

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la recherche scientifique

République du Mali

Un Peuple- Un But- Une Foi

UNIVERSITE DE BAMAKO

Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Année Universitaire 2010 - 2011

Thèse N° /..... /

TITRE

**CHIMIOSENSIBILITE DE *Plasmodium falciparum*
A LA SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE (SP) PLUS
AMODIAQUINE (AQ) DANS LE CADRE DU
TRAITEMENT PREVENTIF INTERMITTENT A LA SP
PLUS AQ CHEZ LES ENFANTS A DJOLIBA, SIBY ET
OUELESSEBOUGOU, CERCLE KATI, MALI.**

THESE

**Présentée et soutenue publiquement le 26/02/2011 à 12
heures devant la Faculté de Médecine de Pharmacie et
d'Odonto-Stomatologie du Mali**

**Par Monsieur *Almahamoudou MAHAMAR*
Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(DIPLOME D'ETAT)**

Jury

Président :

Professeur Amagana DOLO

Membres:

Docteur Issaka SAGARA

Docteur Sékou BAH

Directeur :

Professeur Alassane DICKO

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

A mon père MAHAMAR ABDOU

Cher père vous avez toujours été une miséricorde de Dieu sur nous, vous nous conseillez toujours l'amour du prophète Mohamed (Paix et salut sur lui) et la soumission à ALLAH. Vos conseils continuent de nous éclairer la route de la vie et ton soutien permanent nous donne l'espoir. Qu'ALLAH te donne une longue vie, qu'IL te pardonne dans ce monde ici bas et à l'au-delà, Qu'IL soit satisfait de toi le jour des comptes ! Amen.

A ma mère Feue BALKISSA BAZI

La mort t'a arrachée cruellement à l'affection des tiens. Ton sens élevé de l'honneur et de l'humanisme, ton amour pour le prochain, ta générosité, ton courage, ton affection, sont encore source d'encouragement pour nous. Tes enfants sont fiers de toi maman. Dors en paix et que Dieu notre seigneur t'accorde son paradis. Amen !

A ma grand-mère Feue WOYO GALLAH

La mort t'a arrachée au moment où ce travail tendait vers sa fin. Me voir pharmacien a longtemps été ton souhait. Mon désir était de partager avec toi ces instants de bonheur qui sont le résultat des efforts et des sacrifices que tu as consentis pour moi, mais DIEU le TOUT PUISSANT en a décidé autrement. Chère MAMI, puisse ce travail te faire plaisir dans ta dernière demeure.

A ma tante ADIJATOU ABDOU

Après le décès de notre maman vous n'avez pas hésité une seconde pour vous installer à nos cotés. Vous avez veillé constamment sur nous. Ce travail est le fruit de vos sacrifices.

A mes frères et sœurs TATA, COUMBA, AICHA, ALIETOU, ABDOURHAMANE, YEHIA, ZALIHA, AHAMADOU, ZAKIR, ABOUBACAR, OUMAR.

Unis depuis la naissance, nous le demeurerons inch-ALLAH car notre fraternité est à l'abri de toutes les intempéries. Unis pour le meilleur et le pire nous sommes condamné à œuvrer main dans la main pour soulever haut et fort le flambeau de notre famille. Ce travail est le fruit de notre fraternité. Que Dieu nous bénisse et nous guide vers le droit chemin ; Amen !

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent :

A ALLAH

Le Tout Puissant, Le Tout Miséricordieux, de m'avoir donné la santé et le courage de venir à bout de ce travail. Que sa bénédiction et sa protection soient sur nous tous. Amen !

A notre PROPHETE MOHAMED (Paix et salut sur toi, à toute ta famille, tous tes compagnons, amen). Q'ALLAH nous guide vers le droit chemin et qu'il vous récompense pour votre endurance et votre mission de messager bien réussie ; amen.

A la fondation Bill et Melinda GATES

A mon cousin Mahamoud BABY Dit DEMO, merci cousin.

A mes oncles paternels et maternels Mahamoud Zouber, Yehia, Idrissa, Haddou, Yorohouna Seydi Bazi, Hamma, Yora, Attahir Hachimi, Bakara, Hamady Kowa, Seydi Sidibé, Bouba Gaoukoyé...

A mes tantes paternelles et maternelles, Atta Abdou, Zaliha, Zarha, Fatta Bazi, Hawa, Zeynaba, Ichata, Salma, Aminta Morou, Nachibo, Aicha Hachimi, Hawlata, Zeinaba Bello, Fatta Zindakoira, Kissa Moussa, Aicha Bazi.

A mon grand-père Mohamed Gallah DICKO, papi merci pour ton soutien.

A mon Cousin Ahamadou Houna SIDIBE

A mon père Hamady YOROHOUNA

A mon oncle Mahamadou BELLO, merci hassaï

A mon cousin Mohamed Assaliha BONCANA, merci cousin,

A mon oncle feu Abacar SIDIBE,

A mon cousin Moussa IRKONANANE

Cher cousin, vous qui avez conduit mes premiers pas à l'école, vous avez toujours été soucieux de l'avenir de tous les enfants de notre famille. Votre soutien moral et matériel n'a jamais fait défaut. Puisse ce travail vous apporte toute la satisfaction.

A mon ami Jama HERSI et à tous nos collaborateurs du NIH, Michal Fried, Patrick, Alemush Imeru, Connor, thanks you

Au Pr Alassane DICKO, les mots me manquent pour exprimer tout le bien que nous pensons de vous. Plus qu'un maître, vous êtes un père protecteur. Veuillez retrouver ici cher maître toute ma reconnaissance. Qu'Allah le tout puissant vous protège. Amen

Au Pr Amagana DOLO, cher maître, votre sympathie, votre modestie, votre ouverture, votre disponibilité, votre souci du travail bien fait, votre assiduité et votre cordialité font de vous une personne qu'on ne peut s'empêcher d'admirer ; merci

A mes cousins, Dr Halidou, Mohamed Houna, Ibrahim Moussa, Mohamed Sidda, Abdramane Zouber, Salihou, Dickokachia, Ibrahim Boncane, Vigilance.

