

**BURKINA FASO  
UNITE-PROGRES-JUSTICE**

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

-----  
**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO**

-----  
**INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL**



## **MEMOIRE**

**Présenté par :**

**NIKIEMA ROSALIE**

Maître ès Sciences Biochimie/ Microbiologie Appliquée

**En vue de l'obtention du**

**Diplôme D'Etudes Approfondies  
en**

**Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques**

**Sur le thème**

**Etude du polymorphisme du Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) et du Merozoite Surface Protein 2 (MSP2) de *Plasmodium falciparum* au Burkina Faso**

**Soutenu le 11 juin 2008**

**Devant le jury:**

**Président : Professeur Germain Jérôme Sawadogo**

**Membres : Professeur Georges Anicet Ouédraogo**

**Docteur Halidou Tinto (Directeur de mémoire)**

# DEDICACES

**A mon Père et à ma Mère**

En souvenir des moments passés à vos côtés et de votre souci de faire de nous des hommes préparés pour la vie. Vous avez toujours été soucieux de l'avenir de toute la famille. Ce travail est un modeste témoignage de tous les sacrifices que vous avez consentis.

Que Dieu le tout puissant puisse vous garder encore longtemps parmi nous.

**A mes frères et sœurs Benjamin, Ambroise, Christine et Eugénie**

Sources perpétuelles d'émotion, d'affection, d'inspiration et d'espoir. Que

DIEU puisse raffermir chaque jour nos liens. Considérez ce modeste travail comme une esquisse de chemin que je voudrais vous montrer afin de susciter chez vous beaucoup de courage.

**A mes oncles et tantes**

Merci de vos efforts constants pour le renforcement des liens entre nos familles.

Trouvez ici l'expression de mon profond attachement aux valeurs que vous cultivez.

Ce travail est le vôtre.

**A mes cousins et cousines**

Considérez ce modeste travail comme une esquisse de chemin que je voudrais vous montrer afin de susciter chez vous beaucoup de courage.

**A mon partenaire de lutte Dari Frédéric Yannick**

Que le travail que nous avons mené ensemble puisse consolider et raffermir nos liens d'amitié.

# REMERCIEMENTS

**Au Professeur Guiguemdé T. Robert responsable de la section Parasitologie et entomologie du Centre Muraz.**

Je vous remercie de m'avoir accepté dans votre laboratoire pour cette étude. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

**Au Docteur Potiandi Serge Diagbouga Directeur Général du Centre Muraz.**

Pour m'avoir accueilli dans votre Centre, je vous dis merci. Je vous suis reconnaissante pour tous les moyens matériels mis à ma disposition.

**Au Professeur Jean Bosco Ouédraogo Directeur de recherche, Directeur Régional de l'institut de recherche en science de la santé/Centre National de Recherche Scientifique et Technologique et Responsable adjoint de ce DEA.**

Nous vous témoignons notre reconnaissance pour l'opportunité que vous nous avez offerte de pouvoir nous inscrire dans ce DEA ainsi que pour le bon encadrement que nous avons reçu. J'ai toujours été accueilli chaleureusement dans votre laboratoire et j'ai toujours pu compter sur votre aide pour le travail que je réalisais. Je vous exprime toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

**A Madame Zampa Odile**

Je vous adresse ma sincère reconnaissance pour vos conseils, votre disponibilité pour tout le travail mené. Vous avez contribué à la réalisation de ce travail, soyez assurée de notre plus profond respect pour votre compétence.

**A Sœur Régina Opportune**

Tu as toujours été là pour nous donner un coup de main et des conseils dans la réalisation de ce travail. Reçoit nos sincères remerciements.

**Au Docteur Zongo Issaka**

Vous avez été d'un recours pour l'analyse de mes données et m'avez également apporté des conseils pour l'amélioration de ce travail. Veuillez recevoir nos sincères remerciements.

**Au personnel du centre Muraz et de l'IRSS**

Je voudrais adresser un remerciement particulier à tous les membres du laboratoire de Parasitologie et Entomologie ainsi qu'au personnel de l'IRSS pour l'accueil et l'ambiance chaleureux de travail que vous maintenez au quotidien. Mes remerciements les plus sincères.

**A l'équipe de Séguédin: Dr Kpoda Hervé, Sibalo Amadou, Tinto Sanata, le personnel du CSPS de Séguédin**

Vos différents soutiens et interventions ont été d'un apport précieux lors des activités que nous avons menées ensemble. Nous vous adressons nos sincères remerciements.

**A mes collègues du DEA**

Nous avons passés des moments de joie et de complicité. Que cette relation se perpétue et consolide notre amitié.

A tous mes ami(e) s qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail. Mes remerciements les plus sincères.

**A nos maîtres et juges**

**A notre Maître et Président de jury,  
Le Professeur Germain Jérôme Sawadogo,  
Professeur titulaire en biochimie,  
Chef de service du département de physique et chimie biologiques et médicales à  
l'EISMV.**

Cher maître, vous nous faites l'honneur de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Vos qualités humaines, sociales, et scientifiques font de vous un maître respectable et admiré. Nous avons très tôt compris l'intérêt que vous portez à ce travail. Nous vous prions cher maître d'accepter nos remerciements.

**A notre Maître et Juge,  
Le Professeur Georges Anicet Ouédraogo,  
Professeur agrégé en biochimie,  
Vice-président de l'U.P.B.**

Nous sommes très honorés par votre présence dans ce jury de D.E.A. Vos qualités humaines et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail ont beaucoup attiré notre attention. Vous avez apporté un concours appréciable à la réalisation de ce travail. Veuillez recevoir nos vifs remerciements.

**A notre maître et Directeur de mémoire  
Docteur Halidou Tinto,  
PharmD, Msc, PhD,  
Chargé de recherche à l'IRSS (CNRST).**

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez faite en nous proposant ce travail. Nous avons vite apprécié vos qualités scientifiques, humaines et surtout votre amour pour le travail bien fait. Ces qualités couplées à votre simplicité et votre générosité font de vous un directeur exemplaire. Homme de terrain, vous avez cultivé en nous l'esprit d'équipe, le dévouement, l'endurance et la persévérance; des qualités sans doute indispensables à la réalisation d'un travail scientifique et qui nous aideront dans les combats futurs. Nous sommes très honorés d'être parmi vos élèves. Soyez assuré cher directeur, de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements

## SOMMAIRE

SOMMAIRE .....	8
Liste des sigles et abréviations .....	10
Liste des tableaux et figures .....	12
RESUME .....	13
ABSTRACT .....	14
I-INTRODUCTION .....	15
II- DONNEES SUR LE PALUDISME .....	17
1. Epidémiologie .....	17
1-1 L'anophèle .....	17
1-2 Le parasite .....	17
1-3 L'homme .....	17
2. Cycle des plasmodies (figure 2) .....	18
2-1 Cycle chez l'anophèle .....	18
2-2 Cycle chez l'homme .....	18
2-2-1 cycle exo érythrocytaire .....	18
2-2-2 cycle intra érythrocytaire .....	19
3. Physiopathologie .....	20
4. Diagnostic du paludisme .....	20
5. Médicaments antipaludiques .....	21
5-1 Les schizonticides électifs .....	21
Ils comprennent les dérivés quinoléiques et les dérivés de l'artémisinine. ....	21
5-2 Les inhibiteurs des acides nucléiques ou antimétabolites .....	21
6. Quelques rappels sur la chimiorésistance .....	22
6-1 Définition .....	22
6-2 Mécanismes de la chimiorésistance et les facteurs liés .....	22
7. Diversité de <i>Plasmodium falciparum</i> [6] .....	23
7-1 Polymorphisme chromosomique .....	23
7-2 Polymorphismes alléliques étendus .....	23
7-2-1- Description du gène <i>MSP1</i> (Merozoïte Surface Protein1) .....	24
7-2-2 - Description du gène <i>MSP2</i> (Merozoïte Surface Protein2) .....	24
7-3 Reproductions sexuées .....	25
7-4 Variations antigéniques .....	25
III- OBJECTIF DE L'ETUDE .....	26
1. Objectif général .....	26
2. Objectifs spécifiques .....	26
IV- MATERIELS ET METHODES .....	27
1- Site et population d'étude .....	27
2- Sélection des patients et collecte des données .....	27
3- Analyse moléculaire .....	29
3.1. Extraction de l'ADN de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	29
3.2 Amplification des séquences spécifiques du <i>Plasmodium falciparum</i> .....	29
3.3 Détermination du polymorphisme génétique de <i>MSP1</i> et <i>MSP2</i> .....	30
3.3.1 Programme d'amplification des gènes <i>MSP1</i> et <i>MSP2</i> .....	30
3.3.2 Génotypage des allèles du <i>MSP1</i> (K1, Mad20, Ro33) et du <i>MSP2</i> (3D7, FC27) .....	31
3.3.3 Analyse des produits de la PCR nichée .....	32
3.3.4 Définition de l'efficacité thérapeutique .....	33
3.5- Analyse des données .....	34

V- RESULTATS.....	35
1. Résultats globaux.....	35
2. Résultats cliniques et parasitologiques.....	35
3. Polymorphisme des gènes <i>MSP1</i> et <i>MSP2</i> .....	36
3.1 Prévalence des différents allèles des gènes <i>MSP1</i> et <i>MSP2</i> dans la population d'étude.....	37
3.2 Polymorphisme du gène <i>MSP1</i> dans la population avant (J0) et après (JR) l'administration des traitements.....	38
3.3 Polymorphisme du gène <i>MSP2</i> dans la population avant (J0) et après (JR) l'administration des traitements.....	39
VI- DISCUSSION.....	41
1. De la réponse au traitement avec les deux combinaisons.....	41
2- De la réalisation des tests de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	41
3- De la prévalence des différents allèles des deux gènes dans la population d'étude.....	42
4. Du polymorphisme des 2 gènes avant et après l'administration des traitements et l'impact des traitements sur la sélection des différents allèles.....	43
VII- CONCLUSION.....	44
VIII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45

## **Liste des sigles et abréviation**

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**AL:** Artéméter-Luméfantrine

