

BURKINA FASO  
UNITE-PROGRES-JUSTICE

MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE,  
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL



MEM  
363 DIA

**MEMOIRE**

Présenté par : **DIALLO Salou**

*Maître ès Sciences Biochimie- Microbiologie Appliquée*

Pour l'obtention du :

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

*Sur le Thème :*

*Sensibilité de Plasmodium falciparum aux antipaludiques :  
Relations entre marqueurs moléculaires et échecs thérapeutiques  
au traitement.*

**Soutenu le 06 août 2009**

**Devant le Jury :**

**Président : Pr Jean Bosco OUEDRAOGO**

**Membres : Dr Hermann SORGHO**

**Dr Abdoulaye DIABATE**

**Directeur de mémoire : Dr Halidou TINTO**

**Co-directeur : Dr Hermann SORGHO**

N° d'ordre .....

# ***DEDICACE***

MEM

363 DIA

## **Je dédie ce travail**

A Dieu tout puissant

### **A mon père**

C'est grâce à tes bénédictions que j'ai pu réaliser ce travail qui est le fruit de tes multiples sacrifices, j'espère qu'il pourra faire ta fierté. A toi mon affection et ma gratitude éternelle. Puisse ce modeste travail te donner une légitime fierté.

### **A ma mère.**

Voici le fruit pour lequel tu as souffert depuis des années. Tu m'as toujours soutenu dans toutes mes entreprises. Soit assurée de ma profonde affection. Tes conseils, tes encouragements, tes bénédictions et surtout ta patience m'ont permis d'atteindre ce résultat.

Que le bon Dieu t'accorde longue vie afin que tu puisses jouir du fruit de tes peines.

A toi mon affection et ma reconnaissance éternelle.

### **A mon grand frère (in memoriam)**

Fier de toi je n'oublierai jamais ces mots de courage; d'intégrité et d'honnêteté que tu me prodiguais comme conseil.

Tu nous as été affectueusement arraché le 05/09/2005. Ma joie serait encore plus immense si tu avais été là, ton siège en ce jour mémorable est vide et j'ai le regret de ne pouvoir te dédier ce travail qu'après ta mort.

Dors en paix.

### **A ma bien aimée.**

Tu as su me soutenir lors des moments difficiles. Tu as toujours su apporter les bons gestes et les bonnes paroles au bon moment. Je ne te remercierai jamais assez pour le soutien que tu m'as apporté la joie, nous unir d'avantage.

Sois assurée de mon profond amour.

# ***REMERCIEMENTS***

**A notre Maître et Directeur de mémoire**

**Docteur Halidou Tinto,**

**PharmD, Msc, PhD,**

**Chargé de recherche à l'IRSS (CNRST).**

Il nous faut d'abord vous remercier d'avoir accepté de diriger ce mémoire malgré vos multiples occupations. Votre grande disponibilité, votre rigueur dans le travail, vos qualités humaines et votre érudition sont autant de caractère que forcent le respect et l'administration.

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 honoré d'être parmi vos élèves. Soyez assuré cher directeur, de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.

**A nos membres du Jury :**

**Professeur Jean Bosco OUEDRAOGO** directeur de l'IRSS/DRO Bobo Dioulasso. Nous vous adressons nos sincères remerciements d'avoir accepté, malgré vos multiples occupations, de présider ce Jury pour juger notre travail.

**Au Docteur Abdoulaye DIABATE (PhD).** Il nous sera très difficile de trouver des mots exacts pour vous remercier de l'honneur dont vous nous avez fait en acceptant de siéger dans ce jury pour juger ce travail dans le but de son amélioration. Nous vous disons merci.

**Dr Hermann Sorgho (PhD).** Nous vous prions de trouver ici l'expression de notre profonde gratitude d'avoir accepté de juger ce travail malgré les charges de votre agenda. Nous disons merci infiniment.

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

Nous vous remercions de nous avoir accepté dans votre laboratoire pour cette étude. Veuillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

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

Pour nous avoir accueilli dans votre Centre, nous vous disons merci. Nous vous sommes reconnaissant pour tous les moyens matériels mis à notre disposition.

**A madame Zampa Odile et mademoiselle Nikiéma Rosalie**

Vos conseils pratiques ont été d'un apport considérable lors de nos différentes manipulations. Soyez rassurées de nos sincères remerciements.

A l'équipe de l'**Unité de Recherche Clinique de Nanoro (URCN)** : Dr Bihoun, Dr Kpoda, Mrs Djiguemdé Adama, Tinto Adèle, Sibalo Hamadou, Abassiri, Hien Patrice.

Vos différents soutiens et interventions ont été d'un apport précieux lors des activités que nous avons mené ensemble. Recevez ici notre profonde reconnaissance.

**A tous** nos amis qui ont participé à la réalisation de ce travail, nous leur disons grandement merci.

**Nos remerciements** vont également à l'endroit de la population de Nanoro notamment à tous les enfants et leur parent qui ont accepté participer à cette étude.

## Sigles et abréviations

<b>ACTs :</b>	Artemisinin-based combination therapies
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ATP:</b>	Adénosine Triphosphate
<b>BET:</b>	Bromure d’Ethidium
<b>Bp :</b>	base paire
<b>CSPS :</b>	Centre de Santé et de Promotion Sociale
<b>dATPs:</b>	Désoxy-Adénosine Triphosphates
<b>dCTPs:</b>	Désoxy-Cytosine Triphosphates
<b>dGTPs:</b>	Désoxy-Guanosine Triphosphates
<b>dNTPs:</b>	Désoxyribonucléosides triphosphates
<b>dTTPs:</b>	Désoxy-Tyrosine Triphosphates
<b>EPP :</b>	Echec Parasitologique Précoce
<b>EPT :</b>	Echec Parasitologique Tardif
<b>ETP :</b>	Echec Thérapeutique Précoce
<b>ETT :</b>	Echec Thérapeutique Tardif
<b>FP :</b>	Ferriprotoporphirine
<b>GE :</b>	Goutte épaisse
<b>G6PD :</b>	Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase
<b>IRSS/DRO :</b>	Institut de Recherche en Sciences de la Santé/Direction Régionale de l’Ouest
<b>mA :</b>	Milliampère
<b>MSP1, 2 :</b>	Merozoite Surface Protein 1, 2
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PBS :</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCR :</b>	Polymerase Chain Reaction
<b><i>Pfprt:</i></b>	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter gene
<b><i>PFCRT:</i></b>	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter protein
<b><i>Pfprt K76T</i></b>	Substitution de la lysine (K) en position 76 par la thréonine (T) du <i>Pfmdr-1</i>
<b><i>Pfdhfr:</i></b>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase
<b><i>Pfdhps:</i></b>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydropteroate synthetase
<b><i>Pfmdr1:</i></b>	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1
<b><i>Pfmdr-1N86Y</i></b>	Substitution de l’asparagine (N) en position 86 par la tyrosine(Y) du <i>Pfmdr1</i>
<b><i>Pfmdr-1Y184F</i></b>	Substitution de la tyrosine(Y) en position 184 par la Phenylalanine (F)
<b><i>Pfmdr-1S1034C</i></b>	Substitution de la Serine (S) en position 1034 par la Cystéine(C)
<b><i>Pfmdr-1N1042D</i></b>	Substitution de l’asparagine (N) en position 1042 par l’acide aspartique (D)
<b><i>Pfmdr-1D1246Y</i></b>	Substitution de l’acide aspartique (D) en position 1246 par la tyrosine(Y)
<b><i>Pgh1:</i></b>	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1 protein
<b>SP:</b>	Sulfadoxine–pyrimethamine
<b>TBE:</b>	Trizma acid-Boric EDTA
<b>Th:</b>	Température d’hybridation
<b>VIH :</b>	Virus de l’immunodéficience humaine
<b>WHO :</b>	World Health Organization

## Sommaire

<i>Introduction</i> .....	- 1 -
I. RAPPEL SUR LE PALUDISME.....	- 2 -
I.1. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> .....	- 2 -
I.1.1. Chez l'Homme .....	- 3 -
I.1.2 Chez l'Anophèle femelle.....	- 3 -
I.2. Particularités liées à l'espèce plasmodiale. ....	- 4 -
I.2.1. <i>Plasmodium falciparum</i> .....	- 4 -
I.2.2. <i>Plasmodium vivax</i> .....	- 4 -
I.2.3. <i>Plasmodium Ovale</i> .....	- 4 -
I.2.4. <i>Plasmodium malariae</i> .....	- 5 -
I.3. Physiopathologie du paludisme.....	- 5 -
I.3.1. Moelle osseuse .....	- 5 -
I.3.2 .La rate.....	- 5 -
I.3.3.Les reins .....	- 6 -
I.3.4. Le système nerveux central .....	- 6 -
I.4. Formes cliniques du paludisme. ....	- 6 -
I.5. Diagnostics du paludisme.....	- 7 -
1.5.1. Diagnostic clinique .....	- 7 -
1.5.2. Diagnostic biologique.....	- 7 -
1.5.3. Le diagnostic direct.....	- 7 -
1.5.4. Le diagnostic indirect .....	- 7 -
I.6. Traitement du paludisme. ....	- 8 -
I.6.1. Les schizonticides.....	- 8 -
I.7. Chimiorésistance .....	- 9 -
I.7.1. Facteurs liés aux antipaludiques.....	- 9 -
I.7.2 Les facteurs liés à l'hôte.....	- 9 -
I.7.3. Les facteurs liés au vecteur .....	- 9 -
I.7.4. Les facteurs liés aux vecteurs et à l'environnement.....	- 10 -
I.7.5. Mécanisme de la résistance .....	- 10 -
I.8. Méthode d'étude de la chimiorésistance .....	- 11 -
I.9. Les composants de la PCR .....	- 11 -
I.9.1. L'ADN matrice de départ et les amorces .....	- 12 -
I.9.2. La Taq polymérase .....	- 12 -
I.9.3. Le dNTP (désoxyNucléotideTriPhosphate) .....	- 12 -
I.9.4. Le tampon de réaction (PCR Buffer) .....	- 12 -
I.9.5. Le chlorure de magnésium (MgCl <sub>2</sub> ) .....	- 13 -
I. 10. Les étapes de la PCR.....	- 13 -
I. 11. Polymorphisme du <i>Plasmodium falciparum</i> .....	- 13 -
I. 12. Les gènes de Résistance .....	- 14 -

I.12.1. Le gène <i>Pfmdr1</i> ( <i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1) .....	14 -
I.12.2 Le gène <i>Pfcr1</i> ( <i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquine Resistance Transporteur) .....	15 -
II. OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	16 -
III. METHODOLOGIE .....	17 -
III.1. Le cadre de l'étude.....	17 -
III. 2. Période, type et population d'étude .....	18 -
III.3. Critères d'inclusion.....	18 -
III.4. Critères de non inclusion .....	18 -
III.5. Administration du traitement et suivi des patients .....	19 -
III.6. Interprétation des résultats.....	20 -
III.7. Etudes moléculaires .....	21 -
III.7.1. Mise en évidence des marqueurs de polymorphisme MSP1 et MSP2 .....	21 -
III.7.2. Extraction de l'ADN génomique de Plasmodium .....	22 -
III.7.3. Mixte et programme d'amplification de MSP1 et MSP2 pour la première et la deuxième PCR.....	22 -
III.7.4. Révélation des produits de la PCR nichée.....	24 -
III.7.5. Génotypage des allèles <i>Pfmdr1</i> -86, <i>Pfmdr1</i> -184, <i>Pfmdr1</i> -1034, <i>Pfmdr1</i> -1042, et <i>Pfmdr1</i> -1246 .....	25 -
III.7.6. Génotypage des allèles du <i>Pfcr1</i> K76T .....	30 -
III. 8. Analyse des données.....	32 -
III.9. Considérations éthiques .....	32 -
IV. RESULTATS .....	33 -
IV.1 Résultats globaux.....	33 -
IV. 2. Caractéristiques générales des patients à l'inclusion.....	35 -
IV.3 Résultats clinique et parasitologique.....	35 -
IV.4. Prévalence des allèles <i>Pfmdr1</i> et <i>Pfcr1</i> .....	36 -
IV.5. Impact du traitement sur la sélection des allèles : .....	36 -
IV.5.1. Variation des allèles sur la position 86 du gène <i>Pfmdr-1</i> .....	37 -
IV.5.2. Variation de la prévalence sur la position 184 du gène <i>Pfmdr-1</i> .....	37 -
IV.5.3. Variation de la prévalence sur la position 1246 du gène <i>Pfmdr-1</i> . .....	37 -
IV.5.4. Variation de la prévalence des allèles du gène <i>Pfcr1</i> K76T.....	38 -
IV.6. Associations entre marqueurs moléculaires et recrudescences .....	40 -
IV.6.1. Marqueur moléculaire du <i>Pfcr1</i> K76T. ....	40 -
IV.6.2. Marqueur moléculaire du <i>Pfmdr-1</i> N86Y. ....	40 -
IV.6.3. Marqueur moléculaire du <i>Pfmdr-1</i> Y184F. ....	40 -

IV.6.4. Marqueur moléculaire du <i>Pfmdr-1</i> N1246Y .....	40 -
IV.6.5. Combinaison entre allèles des 2 gènes ( <i>Pfmdr-1</i> 86Y / <i>Pfprt</i> 76T) et recrudescence ....	41 -
IV.6.6. Combinaison entre marqueurs moléculaires du <i>Pfmdr-1</i> 86Y / <i>Pfprt</i> 76T/ <i>Pfmdr-1</i> 1246Y -	41 -
<b>V. DISCUSSION.....</b>	<b>41 -</b>
V.1. De la caractéristique des patients à l'inclusion sur les résultats globaux.....	41
V.2. De l'efficacité thérapeutique aux traitements. ....	42 -
V.3. De la prévalence des différents allèles du <i>Pfmdr-1</i> et <i>Pfprt</i> .....	43 -
V.4. De l'impact du traitement sur la prévalence des allèles.....	44 -
V.5. De l'Associations entre marqueurs moléculaires et recrudescences. ....	46 -
<i>Conclusions.....</i>	<i>47 -</i>
<i>Perspectives.....</i>	<i>47 -</i>
<i>Bibliographie.....</i>	<i>48 -</i>

## Listes des tableaux et figures

### Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Posologie du Coartem® .....	- 19 -
<b>Tableau II :</b> Posologie du COARSUCAM™ .....	- 19 -
<b>Tableau III:</b> Tableau de suivi des patients pendant les 42 jours .....	- 20 -
<b>Tableau IV:</b> Constitution du mix pour la première et la deuxième PCR .....	- 23 -
<b>Tableau V:</b> Séquences des amorces et les programmes d'amplification de chaque gène. ....	- 24 -
<b>Tableau VI :</b> Exemple non exhaustif d'interprétation des gels .....	- 25 -
<b>Tableau VII :</b> Composition du milieu réactionnel pour les PCR 1 et 2 du gène <i>Pfmdr-1</i> .....	- 26 -
<b>Tableau VIII:</b> Séquences des primers et programmes d'amplifications pour l'analyse de <i>Pfmdr-1</i> -86, 184, 1034, 1042,1246. ....	- 27 -
<b>Tableau IX :</b> Composition du mélange pour la digestion enzymatique .....	- 28 -
<b>Tableau X :</b> Les différents contrôles et les tailles de bandes attendues.....	- 29 -
<b>Tableau XI :</b> Composition du mix réactionnel pour le génotypage des allèles <i>Pfprt</i> : K76T .....	- 30 -
<b>Tableau XII :</b> Séquences des primers et programmes d'amplifications du gène <i>Pfprt</i> K76T.....	- 31 -
<b>Tableau XIII :</b> Composition du mélange pour la digestion enzymatique du <i>Pfprt</i> K76T.....	- 31 -
<b>Tableau XIV:</b> Contrôles utilisés et taille des bandes attendues pour le gène <i>Pfprt</i> K76T .....	- 31 -
<b>Tableau XV :</b> Caractéristiques des patients à l'inclusion.....	- 35 -
<b>Tableau XVI:</b> Résultats thérapeutiques de AL et -ASAQ avant et après PCR.....	- 36 -
<b>Tableau XVII:</b> Prévalence des allèles dans la population à J0.....	- 36 -
<b>Tableau XVIII:</b> Prévalences des allèles avant et après les traitements.....	- 39 -
<b>Tableau XIX:</b> Associations entre marqueurs moléculaires et recrudescences. ....	- 41 -

### Liste des figures

<b>Figure1:</b> Cycle de vie du <i>Plasmodium falciparum</i> .....	- 2 -
<b>Figure 2:</b> Structure du gène merozoïte surface protein-1 (Sakihama et al., 2007) .....	- 14 -
<b>Figure 3 :</b> Structure du gène merozoïte surface protein-2 (Sakihama et al., 2007) .....	- 14 -
<b>Figure 4 :</b> Structure de la protéine <i>pfmdr-1</i> indiquant les différents points de mutation.....	- 15 -
<b>Figure 5 :</b> Structure schématique de la protéine issue du gène <i>Pfprt</i> montrant les positions subissant les mutations habituellement rencontrées. ....	- 15 -
<b>Figure 6:</b> Présentation de la zone de l'étude .....	- 17 -
<b>Figure 7 :</b> Photo montrant la révélation des bandes aux UV (mutation <i>Pfmdr-1</i> 86).....	- 29 -
<b>Figure 8:</b> Diagramme de sélection des patients .....	- 34 -

## Résumé

Le paludisme affecte annuellement près de 350 millions de personnes causant plus d'un million de décès par an. La chimiorésistance est l'une des causes majeures de cette mortalité. Le contrôle de cette chimiorésistance passe par la détermination des marqueurs de résistance.

