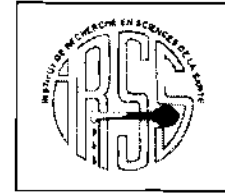


**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO
BOBO DIOUASSO**

Institut du Développement Rural



**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE**

Institut de Recherche en Sciences
de la Santé

MEMOIRE

Présenté par :

Yves Yacouba SERE
Maître es Biochimie-Microbiologie Appliquée

Pour l'obtention du :

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

Sur le Thème :

**ETUDE DE LA RELATION ENTRE LA MUTATION GENETIQUE
Pfmdr1-Y184F ET LA CHIMIORESISTANCE DE *PLASMODIUM
falciparum* A L'AMODIAQUINE**

Soutenu le 05 février 2007, devant le Jury :

Président : Pr Hamidou BOLY

Membres : Pr Jean Bosco OUEDRAOGO

Pr Georges Anicet OUEDRAOGO

Dédicace

di 11
1115
50 R

À mes très chers parents

Je ne saurai expliquer combien immense a toujours été votre amour pour moi. Puisse Dieu combler vos attentes.

À ma sœur et à mes frères

Vous m'avez toujours fait preuve d'amour et de compréhension; que l'Éternel nous garde toujours unis.

À tout ceux qui ont contribué à la réalisation de ce document; puisse vous trouver en ce travail la satisfaction de vos efforts.

REMERCIEMENTS

Aux Pr Georges Anicet OUEDRAOGO et Jean Bosco OUEDRAOGO, merci pour avoir mis en place une possibilité de formation au niveau troisième cycle en Biologie Appliquée dans la ville de Sya.

Au Pr Jean Bosco OUEDRAOGO je dis grand merci pour m'avoir permis d'effectuer ce DEA. Cher Professeur vous êtes pour moi plus qu'un formateur; puisse Dieu vous bénisse dans vos projets.

Au Dr Halidou TINTO je dis merci pour son encadrement durant ce travail.

Je remercie le Dr Hermann SORGHO pour sa disponibilité et son soutien.

Je remercie le Dr Zékiba TARNAGDA pour ses précieux conseils.

A tous les chercheurs et techniciens et personnel de l'IRSS ainsi qu'à Mme ZAMPA Odile je dis merci.

Etude de la relation entre la mutation génétique *Pfmdr1-Y184F* et la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à l'amodiaquine

Résumé :

Le paludisme est une parasitose affectant annuellement 350 millions de personnes avec plus d'un million de décès. La chimiorésistance aux antipaludiques est l'une des causes majeures de cette morbidité. Le contrôle de cette chimiorésistance passe par la détermination des marqueurs moléculaires pour chaque antipaludique. Cependant, l'Amodiaquine, antipaludique financièrement accessible et toujours efficace au Burkina Faso, n'a aucun marqueur moléculaire spécifique.

Ainsi, nous avons investigué sur le rôle de la mutation *Pfmdr1-184F* en cas de recrudescence parasitaire à l'Amodiaquine.

La goutte épaisse a servi pour déterminer les patients positifs à une mono infection à *Plasmodium falciparum*. Les recrudescences parasitaires ont été déterminées par PCR nichée des gènes *MSP1* et *MSP2* ; et la mutation *Pfmdr1-184F* a été mise en évidence par PCR - RFLP.

Sur 118 patients positifs à *P. falciparum*, 12,71% ont présenté un échec thérapeutique et seulement 5,78% de ces cas d'échecs thérapeutiques étaient dus à une recrudescence parasitaire. La prévalence de la mutation *Pfmdr1-184F* avant traitement était de 69,49%.

Statistiquement il n'y a pas d'association entre la présence de cette mutation et la survenue de recrudescence parasitaire après traitement à l'Amodiaquine.

Mots clés : *Plasmodium falciparum* ; chimiorésistance ; *Msp1* ; *Msp2* ; *Pfmdr1-Y184F*

Summary :

Every year, 350 millions persons are victim from malaria and about 1 million of these die. Chemoresistance is a major cause of this morbidity. To control this chemoresistance we need to determine the molecular marker of each anti malarial drug. Whereas, there is no marker for Amodiaquine a low cost and efficient drug in Burkina Faso. Thus, we plan to determine the relationship between *Pfmdr1-184F* mutation and Amodiaquine failure due to parasite recrudescence.

We determined *Plasmodium falciparum* positive patients with blood smear technic. *MSP1* and *MSP2* nested PCR discriminated recrudescence parasites from new infection ones. To study *Pfmdr1-184F* mutation we used PCR - RFLP technic.

118 patients were blood smear positive, and from these 12.71% failed to Amodiaquine. From these failures too, 5.78% were due to recurrent parasitemia. The prevalence of *Pfmdr1-184F* mutation were 69.49%.

We found no relationship between Amodiaquine failure and *Plasmodium falciparum* *Pfmdr1-184F* mutation.

Key words : *Plasmodium falciparum* ; chimiorésistance ; *Msp1* ; *Msp2* ; *Pfmdr1-Y184F*

Table des Matières

Table des Matières	v
Sigles et Abréviations	1
Liste des Tableaux et Figures.....	2
Tableaux	2
Figures.....	2
I. INTRODUCTION.....	3
II. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	4
2.1. Objectif général	4
2.2. Objectifs spécifiques.....	4
III. GENERALITES SUR LE PALUDISME.....	5
3.1. Le parasite et ses vecteurs.....	5
3.3. Le cycle parasitaire du Plasmodium	5
3.2. Ampleur du paludisme dans le monde.....	7
3.4. Formes cliniques du paludisme à Plasmodium falciparum	8
3.5. Diagnostic biologique du paludisme	9
3.6. Polymorphisme génétique de Plasmodium falciparum.....	10
3.7. Médicaments antipaludiques.....	10
3.7.1. Les schizonticides	11
3.7.2. Les antifolates	11
3.7.3. Les drogues anti-mitochondriales	11
3.8. Chimiorésistance aux antipaludiques.....	12
3.8.1. Définition de la chimiorésistance	12
3.8.2. Mécanismes de la chimiorésistance aux antipaludiques	12
3.8.2.1. Mécanisme de la chimiorésistance à l'amodiaquine (AQ) et aux amino 4 quinoléines.....	12
3.8.2.2. Mécanisme de la chimiorésistance aux antifolates.....	12
3.8.3. Déterminants de la chimiorésistance.....	13
3.8.3.1. Facteurs liés aux antipaludiques	13
3.8.3.2. Les facteurs liés aux humains.	13
3.8.3.3. Les facteurs liés au parasite	13
3.8.3.4. Les facteurs liés aux vecteurs et à l'environnement.....	14
3.8.4. Méthodes d'études de la chimiorésistance de Plasmodium falciparum	14
3.8.4.1. Tests <i>in vitro</i>	14
3.8.4.2. Tests <i>in vivo</i>	15
3.8.4.3. Tests moléculaires	15
IV. METHODOLOGIE.....	16
4.1. Sites et population d'étude	16
4.2. Calcul de la taille de l'échantillon.....	16
4.3. Collette des données et suivi des patients	16
4.4. Etudes moléculaires.....	17
4.4.1. Extraction de l'ADN génomique de <i>Plasmodium</i>	17
4.4.2. Amplification des séquences spécifiques d'ADN	18
4.4.2. Détermination du polymorphisme génétique de <i>msp1</i> et <i>msp2</i>	18

4.4.2.1. Mélange réactionnel et programme d'amplification de <i>msp1</i> et <i>smp2</i>	18
4.4.2.1. Analyse des produits de la PCR nichée.....	20
4.4.3. Géotypage de l'allèle <i>Pfmdr1-184</i>	21
4.4.3.1. Digestion de l'ADN par l'enzyme de restriction DraI et Electrophorèse du produit de la digestion	23
4.5. Analyse des données	24
4.6. Considérations éthiques	24
VI. RESULTATS	25
5.1. Caractéristiques de la population d'étude.	25
5.2. Résultats cliniques et parasitologique.....	26
5.3. Prévalence de l'allèle <i>Pfmdr1-184</i>	28
5.4. Relation entre la mutation <i>Pfmdr1-Y184F</i> et les échecs thérapeutiques à l'amodiaquine.....	28
VI. DISCUSSION.....	29
6.1. L'efficacité thérapeutique de l'amodiaquine.	29
6.2. Prévalence de l'allèle <i>Pfmdr1-184F</i> en période prétraitement à l'amodiaquine	30
6.3. Relation entre la mutation <i>Pfmdr1-184F</i> et les échecs thérapeutiques dus à la recrudescence	30
VII. CONCLUSION	31
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	32

Sigles et Abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

Pfcrt: *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene

Pfmdr1 : *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1

Pfdhfr: *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase

Pfdhps: *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthetase

SP: Sulfadoxine-pyrimethamine

PFCRT: *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter protein

Pgh1: *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 protein

dNTPs: Désoxyribonucléosides triphosphates

ATP: Adénosine triphosphate

EPP: Echec Parasitologique Précoce

EPT: Echec Parasitologique Tardif

ETP: Echec Thérapeutique Précoce

ETT: Echec Thérapeutique Tardif

MSP1, 2: Merozoite Surface Protein 1, 2

ml/j: millilitre par jour

PBS: Phosphate Buffered Saline

TBE: Trizma acid-Boric EDTA

BET: Bromure d'Ethidium

PCR: Polymerase Chain Reaction

µmol/L: micro moles/litre

mA: milliampère

V: volt

bp: base paire

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

WHO: World Health Organisation

IRSS/DRO : Institut de Recherche en Sciences de la Santé / Direction Régionale de l'Ouest

Liste des Tableaux et Figures

Tableaux

Tableau I : Suivi des patients et collecte des échantillons biologiques	17
Tableau II : Composition des mélanges réactionnels pour la première et la deuxième PCR	19
Tableau III : Tableau récapitulatif des programmes d'amplifications de chaque gène.	20
Tableau IV: Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR de <i>Pfmdr1-184F</i>	22
Tableau V : Programmes d'amplifications et des séquences des primers pour analyse de <i>Pfmdr1-184</i>	22
Tableau VI : Mélange réactionnel de digestion avec le Dral	23
Tableau VII : Résultats cliniques et parasitologiques par faciès épidémiologique après une correction par la PCR	27
Tableau VIII : Prévalence des allèles en fonction du site d'étude	28

Figures

Figure 1 : Cycle de vie du <i>Plasmodium falciparum</i>	6
Figure 2 : Répartition géographique du paludisme dans le monde [WHO, 2004].	7
Figure 3 : Diagramme de suivi des patients	25
Figure 4 : Résultats cliniques et parasitologiques par site d'étude.....	26
Figure 5 : Résultats cliniques et parasitologiques par site d'étude après ajustement par la PCR.....	27

I. INTRODUCTION

Le paludisme est une parasitose causée par un protozoaire hématozoaire du genre *Plasmodium*. Les parasites de ce genre peuvent infecter une large gamme de mammifères dont l'homme. On estime l'origine de cette parasitose au sein de la population humaine entre 6000 et 10000 ans (Cowman et Baum, 2002; Joy *et al.*, 2003).