**AQ+AS:** Amodiaquine + Artésunate

**C-:** Control négatif

**ECT:** Echec Clinique Tardif

**EDTA:** Ethylène Diamine Tétra-Acétique

**EPT:** Echec Parasitologique Tardif

**ETT:** Echec Thérapeutique Tardif

**IC:** Intervalle de Confiance

**M:** Marqueur de poids moléculaire

**MSP1, 2:** Merozoïte surface Protein 1, 2

**NI :** Nouvelle Infection

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

**PBS :** Phosphate Buffer Saline

**PfEMP-1 :** Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1

**PCR :** Polymerase Chaine Reaction

**QBC :** Quantitative Buffy Coast

**R :** Recrudescence

**RCPA :** Réponse Clinique Parasitologique Adéquate

**RFLP :** Restriction Fragment Length Polymorphism

**TBE:** Trizma Boric acid EDTA

**UV :** Ultra Violet

## Liste des tableaux et figures

Tableau I : Tableau de suivi des patients pendant les 42 jours.....	27
Tableau II : Posologie du Coartem® (Artéméther -Luméfantrine) .....	28
Tableau III : Posologie du COARSUCAM™ .....	28
Tableau IV : Composition des mélanges réactionnels pour la première et la deuxième PCR .....	30
Tableau V : Tableau récapitulatif des programmes d'amplifications du <i>MSP1</i> et <i>MSP2</i> .....	31
Tableau VI : Tableau récapitulatif des programmes d'amplifications des différents allèles.....	32
Tableau VII: Exemple d'interprétation des gels .....	33
Tableau VIII: Caractéristiques de la population d'étude.....	35
Tableau IX : Réponse au traitement par AL et AS+AQ avant et après PCR .....	36
Tableau X: Fréquence des différents allèles des gènes <i>MSP1</i> et <i>MSP2</i> dans la population des parasites étudiés .....	38
Tableau XI : Répartition du polymorphisme des allèles du <i>MSP1</i> avant (J0) et après (JR) traitement .....	39
Tableau XII: Répartition du polymorphisme de taille à l'intérieur des allèles du <i>MSP2</i> avant (J0) et après (JR) traitement.....	40
Figure1 : Le paludisme dans le monde .....	16
Figure2: Cycle de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	19
Figure3: Alignement des séquences protéiques déduites du bloc 2 de <i>MSP1</i> .....	24
Figure 4 : Diagramme schématisé de la structure des deux familles d'allèles de <i>MSP2</i> , construction de l'expression et des régions conservées de <i>MSP2</i> .....	25
Figure 5 : Polymorphisme du <i>MSP1</i> à J0 .....	36
Figure 6 : Polymorphisme du <i>MSP2</i> à J0 .....	37

## RESUME

Nous avons conduit une étude sur le polymorphisme de deux gènes de *Plasmodium falciparum* (Merozoïte surface Protein 1 : *MSP1* et Merozoïte surface Protein 2 : *MSP2*) au Burkina Faso. Au total, 165 enfants âgés de 6 à 59 mois consultant dans le Centre Médical de Nanoro entre Septembre et Décembre 2006 ont été enrôlés dans l'étude. Deux combinaisons à base d'artémisinine (Artéméther-Luméfantrine, AL et Amodiaquine+Artésunate, AQ+AS) ont été utilisées pour le traitement des enfants. Le protocole standard défini par l'OMS en 2003 pour les études d'efficacité thérapeutique des antipaludiques a été utilisé pour le suivi des patients. Nous avons utilisé la méthode de la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) pour l'étude des amorces du bloc 2 de *MSP1* et du bloc 3 de *MSP2*.

Après correction par la PCR, nous avons noté une efficacité thérapeutique de 78,05% pour AL et 87,34% pour AQ+AS. L'étude du polymorphisme du gène *MSP2* indique un très grand polymorphisme de celui-ci comparé au gène *MSP1*. Nous avons noté que les allèles K1 pour *MSP1* et 3D7 pour *MSP2* sont celles qui circulaient le plus, par contre les allèles Ro33 pour le *MSP1* et FC27 pour le *MSP2* sont celles qui circulaient le moins. Pour le *MSP1*, le nombre de clones de parasites dans la population d'étude variait de 1 à 4 aussi bien avant l'administration des traitements qu'après l'administration des traitements, tandis que pour le *MSP2*, ce nombre variait de 1 à 7 avant l'administration des traitements alors qu'après l'administration des traitements, il variait de 1 à 6. Nous avons noté une forte proportion des infections monoclonales pour le FC27 (53,7%) avant l'administration des traitements, contrairement au 3D7 pour lequel on notait autant d'infections monoclonales que bi, tri ou quatre clones. Après l'administration des traitements, nous constatons une sélection statistiquement significative ( $p = 0,01$ ) des infections avec le 3D7. Pour les infections avec FC27, nous constatons également une sélection statistiquement significative ( $p = 0,02$ ) des infections.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, *MSP1*, *MSP2*, polymorphisme, allèles, Burkina Faso

## ABSTRACT

We carried out a study to investigate the polymorphism of *Plasmodium falciparum* two genes (Merozoite surface Protein 1, *MSP1* and Merozoite surface Protein 2, *MSP2*) in Burkina Faso. In total, 165 children from 6 to 59 months of age consulting in Nanoro Medical center have been enrolled from September to December 2006. Children were treated with two Artemisinin based combination treatments (Artéméther-Luméfantrine, AL and Amodiaquine+Artésunate, AQ+AS). WHO 2003 standard protocol for antimalarial drugs efficacy studies were used for the patients' follow-up. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to analyze the block 2 of *MSP1* and block 3 of *MSP2*.

The rates of PCR-corrected Adequate Clinical and Parasitological Response were 78,05% and 87,34% for AL and AQ+AS respectively. The analysis of polymorphisms showed that *MSP2* was more polymorphic than *MSP1*. We noted that K1 for *MSP1* and 3D7 for *MSP2* were the most circulating alleles in the parasites population. However Ro33 for *MSP1* and FC27 for *MSP2* were the lowest circulating alleles. For *MSP1*, the number of alleles varied between 1 and 4 as well before treatment as after treatment whereas, for *MSP2*, this number varied from 1 to 7 before treatment and from 1 to 6 after treatment. We also noted a high rate of monoclonal infections for FC27 (53,7%) before treatment, in opposite to 3D7 which showed as well monoclonal infections as 2, 3 or 4 clones. After treatment we observed a significant selection of 3D7 selection ( $p = 0,01$ ). For FC27, we also observed a significant selection of infections ( $p = 0,02$ ).

**Keywords:** *Plasmodium falciparum*, *MSP1*, *MSP2*, alleles, polymorphism, Burkina Faso

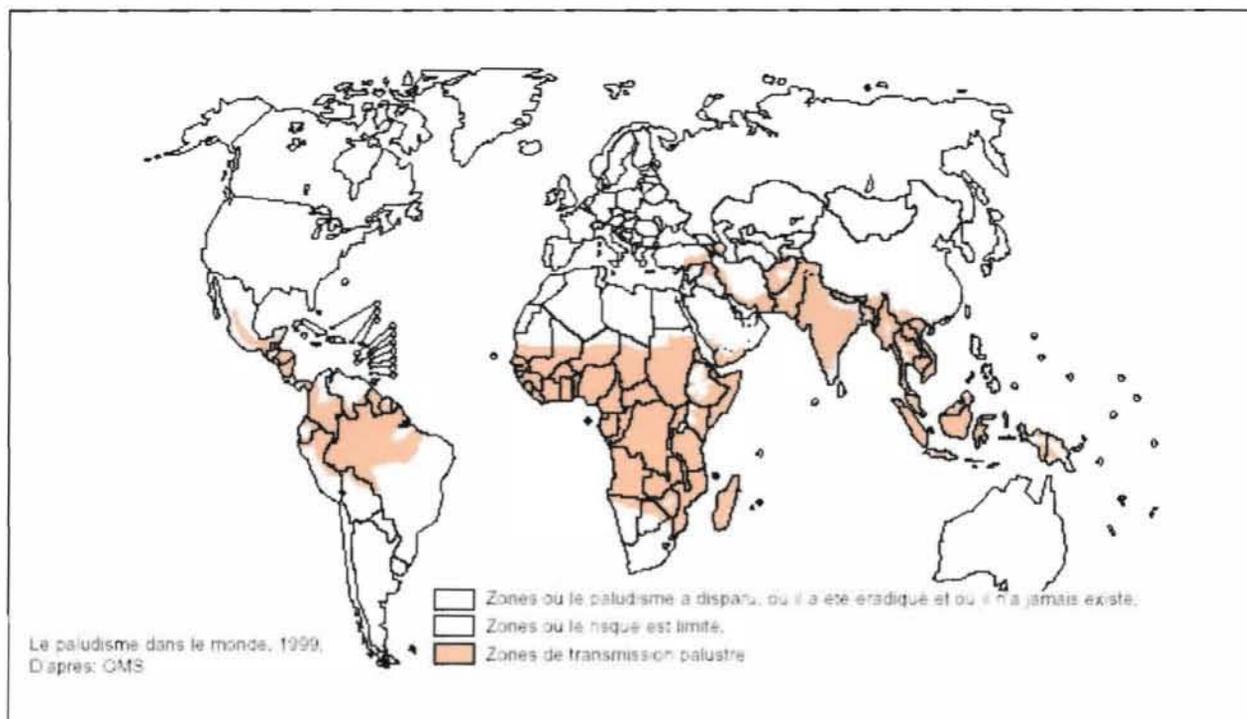
## I-INTRODUCTION

Par sa prévalence et son haut niveau de transmission, le paludisme demeure la première endémie mondiale (figure 1). Il constitue un problème de santé public majeur dans les zones tropicales. En effet, le paludisme est la première cause de morbidité et de mortalité en Afrique sub-saharienne [7]. Le phénomène se voit aggravé aujourd'hui par l'apparition et l'extension de la résistance du parasite (le plasmodium) aux antipaludiques [20].

La mise au point d'un vaccin efficace constitue aujourd'hui l'un des défis majeurs de la lutte contre le paludisme. Cependant, cette approche est limitée par la nature du plasmodium qui est une espèce extrêmement polymorphe [7]. En effet, l'existence d'une grande diversité antigénique entre les souches de *Plasmodium falciparum* est l'une des hypothèses avancées pour expliquer la lente acquisition de l'immunité contre le paludisme des individus vivant en zone d'endémie palustre [7]. Cette grande diversité pose également le problème du développement d'un vaccin [2].

La protéine 1 de surface du mérozoite (*MSP1*) et la protéine 2 de surface du mérozoite (*MSP2*) sont deux candidats vaccins et responsables de la réponse immunitaire chez l'homme [2]. Ces deux protéines sont extrêmement diverses (25 allèles différents sont trouvés pour *MSP1* et 19 pour le *MSP2* [2]). Du fait de cette diversité, les génotypes de *Plasmodium falciparum* sont presque uniques pour chaque individu [9] ; ce qui permet d'utiliser ces deux marqueurs pour discriminer les recrudescences des nouvelles infections.

Si plusieurs publications portant sur ces deux protéines ont été réalisées dans le monde, très peu de travaux ont été conduits au Burkina Faso concernant l'étude du polymorphisme associé à ces deux protéines. C'est dans ce contexte que nous avons conduit la présente étude sur le polymorphisme de *MSP1* et *MSP2* de *Plasmodium falciparum* chez des enfants traités en milieu rural du Burkina Faso avec deux combinaisons à base d'artémisinine.



