities in Developing Countries. *Conquering Malaria*. 2005. p. 413–31.
3. Tiono AB, Ouedraogo A, Bougouma EC, Diarra A, Konaté AT, Nébié I, et al. Placental malaria and low birth weight in pregnant women living in a rural area of Burkina Faso following the use of three preventive treatment regimens. *Malaria journal*. 2009 Jan;8(224):1–8.
4. OMS. Statistiques sanitaires mondiales. 2013. p. 1–172.
5. OMS. Statistiques sanitaires mondiales. 2012. p. 1–180.
6. Nchinda TC. Malaria: a reemerging disease in Africa. *Emerging infectious diseases*. 1998;4(3):398–403.
7. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *NATURE*. 2002;415(7):680–5.
8. PNL, PSLP. Plan stratégique 2006-2010 de lutte contre le paludisme au Burkina Faso. 2010. p. 1–53.
9. Ministère de la Santé, Burkina Faso. Bulletin d'épidémiologie et d'information sanitaire. Quatrième trimestre 2011. p. 1–16.
10. Gentilini M, Duflo B, Danis M, Lagardere B, Richard-Lenoble D et al. Maladies parasitaires : le paludisme. *Méd. Trop*. 1986. p. 81–107.
11. Guiguemdé TR, Gbary AR, Ouedraogo JB, Gaybor A, Lamizana L, Maïga AS et al. Point actuel sur la chimiorésistance du paludisme des sujets autochtones dans les états de l'OCCGE (Afrique de l'Oest). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop*. 1991;71:199–207.
12. Ouédraogo JB, Guiguemdé TR GA. Surveillance passive de la chimiosensibilité palustre à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Médecine d'Afrique Noire*. 1990;37(5):261–4.
13. Bamba S, Tinto H, Drabo M, Sangaré I, Zida A, Gaye O, et al. Etude de la résistance *in vitro* de *plasmodium falciparum* aux antipaludiques et relation avec la mutation pfmdr1 N86Y a Bobo Dioulasso au Burkina Faso. *Dakar Med*. 2011;56(2):294–302.
14. Tinto H, Sanou B, Erhart A, D'Alessandro U, Ouédraogo JB, Guiguemde TR, et al. Sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine dans la région de Bobo-Dioulasso (1998-2001): étude des facteurs de risques associés aux échecs thérapeutiques de ces deux médicaments. *Bull Soc Pathol Exot*. 2006;99(2).
15. Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Dokomajilar C, Lankoande M, Ouedraogo J, et al. Amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and combination therapy for uncomplicated falciparum malaria : a randomized controlled trial from burkina faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2005;73(5):826–32.

16. Tinto H, Ouédraogo JB, Zongo I, Van Overmeir C, Van Marck E, Guiguemdé TR, et al. Sulfadoxine-pyrimethamine efficacy and selection of *Plasmodium falciparum* DHFR mutations in Burkina Faso before its introduction as intermittent preventive treatment for pregnant women. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007 Apr;76(4):608–13.
17. OMS. L'utilisation des antipaludiques. Rapport d'une consultation informelle de l'OMS. 2001;1–156.
18. PNLP. Nouvelles politiques nationales de prise en charge du paludisme au Burkina Faso. 2005.
19. Noedl H, Se Y, Schaecher K et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *The New England journal of medicine.* 2008 Dec 11;359(24):2619–20.
20. Chansuda Wongsrichanalai, Steven R Meshnick. Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerging infectious diseases.* 2008 May;14(5):716–9.
21. Na-Bangchang K, Ruengweerayut R, Mahamad P, Ruengweerayut K, Chaijaroenkul W et al. Declining in efficacy of a three-day combination regimen of mefloquine-artesunate in a multi-drug resistance area along the Thai-Myanmar border. *Malaria journal.* 2010 Jan;9:273.
22. Charneau S. Approches moléculaires des mécanismes mis en jeu en fin de schizogonie intraérythrocytaire de *Plasmodium falciparum* (agent du paludisme) par Hybridation soustractive suppressive et Puce à ADN. Thèse de doctorat en Biologie Moléculaire et Cellulaire des . 2005. p. 1–185.
23. WHO. Basic MALARIA MICROSCOPY. Second edition. Part I. Learner's guide. 2010.
24. Bannistera LH, Hopkinsa JM, Fowlerb RE , Krishnac S, Mitchellb GH et al. A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stages. *Parasitology Today.* 2000;16(10):427–33.
25. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O BM, Hyman RW, Carlton JM, Pain AN et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *NATURE.* 2002;419:498–511.
26. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm>.
27. IFMT MS Paludisme 2011. Infection humaine à *Plasmodium knowlesi*. 2011;1–10.
28. Carnevale P, Robert V. Les anophèles. Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. *IRD.* 2009. p. 1–402.
29. Laudenbach V, Mantz J DJ. Comprendre la biologie moléculaire. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation. Elsevier;* 18(7):725–47.
30. OMS. Directives pour le traitement du paludisme – Deuxième édition. 2009. p. 1–219.
31. PNLP. Directives nationales pour la prise en charge du paludisme dans les formations sanitaires au Burkina Faso. 2010.
32. Stephen M Todryk And. Malaria vaccines: the stage we are at. Nature reviews. *Microbiology.* Nature Publishing Group; 2007 Jul;5(7):487–9.