Durant la première moitié du vingtième siècle, l'humanité se croyait capable d'éradiquer le paludisme (Russel, 1955). Mais un demi-siècle plus tard, cette maladie tue plus d'un million de personnes par an.

L'une des causes majeures de cette forte mortalité est l'émergence de la chimiorésistance à la fin des années 1950 aux antipaludiques utilisés jusqu'alors (Cortese *et al.*, 2002; Talisuma *et al.*, 2003, Hastings, 2004). De nos jours une résistance de *Plasmodium* aux médicaments tels que la sulfadoxine-pyriméthamine (SP), la chloroquine, l'amodiaquine est largement répandue à travers le monde (Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Depuis les premiers reports d'une absence d'efficacité des antipaludiques sur les *Plasmodium*, d'importantes investigations ont conduit à la mise en évidence de l'implication de mutations génétiques chez les parasites leur conférant cette résistance. Ainsi, des mutations au niveau des gènes *Pfcr*t et *Pf*dhfr ont été respectivement associées à la chimiorésistance de *P. falciparum* à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine (Fidock *et al.*, 2000; Cowman *et al.*, 1988).

Les marqueurs *Pfcr*t-K76T et *Pf*mdr1-N86Y de la résistance à la chloroquine (même famille chimique que l'amodiaquine) sont associés à la chimiorésistance à l'amodiaquine. Mais leur présence n'est pas indispensable pour la survenue de la chimiorésistance à l'amodiaquine. (Holmgren *et al.*, 2005). De plus, peu de résultats sont disponibles sur le rôle des autres allèles de la chloroquino-résistance (*Pf*mdr1-184, 1034, 1042, 1246) dans la chimiorésistance à l'amodiaquine.

Aussi, l'amodiaquine demeure-t-elle toujours un antipaludique efficace et financièrement plus accessible aux pays en voie de développement (D'Alessandro et Kuile, 2006; Grandesso *et al.*, 2006).

Il y a alors une nécessité d'investiguer le rôle de la mutation *Pf*mdr1-Y184F dans la chimiorésistance de *P. falciparum* à l'amodiaquine.

II. OBJECTIFS DE L'ETUDE

2.1. OBJECTIF GENERAL

L'objectif général du présent travail était d'étudier de la relation entre la mutation génétique *Pfmdr1-184F* et les échecs thérapeutiques (recrudescences) à l'amodiaquine au cours d'une saison de transmission du paludisme au Burkina Faso.

2.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES

1. Déterminer la prévalence des échecs thérapeutiques cliniques et parasitologiques,
2. Déterminer la prévalence de la mutation *Pfmdr1-184F* dans la population d'étude,
3. Mesurer l'association entre la présence de la mutation *Pfmdr1-184F* et les échecs thérapeutiques (recrudescences) à l'amodiaquine.

III. GENERALITES SUR LE PALUDISME

3.1. LE PARASITE ET SES VECTEURS

Le paludisme est causé par des sporozoaires sanguins du genre *Plasmodium*. Plus de 100 espèces plasmodiales ont été décrites mais seulement quatre espèces sont parasites de l'homme. La responsabilité de *Plasmodium* dans la transmission du paludisme à l'homme a été établie par Alphonse Laveran en 1880 à Constantinople. Il s'agit de *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. falciparum*. Cette dernière est l'espèce la plus pathogène chez l'homme et est responsable de 74 % des cas cliniques (Korenromp, 2004).

Les *Plasmodium* sont transmis aux humains par les femelles de certains moustiques du genre *Anopheles* au cours de leurs repas sanguins. Une vingtaine d'*Anopheles* sont vecteurs du paludisme. En Afrique, *Anopheles gambiae*, *A. funestus* et *A. arabiensis* sont les vecteurs couramment rencontrés (Kiszewski et Teklehaimanot, 2004).

3.3. LE CYCLE PARASITAIRE DU PLASMODIUM

Le cycle de vie du *Plasmodium* (Figure 1) admet un hôte intermédiaire (l'homme ou d'autres mammifères) chez qui a lieu une reproduction asexuée et un hôte définitif (le moustique) chez qui a lieu la reproduction sexuée.

La première partie de ce cycle commence quand un moustique infecté par *Plasmodium falciparum* injecte 5 à 20 sporozoïtes dans le sang humain au cours de son repas. Ces sporozoïtes migrent rapidement (30 min) vers le foie et envahissent les hépatocytes, où ils se multiplient et se développent en schizontes puis en mérozoïtes: c'est la phase hépatocytaire ou première phase de multiplication asexuée. A leur maturité, les mérozoïtes sont libérés suite à l'explosion des hépatocytes se retrouvent dans le sang où elles vont entreprendre la deuxième phase de multiplication asexuée ou phase érythrocytaire. Au cours de cette phase, les mérozoïtes provenant du foie infectent les hématies se multiplient et se développent en trophozoïtes puis en schizontes. La prolifération des schizontes éclate les hématies et libèrent de

nouveaux mérozoïtes. Ces mérozoïtes réinfectent d'autres hématies établissant ainsi des cycles synchrones dont la durée est fonction de l'espèce plasmodiale.

Après un certain nombre de cycles, et pour des raisons non encore élucidées, les mérozoïtes se différencient en des formes sexuelles les gamétocytes mâles (microgamètes) et femelle (macro-gamètes).

Les cellules reproductrices ainsi formées sont absorbées par l'anophèle femelle au cours d'un repas sanguin transférant ainsi le parasite chez son hôte définitif. Une fois dans l'intestin du moustique, le micro-gamète et macro-gamète fusionnent pour donner un ookynete qui va s'attacher puis traversée la paroi intestinale du moustique. Une fois du côté extérieur de la paroi intestinale, l'ookynete se transforme en oocyste. Il va s'en suivre un cycle sporogonique de multiplication et de transformation successive qui va donner des sporozoïtes. Ces sporozoïtes vont migrer dans les glandes salivaires du moustique et seront transmis à l'homme au cours d'un deuxième repas sanguin.

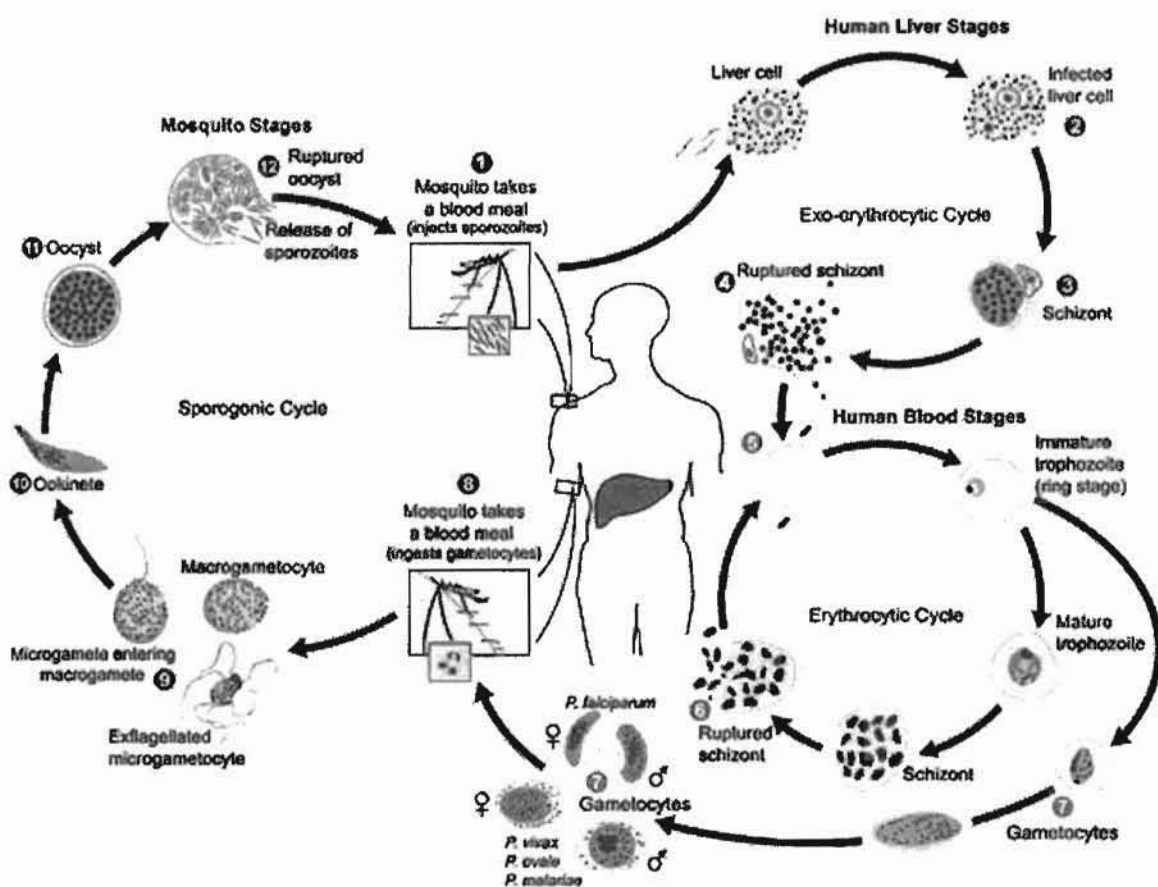


Figure 1: Cycle de vie du *Plasmodium falciparum*

Source: http://www.uni-tuebingen.de/modeling/images/malaria_LifeCycle.gif

3.2. AMPLEUR DU PALUDISME DANS LE MONDE

Maladie parasitaire, le paludisme se rencontre dans tout le monde intertropical à savoir l'Asie du sud est, en Amérique du sud, au Moyen orient et l'Afrique subsaharienne (Figure 2).