Notre étude a porté sur la relation entre les marqueurs de résistance des gènes *Pfmdr-1* et *Pfcr1* et les échecs au traitement des combinaisons ASAQ et AL. Le recrutement des patients a eu lieu dans l'aire du district sanitaire de Nanoro et les critères d'inclusion et d'exclusion ont été ceux définis par l'OMS. Le suivi des patients s'est effectué pendant 42 jours et la Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été utilisée pour les analyses moléculaires.

Après la correction des résultats par la PCR, au jour J42 les taux d'échecs thérapeutiques étaient 17,46% pour ASAQ et 10,30% pour AL. Les taux de prévalence des mutations ont été de 25,76% ; 47,66% ; 5,1% et 53,93% pour *Pfmdr-1* 86Y, *Pfmdr-1* 184F, *Pfmdr-1* 1246Y et *Pfcr1* 76T respectivement.

Notre étude a permis de comprendre que la combinaison ASAQ sélectionnait certains allèles lors de son usage notamment une diminution des allèles sauvages D1246 et K76 et l'augmentation des allèles mutants 1246Y et 76T. Par contre la combinaison AL, sélectionnait seulement l'allèle sauvage *Pfmdr1*N86 parmi les allèles analysés.

Toute fois, il est important de noter une association entre certains marqueurs moléculaires et la recrudescence avec le traitement à l'ASAQ : 76T ; 184F et l'haplotype 86Y/76T.

**Mots clés :** *Plasmodium falciparum*, *Pfmdr-1* ; *Pfcr1* ; *MSP1* et 2, mutation.

## Abstract

Malaria annually affects nearly 350 million people causing over one million deaths per year. Chemo resistance is a major cause of mortality. The monitoring of this resistance is through the determination of resistance markers. Our study focused on the relationship between the resistance marker of genes *Pfmdr-1* and *Pfcr1* and failures in treatment combinations ASAQ and AL. Patient recruitment took place in area of health district Nanoro and the criteria for inclusion and exclusion were those defined by WHO criteria. Patient follow-up was conducted for 42 days and the polymerase chain reaction (PCR) was used for molecular studies. After correcting the results by PCR, in J42 the therapeutic failure rate was 17.46% for ASAQ and 10.30% for AL. The prevalences of mutations were 25.76%, 47.66%, 5.1% and 53.93% *Pfmdr-1* 86Y, *Pfmdr-1* 184F, *Pfmdr-1* and 1246Y *Pfcr1* 76T respectively.

Our study has helped to understand that the combination ASAQ selected alleles at some of its use include a decrease in wild alleles D1246 and K76 and increased mutant alleles 1246Y and 76T. On the contrary AL selected only wild allele *Pfmdr1*N86 among alleles analysed.

An association between certain molecular markers and the increase was found during treatment with ASAQ: 76T; 184F and double mutation 86Y/76T.

Keywords: *Plasmodium falciparum*; *Pfmdr-1*; *Pfcr1*; MSP1, 2; mutation.

## Introduction

Le paludisme est une maladie parasitaire due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* et est transmis à l'homme par des moustiques du genre *Anophèles* (femelle). Parmi les quatre espèces du *Plasmodium* transmettant le paludisme, *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus fréquente, la plus redoutable et est la principale concernée par la chimiorésistance. [18]

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS ; 2005), le nombre d'accès palustres survenant chaque année à travers le monde est estimé entre 300 à 500 millions, entraînant la mort de 1 à 3 millions de personnes, parmi lesquelles une majorité de jeunes enfants vivant en Afrique subsaharienne [26].

Depuis plusieurs années le traitement du paludisme a été effectué grâce à la monothérapie. Cependant, l'apparition et l'émergence de la résistance des parasites aux antipaludiques a compromis cet arsenal thérapeutique. La propagation rapide de la résistance aux antipaludiques depuis plusieurs dizaines d'années a imposé une surveillance plus intense de la chimiorésistance aux antipaludiques. Cela permettra de garantir une prise en charge convenable des cas cliniques et une détection rapide de l'évolution de la résistance afin que les politiques nationales de traitement puissent être révisées si nécessaire. C'est dans ce contexte que l'OMS préconise depuis 2002 l'usage des combinaisons à base d'artémisinine (ACT) pour freiner l'expansion de cette résistance. En effet, pour préserver l'efficacité des dérivés de l'artémisinine, l'OMS recommande toujours leur utilisation en combinaison avec d'autres antipaludiques. C'est ainsi que plusieurs combinaisons à base d'artémisinine (ACT) ont été mises au point depuis ces dernières années. Parmi ces combinaisons, les associations Artemether-Luméfantine (AL ou Coartem®) et Amodiaquine + Artésunate (ASAQ, COARSUCAM™) sont les plus utilisés dans la plupart des pays endémiques qui ont changé leur politique de traitement ces 5 dernières années.

Toutefois, le choix de ces combinaisons impose de comprendre les principes de la distribution des populations plasmodiales résistantes et de leur évolution dans le temps et l'espace.

Le Burkina Faso, à l'instar des autres pays a adopté depuis Février 2005 l'association Artemether-Luméfantine (AL ou Coartem®) et l'association Amodiaquine + Artésunate (ASAQ, COARSUCAM™) comme médicaments de première intention dans le traitement du paludisme simple. Toute fois des échecs au traitement avec ces associations ont été rapportés par certains auteurs dans d'autres régions du monde [20]. De plus des relations entre ces échecs et des mutations des marqueurs *Pfprt* et *Pfmdr-1* ont été également rapportés [6; 15].

S'il existe plusieurs études sur l'efficacité de ces 2 combinaisons au Burkina Faso, très peu d'études sur la relation entre les échecs thérapeutiques de ces 2 combinaisons et les marqueurs moléculaires de la résistance ont été conduites. C'est dans ce contexte que nous avons initié le présent travail pour

étudier la relation entre les échecs au traitement avec AL et ASAQ et la présence des mutations des gènes *Pfprt* et *Pfmdr-1*.

## I. RAPPEL SUR LE PALUDISME

Le paludisme est une infection parasitaire fébrile, endémoépidémique due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique, l'anophèle femelle.

### I.1. Cycle biologique du *Plasmodium*

Le cycle biologique du *Plasmodium* passe par un hôte intermédiaire (homme ou autre mammifère) où se déroule la reproduction asexuée et un hôte définitif (Anophèle femelle) où se déroule la reproduction sexuée. La figure 1 montre les différentes phases du développement du parasite chez l'homme et chez le moustique.

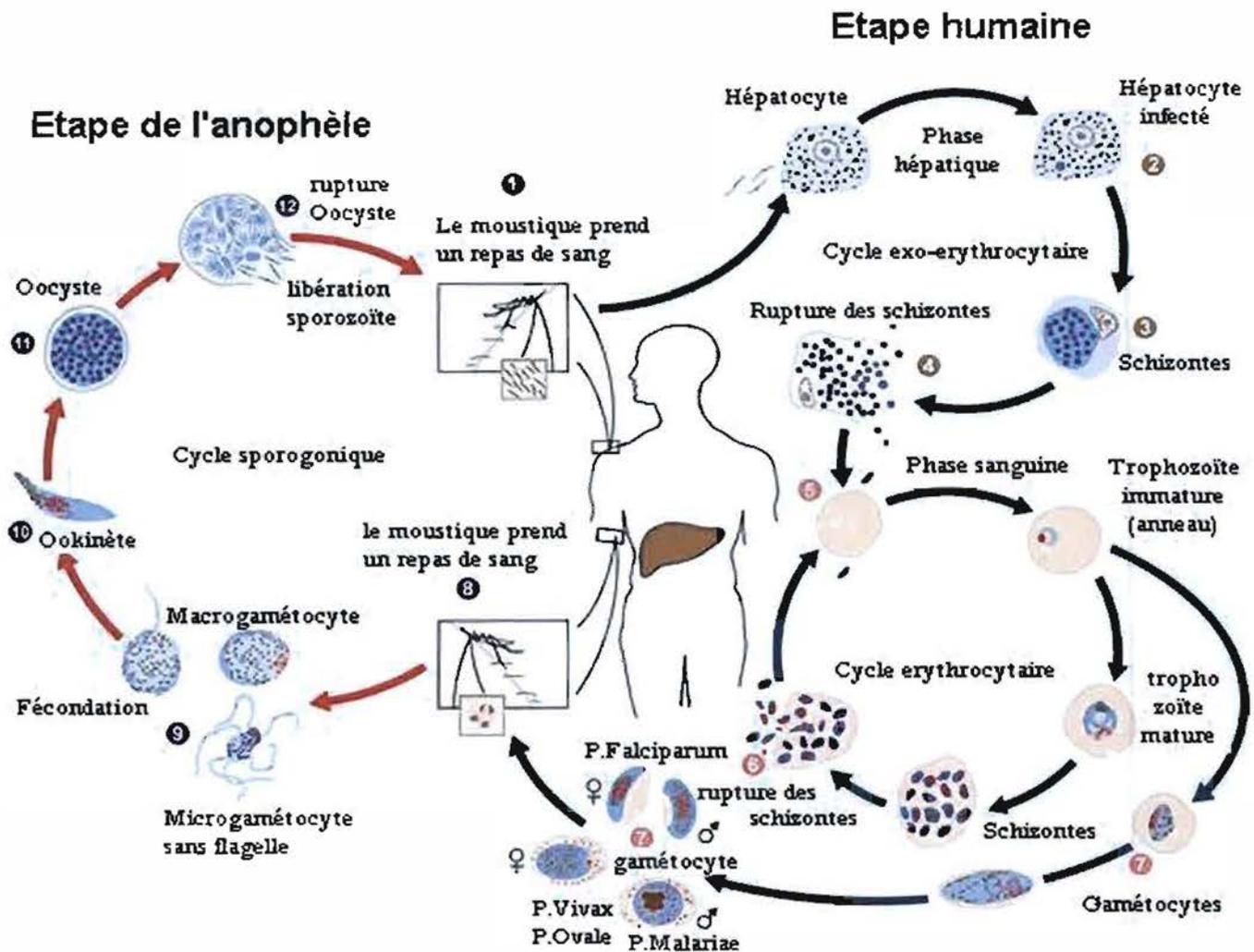


Figure 1: Cycle de vie du *Plasmodium falciparum*

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

### **I.1.1. Chez l'Homme**

Il s'y effectue la reproduction asexuée ou division schizogonique qui comprend deux phases:

#### **- La phase hépatocytaire**

L'Anophèle femelle est un hémaphage anthropophile. Lors de son repas sanguin elle inocule au niveau de la zone de piqûre des anticoagulants et un anesthésique lui permettant d'aspirer convenablement le sang. Si elle est infectée, elle lui inocule alors les sporozoïtes qui étaient en attente dans ses glandes salivaires. Ces sporozoïtes gagnent la circulation sanguine et se retrouvent dans le foie 30 minutes plus tard. Ils s'y multiplient activement et envahissent les hépatocytes grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte.

Les sporozoïtes se transforment grâce à plusieurs stades de maturations en schizontes puis en mérozoïtes devenant volumineux, déformant ainsi l'hépatocyte et repoussant son noyau vers la périphérie. L'hépatocyte éclate et libère de nombreux mérozoïtes dont la majorité se retrouvera dans la circulation sanguine de l'hôte.

#### **- La phase érythrocytaire**

Les mérozoïtes ayant gagné la circulation sanguine infectent chacun un érythrocyte grâce au processus parasitaire actif, se différencient au sein de la vacuole parasitophore en anneau puis en trophozoïte. Le trophozoïte grossit, son noyau se divise et devient un schizonte qui se charge en pigment malarique qui, après segmentation montre une forme caractéristique en rosace. C'est cette forme caractéristique qui est utilisée pour différencier les espèces de *Plasmodium* lors des frottis minces à la microscopie. Ces schizontes grâce à leur disposition en rosace exercent une pression sur l'érythrocyte et provoquent son éclatement libérant ainsi 8 à 32 mérozoïtes qui attaqueront d'autres érythrocytes sains. Ce cycle érythrocytaire se poursuit de façon synchrone à partir de ces mérozoïtes libérés mais sa durée est fonction de l'espèce plasmodiale. A partir d'un certain nombre de cycles pour des raisons non encore bien éclaircies, certains mérozoïtes se différencient en des formes sexuelles : gamétocytes mâles et gamétocytes femelles reconnaissables par leur taille, leur forme et la façon dont ils transforment l'hématie.

### **I.1.2 Chez l'Anophèle femelle.**

Lorsque l'anophèle femelle vient à effectuer son repas sanguin sur une personne infectée par le *Plasmodium*, elle absorbe toutes les formes de la division asexuée. Seuls les gamétocytes pourront poursuivre leur développement, toutes les autres formes seront détruites et digérées dans l'estomac du moustique. Dans cet estomac les gamétocytes se transforment en gamètes mâles (microgamètes) et en gamètes femelles (macrogamètes). Lors de la fécondation, les deux formes fusionnent pour donner un

œuf libre et mobile: l'ookynète. Celui-ci traverse la paroi de l'estomac du moustique, se fixe du côté extérieur et se transforme en oocyste. Il s'en suit alors un cycle sporogonique de différenciation et de transformations successives aboutissant à la maturation de l'oocyste. L'oocyste mature, éclate et libère des milliers de sporozoïtes. Ceux-ci sont des formes infectantes. Ils vont migrer dans les glandes salivaires du moustique où ils sont prêts à être transmis à un nouvel hôte lors du second repas sanguin.

## **I.2. Particularités liées à l'espèce plasmodiale.**

Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (plus de 140) touchant diverses espèces animales. Cependant seulement quatre sont retrouvées en pathologie humaine (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*).

### **I.2.1. *Plasmodium falciparum***

Cette espèce est la plus redoutable et la plus répandue dans le monde. En effet *P. falciparum* est impliqué dans 90% des cas de décès dus au paludisme dans le monde. Il est responsable de la quasi-totalité du neuropaludisme et est aussi la plus incriminée dans les densités parasitaires élevées. Il sévit de façon permanente au niveau des zones tropicales. Dans les régions subtropicales, il ne survient qu'en période chaude et humide. Sa transmission s'estompe lorsque la température baisse en dessous de 20°C ou s'élève au dessus de 33°C.

La phase hépatocytaire dure environs 6 jours et on note l'absence de reviviscence schizogonique.

La schizogonie érythrocytaire est d'environ 48 heures s'effectuant presque exclusivement dans les capillaires viscéraux.

### **I.2.2. *Plasmodium vivax***

Très largement répandu en Amérique du Sud et en Asie, *P. vivax* est rarement observé en Afrique. Les érythrocytes du groupe sanguin Duffy négatif (observé chez la majorité des sujets originaires d'Afrique de l'Ouest) ne possèdent pas de récepteur membranaire nécessaire à l'infection par *P. vivax*. Sa transmission s'arrête en dessous de 15°. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours mais on note cependant deux schizogonies tissulaires, l'une immédiate et l'autre retardée dès suite de l'existence des hypnozoïtes qui peut durer pendant 3 à 4 ans (accès de reviviscence).

### **I.2.3. *Plasmodium ovale***

Ce parasite sévit en Afrique intertropicale, du Centre et de l'Ouest (et dans certaines régions du Pacifique). *P. ovale* provoque une fièvre tierce bénigne, comme *P. vivax* dont il est très proche. Son incubation est de 15 jours au minimum mais peut-être beaucoup plus longue, jusqu'à 4 ans. Son évolution est bénigne mais on peut observer, comme avec *P. vivax*, des rechutes tardives (5 ans). Schématiquement on dit que *P. ovale* remplace *P. vivax* là où cette dernière espèce n'existe pas.

#### **I.2.4. *Plasmodium malariae***

Il sévit en Afrique, de manière beaucoup plus sporadique. *P. malariae* se différencie des autres espèces par une incubation plus longue (15 à 21 jours), une périodicité différente de la fièvre (cycle érythrocytaire de 72 heures, responsable d'une fièvre quarte). Il a la capacité d'entraîner parfois des reviviscences très tardives (jusqu'à 20 ans après le retour de la zone d'endémie). Les mécanismes physiopathologiques responsables de ces reviviscences tardives ne sont pas totalement élucidés. L'infection est bénigne mais *P. malariae* peut parfois entraîner des complications rénales.

### **I.3. Physiopathologie du paludisme.**

Malgré le nombre de cas de paludisme et en dépit des modèles expérimentaux améliorés (culture *in vitro*, biologie moléculaire) la physiopathologie du paludisme demeure toujours mal élucidée bien que son impact dans certains organes a été clairement défini.

Au niveau du sang, les hématies sont détruites par les trophozoïtes qu'ils hébergent. L'anémie s'installe. Lors des fortes parasitémies il se produit une hémolyse brutale et massive entraînant une libération de l'hémoglobine. Cela entraîne une surcharge rénale et une hémoglobinurie. L'utilisation de l'hémoglobine par le parasite conduit à la précipitation dans son cytoplasme, de granules de pigment (hémozoïne). Le pigment accumulé dans le cytoplasme du schizonte est relargué dans le plasma lors de la libération des mérozoïtes.

#### **I.3.1. Moelle osseuse**

La lignée érythrocytaire est hypertrophiée pour compenser l'anémie. Les lignées leucocytaires sont peu perturbées.

#### **I.3.2 .La rate**

La rate augmente de volume lors de l'infection paludéenne. Cela est provoqué par l'hypertrophie de la pulpe blanche (lymphocytes petits et grands, cellules réticulaires, macrophages). L'érythrophagocytose est accélérée par deux phénomènes: l'activation des macrophages et la fixation d'immunoglobulines sur la paroi des érythrocytes, infectés ou non. L'activité de phagocytose concerne aussi le pigment parasitaire et les débris cellulaires. La splénomégalie constitue un signe qui accompagne le développement de la parasitémie. Il sert de base à une observation épidémiométrique: l'indice splénique. Celui-ci rend compte de la fréquence des rates hypertrophiées dans une population et constitue une mesure de l'endémie malarienne dans une zone donnée.