33. Schwartz L, Brown G V, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malaria Journal*. BioMed Central Ltd; 2012;11(1):11.
34. GSK, Malaria Vaccine Initiative, Bill & Melinda Gates Foundation. Le candidat vaccin antipaludique *RTS, S*. www.malariavaccine.org. 2004;12-4.
35. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, et al. Efficacy of the *RTS,S/AS02A* vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;364(9443):1411-20.
36. Sacarlal J, Aide P, Aponte JJ, Renom M, Leach A, Mandomando I, et al. Long-term safety and efficacy of the *RTS,S/AS02A* malaria vaccine in Mozambican children. *The Journal of infectious diseases*. 2009 Aug 1;200(3):329-36.
37. Bejon P, Lusingu J, Olotu A, Leach A, Lievens M, Vekemans J et al. Efficacy of *RTS,S/AS01E* Vaccine against Malaria in Children 5 to 17 Months of Age. *The New England Journal of Medicine*. 2008;359(24):2521-32.
38. Olotu A, Lusingu J, Leach A, Lievens M, Vekemans J, Msham S, et al. Efficacy of *RTS,S/AS01E* malaria vaccine and exploratory analysis on anti-circumsporozoite antibody titres and protection in children aged 5-17 months in Kenya and Tanzania: a randomised controlled trial. *The Lancet infectious diseases*. Elsevier Ltd; 2011 Feb;11(2):102-9.
39. Agnandji ST, Asante KP, Lyimo J, Vekemans J, Soulanoudjingar SS, Owusu R, et al. Evaluation of the safety and immunogenicity of the *RTS,S/AS01E* malaria candidate vaccine when integrated in the expanded program of immunization. *The Journal of infectious diseases*. 2010 Oct 1;202(7):1076-87.
40. The *RTS SCTP*. First Results of Phase 3 Trial of *RTS,S/AS01* Malaria Vaccine in African Children. *The New England Journal of Medicine*. 2011;365(20):1863-75.
41. The *RTS SCTP*. A Phase 3 Trial of *RTS,S/AS01* Malaria Vaccine in African Infants. *The New England Journal of Medicine*. 2012;367(24):2284-95.
42. Joel Täarning. Piperaquine: Bioanalysis, drug metabolism and pharmacokinetics. 2007. p. 1-61.
43. Davis TM, Hung TY, Sim IK, Karunajeewa HA, Ilett KF et al. Piperaquine: a resurgent antimalarial drug. *Drugs*. 2005;65(1):75-87.
44. Duraisingh MT, Cally R, David W, David C Warhurst et al. Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*. 2000;36(4):955-61.
45. OMS. Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS, Genève. *Série de Rapports techniques*. 1973;No 529.
46. Bruce-Chwatt LJ. Chemotherapy of Malaria. Second edition. Geneva: World Health Organization, *Monograph Series*. No. 27. *World Health Organization*; 1986;261.
47. Touze JE, Fourcade L, Pradines B, Hovette P, Paule P, Heno PH et al. Les modes d'action des antipaludiques. Interet de l'association atovaquone-proguanil. *Med Trop*. 2002;62(3):219-24.

