

**BURKINA FASO
UNITE-PROGRES-JUSTICE**

**MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE,
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL



DEA-B

1130

MAH

MEMOIRE

Présenté par :

Mahamat Hassan Abdel-Aziz

En vue de l'obtention du

**Diplôme d'Etudes Approfondies
En**

Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques

Sur le thème

***Etude de la relation entre la présence de la mutation
Pfcrt 76T et l'efficacité thérapeutique
de l'association artesunate amodiaquine dans le traitement du
paludisme simple à Plasmodium falciparum au Burkina Faso***

Soutenu le 1^{er} juillet 2008

Devant le jury

Composé de :

Pr Adrien Belem : Président du jury

Dr Issa SIDIBE

Pr Jean-Bosco OUEDRAOGO (Directeur de mémoire)

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

- ma mère Mariam Djama-adine
- mon père Abdel-Aziz Adam
- tous mes frères et sœurs
- toute ma grande famille et tous ceux qui me sont chers.

Remerciements

C'est avec un grand plaisir que je réserve ces lignes en signe de gratitude et de reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Je voudrais tout d'abord exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean Bosco OUEDRAOGO. Vous nous honorez doublement puisque non seulement vous m'avez accueilli dans votre laboratoire pour la préparation de ce mémoire et mis à ma disposition les moyens nécessaires à sa réalisation, mais aussi vous avez bien voulu accepter de diriger ce travail. Malgré vos multiples occupations, vous êtes toujours disponible pour les étudiants que nous sommes. J'ai été particulièrement sensible à l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Recevez mes sincères remerciements.

Je voudrais également exprimer mes remerciements sincères à Monsieur le Professeur Georges Anicet OUEDRAOGO coresponsable de DEA de Biologie Appliquée et Modélisation de Systèmes Biologiques. J'ai été émerveillé par votre disponibilité, votre grand humanisme, votre simplicité. Vous êtes un modèle pour moi à plus d'un titre. Soyez rassuré de ma profonde gratitude.

Le Pr. Adrien Belem, malgré vos multiples occupations, vous n'avez ménagé aucun effort pour présider le jury de ce mémoire. J'ai été particulièrement sensible à l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Recevez mes sincères remerciements.

Merci à tous les membres du jury d'avoir accepté de lire et critiquer ce mémoire. Je souhaiterai également remercier chaleureusement tous ceux qui ont rendu ce travail possible par leurs conseils, remarques et encouragements. Plus spécifiquement, un grand merci à Dr Sorgho Herman et à Dr Zongo Issaka pour les relectures de ce mémoire aux différentes étapes de son accomplissement et pour leurs témoignages d'amitiés.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de toute l'équipe enseignante du DEA de Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques de l'Université Polytechnique de Bobo-dioulasso.

J'ai une pensée particulière pour l'ensemble des stagiaires et toutes les personnes que j'ai rencontrées à l'IRSS et au Muraz et qui ont su installer un climat chaleureux au sein duquel il était agréable de travailler.

Je ne saurais terminer sans remercier particulièrement mes frères et sœurs : Mahamat Amine Abdel-Aziz, Abdelmounim Abdel-Aziz, Mahamat Habib Abdel-Aziz, Fatime Zara Abdel-Aziz, Zenaba Abdel-Aziz et tous mes amis et collègues .

Que Dieu nous donne la force d'aller le plus loin possible dans nos activités de recherche !

Résumé

L'apparition et le développement de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antimalariques couramment utilisés (chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine) ont conduit à l'adoption des combinaisons à base d'artémisinine parmi lesquelles l'artésunate-amodiaquine qui a montré une bonne efficacité thérapeutique dans les zones où l'amodiaquine en monothérapie demeure efficace. La mutation génétique *Pfcr1 76T* a été validée comme marqueur conférant la résistance à la chloroquine. A ce jour il n'y a pas de marqueur connu associé à la résistance à l'artésunate. Du fait de la similarité structurale de l'amodiaquine avec la chloroquine, il s'avère intéressant d'investiguer l'existence d'une association entre la présence du point de mutation *Pfcr1 76T* et l'efficacité de l'association artésunate-amodiaquine pour une meilleure surveillance de l'évolution de la résistance de cet ACT (Artemisinin-base Combination Therapies).

Nous avons conduit un essai clinique randomisé ouvert dans deux sites ruraux du Burkina Faso (Dandé et Gourcy) au cours duquel nous avons évalué l'efficacité thérapeutique de l'artésunate-amodiaquine et de l'artémether-luméfantrine chez des patients présentant un paludisme simple et suivis pendant 28 jours (selon le protocole d'OMS 2005 pour l'évaluation de l'efficacité des antimalariques). L'étude du polymorphisme parasitaire par PCR a permis de distinguer les nouvelles infections des recrudescences (vrais échecs).

Au total 47 patients ont été traités avec l'artésunate-amodiaquine et feront l'objet de cette étude. L'échec thérapeutique cumulé (clinique et parasitologique) était de 14,89% (7/47). L'étude du polymorphisme parasitaire a montré 12,77% (6/47) de cas de recrudescence (échec vrais). Au total 48,94% des patients étaient porteurs de la mutation *Pfcr1 76T* avant le traitement et 66,67% parmi les recrudescences.

Au Burkina Faso, artésunate-amodiaquine reste toujours efficace, il n'y avait pas d'association de la mutation ponctuelle *Pfcr1 76T* avec les résultats cliniques des patients traités avec Artésunate-amodiaquine. Cependant une vigilance sur la surveillance de cette efficacité et l'orientation de marqueur spécifique est nécessaire.

Mots clés : Plasmodium falciparum, artésunate-amodiaquine, Pfcr1 76T, Burkina Faso

Abstract

The emergence and development of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalariques commonly used (chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine) led to the adoption of combinations based on artemisinin including artesunate amodiaquine, which has showed a good therapeutic efficacy in areas where amodiaquine monotherapy remains effective. The genetic mutation Pfcrt 76T has been validated as a marker that confers resistance to chloroquine. So far there is no known marker associated with resistance to artesunate. Because of the structural similarity of amodiaquine with chloroquine, it is interesting to investigate the existence of an association between the presence of point mutation Pfcrt 76T and effectiveness of the association for artesunate amodiaquine - better monitoring of the development of resistance that ACT (Artemisinin-based Combination Therapies).

We conducted a randomized clinical trial opened in two rural sites in Burkina Faso (Dandé and Gourcy) during which we assessed the therapeutic efficacy of artesunate-amodiaquine and artemether-lumefantrine in patients with uncomplicated malaria and monitored for 28 days (according to the WHO 2005 protocol for evaluating the effectiveness of antimalariques). The study polymorphism parasitic PCR has helped distinguish the new infections from recrudescences (Real failures).

In total 47 patients were treated with artesunate and amodiaquine and included in this study. The cumulative treatment failure (clinical and parasitological) was 14.89% (7 / 47). The study of parasitic polymorphism showed 12.77% (6 / 47) cases of recrudescence (real failure). A total 48.94% of patients were carriers of the mutation Pfcrt 76T before treatment and 66.67% among recrudescences

In Burkina Faso, artesunate-amodiaquine is still effective, there was no association of the point mutation Pfcrt 76T with clinical outcomes of the patients treated with Artesunate amodiaquine. Other point mutations maybe investigated to help for these drugs failure prediction.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, artesunate-amodiaquine, Pfcrt 76T, Burkina Faso

Sigles et Abréviations

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
<i>Pfcr1</i>	:	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
<i>Pfmdr1</i>	:	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1
<i>Pfdhfr</i>	:	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase
<i>Pfdhps</i>	:	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydropteroate synthetase
SP	:	Sulfadoxine-pyrimethamine
PFCRT	:	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter protein
Pgh1	:	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1 protein
dNTPs	:	Désoxyribonucléosides triphosphates
ATP	:	Adénosine triphosphate
EPT	:	Echec Parasitologique Tardif
ETP	:	Echec Thérapeutique Précoce
ETT	:	Echec Thérapeutique Tardif
ETG	:	Echec Thérapeutique Général
RCPA	:	Réponse Clinique Parasitologique Adéquate
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 Science de la Santé/ Direction Régionale de l'Ouest
AS/AQ	:	Artésunate/amodiaquine
ACT	:	Combinaison thérapeutique à base d'Artemisinine
PNLP	:	Programme National de Lutte contre le Paludisme
CNRF	:	Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme

Liste des Tableaux et Figures

Tableaux

Tableau I : Suivi des patients et collecte des échantillons biologiques.....	18
Tableau II :Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR de <i>Pfprt</i> 76.....	22
Tableau III : Programmes d'amplifications et séquences des primers pour analyse de <i>Pfprt</i> 76.....	23
Tableau IV : Composition du milieu réactionnel pour la digestion avec APO1.....	24
Tableau V :Composition des mélanges réactionnels pour la première et la deuxième PCR.....	25
Tableau VI : Tableau récapitulatif des programmes d'amplifications de chaque gène.....	26
Tableau VII: Analyse de l'efficacité du traitement selon le site.....	31
Tableau VIII : Analyse de l'efficacité du traitement après ajustement par la PCR.....	30
Tableau IX : Association <i>PfprtK76T</i> et réponse clinique au traitement	31

Figures

Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde (WHO, 2004).....	4
Source : http://www.who.int/malaria/malariaendemiccountries.html	
Figure 2: Cycle de vie du <i>Plasmodium sp</i>	5
Source : http://www.dpd.cdc.gov/dpdx	
Figure 3 : Profil de l'étude	28

I. INTRODUCTION

Le paludisme ou malaria est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium*. Le parasite est transmis à l'homme par la piqûre de la femelle d'un moustique du genre Anophèle.