### **I.3.3. Les reins**

La formation de complexes antigènes-anticorps et leur dépôt dans la membrane basale cause une surcharge du rein et une diminution de la capacité d'épuration de cet organe, déjà anormalement sollicité en cas d'hémolyse.

La thrombose des artéioles des glomérules rénaux, l'anoxie des cellules des tubes contournés et l'apparition de signes de glomérulonéphrite sont des phénomènes souvent observés. Une dégénérescence locale est possible, pouvant aboutir à la néphrose, complication fréquente pour *P. malariae*

### **I.3.4. Le système nerveux central**

La schizogonie profonde de *P. falciparum* est à l'origine de complications redoutables dont le paludisme cérébral. Celle-ci consiste en des thromboses capillaires responsables de lésions vasculaires et hémorragiques, provoquant des altérations dégénératives des cellules nerveuses, entourées d'infiltrats cellulaires. L'expression symptomatologique consistera en une hémiplégié ou des convulsions (zones motrices), des troubles thermorégulateurs avec hyperpyrexie (hypothalamus), une altération progressive de la conscience si le cerveau entier est entrepris.

## **I.4. Formes cliniques du paludisme.**

Le paludisme à *P. falciparum* peut se présenter sous différentes formes cliniques. En fonction des symptômes, de l'immunité du sujet, de certains facteurs génétiques liés aux parasites et /ou à l'hôte on distingue :

### **- Le paludisme simple**

Il se caractérise par des accès palustres classiques sans signes de malignité. Cette étape pourrait correspondre à une parasitémie circulante faible, inférieure au seuil de patence des signes cliniques. Ensuite survient la phase d'invasion caractérisée par une fièvre continue ( $T^{\circ}$  supérieure  $37,5^{\circ}\text{C}$ ) accompagnée de céphalées, nausées ou de vomissements. Enfin on a la phase d'état se caractérisant par une intensification de la fièvre ( $T^{\circ} = 39-40^{\circ}\text{C}$ ), des frissons, des sueurs et une accentuation des céphalées et des vomissements. En absence de traitement ces accès palustres simples peuvent se compliquer en accès palustres graves.

### **- Le paludisme grave**

On aboutit généralement à cette étape dès suite d'une défaillance thérapeutique ou d'une absence de traitement. L'apparition de la forme grave du paludisme serait ralentie par certains facteurs génétiques. Cette forme s'observe surtout chez des sujets non immuns, les enfants, les femmes enceintes et les voyageurs venant des zones non endémiques. L'OMS a défini des critères de gravité du paludisme et la présence d'un seul des critères cliniques ou biologiques plus une goutte épaisse positive est attribué au paludisme grave [36].

## **1.5. Diagnostic du paludisme**

Le paludisme a des manifestations cliniques nombreuses et très diversifiées. Néanmoins certains symptômes tels que la fièvre (sa périodicité et son intensité), les vomissements, les céphalées etc. restent évocateurs d'un accès palustre. Cependant le diagnostic du paludisme le plus sûr reste le diagnostic biologique. Il se base sur la mise en évidence, soit directement du parasite dans le sang, soit de ses métabolites ou des anticorps produits lors de sa présence.

### **1.5.1. Diagnostic clinique**

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

### **1.5.2. Diagnostic biologique**

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

### **1.5.3. Le diagnostic direct**

**La microscopie :** sur une lame porte-objet on dépose 2 à 3 gouttes de sang pour la goutte épaisse (GE) et 1 goutte pour le frottis mince. Le sang est rapidement défibriné (cas de la GE) par un mouvement en spirale à l'aide du bord rectangulaire d'une autre lame ou étalé (cas du frottis). Après séchage on fixe le frottis mince à l'alcool (méthanol). Le prélèvement est ensuite coloré au Giemsa préparé au 10ème (pendant 20-30mn) ou au Field. Ces colorants ont la capacité de se fixer sur le cytoplasme pour donner une coloration bleue et sur le noyau pour donner une coloration rouge. La lecture se fait au microscope optique à l'objectif x100. La sensibilité de la technique est de 6 parasites/ $\mu$ L [16].

- **La technique moléculaire :** La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet la détection d'acides nucléiques spécifiques à chaque espèce. Elle permet également de différencier les différents clones à l'intérieur d'une même espèce.

### **1.5.4. Le diagnostic indirect**

Il s'agit de rechercher les anticorps contre les parasites chez un sujet suspecté faire une infection à *Plasmodium*. Cependant, l'existence de certains anticorps même après l'infection limite cette technique.

## I.6. Traitement du paludisme.

On peut classer les différents antipaludiques selon le point d'impact (les schizonticides et les gamétocides), selon l'origine du principe actif (naturelle ou synthétique), selon la caractéristique de l'action: rapide ou lente, ou selon la famille chimique du principe actif.

### I.6.1. Les schizonticides

Ces antipaludiques se répartissent en deux groupes :

- ceux ayant une action rapide, nous avons les **4-amino-quinoléines** (Chloroquine, Amodiaquine) ; les **amino-alcools** (méfloquine, halofantrine) ; les **dérivés d'artémisinine** (Artémether, Artésunate, artéether) ;
- ceux ayant une action lente les antifolates : les **Antifoliques** (sulfones, sulfamides) et les **Antifoliniques** (Biguanides, Diaminopyrimidines).

#### I.6.1.1. Les 4-amino, quinoléines

Une fois dans le sang les parasites du *Plasmodium* se nourrissent de l'hémoglobine dont la dégradation produit la Ferriprotoporphrine (FP) substance qui leur est toxique. C'est alors qu'ils sécrètent une protéine qui se lie à la FP et l'inactive. Les 4-amino-quinoléines se concentrent dans la vacuole digestive du parasite grâce à un gradient de Ph. Ils inhibent la digestion de l'hémoglobine en se liant à cette FP pour former un complexe qui est toxique pour le parasite. [3]

#### 1.6.1.2- Les amino-alcools

Ce sont de très bon schizonticides. On pense que la méfloquine agit en formant des complexes avec l'hème toxique endommageant la vacuole nutritive du parasite et que l'halofantrine forme des complexes cytotoxiques avec la ferritoporphyrine causant des dommages à la membrane plasmodiale

#### I.6.1.3. Les dérivés d'artémisinine.

C'est essentiellement de l'artésunate, l'arteéther et l'artémether. Ils sont issus de l'artémisinine qui est une molécule extraite de *l'Artemisia annua*, une plante médicinale chinoise, dont la vertu thérapeutique a été prouvée par plusieurs études [1]. Ils interfèrent avec l'utilisation de l'hémoglobine, par libération de radicaux libres, toxiques pour le parasite.

#### I.6.1.4 Les antifolates

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.

## **I. 6.2. Les antibiotiques**

Certains antibiotiques comme les tétracyclines (doxycycline), les macrolides (érythromycine, azithromycine, clindamycine) peuvent inhiber la synthèse protéique par inhibition de certaines fonctions de l'apicoplaste.

## **I.7. Chimiorésistance**

La résistance aux antipaludiques est définie comme étant l'aptitude du parasite à survivre et/ou à se multiplier en dépit de l'administration et l'absorption d'un antipaludique donné à des doses thérapeutiques supérieures ou égales aux doses limites tolérables par un sujet humain [37].

Cependant, l'antipaludique en question doit être capable d'accéder aux parasites ou aux globules rouges infectés pendant une durée nécessaire à son action normale [4].

La chimiorésistance est un phénomène dynamique fluctuant dans le temps et dans l'espace. Elle concerne principalement le *P. falciparum* face à certains antipaludiques comme les 4-aminoquinoléines, les amino-alcools, les antifoliques et les antifoliniques. Cette résistance a atteint des proportions de sorte qu'elle constitue une menace majeure pour les efforts de lutte antipaludique actuellement déployés. Il existe plusieurs facteurs liés à la chimiorésistance :

### **I.7.1. Facteurs liés aux antipaludiques**

La fréquence et l'usage massif des antipaludiques entraîneraient une émergence de la chimiorésistance soit par sélection de parasites résistants soit par induction de mutations. En effet, plus la pression médicamenteuse est forte et constante, plus les parasites s'évertuent à s'adapter et à se multiplier. Cette adaptation se manifeste par une émergence de la chimiorésistance [27 ; 8]. Les antipaludiques à demi vie longue (méfloquine 10-40 jours; sulfadoxine-Pyriméthamine 95-180 h) éliminent les parasites sensibles et protègent l'organisme contre les nouvelles infections. Cependant lorsque leur concentration sanguine est inférieure au seuil thérapeutique, on assiste à une recrudescence voire un envahissement de l'organisme par les souches résistantes [19].

### **I.7.2 Les facteurs liés à l'hôte.**

L'immunité de prémunition améliore l'efficacité thérapeutique d'un antipaludique. Les personnes "naïves" au paludisme développent une immunité non spécifique contre les parasites et sont donc des réservoirs de multiplication et de propagation des souches plasmodiales chimiorésistantes [2].

### **I.7.3. Les facteurs liés au vecteur**

Indépendamment de toute pression médicamenteuse, des mutations spontanées susceptibles d'induire une résistance peuvent survenir au niveau du génome plasmodial. Moins le nombre de mutations requis pour la chimiorésistance est élevé, plus vite la chimiorésistance intervient [35]. En effet lorsqu'une résistance à un antipaludique est conférée par une seule mutation, il suffit qu'il se

produise une seule mutation ponctuelle et on obtient une sélection des parasites mutant entraînant l'apparition de la chimiorésistance.

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 [24]. Pour d'autres par contre, en zone à transmission faible, le risque d'apparition de parasites chimiorésistants est élevé [35]. En effet, compte tenu de la nature monoclonale des infections dans ces zones, la probabilité que deux gamètes, porteurs de gènes de résistances, fusionnent est élevée. Une troisième hypothèse soutient que le niveau de transmission n'affecte pas l'apparition et l'extension de la chimiorésistance [18].

#### **I.7.4. Les facteurs liés aux vecteurs et à l'environnement**

Une capacité vectorielle élevée entraînerait l'expansion de la chimiorésistance car elle favorise une infestation permanente de l'hôte. De plus, certaines souches chimiorésistantes se reproduisent plus facilement chez le vecteur (*Anopheles dirus*) que chez les souches chimiosensibles [34].

#### **I.7.5. Mécanisme de la résistance**

Les parasites ont développé plusieurs mécanismes pour vaincre la toxicité des médicaments. La plupart du temps ce sont les mutations qui sont incriminées. Au niveau de la séquence d'un gène cible soit par une substitution ou une délétion ou une insertion d'une base ou par réarrangement entre des petites séquences, on obtient un gène structurellement différent. Ce gène nouveau codera des protéines ayant des propriétés différentes aboutissant soit à une inactivation du médicament, soit à une inhibition enzymatique ou encore à une modification du système d'échange au niveau membranaire etc.

- La résistance aux amino-alcools et à la méfloquine répondrait à un mécanisme d'amplification du gène *Pfmdr-1* codant pour la glycoprotéine et non à une mutation ;
- La résistance aux antifoliques est induite par des mutations sur les gènes codant la DHFR en position 108 principalement mais aussi en position 51, 59, et 164 ;
- La résistance à l'atovaquone-proguanil est due à une mutation dans la séquence du gène *Cy-B* codant le cytochrome B [10] ;
- La résistance aux 4-amino-quinoléines : Plusieurs hypothèses tendent à l'expliquer de façon divergente. Cependant toutes sont unanimes 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 dans sa vacuole digestive, ce qui lui permet de survivre. Des mutations ponctuelles sur le gène candidat *Pfcrt K76T* et *Pfmdr1 N86Y* codant des protéines conférant la résistance de *P. falciparum* à ces antipaludiques ont été mises en évidence [17].

## I.8. Méthode d'étude de la chimiorésistance

### ❖ Tests *in vivo*

Deux méthodes d'évaluation peuvent être utilisées :

- L'évaluation parasitologique qui consiste à détecter la présence des parasites dans le sang. Il s'agit des études transversales à intérêt épidémiologique.

- L'évaluation parasito-clinique qui consiste à apprécier la réponse clinique et parasitologique à un traitement sur une durée bien déterminée. Les normes standard de l'OMS (OMS ; 2003) donnent les résultats en 3 catégories :

- ↳ L'échec thérapeutique précoce (ETP)
- ↳ L'échec thérapeutique tardif (ETT) divisé en
  - Echec clinique tardif (ECT)
  - Echec parasitologique tardif (EPT)
- ↳ La réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA).

### ❖ Tests *in vitro*

On mesure la résistance d'isolats de parasites à des concentrations croissantes d'antipaludiques. Ces tests permettent de définir une concentration seuil à partir de laquelle le parasite est dit résistant s'il s'y développe, sinon il est dit sensible. Les tests les plus couramment utilisés sont :

- Le microtest de l'OMS qui permet au moyen d'un microscope de dénombrer les trophozoïtes.
- Le microtest isotopique qui permet la mesure de la croissance parasitaire par l'évaluation de la quantité d'hypoxanthine radioactive incorporée dans les molécules d'ADN du parasite.

### ❖ Les tests moléculaires.

Ce sont des techniques de biologie moléculaire utilisées pour la mise en évidence des mutations génétiques de l'ADN du parasite responsables de la résistance. La technique communément utilisée est la *polymerase chain reaction* (PCR). Elle permet d'obtenir à partir de petites quantités d'ADN d'importantes quantités de fragments identiques visualisables à la lumière ultra-violette. Les variantes de la PCR sont essentiellement le Dot blot qui conjugue la PCR à l'hybridation par l'utilisation de sondes radio-marquées. L'automatisation de toutes les étapes de la PCR fait de cette technique une méthode de référence dans beaucoup de domaines y compris la recherche. Elle constitue un outil de choix pour la surveillance des marqueurs moléculaires de résistance de *Plasmodium* aux antipaludiques [28].

## **I.9. Les composants de la PCR**

### **I.9.1. L'ADN matrice de départ et les amorces**

L'ADN matrice est sous la forme d'un double brin et contient le fragment recherché. Les amorces de 15 à 30 nucléotides s'hybrident aux deux extrémités de la séquence d'ADN à amplifier. La quantité d'amorces à utiliser peut varier, mais elle doit être la plus petite possible. Un excès d'amorces se traduit le plus souvent par des amplifications non spécifiques. Ce qui se manifeste par la présence de doubles bandes ou de traînées sur le gel rendant difficile voire impossible l'interprétation. 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.

### **I.9.2. La Taq polymérase**

La Taq polymérase (Taq) est une ADN polymérase thermostable qui a une activité maximale entre 72°C et 80°C. La polymérisation par la Taq se fait habituellement entre 70°C et 75°C. Son utilisation dans la PCR a permis d'augmenter non seulement la spécificité et l'efficacité de celle-ci mais également d'automatiser tout le processus. Son rôle est de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN à partir des amorces. Lors de la manipulation si la quantité de la Taq est insuffisante on peut aboutir à une amplification trop faible du produit désiré se traduisant par des bandes floues ou absentes. Par contre une quantité trop importante conduirait à l'amplification de produits non spécifiques fournissant une multitude de bandes à des positions inattendues.

### **I.9.3. Le dNTP (désoxyNucléotideTriPhosphate)**

Il existe quatre types de dNTPs à savoir le désoxy-Adénosine-Triphosphate (dATP), le désoxy-Cytosine-Triphosphate (dCTP), le désoxy-Guanosine-Triphosphate (dGTP) et le désoxy-Thymidine-TriPhosphate (dTTP). Leur rôle est de fournir les désoxyribonucléotides nécessaires à la synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase. Les dNTPs 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 dNTPs. Son augmentation conduit à des produits non spécifiques.

### **I.9.4. 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.

### I.9.5. Le chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>)

Le MgCl<sub>2</sub> 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<sup>2+</sup> libres. Ces ions interviennent dans la spécificité de reconnaissance des substrats de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs) et permettent leur stabilisation. Un excès de MgCl<sub>2</sub> 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 ([http://www.ens-lyon.fr/R\\_ELLIE/](http://www.ens-lyon.fr/R_ELLIE/)).

### I. 10. Les étapes de la PCR

La PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun trois étapes successives qui sont :

- **La dénaturation** qui consiste à chauffer l'ADN double brin à une température de 92°-95°C pendant 30 à 60 secondes, ce qui permet d'obtenir deux simples brins.
- **L'hybridation** : au cours de cette étape, il y a une hybridation des amorces de manière spécifique aux deux extrémités de la séquence d'ADN cible sur chacun des brins dénaturés. Elle se fait entre 50°C et 60°C pendant 30 à 60 secondes.
- **La troisième étape ou phase d'élongation** permet à la Taq polymérase de mettre en place les bases complémentaires à celles des brins d'ADN à une température de 70 - 75°C.

### I. 11. Polymorphisme du *Plasmodium falciparum*

*Plasmodium falciparum* possède trois types d'acides nucléiques : nucléaire, mitochondrial et plastidique qui sont utilisés pour l'étude de la diversité génétique du parasite. L'ADN nucléaire comporte 25 à 30x10<sup>6</sup> paires de bases réparties sur 14 chromosomes de tailles différentes. Les événements génétiques (recombinaison, crossing-over) et les pressions immunitaires sont à l'origine de l'émergence de polymorphisme au niveau des antigènes du *Plasmodium*. Chez *P. falciparum*, les gènes de polymorphisme les plus utilisés pour la différenciation des clones infectants sont:

- **MSPI**: localisé sur le chromosome 9, ce gène comporte 17 blocs et code pour une glycoprotéine de surface du mérozoïte de 190 kDA (Merozoïte surface Protein 1). La variabilité du bloc 2 (K1, MAD20, RO33) sert à la différenciation des clones de *P. falciparum* (figure 2)



Les points de mutations couramment étudiés sont les positions 86, 184, 1034, 1042, et 1246

[29].