Dans le monde, on enregistre annuellement 350 à 500 millions de cas cliniques de paludisme (Korenromp, 2004) occasionnant plus d'un million de décès. Environ 60% des cas cliniques et plus de 80% des cas de décès ont lieu en Afrique au sud du Sahara (WHO, 2003). Toutes les évaluations épidémiologiques s'accordent à dire que les personnes les plus vulnérables au paludisme sont les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes (Hay *et al.*, 2004; Snow *et al.*, 2005).

En zone endémique, la maladie entraîne une réduction de la croissance économique de 1,3% (Gallup et Sachs, 2001).

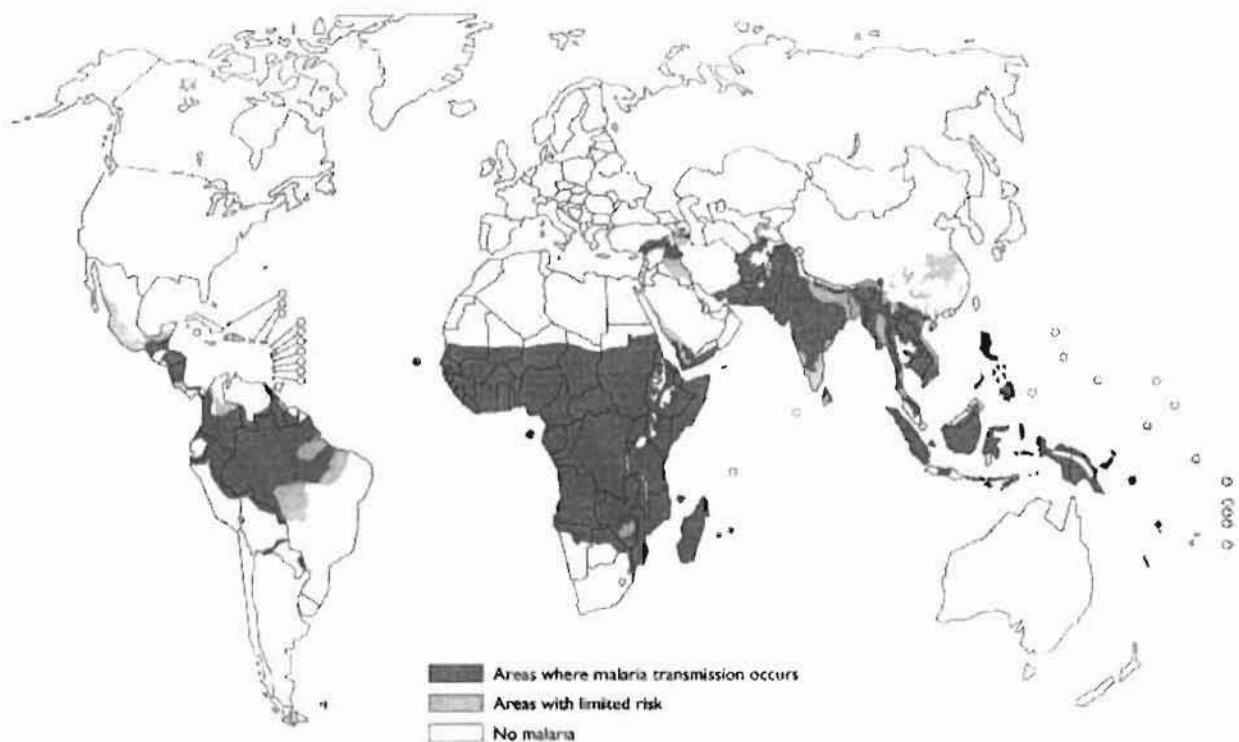


Figure 2: Répartition géographique du paludisme dans le monde [WHO, 2004].
Source : <http://www.who.int/malaria/malariaendemiccountries.html>

3.4. FORMES CLINIQUES DU PALUDISME A PLASMODIUM FALCIPARUM

En fonction des symptômes on distingue plusieurs types d'accès palustres (paludisme asymptomatique, le paludisme simple, paludisme grave, le paludisme viscéral évolutif, le neuropaludisme, la fièvre bilieuse hémoglobinurique). Ces symptômes dépendent de l'immunité de l'hôte, des facteurs génétiques liés aux parasites.

- **Le paludisme asymptomatique** se caractérise par la présence, chez un hôte, de parasites asexués sans aucun symptôme clinique.
- **Le paludisme simple** se caractérise par des accès palustres classiques sans aucun signe de malignité. La période d'incubation dure entre 7 à 10 jours et est asymptomatique. Cette phase, suivie par la phase d'invasion se caractérise par une fièvre continue (39-40°C) accompagnée de céphalées, nausées ou vomissements. Enfin on a la phase d'état (les accès palustres surviennent toutes les 48 h) qui se caractérisent par des fièvres 39-40°C, des frissons, des sueurs accompagnées de céphalées, de vomissements et d'une splénomégalie parfois d'une hépatomégalie. En l'absence de traitement les accès palustres simples peuvent se compliquer en accès palustres graves.
- **Le paludisme grave** s'observe surtout chez les sujets non immuns (enfants, femmes en ceintes, voyageurs). L'accès palustre grave se caractérise par plusieurs états dont on peut retenir (WHO, 2003) :
 - Une densité parasitaire supérieure à 200000 parasites asexués/ μ l de sang
 - Une anémie sévère : hémoglobine < 5 g/dl, hématocrite < 20 p. 100
 - Un ictère clinique ou une élévation de la bilirubine totale (50 μ mol/l)
 - Une insuffisance rénale marquée par la chute de la diurèse (< 400 ml/j) ou une élévation de la créatinémie (265 μ mol/l)
 - Une hyperthermie (40,5°C)
 - Une hypoglycémie < 2,2 mmol/l
 - Des troubles digestifs:diarrhée, vomissements
 - Une hémoglobinurie
 - Un oedème pulmonaire

L'expression majeure de ces formes graves est le neuropaludisme qui se caractérise par une atteinte cérébrale par les parasites.

3.5. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU PALUDISME

Selon que l'on détecte le parasite, ses métabolites, ou les anticorps qui lui sont spécifiques on distingue :

- **Diagnostic direct** qui permet de détecter le parasite ou sa présence. Il s'agit de :
 - La microscopie: la goutte épaisse (GE), le frottis mince et la fluorescence sont basées sur la capacité de certains colorants (Giemsa, Fields) et de certains composés fluorescents (acridine orange, Bromocrésol pourpre) de se fixer préférentiellement sur l'ADN. Ainsi au moyen du microscope photonique ou à fluorescence, on observe les parasites (*Plasmodium*) au sein des hématies infectées
 - Détection de séquences d'acides nucléiques spécifiques : La PCR, permet d'amplifier des séquences spécifiques d'acides nucléiques de *Plasmodium* (ARN 18S, circumsporozoïte; mérozoïte surface Protein 1 et 2). Les produits d'amplification sont révélés par électrophorèse ou par radioactivité. Cette technique moléculaire permet une détection, inter et intra spécifiques, de *Plasmodium* avec un seuil inférieur à cinq parasites par microlitre de sang (Moody, 2002). Cette technique est onéreuse et requiert des heures.
 - La détection d'antigènes du *Plasmodium*: Des kits commerciaux (Rapid diagnostic Test ou RDT) permettent de détecter des antigènes plasmodiales par une capture en sandwich (anticorps-antigène-anticorps marqué) de ces antigènes. Quelques kits couramment rencontrés sont le «ParaSight F test» et «OptiMAL». ParaSight F permet la détection de la HRP2 (Histidine Rich Protein 2), une protéine synthétisée par les trophozoïtes et les jeunes gamétocytes de *P. falciparum*. OptiMAL permet la détection de la pLDH (p-Lactate Déshydrogénase) est une enzyme synthétisée par les formes sexuées et asexuées de *Plasmodium* Cette enzyme est détectée par le test. Ces techniques sont peu sensibles (supérieur à 100 parasites par microlitre de sang) et non quantitatif (Moody, 2002).
- **Diagnostic indirect ou Détection d'anticorps anti-*Plasmodium***: La recherche d'anticorps sériques bio synthétisés contre les parasites est souvent utilisée

pour diagnostiquer une infection à *Plasmodium*. Cependant, des anticorps sériques persistent après l'infection; d'où l'inconvénient de cette technique.

3.6. POLYMORPHISME GENETIQUE DE PLASMODIUM FALCIPARUM

Plasmodium falciparum possède trois types d'acides nucléiques : nucléaire, mitochondrial et plastidique utilisés pour l'étude la diversité génétique du parasite. L'ADN nucléaire comporte 25 à 30.10⁶ paires de bases réparties sur 14 chromosomes de tailles différentes. Les événements génétiques (recombinaison, crossing-over) et les pressions immunitaires sont à l'origine de l'émergence de polymorphisme au niveau des antigènes du *Plasmodium*. Chez *P. falciparum*, les gènes de polymorphisme les plus utilisés pour la différenciation des clones infectants sont :

- *msp1* : localisé sur le chromosome 9, ce gène comporte 17 blocks et code pour une glycoprotéine de surface du mérozoïtes de 190 kDA (Merozoite surface Protein 1). La variabilité du block 2 (K1, MAD20, RO33) sert à la différenciation des clones de *P. falciparum*
- *msp2* : ce gène situé sur le chromosome 2 est divisé en 5 blocks et code pour une glycoprotéine de surface de 28kDA (Merozoite surface Protein 2). La variabilité du block3 (IC3D7ou FC27) est utilisée pour différencier les clones.
- *Glurp* : Glutamate rich protein.
- *Microsatellites* : TA81, TA60, TA40, PFPK2 ...