Le paludisme demeure, avec le sida et la tuberculose l'une des affections les plus meurtrières et les plus préoccupantes de la planète. On estime à 2,7 millions le nombre annuel de décès attribués au *Plasmodium falciparum*, l'Afrique Sub-saharienne à elle seule présente 80% à 90% et dans la majorité des cas ce sont des enfants et des femmes enceintes (OMS, 2005). Au Burkina Faso en 2005 le paludisme représentait 35,12% des motifs de consultations, 40,83% des motifs d'hospitalisation et 37,5% des causes de décès. Les enfants de moins de 5 ans restent les plus touchés avec 44,86% de motifs de consultations, 54,94% de motifs d'hospitalisation et 57,29% de motifs de décès (Ministère de la Santé, 2006)

La situation est d'autant plus préoccupante que le paludisme sévit dans les couches les plus pauvres de nos populations. La charge financière engendrée par un épisode de paludisme en Afrique noire est estimée à environ 1330F CFA à 16625F CFA pour le seul traitement et 133F CFA à 9975F CFA pour la prévention mensuelle (Kager, 2002).

L'une des causes majeures de la 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 baisse d'efficacité des antipaludiques sur les Plasmodies, 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 *Pfprt* et *Pfdhfr* ont été respectivement associés à la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la sulfadoxine –pyriméthamine (Fidock et al., 2000 ; Cowman et al., 1988).

Ainsi, les marqueurs *Pfprt-K76T* et *Pfmdr1-N86Y* ont été démontrés associés à la résistance à la chloroquine (même famille chimique que l'amodiaquine). Mais leur présence n'est pas indispensable pour la survenue de la chimiorésistance à l'amodiaquine (Holmgren et al., 2005). Aussi, l'amodiaquine demeure t-il toujours un antipaludique efficace et financièrement plus accessible aux pays en voie de développement (D'Alessandro et Kuile, 2006 ; Grandesso et al. 2006). L'amodiaquine, en raison de son coût

abordable, son efficacité avérée sur certaines souches chloroquino-résistantes (Brasseur, 1999, Barenne, 2004) et sa bonne tolérance se trouve aujourd'hui être au centre de nombreux essais thérapeutiques en association avec les dérivés de l'artémisine. Cependant, il n'existe pas de marqueurs de résistances moléculaires capables de prédire la résistance de *Plasmodium falciparum* à l'amodiaquine et à l'artésunate. C'est dans ce contexte que notre travail a pour objectif majeur d'étudier la relation entre la présence de la mutation génétique *Pfcr176T* et les échecs thérapeutiques à l'association artésunate-amodiaquine. De façon spécifique, il s'agira de :

- déterminer la prévalence des échecs cliniques et parasitologiques de *Plasmodium falciparum* à la combinaison artésunate-amodiaquine dans la population d'étude ;
- déterminer la prévalence de la mutation génétique *Pfcr176T* dans la population d'étude ;
- établir l'association entre la présence de la mutation *Pfcr176T* et la résistance in vivo du *Plasmodium falciparum* à la combinaison artésunate-amodiaquine ;

II GENERALITES

2.1 Le parasite

Le *Plasmodium* fait partie du phylum des sporozoaires au même titre que les toxoplasmes. C'est un parasite intracellulaire appartenant à l'embranchement des Apicomplexa, au Sous-embranchement des Hemosporida, à l'ordre de Hemosporida, à la famille des Plasmodiidae et au genre *Plasmodium*.

Plus de 100 espèces plasmodiales ont été décrites à ce jour mais seulement 4 espèces sont parasites de l'homme, qui est leur principal hôte réservoir. 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*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium falciparum*. Cette dernière est l'espèce la plus pathogène chez l'homme et est responsable de 74% des cas cliniques (Korenromg, 2004). Ce sont des protozoaires intracellulaires dont la multiplication est asexuée (ou schizogoniques) chez l'homme et sexuée (ou sporogoniques) chez le moustique vecteur : l'anophèle femelle (Gentilini M., 1990).

2.2 Le vecteur : l'Anophèle femelle

Au cours de leurs repas sanguins, les plasmodiums sont transmis aux humains par les femelles de certains moustiques du genre Anophèle.

Leur reproduction exige du sang, de l'eau et de la chaleur. La femelle fécondée ne peut pondre qu'après un repas sanguin, pris sur l'homme ou sur l'animal. Les gîtes de ponte varient selon l'espèce anophélienne : collections d'eaux permanentes ou temporaires. Dans l'eau les œufs se transforment en larves puis en nymphes, desquels naîtra une nouvelle génération d'adultes.

2.3. Répartition géographique du paludisme

Dans le monde, annuellement 250 à 500 millions de cas cliniques de paludisme est enregistré (Korenromp, 2004) occasionnant plus d'un million de décès. Environ 60% des cas cliniques et plus de 80% de cas de décès ont lieu en Afrique au Sud du Sahara (WHO, 2003).

En dehors de l'Afrique, 70% de cas mondiaux sont observés dans 6 pays : L'Inde, le Brésil, L'Afghanistan, le Viêt-Nam, la Colombie et les Iles Salomon (anonyme <http://astrium.Com/maladies:visa09-6.Html>; 11/2000).

Toutes les évaluations épidémiologiques s'accordent à dire que les personnes les plus vulnérables au paludisme sont les enfants de moins de 5ans 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).fig. (1)



Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde (WHO, 2004)

Source : <http://www.who.int/malaria/malariaendemiccountries.html>

2.4. Le cycle parasitaire du *Plasmodium* sp

Le cycle de vie du *Plasmodium* (Figure 2) 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.

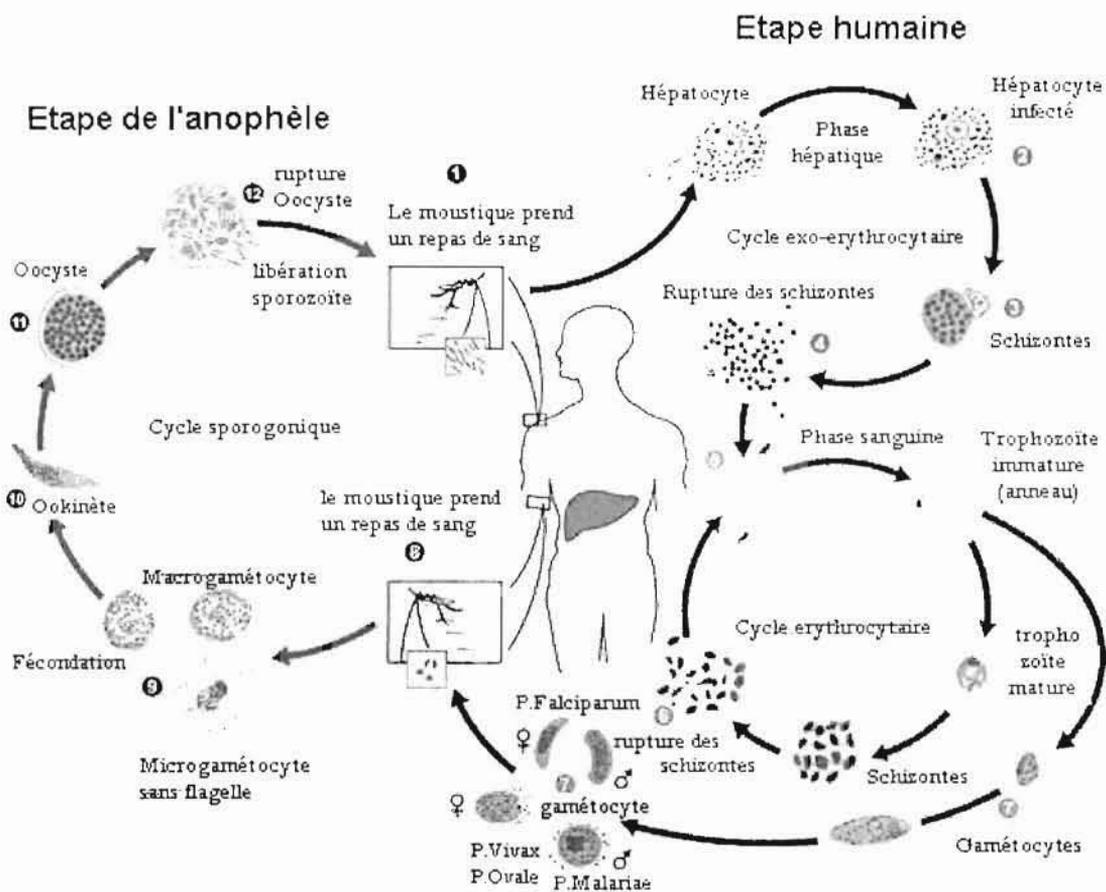


Figure 2: Cycle de vie du *Plasmodium* sp

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

La première partie de ce cycle commence quand un moustique infecté par *Plasmodium falciparum* par exemple, injecte 5 à 20 Sporozoïtes dans le sang humain au cours de son repas. Ces sporozoïtes migrent rapidement (30 minutes) vers le foie et envahissent les hépatocytes où ils se développent en schizontes puis en mérozoïtes.

C'est la phase hépatocytaire ou première phase de multiplication asexuée, au cours de laquelle le parasite va puiser le glucose contenu dans les cellules du foie indispensable pour sa croissance.

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 il y aura une invasion des hématies de l'hôte.

Après l'invasion des hématies, les mérozoïtes se multiplient et se développent en trophozoïtes puis en schizontes. La prolifération de schizontes éclate les hématies et libèrent de nouveaux mérozoïtes. Ces mérozoïtes réinfectent d'autres hématies établissant ainsi des cycles synchrones, chaque cycle dure en moyenne 24 heures à 48 heures (Brumpt, 1949). Il faut toute fois noter que la durée du cycle est fonction de l'espèce plasmodiale.

Après un certains nombre de cycles, certains mérozoïtes vont se transformer en éléments à potentiel sexuel : les gamétocytes. Les conditions de cette transformation ne sont pas encore élucidées. On pense notamment à la pression médicamenteuse, l'état immunitaire de l'hôte ou encore à des contraintes métaboliques (OMS, 1987). Les éléments à potentiel sexuel mâle donnent les micro-gamétocytes ; les éléments à potentiel sexuel femelle donnent quant à eux les macro-gamétocytes. Les gamétocytes formés ne peuvent poursuivre leur développement que dans l'abdomen de l'anophèle. De plus ils ne sont rencontrés que dans le sang périphérique: une adaptation du parasite pour assurer la propagation de l'espèce. 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. Dans l'intestin du moustique, le micro-gamète et le macro-gamète se fusionnent pour donner un œuf diploïde ou zygote (Robert et Boudin, 2003). Le zygote se transforme après deux divisions en ookynete qui va s'attacher puis traverser la paroi intestinale du moustique. 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 lors d'un deuxième repas sanguin.