*Ci-dessus. Le paludisme dans le monde. Le paludisme est endémique dans les régions tropicales et subtropicales.*

Figure1 : Le paludisme dans le monde

Source : [14]

## II- DONNEES SUR LE PALUDISME

### 1. Epidémiologie

Le *Plasmodium* est un sporozoaire qui appartient au phylum des Apicomplexa et à l'ordre des Haemosporidies. Deux hôtes successifs sont nécessaires à l'accomplissement du cycle : l'homme, l'hôte intermédiaire où a lieu la multiplication asexuée ou schizogonique du parasite, et le moustique du genre anopheles, hôte définitif où s'effectue la multiplication sexuée ou sporogonique [10].

#### 1-1 L'anophèle

Il fait partie de la famille des Culicidae et de l'ordre des diptères. Les anophèles sont des holométaboles ne présentant que des métamorphoses complètes. Elles passent au cours de leur vie par quatre stades successifs: œuf, larve, nymphe et adulte ou imago. Les trois stades sont aquatiques et les adultes mènent une vie aérienne. Les mâles se nourrissent uniquement de jus sucré et ne piquent pas ; par contre les femelles ont besoin de protéines pour assurer le développement de leurs ovaires. Elles les puisent dans le sang qu'elles prélèvent sur les vertébrés dont l'homme. Ce sont donc les femelles qui piquent et peuvent transmettre le paludisme.

#### 1-2 Le parasite

*Plasmodium* est un genre qui comprend de nombreuses espèces (140). Seulement 4 de ces espèces sont pathogènes pour l'homme. Ce sont *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*. De ces 4 espèces, *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus répandue à travers le monde, causant 90% des cas d'infestations mortelles pour l'homme lorsqu'un traitement n'est pas administré.

#### 1-3 L'homme

Il est l'hôte intermédiaire de *Plasmodium falciparum* et dispose de facteurs naturels vitaux au développement du parasite tel que le type hémoglobinique du globule rouge,

l'équipement enzymatique intraérythrocytaire, la nature des récepteurs membranaires du globule rouge [10].

## **2. Cycle des plasmodies (figure 2)**

### **2-1 Cycle chez l'anophèle**

Après une piqûre sur un paludéen, le moustique absorbe des schizontes, des corps en rosace, des gamétocytes. Les éléments asexués sont digérés et seuls les gamétocytes ingérés poursuivent le cycle [15]. Dans l'estomac du moustique, les gamétocytes se transforment en gamètes. Le gamétocyte mâle subit un processus d'exflagellation à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés. Cela donne un zygote appelé ookinète qui traverse la paroi de l'estomac de l'anophèle, se fixe sur sa face externe, formant l'oocyste dans lequel s'individualise les sporozoïtes. Libérés par l'éclatement de l'oocyste, ces derniers gagnent préférentiellement les glandes salivaires de l'anophèle. La durée du cycle sporogonique varie entre 10 et 40 jours suivant la température extérieure et les espèces en cause.

### **2-2 Cycle chez l'homme**

#### **2-2-1 cycle exo érythrocytaire**

Au cours de son repas humain, le moustique infesté injecte avec sa salive dans un capillaire des sporozoïdes sous forme de sporozoïtes fusiformes qui gagnent rapidement le foie. Les sporozoïtes transitent dans la circulation générale et, en quelques minutes, ils envahissent les hépatocytes grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte (CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte. Ils grossissent, se divisent et constituent en une semaine des corps bleus (schizontes matures) volumineux, déformant l'hépatocyte et repoussant son noyau en périphérie. L'éclatement des corps bleus libère de nombreux mérozoïtes, qui pour la plupart passent dans la circulation sanguine.

## 2-2-2 cycle intra érythrocytaire

Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte pénètrent chacun dans un érythrocyte grâce à un processus parasitaire actif et se différencie au sein de la vacuole parasitophore en anneau, puis en trophozoïte, stade à partir duquel une intense phase répliative commence. Le trophozoïte grossit, et son noyau se divise, donnant alors un schizonte qui se charge en pigment malarique ou hémotoïne. Celui-ci après segmentation, montre une forme caractéristique de rosace puis libère 8 à 32 mérozoïtes qui, rapidement réinfectent des érythrocytes sains. L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et 72 heures pour *P. malariae*.

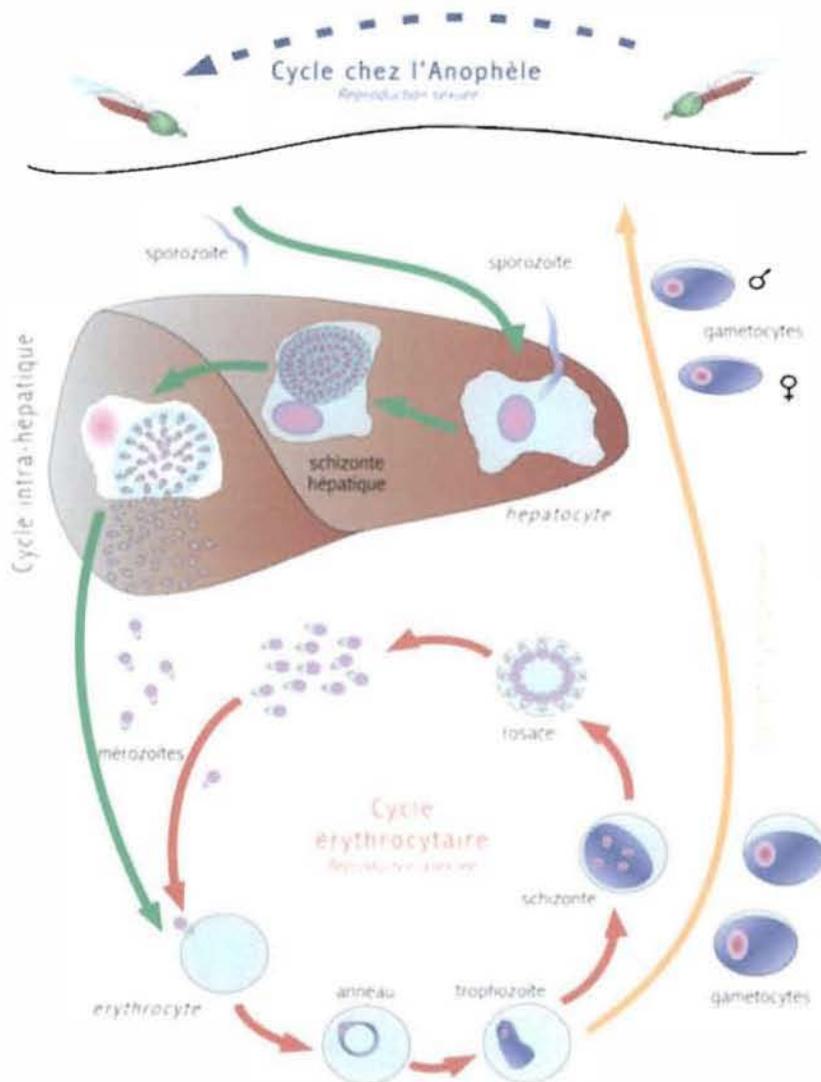


Figure 2: Cycle de *Plasmodium falciparum*

Source : [6]

### 3. Physiopathologie

Suite à une piqûre infestante, le paludisme évolue en :

- période prépatente durant 6 à 15 jours (cycle hépatique)
  - période d'incubation, période séparant l'apparition des premiers parasites de celles des premiers symptômes.
  - période d'invasion se traduisant par des céphalées, fatigues, courbatures, anorexies, vomissement et diarrhées chez l'enfant suite à l'éclatement des érythrocytes parasités.
  - accès palustre avec des pics de fièvre tous les deux jours, compte tenu du cycle de *Plasmodium falciparum* qui est de deux jours. L'accès palustre dure de 6 à 10 heures avec des sensations de froid intense, d'hyperpyrexie et de sudation successivement.
- L'accès palustre peut présenter des complications et évoluer en accès pernicleux.

### 4. Diagnostic du paludisme

Le diagnostic clinique et biologique permet de détecter le paludisme.

Le diagnostic clinique se base sur l'accès fébrile avec sa périodicité et sa séquence de frisson.

Le diagnostic biologique se base sur la mise en évidence du parasite. Il comprend :

- La goutte épaisse qui est la technique la plus utilisée. Elle consiste à prélever du sang au bout du doigt pour la confection d'une goutte épaisse et d'un frottis mince sur une lame. Après une coloration au Giemsa ou autres colorants tels que le Field de ces lames, l'identification du *Plasmodium* se fait au microscope optique à l'objectif 100.

-Le test QBC qui consiste à recueillir le sang sur un tube à hématocrite contenant de l'acridine orange (tube QBC) qui est ensuite centrifugé à 12000 t/min pendant 5min. L'identification est faite par lecture au microscope à fluorescence. [22]

-La PCR qui consiste à amplifier des séquences spécifiques d'acides nucléiques du *Plasmodium*.

-Les tests immunologiques tels que les sondes à ADN et le ParaSight F qui sont souvent utilisés.

## 5. Médicaments antipaludiques

Selon leur mode d'action, ils peuvent être classés en deux grandes catégories. Les schizonticides électifs et les inhibiteurs des acides nucléiques. [12]

### 5-1 Les schizonticides électifs

Ils comprennent les dérivés quinoléiques et les dérivés de l'artémisinine.

- **Les dérivés quinoléiques** : ce sont les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine) et les amino-alcools (quinine, méfloquine, halofantrine, luméfantrine). Ces molécules interfèrent avec l'utilisation de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive en inhibant la formation de l'hémozoïne.

- **Les dérivés de l'artémisinine** (artésunate, artéméther) : cette nouvelle classe d'antipaludique de type peroxyde, interfère aussi avec l'utilisation de l'hémoglobine, par libération de radicaux libres, toxiques pour le parasite. Les dérivés de l'artémisinine ont une action gamétocytocide, qui réduit la transmission et limite les risques de voir émerger des résistances.

### 5-2 Les inhibiteurs des acides nucléiques ou antimétabolites

Ils bloquent la division du noyau de l'hématozoaire. Ce groupe comprend les antifolates, les naphtoquinones et les antibiotiques.

- **Les antifolates** : ils sont répartis en deux familles, les antifoliques (sulfamides, dont la sulfadoxine, sulfones), et les antifoliniques (proguanil, pyriméthamine). Ils agissent au niveau de la voie de synthèse des folates, qui sont essentiels à la biosynthèse des acides nucléiques. Les antifoliques inhibent la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui produit l'acide folique et les antifoliniques inhibent la dihydrofolate réductase (DHFR) qui produit l'acide folinique.