Ces marqueurs de polymorphismes servent à la différenciation des parasites recrudescents de ceux qui infectent nouvellement un patient au cours d'un traitement antipaludique.

3.7. MEDICAMENTS ANTIPALUDIQUES

Suivant leurs modes d'action, les antipaludiques sont regroupés en quatre groupes.

3.7.1. Les schizonticides

Ils regroupent la quinine, l'amodiaquine, la chloroquine, l'halofantrine, la mefloquine les dérivés de l'artémisinine. Ces drogues sont actives dans les vacuoles digestives des schizontes sanguins. Au sein des hématies parasitées, *Plasmodium* catabolise l'hémoglobine en donnant l'hème, une molécule qui lui est toxique. Normalement, le parasite polymérise l'hème en un pigment non toxique (l'hemozoïne). Les schizonticides inhibent la détoxification de l'hème en hemozoïne, d'où leur létalité pour le parasite.

3.7.2. Les antifolates

L'acide folique est un cofacteur enzymatique essentiel pour la biosynthèse de l'ADN. Les antifolates tels que la sulfadoxine, analogue structural de l'acide para-amino benzoïque (pABA), inhibe spécifiquement l'activité de la dihydropteroate synthétase du parasite. La pyriméthamine et le cycloguanil, analogues structuraux du dihydrofolate, sont des inhibiteurs compétitifs du dihydrofolate réductase de *P. falciparum*. L'inhibition, de ces enzymes de la biosynthèse de l'ADN, entraîne un arrêt de la multiplication des parasites.

3.7.3. Les drogues anti-mitochondriales

Ces médicaments sont actifs dans les mitochondries. L'atovaquone, analogue structural du coenzyme Q, inhibe préférentiellement la chaîne de transport d'électron qui est nécessaire pour la biosynthèse de l'ATP (*Ittarat et al., 1994*) du *Plasmodium*. La tétracycline et la clindamycine inhibent la biosynthèse des protéines mitochondriales.

Il existe aussi des drogues inhibitrices les réactions redox telle que la primaquine qui inhibe les réactions d'oxydo réductions des métabolites de la quinine. Elle est très active sur les parasites pré-erythrocytaires.

3.8. CHIMIORESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES

3.8.1. Définition de la chimiorésistance

La chimiorésistance parasitaire est l'aptitude d'une souche du parasite à survivre et où se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un antipaludique donné, à des doses thérapeutiques supérieures ou égales à la dose limite tolérable par un sujet humain (WHO, 1965). Cet antipaludique doit être en contact direct avec le parasite ou les érythrocytes infectés pendant un temps nécessaire pour l'action normale du médicament (Bruce-chwatt *et al.*, 1986).

3.8.2. Mécanismes de la chimiorésistance aux antipaludiques

3.8.2.1. Mécanisme de la chimiorésistance à l'amodiaquine (AQ) et aux amino 4 quinoléines

Les amino 4 quinoléines (chloroquine, quinine, amodiaquine) et précisément la chloroquine (CQ) inhibe la détoxification de l'hème dans la vacuole du parasite entraînant ainsi une accumulation de la CQ dans la vacuole des phénotypes sensibles de *Plasmodium falciparum*. Les phénotypes CQ résistants empêchent l'accumulation intra vacuolaire de l'antipaludique grâce à des protéines de transport (PFCRT, Pgh1) situées dans la membrane vacuolaire (Fidock *et al.*, 2000; Mu *et al.*, 2003). L'amodiaquine (AQ) étant de la même famille thérapeutique que la CQ, le mécanisme de résistance à l'AQ serait probablement similaire à celui de la CQ.

3.8.2.2. Mécanisme de la chimiorésistance aux antifolates

Les phénotypes sulfadoxine-pyriméthamine résistants de *P. falciparum* possèdent des formes mutantes de la DHFR (Dihydrofolate réductase) et de la DHPS (Dihydroptéroate synthétase). Ces enzymes mutantes n'ont aucune spécificité pour la sulfadoxine-pyriméthamine et par conséquent ne sont pas inactivés par celles-ci.

3.8.3. Déterminants de la chimiorésistance

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

3.8.3.1. Facteurs liés aux antipaludiques

La fréquence et l'usage massif des antipaludiques entraîneraient une émergence de la chimiorésistance soit par sélection d'individus résistants soit par induction de mutations. En effet, plus la pression médicamenteuse est forte et constante, plus les parasites s'évertuent à s'adapter et se reproduire malgré cette pression. Cette adaptation se manifeste par une émergence de la chimiorésistance (Payne, 1988; Diourte *et al.*, 1999). Les antipaludiques à demi vie longue (mefloquine 10-40 jours; sulfadoxine pyriméthamine 95-180 h) éliminent les parasites sensibles et protègent l'organisme contre les nouvelles infections. Cependant lorsque leur concentration sanguine est inférieure au seuil thérapeutique, on assiste à une recrudescence voire un envahissement de l'organisme par les souches résistantes (Hastings *et al.*, 2002).

3.8.3.2. Les facteurs liés aux humains.

L'immunité de prémunition améliore l'efficacité thérapeutique d'un antipaludique. Les personnes naïves au paludisme développent une immunité non spécifique contre les parasites et sont donc des réservoirs de multiplication et de propagation des souches plasmodiales chimiorésistantes (Alene et Bennett, 1996).

3.8.3.3. Les facteurs liés au parasite

Indépendamment de toute pression médicamenteuse, des mutations spontanées susceptibles d'induire une résistance peuvent survenir au niveau du génome plasmodial. Moins le nombre de mutations requis pour la chimiorésistance est élevé, plus vite la chimiorésistance intervient (White, 1999).

Le niveau de transmission du paludisme dans une zone influence aussi l'expansion de la chimiorésistance; mais son rôle exact est mal connu. Pour certains auteurs, en zone endémique la forte transmission favorise l'émergence de souches plasmodiales résistantes (Molyneux *et al.*, 1999). Pour d'autres par contre, en zone à transmission faible, le risque d'apparition de parasites chimiorésistants est élevé

(White, 1999). En effet, compte tenu de la nature monoclonale des infections dans ces zones, la probabilité que deux gamètes, porteurs de gènes de résistances, fusionnent est élevée dans ces zones. Une troisième hypothèse soutient que le niveau de transmission n'affecte pas l'apparition et l'extension de la chimiorésistance (Hastings, 1997).

3.8.3.4. Les facteurs liés aux vecteurs et à l'environnement

Une capacité vectorielle élevée entraînerait l'expansion de la chimiorésistance car elle favorise une infestation permanente de l'hôte. De plus, certaines souches chimiorésistantes se reproduisent plus facilement chez le vecteur (*Anopheles dirus*) que les souches chimiosensibles (Wernsdorfer, 1994).

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

Le choix d'une méthode dépend des objectifs visés (phénotypique, génotypage ou nature biologique d'un antipaludique) et des technologies disponibles (PCR, microscopie, radio marquage, ELISA).

3.8.4.1. Tests *in vitro*

Plasmodium falciparum est un parasite cultivable. Les tests *in vitro* sont basés sur la capacité de certains médicaments à inhiber la croissance de *Plasmodium* en milieu de culture. En fonction des moyens de mesure de cette inhibition on a :

- Le microtest de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) qui permet au moyen d'un microscope de dénombrer les trophozoïtes.
- Le microtest isotopique qui permet la mesure de la croissance parasitaire par l'évaluation de la quantité d'hypoxanthine radioactive incorporée dans les molécules d'ADN néosynthétisées du parasite.
- Les tests colorimétriques sont des tests qui permettent la mesure de la croissance de *P. falciparum* grâce à la détection d'enzymes spécifiques du parasite. Ces enzymes sont détectées soit par la technique ELISA (enzymes

HRP2 et pLDH respectivement par la HRP2 test et la pLDH DELI test) soit par la mesure de leurs activités (pLDH test).

- Les tests *in vitro* permettent de déterminer le phénotype des souches plasmodiales vis-à-vis des drogues antipaludiques.

3.8.4.2. Tests *in vivo*

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

3.8.4.3. Tests moléculaires

Les techniques de biologie moléculaire (amplification spécifique de fragment d’ADN ou de séquençage du génome), ont permis l’élucidation des mécanismes moléculaires de la chimiorésistance et identification de marqueurs moléculaires de la chimiorésistance de *Plasmodium* aux antipaludiques. Ainsi certains allèles mutants sont associés dans la chimiorésistance de *P. falciparum* (Le Bras et Durand, 2003) :

- *Pfcrt-K76T* : est associé à la CQ résistance.
- *Pfmdr1-N86Y* : sans être la cause, il contribue à la résistance à la chloroquine.
- *Pfdhfr-S108N* : sa présence est associée à la résistance à la pyriméthamine.
- *Pfdhps-A437G* : sa présence est associée à la résistance à la sulfadoxine.
- *Pfmdr1 copy number* : est présumé associé à la résistance aux artémisinines.
- *PfAtpase6* : est présumé associé à la résistance aux artémisinines

IV. METHODOLOGIE

4.1. SITES ET POPULATION D'ETUDE

De septembre à novembre 2004, périodes à forte transmission de paludisme, cette étude fut menée dans trois villes (Dori, Koupèla, Nanoro) représentant deux des trois niveaux épidémiologiques du paludisme au Burkina Faso.

Dans l'optique de sélectionner, les patients, sans biais; il fut réalisé une étude longitudinale prospective randomisée à l'amodiaquine versus sulfadoxine-pyriméthamine. Cependant seuls les patients randomisés à l'amodiaquine ont fait l'objet de notre étude. Durant la période d'étude, l'équipe de recherche s'est installée dans des centres de santé des localités concernées et à inclus tous sujets de des deux sexes habitants la localité et volontaires pour participer.