2.5. Diagnostique biologique du paludisme

2.5.1. Diagnostic direct

Il est réalisé sur des prélèvements sanguins qui sont effectués si possible au moment du pic fébrile et avant toute prise d'antipaludique. La recherche parasitologique se fait sur le frottis mince ou la goutte épaisse.

- La Goutte Epaisse (GE). Elle est la technique de référence (technique de concentration). Sa réalisation consiste à déposer une goutte de sang sur une lame porte-objet propre. Le sang est rapidement defibriné par un mouvement en spirale à l'aide d'un coin d'une autre lame. Après séchage le prélèvement est coloré soit au Giemsa 10% ou au Field. La lecture se fait au microscope optique à l'objectif x100. La sensibilité de la technique est de 6 parasites/ μ L (Tinto et *al.* 2004).
- Le Frottis Mince, il s'agit d'un étalement mince d'une goutte de sang sur une lame porte-objet. La sensibilité pour cette technique, est de 100 parasites μ L (Tinto et *al.* 2004).

La PCR, permet d'amplifier des séquences spécifiques d'acides nucléiques de *Plasmodium* (ARN 18S, circumsporozoite ; mérozoite 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 spécifique, de *Plasmodium* avec un seuil inférieur à cinq parasites par microlitre de sang (Moody, 2002).

2.5.2. Diagnostic indirect

Méthodes immunologiques

Ce sont :

- l'immunofluorescence indirecte (IFI) [Gentilini, 1986], l'immunoélectrophorèse, l'ELISA, l'hémagglutination,... Ces techniques sont surtout utilisées dans les enquêtes épidémiologiques.
- Le parasight : c'est une nouvelle méthode de diagnostic rapide dont le principe est basé sur la détection qualitative de l'antigène de la malaria à *P. falciparum* Histidine Rich Protein II (HRPII) sur sang total. Cette technique utilise des « bandelettes d'essai » qui permettent la détection du complexe antigène soluble-anticorps sous forme d'une bande colorée visible à l'œil nu.

2.6. Polymorphisme génétique de *Plasmodium falciparum*

Le *Plasmodium falciparum* possède trois types d'acides nucléiques : nucléaire, mitochondrial et plastidique utilisés pour l'étude de la diversité génétique du parasite. L'ADN nucléaire comporte 25 à 30x10⁶ 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 polymorphismes 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 mérozoïte de 190 KDA (Merozoïte 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 (Merozoïte surface Protein 2). La variabilité du block 3 (IC3D7 ou 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.

2.7. Traitement

L'objectif du traitement est d'éliminer les parasites et d'éviter l'évolution vers des formes graves ; le paludisme grave est une urgence thérapeutique.

De ce fait, devant toute suspicion de cas de paludisme, le praticien doit dans la mesure du possible faire la preuve parasitologique de l'affection et instaurer un traitement efficace sans tarder.

Les antipaludiques dont on dispose de nos jours peuvent être classés en quatre groupes.

2.7.1. Les schizonticides

Ils agissent sur les plasmodes à l'intérieur des hématies parasitées les empêchant ainsi de détruire l'hémoglobine.

Ils regroupent la quinine, l'amodiaquine, la chloroquine, l'halofantrine, la mefloquine les dérivés de l'artémisinine. Au sein des hématies parasitées, le *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.

2.7.2. Les antifolates

Ils interagissent avec la biosynthèse de l'ADN plasmodiale en inhibant les enzymes intervenant dans cette biosynthèse. Leur inconvénient est que leur demi vie est longue ce qui favoriserait l'apparition des phénomènes de chimiorésistance. On a dans ce groupe : Sulfadoxine, Pyriméthamine, Proguanil.

2.7.3. 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 inhibant les réactions redox telles que la Primaquine qui inhibe les réactions d'oxydoréductions des métabolites de la quinine. Elle est très active sur les parasites pré-erythrocytaires.

2.7.4. Les gametocytocides

Les gametocytocides (Primaquine) actuellement connus sous les amino-8-quinoleines, toutes toxiques et donc peu employées. Néanmoins, elles sont les seules à avoir réellement un effet sur les gamétocytes de *Plasmodium falciparum*.

2.8. Stratégie de lutte contre le paludisme

2.8.1. Lutte antivectorielle

Elle vise essentiellement à empêcher le contact homme -vecteur par :

- la protection individuelle par l'usage des moustiquaires imprégnées d'insecticides à effet rémanent tels que les pyréthrinoides, et l'usage de crèmes répulsives à base d'insecticides.
- La protection collective par l'usage de rideaux imprégnés et de grillages placés aux portes et fenêtres, la pulvérisation intra domiciliaire d'insecticides. La lutte anti-larvaire par l'usage de moyen chimique, biologique ou physique.

2.8.2. Traitement médicamenteux

Elle fait recours aux antimalariques :

La prévention, autrefois réservée aux sujets non immuns voyageant vers une zone d'endémie palustre et aux femmes enceintes, elle connaît un regain d'intérêt chez l'enfant.

2.9. Mécanisme d'action des antipaludiques

2.9.1. Les lysosomotropes

On distingue dans ce groupe les schizonticides sanguins dont la chloroquine, l'amodiaquine, la quinine, l'halofantrine et l'artémisine. Ces médicaments agissent en se concentrant dans la vacuole digestive du parasite empêchant ainsi celle-ci de digérer l'hémoglobine.

L'efficacité de ces antipaludiques dépendra en grande partie de la capacité du *Plasmodium* à les accumuler. Le mécanisme d'action de ces antipaludiques n'est pas encore bien élucidé. Cependant plusieurs théories développées par certains auteurs tentent de le démontrer.

Théories des récepteurs

- l'ADN : pendant longtemps, on a cru à une éventuelle interaction entre amino-4-quinoléines et nucléoprotéines. Cette hypothèse, évoquée dans les années 50 et 60 fut abandonnée par la suite jusqu'à la fin des années 80, et puis réexaminée par Meshnick compte tenu de l'affinité de la liaison entre la chloroquine et l'ADN *in vitro* (Kawky, 1989,).
- la ferriprotoporphyrine IX membranaire (FP) : le mécanisme de toxicité membranaire selon Fitch, les interactions entre la chloroquine et la FP jouent un rôle capital dans la concentration des schizonticides dans les vacuoles des parasites (Fitch, 1984 ; Chou et *al*, 1980) ont identifié la FP comme étant le récepteur à forte affinité et spécificité pour la chloroquine, la quinine et la mefloquine *in vitro* la FP (constituant à 90% de hemozoïne) est un produit de dégradation toxique (lytique) de la digestion de l'hémoglobine. Celle-ci se lie normalement à une protéine formée par le parasite (protéine liant l'hème), pour donner le pigment malarique non toxique (hémine). La chloroquine entre en compétition avec la protéine parasitaire et empêche la fixation et donc la détoxification de la FP celle-ci peut alors exercer son effet cytotoxique sur le parasite.

2.9.2. Les antimétabolites

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

La spécificité d'action des antimétabolites contre les plasmodies est basée sur la haute affinité de ces antimétaboliques pour les enzymes plasmodiales par rapport aux enzymes des cellules hôtes (Le bras et Bosco, 1991).

2.9.3. Les antibiotiques

Les antibiotiques possédant une activité (modérée) sont les cyclines, les quinolones, la clindamycine, l'érythromycine et dans une moindre mesure le chloramphénicol (Brysker, 1988). Ils agissent en inhibant la synthèse protéique au niveau des ribosomes 70s des mitochondries plasmodiales. Une étude a démontré par ailleurs qu'il y a un effet tardif attribué à l'action lente des antibiotiques sur la mitochondrie plasmodiale (Divo *et al*, 1985).

2.10 La chimiorésistance dans le paludisme.

2.10.1 Définition

La résistance aux antipaludiques est définie comme l'aptitude d'une souche de parasites du paludisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées, mais comprises dans les limites de tolérance du sujet (OMS, 1973).

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

Plusieurs théories ont été émises pour expliquer la résistance de *Plasmodium falciparum* aux amino-4-quinoléines. Toutes s'accordent à reconnaître que la caractéristique commune des parasites résistants est une altération de l'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive. Autrement dit, lorsqu'un parasite est résistant, il y'a un efflux rapide de l'antipaludique de sa vacuole digestive, ce qui lui permet de survivre. Les théories dominantes stipulaient que ces défauts d'accumulation étaient dus à une altération des gradients de pH et/ou de la perméabilité membranaire (Le Bras, 2003). Plus tard, les travaux de Würnsch *et al.* (1998) décrivent un autre mécanisme de résistance à la chloroquine reposant sur une stimulation de l'échange sodium-proton (Na⁺/H). Ces auteurs ont pu en effet démontrer que la chloroquine stimulait mieux l'échange sodium-proton chez les parasites sensibles et augmentait de ce fait le transport du médicament chez ces parasites, alors que le contraire se produisait chez les parasites résistants. Les derniers travaux sur la question se fondent essentiellement sur un déficit de la liaison chloroquine-ferriprotoporphyrine (CQ-FP) inhérent

à une altération dans l'environnement local de la FP plutôt qu'à l'implication d'un mécanisme de stimulation de l'échange Na^+/H^+ ou à une altération des gradients de pH (Bray, 1999).