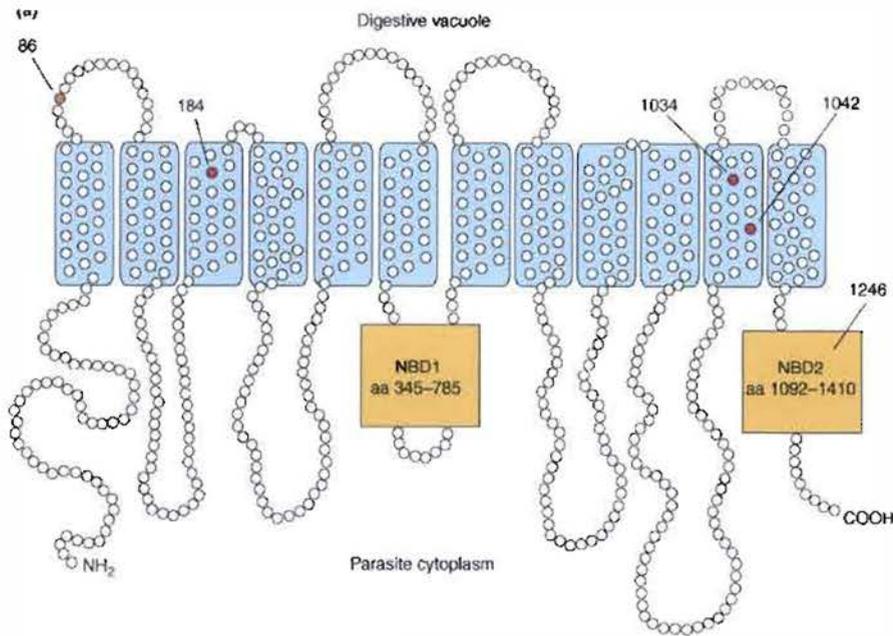


Figure 4 : Structure de la protéine *pfmdr-1* indiquant les différents points de mutation

### I.12.2 Le gène *Pfprt* (*Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporteur)

La figure 5 indique la structure de la protéine issue du gène *Pfprt*

Ce gène est situé sur le chromosome 7 du *P. falciparum* et s'étend sur une région de 36 Kilobase. Il code pour une protéine ayant 10 domaines transmembranaires. Les points couramment étudiés se situent aux positions 72; 74 ; 75 ; 76 et 160 mais c'est la position 76 qui est la plus incriminée dans la résistance aux 4-amino-quinoléines notamment la Chloroquine [15].

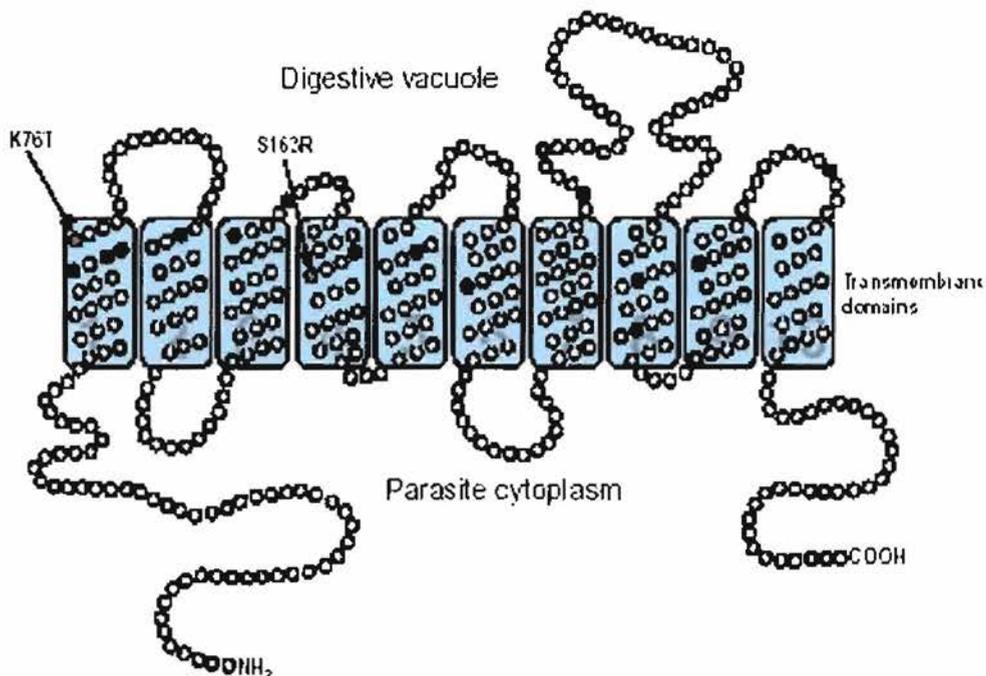


Figure 5 : Structure schématisée de la protéine issue du gène *Pfprt* avec les mutations fréquentes

## II. OBJECTIFS DE L'ETUDE

### Objectif général :

Etudier la relation entre les marqueurs moléculaires des gènes *Pfprt* et *Pfmdr-1* de *P. falciparum* et l'efficacité thérapeutique des combinaisons AL et ASAQ chez les enfants de 6 à 59 mois à Nanoro.

### Objectifs spécifiques :

- Déterminer les taux d'échecs cliniques et parasitologiques corrigés par la PCR au sein de la population d'étude (enfants de 6-59 mois) ;
- Déterminer la prévalence des mutations *Pfmdr-1 86Y*, *Pfmdr-1 184F*, *Pfmdr-1 1034C*, *Pfmdr-1 1042D*, *Pfmdr-1 1246Y* et *Pfprt 76T* ;
- Déterminer la relation entre les fréquences des mutations des gènes *Pfmdr-1* et *Pfprt* et la réponse au traitement avec les 2 combinaisons ASAQ et AL.

### III. METHODOLOGIE

#### III.1. Le cadre de l'étude

Notre étude s'est déroulée dans le district sanitaire de Nanoro qui relève de la région sanitaire du Centre-Ouest dont le chef lieu est Koudougou.

Le district de Nanoro couvre cinq départements administratifs : Nanoro, Kindi, Siglé, Pella, et Soaw. (Figure 5). Il s'étend sur une superficie de 1562 Km<sup>2</sup>, avec une population de 134.212 habitants dont 22293 (16.61%) enfants de 6 à 59 mois [données du district sanitaire de Nanoro 2008]. Le groupe ethnique majoritaire est constitué par les Mossé. Le climat est de type soudanien. Selon les statistiques sanitaires de 2008, le paludisme constitue le premier motif de consultation dans les formations sanitaires avec une proportion de 53,67% de l'ensemble des consultations [Données du district 2008]. Il sévit dans cette région de façon holoendémique avec une transmission maximale pendant l'hivernage (Mai-Septembre).

La collecte des données s'est déroulée au sein du Centre Médical avec antenne chirurgicale (CMA) Saint Camille de Nanoro et dans deux Centres de Santé et de Promotion Sociale (CSPS) environnants : Séguédin (22 kilomètres), Nazoanga (14 kilomètres). (Voir figure 6).

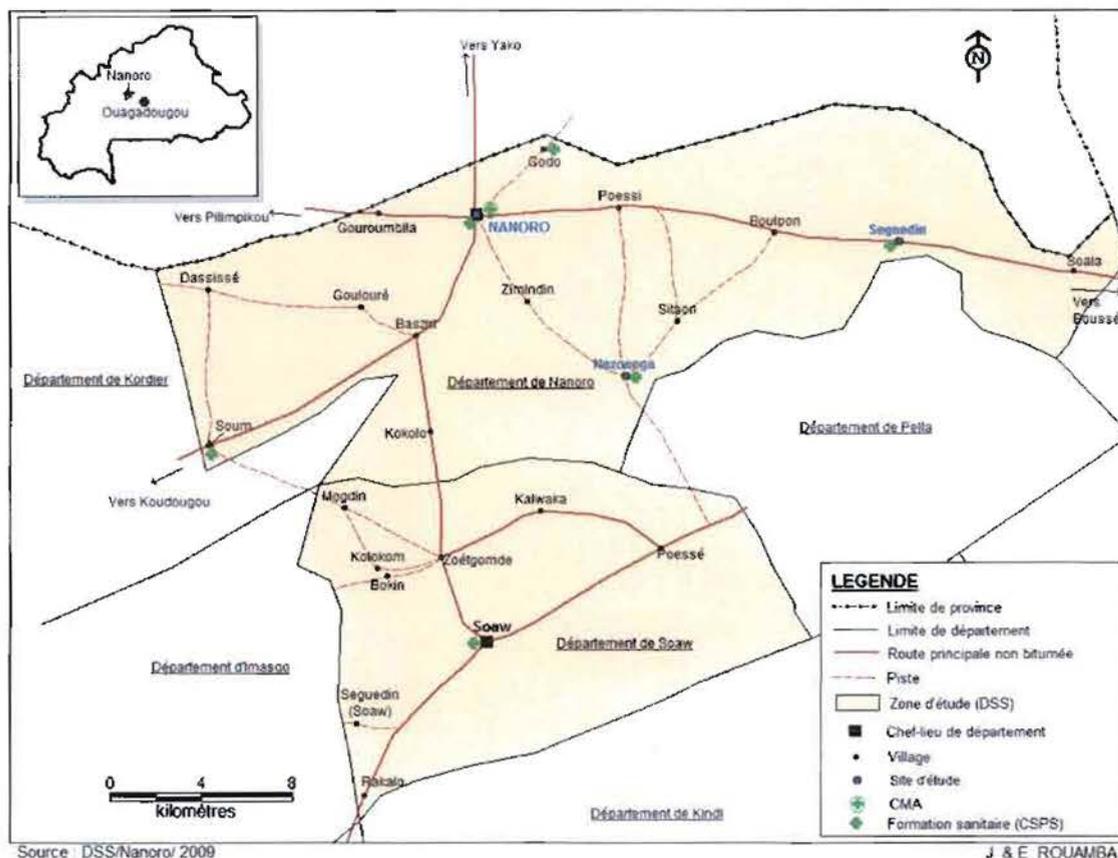


Figure 6: Présentation de la zone de l'étude

### III. 2. Période, type et population d'étude

L'étude s'est déroulée de Septembre 2007 à Décembre 2008. Il s'est agi d'un essai clinique de phase IV, randomisé de type ouvert, à deux bras comparant l'efficacité thérapeutique de AL vs ASAQ en administration non supervisée. Au total, 340 enfants des deux sexes âgés de 6 à 59 mois et vivant dans l'aire du district sanitaire de Nanoro et ses environs répondant aux critères d'inclusion ont été sélectionnés lors de notre étude.

### III.3. Critères d'inclusion

Ont été inclus dans notre étude, les enfants des deux sexes âgés de 6 à 59 mois respectant les critères suivants :

- Mono infection à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 2000 et 200 000 parasites/ $\mu$ l;
- Poids  $\geq$  5 kg;
- Fièvre (température axillaire  $\geq$ 37,5°C) ou histoire de fièvre dans les 24 heures précédentes ;
- Consentement éclairé librement donné par les parents/tuteur légal de l'enfant;
- Hémoglobine  $\geq$ 5 g/dl.

### III.4. Critères de non inclusion

N'étaient pas inclus dans notre étude les patients présentant l'un des critères suivants :

- o Signes de danger ou de paludisme grave ou compliqué : incapacité de boire ou prendre le lait maternel ;
- o Vomissement (> deux fois en 24H), histoire récente de convulsions (>1 en 24H), état d'inconscience, incapacité de rester assis ou debout ;
- o Maladies récurrentes et/ou conditions médicales (cardiaques, rénales, hépatiques, malnutrition, déficience de G6PD) qui pourraient exposer les patients à une situation de danger ou interférer avec les résultats de l'étude ;
- o Malnutrition grave (rapport poids par taille <70% de la médiane (NCHS/WHO) ;
- o Histoire d'allergie aux médicaments d'étude ;
- o Prophylaxies en cours avec des médicaments ayant une activité antipaludéenne, comme le cotrimoxazole pour la prévention de la pneumonie due au *Pneumocystis carinii* chez les enfants nés d'une mère positive au VIH ;
- o Histoire de traitement antipaludique adéquat dans le mois précédent.

### III.5. Administration du traitement et suivi des patients

Une fois que le patient remplissait ces critères, quelques gouttes de sang étaient recueillies du bout du doigt sur du papier filtre Whatman (confetti) pour les analyses moléculaires futures. Les traitements étaient ensuite administrés aux patients selon une liste de randomisation définie à l'avance. La première dose du traitement a été administrée sous la supervision de l'infirmière de l'étude et la suite du traitement s'est faite à la maison par les parents eux-mêmes. Dès leur retour au rendez-vous suivant un questionnaire leur était adressé sur la manière dont ils avaient donné le traitement. Nous avons retenu cette procédure de traitement pour rester en accord avec les conditions réelles de prise en charge du paludisme simple au Burkina Faso.

L'antipaludique Artemether-luméfantine a été utilisée sous sa forme de spécialité Coartem® en combinaison fixe. Les doses de Coartem® ont été administrées de façon journalière en fonction du poids corporel pendant 3 jours (tableau 1). Les comprimés contenaient 20 mg d'Artemether et 120 mg de Luméfantine.

**Tableau I: Posologie du Coartem®**

<i>Poids en kg</i>	<i>Nombre de comprimés par dose</i>
5-15 kg	1 comprimé par dose
15 -25 kg	2 comprimés par dose
25-35 kg	3 comprimés par dose

La combinaison Artésunate-Amodiaquine a été utilisée sous sa forme de spécialité COARSUCAM™ en combinaison fixe. La dose était administrée en fonction du poids corporel une fois par jour pendant 3 jours (tableau 2)

**Tableau II : Posologie du Coarsucam™**

Poids	Formulation	Comprimés/ jour
< 9 Kg	COARSUCAM™	1
9-17,9 Kg	25mg/67,5mg COARSUCAM™	1
18- 35 Kg	50mg/135mg COARSUCAM™	1
	100mg/270mg	

Le suivi clinique et biologique des patients s'est déroulé pendant 42 jours conformément au tableau 3.

**Tableau III: Tableau de suivi des patients durant les 42 jours**

Jour	J0	J1	J2	J7	J14	J21	J28	J35	J42	Autres jours
Température et poids	X									
Examen clinique	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
Consentement éclairé	X									
Confettis pour PCR	X				X	X	X	X	X	X
Thérapie	X	X	X							
Événements indésirables	X			X	X	X	X	X	X	X
Visite	V1			V2	V3	V4	V5	V6	V7	

### III.6. Interprétation des résultats

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

Echec Thérapeutique Précoce (ETP) qui correspond à l'un des cas suivants :

- (i) Développement de signes de danger ou de paludisme grave au jour 0, jour 1, jour 2 ou jour 3, en présence de parasitémie ;
- (ii) Densité parasitaire au jour 2 > à celle du jour 0, indépendamment de la température axillaire ;
- (iii) Présence de parasitémie au jour 3 avec fièvre (température axillaire  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ) ;
- (iv) Parasitémie au jour 3  $\geq 25\%$  à celle du jour 0.

Echec Thérapeutique Tardif (ETT)

L'ETT est divisé en Echec clinique tardif et en Echec parasitologique tardif

Echec Clinique Tardif (ECT) :

- (i) Développement de signes de danger ou de paludisme grave après le jour 3 en présence de parasitémie.
- (ii) Présence de parasitémie et fièvre n'importe quel jour après le jour 3 sans avoir répondu aux critères de la ETP

Echec Parasitologique Tardif (**EPT**):

Réapparition de la parasitémie après le jour 3 en l'absence de fièvre (Température axillaire < 37,5°C) sans avoir précédemment répondu aux critères d'ETP ou d'ECT.

Le taux d'échec thérapeutique constitue la somme des ETP et des ETT rapportés à l'ensemble de l'échantillon.

La réponse clinique et parasitologique adéquate (**RCPA**)

Elle est définie comme l'absence de parasitémie à la fin de la période de suivi, indépendamment de la température axillaire sans avoir répondu précédemment à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce ou tardif.

Les patients qui ont eu une réapparition tardive de parasites (avec ou sans fièvre) ont été considérés comme RCPA si l'analyse de la PCR a montré qu'il s'agit d'une nouvelle infection plutôt qu'une recrudescence

### **III.7. Etudes moléculaires**

Les études moléculaires avaient deux composantes essentielles qui étaient :

- 1- l'étude du polymorphisme génétique de MSP1 et MSP2 de *Plasmodium falciparum* pour distinguer les recrudescences des nouvelles infections
- 2- le génotypage des allèles de *Pfmdr1*-N86Y, Y184F, D1246Y, S1034C, N1042D et de *Pfcr1* K76T.

Ces analyses ont été réalisées en utilisant la méthode de «polymerase chain reaction» (PCR) ou réaction de polymérisation en chaîne comportant trois étapes essentielles : Extraction de l'ADN, l'amplification et la révélation.

Notre étude moléculaire a débuté par la détermination des marqueurs du polymorphisme génétique du MSP1 et MSP2 et s'est achevée par le génotypage des différents allèles du *Pfmdr-1* et *Pfcr1* K76T.

#### **III.7.1. Mise en évidence des marqueurs de polymorphisme MSP1 et MSP2**

La polyclonalité des infections à *P. falciparum* a été déterminée par une « nested » PCR (ou PCR nichée) des gènes MSP1 et MSP2 suivant les 3 étapes citées plus haut. La PCR nichée est une série de deux PCR consécutives. La première PCR utilisant des primers amplifiant des séquences plus longues encadrant la séquence cible. La deuxième PCR utilise des primers amplifiant des séquences plus spécifiques plus proches du gène cible. Cela permet d'avoir une plus grande spécificité de la technique.