Tout patient suspecté de paludisme a bénéficié d'un examen parasitologique de *Plasmodium* (goutte épaisse). Parmi les patients positifs à *Plasmodium falciparum*, ceux retenus pour l'étude ont été sélectionnés selon des critères définis par l'OMS en 2003.

4.2. CALCUL DE LA TAILLE DE L'ECHANTILLON

En 2004, une étude menée au Burkina Faso (Barenes *et al.*, 2004) a révélé que la prévalence des échecs thérapeutiques à l'amodiaquine était de 4%. Pour un risque d'erreur de 5%, la taille minimale de notre échantillon devait être de 60 patients. En incluant une marge d'erreur de 10% du fait de la possibilité d'abandon par certains patients; la taille minimale requise pour notre échantillon est de 66 patients.

4.3. COLLETTE DES DONNEES ET SUIVI DES PATIENTS

La procédure de collecte des données, cliniques et biologiques, est détaillée dans le protocole définit par l'OMS en 2003. Le régime thérapeutique à l'amodiaquine était et de 10 mg d'AQ / kg de poids; en prise unique pendant 3 jours. Durant 28 jours les patients bénéficièrent d'un suivi au cours duquel les données sont collectées selon un programme indiqué par le Tableau ci-dessous.

Tableau I : Suivi des patients et collecte des échantillons biologiques

Jour	J0	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28	Autres jours
Gouttes épaisses et Frottis minces	X		X	X	X	X	X	X	
Confettis pour la PCR	X		X	X	X	X	X	X	
Taux d'hémoglobine	X							X	
Examen clinique	X	X	X	X	X	X	X	X	

4.4. ETUDES MOLECULAIRES

Ces études moléculaires avaient deux composantes essentielles qui étaient l'étude du polymorphisme génétique de *msp1* et *msp2* de *Plasmodium falciparum* et le génotypage de l'allèle *Pfmdr1-184*. Ces analyses ont été réalisées en utilisant la méthode de «polymerase chain reaction» (PCR) ou réaction de polymérisation en chaîne. Cette méthode comporte trois grandes étapes qui sont l'extraction du matériel génétique, son amplification et la révélation des produits d'amplification.

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

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

4.4.2. Amplification des séquences spécifiques d'ADN

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

4.4.2. Détermination du polymorphisme génétique de *msp1* et *msp2*

La polyclonalité des infections à *P. falciparum* a été déterminée par une nested PCR des gènes *msp1* et *msp2*.

4.4.2.1. Mélange réactionnel et programme d'amplification de *msp1* et *smp2*

Pour la *msp1* et *msp2*, les constituants (volume et concentration des réactifs) sont identiques hormis les séquences des paires d'amorces. Les composants des mélanges réactionnels pour la première et la deuxième PCR de *msp1* et *msp2* sont présentées dans le Tableau II. Le produit de la première amplification sert de source d'ADN pour la deuxième amplification.

Tableau II : Composition des mélanges réactionnels pour la première et la deuxième PCR

Réactif	PCR 1		PCR 2	
	Concentration	Volume (μ l) à prélever	Concentration	Volume (μ l) à prélever
H ₂ O ultra pure		19,525		20,025
Primer sens	50 μ M	0,05	50 μ M	0,05
Primer antisens	50 μ M	0,05	50 μ M	0,05
Buffer	10X	2,5	10X	2,5
dNTPs	20 mM	0,25	20 mM	0,25
MgCl	25 mM	1,5	25 mM	1,5
Taq polymérase	5 U/ μ l	0,125	5 U/ μ l	0,125
Extrait d'ADN	inconnue	1	inconnue	0,5
Volume final = 25 μ l				

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

Les 25 μ l, contenus dans un micro tube stérile, sont incubés dans un thermo cycler (*Master cycler gradient*) sous un programme spécifique à chaque gène (Tableau III).

Tableau III : Tableau récapitulatif des programmes d'amplifications de chaque gène.

Gènes		Amorce et séquences (5'-3')	Programme d'amplification
MSP1	1 ^{ère} amplification.	O1: 5'-CACATGAAAGTTATCAAGAAGTTGTC3' O2 :5'-GTACGTCTAATTCATTTGCACG 3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x 30; 72°C x 3min
	2 ^{ème} amplification.	N1: 5'-GCAGTATTGACAGGTTATGG-3' N2: 5'-GATTGAAAGGTATTTGAC-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x30; 72°C x 3min
MSP2	1 ^{ère} amplification.	S3: 5'-GAAGGTAATTAACATTGTC-3' S2 :5'-GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 42°C x 1min; 65°C x 2min,) x30; 72°C x 3min
	2 ^{ème} amplification.	S1: 5'-GAGTATAAGGAGAAGTATG-3' S4 :5'-CTAGAACCATGCATATGTCC-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 1min; 70°C x 2min,) x30; 72°C x 3min

4.4.2.1. Analyse des produits de la PCR nichée

Les produits obtenus après la PCR nichée sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % contenant 5µl de bromure d'ethidium (5-éthyl-3,8-diamino-6-phénylphénanthidine). Le gel est déposé dans une cuve à électrophorèse contenant un tampon TBE (Trizma Boric acid EDTA) 1X. 5 µl de chaque produit de la PCR nichée est mélangé avec 2µl de bleu de charge puis le mélange est déposé dans un puit du gel d'électrophorèse. La forte densité du bleu de charge lui permet de demeurer avec la solution d'ADN dans le puit d'électrophorèse. L'électrophorèse est réalisée à une intensité de 350mA sous une tension de 80 volts pendant 3 heures. Le bromure d'ethidium a la propriété de s'intercaler entre les fragments d'une molécule d'ADN; et d'émettre une fluorescence à 622 nm quand il est excité aux rayons ultra violets.

Sous illumination ultra violet, les fragments d'ADN apparaissent sous forme de bandes à différentes positions sur le gel. Pour un même patient, On compare le nombre et la position des bandes de fragments d'ADN du jour d'inclusion (J0) et du jour d'échec thérapeutique (J-échec). Les résultats sont exprimés en terme de recrudescence, nouvelle infection ou indéterminé.

Exemple non exhaustif d'interprétation des gels

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

Pour un même patient, on détermine le statut à partir du polymorphisme de la *msp1* et de la *msp2*.

4.4.3. Génotypage de l'allèle *Pfmdr1-184*

La détermination du statut sauvage ou mutant de l'allèle *Pfmdr1-184* a été déterminé par nested PCR en utilisant les paires d'amorces définies par Duraishingh (Duraishingh *et al.*, 2000). La première série de PCR a été effectuée avec la paire d'amorces A1/A3 dans un mélange réactionnel de 25 μ l (Tableau IV). Une particularité de cette méthode est la nécessité d'une digestion enzymatique avant la migration des produits d'amplification.

Tableau IV: Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR de *Pfmdr1-184F*

Réactif	Concentration	Volume à prélever (µl)
H ₂ O	-	16,05
Primer sens	10 mM	0,5
Primer antisens	10 mM	0,5
Buffer	10X	2,5
dNTPs	2 mM	2,5
MgCl ₂	50 mM	0,75
Taq polymérase	5 U/µl	0,2
Solution d'ADN	inconnu	2
Final volume = 25 µl		

Ce mélange a été incubé dans un thermocycler sous le programme décrit dans le Tableau V. Le mélange réactionnel de la deuxième série de PCR a été réalisé avec les amorces A2/A4. A ce mélange, nous avons ajouté 2 µl du produit de la première amplification; puis nous avons incubé dans un thermocycler sous un programme définit dans le tableau ci-dessous.

Tableau V : Programmes d'amplifications et séquences des primers pour analyse de *Pfmdr1-184*.

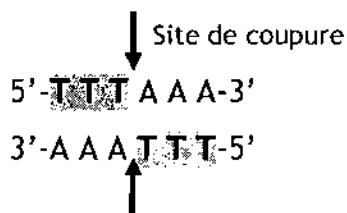
Gène et étape de la PCR	Primers (5' → 3')	Programme d'amplification
<i>Pfmdr1-184</i> PCR1	A1 : TGTTGAAAGATGGGTAAAGAGCAGAAAGAG A3 : TACTTTCTTATTACATATGACACCACAAACA	94°C x 2 min (94°C x 1min, 45°C x 1min, 72°C x 1min) x40 72°C x 5 min Conservation à 4°C
<i>Pfmdr1-184</i> PCR2	A4 : AAAGATGGTAACTCAGTATCAAAGAAGAG A2 : GTCAAACGTGCATTTTTTTATTAATGACCATTFTA	94°C x 2 min (94°C x 1min, 52°C x 1min, 72°C x 1min) x40 72°C x 5 min Conservation à 4°C

Afin de servir de témoins, l'ADN d'une souche sauvage 3D7 et d'une souche mutante HB3 à l'allèle *Pfmdr1-184* sont parallèlement amplifiés avec les échantillons. La souche sauvage 3D7 possède la forme allélique *Pfmdr1-184F* tandis que la souche mutante a pour forme allélique *Pfmdr1-Y184F*.

Remarque : Dans la nomenclature des aminoacides, F et Y représentent respectivement la phénylalanine et la tyrosine. Donc la protéine sauvage contient la phénylalanine en position 184 tandis que la protéine mutante porte la tyrosine en position 184.

4.4.3.1. Digestion de l'ADN par l'enzyme de restriction DraI et Electrophorèse du produit de la digestion

DraI est une enzyme de restriction de type II qui coupe de manière spécifique et reproductible le produit de la nested PCR en toute région de séquences nucléotidiques définies par la symétrie suivante:



Afin de digérer le produit de la nested PCR, 10 µl d'une solution réactionnelle de DraI ont été réalisés (Tableau VI). A cette solution réactionnelle nous avons ajouté 10 µl du produit d'amplification de la nested PCR. L'ensemble (20 µl) contenu dans un microtube Eppendorff a été incubé à 37°C dans un bain marie. A 37°C, Dra I possède une activité optimale.