Par ailleurs, des mutations ponctuelles du gène situé sur le chromosome 5 et codant pour une protéine, le *Pfmdr-1*, et celle d'un second gène situé cette fois-ci sur le chromosome 7 (*Pfeg2*) ont été présentées comme responsables de la résistance (Foote et al., 1990). Cependant d'autres études viendront réfuter ces théories (Grobusch, 1998, Durand, 1999). Récemment un troisième gène candidat, *Pfert*, situé sur le chromosome 7 à proximité du *Pfeg2* a été identifié et des mutations ponctuelles de ce gène sont retrouvées chez des souches chloroquino-résistantes *in vitro* (Fideck, 2000). Il est donc assez clair de nos jours que les résistances des parasites aux médicaments sont l'œuvre des mutations génétiques observées chez ces parasites (Djimé et al., 2001)

2.10.3. Les facteurs d'apparition et d'extension de la chimiorésistance

2.10.3.1. La pression médicamenteuse

L'utilisation massive des antipaludiques et surtout la chloroquine en chimioprophylaxie de masse, ou son utilisation à des doses curatives incomplètes contribue à la sélection des clones de parasites résistants. En effet, plus la pression médicamenteuse est forte et constante, plus les parasites s'adaptent. Cette adaptation se manifeste par une émergence de la chimiorésistance (Payne, 1988 ; Diourte et al., 1999).

2.10.3.2. L'immunité de l'hôte

L'expression de la résistance s'observe en général chez les sujets dont le niveau d'immunité est bas et ne suffit pas à éliminer les parasites avec l'aide du médicament. Ces sujets 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).

2.10.3.3. Le parasite

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 la transmission

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 chimiorésistances est élevé (White, 1999). Cependant, 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).

2.10.4. Les méthodes d'étude de la chimiorésistance

2.10.4.1. Les tests *in vitro*

Il consiste à mesurer l'inhibition de la maturation des parasites isolés, en présence de doses croissantes d'un antipaludique donné.

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

- Les tests optiques ; le micro-test OMS (Payne, 1990) et le semi-microtest (Le Bras, 1993) ont été mis au point à la fin des années 70 afin d'évaluer la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à certains médicaments : ils sont basés sur la capacité des doses croissantes d'antipaludiques testés à empêcher la maturation des trophozoïtes de *P. falciparum* en schizontes, lorsque le prélèvement sanguin est mis en culture dans du milieu RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) et incubé à 37°C, en présence du CO₂ (5%), pendant 24 à 48 heures.

Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI), pour le microtest (OMS) et en concentration inhibitrice 50% (CI50) ou (CI90) pour le semi-microtest.

- Les tests isotopiques ; il s'agit du microtest isotopique de Desjardins (Desjardins, 1979) et le semi-microtest isotopique de Le Bras et Deloron (Le Bras, 1984). Ce sont des modifications, respectivement, du microtest OMS et du semi-microtest optique par l'adjonction dans chaque cupule d'un radio-isotope, l'hypoxanthine tritiée. La maturation des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites. La mesure de la radioactivité se fait après 42 à 48 heures d'incubation. Les résultats sont donnés en coups par minutes et l'activité du médicament est exprimée en CL50 ou en CL90.
- Test de Makler ; c'est un test enzymatique fondé sur la capacité de la lactate déshydrogénase (LDH) de *Plasmodium falciparum* à utiliser rapidement la 3-acétylpyridine adénine dinucléotide dans la réaction aboutissant à la formation du pyruvate à partir de l- lactate.

2.10.4.2. Les tests *in vivo*

C'est l'évaluation de l'efficacité thérapeutique chez un patient présentant un paludisme (asymptomatique, simple ou compliqué) sur la base d'un protocole (qui a connu plusieurs modifications) développé par l'OMS

2.10.4.3. Les tests moléculaires

Il s'agit de techniques de biologie moléculaire utilisées pour la mise en évidence des mutations génétiques de l'ADN du parasite responsable de la résistance. La technique couramment utilisée pour la mise en évidence des markers de chimiorésistance est la polymérase Chain réaction (PCR). Il s'agit d'une technique qui permet, à partir d'un fragment d'ADN, d'obtenir une quantité importante de fragments identiques visualisables à la lumière ultra-violet.

- **les gènes dits marqueurs de résistance** : ces gènes sont réputés être impliqués dans les phénomènes de résistance du *P. falciparum* aux antipaludiques. Pour les amino-4-quinoléines et notamment la chloroquine les markers les plus utilisés sont le *Pfcr* *k76T* et le *Pfmdr-1N86Y* qui codent respectivement pour les protéines PFCRT et Pgh1.

Ces protéines situées au niveau de la membrane de la vacuole digestive du *P. falciparum*, sont impliquées dans la résistance du *P. falciparum* à la chloroquine (Djindé, 2001 ; Fidock, 2000). Quant aux gènes *Dhfr* (Points de mutation 51, 59, 108,...) et *Dhps* (mutation en position 437 et 540), ils sont respectivement associés aux résistances à la pyriméthamine et à la sulfadoxine.

- **Les markers de polymorphisme :** *Msp1* et 2, *GLURP*, les *Microsatellites*, *PfEMP1*, *AMA1*, *CSP*... Ces gènes codent pour des glycoprotéines de surface impliquées soit dans la virulence du parasite soit dans les réponses immunitaires ou dans l'émergence de souches plasmodiales résistantes (Meyer, 2002).

III. METHODOLOGIE.

3.1. Site et population d'étude

La présente étude a été menée à Dandé et Gourey, deux zones rurales situées respectivement à l'Ouest et au Nord du pays. L'étude s'est déroulée entre Octobre et Décembre 2006 correspondant à la période à forte transmission de paludisme.

3.2. Type d'étude

Essai clinique randomisé à l'association artésunate-amodiaquine versus artémether-luméfantrine. Durant la période d'étude, l'équipe de recherche s'est installée dans les centres de santé des localités concernées et a inclus tous les patients des deux sexes habitant les localités, remplissant les critères d'inclusion et volontaires pour participer. Ainsi, tout patient présentant des signes suggestifs de paludisme simple a bénéficié d'un examen clinique et d'une goutte épaisse/frottis mince à la recherche de formes asexuées de *Plasmodium falciparum*. Parmi les patients positifs à *Plasmodium falciparum*, ceux retenus pour l'étude ont été sélectionnés selon des critères définis par l'OMS en 2003.

3.3. Critères d'inclusion

Les sujets dont le diagnostic parasitologique a été confirmé ont ensuite été sélectionnés selon les critères d'inclusion suivants :

- Age supérieur ou égale à 6 mois ;
- Histoire fébrile des dernières 24h (ou Température axillaire $\geq 37^{\circ} 5$ C)
- Densité parasitaire comprise entre 2000 et 200.000 parasites / μ L ;
- Infection mono spécifique à *Plasmodium falciparum* ;
- Absence d'allergie connue au médicament de l'étude
- Absence de signes de danger et/ou de paludisme grave
- Absence d'autres causes évidentes de fièvre ;
- Provision d'un consentement éclairé du parent ou du tuteur de l'enfant ;
- Absence de prise d'antipaludique durant les deux dernières semaines.

3.4. Collecte des Données et Suivi des Patients

Les patients inclus dans l'étude sont revus au dispensaire au jour 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 ainsi que tout autres jours où le malade se sentait malade. A chaque visite le malade a bénéficié d'un examen clinique complet (à la recherche de nouveaux symptômes ou de l'aggravation de ceux existant la veille) mais aussi d'une goutte épaisse/frottis mince pour la recherche de formes asexuées de *P.falciparum* ainsi que des gamétocytes. Deux ou trois gouttes de sang ont été recueillies sur du papier filtre Wattman à l'exception du jour 1 pour les besoins des analyses moléculaires. Une mesure de l'hémoglobine a été réalisée à l'inclusion et au dernier jour de suivi du malade. (Tableau I)

Tableau I : Suivi des patients et collecte des échantillons biologiques

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

3.5. Critères de jugement de l'efficacité du traitement

L'efficacité du traitement a été évaluée selon les critères contenus dans le protocole OMS 2005 en :

Echec Thérapeutique Précoce (ETP)

- apparition de signes de danger ou de paludisme grave aux jours 1, 2, ou 3 en présence d'une parasitémie ;
- parasitémie au jour 2 supérieure à celle du jour 0, quelle que soit la température axillaire ;
- parasitémie au jour 3 et température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C ;
- parasitémie d'au moins 25% de celle du jour 0.

Echec Thérapeutique Tardif (ETT) elle est divisée en deux :

Echec Clinique Tardif (ECT) :

- apparition de signes de danger ou de paludisme grave après le jour 3 en présence d'une parasitémie et en absence préalable de tout critère d'ETP.
- température axillaire supérieure à 37,5°C ; ou histoire fébrile dans les 24 heures précédentes entre le jour 4 et 28 en présence d'une parasitémie sans répondre aux critères d'échec thérapeutique précoce.

Echec Parasitologique Tardif (EPT)

Présence d'une parasitémie au jour 28 avec une température axillaire < 37,5°C, en l'absence de tout critère d'ECT ou d'EPT.

Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (RCPA)

Absence d'une parasitémie au jour 28 quelque soit la température sans répondre aux critères d'ETP, d'ECT ou d'EPT.

3.6. Etudes moléculaires

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 *Pfprt K76T*. Ces analyses ont été réalisées en utilisant la méthode de « polymérase chain reaction » (PCR) ou réaction de polymérisation en chaîne.

Cette méthode comporte quatre grandes étapes qui sont l'extraction de l'ADN parasitaire, son amplification, la digestion et la révélation des produits d'amplification.