- **Les naphtoquinones** : l'atovaquone est un inhibiteur puissant des fonctions mitochondriales en bloquant la chaîne de transfert d'électrons au niveau de son enzyme-clé, la dihydroorotate déshydrogénase (DHODase). Elle a peu d'impact thérapeutique lorsqu'elle est utilisée seule.

En combinaison avec un antimétabolite (proguanil), on observe une intéressante synergie d'action grâce à une inhibition séquentielle de la synthèse des pyrimidines.

- **Les antibiotiques** : les tétracyclines (doxycycline), les macrolides (érythromycine, azythromycine, clindamycine) peuvent inhiber la synthèse protéique par inhibition de certaines fonctions de l'apicoplaste.

En dehors de ces groupes, l'association de certains de ces antipaludiques est un recours pour le traitement du paludisme dans les pays en voie de développement. Ce sont entre autre l'amodiaquine + artésunate, artémeter + luméfantrine, artésunate + sulfadoxine - pyriméthamine, artésunate + méfloquine [18].

## **6. Quelques rappels sur la chimiorésistance**

### **6-1 Définition**

La résistance médicamenteuse est la capacité qu'à un parasite à se multiplier ou à survivre en présence de concentration d'une substance qui, normalement, détruit les parasites de la même espèce ou empêche leur multiplication. [10]

### **6-2 Mécanismes de la chimiorésistance et les facteurs liés**

Conséquence d'une mutation chromosomique, spontanée et aléatoire, la résistance des hématozoaires aux amino-4-quinoléines se traduit par l'absence de pénétration de ces médicaments à travers la membrane érythrocytaire, avec pour conséquence, l'absence de leur fixation sur le noyau des parasites. Ainsi, on conçoit que, sous l'influence d'une pression médicamenteuse, les souches plasmodiales sensibles disparaissent alors que les souches chimiorésistantes sont sélectionnées et peuvent ensuite être transmises par les anophèles. Adaptabilité du vecteur, niveau d'immunité des populations, mouvements migratoires interviennent ensuite dans la diffusion des souches résistantes. [17]

## 7. Diversité de *Plasmodium falciparum* [6]

A la complexité de la réponse immunitaire répond, au niveau du parasite, une diversité antigénique, phénotypique et moléculaire. Quatre éléments majeurs participent à la diversité des populations parasitaires : un important polymorphisme chromosomique et allélique, la reproduction sexuée et la variation antigénique.

### 7-1 Polymorphisme chromosomique

Les régions subtélomériques des chromosomes sont le site de fréquents réarrangements génétiques chez de nombreux organismes et *Plasmodium falciparum* ne déroge pas à la règle. La délétion de l'extrémité des chromosomes est un événement qui contribue de façon significative au polymorphisme de taille des chromosomes. Des variations sont observées au cours de la multiplication asexuée des parasites ou *in vitro*, mais également lors de la reproduction sexuée. L'instabilité de l'extrémité des chromosomes est en partie imputée à la présence de motifs répétés. Ces répétitions sont le site privilégié de recombinaison intra et inter chromosomique à l'origine du polymorphisme de taille des chromosomes.

### 7-2 Polymorphismes alléliques étendus

La diversité antigénique de *Plasmodium falciparum* est le reflet d'un polymorphisme allélique important. Les bases structurelles de ce polymorphisme sont multiples, parmi lesquelles, les mutations ponctuelles. Cependant *Plasmodium falciparum* utilise de manière intensive d'autres mécanismes afin de générer une telle diversité. Beaucoup d'antigènes comportent des séquences répétées ; suivant les allèles, celles-ci peuvent varier en nombre, en taille ou même de cadre de lecture. Enfin la dégénérescence des répétitions assure un degré de diversité supplémentaire.

Plusieurs études et techniques ont permis de mettre en évidence le polymorphisme allélique. Ces techniques sont entre autre le typage génétique d'isolats de zone d'endémie palustre par PCR des gènes de *MSP1* et *MSP2* ou la RFLP. Chez *Plasmodium falciparum*, de nombreux antigènes codés par des gènes en copie unique possèdent un très grand nombre

d'allèles, pouvant, parfois, être regroupés en familles alléliques de séquence primaire très différentes telles que *MSP1* et *MSP2*.

### 7-2-1- Description du gène *MSP1* (Merozoïte Surface Protein1)

*MSP1* est une protéine localisée sur le chromosome 9 de *Plasmodium falciparum*. Elle est composée de 17 blocs dont le plus variable est le bloc 2. Ce dernier, par sa variabilité permet de distinguer les clones de *Plasmodium falciparum*. Le bloc 2 comprend les allèles K1, Mad20 et Ro33 (figure3).

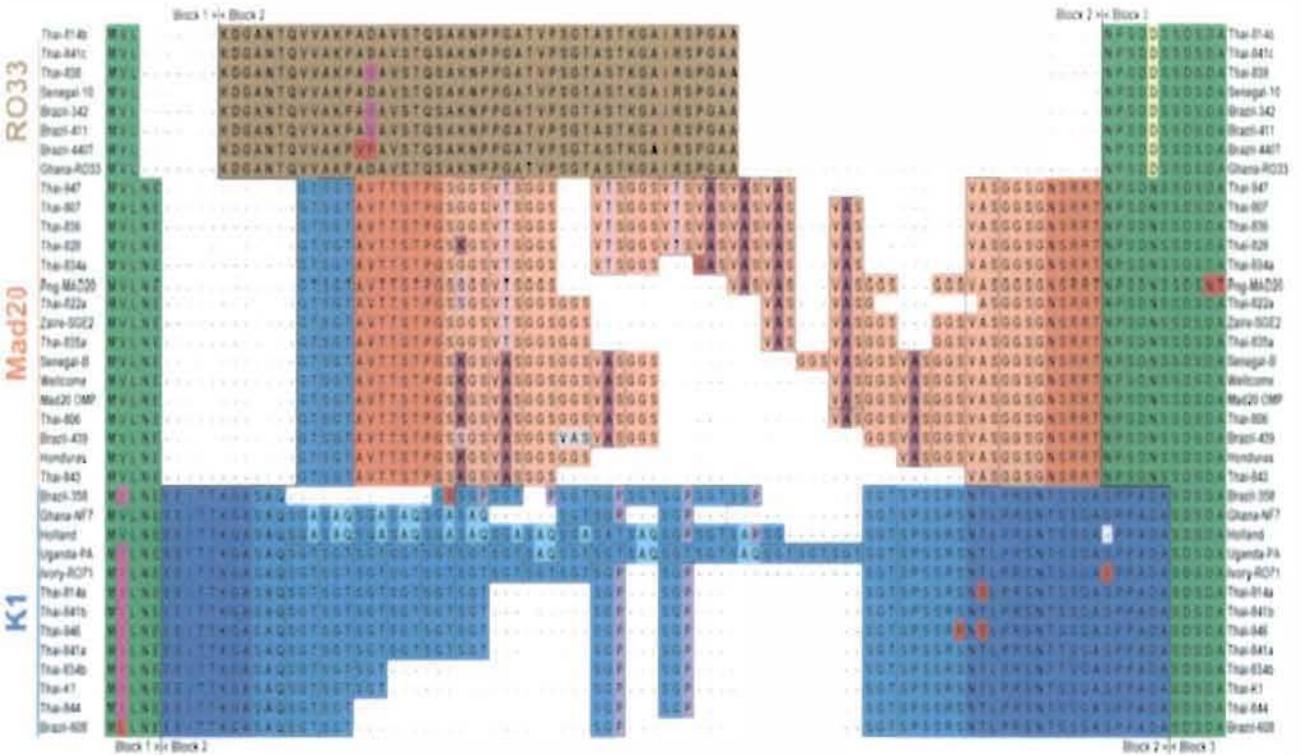


Figure 3: Alignement des séquences protéiques déduites du bloc 2 de *MSP1*.

Source : [6]

### 7-2-2 - Description du gène *MSP2* (Merozoïte Surface Protein2)

*MSP2* est une protéine située sur le chromosome 2 de *Plasmodium falciparum* et comprend 5 blocs. Le bloc 3 de ce chromosome est très variable et comporte les allèles 3D7 et FC27 qui permettent de différencier les clones de ce parasite (Figure 4).

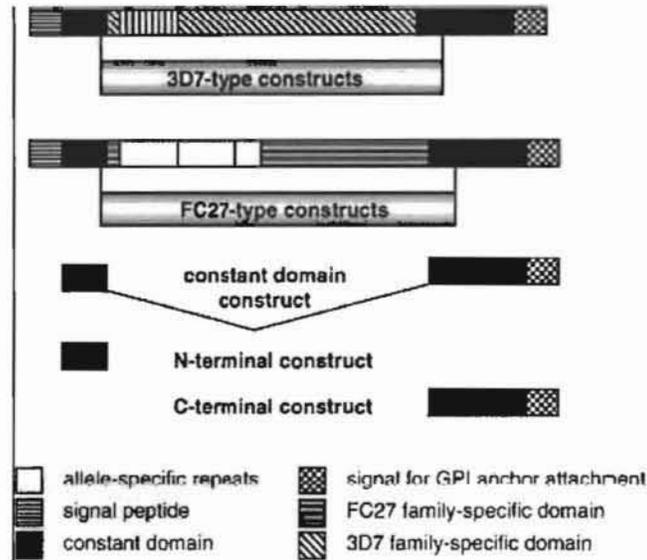


Figure 4 : Diagramme schématique de la structure des deux familles d'allèles de MSP2, construction de l'expression et des régions conservées de *MSP2* Source : [16]

### 7-3 Reproductions sexuées

La reproduction sexuée du parasite chez l'Anophèle constitue une étape obligatoire du cycle biologique du parasite et contribue à la diversité génétique des populations de *Plasmodium falciparum*. Les croisements expérimentaux effectués indiquent que des "crossing over" méiotiques ont lieu. Ceux-ci, conjugués à l'effet de la ségrégation aléatoire des chromosomes, permettent un réassortiment des combinaisons d'allèles et l'émergence de nouveaux génotypes. Par exemple des recombinaisons intragéniques sont à l'origine de la diversification allélique de *MSP1*.

### 7-4 Variations antigéniques

La forte pression de sélection exercée par la diversité de l'hôte, a contraint le parasite à une meilleure adaptabilité et a sélectionné la mise en place d'un processus de variation phénotypique programmée: la variation antigénique. La variation antigénique chez *Plasmodium falciparum* a trois fonctions : une fonction d'échappement au système immunitaire, d'immunorégulation et d'adaptation aux récepteurs endothéliaux de l'hôte.

Ces quatre éléments participent au polymorphisme de *MSP1* et *MSP2* de *Plasmodium falciparum* (qui fera l'objet de notre étude), leur conférant ainsi une grande diversité allélique.