A la fin de la digestion, le produit final est déposé sur gel d'agarose 2,5 % contenant 7,5 µl de BET pour 100 µl de TBE 1X. L'électrophorèse a lieu en milieu tamponné (TBE 1X) à 350 mA sous une tension de 80 V.

Tableau VI : Mélange réactionnel de digestion avec le DraI

	Concentration	Volume à prélever (µl)
H ₂ O	-	6
Tampon:NEB4	10X	2
DRAI	100X	2
Produit de Nested PCR	inconnu	10
Volume final = 20 µl		

L'ADN de la souche sauvage 3D7, digéré par Dral, donne deux bandes (242bp, 204 bp) visibles sous illumination du gel aux ultraviolets. L'ADN de la souche mutante HB3, après digestion, donne trois bandes (242 bp, 173 bp, 114 bp) visibles aux ultraviolets. Le caractère sauvage ou mutant d'un échantillon est déterminé en fonction de la position des bandes par rapport à celles de HB3 ou 3D7.

4.5. ANALYSE DES DONNEES

Pour la saisie des données, nous avons utilisé le logiciel EXCEL 2003.

L'analyse statistique a été effectuée par les logiciels Epi Info 6.04 et SPSS 11.0

Les résultats de l'efficacité *in vivo* des traitements sont exprimés terme de:

- Echec thérapeutique précoce (ETP): échec survenu entre J0 et J3
- Echec clinique tardif (ECT): échec survenu entre J4 à J28
- Echec parasitologiques tardif (EPT): échec survenu à J28
- Réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) : absence des cas ci-dessus

Le test de Chi-deux et le test exact de Fisher ont servi pour comparer les proportions et mesurer l'association entre certaines variables. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

4.6. CONSIDERATIONS ETHIQUES

Le protocole de cette étude fut approuvé par le comité d'éthique institutionnel du centre Muraz/IRSS. Les patients ont été inclus après obtention d'un consentement éclairé matérialisé par la signature d'une fiche établie à cet effet. Tous les patients inclus ont bénéficié d'une prise en charge médicale gratuite.

VI. RESULTATS

5.1. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION D'ETUDE.

Sur un total de 228 patients randomisés à l'amodiaquine, 206 patients ont bénéficié d'un suivi durant 28 jours. Pour notre étude nous avons sélectionné, aléatoirement, 118 échantillons (Dori = 36, Koupèla = 51, Nanoro = 31).

La moyenne d'âge dans la population d'étude était de 5,5 ans avec pour valeurs extrêmes 9 mois et 35 ans. Le sexe ratio (Masculin/féminin) était de 1,07 pour les 118 patients. Les détails, sur le suivi des patients, sont donnés par la figure ci-dessous.

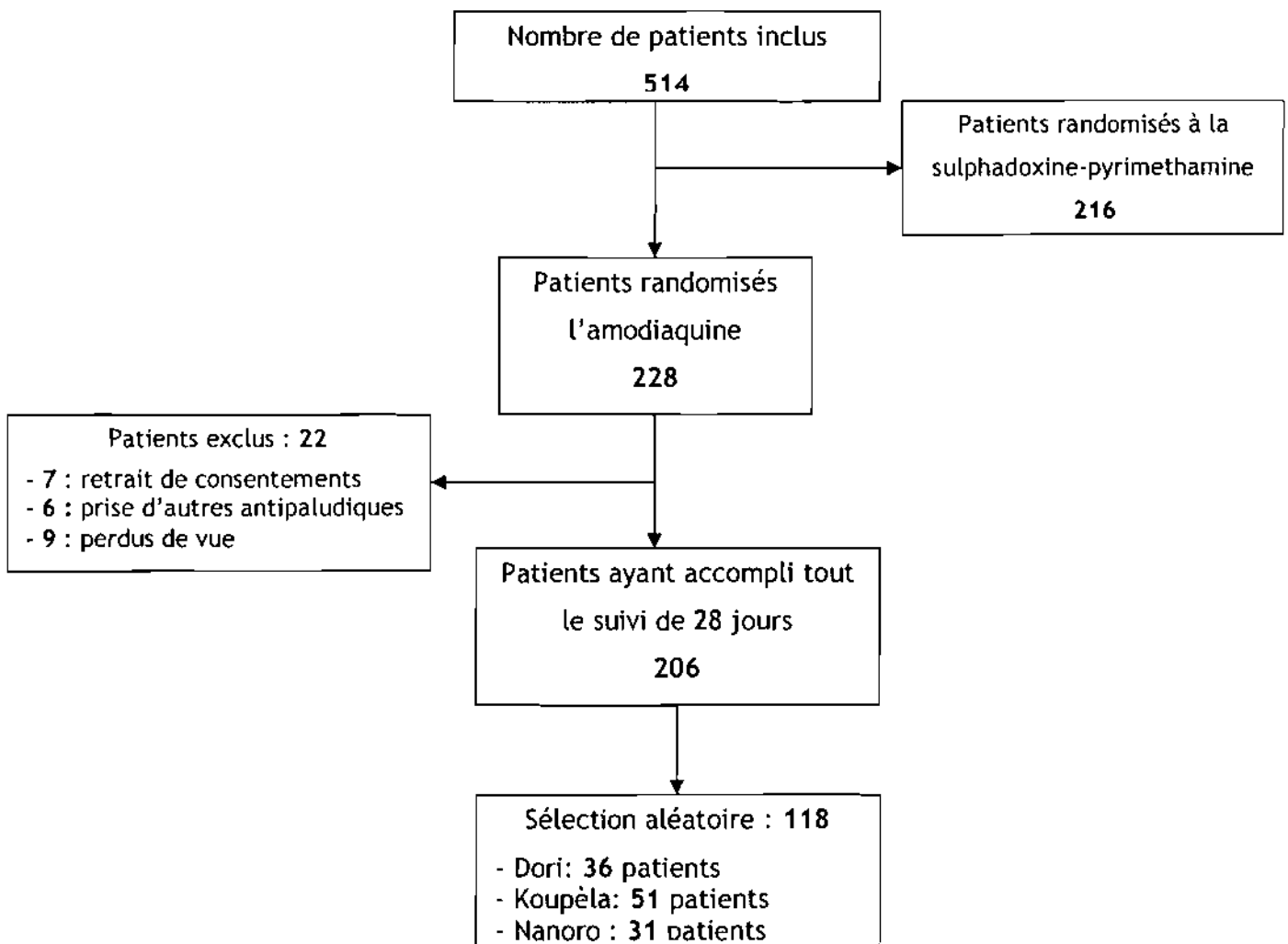
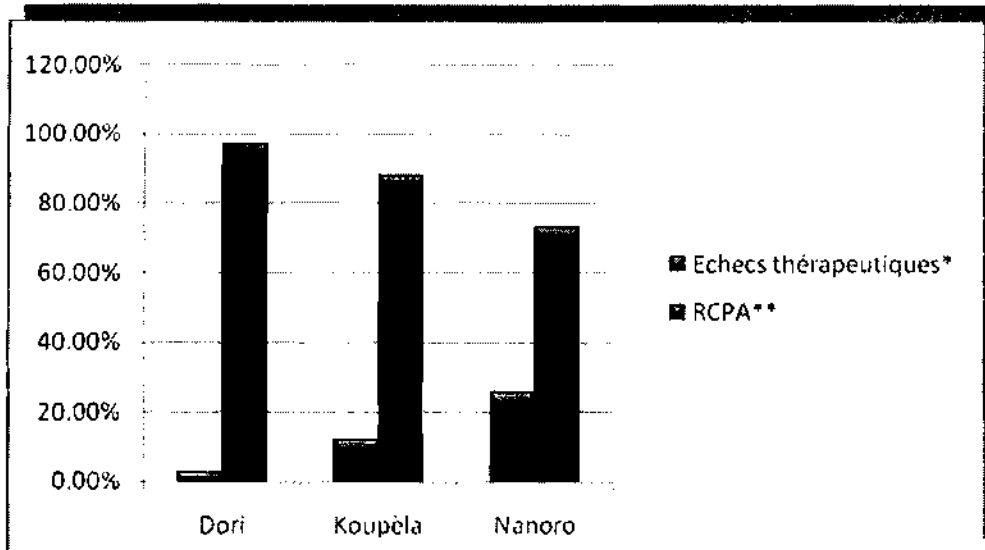


Figure 3: Diagramme de suivi des patients

5.2. RESULTATS CLINIQUES ET PARASITOLOGIQUE

La Figure 4 montre les prévalences obtenues après traitement à l'amodiaquine. La prévalence moyenne, des échecs thérapeutiques enregistré sur l'ensemble des sites d'étude, était de 12,71 % (IC95% = [7,29 - 20,1]). Cette prévalence était variable d'une région à une autre ($p = 0,018011$).



*Echecs thérapeutiques : Echecs Cliniques + Echecs Parasitologiques

**RCPA : Réponses Cliniques et Parasitologiques Adéquates

Figure 4 : Résultats cliniques et parasitologiques par site d'étude

Après cette première analyse des résultats obtenus *in vivo*, l'amplification des gènes de polymorphisme *msp1* et *msp2*, des cas d'échecs thérapeutiques a permis de d'ajuster les résultats parasitologiques (Figure 5). Ces résultats ont permis de différencier les cas recrudescents parasitaires des nouvelles infections chez les patients au cours du suivi. Ainsi, la prévalence des échecs thérapeutiques, dus à la recrudescence, était de 5,98 % (IC95 % = [2,44 - 11,94]) dans la population d'étude.

Par ailleurs nous n'avons pas observé une influence de la zone d'étude sur la prévalence des échecs thérapeutiques (Tableau 1). En effet la prévalence des échecs était statistiquement similaire pour tous les sites ($p = 0,140557$). Au sein d'un même faciès épidémiologique les échecs thérapeutiques ne variaient pas significativement ($p = 0,131888$).