3.6.1. Extraction de l'ADN parasitaire

Nous avons procédé selon la méthode de PLOWE C. et *al.* (1995). Le chelex-100 utilisé permet également la séparation de l'ADN d'avec les protéines. Les différentes étapes sont les suivantes :

- Sous une hotte à flux d'air laminaire, sortir le confetti de son emballage et découper un petit morceau qui est mis dans le microtube portant le numéro de l'échantillon ;
- ajouter 1ml de PBS1X et 50µL de saponine 10%, bien immerger les confettis ;
- laisser tremper toute la nuit à 4°C au réfrigérateur ;

- retirer les tubes d'échantillons du réfrigérateur et les centrifuger brièvement pendant 5 secondes à 8000 tr/min ;
- enlever le surnageant, remettre 1ml du BPSIX et laisser encore tremper 30min à 4°C ;
- préparer la plaque chauffante à la température de 95°C, ajouter de l'eau distillée dans les puits pour permettre une bonne diffusion de la chaleur sur la paroi des tubes ;
- sortir les tubes du réfrigérateur et les centrifuger brièvement. Enlever le surnageant ;
- ajouter dans chaque tube 50µL de chelex-100 à 20% et compléter avec 100µl. d'eau bidistillée stérile :
- placer les tubes sur la plaque chauffante pendant 10min en vortexant chaque tube toutes les 2min ;
- placer les tubes sur de la glace et procéder à l'essorage des confettis en les pilant à l'aide des embouts stériles de micropipette ;
- centrifuger à 10000 g pendant 5min ;
- transférer le surnageant dans un autre tube stérile et procéder à une nouvelle centrifugation
- prélever le surnageant qui contient l'extrait d'ADN, le mettre dans un nouveau tube et conserver à -20°C.

3.6.2. 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'amorce. Cette deuxième amplification dite « niché » rend la technique plus sensible.

a) Principe

Le principe de cette technique moléculaire est d'utiliser de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérases qui est celle de pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir de couple d'amorces. La réaction correspond à la succession d'un certain nombre de cycles comportant chacun trois étapes : une dénaturation, une hybridation et une élongation.

Tous les éléments nécessaires à la réaction contenus dans un tube qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape de la PCR. Ces cycles de températures sont réalisés automatiquement par un programme dans un thermocycleur.

b) Les composants de la PCR

- l'ADN matrice de départ et les amorces

L'ADN matrice est sous la forme d'un double brin et contient le fragment à amplifier.

Les amorces doivent avoir une température d'hybridation (T_h) comprise entre 40°C et 70°C. Des températures supérieures à 70°C entraînent une absence de produits d'amplification ; des températures inférieures à 40°C diminuent la spécificité de la réaction et on obtient des productions d'ADN non spécifiques (http://www.ens-lyon.fr/R_ELLIE/).

- **La Taq polymérase**

La Taq polymérase est une enzyme thermostable qui a une activité maximale entre 72 et 80°C. La polymérisation par la Taq se fait habituellement entre 70°C et 75°C. Son rôle est de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN à partir des amorces. Une quantité insuffisante de la Taq conduit à une amplification trop faible du produit désiré et une quantité importante conduit à l'amplification de produits non spécifiques (http://www.ens-lyon.fr/R_ELLIE/).

- **Le dNTP (désoxyNucléotideTriPhosphate)**

Il existe quatre types de dNTP à savoir le désoxyAdénosineTriPhosphate (dATP), le désoxyCytosineTriPhosphate (dCTP), le désoxyGanosineTriPhosphate (dGTP) et le désoxyThymidineTriPhosphate (dTTP). Leur rôle est de fournir les désoxyribonucléotides nécessaires à la synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase.

Les dNTP doivent être à des concentrations identiques pour minimiser les erreurs d'incorporation par la polymérase. La spécificité de la PCR augmente quand on diminue les concentrations de dNTP. Son augmentation conduit à des produits non spécifiques (http://www.ens-lyon.fr/R_ELLIE/).

- **Le tampon de réaction (PCR Buffer)**

Son rôle est d'assurer une bonne hybridation des amorces ainsi que le bon fonctionnement de la Taq polymérase.

Ce tampon contient généralement des sels tels que les chlorures qui assurent une force ionique correcte ainsi qu'un pH adéquat. Il contient également du chlorure de potassium (KCl) qui facilite l'hybridation des amorces, et de la gélatine qui favorise l'action de la Taq (http://www.ens-lyon.fr/R_ELLIE/).

- **Le chlorure de magnésium (MgCl₂)**

Le MgCl₂ est indispensable pour l'amplification. Il a une influence sur l'hybridation des amorces, sur la spécificité du produit d'amplification et sur l'activité et la fidélité de la Taq polymérase qui ne peut fonctionner sans les ions Mg⁺⁺ libres. Ces ions interviennent dans la spécificité de reconnaissance des substrats de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) et permettent leur stabilisation. Un excès de MgCl₂ provoque des hybridations non spécifiques des amorces avec synthèse de bandes aspécifiques visibles sur le gel : une baisse de sa concentration diminue de façon importante la quantité de séquences synthétisées par la diminution de l'activité de l'enzyme thermostable.

Tableau II : Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR de *Pfert 76T*

Réactifs	Concentration	Volume à prélever (µl)
H2O	-	15,3
Primer sens	10 µM	0,5
Primer antisens	10 µM	0,5
Buffer	10X	2,5
dNTP	2 mM	2,5
Mg Cl2	25 mM	1,5
Tag polymérase	5 U/µl	0,2
Solution d'ADN	Inconnue	2
Final volume	-	25

Ce mélange a été incubé dans un thermocycleur sous le programme décrit dans le Tableau III. Le mélange réactionnel de la deuxième série de PCR a été réalisé avec les amorces CQR-A/CQR-B. A ce mélange, nous avons ajouté 2µl du produit de la première amplification ; ensuite nous avons incubé dans un thermocycleur sous le programme défini dans le Tableau ci-dessous.

Tableau III : Programmes d'amplifications et séquences des primers pour analyse de *PfertK76T*

Gène et étape de la PCR	Primes (5' → 3')	Programme d'amplification
<i>Pfert-T76</i>	CRT-1 : (21bp)	94°Cx3min
PCR1	GACG AGCG TTAT AGAGAATTA	(94°Cx30s 47°Cx1min 72°Cx1.5) x40 cycles
	CRT-2 : (20bp)	72°C x 3min
	C CAGTAGTTCTTGTAAGACC	Concentration à 4°C
<i>PfertT 76</i>	CQR-A- (21bp)	94° Cx5min
PCR2	TGTGC TCATGTG TTAAACTT	(94° Cx30s 52°Cx4min 72°Cx1min) x30cycles
	CQR-B : (23bp)	72°x3m
	CAAAACTATAGITACCAATTTTG	Concentration à 4°C

3.6.3. Digestion de l'ADN par l'enzyme de restriction APO1 (NEB)

La digestion se fait à une température de 50°C pendant 2 heures dans un thermocycleur ou dans l'incubateur. L'enzyme APO1 (NEB) ne coupera que la souche sauvage (HB3), la souche mutante (Dde2) restant intacte.

Afin de digérer le produit de la nested PCR, 10µL d'une solution réactionnelle avec APO1 (NEB) ont été réalisées (Tableau IV). A cette solution réactionnelle nous avons ajouté 10µL du produit d'amplification de la nested PCR. L'ensemble (20µL) contenu dans un microtube Eppendorff a été incubé à 50°C dans un bain marie. A 50°C, APO1 possède une activité optimale.

Tableau IV : Composition du milieu réactionnel pour la digestion avec APO1

	Concentration	Volume à prélever
H ₂ O	-	6,8
Neb3	10X	2,0
BSA	100X	0,2
APO1 (NEB)	10 U/µl	1,0
Produit de Nested PCR	Inconnu	10
Volume final		20,0

3.6.4. Révélation de produit d'amplification

a) Electrophorèse :

La migration se fait sur gel d'agarose à 2,5% :

- Dissoudre 2 g d'agarose dans 100 ml de TBE à 1X ;
- Bouillir ce mélange pendant 3min dans un four à micro-onde ;
- Ajouter 7,5 µl de bromure d'éthidium dans l'agarose fondu ;
- Couler le gel dans la moule et attendre sa solidification ;
- Enlever les peignes et placer le gel avec le moule dans le bac de migration contenant le TBE à 0,5X le gel doit être immergé ;
- Découper le papier parafilm ;
- Placer sur le parafilm 3 µl de colorant (Dye) pour chaque échantillon à migrer ;
- Placer 5µl du marqueur de poids moléculaire dans le premier puit ;
- Mélanger entre 15 à 18µl de produit de digestion au Dye puis loger dans le puit ;
- Faire migrer entre 80 à 90 volts pendant 1,5 à 2 heures ;
- Sortir le gel du moule et le placer sous l'appareil à UV pour la photographie ;
- Marquer devant chaque bande le numéro de l'échantillon correspondant.

b) Interprétation de la photographie :

Une bonne réaction se traduit par la présence de bandes conformes à celles attendues. Il faut observer la conformité de la taille du produit attendu ainsi que celle des témoins positifs. L'enzyme Apo I (NEB) ne coupe que les souches de génotypes sauvages. Les bandes de la même taille que le témoin sauvage (100 pb) correspondent aux souches sensibles à la chloroquine.

Par contre celles qui ont la même taille que le témoin résistant (134 pb) correspondent aux souches résistantes à la chloroquine. Les bandes qui apparaissent à la fois au niveau des deux témoins correspondent aux souches mixtes.

La taille attendue pour les produits d'amplifications est de 537 pb pour la première amplification et de 134 pb pour la deuxième.

3.6.5 Détermination du polymorphisme génétique de *msp1* et *msp2*

3.6.5.1. Mélange réactionnel et programme d'amplification de *msp1* et *msp2*

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.IV. Le produit de la première amplification sert de source d'ADN pour la deuxième amplification.

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

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

Lors de la première PCR les couples d'amorces utilisés étaient : 01/02 pour *msp1* et S3/S2 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 µl, contenus dans un microtube stérile, sont incubés dans un thermocycler (*Master cycler gradient*) sous un programme spécifique à chaque gène (Tableau VI).