A mes cousines, Kissa Houna, Ammou, Zeynaba, Kissa Yehia, Aicha Boncana, Fatoumata Zouber, Mariama Abouba, Haja Adama, Nima, haoua Cheho, Alkoubra

A mes grands frères et petits frères, Mohamed Zouber, Alpha Alhassane, Abdoulaye haddou, Lamine Samba, yehia seydi, Nafa, Halidou Maiga, Ahamadou Acheha.

A mes grandes sœurs et petites sœurs, Nina, Namissa, Aichetou, Nana Sidibé, Fatoumata Cheho

A mes nièces et neveux, Abba, Djeli, Alhazo, Lamine yehia, Nana Demo, Hajara Ibrahim, Oumar Dembo, Hamidou Hamma, Dijo Salihou, Fati Zibilila, Icheta Abacar, Safiatou,

A Messieurs Sagaidou Mohamed Lamine, Abdourhamne A Dicko, Hilaria, merci

Au Dr Abdoulbaki Ibrahim DIALLO, vous avez été pour moi un grand frère, vous avez été d'un grand apport dans l'élaboration de ce travail. Merci pour votre franche collaboration et votre disponibilité.

Aux Docteurs Mahamadou Ibrahima dit NDiaye, Abdoulaye Yohorouna, Mohamad Ibrahim Baby, merci pour tout.

A mes aînés du DEAP, Dr Sidibé Y, Yahia Dicko, Antoine Dara, Amadou Barry, Niawanlou Dara, Moussa Diakité, Halimatou Diawara, Gaoussou Santara, Souleymane Diarra, votre collaboration, votre enthousiasme et vos conseils ont été précieux dans l'élaboration de ce travail. Permettez moi de vous exprimer ici ma profonde gratitude et de mon indéfectible respect.

A mes amis et collègues internes du DEAP, Bouran Sidibé, Djibril Traoré, Mohamed Lamine, Gogo Kontao. Je vous dis courage et persévérance pour ceux d'entre vous qui n'ont pas terminé, et j'adresse mes félicitations à ceux qui viennent de soutenir.

Au personnel de Research Lab, Oumar, Kadidia, Kanouté, Bacary Diarra, merci pour votre soutien constant.

Au personnel de GLP Lab, Dr Agnes, Diakité, Dembélé, Sintri, Sekouba, merci pour votre franche collaboration

Au personnel du SEREFO, Dr Sarro, Dr Bassirou, Dr Almoustaph, Dr Fatim DAOU, Dr AAO, Mr KONE B, Mme Keita Mariam

A mes Camarades de l'école fondamentale de Boya, de Menaka et de Saneye B à Gao,

A mes amis et complices, Sylvestre TOGO, Moussa Goita, Siddi Ahamadou, Soumba Keita, Ibrahim Dicko, Tenessé Saye, Ahamadou Samba, Aichetou Maiga, Julien Ouoleguem, Aliou Maiga, Norma Sangaré, Abdel-Aziz Baby, Hadeye Abacar, Benjamin Sanogo, Bengué, Peter, en réalité vous êtes à la fois des amis et des frères pour moi. Chers amis, c'est l'occasion pour moi de vous témoigner toute ma sympathie.

A la 2^{ème} Promotion du Numerus clausus, Phamahome

A la 2^{ème} Promotion du lycée Soundjata Keita

A tous les militants du groupe Allure,

A tous les militants de l'ARG,

A toute la génération ALKAALEY,

A tous les militants et sympathisants de Gaakassiney,

Aux informaticiens du DEAP/MRTC: Sidy Soumaré, Moussa Bagayogo, Diallo Amadou, Amara Dicko, Salimata, Mady, Ismaël, Saye, Balakissa, Issa Ba

Au personnel administratif de la FMPOS, aux chauffeurs, aux manœuvres, aux gardiens, merci pour votre sympathie.

Aux guides et aux populations de Djoliba, Siby et Ouelessebougou merci pour votre disponibilité et votre pleine participation à l'étude.

A tous mes enseignants depuis l'école primaire, merci pour la formation que vous m'avez donnée.

En fin à tous ceux que j'aurai omis de remercier ici, je les prie de bien vouloir m'en excuser.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

Professeur AMAGANA DOLO

PhD en parasitologie

Professeur de parasitologie à la Faculté de Médecine de pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Chef de DER des Sciences Fondamentales à la FMPOS.

Cher maître,

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de ce modeste travail. Nous avons beaucoup admiré vos qualités humaines, scientifiques et pédagogiques. Votre discrétion et votre dynamisme puis votre disponibilité constante font de vous un maître exemplaire, admiré de tous. Permettez-nous cher maître de vous réitérer, l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible disponibilité.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Docteur Issaka Sagara,

Médecin chercheur au MRTC/DEAP/FMPOS et Biostatisticien

Cher maître,

C'est le lieu de vous remercier pour votre modestie, votre disponibilité constante, vos qualités scientifiques et pédagogiques, votre esprit d'équipe et votre rigueur pour le travail bien fait qui font de vous un maître apprécié. Permettez nous cher maître de vous adresser l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Docteur SEKOU BAH

Maitre assistant de pharmacologie à la FMPOS

Pharmacologue à la pharmacie hospitalière du CHU du pt G.

Membre du comité technique de pharmacovigilance du ministère de la santé.

La qualité de votre enseignement et la valeur de vos connaissances ont tout le temps suscité notre admiration. Votre discrétion, votre dynamisme, votre disponibilité constante font de vous un maître exemplaire, admiré de tous. Permettez-nous cher maître de vous réitérer, l'expression de notre profonde gratitude et de notre profond respect.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

Professeur ALASSANE A DICKO

Maître de conférences en santé publique

Chef de l'Unité d'épidémiologie, Biostatistique et gestion des données au MRTC/DEAP/FMPOS

Cher maitre,

Vous m'avez fait honneur en m'acceptant dans votre équipe. Au cours de l'élaboration de ce travail nous avons apprécié vos hautes qualités scientifiques et surtout humaines. Vous nous avez séduit par votre esprit d'équipe, votre endurance, votre persévérance, votre amour du travail bien fait et surtout votre patience. Cher Professeur, trouvez ici le témoignage de notre profonde gratitude et l'assurance de notre indéfectible attachement.