### III.7.2. Extraction de l'ADN génomique de *Plasmodium*

L'ADN a été extrait à partir des papiers confettis par la méthode de chelex-100 [28]. Les différentes étapes sont les suivantes :

- Découper environ 6 mm le confetti, le mettre dans un tube de 1,5 ml, ajouter 1ml de saponine 0,5% préparé au PBS 1X et laisser tremper toute la nuit à 4°C;
- Centrifuger pendant 5 secondes à 8000 tours/minute ; retirer le surnageant, remettre 1ml du BPS 1X, laisser tremper 15-30 minutes à 4°C ;
- Centrifuger ensuite pendant 1mn à 12000tours/mn retirer le surnageant puis ajouter 50µL de Chelex-100 à 20% et compléter avec 100µL de DNA water free ;
- Chauffer pendant 10 minutes à 100°C en vortexant toutes les 2 minutes; Centrifuger à 12000 tours/minute pendant 5 minutes; transférer le surnageant et procéder à une nouvelle centrifugation à 12000 tours/minute pendant 10 minutes.
- Prélever le surnageant qui contient l'extrait d'ADN, le conserver à -20°C jusqu'à l'amplification.

### III.7.3. Mélange réactionnel et programme d'amplification de MSP1 et MSP2 pour la première et la deuxième PCR

Le tableau IV résume la composition des milieux réactionnels pour la première et la deuxième PCR du MSP1 et 2.

Le mélange réactionnel (mix) est préparé dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Pour limiter les contaminations qui pourraient être liées aux manipulations antérieures, se nettoyer les mains à l'aide d'un antiseptique, désinfecter la paillasse de manipulation à l'aide de l'alcool 70°. Les volumes individuels des réactifs et solvants qui entrent dans la composition du mix sont alors calculés et multipliés au nombre total d'échantillons à amplifier. Les volumes requis sont successivement ajoutés dans l'ordre : DNA water free, amorces, buffer, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, Taq polymérase en utilisant pour chaque réactif un cône différent.

**Tableau IV: Constitution du mix pour la première et la deuxième PCR du MSP1 et 2**

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

Des micro-tubes Eppendorf de 0,2 ml sont alors numérotés au nombre d'échantillons à amplifier. Un volume de 23  $\mu\text{l}$  de mix est ensuite distribué dans chaque tube étiqueté.

À ces 23  $\mu\text{l}$ , nous avons ajouté 2  $\mu\text{l}$  de DNA et incubé les tubes dans un thermocycler pour l'amplification selon un programme spécifique conformément au tableau 5

**Tableau V: Séquences des amorces et les programmes d'amplification de chaque gène.**

Gènes	Amorces et séquences (5'-3')	Programmes d'amplification	
<b>MSP1</b>	1 <sup>ère</sup> amplification	<b>O1</b> :5'-CACATGAAAGTTATCAAGAACTTG-3' <b>O2</b> :5'-GTACGTCTAATTCATTTGCACG 3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x 30; 72°C x 3min
	2 <sup>ème</sup> amplification	<b>N1</b> : 5'-GCAGTATTGACAGGTTATGG-3' <b>N2</b> : 5'-GATTGAAAGGTATTTGAC-3'	94°Cx3min; (94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x30; 72°C x 3min
<b>MSP2</b>	1 <sup>ère</sup> amplification	<b>S3</b> : 5'-GAAGGTAATTAACATTGTC-3' <b>S2</b> :5'-GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG-3'	94°Cx3min; (94°C x 25s; 42°C x 1min; 65°Cx2min,)x30; 72°C x 3min
	2 <sup>ème</sup> amplification	<b>S1</b> : 5'-GAGTATAAGGAGAAGTATG-3' <b>S4</b> :5'-CTAGAACCATGCATATGTCC-3'	94°Cx3min; (94°C x 25s; 50°C x 1min; 70°C x 2min)x30; 72°C x 3min

Pour la MSP1 et la MSP2, les volumes et les concentrations des différents réactifs étaient identiques sauf les séquences des paires d'amorces et le buffer pour la deuxième PCR qui étaient différentes.

Le produit de la première amplification a servi de source d'ADN pour la deuxième amplification.

Lors de la première PCR les couples d'amorces utilisés étaient : O1/O2 pour MSP1 et S2/S3 pour MSP2.

Au cours de la seconde PCR nous avons utilisé la paire d'amorces N1/N2 pour MSP1 et la paire S1/S4 pour MSP2.

### III.7.4. Révélation des produits de la PCR nichée

Les produits obtenus après la PCR nichée sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2,5 % contenant bromure d'éthidium (5-éthyl-3,8-diamino-6-phénylphénanthidine) qui a la propriété de s'intercaler entre les fragments d'une molécule d'ADN et d'émettre une fluorescence à 622 nm quand il est excité aux rayons ultra violets.

Nous avons déposé un volume de 5-8 µl de chaque produit de la PCR nichée dans un puits du gel placé dans une cuve à électrophorèse contenant un tampon TBE (Trizma Boric acid EDTA) 0,5X.

L'électrophorèse est réalisée à une intensité de 400 mA sous une tension de 80 volts (V) pendant 3 heures. Sous illumination ultra violet, les fragments d'ADN apparaissent sous forme de bandes à différentes positions sur le gel. Pour un même patient, nous avons comparé 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. Le tableau VI donne un exemple d'interprétation des gels pour différencier les recrudescences des nouvelles infections.

**Tableau VI : Exemple non exhaustif d'interprétation des gels**

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

Le statut d'un patient est déterminé à partir du polymorphisme de la MSP1 et de la MSP2. Dans notre étude, était considéré comme recrudescence un patient dont la taille d'au moins d'une des bandes à J0 et J-échec était identique pour la MSP1 et MSP2.

### III.7.5. Géotypage des allèles *Pfmdr1-86*, *Pfmdr1-184*, *Pfmdr1-1034*, *Pfmdr1-1042*, et *Pfmdr1-1246*

A l'exception des amorces, le matériel et les réactifs sont identiques à ceux dont nous avons utilisé pour l'étude des marqueurs de polymorphisme. Le tableau VI donne la composition du milieu réactionnel en fonction de chaque point de mutation.

La particularité de cette partie était la nécessité d'une digestion enzymatique avant la migration des produits d'amplification.

#### III.7.5.1 Mélange réactionnel et programmes d'amplification.

Le mix est préparé dans un tube Eppendorf conformément au tableau VII. Nous calculions, à chaque manipulation les volumes des différents réactifs et solvant du mix et leur multiplions par le nombre total des échantillons à amplifier.

Comme source d'ADN, nous avons utilisé l'ADN extrait lors de la détermination du polymorphisme. Nous avons distribué 23 µL du mix dans les microtubes étiquetés, ajouté 2 µL de l'ADN et incubé les tubes dans un thermocycleur pour l'amplification.

Le Tableau VIII donne les programmes d'amplification et les primers pour les différents points de mutation du *Pfmdr-1* étudiés.

Tableau VII : Composition du milieu réactionnel pour les PCR 1 et 2 du gène *Pfmdr-1*

Réactifs	Concentrations	Volumes à prélever (µl)	
<i>PfMDR 1</i> 86 et 184 PCR 1	H2O	-	12,8
	Primer sens : <i>MDR-A1</i>	10 mM	0,5
	Primer antisens : <i>MDR-A3</i>	10 mM	0,5
	Buffer	10X	5
	dNTPs	2 mM	2,5
	MgCl2	50 mM	1,5
	Taq polymérase	5 U/µl	0,2
	Solution d'ADN	Inconnu	2
	Volume final 25 µl		
<i>PfMDR 1</i> 86 et 184 PCR 2	H2O	-	12,8
	Primer sens : <i>MDR-A4</i>	10 mM	0,5
	Primer antisens : <i>MDR-A2</i>	10 mM	0,5
	Buffer	10X	5
	dNTPs	2 mM	2,5
	MgCl2	50 mM	1,5
	Taq polymérase	5 U/µl	0,2
	Solution d'ADN	Inconnu	2
	Volume final 25 µl		
<i>PfMDR1-</i> 1034,1042, 1246 PCR 1	H2O	-	12,8
	Primer sens <i>MDR-O1</i>	10 mM	0,5
	Primer antisens : <i>MDR-O2</i>	10 mM	0,5
	Buffer	10X	5
	dNTPs	2 mM	2,5
	MgCl2	50 mM	1,5
	Taq polymérase	5 U/µl	0,2
	Solution d'ADN	Inconnu	2
	Volume final 25 µl		
<i>PfMDR1</i> 1034 et 1042 PCR 2	H2O	-	12,8
	Primer sens : <i>MDR-A4</i>	10 mM	0,5
	Primer antisens : <i>MDR-A2</i>	10 mM	0,5
	Buffer	10X	5
	dNTPs	2 mM	2,5
	MgCl2	50 mM	1,5
	Taq polymérase	5 U/µl	0,2
	Solution d'ADN	Inconnu	2
	Volume final 25 µl		
<i>PfMDR1</i> 1246 PCR 2	H2O	-	12,8
	Primer sens : 1246F	10 mM	0,5
	Primer antisens : <i>MDR-O2</i>	10 mM	0,5
	Buffer	10X	5
	dNTPs	2 mM	2,5
	MgCl2	50 mM	1,5
	Taq polymérase	5 U/µl	0,2
	Solution d'ADN	Inconnu	2

Tableau VIII: Séquences des primers et programmes d'amplifications pour l'analyse de *Pfmdr-1*  
86, 184, 1034, 1042,1246.

Gènes / étapes de la PCR	Primers (5'.....3')	Programme d'amplification
<i>PfMDR 1</i> 86 et 184 PCR 1	MDR-A1 : TGT TGAA AGA TGG GTA AAG AGC AGA AAG AG	<u>Dénaturation initiale</u> 94°C x 2min <u>Amplification</u> 30 cycles; 94°C x1min, 45°C x1min, 72°C x 45s <u>Elongation finale</u> 72°C x 5 min <u>Hold</u> to 4 °C
	MDR-A3 : TAC TTT CTT ATT ACA TAT GAC ACC ACA AAC A	
<i>PfMDR 1</i> 86 et 184 PCR 2	MDR-A4 : AAA GAT GGT AAC CTC AGT ATC AAA GAA GAG	<u>Dénaturation initiale</u> 94°C x 2min <u>Amplification</u> 30 cycles; 94°C x1min, 52°C x1min, 72°C x 45s <u>Elongation finale</u> 72°C x 5 min <u>Hold</u> to 4 °C
	MDR-A2 : GTC AAA CGT GCA T TT TTT ATT AAT GAC CAT TTA	
<i>PfMDR1-</i> 1034,1042, 1246 PCR 1	MDR-O1 : AGA AGA TAT TTC TGT AAT TTG ATA CAA AAA GC	<u>Dénaturation initiale</u> 94°C x 2min <u>Amplification</u> 30 cycles; 94°C x1min, 52°C x1min, 72°C x 45s <u>Elongation finale</u> 72°C x 5 min <u>Hold</u> to 4 °C
	MDR-O2 : ATG ATT CGA TAA ATT CAT CTA TAG CAG CAA	
<i>PfMDR1</i> 1034 et 1042 PCR 2	1034F : AGA ATT ATT GTA AAT GCA GCT TTA TGG GGA CTC	<u>Dénaturation initiale</u> 94°C x 2min <u>Amplification</u> 30 cycles; 94°C x1min, 52°C x1min, 72°C x 45s <u>Elongation finale</u> 72°C x 5 m <u>Hold</u> to 4 °C
	1042R : AAT GGA TAA TAT TTC TCA AAT GAT AAC TTA GCA	
<i>PfMDR1</i> 1246 PCR 2	1246F : ATG ATC ACA TTA TAT TAA AAA ATG ATA TGA CAA AT	<u>Dénaturation initiale</u> 94°C x 2min <u>Amplification</u> 30 cycles; 94°C x1min, 52°C x1min, 72°C x 45s <u>Elongation finale</u> 72°C x 5 min <u>Hold</u> to 4°C
	MDR-O2 : ATG ATT CGA TAA ATT CAT CTA TAG CAG CAA PCR semi-nichée	

Pour servir de témoins, nous avons utilisé la souche 3D7 comme souche sauvage et l'une des souches HB3 ou K1 ou 7G8 comme souche mutante pour les allèles *Pfmdr-1*-86, 184, 1246, 1034,1042. Ces souches ont parallèlement été amplifiées avec les échantillons.

### III.7.5.2. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction

Le tableau IX donne la composition du mélange pour la digestion enzymatique de chaque point de mutation. Pour la digestion des produits de la PCR nichée, nous avons préparé 10 µl (par micro-tube Eppendorff) de différentes solutions réactionnelles correspondant aux différents enzymes.

**Tableau IX : Composition du mélange pour la digestion enzymatique des gènes *Pfmdr-1***

Point de mutation	Réactifs	Concentration du stocke	Concentration finale	Volume à prélever (µL)	Durée/T° incubation
N86Y	H <sub>2</sub> O	-	-	7.4	1h 30mn/ 37°c
	NEB3	10X	1X	2.0	
	BSA	100X	1X	0.2	
	Afl III (NEB)	5 U/µL	2 U	0.4	
	Produit de PCR2	-	-	10.0	
	<b>Final volume</b>		<b>20.0 µL</b>		
Y184F	H <sub>2</sub> O	-	-	7.4	2h /37°c
	NEB4	10X	1X	2.0	
	Dra I (NEB)	20 U/µL	15 U	0.75	
	Produit de PCR2	-	-	10.0	
	<b>Final volume</b>		<b>20.0 µL</b>		
S1034C	H <sub>2</sub> O	-	-	7.8	1h 30mn/37°c
	NEB3	10X	1X	2.0	
	Dde I (NEB)	10U/µL	2 U	0.2	
	Produit de PCR2	-	-	10.0	
	<b>Final volume</b>		<b>20.0 µL</b>		
N1042D	H <sub>2</sub> O	-	-	7.8	1h 30mn/37°c
	NEB3	10X	1X	2.0	
	Ase I (NEB=Vsp I)	10U/µL	2 U	0.2	
	Produit de PCR2	-	-	10.0	
	<b>Final volume</b>		<b>20.0 µL</b>		
D1246Y	H <sub>2</sub> O	-	-	7.7	1h 30mn/37°c
	NEB3	10X	1X	2.0	
	BSA	100X	1X	0.2	
	EcoR V (NEB)	20 U/µL	2 U	0.1	
	Produit de PCR2	-	-	10.0	
	<b>volume Final</b>		<b>20.0 µL</b>		

A ces 10 µl des solutions réactionnelles pour la digestion enzymatique, nous avons ajouté 10 µl du produit d'amplification de la PCR nichée et incubé à la température et au temps indiqués sur le tableau IX. Nos contrôles ont été aussi digérés en même temps que les échantillons.

A la fin de la digestion, nous avons déposé le produit final sur un gel d'agarose 2,5 % contenant 7,5 µl de TBE pour 100 ml de TBE 1X. L'électrophorèse a lieu en milieu tamponné (TBE 1X) à 400 mA sous une tension de 80 V pendant 1 heure 30 mn. Le tableau X nous donne les tailles des bandes attendues et les contrôles utilisés par point de mutation.

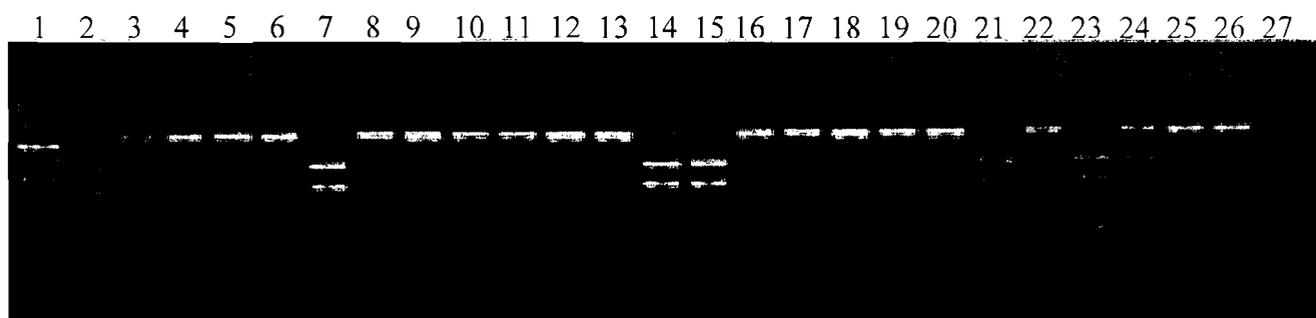
**Tableau X : Les différents contrôles et les tailles de bandes attendues du gène *Pfmdr-1***

Gène	Control sauvage	Control mutant	Site de reconnaissance et de coupure	Fragments du sauvage (bp)	Fragments du mutant (bp)
<i>Pfmdr-1</i> N86Y	3D7, HB3, 7G8	FCR3, K1, V1	5'... <b>A<sup>1</sup>TCRYGT</b> ...3' 3'... <b>TGYRC<sup>1</sup>A</b> ...5'	560	232, 328
<i>Pfmdr-1</i> Y184F	3D7, FCR3, K1	HB3, 7G8, Ghana	5'... <b>TTTT<sup>1</sup>AAA</b> ...3' 3'... <b>AAA<sup>1</sup>TTTT</b> ...5'	204, 242	114, 173, 242
<i>Pfmdr-1</i> S1034C	3D7, FCR3	7G8	5'... <b>CTTNAG</b> ...3' 3'... <b>GANTTC</b> ...5'	60, 172	27, 205
<i>Pfmdr-1</i> N1042D	3D7, FCR3	HB3, 7G8	5'... <b>ATTTAAT</b> ...3' 3'... <b>TAATA<sup>1</sup>TA</b> ...5'	116, 116	56, 176
<i>Pfmdr-1</i> D1246Y	3D7, FCR3, HB3	7G8	5'... <b>GATTAATC</b> ...3' 3'... <b>CTA<sup>1</sup>TAG</b> ...5'	344	153, 191

### III.7.5.3. Interprétation des résultats après la migration

Le produit de la digestion est déposé parallèlement avec un marqueur de poids moléculaire sur le gel. Le caractère sauvage ou mutant d'un échantillon est déterminé en fonction de la position des bandes par rapport à celles de K1, HB3, 7G8 ou 3D7.