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

<i>MSP1</i>	1 ^{ère} amplification.	O1: 5'-CACATGAAAGTTATCAAGAAGTTGTC-3' O2: 5'-GTACGTCTAATTCATTTGCACG-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x 30;
	2 ^{ème} amplification.	N1: 5'-GCAGTATTGACAGGTTATGG-3' N2: 5'-GATTGAAAGGTATTTGAC-3'	72°C x 3min; 94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x30; 72°C x 3min
<i>MSP2</i>	1 ^{ère} amplification.	S3: 5'-GAAGGTAATTA AAAACA TTGTC-3' S2 :5'-GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 42°C x 1min; 65°C x 2min) x30;
	2 ^{ème} amplification.	S1: 5'-GAGTATAAGGAGAAGTATG-3' S4 :5'-CTAGAACCATGCATATGTCC-3'	72°C x 3min 94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 1min; 70°C x 2min) x30; 72°C x 3min

3.6.5.2 Interprétation des résultats

Les produits obtenus après la PCR nichée sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2,5 % contenant 5µl de bromure d'éthidium (5-éthyl-3,8-diamino-6-phénylphénanthidine). Le gel est déposé dans une cuve à électrophorèse contenant un tampon TBE IX. 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'éthidium a la propriété de s'insérer entre les fragments d'une molécule d'ADN; et d'émettre une fluorescence à 622 nm quand il est excité au rayon ultra-violet.

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 Jour d'échec sont différents
Recrudescence	Tailles des bandes à J0 et Jour d'échec sont identiques
Indéterminé	PCR négative pour J0 ou Jour d'échec

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

3.7. Analyse des données

Pour la saisie des données, nous avons utilisé le logiciel EXCEL 2003. L'analyse statistique a été effectuée par les logiciels Epi info6.04 et SPSS 11.0.

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.

3.8. Considérations éthiques

Avant le début de l'étude, ce protocole a été soumis et approuvé par le comité d'éthique institutionnel du centre MURAZ/IRSS.

Les patients ont été informés que leur participation à l'étude était entièrement volontaire et que les informations recueillies par l'équipe sont strictement confidentielles. Il leur était également permis de mettre fin à tout moment à leur participation s'ils le désiraient.

IV.RESULTATS

4.1. Caractéristiques de la population d'étude

Ce sont au total 497 patients qui ont été examinés durant la période entre octobre-décembre 2006 sur l'ensemble de deux sites dont 286 ont présenté une goutte épaisse positive à l'examen microscopique soit un indice plasmodique de 57,54%. Au total 167 patients ont été inclus dans l'étude et traités avec l'artésunate-amodiaquine AQ/AS (67) ou l'artémether-luméfanantrine AL (100). Au cours du suivi 60 patients ont été exclus pour raison diverses (vomissements répétés, retrait de consentement, perdu de vue...) dont 20 pour AQ/AS et 40 pour AL (Figure 3).

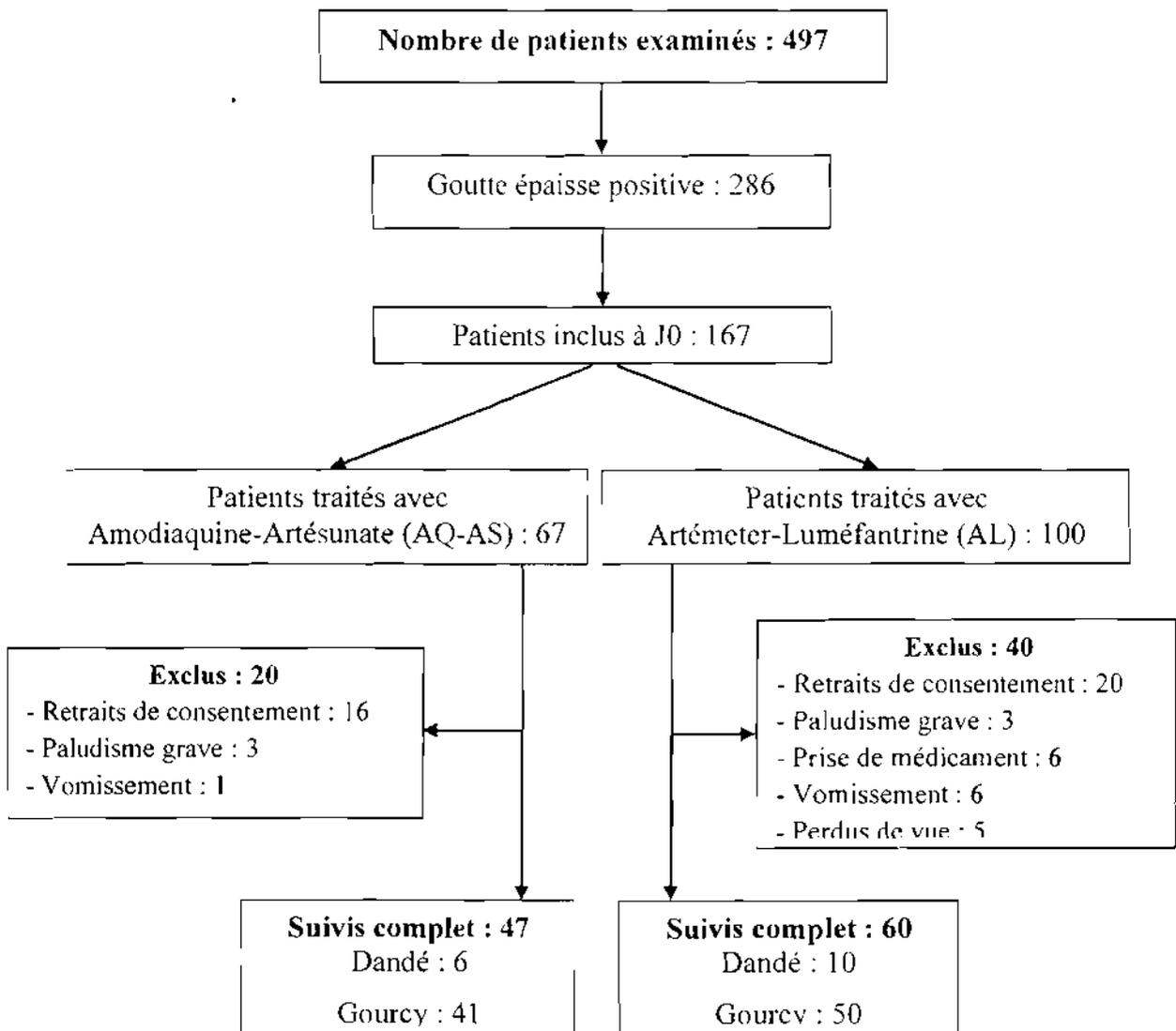


Figure 3 : Profile de l'étude

4.2. Caractéristiques des sujets inclus

La répartition de la population d'étude selon deux classes d'âge montre que 78,72% (37/47) des patients avaient un âge compris entre 6 mois et 59 mois. Les âges extrêmes étaient de 6 mois et 30 ans avec une moyenne de $3,85 \pm 5,21$ ans.

Les patients de sexe féminin représentaient 55,32% (26/47) des sujets inclus

➤ La température

Les températures extrêmes des patients à l'inclusion étaient de $36,1^{\circ}\text{C}$ et de $40,2^{\circ}\text{C}$ avec une moyenne de $38,2 \pm 1,03^{\circ}\text{C}$. Pour les enfants de moins de 5 ans, la moyenne était de $38,4^{\circ}\text{C}$, et de $37,7^{\circ}\text{C}$ pour ceux dont l'âge est supérieur à 5 ans. Cependant, cette moyenne, varie très peu selon les sexes des patients.

➤ La densité parasitaire

La moyenne géométrique des densités parasitaires à l'inclusion était de 12751,12 trophozoïtes/ μL avec des extrêmes de 2000 et de 110068 trophozoïtes/ μL . Cette moyenne était de 12617,3 trophozoïtes/ μL chez les enfants de plus de 5 ans contre 12086,8 trophozoïtes/ μL chez les moins de 5 ans.

➤ Le taux d'hémoglobine

Il présente une moyenne de $9,10 \pm 2,27\text{g/dL}$ avec des extrêmes de 5 et $14,8\text{g/dL}$. Chez le groupe d'âge de plus de 5 ans, la moyenne était de $11,38\text{g/dL}$. En ce qui concerne le groupe d'âge de moins de 5 ans, elle était de $8,10\text{g/dl}$.

Par ailleurs, nous avons observé 55,32%(26/47) des patients étaient anémiens à l'inclusion.

➤ La densité gaméocytaire

Sur les 47 patients au suivi complet, un seul présentait des gaméocytes au jour d'inclusion soit un taux de 2,13% (1/47).

4.3 Résultats cliniques et parasitologiques

Le tableau ci-dessous montre les prévalences obtenues après traitement à AQ/AS. La prévalence moyenne, des échecs thérapeutiques enregistrée sur l'ensemble des sites d'étude, était de 14,89% (IC95% = [6,2- 28,3] dans la population d'étude. Cette prévalence n'était pas variable d'un site à un autre ($p=0,45$)

Tableau VII: Analyse de l'efficacité du traitement selon le site

Localité	Gourcy (n=41)	Dande** (n=6)	Total (N=47)
ETP	0	0	0
ECT	0	0	0
EPT	6 (14,63%)	1 (16,67%)	7 (14,89%)
ETG*	6 (14,63%)	1 (16,67%)	7 (14,89%)
RCPA	35 (85,37%)	5 (83,33%)	40 (85,11%)

ETG*=échec thérapeutique général. ** Echantillon très faible

Aucun cas d'échec précoce n'a été enregistré. Quelque soit le site il s'est agi d'échec parasitologique tardif. En moyenne l'efficacité thérapeutique a été de 85.11% (85.37% a Gourcy contre 83.33% a Dande).

Au vu de la réapparition tardive des échecs, l'étude du polymorphisme parasitaire permettra de distinguer les recrudescences des nouvelles infections et permettre une meilleure estimation des échecs vrais.

4.4 Résultats cliniques et parasitologiques par site après un ajustement par la PCR.

La prévalence des échecs thérapeutiques, due à la recrudescence, était de 12,8% (IC95%=[8,1- 17,5]) 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 VIII)

Tableau VIII : Analyse de l'efficacité du traitement après ajustement par la PCR.