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AQ	Amodiaquine
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CSCOM	Centre de Santé Communautaire
CSRéf	Centre de Santé de Référence
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
DEAP	Département d'épidémiologie des affections parasitaires
DHFR	Dihydrofolate réductase
DHPS	Dihydroptéroate synthétase
FM	Frottis Mince
FMPOS	Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
GE	Goutte Epaisse
Pt G	Point G
ID	Numéro d'indentification du participant
MII	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticides
<i>m</i> sp2	Mérozoite Surface protein-2
MRTC	Malaria Research and Training Center
OptiMal-IT	OptiMal-Individual Test
OMS/WHO	Organisation Mondiale de la Santé/World Health Organization
pb	paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEV	Programme Elargi de Vaccination
<i>Pf</i> crt	<i>Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter</i>
<i>Pf</i> mdr1	<i>Plasmodium falciparum multi drug resistance 1</i>
pH	Potentiel d'hydrogène
PLDH	<i>Plasmodium</i> Lactate déshydrogénase
RGPH	Recensement Général de la Population et de l'Habitat
RN	Route Nationale
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
SLIS	Système Local d'Information Sanitaire
SP	Sulfadoxine-Pyriméthamine

TDR	Test de Diagnostic Rapide
TPI	Traitement Préventif Intermittent
VIH	Virus de l'Immunodéficience humaine

SOMMAIRE

	Pages
1. INTRODUCTION.....	019
2. OBJECTIFS.....	021
2.1 Objectif général.....	021
2.2 Objectifs spécifiques.....	021
3. GENERALITES.....	022
3.1 Biologie des espèces plasmodiales.....	022
3.1.1 Schizogonie ou multiplication asexuée chez l'homme.....	022
❖ Schizogonie hépatique ou exo érythrocytaire.....	022
❖ Schizogonie érythrocytaire ou endocytaire.....	022
3.1.2 Sporogonie ou multiplication sexuée chez l'anophèle.....	023
3.2 Les antipaludiques	026
- Les schizonticides érythrocytaires.....	026
❖ Les amino-4-quinoléines.....	026
❖ Les amino-alcools.....	026
❖ Les antifolates.....	027
❖ Les antibiotiques.....	028
❖ Les dérivés de l'artémisinine.....	028
- Les schizonticides hépatiques.....	028
❖ Les amino-8-quinoléines.....	028
❖ Certains antimétabolites.....	029
Les combinaisons thérapeutiques antipaludiques.....	029
3.3 Les produits de l'étude	030
➤ <i>la sulfadoxine-pyriméthamine.....</i>	<i>030</i>
➤ <i>l'amodiaquine</i>	<i>031</i>
3.4 La résistance aux antipaludiques.....	031
3.4.1 Répartition mondiale de la résistance.....	031
3.4.2 Evaluation de la résistance.....	032
3.5 Pharmacodynamique des amino-quinoléines, des antifolates	

et la sélection de la résistance	034
- les amino-quinoléines.....	034
- les antifoliques.....	035
- les sulfamides et sulfones.....	035
3.6 Rappel sur l'essai du TPI en 2008	036
4. METHODOLOGIE	038
4.1 Lieux d'étude	038
🚧 Djoliba	038
🚧 Siby	039
🚧 Oueléssébougou.....	040
4.2 Type d'étude	042
4.3 Période d'étude	042
4.4 Taille de l'échantillon	042
4.5 Population d'étude	043
4.6 Critères d'éligibilité	043
4.6.1 Pour la détermination des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à l'AQ.....	043
4.6.2 Pour l'évaluation de l'efficacité de la SP+AQ.....	043
4.7 Organisation pratique du travail au sein des villages	044
4.8 Techniques et matériels utilisés pour la récolte des données	046
4.8.1 Evaluation clinique.....	046
4.8.2 Techniques biologiques.....	047
4.9 Critères de jugement	071
4.10 Méthodes de gestion et analyse des données	071
4.11 Considérations d'éthiques	072
5. RESULTATS	073
5.1 Marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et l'AQ	073
5.1.1 <i>Caractéristiques de base des sujets inclus dans les enquêtes transversales pour la détermination des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et l'AQ</i>	073

5.1.2	<i>Fréquence des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et l'AQ au cours de l'enquête de base (avant intervention TPI).....</i>	<i>074</i>
5.1.3	<i>Fréquence des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et l'AQ au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI.....</i>	<i>075</i>
5.1.4	<i>Comparaison des fréquences des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et à l'AQ avant et après intervention.....</i>	<i>082</i>
5.2	Réponse <i>in vivo</i> de <i>P. falciparum</i> à la combinaison SP + AQ.....	087
5.2.1	<i>Caractéristiques des sujets inclus dans l'étude.....</i>	<i>087</i>
6.	COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	088
6.1	<i>Au plan méthodologique.....</i>	<i>088</i>
6.2	<i>Au plan des résultats</i>	<i>088</i>
7.	CONCLUSIONS.....	091
8.	RECOMMANDATIONS	092
	➤ <i>Aux chercheurs</i>	<i>092</i>
	➤ <i>Aux autorités sanitaires et au PNLN</i>	<i>092</i>
	➤ <i>Aux prescripteurs.....</i>	<i>092</i>
	➤ <i>Aux dispensateurs.....</i>	<i>092</i>
	➤ <i>A la population.....</i>	<i>092</i>
9.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	093
10.	FICHE SIGNALÉTIQUE.....	098