### **III- OBJECTIF DE L'ETUDE**

#### **1. Objectif général**

- ❖ Etudier le polymorphisme des gènes *MSP1* et *MSP2* de *Plasmodium falciparum* sur des souches de parasites provenant d'enfants malades du Burkina Faso.

#### **2. Objectifs spécifiques**

- ❖ Déterminer la prévalence des différents allèles des 2 gènes au sein de la population des souches de parasites étudiées.
- ❖ Déterminer le polymorphisme des différents allèles des 2 gènes avant et après l'administration des traitements.
- ❖ Etudier l'impact des traitements sur la sélection des différents allèles des deux gènes.

## IV- MATERIELS ET METHODES

### 1- Site et population d'étude

Notre étude s'est déroulée de Septembre à Décembre 2006 à Nanoro qui est représentatif de l'un des trois faciès épidémiologique du paludisme au Burkina Faso. Nanoro est un district sanitaire de 131.710 habitants (statistiques 2005) qui relève de la région sanitaire du Centre - Ouest dont le chef lieu est Koudougou.

Les échantillons que nous avons analysés proviennent d'une étude randomisée ouverte utilisant les combinaisons Artéméther – Luméfantrine (AL) et Artésunate + Amodiaquine (AS+AQ) pour le traitement du paludisme simple chez des enfants de 6 à 59 mois. Cette étude a été approuvée par le comité d'Ethique institutionnel du centre Muraz.

### 2- Sélection des patients et collecte des données

Les enfants des deux sexes âgés de 6 à 59 mois ont été inclus après que leurs parents aient donné un consentement pour leur participation à l'étude. Les procédures de sélection des patients ainsi que les critères d'inclusion sont détaillés dans un protocole standard défini par l'OMS en 2003 pour les études d'efficacité thérapeutique des antipaludiques [25].

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

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

Jour	J0	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42	Autres jours
Visite	V1			V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	
Histoire médicale	X										
Consentement éclairé	X										
Examen clinique	X				X	X	X	X	X	X	X
Température et poids	X				X	X	X	X	X	X	X
Lame (GE et parasitémie)	X				X	X	X	X	X	X	X
Hématologie (Hb)	X					X		X		X	X
Événements indésirables	X				X	X	X	X	X	X	X
PCR	X					X	X	X	X	X	X
Traitement	X	X	X								

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

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

Tableau II : Posologie du Coartem® (Artéméther -Luméfantrine)

<i>Age (poids)</i>	<i>1<sup>er</sup> jour</i>	<i>2<sup>eme</sup> jour</i>	<i>3<sup>eme</sup> jour</i>
< 1 an (5 à 9 kg)	1 cp x 2/j	1 cp/j	1cp/j
1 à 4 ans (10 à 14 kg)	1 cp x 2/j	1 cp x 2/j	1 cp x 2/j
4 à 8 ans (15 à 24 kg)	2 cp x 2/j	2 cp x 2/j	2 cp x 2/j

Kg = kilogramme ; cp= comprimé ; j = jour

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

Tableau III : Posologie du COARSUCAM™

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

### 3- Analyse moléculaire

#### 3.1. Extraction de l'ADN de *Plasmodium falciparum*

L'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par Chris Dokomajilar [13].

Les confettis imbibés de sang sont découpés à l'aide de ciseaux et introduits dans des tubes stériles de 1,5 ml. 1 ml de saponine à 0.5% était ajouté et incubé pendant une nuit à 4°C. La saponine dissout la double couche phospholipidique du globule rouge. Cette altération détruit la membrane de l'hématie et libère le parasite. L'incubation à 4°C a pour effet l'inhibition des enzymes libérées par la lyse des hématies.

Les confettis étaient ensuite lavés à l'aide du PBS 1X jusqu'à ce que la solution devienne claire. Le PBS est un détergent qui enlève l'hémoglobine et le reste de la saponine présent dans la solution. Une fois la dernière solution de lavage éliminée, 50 µl de Chelex-100 à 20% plus 100 µl d'eau stérile sont ajoutés et chauffés à 95°C pendant 10 min dans un bloc chauffant et remué toutes les 2 minutes.

L'ADN se trouve normalement lié aux ions Mg<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup> qui sont des cofacteurs.

Le Chelex-100 permet la chélation de ces cations polyvalents et libère l'ADN. Le tube est ensuite centrifugé à 12000g pendant 5 min. Cette centrifugation permet le dépôt du Chelex-100 au fond du tube tandis que le surnageant qui contient l'ADN est recueilli et conservé à -20°C.

#### 3.2 Amplification des séquences spécifiques du *Plasmodium falciparum*

La PCR nichée a été utilisée pour l'amplification des séquences spécifiques d'ADN plasmodiale. Le mélange réactionnel et l'amplification ont été réalisés selon le protocole de Chris Dokomajilar [13]. La PCR nichée 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 et amplifiées. Cette deuxième amplification dite «nichée» rend la technique très sensible.

### 3.3 Détermination du polymorphisme génétique de MSP1 et MSP2

Nous avons utilisé la PCR nichée pour déterminer le polymorphisme des deux gènes. La première PCR a consisté à amplifier le bloc 2 et 3 de *MSP1* et *MSP2* respectivement puis la deuxième a servi à génotyper les allèles de ces deux gènes à partir du premier produit de PCR.

Pour la première et deuxième PCR des deux gènes, les constituants (volume et concentration des réactifs) sont identiques hormis les séquences des paires d'amorces. Les composants des mélanges réactionnels de ces deux gènes sont présentés dans le Tableau IV.

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

Réactifs	Concentration de la solution stocke	Concentration finale	Volume ( $\mu\text{L}$ ) à prélever
<b>H2O ultra pure</b>	-	-	16,05
<b>Primer sens</b>	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$	0,5
<b>Primer antisens</b>	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$	0,5
<b>Tampon</b>	10x	1x	2,5
<b>dNTPs</b>	2mM	200 $\mu\text{M}$	2,5
<b>MgCl</b>	50 mM	1,5mM	0,75
<b>Taq polymérase</b>	5 U/ $\mu\text{L}$	1 Unit	0,2
<b>Extrait d'ADN</b>	inconnu	--	2,0
<b>Volume final = 25 <math>\mu\text{L}</math></b>			

#### 3.3.1 Programme d'amplification des gènes *MSP1* et *MSP2*

Lors de la première PCR, les couples d'amorces utilisés étaient : OF/OR pour *MSP1* et 1/4 pour *MSP2*. Les 25  $\mu\text{l}$  du mélange réactionnel, contenus dans un micro tube stérile de 0,2ml, ont été incubés dans un thermocycler sous un programme spécifique à chaque gène (tableau V).

Tableau V : Tableau récapitulatif des programmes d'amplifications du *MSP1* et *MSP2*

Gènes	Amorce et séquences (5'-3')	Programme d'amplification
<b>MSP1</b>	<p>M1-OF :(27bp) CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG</p> <p>M1-OR : (30 bp) CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGAT CA</p>	<p>Dénaturation initiale 95°C x 5m <b>PCR</b> 25 cycles of 94°C x 1m, 61°C x 45s, 72°C x 1.5m Elongation finale 72°C x 5m Conservation à 4 °C</p>
<b>MSP2</b>	<p>1: (30 bp) ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTA TA</p> <p>4: (30 bp) ATATGGCAAAAGATAAAACAAGTGTG CTG</p>	<p>Dénaturation initiale 94°C x 5m <b>PCR</b> 40 cycles of 94°C x 1.5m, 55°C x 45s, 72°C x 1.5 m Elongation finale 72°C x 10 m Conservation à 4 °C</p>

### 3.3.2 Génotypage des allèles du *MSP1* (K1, Mad20, Ro33) et du *MSP2* (3D7, FC27)

Cela a consisté à utiliser le produit de la première PCR comme source d'ADN. Les programmes d'amplification de ces différents allèles se trouvent dans le tableau VI.

Les amorces KF/KR, MF/MR, RF/RR ont été respectivement utilisées pour K1, Mad20 et Ro33 et les amorces A1/A2 et B1/B2 ont été utilisées respectivement pour 3D7 et FC27 (tableau VI).

Tableau VI : Tableau récapitulatif des programmes d'amplifications des différents allèles

Gènes	Allèles	Amorce et séquences (5'-3')	Programme d'amplification
	K1	M1-KF (30bp) AAATGAAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC	Dénaturation initiale 95°C x 5m <u>PCR</u> 30 cycles of 94°C x 45s, 61°C x 30s, 72°C x 1m
	Mad20	M1-KR (30bp) GCTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGA	Elongation finale 72°C x 5m Conservation à 4 °C
<i>MSP1</i>		M1-MF : (30 bp) AAATGAAGGAACAAGTGGAACAGCTGTTAC	
	Ro33	M1-MR : (30 bp) ATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATTACC	
		M1-RF (30bp) TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG	Dénaturation initiale 95°C x 5m <u>PCR</u> 30 cycles of 94°C x 45s, 63°C x 30s, 72°C x 1m
		M1-RR : (30 bp) CATCTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGATC	Elongation finale 72°C x 5m Conservation à 4 °C
<i>MSP2</i>		A1: (27 bp) GCAGAAAGTAAGCCTTCTACTGGTGCT	Dénaturation initiale 94°C x 2m <u>PCR</u> 30 cycles: 94°C x 1.5m, 55°C x 45s, 72°C x 1.5 m
	IC3D7	A2: (23 bp) GATTTGTTTCGGCATTATTATGA	Elongation finale 72°C x 10 m Conservation à 4 °C
		B1: (26 bp) GCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAG	
	FC27	B2: (26 bp) GCTTTGGGTCCTTCTTCAGTTGATTC	

### 3.3.3 Analyse des produits de la PCR nichée

Les produits obtenus après la PCR nichée (séquences nucléotidiques amplifiées) 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 1X (Trizma Boric acid EDTA). Cinq (5) µl de chaque produit de la PCR nichée sont déposés dans un puit du gel d'électrophorèse. Le produit de la PCR n'est pas mélangé à du bleu de charge car le tampon (Flexi Buffer) que nous avons utilisé est un

tampon coloré qui a la propriété de maintenir l'ADN au fond du puit. L'électrophorèse a été réalisée à une intensité de 400mA sous une tension de 80 volts pendant 3 heures. Le bromure d'éthidium a la propriété de s'intercaler entre les fragments d'une molécule d'ADN et quand il est excité aux rayons ultra- violets, il émet une fluorescence à 622 nm permettant ainsi de localiser les fragments d'ADN après électrophorèse. Sous illumination ultra violet, les fragments d'ADN apparaissent sous forme de bandes à différentes positions sur le gel.

Le polymorphisme des deux gènes se caractérise par le nombre de clones (bandes) des différents allèles. Plus un allèle a de bandes plus le gène est polymorphe.