Les bandes de la même taille que le contrôle sauvage correspondent aux sauvages, par contre celles qui ont la même taille que le mutant correspondent aux souches mutantes. Les bandes qui apparaissent à la fois au niveau des deux témoins correspondent aux infections mixtes.



**Figure 7: Photo montrant la révélation des bandes aux UV (mutation *Pfmdr-1* 86)**

**Légende:**

- 1: marqueur de poids moléculaire ; 2 : K1= control mutant; 3 : 3D7= control sauvage
- 4-26 : échantillons : Les échantillons 4 - 6 , 8 - 13, 16 - 20 et 25 - 26 sont de type sauvage.
- Les échantillons 7, 15, 21 sont des mutants ; Les échantillons 14, 23 et 24 sont des infections mixtes.

### III.7.6. Génotypage des allèles du *Pfcrt* K76T

Le matériel et les réactifs sont identiques à ceux que nous avons utilisés lors du génotypage des allèles du *Pfmdr1* sauf les amorces des primers. Le tableau XI donne la constitution du mix réactionnel pour la première et la deuxième PCR du génotypage des allèles du gène *Pfcrt* K76T.

**Tableau XI : Composition du mix réactionnel pour le génotypage des allèles *Pfcrt* : K76T**

	Réactifs	Concentration de la solution stocke	Concentration Finale	Volume à prélever (en $\mu\text{L}$ )
<b>PCR 1</b>	H <sub>2</sub> O	-	-	12,8
	Primer sens: CRT-1	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$	0,5
	Primer antisens: CRT-2	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$	0,5
	Tampon	5X	1X	5
	dNTP	2mM chacun	200 $\mu\text{M}$	2,5
	MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	1,5
	Taq (INV)	5U/ $\mu\text{L}$ (INV)	1 U	0,2
	Extrait d'ADN	Inconnue	Inconnue	2
<b>volume Final = 25<math>\mu\text{L}</math></b>				
<b>PCR 2</b>	H <sub>2</sub> O	-	-	12,8
	Primer sens: CQR-A	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$	0,5
	Primer antisens: CQR-B	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$	0,5
	Tampon	5X	1X	5
	dNTP	2mM chacun	200 $\mu\text{M}$	2,5
	MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	1,5
	Taq (INV)	5U/ $\mu\text{L}$ (INV)	1 U	0,2
	Extrait d'ADN	inconnue	Inconnue	2
<b>volume Final = 25<math>\mu\text{L}</math></b>				

23  $\mu\text{L}$  du mix sont distribués dans chaque micro-tube étiqueté dans lequel nous avons ajouté 2  $\mu\text{L}$  d'ADN et incubé dans le thermocycleur pour l'amplification. Le tableau XII donne les séquences des primers et les programmes d'amplification de la première et la deuxième PCR du gène *Pfcrt* K76T.

**Tableau XII : Séquences des primers et programmes d'amplifications du gène *Pfcrt* K76T**

Etape de la PCR	Primers	Programmes d'amplification
PCR1	CRT-1 : (21bp) GACGAGCGTTATAGAGAATTA	<u>Dénaturation initiale</u> : 94°C x 3min <u>Amplification</u> : 40 cycles; 94°C x30s, 47°C x1min, 72°C x 1,5min <u>Elongation finale</u> : 72°C x 3 min <u>Hold</u> to 4 °C
	CRT-2 : (20bp) CCAGTAGTTCTTGTAAGACC	
PCR2	CQR-A : (21bp) TGTGCTCATGTGTTAAACTT	<u>Dénaturation initiale</u> : 94°C x 5min <u>Amplification</u> : 30 cycles; 94°C x30s, 52°C x1min, 72°C x 1min <u>Elongation finale</u> : 72°C x 3 min <u>Hold</u> to 4 °C
	CQR-B : (23bp) CAAACTATAGTTACCAATTTTG	

Pour la digestion des produits de la PCR “nichée”, 10µL du mix réactionnel pour la digestion enzymatique ont été distribués dans les micro-tubes Eppendorf étiquetés. Nous avons ajouté 10µL du produit de la PCR nichée et incubé à 50°C pendant deux heures.

Le tableau XIII donne la composition du mix pour la digestion enzymatique du *Pfcrt* K76T

**Tableau XIII : Composition du mélange pour la digestion enzymatique du *Pfcrt* K76T**

Point de mutation	Réactifs	Concentration du stocke	Concentration finale	Volume à prélever (µL)
<i>Pfcrt</i> : K76T	H <sub>2</sub> O	-	-	6.8
	NEB3	10X	1X	2.0
	BSA	100X	1X	0.2
	Apo I (NEB)	10 U/µL	1 U	1
	Extrait d'ADN	-	-	10.0
	<b>Final volume</b>			<b>20.0 µL</b>

Le principe de l'électrophorèse et l'interprétation des bandes sont les mêmes que ceux du génotypage du gène *Pfmdr-1*. Le tableau XIV donne la taille des bandes attendues et les contrôles utilisés pour la mutation *Pfcrt* K76T.

**Tableau XIV: Contrôles utilisés et taille des bandes attendues pour le gène *Pfcrt* K76T**

Gene	Control sauvage	Control mutant	Fragments du sauvage (bp)	Fragments du mutant (bp)
<i>Pfcrt</i> : K76T	HB3	DD2	34 ; 100	134

Pour l'interprétation nous avons considéré les bandes de la même taille que le contrôle sauvage comme sauvages, et celles qui ont la même taille que le mutant comme souche mutante. Les bandes qui apparaissent à la fois au niveau des deux témoins correspondent aux infections mixtes.

### **III. 8. Analyse des données**

Les données ont été saisies avec les logiciels Epi DATA et ont ensuite été analysées avec le logiciel Epi Info 6.04. Le test de Chi 2 a été utilisé pour comparer les variables catégorielles et mesurer leur association avec un niveau de significativité de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **III.9. Considérations éthiques**

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

## **IV. RESULTATS**

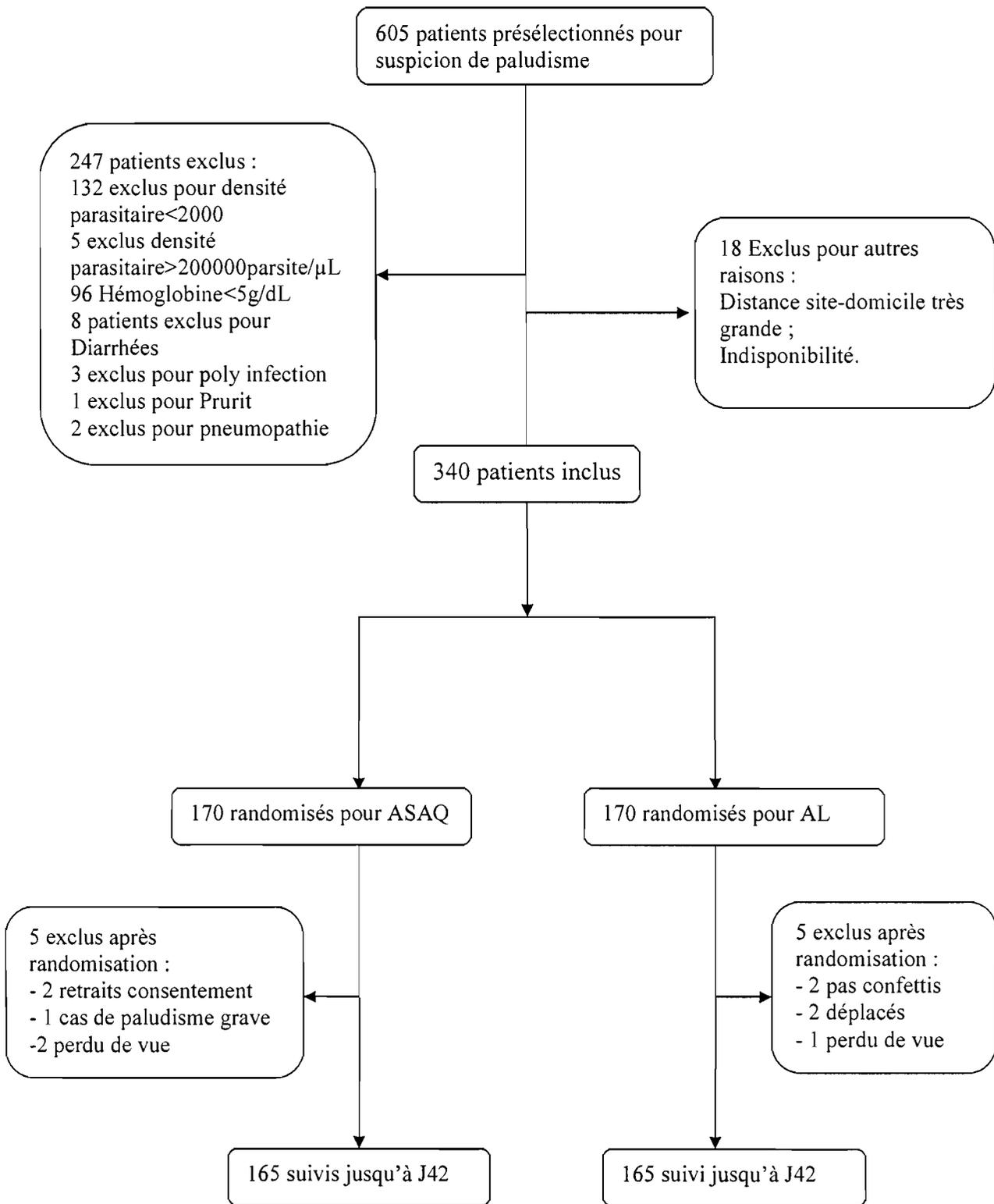
### **IV.1 Résultats globaux**

La figure 8 donne les détails sur la sélection des patients et le motif de non inclusion des patients.

Au total 605 patients ont été examinés pour suspicion de paludisme au cours de l'étude. Au screening, nous avons trouvé un indice plasmodique de 71%. Parmi ces 605 patients screenés, 340 patients ont été enrôlés et randomisés dans les 2 groupes de traitement dont 170 dans le groupe de AL et 170 dans le groupe de ASAQ.

La moyenne d'âge était de 25,92 mois dans le groupe de ASAQ et 26,10 mois dans le groupe de AL. Au total il y avait 174 filles et 166 garçons qui ont été inclus dans notre étude.

Au terme de notre étude nous avons 165 patients dans chacun des deux bras de traitement qui ont terminé leur suivi de 42 jours.



**Figure 8: Diagramme de sélection des patients**

## IV. 2. Caractéristiques générales des patients à l'inclusion

Le Tableau XV résume les différentes caractéristiques des patients à l'inclusion.

Nous n'avons pas noté une différence significative entre les deux groupes de traitement en ce qui concerne le sexe, la température, la densité parasitaire et l'hémoglobine. ( $P>0,05$ ).

**Tableau XV : Caractéristiques des patients à l'inclusion.**

Paramètres	AQ-AS (N=165)	AL (N=165)	P
Age moyenne (en mois)	25,92±12,23	26,10±13,71	
féminin	80 (48)	94	
Sexe			
masculin	90	76 (45)	
Poids (kg)	9,78± 2,36	9,85±2,57	0,78
Température moyenne (°c)	38,±1.18	38,24±1.24	0,06
Densité Parasitaire à J0 : Moyenne géométrique [95%CI]	31389±36584	32771±37157	0,72
Hémoglobine (en g/dl)	7,37±1,58	7,41±1,50	0,81

## IV.3 Résultats clinique et parasitologique

Le tableau XVI résume les réponses au traitement dans les deux groupes à J28 et à J42.

L'analyse a porté sur les 330 patients ayant terminé leur suivi de 42 jours. Sur la base des observations cliniques et microscopiques, à J28 les taux d'échecs thérapeutiques bruts (avant l'interprétation des résultats de la PCR) étaient 53,34% et 39,97% pour AL et ASAQ respectivement. La différence entre ces deux taux d'échecs était statistiquement significative. ( $P= 0,013$ ). Après la correction à la PCR on obtenait des taux d'échecs thérapeutiques similaires dans les deux groupes de 9.09% et 9.64% pour AL et ASAQ respectivement.

Au jour 42, avant la correction par la PCR, on notait des taux d'échecs thérapeutiques similaires entre les deux groupes de traitement de 64,24% et 61,45% pour AL et ASAQ respectivement. Par contre, après la correction par la PCR, nous avons obtenu des taux d'échecs thérapeutiques avec des différences significatives de 10,30% et 17,46% pour AL et ASAQ respectivement ( $P=0.039$ ).

**Tableau XVI: Résultats thérapeutiques de AL et ASAQ avant et après PCR**

		AL (N=165)		AS+AQ (N=165)		p
		ETT	RCPA	ETT	RCPA	
Classification non corrigée par la PCR	J28	53.34% (88/165)	46.66% (77/165)	39.97% (66/165)	60.23% (100/165)	0.013
	J42	64.24% (106/165)	35.76% (59/165)	61.45% (102/165)	38.55% (64/165)	0.598
Classification corrigée par la PCR	J28	9.09% (15/165)	90.91% (150/165)	9.64% (16/165)	90.36% (150/165)	0.864
	J42	10.30% (17/165)	89.70% (148/165)	17.46% (29/165)	82.53% (137/165)	0.039

#### IV.4. Prévalence des allèles *Pfmdr1* et *Pfcr1*

Le tableau XVII présente la prévalence des allèles des gènes *Pfmdr1* et *Pfcr1* K76T à Nanoro. Pour déterminer la prévalence des différents allèles de *Pfmdr-1* au sein de la population des parasites étudiés, les prélèvements effectués avant l'administration du traitement ont été analysés à la PCR. Dans l'ensemble, les résultats portant sur les six points de mutations étaient interprétables à plus de 95%. Le génotypage de l'ensemble des échantillons pour le gène *Pfmdr-1* a révélé des mutations ponctuelles aux proportions de 25,76% pour la position 86 ; 47,66% pour la position 184. Cependant aucune mutation ponctuelle n'a été observée pour les positions 1034 et 1042 pour le même gène. En effet tous les échantillons présentaient 100% d'allèle sauvage pour ces deux positions. Des mutations ont également été observées au niveau de la position *Pfmdr-1* D1246Y à 5,1%. Le taux de prévalence des allèles mutants le plus élevé a été celui de *Pfcr1* 76T qui était de 53.93%.

**Tableau XVII: Prévalence des allèles dans la population à J0.**

génotype	<i>Pfmdr-1</i> 86	<i>Pfmdr-1</i> 184	<i>Pfmdr-1</i> 1034	<i>Pfmdr-1</i> 1042	<i>Pfmdr-1</i> 1246	<i>Pfcr1</i> K76T
	(n/N)	(n/N)	(n/N)	(n/N)	(n/N)	(n/N)
<b>Sauvage</b>	(74,24%) 245/330	(52,34%) 168 /321	(100%) 340 /340	(100%) 340/340	(94,90%) 316/333	(46,07%) 129/280
<b>Mutant</b>	(25,76%) 85/330	(47,66%) 153 /321	0 /340	0/340	(5,1%) 17/333	(53,93%) 151/280

n/N : n= nombre d'échantillons contenant l'allèle analysé ; N= nombre total d'échantillons avec résultats interprétables.

#### **IV.5. Impact du traitement sur la sélection des allèles :**

Le tableau XVIII fournit les prévalences des allèles en pré et post-traitement à l'ASAQ et à AL. Pour établir s'il y avait un impact de l'usage des combinaisons ASAQ et AL sur la sélection des différents allèles du *Pfmdr-1* et *Pfprt K76T*, nous avons comparé la prévalence des allèles sauvages, mutants et mixtes avant et après le traitement.

##### **IV.5.1. Variation de la prévalence des allèles à la position 86 du gène *Pfmdr-1***

Nous avons obtenu une diminution de la fréquence de l'allèle sauvage N86 qui passe de 72,28% période prétraitement à 65,30% au jour de l'échec avec ASAQ. Cependant, cette différence n'était pas statistiquement significative ( $P=0,23$ ). Nous avons aussi remarqué qu'il y avait une augmentation de la prévalence de l'allèle mutant 86Y. Elle est passée de 13,20% en prétraitement à 20,4% en post-traitement. Là également, la différence n'était pas statistiquement significative ( $P=0,16$ ). Par contre nous avons obtenu des variations statistiquement significatives lors du traitement à AL sur la position 86 du gène *Pfmdr-1*.

##### **IV.5.2. Variation de la prévalence des allèles à la position 184 du gène *Pfmdr-1***

Nous avons noté des différences entre les prévalences des allèles du sauvage, du mutant et du mixte en période prétraitement et post-traitement pour les deux combinaisons ASAQ et AL. Cependant, ces différences ne sont pas statistiquement significatives ( $P>0,05$ ). (Voir tableau XVIII)

##### **IV.5.3. Variation de la prévalence des allèles à la position 1246 du gène *Pfmdr-1*.**

Les résultats de la PCR montrent des variations significatives de la prévalence des allèles sauvage et mutant en pré et post-traitement à l'ASAQ. En effet l'allèle sauvage D1246 qui était de 94,64% en prétraitement devient 81,37% en post-traitement. Cette diminution était statistiquement significative ( $P=0,00052$ ). L'allèle mutant 1246F qui était de 1,19% est passé à 13,72% en pré et post-traitement. Cette augmentation est également statistiquement significative ( $P=0,00023$ ). Par contre les prévalences des souches mixtes D1246F ont subi des variations non significatives pendant le traitement de ASAQ ( $P=0,98$ ). Pour ce qui est de la combinaison AL, nous avons noté une différence significative de l'allèle sauvage *Pfmdr1*N86 parmi les allèles analysés en pré et post-traitement ( $P=0,03$ ).