TABLEAUX

Tableau 01 : Fréquence de la mutation dhfr 51 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008.....	075
Tableau 02 : Fréquence de la mutation dhfr 59 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008.....	076
Tableau 03 : Fréquence de la mutation dhfr 108 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008.....	076
Tableau 04 : Fréquence de la mutation dhps 437 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008.....	077
Tableau 05 : Fréquence de la mutation dhps 540 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008.....	077
Tableau 06 : Fréquence de la mutation triple dhfr en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008.....	078
Tableau 07 : Fréquence de la quadruple mutation en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008.....	079
Tableau 08 : Fréquence de la quintuple mutation en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008.....	080

Tableau 09 : Fréquence de la mutation <i>Pfcr</i> t-76 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008.....	080
Tableau 10 : Fréquence de la mutation <i>Pfmd</i> r1-86 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008.....	081
Tableau 11 : Fréquence de la mutation <i>dhfr</i> 51 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.....	082
Tableau 12 : Fréquence de la mutation <i>dhfr</i> 59 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.....	082
Tableau 13 : Fréquence de la mutation <i>dhfr</i> 108 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.....	083
Tableau 14 : Fréquence de la mutation <i>dhps</i> 437 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.....	083
Tableau 15 : Fréquence de la mutation <i>dhps</i> 540 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.....	084
Tableau 16 : Fréquence de la mutation triple <i>dhfr</i> avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.....	085
Tableau 17 : Fréquence de la quadruple mutation (triple <i>dhfr</i> + <i>dhps</i> 437) avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.....	085
Tableau 18 : Fréquence de la mutation <i>Pfcr</i> t-76 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.....	086
Tableau 19 : Fréquence de la mutation <i>Pfmd</i> r1-86 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.....	086

FIGURES

Figure 1 : Cycle de développement du <i>Plasmodium</i>025
Figure 2 : Technique d'étalement pour la confection du frottis mince.....	050
Figure 3 : Technique lecture d'une lame.....	052
Figure 4 : Matériel nécessaire pour réaliser un test d'OptiMAL-IT.....	053
Figure 5 : Mode opératoire et interprétation des résultats du test OptiMAL-IT.....	056
Figure 6 : Préparation du spot de sang sur papier filtre.....	059
Figure 7 : Piqûre du doigt avec un vaccinostyle en vue de la préparation d'un spot de sang.....	059
Figure 8 : Photographie de gel d'agarose à 2% de la technique de mutations spécifiques (MS-PCR) du codon 59 du gène <i>Pfdhfr</i>	070
Figure 9 : Fréquences des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et AQ au cours de l'enquête de base en Aout 2008.....	074
Figure 10 : Evolution de la proportion des enfants porteurs de formes asexuées de <i>P. falciparum</i> du jour 0 au jour 28 de suivi après traitement en Novembre –Décembre 2009.....	087

1. INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à la présence et au développement dans le foie puis dans les hématies d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Il est transmis par la piqûre infestante du moustique femelle du genre *Anopheles*.

Selon l'estimation de l'OMS, la moitié de la population mondiale est à risque de contracter le paludisme. En 2008, on estime à près de 243 millions le nombre annuel de cas de paludisme dans le monde pour la plupart chez les enfants de moins de cinq ans qui restent de loin les plus exposés au risque de décès par paludisme avec 863 000 décès par an [1].

Le Rapport mondial 2009 de l'Organisation Mondiale de la Santé sur le paludisme à la base des données de 2008, indique que le paludisme est endémique dans 108 pays, dont 45 sont situés dans la Région africaine. Entre 30 et 50% des admissions hospitalières, 50% des consultations externes et 13 à 50% des absences scolaires pour des raisons médicales sont dues au paludisme dans les zones d'endémie palustres [3, 4].

Les conséquences économiques du paludisme touchent surtout l'Afrique subsaharienne où la maladie frappe les bras valides en période de travaux champêtres [2]. Ce qui fait de cette maladie un véritable fléau qui freine le développement du continent. La réduction de la productivité par l'arrêt de travail occasionné par le paludisme est estimée à 1,3% de croissance économique avec une perte annuelle de 12 milliards de dollars du produit intérieur brut pour la seule Afrique [3].

Au Mali, le paludisme occupe la première place parmi les motifs de consultation dans les services de santé avec 37,35% pour la population générale [5]. Il est la cause la plus fréquente des admissions dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré représentant 44,9% des admissions, suivi par les infections respiratoires aiguës (26,4%) et les diarrhées(11,2%) [6]. Le nombre de cas de paludisme recensé dans les formations sanitaires publiques a été estimé à 1 291 853 en 2007 dont 238 324 cas de paludisme grave (soit 18% des cas de

paludisme). Cette situation ne reflète pas la réalité car la couverture sanitaire n'est que de 58% dans un rayon de 5 km et 79% dans un rayon de 15 km en 2007 [5]. Le paludisme maladie représentait 33,8 % de l'ensemble des consultations à Nossoumbougou et 26,9 % de l'ensemble des consultations à Didiéni [7]. Les proportions de cas de paludisme étaient plus élevées chez les sujets de classe d'âge les plus jeunes avec un maximum de 60,7 % chez les sujets des classes d'âge de 2-4 ans à Nossoumbougou et de 50,3 % chez les mêmes classes d'âge à Didiéni.

Le traitement préventif intermittent (TPI) est une nouvelle stratégie très prometteuse de lutte contre le paludisme. Le TPI à la sulfadoxine-pyriméthamine a été testé et adopté comme politique de prévention chez les enfants femmes enceintes, largement utilisé en Afrique subsaharienne [8]. Des études plus récentes ont montré que la stratégie est très efficace contre la survenue des épisodes d'accès palustres et l'anémie avec des réductions de 30% et 10% chez les nourrissons quand elle est donnée avec les vaccins du PEV [9]. Des réductions plus importantes sont obtenues quand la stratégie est donnée (chez les enfants y compris les plus âgés) pendant la saison de transmission [10, 11]. SP plus AQ s'est révélée comme la combinaison la plus efficace en TPI chez les enfants pendant la saison de transmission [12]. Une des inquiétudes majeures du TPI pour l'utilisation à cette stratégie est la possibilité de développer rapidement de la résistance des parasites aux médicaments utilisés. Dans le cadre d'une large étude du TPI chez les enfants, nous avons voulu évalué l'effet de la stratégie sur la résistance des parasites aux médicaments utilisés.