Pour la classification de la réponse au traitement à partir des résultats du *MSP1* et du *MSP2*, nous avons comparé chez un même patient la position des clones du jour d'inclusion (J0) à celle du jour de ré-apparition des parasites (J-échec). Les résultats sont exprimés en terme de recrudescence, nouvelle infection ou indéterminé (tableauVII).

Tableau VII: Exemple d'interprétation des gels

Statut	Caractéristiques
Nouvelle infection	Taille des bandes à J0 et J-échec est différent.
Recrudescence	Taille de certaines bandes à J0 et J-échec sont identiques
Indéterminé	PCR négative pour J0 ou J-échec

### 3.3.4 Définition de l'efficacité thérapeutique

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

- Echec Thérapeutique Précoce (ETP):
  - Apparition de signes de danger ou de paludisme grave au jour 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  $\geq 37,5$  °C
  - Parasitémie au jour 3 dépassant d'au moins 25 % celle du jour 0
- Echec Thérapeutique Tardif (ETT)

L'ETT est divisée en Echec Clinique Tardif et en Echec Parasitologique Tardif

### 1. Echech Clinique Tardif (ECT):

- Apparition de signes de danger ou de paludisme grave après le jour 3, en présence d'une parasitémie, en l'absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique précoce
- Présence d'une parasitémie et température axillaire  $\geq 37,5$  °C un jour quelconque entre le jour 4 et le jour 42, en l'absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique précoce

### 2. Echech Parasitologiques Tardif (EPT):

Présence d'une parasitémie au jour 42 et température axillaire  $< 37,5$  °C, en l'absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique précoce ou d'échec clinique tardif.

- Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (RCPA) :  
Absence de parasitémie au jour 28, quelle que soit la température axillaire, en l'absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique précoce, d'échec clinique tardif ou d'échec parasitologique tardif.

## 3.5- Analyse des données

Les données ont été saisies sur le logiciel EXCEL 2003 et analysée avec le logiciel Epi Info 6.04. Le taux d'échec thérapeutique constitue la somme des ETP et des ETT rapportés à l'ensemble de l'échantillon. Le test de Chi 2 a été utilisé pour comparer les variables catégorielles et mesurer leur association avec un niveau de significativité de 5% ( $p < 0,05$ ).

## V- RESULTATS

### 1. Résultats globaux

Nous avons inclus au total 165 patients au cours de l'étude. La moyenne d'âge globale était de 25,95 mois et le sexe ratio de 1,54 en faveur de l'homme. Parmi les 165 patients, 83 était sous AL et 82 sous AS+AQ (tableau VIII). A la fin des 42 jours, 161 patients ont pu terminer le suivi (82 patients sous AL et 79 sous AS+AQ).

Pour déterminer le polymorphisme des deux gènes et la prévalence des différents allèles dans la population des parasites étudiée nous avons pris en compte tous les patients inclus au J0, soit 165 échantillons. Après avoir réalisé la PCR, les résultats étaient interprétables pour 146 échantillons (88,49%) et 151 échantillons (91,51%) respectivement pour le *MSP1* et le *MSP2*.

Tableau VIII: Caractéristiques de la population d'étude n (%)

	Groupe AL 83 (50,30)	Groupe AQ+AS 82 (49,70)
- Sexe : féminin	30 (36,14)	35 (42,68)
- Sexe : masculin	53 (63,86)	47 (53,32)
Age moyenne (en mois)	26,21	25,67
Température moyenne à J0 (en °c)	37,96	38,02
Densité Parasitaire à J0 : Moyenne géométrique [95%CI]	29125	29342
Poids moyen à J0 (en kg)	10,00	10,12

### 2. Résultats cliniques et parasitologiques

L'analyse des résultats cliniques et parasitologiques des 161 patients qui ont terminés leur suivi de 42 jours, indique des taux d'échecs thérapeutiques bruts (avant correction par la PCR) de 60,07% et de 53,16% respectivement pour AL et pour AS+AQ (tableau IX). La différence entre ces 2 taux n'était pas statistiquement significative [OR = 1,79 ; IC 95% (0,90 – 3,58)] P = 0,07]. Les résultats obtenus après correction par la PCR (allèles *MSP1/MSP2*) indiquent des taux d'échec de 21,95% et 12,66% respectivement pour AL et pour AS+AQ. Là

également, la différence observée entre ces 2 taux n'était pas statistiquement significative [OR = 1,94 ; IC 95% (0,78 – 4,92)] P = 0,11].

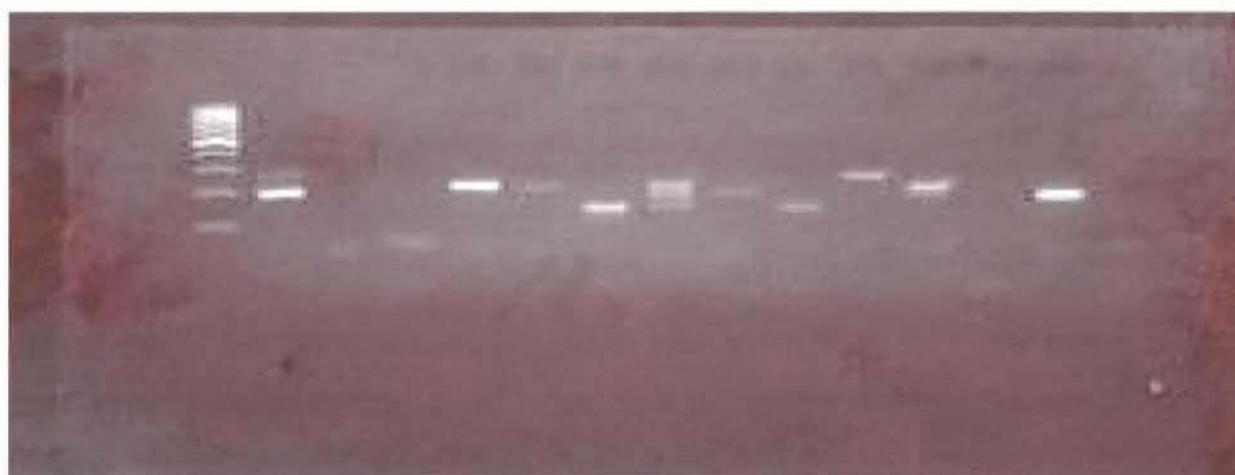
Tableau IX : Réponse au traitement par AL et AS+AQ avant et après PCR [% (n/N)]

	AL (N=82)		AS+AQ (N=79)		P value
	ETT	RCPA	ETT	RCPA	
Classification non corrigée par la PCR	<b>67,07</b> (55/82)	<b>32,93</b> (27/82)	<b>53,16</b> (42/79)	<b>46,84</b> (37/79)	0,07
Classification corrigée par la PCR	<b>21,95</b> (18/82)	<b>78,05</b> (64/82)	<b>12,66</b> (10/79)	<b>87,34</b> (69/79)	0,11

### 3. Polymorphisme des gènes *MSP1* et *MSP2*

Les figures 5 et 6 présentent un exemple de résultats de l'étude du polymorphisme des gènes *MSP1* et *MSP2* pour différents patients. Le patient 154 par exemple hébergeait 3 clones de K1, 1 clone de Mad20 et 1 clone de Ro33. Le patient 022 avait quant à lui 4 clones de 3D7 et 2 clones de FC27.

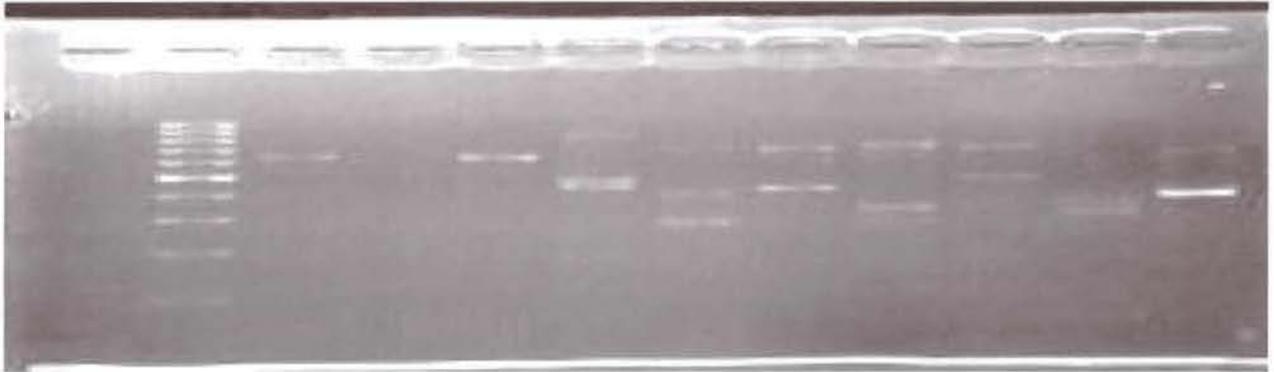
Patients		151				152			154			156		
allèles	C-	MP	K	M	R	K	M	R	K	M	R	K	M	R
puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15



C-= contrôle négatif, MP= marqueur de poids moléculaire, K=K1, M= Mad20, R= Ro33

Figure 5 : Polymorphisme du *MSP1* à J0

Patients			016		018		019		022		024	
allèles	C-	MP	3D7	FC27								
puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12



C-= contrôle négatif, MP= marqueur de poids moléculaire

Figure 6 : Polymorphisme du *MSP2* à J0

### 3.1 Prévalence des différents allèles des gènes *MSP1* et *MSP2* dans la population d'étude

La répartition des différents allèles circulant dans la population d'étude avant l'administration des traitements est résumée dans le tableau X. Les allèles K1 pour *MSP1* et 3D7 pour *MSP2* sont celles qui circulaient le plus, par contre les allèles Ro33 pour le *MSP1* et FC27 pour le *MSP2* sont celles qui circulaient le moins.

Pour le *MSP1*, les infections avec des souches de type K1 uniquement étaient les plus fréquentes (28,1%) alors que les infections mixtes avec les souches de type Mad20/Ro33 avaient la fréquence la plus faible (2,7%).

Pour le *MSP2*, les infections mixtes 3D7/FC27 (58,9%) étaient les plus fréquentes alors que les infections avec des souches de type FC27 uniquement avaient la fréquence la plus faible (6%).