48. William Trager and James B Jensen. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *SCIENCE*. 1976;193(August):673–5.
49. Le Bras J and Deloron P. *In vitro* study of drug sensitivity of *P. falciparum*: Evaluation of new semi-microtests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983;32(3):447–51.
50. Desjardin RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD et al. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution Technique. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 1979;16(6):710–8.
51. Elabbadi N, Ancelin ML and, Vial HJ. Use of radioactive ethanolamine incorporation into phospholipids to assess *in vitro* antimalarial activity by the semiautomated microdilution technique. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 1992 Jan;36(1):50–5.
52. Gluzman I Y, Krogstad D J, Orjih A U, Nkangineme K, Wellems T E, Martin J T and SP. A rapid *in vitro* test for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1990;42(6):521–6.
53. WHO. *In vitro* micro-test (MARK III) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine , mefloquine , quinine , artemisinin. Instructions for use of the *in vitro* micro-test kit (MARK III) World Health Organisation. 2001. p. 1–21.
54. Makler M T. & David J H. Measurement activity of the lactate dehydrogenase of Plasmodium assessment of parasitemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993;48(2):205–10.
55. Druilhe P, Moreno A, Blanc C, Brasseur PH, Jacquier P et al. A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001;64((5, 6)):233–41.
56. Brasseur P, Agnamey P, Moreno A, Druilhe P, et al . Evaluation de la sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* aux antimalariques par un test colorimétrique (DELI-microtest). *Med. Trop.* 2001;61(6):545–7.
57. E.M.A. Co, Johnson SM, Murthy T, Talwar M, Hickman MR, Johnson JD et al. Recent Methods in Antimalarial Susceptibility Testing. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. 2010 Jul 1;9(3):148–60.
58. Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C et al. Histidine-Rich Protein II : a Novel Approach to Malaria Drug Sensitivity Testing. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*,. 2002;46(6):1658–64.
59. Russell JH, Uni S, Aikawa M, Aley SB, Leech JH, Lew AM et al. Secretion of a Malarial Histidine-rich Protein (Pf HRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected Erythrocytes. *Journal of Cell Biology*. 1986;103(October):1269–77.
60. Parra ME, Evans CB, Taylor DW. Identification of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in the plasma of humans with malaria. *Journal of clinical microbiology*. 1991 Aug;29(8):1629–34.
61. Zon H. 11.1 situation et stratégies de lutte contre le paludisme au burkina faso. *Paludisme*. 2002;189–202.

62. Le Nagard H, Vincent C, Mentré F, Le Bras J et al. Online analysis of *in vitro* resistance to antimalarial drugs through nonlinear regression. *computer methods and programs in biomedicine*. 2011;104:10–8.
63. Kaddouri H, Nakache S, Houzé S, Mentré F, Le Bras J et al. Assessment of the Drug Susceptibility of *Plasmodium falciparum* Clinical Isolates from Africa by Using a Plasmodium Lactate Dehydrogenase Immunodetection Assay and an Inhibitory Maximum Effect Model for Precise Measurement of the 50-Percent Inhibitory Conc. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 2006;50(10):3343–9.
64. Legrand E, Lise M, Damien D, Nicolle G. CNR Chimiorésistance du Paludisme région Antilles-Guyane. Rapport d'activités annuel 2011. Réseau International des Instituts Pasteur. 2011;26–39.
65. Pradines B, Tall A, Fusai T, Spiegel A, Hienne R, Rogier C, et al. *In Vitro* Activities of Benflumetol against 158 Senegalese Isolates of *Plasmodium falciparum* in Comparison with Those of Standard Antimalarial Drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(2):418–20.
66. Basco LK and Ringwald P. In Vitro Activities of Piperaquine and Other 4-Aminoquinolines against Clinical Isolates of *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(4):1391–4.
67. Pascal Ringwald, Jean Bickii and LKB. *In vitro* activity of dihydroartemisinin against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde, Cameroon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999 Aug;61(2):187–92.
68. Tinto H, Ouedraogo JB, Traoré B, Coulibaly SO, Guiguemde TR, et al . Étude de la sensibilité *in vitro* de 232 isolats de *Plasmodium falciparum* aux antipaludéens au Burkina Faso (Afrique de l'Ouest). *Bull Soc Pathol Exot*. 2000;94, 2 bis(1):188–91.
69. Noedl H, Wongsrichanalai C, Walther HW et al. Malaria drug-sensitivity testing : new assays , new perspectives. *TRENDS in Parasitology*. 2003;19(4):175–81.
70. Noedl H, Attlmayr B, Wernsdorfer WH, Kollaritsch H, Miller RS. A histidine-rich protein 2-based malaria drug sensitivity assay for field use. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004 Dec;71(6):711–4.
71. Tinto H, Rwagacondob C, Karemab C, Mupfasonib D, Vandorenb W, Rusanganwac E et al. *In vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to monodesethylamodiaquine, dihydroartemisinin and quinine in an area of high chloroquine resistance in Rwanda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006 Jun;100(6):509–14.
72. Nsohya SL, Moses K, Nanyunja S, Joloba M, Greenhouse B, Rosenthal PJ, et al . *In vitro* sensitivities of *Plasmodium falciparum* to different antimalarial drugs in Uganda. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010 Mar;54(3):1200–6.
73. Offianan TA, Penali LK, Ronan J, Tanoah KT, Sarr D, Grah EB et al. Sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à la quinine, l'artésunate et la chloroquine à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Cahiers Santé*. 2008;18(n° 1.):43–7.