2. OBJECTIFS

2.1 Objectif Général

Evaluer les réponses *in vivo* et moléculaires de *P. falciparum* à la SP et à l'AQ dans le cadre du TPI à la SP plus AQ chez les enfants à Djoliba, Siby et Ouelessebouyou, cercle Kati.

2.2 Objectifs Spécifiques :

- Comparer les fréquences des mutations des gènes dhfr 51, 59 et 108, et dhps 437, 540 associés à la résistance de *P. falciparum* à la SP avant et après le TPI avec SP +AQ chez les enfants de moins 5 ans dans les 3 localités.
- Comparer les fréquences des mutations des gènes PfCRT-76 et PfMDR1-86 associés à la résistance de *P. falciparum* à l'AQ avant et après le TPI avec SP +AQ chez les enfants de moins 5 ans dans les 3 localités.
- Comparer les fréquences des mutations des gènes dhfr 51, 59 and 108, et dhps 437, 540 associés à la résistance de *P. falciparum* à la SP chez les enfants qui ont reçu le TPI avec SP +AQ et ceux qui ne l'ont pas reçu dans les 3 localités.
- Comparer les fréquences des mutations des gènes PfCRT-76 et PfMDR1-86 à la résistance de *P. falciparum* à l'AQ chez les enfants qui ont reçu le TPI avec SP +AQ et ceux qui ne l'ont pas reçu dans les 3 localités.
- Déterminer la fréquence des réponses *in vivo* de *P. falciparum* à la combinaison SP +AQ dans les 3 localités.

3. GENERALITES

3.1 Biologie des espèces plasmodiales [13]

Cycle biologique

Les recherches entreprises ces dernières années, pour la mise sur le marché de nouveaux médicaments et les essais de mise au point d'un vaccin antipaludique, ont considérablement enrichi la connaissance de la biologie du parasite et ont mis en évidence la complexité des relations entre le parasite et ses hôtes. Les plasmodies sont des protozoaires intracellulaires dixènes. Leur cycle biologique est complexe et se déroule chez deux hôtes : l'Anophèle femelle (hôte intermédiaire chez qui on observe le cycle sporogonique) et l'Homme (hôte définitif chez lequel se déroule le cycle schizogonique asexué).

3.1.1 Schizogonie ou multiplication asexuée chez l'Homme

❖ *Schizogonie hépatique ou exo érythrocytaire*

Au cours de son repas sanguin, un moustique infesté injecte dans un capillaire des sporozoïtes, formes infestantes contenues dans ses glandes salivaires. Ces sporozoïtes transitent dans les capillaires sanguins pour gagner le foie et pénètrent dans les hépatocytes. Leur développement et leur multiplication repoussent en périphérie le noyau de la cellule et finit par constituer une masse multinucléée appelée schizonte ou corps bleu. La cellule éclate, libère de nombreux mérozoïtes. Certains parasites restent quiescents dans l'hépatocyte, sans se transformer en corps bleu (hypnozoïtes). Après un temps variable, génétiquement déterminé, ces hypnozoïtes entrent en division. Ce phénomène n'existe que chez les espèces *P. vivax* et *P. ovale*, expliquant les accès de reviviscence schizogonique tardifs.

❖ *Schizogonie érythrocytaire ou endocytaire*

Les mérozoïtes libérés gagnent la circulation sanguine, pénètrent par endocytose dans une hématie et deviennent chacun un trophozoïte. Les merozoïtes présentent une affinité pour tous les globules rouges, quel que soit leur stade. Le processus de pénétration du mérozoïte à l'intérieur de l'hématie se fait en trois étapes : la reconnaissance, la réorientation ou l'adaptation conformationnelle du

mérozoïte au globule rouge et la pénétration qui s'accompagne de la libération du contenu des organites apicaux du mérozoïte (rhoptries et micronèmes). Celui-ci se développe, grossit et son noyau se divise. Il en résulte un schizonte, qui se charge progressivement d'un pigment spécifique d'origine parasitaire, l'hémozoïne ou pigment malarique. La multiplication des noyaux forme dans l'hématie un corps en rosace. Parallèlement, apparaissent dans l'hématie selon l'espèce plasmodiale en cause, des granulations de Schüffner (*P. vivax*, *P. ovale*), des tâches de Maurer (*P. falciparum*) ou des ponctuations de Ziemann (*P. malariae*). Le corps en rosace, dilaté et mûr, éclate ; cet éclatement est contemporain de l'accès thermique clinique. L'hémozoïne libérée est phagocytée par des leucocytes polynucléaires ou mononucléaires qui deviennent mélanifères. Ils déversent cette charge pigmentaire dans les tissus, au niveau des cellules du système monocyte-macrophage (cellules de Küpffer du foie et histiocytes de la rate). Les mérozoïtes libérés vont parasiter une nouvelle hématie et poursuivre le cycle intra-érythrocytaire. Chaque cycle schizogonique dure 48 heures chez *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum* (fièvre tierce) ou 72 heures chez *P. malariae* (fièvre quarte). Ce cycle intra-érythrocytaire est responsable de la pathologie liée au paludisme.