#### **IV.5.4. Variation de la prévalence des allèles du gène *Pfcr* K76T.**

En ce qui concerne ce gène, les analyses moléculaires nous donnent une diminution de la prévalence de l'allèle sauvage K76 qui passe de 42,25% en prétraitement à 24,6% en post-traitement dans le groupe ASAQ. La différence observée était statistiquement significative ( $P= 0,014$ ).

Par ailleurs, nous avons obtenu une augmentation de la prévalence de l'allèle mutant 76T qui passe de 45,77% en prétraitement à 66,15% en post-traitement à l'ASAQ. La différence observée était également statistiquement significative ( $P= 0,0064$ ). Par contre les infections mixtes ont subies des K76T variations non significatives ( $P= 0,56$ ).

Lors du traitement avec AL, nous n'avons pas noté des variations significatives sur la prévalence des allèles du *Pfcr* K76T à Nanoro.

**Tableau XVIII: Prévalences des allèles avant et après les traitements**

Point de mutation	ASAQ			AL			
	Jo	Jr	P	Jo	Jr	P	
	%	%		%	%		
	n/N	n/N	n/N	n/N			
<i>Pfmdr-1</i> 86	N86 (w)	72,28 <b>120/166</b>	65,30 <b>64/98</b>	0,232	76,22 <b>125/164</b>	83,96 <b>89/106</b>	0,125
	86Y(m)	13,86 <b>23/166</b>	20,40 <b>20/98</b>	0,163	7,93 <b>13/164</b>	4,72 <b>5/106</b>	0,301
	N86Y (w/m)	13,86 <b>23/166</b>	14,30 <b>14/98</b>	0,922	15,85 <b>26/164</b>	11,32 <b>12/106</b>	0,295
	Y184 (w)	51,85 <b>84/162</b>	48,20 <b>40/83</b>	0,58	52,84 <b>84/159</b>	53,60 <b>52/97</b>	0,905
<i>Pfmdr-1</i> 184	184F (m)	35,19 <b>57/162</b>	40,96 <b>34/83</b>	0,375	33,96 <b>54/159</b>	38,15 <b>37/97</b>	0,497
	Y184F (w/m)	12,96 <b>21/162</b>	10,84 <b>9/83</b>	0,631	13,20 <b>21/159</b>	8,25 <b>8/97</b>	0,224
	D1246 (w)	94,64 <b>159/168</b>	81,38 <b>83/102</b>	0,0005	95,15 <b>157/165</b>	99,03 <b>103/104</b>	0,168
	1246Y (m)	1,20 <b>2/168</b>	13,72 <b>14/102</b>	0,0002	1,82 <b>3/165</b>	0 <b>0/104</b>	0,430
<i>Pfmdr-1</i> 1246	D1246Y (w/m)	4,16 <b>7/168</b>	4,90 <b>5/102</b>	0,98	3,03 <b>5/165</b>	0,97 <b>1/104</b>	0,480
	K76 (w)	42,26 <b>60/142</b>	24,61 <b>16/65</b>	0,014	50,0 <b>69//138</b>	57,62 <b>34/59</b>	0,320
	76T (m)	45,77 <b>65/142</b>	66,16 <b>43/65</b>	0,0064	42,02 <b>58/138</b>	35,60 <b>21/59</b>	0,390
	K76T (w/m)	11,97 <b>17/142</b>	9,23 <b>6/65</b>	0,56	7,98 <b>11/138</b>	6,78 <b>4/59</b>	0,990

**Légende :** w = allèle sauvage ; m = allèle mutant ; w/m = échantillon ayant allèles sauvage et mutant ; n = nombre d'échantillons contenant l'allèle analysé ; N= nombre total d'échantillons avec résultats interprétables.

## **IV.6. Associations entre marqueurs moléculaires et recrudescences.**

Le tableau XIX permet de voir le lien entre les marqueurs moléculaires et la recrudescence. Pour déterminer les relations entre les marqueurs moléculaires et les recrudescences, nous nous sommes posés l'hypothèse suivante : « la présence de la mutation chez un patient à l'inclusion était-il synonyme d'un risque de recrudescence ? ». Nous avons donc évalué le risque d'avoir une recrudescence lorsque l'on héberge des parasites mutants. Nous avons ainsi déterminé le nombre d'allèles sauvage et mutant à J0. Nous avons aussi déterminé le nombre de ces mêmes allèles qu'on retrouvait à J0 et au jour de la recrudescence. Pour vérifier notre hypothèse nous avons utilisé la table 2 X 2 qui permet de dire s'il existe ou pas un facteur de risque. Cela nous a permis d'établir les relations entre les marqueurs moléculaires et les recrudescences suivantes :

### **IV.6.1. Marqueur moléculaire du *Pfcrt* K76T.**

Une association hautement significative a été trouvée entre l'allèle mutant 76T et la recrudescence lorsque le patient recevait de l'ASAQ comme traitement ( $P < 0,0001$ ). En effet les patients présentant cette mutation avaient un facteur de risque se multipliant par 19.51 [I=12,28-29,47%] comparativement à ceux qui n'en possédaient pas. Par contre nous n'avons pas obtenu une association significative entre ce même marqueur et la recrudescence lors du traitement à AL ( $P= 0.13$ ).

### **IV.6.2. Marqueur moléculaire du *Pfmdr-1* N86Y.**

Aucune association significative n'a été trouvée entre ce marqueur moléculaire et la recrudescence lors du traitement à l'ASAQ et à l'AL. Les valeurs de P étaient respectivement 0.51 et 0.17. Les risques de ceux qui possédaient la mutation et ceux qui n'en possédaient pas étaient respectivement 13,04% [I = 5.74-26.04] et 8.33% [I= 4.43-14,82].

### **IV.6.3. Marqueur moléculaire du *Pfmdr-1* Y184F.**

Nous avons trouvé une association significative entre la mutation 184F et la recrudescence lors du traitement à l'ASAQ [( $P= 0.006$ ); (IC= 0,14-0,75)]. Par contre aucune relation n'a été trouvée entre ce marqueur et la recrudescence lors du traitement à AL.

### **IV.6.4. Marqueur moléculaire du *Pfmdr-1* N1246Y**

Aucune relation entre ce marqueur et la recrudescence n'a été trouvée lors du traitement de l'ASAQ ( $P= 0.99$ ) et du AL ( $P= 0.48$ ) lors de notre étude.

#### IV.6.5. Combinaison entre allèles des 2 gènes (*Pfmdr-1* 86Y /*Pfcr*t 76T) et recrudescence

Pour cette analyse, nous avons regardé les patients qui possédaient à la fois les mutants 86Y et 76T à J0 et au J-échec. En évaluant le risque d'apparition de la recrudescence, nous avons abouti à des résultats démontrant qu'il y avait une association hautement significative entre la présence de ces deux mutations et la recrudescence (P=0.01) lorsque le patient avait reçu de l'ASAQ comme traitement. Par contre lorsque le patient recevait du AL comme traitement cette association n'est pas statistiquement significative (P= 0.48).

#### IV.6.6. Combinaison entre marqueurs moléculaires du *Pfmdr-1* 86Y /*Pfcr*t 76T/ *Pfmdr-1* 1246Y

Une association hautement significative a été trouvée entre cette combinaison d'allèles et l'apparition de la recrudescence lorsque le patient a reçu de l'ASAQ (P=0.003). Chez les patients ayant reçu du AL aucune association n'a été établie (P= 0.16).

**Tableau XIX: Associations entre marqueurs moléculaires et recrudescences.**

Traitement	Allèle	Sau	Mut ou Mix	Sau avec Rec	Mut ou Mix avec Rec	RR	IC	P
ASAQ	<i>Pfcr</i> t K76T (N=142)	60	82	00	16	ND	ND	<b>0,0001</b>
	<i>Pfmdr-1</i> N86Y (N= 166)	120	46	10	6	1,65	0,56-4,84	0,51
	<i>Pfmdr-1</i> Y184F (N=162)	84	78	24	9	<b>0,41</b>	<b>0,14-0,75</b>	<b>0,008</b>
	<i>Pfmdr-1</i> D1246Y (N=168)	159	9	20	1	0.88	0,1-7,33	0.99
	<i>Pfmdr-1</i> 86Y/ <i>Pfcr</i> t 76T (N= 69)	46	23	0	4	ND	ND	<b>0,01</b>
	<i>Pfcr</i> t 76T/ <i>Pfmdr-1</i> 86Y/ <i>Pfmdr-1</i> 1246Y (N=46)	45	1	0	1	ND	ND	<b>0.0000001</b>
AL	<i>Pfcr</i> t K76T (N=138)	69	69	9	3	0,33	0,08-1,16	0,13
	<i>Pfmdr-1</i> N86Y (N=164)	125	39	14	1	0,23	0,03-1,65	0,17
	<i>Pfmdr-1</i> Y184F (N=159)	84	75	9	5	0.62	0,21-1,77	0,27
	<i>Pfmdr-1</i> D1246Y (N=165)	157	8	14	0	ND	ND	0,48
	<i>Pfmdr-1</i> 86Y+ <i>Pfcr</i> t 76T (N = 61)	54	6	8	0	ND	ND	0,40
	<i>Pfcr</i> t 76T/ <i>Pfmdr-1</i> 86Y/ <i>Pfmdr-1</i> 1246Y (N=55)	55	0	8	1	ND	ND	0,16

ND : Note done = non fait, nous n'avons pas pu calculer les valeurs correspondantes avec la table 2X2 compte tenu du zéro (0) dans l'une des cases de la ligne correspondante. Les taux des risques encourus par ceux portant la mutation et ceux qui ne la portent pas ne figurent pas sur le tableau pour raison de clarté

Sau : Sauvage ; Mut : Mutant ; Mix : Mixte ; Rec : Recrudescence

## V. DISCUSSION

### V.1. De la caractéristique des patients à l'inclusion sur les résultats globaux.

Nous n'avons pas trouvé des différences entre les deux groupes à tous points de vue ( $p>0,05$ ). Par exemple la température, le taux d'hémoglobine ou la parasitémie n'était pas plus élevé chez les garçons que chez les filles. Cela dénote l'importance de l'approche par randomisation qui est une approche capitale dans ces types d'études car elle permet de minimiser les différents biais. Le fort taux d'infestation palustre obtenu témoigne du poids du paludisme à Nanoro où il représente 39,97% des nouvelles consultations curatives dans toutes les formations sanitaires du district.

### V.2. De l'efficacité thérapeutique aux traitements.

Au cours des 28 premiers jours de suivi nous avons noté que les taux d'échecs thérapeutiques avant la correction des résultats par la PCR de AL (53.34%) étaient supérieurs à ceux de l'ASAQ (39.97%) avec une différence statistiquement significative ( $P= 0.013$ ). Nous pouvons émettre certaines hypothèses pour expliquer cela : soit ASAQ possède une activité prophylactique postthérapeutique meilleure par rapport à AL soit par notre mode d'administration du traitement (administration non supervisée) AL a été mal accepté par les enfants (compliance) ou que l'adsorption du AL soit mal réalisée. En effet certains auteurs soutiennent que l'absorption digestive de AL est favorisée par les matières grasses. Mais ces résultats comparés à ceux d'une autre étude conduite par Bihoun *et al.* (Données non encore publiées) dans la même localité au même moment ne révèlent pas une différence dans les taux d'échecs thérapeutiques malgré que le mode d'administration était différente [32]. En effet toutes les doses étaient supervisées dans l'étude de Bihoun et l'administration de AL était accompagnée d'un verre de lait, contrairement à notre étude. Ce constat est en contradiction avec l'idée d'absorption digestive de AL favorisée par les matières grasses. L'état nutritionnel, les conditions d'hygiène, le niveau d'infection microbienne etc agissant sur le système immunitaire pourraient être les facteurs responsables de ce constat.

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus en 2006 par Zongo *et al.* dans la région de Bobo-Dioulasso après 28 jours de suivi [20]. Par contre au Congo [33] et en Tanzanie [23] Van den Broek *et al* et Martenson *et al* ont rapporté des taux d'échecs thérapeutiques non corrigés par la PCR plus faibles dans le groupe AL que dans le groupe ASAQ. En effet au Congo ces taux étaient respectivement de 13% et 32% ( $P<0,05$ ) pour AL et ASAQ. Une résistance plus élevée à l'Amodiaquine dans cette zone pourrait expliquer cette différence de résultats.

Après la correction des résultats par la PCR, au cours des 28 jours de suivi, nous avons noté des taux d'échecs thérapeutiques similaires dans les deux groupes de traitement. Ces taux étaient

respectivement de 9,09% et 9,64% pour AL et ASAQ. Notons ici la chute spectaculaire de l'échec thérapeutique après correction à la PCR (de 53% à 9,09% pour AL). Cela est dû au fait que les échecs obtenus avant la PCR incluent ceux dus aux nouvelles infections et ceux dus aux recrudescences alors que les échecs après la PCR ne prennent en compte uniquement que ceux dus aux recrudescences. La similarité des taux d'échecs dans les deux groupes pourrait s'expliquer par le fait qu'ils possèdent les mêmes modes d'action.

Nos résultats corroborent ceux de Robin *et al* qui avaient obtenu après la correction par la PCR des taux d'échecs thérapeutiques similaires de 11,7% pour AL et 8,3% pour ASAQ au Ghana en 2008 [31]. Cependant, au Nigeria Falade *et al* ont rapporté des taux d'échecs de 0% pour AL et 1,6% pour ASAQ [25]. Au Mali, Abdoulaye *et al* ont rapporté également des taux d'échecs 1,7% pour AL en 2008. Ces différences observées par Falade *et al* et Abdoulaye *et al* avec nos résultats pourraient s'expliquer par le mode d'administration du traitement et/ou par la variabilité géographique de la résistance à l'amodiaquine et à la luméfantine.

Au jour 42, avant la correction des résultats à la PCR, nous avons noté des taux d'échecs similaires dans les deux groupes de traitements. A l'opposé, après la correction des résultats par la PCR, nous avons noté des taux d'échecs thérapeutiques plus élevés chez les patients traités avec de l'ASAQ (17,46%) que ceux traités avec AL (10,30%). Cette différence était statistiquement significative ( $P=0,039$ ). Nos résultats indiquent que lorsque nous atteignons 42 jours de suivi, il y a plus de recrudescences que de nouvelles infections dans le groupe des patients traités avec de l'ASAQ comparativement au groupe des patients traités avec du AL. Deux hypothèses peuvent nous aider à justifier ce constat :

- Premièrement AL a toujours été vendu sous forme Co-formulée : combinaison pharmaceutique conseillée car bithérapeutique et favorise moins l'émergence des parasites résistants du fait de l'effet synergique des deux composés. [38]

- Deuxièmement l'ASAQ a été vendue d'abord sous forme monothérapeutique, Artésunate et Amodiaquine séparément. Cela aurait dû entraîner l'émergence des parasites résistants. Cet état de fait est accentué par le fait que l'Amodiaquine, molécule partenaire à cette combinaison a une formule chimique proche de la Chloroquine dont plusieurs auteurs ont rapporté des résistances croisées. Ces résultats corroborent ceux obtenus à Bobo par Issaka *et al.*, qui ont rapporté des taux d'échecs thérapeutiques de 7% pour AL au jour 42[20].

### V.3. De la prévalence des différents allèles du *Pfmdr-1* et *Pfcr1*

Cette étude nous a permis de déterminer les prévalences des mutations sur l'ensemble des trois points du *Pfmdr-1* et sur la position 76 du *Pfcr1*.

Les prévalences de 100% d'allèles sauvages obtenus au niveau des positions 1034 et 1042 du gène *Pfmdr-1*, indiquent la rareté de ces allèles mutants (1034C et 1042D) au sein de la population plasmodiale étudiée à Nanoro. Ces résultats sont semblables à ceux rapportés par d'autres auteurs qui ont également noté l'absence de ces 2 mutations [11 ; 13 ; 20 ; 21].

Sur les positions 86 ; 184 et 1246 du *Pfmdr-1* et la position 76 du *Pfcr1*, nous avons observé des allèles mutants. Cependant, les résultats montrent une prédominance des souches sauvages par rapport aux souches mutantes sauf au niveau du *Pfcr1* K76T où la prévalence de l'allèle mutant 76T dépassait celle de l'allèle sauvage K76. Cette mutation étant impliquée dans la résistance à la chloroquine sa forte prévalence serait due à l'usage de la chloroquine depuis des dizaines d'années dans cette zone. En effet depuis plusieurs années la chloroquine fut largement utilisée et de façon intensive au Burkina Faso pour la prise en charge du paludisme. Cette pression de la chloroquine sur les parasites aurait entraîné une sélection des parasites résistants d'où l'élévation de la prévalence de cette mutation. Au Burkina Faso depuis 2005 les textes réglementant le traitement du paludisme interdisent l'usage de la chloroquine. En dépit de cette interdiction le maintien du haut niveau de prévalence de cette mutation a plusieurs raisons : les populations continuent toujours d'utiliser cette molécule pour traiter leur paludisme du fait qu'elle soit disponible et moins chère dans les marchés illicites ; la résistance croisée entre la chloroquine et l'Amodiaquine au sein du *Plasmodium* et enfin l'expansion des parasites ayant acquis des gènes de résistances.