Localité	Gourcy (n=41)	Dande (n=6)	Total (N=47)
ETP	0	0	0
ECT	0	0	0
Recrudescences	0	0	0
Nouvelles infections	0	0	0
EPT	6 (14,6%)	1 (16,7%)	7 (14,9%)
Recrudescences	5(12,2%)	1(16,7%)	6(12,8%)
Nouvelles infections	1(2,4%)	0	1(2,1%)
ETG*	6 (14,6%)	1 (16,7%)	7 (14,9%)
RCPA	35 (85,4%)	5 (83,33%)	40 (85,1%)

L'étude du polymorphisme (*MSP-1* et *MSP-2*) a révélé que six (6) des sept (7) cas cliniques positifs étaient dus à des parasites recrudescents. Sauf une (1) seule nouvelle infection a été détectée sur le site de Gourcy. Cela signifie que sur l'ensemble des échecs il y'avait 14,3% de réinfections contre 85,7% de recrudescences, la différence est statistiquement significative ($p=0,03$).

En stratifiant le résultat par classe d'âge quatre (4) recrudescences sur six (6) ont été rencontrées chez les enfants de moins de 5 ans contre seulement deux (2) chez les plus âgés ($p=0,56$).

4.5 Prévalence de l'allèle *Pfprt K76T*

La prévalence de la mutation *Pfprt 76T* avant la thérapie à l'AS/AQ était de 48,9%. IC95% = [34,6- 63,2] dans la population étudiée. Cette prévalence était de 48,8% pour le site de Gourcy et 50% à Dandé. Cette prévalence n'était pas différente en fonction des sites d'études ($P=0,70$). Aussi, la répartition de la distribution n'est pas significative selon l'âge et le sexe. ($p = 0,94$)

Tableau IX Association *Pfprt* et réponse clinique au traitement

	Mutations au <i>Pfprt76T</i>		Total
	Présent	Absent	
ETG***	4(66,7%)	2(33,3%)	6
RCPA	19(46,3%)	22(53,7%)	41
Total	23(48,9%)	24(51,1%)	47

*** Dus aux recrudescences

4.6 Prévalence des mutations chez les sujets ayant échoué au traitement

Afin de déterminer si la présence de la mutation *Pfprt 76T*, en période prétraitement, était associée aux échecs thérapeutiques à l'association AS/AQ, nous avons comparé les prévalences de l'allèle mutant *Pfprt76T* chez les cas d'échecs thérapeutiques et chez les cas des RCPA. Parmi les 6 isolats recrudescents, 4 (66,7%) ont présenté la mutation *Pfprt 76T*, alors que chez les 41isolats RCPA, 19 (46,3%) aussi ont présenté la dite mutation. Nous avons constaté que, statistiquement il n'existait pas d'association entre l'allèle mutant *Pfprt 76T* et les échecs thérapeutiques dus à une recrudescence des parasites ($P=0,94$).

V. DISCUSSION

5.1 L'efficacité thérapeutique de l'association artésunate-amodiaquine

L'analyse de la prévalence du taux d'échec à l'association artésunate-amodiaquine montre que cette combinaison possède un taux d'efficacité assez élevé. Cependant nos résultats rapportent des taux d'échec supérieurs à ceux publiés par d'autres auteurs dans cette région. C'est ainsi qu'en 2004 le taux d'efficacité de cette association rapporté à Bobo-Dioulasso était de 100%. (Barenes et *al.*, 2004).

Une étude réalisée dans la région du centre a révélé un taux d'échec de 7.94% (Sirima et *al.*, 2003). Cette différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par le phénomène de fluctuation dans le temps. Quand on sait que le phénomène de la chimiorésistance est un phénomène dynamique qui évolue dans le temps et dans l'espace; il est donc compréhensible que ce taux d'échec ait augmenté entre ces deux périodes. En effet, nos résultats sont comparables à ceux publiés dans d'autres régions: c'est ainsi qu'en 2004 à Kailahun (Sierra Leone), Grandesso et *al.*, ont rapporté un taux d'échec de 13.49%. Des résultats rapportés d'Afrique Centrale et Orientale indiquent également des taux analogues (Adjuik et *al.*, 2002). Cependant d'autres auteurs ont rapporté des taux moins élevés. C'est ainsi qu'entre 2000 et 2005, des taux de guérisons en moyenne de 97% ont été observé au Sud Sénégal (Brasseur et *al.*, 2005). Cette différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de la distribution géographique des souches de *P. falciparum*.

Nous avons obtenu par ailleurs un taux d'échec plus élevé dans la classe d'âge de 6 mois à 59 mois par rapport à la classe d'âge de 5ans et plus, mais cette différence pourrait s'expliquer par la différence du degré d'immunité qui évolue avec l'âge (Djimdé et *al.*, 2001; Tinto et *al.*, 2003; Khalil et *al.*, 2005). Cependant cette observation, dans la présente étude n'était pas vérifiée, car statistiquement il n'y avait pas d'association entre l'âge et les échecs thérapeutiques à AS/AQ. L'on pourrait probablement aboutir à cette association à condition d'effectuer des études d'ordre immunogénétique.

5.2 De la prévalence des mutations *Pfprt* 76T dans la population d'étude

La mutation 76T du gène *Pfprt* qui code pour une protéine transporteuse située au niveau de la vacuole digestive du *P. falciparum* (Fidock, 2000) a été mise en évidence dans 48.9% (23/47) avec IC95% =[34.6- 63.2] de nos échantillons collectés avant traitement.

Les proportions de mutants obtenus d'un site à un autre sont différents mais pas de façon statistiquement significative ($P>0.05$).

Une étude conduite par Tinto et al en 2000 à Bobo-Dioulasso a rapporté des proportions plus élevées que les nôtres (61.4%). Dans l'Île d'Anjouan où la transmission semble importante, 88% des isolats portaient le profil mutant, c'est à dire 76T (Randrianariveolosia et al., 2000-2002). Cela pourrait s'expliquer par la différence des souches circulantes et/ou la fluctuation du phénomène dans le temps.

Par contre, nos résultats corroborent donc ceux de Ibrahim Maman et al., en 2006 dans la Vallée du Niger; une valeur de 50% a été mise en évidence.

Etant donné que l'amodiaquine était moins utilisée que la chloroquine, ces mutations probablement proviendraient 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.

5.3 La relation entre la présence des mutations *Pfprt*76T et prédiction des résultats cliniques

Au cours de notre étude, la prévalence de la mutation était élevée aussi bien chez les patients ayant présenté une recrudescence parasitaire que ceux ayant montré un succès thérapeutique, aussi il n'y avait pas d'association entre la présence de la mutation et le résultat clinique ($p> 0,05$).

VI CONCLUSION

L'Amodiaquine-artesunate est une combinaison à base d'artémisinine efficace au Burkina Faso et justifie ainsi son choix par le Programme National de Lutte contre le Paludisme pour le traitement du paludisme simple.

Aussi la forte prévalence (48,9%) de la mutation *Pfer176T* et le maintien d'une bonne efficacité (taux d'échec =12,8%) de la combinaison libre sont en faveur de l'absence d'association entre ce point de mutation et l'issue clinique du patient traité.

La recherche d'un marqueur prédictif de la résistance à cette combinaison pourrait s'orienter vers de nouveaux marqueurs ou une association de plusieurs marqueurs déjà connus

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adjuik M., Agnamey P., Babiker A., Borrmann S., Brasseur P., Cisse M., Cobelens F., Diallo S., Faucher J.F., Garnier P., Gikunda S., Kremsner P.G., Krishna S., Lell B., Loolpapit M., Matsiegui P.B., Missinou M.A., Mwanza J., Ntoumi F., Olliaro P., Osimbo P., Some E., Taylor W.R. Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *P. falciparum* malaria in Africa children : a randomised, multicentre trial. *Lancet*. April 2002; 359(9315). 1365-1372.
- Alene G.D. and S. Bennett. Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* malaria in Ethiopia and Eritrea. *Tropical Medicine and international Health*. 1996; 1, 810-815.
- Barenes H., N. Nagot, I. Valea, T. Koussoubé-Balima, A. Ouedraogo, T. Sanou and S. Yé. . A randomized trial of amodiaquine and artesunate alone and in combination for the treatment uncomplicated *falciparum* malaria in children from Burkina Faso. *Tropical Medecine and international Health*. 2004; 9. 4. 438-444.
- Brasseur P, Guiguemde R, Diallo S, Guiyedi V, Kombila M, Ringwald P, Olliaro P. Amodiaquine remains effective for treating uncomplicated malaria in West and Central Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene*. 1999; 93: 645-50
- Bruce-Chwatt L.J., R.H. Black, C. J Canfield, D. F. Clyde, W. Peters and W. Wernsdorfer. Chemotherapy of malaria. WHO Monogr. Ser.1986; 2, 27.
- Brysker A., Lbro M.T. Paludisme et médicaments Arnette 1988
- Chou A.C., Chevli R., Fitch C.D. Ferriprotoporphyrin IX fulfils the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Biochimistry*. 1980; 19: 1543-1549
- Conway D.J and J. Baum, 2002. In the blood- the remarkable ancestry of *Plasmodium*
- Cortese J.F., A. Caraballo, C.E. Contreras and C.V. Plowe. Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. *Journal of Infectious Diseases*. 2002; 186, 999-1006.
- Cowman A.F.T, M.J. Morry, B.A Biggs, G.A.M. Grosst and S.J. Foote. Amino acid changes linked to pyrimethamine. Resistance in the dihydrofolate reductase-thmidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1988; 85, 9109-9113.
- D'Alessandro U. and F.O. ter Kuile. Amodiaquine, malaria, pregnancy: the old new drug. 368; 1306-1307. *Lancet*, 2006; 368, 9544, 1306-1307.