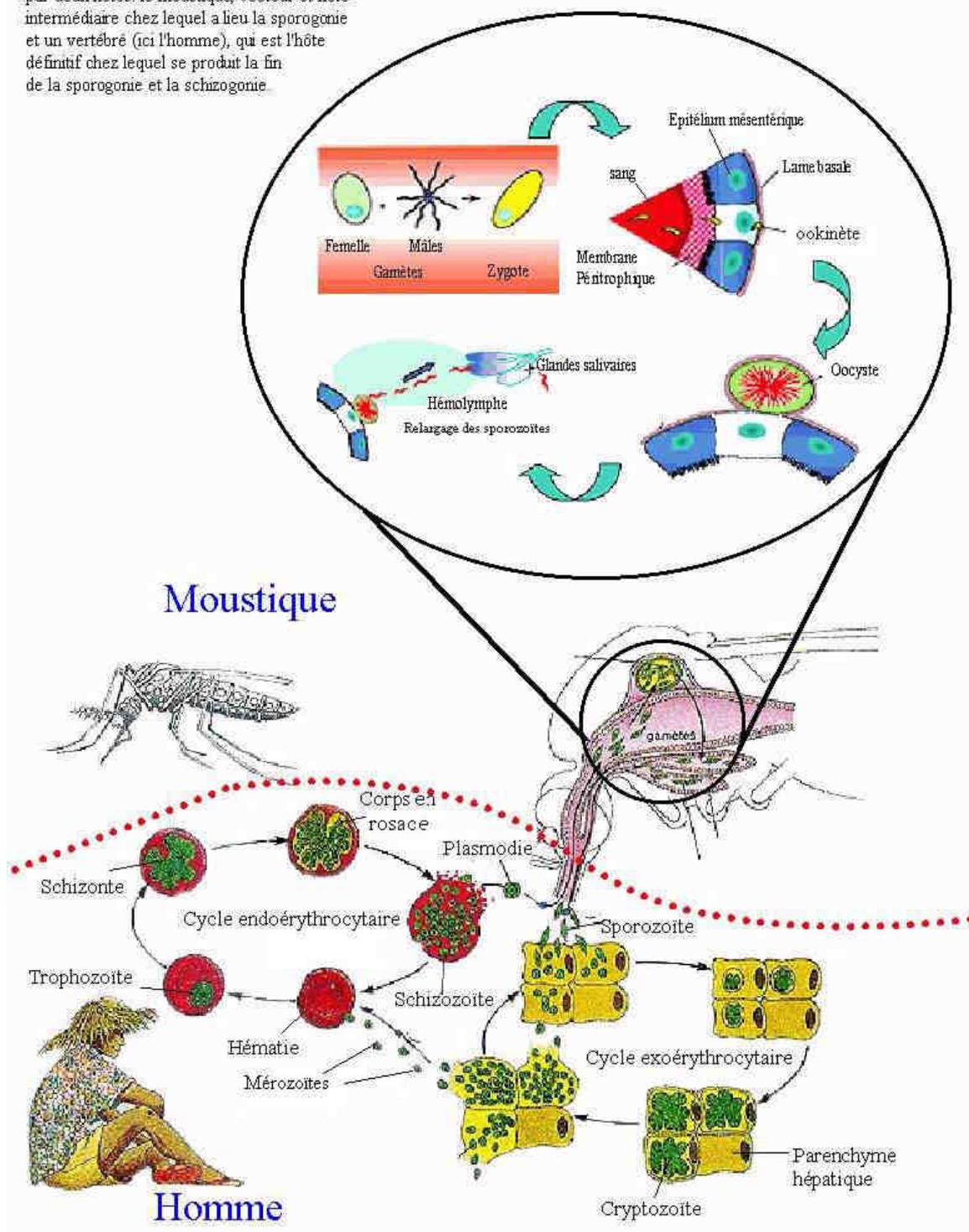
3.1.2 Sporogonie ou multiplication sexuée chez l'anophèle

Après une piqûre sur un paludéen, l'anophèle femelle absorbe toutes les formes sexuées et asexuées (des schizontes, des corps en rosace, des gamétocytes) du parasite. Les éléments asexués sont digérés et seuls les gamétocytes ingérés poursuivent le cycle. Les gamétocytes absorbés, à potentiel sexuel mâle ou femelle parviennent dans l'estomac du moustique. Le gamétocyte mâle se transforme en gamète par exflagellation et le gamétocyte femelle par expulsion du corpuscule chromatinien. Cette exflagellation ne se produit pas dans l'organisme humain, mais peut être obtenue dans le sang humain mis entre lame et lamelle, et grâce à des modifications physico-chimiques. La fécondation du gamète femelle (gamogonie) donne un œuf mobile, encore appelé ookinète ; cet œuf s'implante sous la paroi de l'estomac du moustique en formant l'oocyste, dans lequel, par division, s'individualisent les sporozoïtes (sporogonie). Comme au cours des processus précédents, c'est l'éclatement de la cellule hôte ou de l'oocyste formé

qui libère les éléments mobiles. Ces sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique : à partir de ce réservoir, ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infestante. Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule en 10 à 40 jours, selon la température extérieure et les espèces en cause.

Fig : 1 Cycle de développement du *Plasmodium*
(D'après Ghosh et al. , 2000).

Au cours de son développement, le *Plasmodium* passe par deux hôtes: le moustique, vecteur et hôte intermédiaire chez lequel a lieu la sporogonie et un vertébré (ici l'homme), qui est l'hôte définitif chez lequel se produit la fin de la sporogonie et la schizogonie.



3.2 Les antipaludiques

Définition

Un antipaludique est un produit naturel ou de synthèse pouvant être administré par voie orale, parentérale ou rectale, à dose unique ou répétée, et qui permet de détruire le *Plasmodium* ou de bloquer sa croissance afin de prévenir ou de guérir le paludisme [13].

Classification

Tous les antipaludiques, à l'exception de la quinine et des dérivés de l'artémisinine qui sont des produits naturels ou semi-synthétiques, sont des produits de synthèse. Les antipaludiques peuvent être gamétocytocides ou schizontocides. Nous distinguons les schizontocides érythrocytaires et les schizontocides hépatiques [14, 15].