Tableau X: Fréquence des différents allèles des gènes *MSP1* et *MSP2* dans la population des parasites étudiés

Allèles du <i>MSP1</i>	Nombre d'allèle % (n/N)
K1	28,1 (41/146)
K1/Mad20	24,7 (36/146)
K1/Mad20/Ro33	15,7 (23/146)
K1/Ro33	15,1 (22/146)
Mad20	10,3 (15/146)
Mad20/Ro33	2,7 (4/146)
Ro33	3,4 (5/146)
Allèles du <i>MSP2</i>	
3D7	35,1 (53/151)
3D7/FC27	58,9 (89/151)
FC27	6 (9/151)

### 3.2 Polymorphisme du gène *MSP1* dans la population avant (J0) et après (JR) l'administration des traitements

L'étude du polymorphisme du gène *MSP1* indique que le nombre de clones de parasites dans la population d'étude variait de 1 à 4 aussi bien avant l'administration des traitements qu'après l'administration des traitements (tableau XI). Dans l'ensemble, l'allèle K1 apparaît comme le plus polymorphe avec 53,28% et 24,53% de fréquence des infections polyclonales respectivement avant et après l'administration des traitements.

Nous avons noté une forte proportion des infections monoclonales pour Mad20 (70,51%) et Ro33 (96,29%) avant l'administration des traitements, contrairement au K1 pour lequel on notait autant d'infections monoclonale (46,72%) que bi-clonale (45,08%).

En considérant le nombre de clones pour les 3 allèles, le K1 avait un maximum de 4 clones, contre 3 clones pour Mad20 et 2 clones pour Ro33 avant l'administration des traitements. Après l'administration des traitements, nous constatons une sélection statistiquement significative des infections monoclonales avec K1 qui passe de 46,72% à 75,5% ( $p = 0,0004$ ).

Par ailleurs, nous avons constaté que toutes les infections avec le Ro33 après l'administration des traitements étaient exclusivement monospécifiques.

Tableau XI : Répartition du polymorphisme des allèles du *MSP1* avant (J0) et après (JR) traitement

	Allèles	Nombre de bandes (%) n/N				Polyclonalité (%) n/N
		1	2	3	4	
Avant Traitement	K1	(46,72) 57/122	(45,08) 55/122	(6,6) 8/122	(1,64) 2/122	(53,28) 65/122
	Mad20	(70,51) 55/78	(25,64) 20/78	(3,85) 3/78	-	(29,5) 23/78
	Ro33	(96,29) 52/54	(3,70) 2/54	-	-	(3,70) 2/54
Après Traitement	K1	(75,5) 40/53	(16,98) 9/53	(5,66) 3/53	(1,88) 1/53	(24,53) 13/53
	Mad20	(85,18) 23/27	(14,82) 4/27	-	-	(14,82) 4/27
	Ro33	(100) 28/28	-	-	-	-

### 3.3 Polymorphisme du gène *MSP2* dans la population avant (J0) et après (JR) l'administration des traitements

L'étude du polymorphisme du gène *MSP2* indique un très grand polymorphisme de celui-ci comparé au gène *MSP1*. En effet, le nombre de clones de parasites dans la population d'étude variait de 1 à 7 avant l'administration des traitements alors qu'après l'administration des traitements ce nombre varie de 1 à 6 (tableau XII).

L'allèle 3D7 apparaît comme le plus polymorphe avec 73,57% et 57,33% d'infections polyclonales respectivement avant et après l'administration des traitements.

Nous avons noté une forte proportion des infections monoclonales pour le FC27 (51,02%) avant l'administration des traitements, contrairement au 3D7 pour lequel on notait autant d'infections monoclonales que bi, tri ou quatre clones. Après l'administration des traitements, nous constatons une sélection statistiquement significative ( $p = 0,01$ ) des infections avec le 3D7. Pour les infections avec FC27, nous constatons également une sélection statistiquement significative ( $p = 0,02$ ) des infections.

Tableau XII: Répartition du polymorphisme de taille à l'intérieur des allèles du *MSP2* avant (J0) et après (JR) traitement

	<i>Allèles</i>	<i>Nombre de bandes (%) n/N</i>							<i>Polyclonalité (%) n/N</i>
		1	2	3	4	5	6	7	
Avant Traitement	3D7	(26,40) 37/140	(22,10) 31/140	(17,90) 25/140	(20,70) 29/140	(8,60) 12/140	(2,90) 4/140	(1,40) 2/140	(73,60) 103/140
	FC27	(51,02) 50/98	(32,65) 32/98	(12,42) 12/98	(3,06) 3/98	(1,02) 1/98			(48,97) 48/98
Après Traitement	3D7	(42,67) 32/75	(20,0) 15/75	(21,33) 16/75	(9,33) 7/75	(4,0) 3/75	(2,67) 2/75		(57,33) 43/75
	FC27	(70,0) 35/50	(20,0) 10/50	(6,0) 3/50	(4,0) 2/50				(30,0) 15/50

## **VI- DISCUSSION**

### **1. De la réponse au traitement avec les deux combinaisons**

Le génotypage des gènes *MSP1* et *MSP2* est une méthode simple pour déterminer les recrudescences des nouvelles infections dans les études de l'efficacité thérapeutique aux antipaludiques. [1]. La présente étude indique des taux d'échec de 21,95% et de 12,66% respectivement pour AL et AS+AQ après correction par la PCR. Pourtant, ces taux étaient de 67,07% et de 53,16% respectivement pour AL et AS+AQ avant correction par la PCR. Cette différence avant et après correction par la PCR indique toute l'importance de cet outil dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques. Les cas de PCR négative que nous avons relevés ont pu être dus à une erreur de lecture de la lame qui a confirmé le patient parasité soit à une erreur qui est survenue lors de la réalisation de la PCR. Toutefois, cette technique pourrait comporter des limites car selon une étude conduite par Atunga Nyachio et al au Rwanda, 50% des échantillons classés comme recrudescents par la technique du *MSP1* et *MSP2* était de nouvelles infections lorsqu'on utilise la technique des microsatellites [4].

Les taux d'échecs obtenus indiquent que les deux médicaments ont la même efficacité car il n'y avait pas de différence statistiquement significative. Nos résultats sont similaires à ceux d'autres études conduites en Afrique. C'est ainsi que pour AS+AQ, il a été rapporté des taux d'efficacité de 82%, 89% et 70% au Sénégal, au Gabon et au Kenya respectivement [11]. Cependant, une étude conduite en Tanzanie a rapportée des taux d'échecs moins élevés avec 12,2% pour AQ+AS et 2,8% pour AL [21]. Cette différence entre les résultats pourrait s'expliquer par la différence de transmission entre les différentes régions. Une autre explication possible de la grande efficacité des traitements en Tanzanie pourrait être due au mode d'administration des médicaments. En effet dans l'étude Tanzanienne, l'administration était observée alors que dans notre étude l'administration était faite à domicile par les parents.

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

Au cours de nos analyses PCR, nous avons obtenu des PCR négatives (sans bandes). Cela pourrait s'expliquer par des erreurs de manipulation technique au cours de la PCR, bien que nous ayons respecté scrupuleusement le protocole. Une autre explication possible est la survenue d'erreurs de lecture des lames déclarant un patient positif alors qu'il est négatif. Un système de contrôle de qualité régulier au cours de l'étude aurait permis d'éviter ce problème,

mais cela aurait nécessité plus de moyens que nous ne possédons pas dans le cadre de cette étude.

### **3- De la prévalence des différents allèles des deux gènes dans la population d'étude**

Nous avons noté au cours de notre étude pour le *MSP1* que l'allèle K1 avait la fréquence la plus élevée et que l'allèle Ro33 avait la fréquence la plus faible. Nos résultats étaient similaires à ceux rapporté par G. Peyerl et *al* dans une étude conduite en Ouganda, avec cependant des proportions plus importantes de 81,1% pour le K1, et 35,5% pour le Ro33 [9]. Des études effectuées par Daibing Zhong et *al* dans le village de Kisii au Kenya ont révélé une absence du Ro33 [5]. Cette absence pourrait indiquer une faible représentativité de cet allèle, car dans notre étude il était également très faiblement représenté avec une proportion de 3,4%. D'autres études ailleurs dans le monde ont également rapportés des résultats similaires. En effet, des études conduite par Alihsan Heidari et *al* en Iran et Marcelo U. Ferreira et *al* au Brésil ont rapportés des résultats similaires [3, 19]. Ces résultats nous indiquent que bien que l'on observe des différences de proportion en fonction des zones géographique, la tendance de la répartition des différents allèles du *MSP1* est homogène et standard indépendamment de la zone dans laquelle nous pouvons nous situer.

En ce qui concerne les infections mixtes, nous avons noté que les infections qui contenaient le K1 (K1/Mad20/Ro33, K1/Mad20, K1/Ro33) étaient les plus fréquemment rencontrées avec les infections K1/Mad20 à la plus forte fréquence. Nous avons par contre constaté que les infections mixtes qui ne contenaient pas le K1, notamment les infections avec Mad20/Ro33 étaient très faiblement représentées. Cette tendance des infections mixtes a également été confirmée dans l'étude conduite par Fousseyni et *al* au Gabon [8]. Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'allèle K1 améliorerait le "fitness" et donc la survie des infections mixtes dans lesquelles elle est présente.

En ce qui concerne le *MSP2* nous avons noté une très faible proportion des infections avec l'allèle FC27 et une proportion plus importante des infections avec l'allèle 3D7. Nos résultats corroborent les tendances observées par G. Peyerl et *al* dans leur étude menée en Ouganda avec toutefois des proportions plus élevées de 66,7% pour le 3D7 et 55,6% pour FC27 [9]. Nous avons également noté dans notre étude que bien que les infections mono - spécifiques avec l'allèle FC27 soit faiblement représenter (6%), on notait une grande proportion d'infections mixtes 3D7/FC27 qui était de 58,9%. Cette même tendance a été rapportée dans

l'étude menée au Gabon par Fousseyni et *al* [8]. Ces résultats nous conduisent à émettre l'hypothèse selon laquelle la présence des souches avec l'allèle 3D7 améliore le "fitness" des souches avec l'allèle FC27 et améliore ainsi leur survie.

#### **4. Du polymorphisme des 2 gènes avant et après l'administration des traitements et l'impact des traitements sur la sélection des différents allèles.**

En ce qui concerne le *MSP1*, les résultats de notre étude indiquent qu'avant traitement l'allèle K1 était plus polymorphe avec 4 clones possibles suivit du Mad20 avec 3 clones possible et du Ro33 avec 2 clones possible. Après traitement nous avons constaté que le nombre de clones restait à 4 pour le K1, mais diminuait pour le Mad20 qui passe à 2 et le Ro33 qui passait à un seul clone. Ces résultats sont confirmés par ceux rapporté par Agnès et *al* dans une étude conduite au Gabon en 2003 [2]. Ce polymorphisme de taille observé pourrait s'expliquer par la structure du bloc 2 qui montre que le Ro33 n'est pas étendu sur ce bloc par rapport aux deux autres qui y sont très distribués. La constance du nombre de clones pour le K1 avant et après traitement, indique une faible sensibilité des clones de cet allèle aux traitements avec les 2 combinaisons étudiés.