- Desjardin R. E., Canfield C. J., Haynes J.P., Chnulay J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979; 16: 710-847.
- Diourtey., A. Djimde. O.K. Doumbo. I. Sagara. Y. Coulibaly, A.Dicko, M.Diallo, M.Diakite .J.F Cortese, and C.V Plowe. Pyrimethamine-sulfadoxine efficacy and selection for mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase in Mali. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1999; 60. 475-478.
- Divo A.A., Geary T.G., Jensen J.B. Oxygen and time depend effects of antibiotic and selected mitochondrial inhibitors on *P. falciparum* in culture. *Antimicrob. Agents chemother.* 1985. 27, 1: 21-27
- 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. A Molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine.* 2001; 344, 257-263.
- Dokomajilar C. Z.M. Lankoandé. 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.* 2006; 75, 1, 162-165;
- Dupasquier I Le paludisme. *Enfant Milieu Tropical* 1989. 178. pp . 1-45.
- Durand R., Gabbett E., Di Piazza J.P., Delabre .F., Le Bras J. Analysis of Kappa and omega repeat of the *cg2* gene and chloroquine susceptibility in isolates of *P. falciparum* from sub-saharian Africa. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1999; 101: 185-97.
- 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. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein Pfert and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell.* 2000; 6, 4, 861-871.
- Fitch C.D. Mode of action of antimalarial drug In: *Malaria and the red cell.* Ciba foundation. Symposium 94. London. Pitman Ed., 1984, 222-232.
- Foote SJ, Kyle D.E. Martin R.K., et al. Several alleles of the multidrug-resistance in *P. falciparum*. *Nature.* 1990: 345: 255-8.
- Gallup J.L. and J.D. Sachs. The economic burden of malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2001 ; 64, 1-2 Suppl, 85-96.

- Gentilini M. Le paludisme dans Médecine Tropicale. Paris : Flammarion. 1990 : 91 : 122.
- Gentilini M. et Duflo B. Maladies parasitaires : paludisme. Flammarion Médecine Sciences 4^{ème} édition. 1986 ; 850p.
- Grandesso. Francesco, Hagerman André., Kamara Sarian ., Lam Eva., Checchi Francesco., Balkan Suna., Scollo Giuseppe., Durand Rémy., Gutmann. Jean-Paul. Low efficacy of the combination artesunate plus amodiaquine for uncomplicated falciparum malaria among children under 5 year in Kailahun, Sierre-Leone, 2004.
- Grobusch M.P., Adagu I.S., Kremsner P.G., Warhurst D.C. P. falciparum in vitro susceptibility and allele-specific PCR detection of Pfmdr-1 Asn86Tyr polymorphism in Lambarene, Gabon. Parasitology 1998; 116: 211-7.
- Guiguemdé T.R., Dao F., Curtis V., Traoré A., Sondo B., Testa J., and Ouedraogo J.B., Household expenditure on malaria prevention and treatment for families in the town of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene. 1994; 88, pp. 285-287.
- Happi C.T., Gbotosho G.O., Sowunmi A., Falade C.O., Akinboye D.O., Gerena L., Kyle D.F., Milhous W., Wirth D.F. and Oduola A.M.J. Molecular analysis of Plasmodium falciparum recrudescence malaria infections in children treatment with chloroquine in Nigeria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2004; 70(1), 20-26.
- Hastings I.M. The origins of antimalarial drug resistance. Trends in Parasitology. 2004; 20, 11, 512-518.
- Hastings, I.M.. A model for the origins and spread of drug-resistant malaria. Parasitology. 1997; 115: 133-141.
- Hay S.I., C.A Guerra, A.M. Noor, H.Y. Myint and S.I. Hay. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. Lancet Infectious Diseases. 2004; 4, 327-36.
- Holmgren G., José P., Pedro M.F, Malaria I.V., Charles O.O., Anders B. Amodiaquine resistant Plasmodium falciparum malaria in vivo is associated with selection of Pfert 76T AND Pfmr1 86Y. Infection Genetic and Evolution. 2006; 6, 4, 309-314.
<http://www.who.int/malaria/docs/protocolWHO.pdf>
- Ibrahim Maman Laminou, Hadiza Hassane, Ibrahim Arzika, Maimouna Kalilou, Ibrahim Ousmane, Jean Bernard Duchemin. Réseau de surveillance de la chimiorésistance de P. falciparum et cartographie des mutations Pfert K76T et DhfrSer108Ans dans la Vallée du Niger (2005-2006).

- Ittarat L., W. Asawamahasakda, S.R. Meshnick. . The effects of antimalarials on the Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase. *Experimental Parasitology*. 1994; 79, 50-56.
- Joy D.A., X. Fend, J. Mu, T. Furuya, K. Chotivanich, A.U. Krettli, M. Ho, A. Wang, N.J. Kager P.A. Malaria control: and opportunities. *Tropical Medicine and International Health*. 2002; 7, pp. 1046.
- Khalil I.F.M. Alifrangis, D.S. Tarimo, T.Staalso, G.M.H. Satti, T.G. Theander, A.M. Romm and I.C. Bygbjerg . The roles of the Pfert76T 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*. 2005; 99, 5, 441-448.
- Korenromp E.L for the Roll Back Malaria Monitoring and Evaluation Reference Group MERG Task Force on Malaria Morbidity. Malaria incidence estimates at country level for the year 2004 proposed estimates and draft report. Geneva, Roll Back Malaria, World Health Organisation, 2004; 14, 68-89.
- Kwaky E., Berko F., Meshnick S.R. binding of chloroquine to DNA *Mol., Biochemistry Parasitology*. 1989 ; 35: 51-56.
- La Veran 1881: Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme, description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des maladies atteintes de fièvres palustres, Paris 1881.
- Le Bras J., Andrieu B., Hatin J., Savel J., Coulau J. P. Plasmodium falciparum : Interprétation du semi-microtest de chimiosensibilité in vitro par incorporation de 3-hypoxanthine. *Pathologie Biologie*. 1984; 32: 463-6.
- Le Bras J., Basco L.K. Chimiorésistance des Plasmodiums In *Paludisme Universités francophones "UREF"*, 1991.
- Le Bras J., Deleron P. In vitro study of drug sensitivity of P. falciparum: Evaluation of a new semi-microtest. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993; 32: 447-53.
- Le Bras J., Durand R. The mechanisms of resistance to antimalarial drug in P. falciparum. *Fundam Clin Pharmacology*, 2003; 17: 147-53.
- M Randrianarive lojosia, MA Rason, H Andrianantenaira, A RatsimbASOA . Etude de la chimiorésistance de Plasmodium SP à Madagascar. L Randrianasolo, A Randriamanantena, LA Raharimalala (2000-2002).

- Malvy D, Djossou F, Thiebaut R, Le Bras M. Plasmodies-Malaria. Formes cliniques et diagnostics dans Encyclopédie médico-chirurgicale. Paris, Elsevier, 2000: 8-507-A-20.
- Meyer C.G., May J., Arez A.P., Gil J.P. and Rosario V. Genetic diversity of *P. falciparum*: asexual stage. *Tropical Medicine and International Health*. 2002; 7: 395-408.
- Ministère de la Santé, de l'Action Sociale et de la Famille : Direction de la médecine préventive. Programme national de lutte antipaludique au Burkina Faso 2006 : Ouagadougou : 67p.
- Modiano D., Luoni G., Sirima B.S., Simporé J., Verra F., Konaté A., Rastrlli E., Olivieri A., Calissano C., Paganotti G.M., D'Urbano L., and Coluzzi M., Haemoglobin C protect against *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 414. 2001: (6861): 305-8.
- Molyneux D.H., K.Floyd, G. Barnish and E.M. Fevre. Transmission control and drug resistance in malaria: a crucial interaction. *Parasitology Today*. 1999. 15. 6. 1238-240.
- Moody A.. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. 15, 1. 66-78.
- Mouchet J et al., 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde, John libbey-Eurotext, Moutrouge.
- Ouedraogo J.B Point sur l'endémie palustre au Burkina Faso et résultats des programmes de lutte. Acte de conférence internationale sur les stratégies de lutte contre le paludisme Centre Muraz. Bobo-Dioulasso, 11-14 avril 1988: 272.
- OMS. Biologie des plasmodies. Série de Rapports Techniques. 1987. n° 743
- OMS. Paludisme. Rapport de secretariat. Genève . 2005. n°7.
- Payne D. Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*. 1988, 4, 112-115.
- Plowe C.V., A. Djimdé, M. Bouare, O. Doumbo, T.E. Wellems. 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*. 1995, 52, 565-568.
- Robert V. et Boudin C.. Biologie de la transmission homme-moustique du *Plasmodium*. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. 2003, 96(1), 6-20.
- Snounou G. and H.P. Beck. The use of PCR genotyping in assesment of recrudescence or infection after antimalarial drug treatment. *Parasitology Today*. 1998, 14, 11, 462-467.
- Snow R.W., CA. Guerra, A.M. Noor, H.Y. Myint and S.I. Hay. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005, 434, 214-217.

- Taylor-Robinson, A., W., Immunoregulation of malaria infection: balancing the vices and virtues. *Intern. J. for Parasitology*.1998, 28, 28.
- Tinto H., J.B. Ouedraogo, A. Erhart, Van C. Overmeir, J.C. Dujardin, Van Marek E. T.R. Guiguemde and U. D'Alessandro. Relationship between the P fert 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*. 2003, 3, 4, 287-292.
- Tinto H., Ouedraogo J.B., Traoré M., Guiguemde T.R. Attitude à propos de la résistance parasitologique de *P. falciparum* aux antipaludiques. *Cahier Santé*. 2004, 14: 69-73.
- Wernsdorfer W.H. Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica*. 1994, 56, 143-156.
- White N. Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. *Parasitologia*. 1999, 41, 301-308.
- White. E. Suh, P. Beerti and X-Z. Su. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*. 2003: 300, 318-321.
- WHO. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. 2003.
<http://www.who.int/malaria/docs/ProtocolWHO.pdf>
- WHO. Situation actuelle du paludisme dans le monde. WHO. Séries des rapports Techniques. Genève 2000; N° 892.
- Zongo I., Dorsey G., Roumba N., Dokamalilar C., Lankondé M., Ouedraogo J.P., Rosenthal P.J. Amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and combination therapy for uncomplicated *falciparum* malaria: a randomized controlled trial from Burkina Faso; *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005, 73, 5, 826-832.