- **Les schizontocides érythrocytaires**

❖ **Les amino-4-quinoléines:**

Les molécules principales sont la chloroquine et l'amodiaquine

- La chloroquine :

dosée à 100 mg de base de diphosphate de chloroquine (Nivaquine®), et 300 mg de base (nivaquine forte®).

Resochin® et Aralen dosés à 150 mg de base de diphosphate de chloroquine. Il y a le sirop pour enfant dosé à 25 mg de base par cuillère mesure, ainsi que la forme injectable dosée à 100 mg de base pour 5 ml.

Le traitement est de 3 jours : 10 mg/kg/jour deux jours de suite (sans dépasser 600 mg/jour), 5 mg/kg le troisième jour. Cet antipaludique est le moins cher, mais son efficacité est compromise du fait de la chimiorésistance croissante.

- L'amodiaquine :

C'est la flavoquine® ou Camoquin®, il s'agit de comprimés jaunes dosés à 200 mg de base de chlorhydrate d'amodiaquine.

Chez les enfants, le sirop est dosé à 50 mg de base pour 5 ml.

❖ **Les amino-alcools:**

Cette catégorie comprend :

- La quinine :

qui se présente sous forme de comprimé à base de chlorhydrate ou de sulfate de quinine (Quinine lafran[®], Quinimax[®]) ; d'ampoule injectable à base de dichlorhydrate de quinine (paluject[®]), de formiate de quinine (quiniforme[®]), de gluconate de quinine (Quinimax[®]).

La posologie est de 25 à 30 mg/kg/jour. La forme injectable est le traitement de choix dans le paludisme grave.

- L'halofantrine :

il se présente sous de comprimés dosés à 250 mg (Halfan[®]). Le traitement comporte 3 doses à 8 mg/kg/jour toutes les 6 heures.

Il est conseillé de renouveler la cure 7 jours plus tard pour éviter la rechute.

- La luméfantrine
- La méfloquine :

il s'agit de comprimés dosés à 250 mg (Lariam[®], Méphaquin[®]). La posologie est de 25 mg/kg en trois prises séparées de 8 h.

❖ **Les antifolates :**

Ce sont les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique. On distingue les antifoliques et les antifoliniques.

Les antifoliques :

Cette catégorie comprend les sulfamides et les sulfones. Ils inhibent la transformation de l'acide para-amino-benzoïque dont l'hématozoaire a besoin pour sa croissance en bloquant l'activité de la synthétase de l'acide dihydrofolique. Nous avons ainsi les sulfamides à longue durée d'action telles la *sulfadoxine* (Fanazil[®]) et la *sulfamethopyrazine* (Sulfalène[®]) ; la DDS (diaminodiphénylsulfone : Disulone[®] ou Dapsone[®]) sulfone à action rapide.

En fait, les antifoliques ne sont pas employés isolément mais en association aux antifoliniques. L'association la plus connue la sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar[®]).

Les antifoliniques : Il s'agit des *diguanydes* dont le plus connu est le chlorhydrate de *proguanil* (Paludrine[®], Chlorhyguane[®]) et des *diaminopyrimidines* dont la *pyriméthamine* (Malocide[®]) et le *triméthoprime*. Ce sont des inhibiteurs de la réductase de l'acide dihydrofolique.

❖ **Les antibiotiques**

Les cyclines (doxycycline 200 à 400 mg/jour) sont faiblement et lentement schizonticides. On les associe à la quinine pendant 10 jours dans les régions où la sensibilité à *P. falciparum* à cet antipaludique a diminué. La clindamycine est également schizonticide.

❖ **L'hydroxynaphtoquinone**

Nous avons l'atovaquone qui inhibe le transport des électrons dans la mitochondrie, donc la synthèse d'ATP.

❖ **Les dérivés de l'artémisinine**

L'artémisinine est une lactone sesquiterpène endoperoxide. Les principaux dérivés sont :

- l'artémeter
- l'artesunate
- l'artéether
- le dihydroartémisinine

Ils possèdent la plus grande rapidité d'action ; l'artesunate par exemple réduit le nombre de *Plasmodium* d'environ 10^4 par cycle asexué [16]. Ils sont bien tolérés, le risque de neurotoxicité démontré en expérimentation animale à des doses élevées n'a pas été rencontré chez l'homme aux doses thérapeutiques [17].

– **Les schizontocides hépatiques:**

❖ **Les amino-8-quinoléines**

- La primaquine®, les comprimés sont sous forme de diphosphate de primaquine dosés à 7,5 mg de base. La dose préconisée chez l'adulte est de 15 mg/jour pendant 14 jours ou 45 mg une fois par semaine pendant 8 semaines.

- Pamaquine
- Pentaquine
- plasmocide
- Tafénoquine est un dérivé synthétique de la primaquine qui a les mêmes qualités et une demi-vie beaucoup plus longue (14 jours).

❖ **Certains antimétabolites**

- Proguanil
- Cyclines

Combinaisons thérapeutiques antipaludiques [18].

Définition : selon l’OMS une combinaison thérapeutique d’antipaludiques est l’usage simultané de 2 ou plusieurs schizonticides ayant des modes d’actions et des cibles biochimiques différents au niveau du parasite.

Il ya deux sortes de combinaisons:

- une combinaison libre, il s’agit de la co-administration simultanée de deux médicaments distincts
- une combinaison fixe, il s’agit de la co-formulation de deux principes actifs dans une même forme galénique.

Comme combinaisons thérapeutiques d’antipaludiques recommandées l’OMS, nous pouvons citer

❖ **Combinaisons à base d’artémisinine**

Artesunate + chloroquine

Artesunate + amodiaquine

Artesunate + sulfadoxine-pyriméthamine

Artesunate + mefloquine

Artesunate + sulfamethoxyypyrazine-pyriméthamine

Arthémeter + lumefantrine

❖ **Combinaisons thérapeutiques sans artémisinine**

Chloroquine+sulfadoxine-pyriméthamine

Amodiaquine + sulfadoxine-pyriméthamine

Sulfadoxine-pyriméthamine + méfloquine: FANSIMEF® (utilisé en Asie du sud-est).