Ce fort taux de prévalence été aussi obtenu par Tinto et al en 2005 lors d'une étude menée dans trois (3) villages différents dans la partie Ouest du Burkina Faso.

Dans d'autres régions du monde en Angola par exemple, une étude a rapporté des taux de prévalence du *Pfcr1* de 93.9% pour l'allèle sauvage K76 ; 5.7% pour l'allèle mutant 76T et 0.4% pour les infections mixtes [9]. Ces résultats différents des nôtres pourraient s'expliquer par la fluctuation dans le temps et l'espace du phénomène des mutations impliquées dans la résistance des antipaludiques de *Plasmodium falciparum*.

Pour les mutations ponctuelles N86Y et Y184F, nous avons obtenu des taux de prévalence 25,76% pour l'allèle mutant 86Y et 47,66% pour l'allèle mutant 184F. Ces taux de prévalence sont supérieurs à ceux habituellement obtenus en Afrique de l'Ouest. En effet il a été démontré lors des cultures *in vitro* et des études *in vivo* que ces mutations subissent des sélections en fonction de la nature de l'antipaludique utilisé et de l'intensité de sa pression et aussi en fonction de la diversité des parasites circulant dans la zone. [13]. Ceci pourrait expliquer cette variation de la prévalence de ces allèles mutants

### V.3. De l'impact du traitement sur la prévalence des allèles.

Lors de cette étude, des allèles du gène *Pfmdr1* et du gène *Pfcr1* K76T ont servi d'outils pour observer l'impact du traitement à l'ASAQ ou à AL chez des enfants atteints de paludisme simple à Nanoro.

Nos résultats démontrent qu'il y a une sélection des allèles D1246, 1246Y du gène *Pfmdr1* et des allèles K76, 76T du gène *Pfcr1* dans le groupe de traitement à l'ASAQ. En effet nous remarquons une accumulation significative des allèles mutants 1246Y du *Pfmdr1* et 76T du *Pfcr1* au détriment des allèles sauvages (D1246 et K76) correspondants. Nous avons montré plus haut qu'il y avait plus de parasites résistants lors des échecs thérapeutiques dans le groupe des patients traités avec de l'ASAQ que ceux traités avec AL. La conclusion dont nous pouvons tirer de ces constats est que la combinaison ASAQ exerce un effet électif sur les parasites portant les allèles mutants 1246Y et 76T des gènes *Pfmdr1* et *Pfcr1*.

Par ailleurs, le traitement des patients avec AL a révélé une augmentation significative de l'allèle sauvage 86N et une diminution de l'allèle mutant 86Y sur la position 86 du *Pfmdr1*. Quelques tentatives d'explications à cette sélection d'allèle :

Premièrement selon les cultures *in vitro* si les parasites portant l'allèle sauvage 86N sont soumis à une pression médicamenteuse notamment à la Chloroquine, ils acquièrent une meilleure capacité de survie (adaptation) lorsque cette pression est supprimée [39]. Cette situation est vérifiée ici car la chloroquine a été retirée du marché depuis 2005.

Deuxièmement lors du traitement aux ACTs, l'exposition prolongée des parasites provenant du foie à la Luméfantrine ou à l'Amodiaquine après la clairance de l'artémisinine peut sélectionner des parasites portant ces allèles surtout lors des fortes parasitémies à J0.

Cet état de sélection des allèles du *Pfmdr1* N86Y a été également rapporté par Humphreys et *al* en 2008 en Tanzanie. En effet, dans l'étude de Humphreys et *al*, le taux de l'allèle mutant 86Y quittait de 52,1% à 74,1% de l'étape pré-traitement à l'étape post-traitement à AL. Cela a été aussi rapporté par Martenson lors d'une étude récente menée à Zanzibar où la prévalence de l'allèle augmentait de 15% au jour 0 à 41% au jour de l'échec.

Au terme de notre analyse, il est important de noter que les marqueurs de résistance D1246Y, K76T et N86Y sont ceux dont la surveillance permettrait de contrôler la résistance liée à l'ASAQ et à AL surtout que ces combinaisons ont été adoptées comme antipaludiques de premières intentions pour le traitement du paludisme simple au Burkina Faso.

#### IV.4. De l'Associations entre marqueurs moléculaires et recrudescences.

Nos résultats démontrent que lorsqu'un patient héberge des parasites avec l'allèle mutant 76T à l'inclusion il présente plus de risques de faire une recrudescence lorsqu'il est traité avec de l'ASAQ comparée à AL. La raison probable de cette situation pourrait être la suivante : il se peut que les parasites du *Plasmodium* portant cette mutation aient acquis certaines adaptations face aux molécules de l'ASAQ du fait de la résistance croisée entre la chloroquine et l'Amodiaquine [22, 9, 40]. Cet allèle 76T en association probable avec d'autres mutations peut conférer à ces parasites une résistance contre l'ASAQ d'où l'augmentation du facteur du risque d'une recrudescence chez les patients traités avec cette combinaison. Nos résultats suggèrent également une possible implication de la mutation 184F dans la survenue de la recrudescence lors du traitement à l'ASAQ.

La mutation 76T serait le principal médiateur de la résistance à la combinaison Artésunate-Amodiaquine au sein de la population de Nanoro. Des mutations additionnelles probablement permettraient de maintenir le fitness des parasites ayant la mutation 76T. En effet, de nos résultats il ressort que les patients ayant la double mutation 86Y/76T ont 12,12% de chance de faire une recrudescence et ceux ayant la triple mutation 86Y/76T/1246Y ont 100% de chance de faire une recrudescence. Alors on pourrait penser à une synergie d'action entre les différents points de mutation. Cela serait d'autant plus plausible qu'au cours de nos manipulations nous avons rencontré un patient dont le génotypage du *Pfmdr-1* et *Pfcr1* à J0 a révélé la présence de tous les allèles mutant étudiés. Ce patient présentait une goutte épaisse positive à J14 et la PCR montrait une recrudescence. Sous réserve qu'il s'agit d'un seul patient sur 330, compte tenu de la prévalence de ces trois mutations dans la zone l'association de ces allèles mutants chez un individu rendrait inefficace la combinaison ASAQ. On pourrait émettre l'hypothèse selon laquelle l'introduction de l'ASAQ dans les lignes de traitement du paludisme engendrerait une émergence rapide et exponentielle de la résistance contre cette molécule

## Conclusions

Au terme de cette étude, nous avons noté l'importance des deux gènes MSP1 et MSP2 dans l'interprétation des taux d'efficacité thérapeutique aux antipaludiques. Des taux d'échecs thérapeutiques de 17,46% pour ASAQ et 10,30% pour AL ont été obtenus.

Certains marqueurs de la chimiorésistance à l'instar de *Pfmdr-1* 86Y, *Pfmdr-1* 184F, *Pfmdr-1* 1246Y, *Pfcr1-1* K76T sont présents à des taux de prévalence respectifs de 25,76% ; 47,66% ; 5,1% ; et 53,93%. Ceci dénote de l'importance d'une surveillance du phénomène de la chimiorésistance du *Plasmodium falciparum* dans cette localité. Sur les positions 1034 et 1042 du *Pfmdr-1*, aucune mutation n'a été mise en évidence.

Notre travail révèle également une relation évidente entre les allèles étudiées et la recrudescence en fonction des traitements reçus notamment les allèles 76T, 184F, les haplotypes 86Y/76T et 86Y/76T/11246Y était associées à la recrudescence à l'ASAQ.

Cette étude a permis d'établir la sélection des allèles D1246Y; K76T par la combinaison ASAQ notamment la diminution des allèles sauvages D1246 et K76 et l'augmentation des allèles mutants 1246Y et 76T. Cependant, lors du traitement à la combinaison AL, il n'a pas été établi de relation entre les marqueurs de résistance, mais une sélection des allèles du gène *Pfmdr*N86Y a été mis en évidence.

## Perspectives

Au vu des taux de prévalence des mutations, des sélections d'allèles mutants et de l'association de certains allèles mutants et la recrudescence à Nanoro, l'un des 3 faciès épidémiologiques du paludisme au Burkina Faso, il serait judicieux d'étendre cette étude sur l'ensemble du territoire afin d'obtenir des données représentatives du pays pour ces deux combinaisons ASAQ et AL.

Il nous parait aussi important de pérenniser ces types d'études afin de maintenir une surveillance permanente des marqueurs de résistance liés aux différentes combinaisons des ACT adoptées pour la prise en charge du paludisme simple.

## Bibliographie

1. **Adjuik M., Agnamey P., Babiker A.** Amodiaquine-artésunate versus Amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomised, multicentre trial. *Lancet*. 2002; 359: 1365-72.
2. **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.
3. **Bray P.G, Ward S.A.** A comparison of the phenomenology and genetics of multidrug resistance in cancer cells and quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacolther*, 1998; 77: 170-79.
4. **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).
5. **Christian Dokomajilar, Samuel L. Nsoba, Bryian Greenhouse, Philip J. Rosenthal, and Grant Dorsey.** Selection of *Plasmodium falciparum* *Pfmdr* Alleles following Therapy with Artemeter-Lumefantrine in an Area of Uganda where Malaria is Highly Endemic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50: 1893-5.
6. **Christian Dokomajilar, Zambende Moise Lankoande, Grant Dorsey, Issaka Zongo, Jean Bosco Ouedraogo, and Philip J. Rosenthal.** Roles of specific *Plasmodium falciparum* mutations in resistance to Amodiaquine and Sulfadoxine-Pyrimethamine in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75(1) : 162-5
7. **Christin Sisowath, Ines Petersen M. Isabel Veiga, Andreas Martensson, Zul Premji, Anders Bjorkman David A. Fidock, and Jose P. Gil.** In vivo selection of *Plasmodium falciparum* parasites carrying the chloroquine-susceptible *Pfprt* K76 allele after treatment with Artemether-Lumefantrine in Africa. *The Journal of Infections Disease* 2009: (199) 750-7
8. **Diourtey A., Djimde O. , Doumbo K., Sagara I., Coulibaly Y., Dicko A., Diallo M., Diakite M., Cortese J. F., and Plowe C.V.** 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: 475-78.
9. **Duraisingh, M.,T., Drakely, C.J., Muller, O., Bailey, R., Snounou, G. Target, G. A. Greenwood, B.M., Warhurst, D., C.,.** Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *Pfmdr* gene of *Plasmodium falciparum* by Chloroquine and Amodiaquine. *Parasitology*, 1997; 114, 2
10. **Edrahim G J.** Resistance to antimalarials. *Journal of tropical Pediatrics*. 2002; 48 (4) 192-3
11. **F. de Monbrison, D. Raynaud, C. Latour-Fondanaiche, C. Angei, K. Kaisier, F. Peyron, S. Picot.** Détection des marqueurs moléculaires de la résistance de *Plasmodium falciparum*. *Pathologie Biologie*. 2003; 51 : 528-33.
12. **Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, et al.** Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 1990; 345: 255-8.
13. **G. S. Humpheys, I. Merinopoulos, J. Ahmed, C. J. M. Whitty, T. K. Mutabingwa, C. J. Sutherland, and R. L. Hallett.**2007. Amodiaquine and Artemeter-Lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* gene in Tanzania children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Mars 2007; 51 (3): 991-7

14. Halidou Tinto, Boroma Sanou, Jean-Claude Dujardin, Jean Bosco Ouédraogo, Chantal Van Overmeir, Annette Erhart, Eric van Marck, Tinga Robert Guiguemde, and Umberto D'Alessandro. Short Report: Usefulness of the *Plasmodium falciparum* Chloroquine resistance transporter T76 genotype failure index for the estimation of *in vivo* chloroquine resistance reistance in Burkina faso. *Am. J. Med. Hyg.* 2005; 73(1): 171-3
15. Halidou Tinto, J.B. Ouedraogo, A. Erhart, Van C. Overmeir, J.C. Dujardin, Van Marck E., T.R. Guiguemde and U. D. Alessandro. Relationship between the *Pfprt* T76 and the *Pfmdr1* Y86 mutations in *Plasmodium falciparum* and *in vitro/in vivo* chloroquine reistance in Burkina Faso, West Africa. *Infection, Genetics and Evolution.* 2003; 34: 287- 92.
16. Halidou Tinto, Jean Bosco Ouedraogo, Maminata Traoré, Tinga Rober Guiguemdé. Attitude à propos de la résistance parasitologique de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques. *Cahiers d'études et de recherches francophones/ Santé.* Avril-Mai- Juin 2004 ; Vol 14 ; n° 2, 69-73, Synthèse.
17. Halidou Tinto, Lougué Guekoun, Issaka Zongo, Robert Tinga Guigemdé, Umberto D'Alessandro and Jean Bosco Ouédraogo. Chloroquine-reistance molecular markers (*Pfprt* T76 and *Pfmdr1* Y86) and amodiaquine resistance in BurKina Faso. *Tropical Medicine and International Health.* 2008; 13: 238-40.
18. Hastings I. M. A model for the origins and spread of drug-resistant malaria. *Parasitology,* 1997; 115: 133- 41.
19. Hastings I.M., W.M. Watkins and N.J. White. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination health life. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London Ser. B,* 2002; 357: 505-19
20. Issaka Zongo, Grant Dorsey, Noel Rouamba, Christian Dokomajilar, Yves Séré , Philip J. Rosenthal, and Jean Bosco Ouédraogo. Randomized Comparison of Amodiaquine plus Sulfadoxine-Pyrimethamine, Artemether-Lumefantrine, and Dihydroartemisinin-Piperaquine for the Treatment of Uncomplicated *Plasmodium* Clinical Infectious Diseases. 2007; 45:1453–61
21. J. Ursing, S. Zakeri, J.P. Gil, A. Björkman. Quinoline resistance associated polymorphism in the *pfprt*, *pfmdr1* and *pfmpr* genes of *Plasmodium* in Iran. *Acta Tropic.* 2006; 97: 352-56
22. Le Bras J., Andrieu B., Hatin I., Savel J., Coulau J. P. *Plasmodium falciparum* : Interprétation du semi-microtest de chimiosensibilité *in vitro* par incorporation de 3 hypoxanthine. *Pathologic Biology.* 1984; 32: 463- 66.
23. Martenson A, Stomberg J, Sisowath C, Mwinyi I, Msellem J, Gil P et al Efficacy of Artesunate plus Amodiaquine versus that of Artemeter-Lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania. *Clinical Infections diseases.* 2005; 41(8): 1079-86
24. 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(1): 238-240.
25. O. Falade, A. O. Ogundele, B. O. Yusuf, O. G. Ademowo, and S. M. Ladipo. High efficacy of two artemisinin-based combinations (artemether–lumefantrine and artesunate plus amodiaquine) for acute uncomplicated malaria in Ibadan, Nigeria. *Tropical Medicine and International Health.* May 2008; 13 (5): 635–43.

26. OMS : Relevé épidémiologique hebdomadaire de l'OMS, 1997; n°36 :269-74; n°38 :285-90.
27. **Payne D.** Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*? *Parasitology Today*, 1988; 4: 112-15.
28. **Plowe C.V., A. Djimde, 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: 565–68.
29. **Povoa M., Adagu I.S., Oliveira S.G., Machado R.L.D., Miles M.A. and Warhurst D.C,** *Pfmdr1* Asn1042Asp1246Tyr Polymorphisms, Thought to Be Associated with Chloroquine Resistance, Are Present in Chloroquine-Resistant and -Sensitive Brazilian Field Isolates of *Plasmodium falciparum*. *Experimental Parasitology*.1998;88: 64-68
30. **Reed M. B., Saliba K. J., Caruana S. R., Kirk K. and Cowman A. F.** Pgh1 modulates sensibility and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 2000; 403: 906- 09.
31. **Robin Kobbe, Philipp Klein1, Samuel Adjei,, Solomon Amemasor, William Nana Thompson, Hanna Heidemann1, Maja V. Nielsen1, Julia Vohwinkell1, Benedikt Hogan1, Benno Kreuels1, Martina Bührlen, Wibke Loag, Daniel Ansong, Jürgen May.** A randomized trial on effectiveness of artemether-lumefantrine *versus* artesunate plus amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian children. *Malaria Journal*. 2008; 7: 261.
32. **Thèse de Médecine présentée le 07 mai 2009 à l'UFR/SDS Université de Ouagadougou par Bihoun Biebo** Etude comparée de l'efficacité de la combinaison Arthemether-Lumefantrine versus Artesunate-Amodiaquine dans le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* chez les enfants de 6 à 59 mois à Nanoro (Burkina Faso).
33. **Van den Broek I, Kitz C, AI Attas S,Libama F, Balasegaram M, Guthmann JP.** Efficacy of tree combinations therapies for the treatment of uncomplicated *plasmodium falciparum* malaria in the republic of Congo. *Malaria Journal*. 2006; 24 ; 5: 113
34. **Wernsdorfer W.H.** Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica* 1994; 56:143-56
35. **White N.** Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London Ser. B*. 1999; 354: 739-49.
36. **WHO:** Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria, 2003.
37. **World Health Organisation,** Resistance of malaria parasites to drugs. WHO. *Technical Report. +Ser.* 1965; 296:1-6
38. **Christin Sisowath, Pedro E. Ferreira, Leyla Y. Bustamante, Sabina Dahlström, Andreas Martensson Anders Bjorkman1, Sanjeev Krishna and Jose' P. Gill1.** The role of *Pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. *Tropical Medicine and International Health*. 2007; 12 : 736-42.
39. **Hayward, R., K. J. Saliba, and K. Kirk.** 2005. *Pfmdr1* mutations associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **55**:1285–1295.

40. **Gabrielle Holmgren, Jose´ P. Gil, Pedro M. Ferreira Maria I. Veiga, Charles O. Obonyo, Anders Bjorkman.** 2006. Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of pfcr1 76T and pfmdr1 86Y. *Infection, Genetics and Evolution* 6 (2006) 309–314