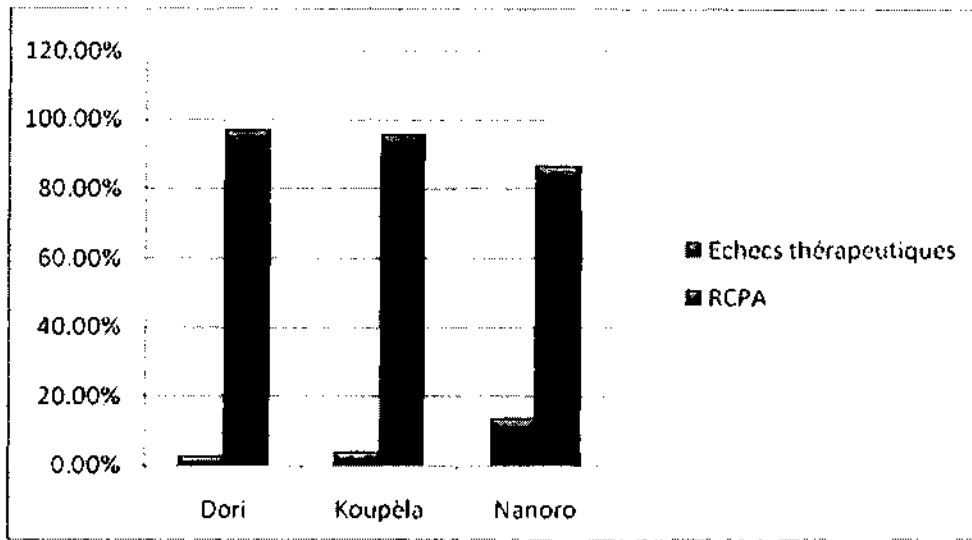


Figure 5 : Résultats cliniques et parasitologiques par site d'étude après ajustement par la PCR

Tableau VII : Résultats cliniques et parasitologiques par faciès épidémiologique après un ajustement par la PCR

	Faciès de Nanoro + Koupèla	Faciès de Dori	p
Echecs thérapeutiques	7,4 % (6/81)	2,8 % (1/36)	0,305691

Par ailleurs aucune variation significative n'a été observée quant à la survenue des échecs thérapeutiques en fonction du sexe La prévalence était de (2/7) et (59/110) respectivement chez les hommes et chez les femmes ($p = 0,257052$).

5.3. PREVALENCE DE L'ALLELE *PFMDR1-184*

Le génotype de l'allèle *Pfmdr1-184* a pu être déterminé pour 100% (118/118) des échantillons. La prévalence de l'allèle mutant *Pfmdr1-184F*, avant la thérapie à l'amodiaquine était de 69,49 % (IC95% = [60,34; 77,63]) dans la population plasmodiale rencontrées. Cette prévalence n'était pas différente en fonction des sites d'études ($p = 0,423196$). Le Tableau 2 ci-dessous donne les prévalences des allèles en fonction des sites.

La répartition de l'allèle mutant était uniforme quelque soit l'âge du sujet ($p = 0,404363$). Il en était de même pour la distribution de dans les deux sexes ($p = 0,199287$).

Tableau VIII: Prévalence des allèles en fonction du site d'étude

	Dori	Koupéla	Nanoro	p
<i>Pfmdr1-Y184F</i>	77,8% (28/36)	66,7% (34/51)	64,5% (20/31)	0,42
<i>Pfmdr1-184F</i>	22,2% (8/36)	33,3% (17/51)	35,5% (11/31)	0,42

5.4. RELATION ENTRE LA MUTATION *PFMDR1-Y184F* ET LES ECHECS THERAPEUTIQUES A L'AMODIAQUINE.

Afin de déterminer si la présence de la mutation *Pfmdr1-184F*, en période prétraitement, était associée aux échecs thérapeutiques à l'amodiaquine; nous avons comparé les prévalences de l'allèle mutant *Pfmdr1-184F* chez les cas d'échecs thérapeutiques (recrudescences = 10/13) et chez les cas de RCPA (72/105). Nous avons constaté que statistiquement il n'existait pas d'association entre l'allèle mutant *Pfmdr1-84F* et les échecs thérapeutiques dus à une recrudescence des parasites ($p = 0,395661$).

VI. DISCUSSION

6.1. L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE DE L'AMODIAQUINE.

Le diagnostic différentiel des parasites recrudescents et de parasites nouvellement infectants a permis de détecter 5,98 % d'échecs thérapeutiques à l'amodiaquine. Une étude d'efficacité thérapeutique de l'amodiaquine menée par une équipe de l'IRSS/DRO en 2005 révèle 8,1 % d'échecs thérapeutiques à l'amodiaquine (Zongo *et al.*, 2005) à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). Une comparaison révèle que la différence n'est pas statistiquement significative ($p = 0,490609$).

Nous avons constaté que ni la localité ni le faciès épidémiologique ni le sexe du patient n'étaient liés à la survenue d'échecs thérapeutiques. Ceci s'expliquerait par le fait que les échecs thérapeutiques seraient dus à des facteurs liés au parasite et à l'immunité de l'hôte.

En fonction de l'âge du patient, nous avons enregistré 7 cas d'échecs thérapeutiques chez les enfants de moins de 11 ans tandis qu'aucun cas d'échec n'a été constaté chez les patients d'au plus 10 ans. Ce constat nous fait émettre l'hypothèse selon laquelle l'âge est un facteur de risque pour la survenue des échecs thérapeutiques. Cette hypothèse est soutenue par des études d'efficacité thérapeutiques qui ont montré des Odds Ratios avec leurs intervalles de confiance supérieurs à 1 (Djimé *et al.*, 2001; Tinto *et al.*, 2003; Khalil *et al.*, 2005). Cependant cette hypothèse n'était pas vérifiée dans la présente étude car statistiquement il n'y avait pas d'association entre l'âge et les échecs thérapeutiques à l'amodiaquine. L'on pourrait probablement aboutir à cette association à condition d'effectuer des études d'ordre immunogénétique.

6.2. PREVALENCE DE L'ALLELE PFMDR1-184F EN PERIODE PRETRAITEMENT A L'AMODIAQUINE

Après analyse par PCR nichée suivie d'une restriction enzymatique par Dral, nous avons obtenu, pour l'allèle mutant *Pfmdr1-184F*, une prévalence de 69,49 % (82/118). avec IC95% = [60,34 - 77,63].

Etant donné que l'amodiaquine était moins utilisée que la chloroquine, ces mutations proviendraient probablement d'une sélection contre la chloroquine. Par ailleurs, vu que la chloroquine et l'amodiaquine ont le même mode d'action, certaines souches mutantes chloroquine résistantes pourraient simultanément être amodiaquine résistantes.

6.3. RELATION ENTRE LA MUTATION PFMDR1-184F ET LES ECHECS THERAPEUTIQUES DUS A LA RECRUDESCENCE

Après comparaison de la prévalence de l'allèle mutant *Pfmdr1-184F* chez les patients avec un RCPA et chez les patients ayant présentés un échec thérapeutique du à la recrudescence, nous avons constaté qu'il n'existait pas association entre la présence de l'allèle mutant et la survenue d'échecs thérapeutiques. Dokomajilar et ses collaborateurs avaient abouti au même résultat (Dokomajilar *et al.*, 2005) .

VII. CONCLUSION

Dans le but de déterminer le rôle de la mutation *Pfmdr1-184F* dans les cas d'échecs thérapeutiques à l'amodiaquine, nous avons mesuré la prévalence des échecs thérapeutiques et celle de l'allèle mutant dans la population d'étude. Nous avons constaté que:

- La prévalence des échecs thérapeutiques dus à la recrudescence était de 5,98 % dans nos sites d'étude.
- La prévalence de l'allèle mutant *Pfmdr1-184F* était de 69,49 %.
- 66,7 % des cas d'échecs thérapeutiques hébergeaient des parasites ayant l'allèle mutant *Pfmdr1-184F*

Du point de vue statistique, il n'existait pas d'association entre la présence de l'allèle mutant et la survenue d'échecs thérapeutiques.

L'amodiaquine, du fait de son coût relativement faible, et de son efficacité (5,8 % d'échecs thérapeutiques) s'avère un médicament profitable dans les combinaisons thérapeutiques recommandées par l'OMS pour les traitements antipaludiques.

Cette étude confirme que l'allèle mutant *Pfmdr1-Y184F* n'est pas la cause directe des échecs thérapeutiques à l'amodiaquine. Ce qui oriente nos futures recherches vers la détermination du rôle exact de la mutation *Pfmdr1-184F* dans les échecs à l'amodiaquine ainsi que l'investigation sur le rôle des autres mutations *Pfmdr1* (1034, 1042, 1246...) dans les résistances à cet antipaludique.

Perspective

Mesure de la pharmacocinétique de l'amodiaquine

Au cours de cette étude aucune propriété pharmacologique de l'amodiaquine n'a été mesurée. La mesure de la pharmacocinétique du médicament chez les sujets d'étude permettrait d'évaluer la demi-vie de l'amodiaquine. La connaissance de cette demi-vie, en plus des résultats cliniques et parasitologiques, permettrait une meilleure interprétation de la chimiorésistance pour un sujet donnée et cela en accord avec la définition de la notion de chimiorésistance (Bruce-chwatt *et al.*, 1986).