En ce qui concerne le *MSP2*, nous avons noté le très grand polymorphisme de ce gène comparé au *MSP1*. En effet le nombre de clones avant le traitement allait jusqu'à 7 pour 3D7 et à 5 pour le FC27. Après le traitement ce nombre passe à 6 pour le 3D7 et à 4 pour le FC27. Ces résultats ont déjà été rapportés dans d'autres études [24]. Ce polymorphisme pourrait être dû à une recombinaison génétique par crossing over ou aux délétions et insertions de bases qui se produiraient dans la séquence de l'ADN au cours de la mitose [23].

Nous avons également noté aussi bien pour le *MSP1* que pour le *MSP2* une sélection des infections monoclonales après les traitements pour tous les allèles. Cela indique que pour plusieurs clones d'un même allèle, les souches peuvent être indépendamment sensibles ou résistants sans tenir compte de cette appartenance commune. La sélection des infections du FC27 évoluant dans le même sens que celle du 3D7 après traitement conforte notre hypothèse évoquée plus haut et selon laquelle cet allèle a un faible "fitness" nécessitant la présence du 3D7 pour lui assurer une meilleure survie.

## VII- CONCLUSION

Au terme de cette étude sur le polymorphisme des gènes *MSP1* et *MSP2* au Burkina Faso, nous avons noté l'importance du rôle de ces deux gènes dans l'interprétation des études d'efficacité thérapeutique aux antipaludiques. L'étude du polymorphisme des deux gènes dans la population des souches de parasites circulant nous a permis de fournir pour la première fois des données sur le sujet au Burkina Faso qui indique une forte prévalence de l'allèle K1 pour le *MSP1* et de l'allèle 3D7 pour le *MSP2*. Elle nous a permis également d'émettre plusieurs hypothèses qui restent à confirmer par des études plus large et si possible couvrant les trois faciès épidémiologiques du Burkina Faso. L'étude de l'impact des traitements sur le polymorphisme de ces deux gènes nous a permis de relever le très grand polymorphisme du gène *MSP2* comparé au gène *MSP1*. Elle nous a permis également d'émettre l'hypothèse de la faible sensibilité de l'allèle K1 du *MSP1* vis-à-vis des traitements comparativement aux autres allèles.

### Perspectives

- Les résultats que nous avons obtenus sur le polymorphisme des gènes *MSP1* et *MSP2* concerne le site de Nanoro qui est représentatif de l'un des trois faciès épidémiologique du Burkina Faso. Une étude dans les autres faciès sera nécessaire en vue d'établir une cartographie de ce polymorphisme sur l'ensemble du pays.
- Nous avons également émis plusieurs hypothèses au cours de cette étude et l'initiation d'étude plus large comme indiquée plus haut permettrait de confirmer ces hypothèses.
- L'initiation d'une étude utilisant les microsatellites permettra de vérifier l'hypothèse de la surestimation des cas de recrudescences évoqués par Atunga Nyachieo et al au cours de l'étude qu'ils ont conduit au Rwanda et qui indiquait que 50% des échantillons classés comme recrudescents par la technique du *MSP1* et *MSP2* était de nouvelles infections lorsqu'on utilise la technique des microsatellites.

## VIII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1- **ADITHYA CATTAMANCHI, DANIEL KYABAYINZE, ALAN HUBBARD, PHILIP J. ROSENTHAL, AND GRANT DORSEY.** Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug efficacy study: comparison of results based on genotyping of msp-1, msp-2, and glurp. **Am. J. Trop. Med. Hyg., 2003, 68(2), pp. 133-139**

2- **AGNES AUBOUY, FLORENCE MIGOT-NABIAS AND PHILIPPE DELERON.** Polymorphism in two merozoite surface proteins of plasmodium falciparum isolates from Gabon. **Malaria journal, 2003, 2:12**

3- **ALIEHSAN HEIDARI, HOSSEIN KESHAVARZ, MOHAMMAD B ROKNI AND TOMAS JELINEK.** Genetic diversity in merozoite surface protein (MSP)-1 and MSP-2 genes of *Plasmodium falciparum* in a major endemic region of Iran. **Korean Journal of Parasitology, 2007, Vol. 45, No. 1: 59-63**

4- **ATUNGA NYACHIEO, CHANTAL VAN OVERMEIR, THIERRY LAURENT, JEAN-CLAUDE DUJARDIN, AND UMBERTO D'ALESSANDRO.** Plasmodium falciparum genotyping by microsatellites as a method to distinguish between recrudescence and new infections. **Am. J. Trop. Med. Hyg., 2005, 73(1), pp. 210-213**

5- **DAIBIN ZHONG, YAW AFRANE, ANDREW GITHEKO, ZHAOQING YANG, LIWANG CUI, DAVID M. MENGE, EMMANUEL A. TEMU, AND GUIYUN YAN.** Plasmodium falciparum Genetic Diversity in Western Kenya Highlands. **Am. J. Trop. Med. Hyg, 2007, 77(6), pp. 1043-1050**

6- **ebischoff.free.fr/These/PDF/Preambule.pdf**

7- **F. NTOUMI A, J. NGROUNDU-LANDJI, A. J. F. LUTY B, G. DUBREUIL C & P. MILLET.** Polymorphisme allélique du gène MSP-2

de Plasmodium falciparum analysé à partir d'échantillons sanguins d'enfants gabonais. **Bull Soc Pathol Exot, 2001, 94, 2 bis, 183-187**

**8- FOUSSEYNI S. TOURE, PHD; ODILE OUWE-MISSI-OUKEM-BOYER, PHD; JEROME MEZUI-ME-NDONG, MS; GUY ROGER NDONG-ATOME, PHD STUDENT; ULRICK BISVIGOU, MD; DOMINIQUE MAZIER, MD, PHD; AND SYLVIE BISSER, MD, PHD.** Cytoadherence and Genotype of *Plasmodium falciparum* Strains from Symptomatic Children in Franceville, Southeastern Gabon. **Clinical Medicine & Research, 2007, Volume 5, Number 2:106-113**

**9- G. PEYERL-HOFFMANN, T. JELINEK, A. KILIAN, G. KABAGAMBE, W. G. METZGER AND F. VON SONNENBURG.** Genetic diversity of Plasmodium falciparum and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. **Tropical Medicine and International Health, 2001, volume 6 no 8 pp 607±613**

**10- HALIDOU TINTO.** Comparaison du microtest et du semi-microtest isotopiques dans leurs versions complète et simplifiée pour l'étude de la sensibilité in vitro de plasmodium falciparum aux antipaludiques. **Thèse, 1997/1998, N°98-P-10, facultés de médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Université.**

**11-**

**[http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires\\_desc/2005-octobre/DESC-octobre-2005-danis.pdf](http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2005-octobre/DESC-octobre-2005-danis.pdf)**

**12- <http://medecinetropicale.free.fr/spe/paluaubry.htm>**

**13- [http://www.muucsf.org/protocols/pdf/Genotyping%20\(MSP-1,%20MSP-2\).pdf](http://www.muucsf.org/protocols/pdf/Genotyping%20(MSP-1,%20MSP-2).pdf)**

14-

[http://www.rbm.who.int/cmc\\_upload/0/000/015/372/RBMInfosheet\\_1fr.htm](http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/372/RBMInfosheet_1fr.htm) : Qu'est-ce que le paludisme ?

15-

[http://www.top-depart.com/guide-voyage/sante/grands\\_dossiers/PALUDISME\\_\\_\\_HISTORIQUE\\_\\_\\_MYTHES\\_\\_\\_CROYANCES\\_ET\\_IDEES\\_RECUES-9.html](http://www.top-depart.com/guide-voyage/sante/grands_dossiers/PALUDISME___HISTORIQUE___MYTHES___CROYANCES_ET_IDEES_RECUES-9.html)

**16- INGRID FELGER, SYLVIA STEIGER, CHRISTOPH HATZ, TOM SMITH & HANS-PETER BECK** Antigenic cross-reactivity between different alleles of the *Plasmodium Falciparum* merozoite surface protein 2. **Parasite Immunology**,2003,25, 531–543

**17- J. DELMONT, J. TESTA, A.J. GEORGES.** Chimiorésistance du paludisme, difficultés d'aujourd'hui, Perspectives vaccinales, espoir de demain. **Médecine d'Afrique Noire**, 1990, 37 (7)

**18- KANGOYE LARBA, NANA VICTOR, KONATE AMADOU TIDIANI.** Réunion de consensus national sur le changement de politique de traitement du paludisme. **Programme National de Lutte contre le Paludisme Ouagadougou, 21-22 Février 2005**

**19- MARCELO U FERREIRA, OSAMU KANEKO, MASATSUGU KIMURA, QING LIU, FUMIHIKO KAWAMOTO, KAZUYUKI TANABE.**  
Allelic Diversity at the Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1) Locus in Natural *Plasmodium falciparum* Populations: a Brief Overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1998, Vol. 93(5): 631-638,**

**20- NAOKO SAKIHAMA A, MASATOSHI NAKAMURA B, ANTONIO A. PALANCA JR. C, RENEE A. ARGUBANO C, ESTER P. REALON C, ALAN L. LARRACAS D, RONALD L. ESPINA D, KAZUYUKI TANABE A.** Allelic diversity in the merozoite surface protein 1 gene

of *Plasmodium falciparum* on Palawan Island, the Philippines. **Parasitology International** ,2007, 56,185-194

**21- NOVARTIS INTERNATIONAL AG.** Une nouvelle étude révèle que *Coartem*® (artéméther-luméfantrine) est le traitement antipaludique le plus efficace dans les zones de résistance élevée aux antipaludiques traditionnels. **<http://www.novartis.com>**, 2005

**22- O. GAYE, G. MC LAUGHLIN, M. DIOUF, S. DIALLO.** Etude comparative de cinq méthodes de diagnostic biologique du paludisme : la goutte épaisse, la méthode QBC, la sonde à ADN, la PCR et le parasight F test. **Médecine d'Afrique Noire**, 1998, 45 (4)

**23- RANFORD CARTWRIGHT LC. , BALFE P., CARTER R., WALLIKER D.,** Frequency of cross fertilization in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Parasitology**, 1993, 107: 11-18

**24- SEDIGHEH ZAKERI, SANDOR BEREZKY, PARIN NAIMI, J.PEDRO GIL, NAVID DINPARAST DJADID, ANNA FARNERT, GEORGES SNOUNOU AND ANDERS BJORKMAN.** Multiple genotypes of the merozoite surface proteins 1 and 2 in *Plasmodium falciparum* infections in a hypoendemic area in Iran. **Tropical Medicine and International Health doi**, 2005, volume 10 no 10 pp 1060-1064

**25-WHO/CDS/CSR/EPH/2002.17 WHO/CDS/RBM/2002.39.** Surveillance de la résistance aux antipaludiques. **Rapport d'une consultation de l'OMS Genève, Suisse, 3-5, décembre 2001**