74. Makthar N. Analyse de la diversité des gènes impliqués dans la résistance aux artesunates. Thèse de 3ème cycle de biologie animale, Dakar. 2005.
75. Lingani M. Etude couplée *in vivo/in vitro* de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à l'artéméther-luméfántrine et à l'artésunate+amodiaquine en milieu urbain de Bobo-Dioulasso. Thèse de médecine. 2011;n° 194.
76. Pradines B, Hovette P, Fusai T et al. Prevalence of *in vitro* resistance to eleven standard or new antimalarial drugs among *Plasmodium falciparum* isolates from Pointe-Noire, Republic of the Congo. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Jul;44(7):2404–8.
77. Parola P, Pradines B, Simon F et al. Antimalarial Drug Susceptibility and Point Mutations Associated with Drug Resistance in 248 *Plasmodium falciparum* Isolates Imported from Comoros to Marseille , France in 2004 – 2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007;77(3):431–7.
78. Pascal Ringwald, JEAN Bickii, Léonardo K. Basco et al. *In vitro* activity of antimalarials against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaoundé, CAMEROON. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996;55(3):254–8.
79. Sasi P, Abdulrahman, Mwai L, Muriithi S, Straimer J, Schieck E et al. *In vivo* and *in vitro* efficacy of amodiaquine against *Plasmodium falciparum* in an area of continued use of 4-aminoquinolines in East Africa. *The Journal of infectious diseases*. 2009 Jun 1;199(11):1575–82.
80. Yavo W, Bla KB , Djaman AJ , Assi SB, Basco LK, Mazabraud A, Koné M et al. *In vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to monodesethylamodiaquine , quinine , mefloquine and halofantrine in Abidjan (Côte d ' Ivoire). *African Health Sciences*. 2010;10(2):111–6.
81. Pradine B, Rogier T, Fusala, Tall J, Doury E J-C. Sensibilité *in vitro* de 85 isolats de *Plasmodium falciparum* dans la région de Fatick, Sénégal. *Médecine Tropicale*. 1996;56(2):141–6.
82. Guiguemdé TR, LE Bras J, Baudon D, Ouedraogo JB, Gbary AR, Douchet C. Baisse de la sensibilité et résistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique de l'Ouest. *Publications médicales africaines*. 1988;N°91 bis:25–32.
83. Bonkian LN. Étude *in vitro* et analyse moléculaire de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques dans la ville de Bobo Dioulasso. Thèse de pharmacie n°, 2007. Université de Ouagadougou. *UFR/SDS*;
84. Léonardo K. Basco, Jean Bickii, and Pascal Ringwal. *In Vitro* Activity of Lumefantrine (Benflumetol) against Clinical Isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde ´ , Cameroon. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998;42(9):2347–51.
85. Pascual A, Parola P, Françoise B-V, Simon F, Malvy D, Picot S et al. *Ex vivo* activity of the ACT new components pyronaridine and piperazine in comparison with conventional ACT drugs against isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*. BioMed Central Ltd; 2012;11(1):45.
86. WHO. Bench aids for malaria diagnosis. 2000. p. 1–12.

IX. ANNEXES

Annexe 1. Fiche de travail pour culture in vitro

Date..... Site d'étude.....

Numéro d'inclusion.....

Initiales..... Age.....

Poids.....

Jour de visite.....

Prophylaxie antipaludique.....

Traitement avant prélèvement.....

Densité parasitaire...../ µl de sang

Espèce plasmodiale.....