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Conway D.J. and J. Baum, 2002. In the blood - the remarkable ancestry of *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*, 18, 8, 351-355.
2. Joy D.A., X. Feng, J. Mu, T. Furuya, K. Chotivanich, A.U. Krettli, M. Ho, A. Wang, N.J. White, E. Suh, P. Beerli and X-Z. Su, 2003. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*, 300, 318-321.
3. Cortese J.F., A. Caraballo, C.E. Contreras and C.V. Plowe, 2002. Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. *Journal of Infectious Diseases*, 186, 999-1006.
4. Talisuna A.O., P. Bloland and U. D'Alessandro, 2004. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 1, 235-254.
5. Wongsrichanalai C., A.L Pickard, W.H Wernsdorfer and S.R Meshnick, 2002. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infectious Diseases*, 2, 209-218.
6. Kiszewski A.E. and A. Teklehaimanot, 2004. A review of the clinical and epidemiologic burdens of epidemic malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(Suppl 2), 128-135.
7. Hastings I.M., 2004. The origins of antimalarial drug resistance. *Trends in Parasitology*, 20, 11, 512-518.
8. Snow R.W., CA. Guerra, A.M. Noor, H.Y. Myint and S.I. Hay, 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434, 214-217.
9. Hay S.I, C.A Guerra, A.J Tatem, A.M Noor, and R.W. Snow, 2004. The global distribution and population at risk of malaria : past, present, and future. *Lancet Infectious Diseases*, 4, 327-36
10. Alene G.D. and S. Bennett. 1996. Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* malaria in Ethiopia and Eritrea. *Tropical Medicine and International Health*, 1, 810-815.
11. Barennes H., N. Nagot, I. Valea, T. Koussoubé-Balima, A. Ouedraogo, T. Sanou and S. Yé. 2004 A randomized trial of amodiaquine and artesunate alone and in combination for the treatment uncomplicated falciparum malaria in children from Burkina Faso. *Tropical Medicine and International Health*, 9, 4, 438-444.
12. Bruce-Chwatt L.J., R.H. Black, C.J. Canfield, D.F. Clyde, W. Peters and W. Wernsdorfer, 1986. Chemotherapy of malaria. *WHO Monogr. Ser.* 2,27.

13. Cowman A.F.T, M.J. Morry, B.A. Biggs, G.A.M. Crosst and S.J. Foote. 1988. Amino acid changes linked to pyrimethamine. resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 85, 9109-9113.
14. D'Alessandro U. and F.O. ter Kuile. 2006. Amodiaquine, malaria, pregnancy : the old new drug, 368, 1306-1307. *Lancet*, 368, 9544, 1306-1307.
15. DiourteY., A. Djimde, O.K. Doumbo, I. Sagara, Y. Coulibaly, A. Dicko, M. Diallo, M. Diakite, J.F. Cortese, and C.V. Plowe. 1999. Pyrimethamine-sulfadoxine efficacy and selection for mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase in Mali. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60, 475-478.
16. Djimde A., O.K. Doumbo, J.F. Cortese, K. Kayentao, S. Doumbo, Y. Diourte, A. Dicko X-Z. Su, T. Nomura, D.A. Fidock, T. Wellems and C.V. Plowe, 2001. A Molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *New England Journal of Medicine*, 344, 257-263.
17. Dokomajilar C. Z.M. Lankoande, G. Dorsey, I. Zongo, J-B. Ouedraogo and P.J. Rosenthal roles of specific *Plasmodium falciparum* mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75, 1, 162-165.
18. Duraisingh M.T., P. Jones, I. Sambou, L. von Seidlein, M. Pinder and D.C. Warhurst. 2000. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 108, 13-23.
19. Ferdig M.T., X. Feng, D.A. Joy, J. Duan, T. Furuya, G. Subramanian, L. Aravind, R.A. Cooper, J.C. Wootton, M. Xiong and X.Z. Su. 2003. Multiple transporters associated with malaria parasite response to CQ and Quinine. *Molecular Microbiology*, 49, 977-989.
20. Fidock D.A., T. Nomura, A.K. Talley, R.A. Cooper, S.M. Dzekunov, M.T. Ferdig, L.M.B. Ursos, A.B.S. Sidhu, B. Naudé, K.W. Deitsch, X.Z. Su, J.C. Wootton, P.D. Roepe and T.E. Wellems. 2000. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, 6, 4, 861-871.
21. Grandesso F., C. Bachy, I. Donam, J. Ntambi, J. Habimana, U. D'Alessandro J. Maikere, V. Vanlerberghe, C.H. Kerah and J-P. Guthmann, 2006. Efficacy of chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria among children under .five in Bongor and Koumra,

- Chad. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 419-426.
22. Hastings I.M., W.M. Watkins and N.J. White. 2002. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half life. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London Ser. B*, 357, 505-519
 23. Hastings, I. M. 1997. A model for the origins and spread of drug-resistant malaria. *Parasitology*, 115:133-141.
 24. Hay S.I., C.A. Guerra and R.W. Snow. 2004. Determination of country populations at malaria risk of different endemicities: report on agreement to perform work (APW) for WHO/Roll Back Malaria. Oxford, Oxford University, Department of Zoology, TALA Research Group, August 2004 (M50/370/19).
 25. Holmgren G., J.P. Gil , P.M. Ferreira, M.I. Veiga, C.O. Obonyo and A. Björkman, 2006. Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of *Pfcr1 76T* and *Pfmdr1 86Y*. *Infection, Genetics and Evolution*, 6, 4, 309-314.
 26. Ittarat I., W. Asawamahasakda, S.R. Meshnick.1994. The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. *Experimental Parasitology*; 79, 50-56.
 27. Khalil I.F. M. Alifrangis, D.S. Tarimo, T. Staalso, G.M.H. Satti, T.G. Theander, A.M. Ronn and I.C. Bygbjerg, 2005. The roles of the *pfcr1 76T* and *pfmdr1 86Y* mutations, immunity and the initial level of parasitaemia, in predicting the outcome of chloroquine treatment in two areas with different transmission intensities. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 99, 5, 441-448.
 28. Kiszewski A.E. and A. Teklehaimanot, 2004. A review of the clinical and epidemiologic burdens of epidemic malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(Suppl 2), 128-135
 29. Korenromp E.L. for the Roll Back Malaria Monitoring and Evaluation Reference Group & MERG Task Force on Malaria Morbidity. Malaria incidence estimates at country level for the year2004-proposed estimates and draft report. Geneva, Roll Back Malaria, World Health Organization, 2004.
 30. Le Bras J. and R. Durand. 2003. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 17, 2, 147-153.
 31. Miller L.H., D.I. Baruch, K. Marsh and O.K. Doumbo. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415, 673-679
 32. Molyneux D.H., K.Floyd, G. Barnish and E.M. Fevre. 1999. Transmission control and drug resistance in malaria: a crucial interaction. *Parasitology Today*, 15, 6, 1 238-240.

33. Moody A. 2002. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 1, 66-78.
34. Mugittu K., M. Adjuik, G. Snounou, F. Ntoumi, W. Taylor, H. Mshinda, P. Olliaro and HP. Beck, 2006. Molecular genotyping to distinguish between recrudescents and new infections in treatment trials of *Plasmodium falciparum* malaria conducted in Sub-Saharan Africa: adjustment of parasitological outcomes and assessment of genotyping effectiveness. *Tropical Medicine and International Health*, 11, 9, 1350-1359.
35. Payne D. 1988. Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*? *Parasitology Today*, 4, 112-115.
36. Plowe C.V., A. Djimde, M. Bouare, O. Doumbo, T.E. Wellems, 1995. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52, 565-568.
37. Andrews J.M., 1955. Man's mastery of malaria. *American Journal of Public Health and Nations Health*, 465, 11, 1490-1491.
38. Gallup J.L. and J.D. Sachs. 2001. The economic burden of malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64, 1-2 Suppl, 85-96.
39. Snounou G. and H.P. Beck. 1998. The use of PCR genotyping in assesment of recrudescence or re-infection after antimalarial drug treatment. *Parasitology Today*, 14, 11, 462-467.
40. *The world health report 2003: shaping the future*. Geneva, World Health Organization, 2003
41. *The world health report 2003: shaping the future*. Geneva, World Health Organization, 2003.
42. Tinto H., J.B. Ouedraogo, A. Erhart , Van C. Overmeir , J.C. Dujardin, Van Marck E, T.R. Guiguemde and U. D'Alessandro. 2003. Relationship between the Pfcrt T76 and the Pfmdr-1 Y86 mutations in *Plasmodium falciparum* and in vitro/in vivo chloroquine resistance in Burkina Faso, West Africa. *Infection, Genetics and Evolution*, 3, 4, 287-292
43. Wernsdorfer W.H. 1994. Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica*, 56,143-156
44. White N. 1999. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London Ser. B*, 354, 739-749.
45. White N.J. 1999. Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. *Parassitologia*, 41, 301-308.

46. WHO, 2003. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. 2003. <http://www.who.int/malaria/docs/ProtocolWHO.pdf>
47. WHO/HTM/RBM/2003.50. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria.
48. World Health Organisation, 1965. Resistance of malaria parasites to drugs. WHO. Technical Report, Ser. 296:1-65
49. World Health Organization. 2001. Monitoring antimalarial drug resistance. Report of WHO Consultation, Geneva, Switzerland, 3-5 December 2001. WHO monographs WHO/CDS/CSR/EPH/2002.7 and WHO/CDS/RBM/2002.29. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
50. World Malaria Report 2005. Global distribution of malaria transmission risk, 2003 (Hay SI, Guerra CA, Snow RW. Determination of country populations at malaria risk of different endemicities: report on agreement to perform work (APW) for WHO/Roll Back Malaria. Oxford, Oxford University, Department of Zoology, TALA Research Group, August 2004 (M50/370/19))<http://rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm>
51. World Malaria Report 2005 Estimated incidence of clinical malaria episodes caused by any species resulting from local transmission, country level averages, 2004 (Kiszewski EL for the Roll Back Malaria Monitoring and Evaluation Reference Group & MERG Task Force on Malaria Morbidity. Malaria incidence estimates at country level for the year 2004-proposed estimates and draft report. Geneva, Roll Back Malaria, World Health Organization, 2004.)<http://rbm.who.int/wmr2005/html/map3.htm>
52. World Malaria Report 2005 Global distribution of dominant malaria vectors, 2003 (Kiszewski A et al. A global index representing the stability of malaria transmission. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2004, 70(5):486-498.)<http://rbm.who.int/wmr2005/html/map2.htm>
53. Zongo I., G. Dorsey, N. Rouamba, C. Dikomajilar, M. Lankoande, J.B. Ouedraogo and P.J. Rosenthal, 2005. Amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and combination therapy for uncomplicated falciparum malaria: a randomized controlled trial from Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 5, 826-832.