Prélevé sur EDTA le.....Heure.....

Parasitémie après lavage par RPMI...../µl de sang

Nombre de champs de lecture.....

Dilution.....Densité parasitaire après dilution/µl de sang

Médicaments étudiés :

Monodéséthylamodiaquine	/_ /	Méfloquine	/_ /
Quinine	/_ /	DHA	/_ /
Chloroquine	/_ /	Pipéraquline	/_ /
Luméfántrine	/_ /	Arthésunate	/_ /

Heure d'incubation.....

Contrôle microscopique le.....

Plaque congelée le.....

ELISA effectué le.....

Annexe 2. Drug dilutions HRP2 assay

CQ Mr 515.87 Stock concentration: 1 mg/l

Needed: 3200 -12,5 ng/ml

Add to 1953 µl water or medium 50 µl stock (1 mg/ml)

Concentration in the plate: use in dry assay 3200 ng/ml - 6208 nM

use in wet assay 2800 ng/ml - 5432 nM

DHA Mr 284.35 Stock concentration: 1 mg/l

Needed: 64 – 0,25 ng/ml

Add to 9765,6 µl water or medium 5 µl stock (1 mg/ml)

Concentration in the plate: use in dry assay 64 ng/ml – 154 nM

use in wet assay 56 ng/ml - 134 nM

PIP Mr 999,56 Stock concentration: 1 mg/l

Needed: 1600 – 6,25 ng/ml

Add to 3850 µl water or medium 50 µl stock (1 mg/ml)

Concentration in the plate: use in dry assay 1600 ng/ml – 1600 nM

use in wet assay 1424 ng/ml - 1424 nM

DAQ Mr 332,82 Stock concentration: 1 mg/l

Needed: 639 – 1,24 ng/ml

Add to 4890 µl water or medium 25 µl stock (1 mg/ml)

Concentration in the plate: use in dry assay 639 ng/ml – 206 nM

use in wet assay 568 ng/ml - 189 nM

MQ Mr 414,77 concentration: 1 mg/l

Needed: 360 – 0,7 ng/ml

Add to 8650 µl water or medium 25 µl stock (1 mg/ml)

concentration in the plate: use in dry assay 343 ng/ml – 142 nM
use in wet dry assay 305 ng/ml - 127 nM

Q Mr 396,91 concentration: 1 mg/l

Needed: 3472 – 6,8 ng/ml

Add to 3600 µl water or medium 100 µl stock (1 mg/ml)

concentration in the plate: use in dry assay 3472 ng/ml – 1378 nM

use in wet assay 3086 ng/ml - 1225 nM

ART Mr 384,425 concentration: 1 mg/l

Needed: 76,88 – 0,075 ng/ml

Add to 8130 µl water or medium 5 µl stock (1 mg/ml)

concentration in the plate: use in dry assay 76,87 ng/ml – 29,55 nM

use in wet assay 68,33 ng/ml - 26,27 nM

MDAQ Mr 461 concentration: 1 mg/l

Needed: 148,8 – 0,129 ng/ml

Add to 8390 µl water or medium 10 µl stock (1 mg/ml)

concentration in the plate: use in dry assay 148,8 ng/ml – 68,6 nM

use in wet assay 132,28 ng/ml - 61 nM

LUM Mr 528,95 concentration: 1 mg/l

Needed: 169,26 ng/ml

Add to 7340 µl water or medium 10 µl stock (1 mg/ml)

concentration in the plate: use in dry assay 170 ng/ml – 321 nM

use in wet assay 152 ng/ml – 287,3 nM

Annexe 3. Principe de la technique ELISA

Principe de la technique ELISA

ETAPES	REACTION POSITIVE	TEMOIN NEGATIF
① <i>Coating</i> : fixation des anticorps sur la microplaque		
② Echantillon : incubation de l'extrait d'antigènes		
③ Lavage : 4 fois avec un tampon de lavage		
④ Conjugué : incubation avec les anticorps conjugués à l'enzyme		
⑤ Lavage : 4 fois avec un tampon de lavage		
⑥ Substrat : une réaction colorée indique la présence d'un échantillon positif		

Légende



Anticorps de capture



Antigène spécifique recherché



Substrat de l'enzyme



Anticorps conjugué à l'enzyme



Antigènes quelconques présents dans l'extrait végétal

Annexe 4. Figure: étapes de réalisation de la méthode in vitro ELISA HRPII