Atovaquone + proguanil: (MALARONE®)

Quinine + doxycycline

Chloroquine + proguanil: SAVARINE® (utilisée en chimioprophylaxie seulement).

Au Mali les options thérapeutiques actuellement retenues par le PNLP sont :

- Artemether - luméfantrine ;
- Artesunate - amodiaquine

La stratégie nationale de lutte contre le paludisme au Mali est multi sectorielle avec l'implication des communautés, de la société civile, du secteur privé et des partenaires au développement.

3.3 Produits de l'étude

➤ La sulfadoxine-pyriméthamine

La pyriméthamine est une antifolinique d'action lente. L'action antiplasmodiale est potentialisée par l'association avec la sulfadoxine, sulfamide à action prolongée. Les deux donc agissent en synergie comme inhibiteurs enzymatiques pour bloquer la synthèse des nucléotides du parasite aux différents niveaux de synthèse. La pyriméthamine administrée en raison de 25 mg per os est bien absorbée, les concentrations plasmatiques d'environ 200 mg/ml sont atteintes entre 2 et 6 heures. Environ 80-90% sont aux protéines plasmatiques. Elle est principalement métabolisée dans le foie et lentement excrétée par voie urinaire, avec une demi-vie d'élimination d'environ 4 jours. Une étude menée sur les sujets impaludés, suite à une administration de 1 g et 50 mg de sulfadoxine et pyriméthamine respectivement, et de 650 mg/8h de quinine, les concentrations se situant entre 300 et 600 µg/L ont été observées pendant au moins deux semaines et l'élimination pendant au moins un mois après la prise. Cela fait qu'on l'administre en dose unique. Les effets secondaires dont les réactions cutanées, la toxicité hématologique (leucopénie, agranulocytose, thrombopénie...), des cas de toxicité hépatique avec ictère, toxicité respiratoire, ont été signalées [19, 20]. Etant des inhibiteurs de l'acide folinique, la prudence s'impose chez les malades carencés en cet acide ou traités aux médicaments susceptibles de diminuer l'acide folinique, le cas entre autre des anticonvulsivants, du trimethoprim... Aussi chez les enfants il pourrait provoquer l'ictère suite à l'immaturité de leur système enzymatique. A doses élevées, la combinaison peut-être mortelle, avec des symptômes tels que des céphalées, anorexie, nausées, vomissements, excitation et éventuellement des

convulsions et des anomalies hématologiques.

➤ **L'amodiaquine**

Cette molécule est de la famille des 4-aminoquinoléines, elle existe sous forme de sel de chlorure. Elle est absorbée dans le tractus gastro-intestinal, transformée en un métabolite actif la déséthylamodiaquine. Les effets secondaires hépatiques et une grande incidence d'agranulocytose, ont été rapportés. Administrée à une grande dose, il a été rapporté qu'elle peut provoquer des effets dont la syncope, la spasticité et des convulsions [21]. Suite à ces effets et la résistance qui s'était avérée, l'amodiaquine avait été abandonnée. Cependant, récemment les études ont montré que l'association amodiaquine et sulfadoxine/pyriméthamine aboutissait à de meilleurs résultats cliniques et parasitologiques que ceux obtenus une fois administrés séparément [22, 23, 24]. L'amodiaquine, possède un effet fébrifuge rapide que la sulfadoxine/pyriméthamine, son action contre la parasitemie est identique à celle de la SP du moins jusqu'au 7^{ème} jour. En association elles agissent en synergie, la sulfadoxine/pyriméthamine prolonge cette action de par un séjour plus long dans l'organisme du patient.

3.4 Résistance aux antipaludiques [16]

La résistance est apparue contre toutes les classes d'antipaludiques y compris l'artémisinine et ses dérivés. Cette résistance a augmenté la charge de morbidité mondiale due au paludisme et constitue une menace importante pour la lutte antipaludique. L'utilisation très répandue et sans discernement des antipaludiques exerce une forte pression de sélection sur les plasmodies qui développent alors des taux de résistance élevés. La résistance peut être évitée ou son apparition différée considérablement en associant des antipaludiques ayant différents mécanismes d'action et en garantissant des taux de guérison très élevés grâce à une compliance totale aux bons schémas thérapeutiques.

3.4.1 Répartition mondiale de la résistance

Une résistance aux antipaludiques a été documentée pour *P. falciparum*, *P. vivax* et plus récemment *P. malariae*. Chez *P. falciparum*, la résistance a été observée contre pratiquement tous les antipaludiques actuellement utilisés

(amodiaquine, chloroquine, mefloquine, quinine et sulfadoxine-pyriméthamine), y compris l'artémisinine et ses dérivés [25, 26, 27]. Sa répartition géographique et sa vitesse de propagation ont montré des variations considérables.

3.4.2 Evaluation de la résistance

On dispose des méthodes suivantes pour évaluer la résistance aux antipaludiques.

✓ évaluation *in vivo* de l'efficacité thérapeutique

La méthode de référence de diagnostic et de surveillance des résistances est donc le test *in vivo* de l'OMS développé en 1965 et révisé en 1967, en 1972, en 1996 et enfin en 2001 [28]. Leur confirmation exige la preuve 1) que les parasites sont recrudescents chez un patient qui a récemment reçu le traitement à dose adaptée et 2) que la concentration sanguine efficace du médicament ou de ses métabolites actifs a été maintenue pour au moins quatre cycles parasitaires [28]. En effet, des résistances apparentes peuvent en fait être dues à des différences interindividuelles de pharmacocinétique des antipaludiques testés. C'est le cas par exemple de l'atovaquone, la méfloquine, l'halofantrine et la luméfántrine. Les tests *in vivo* consistent à administrer une dose standard d'antipaludique à des malades infectés par *P. falciparum* et à suivre pendant au moins 28 jours la disparition des manifestations cliniques et de la parasitémie. Les principales limitations des tests *in vivo* sont leur dépendance à 1) l'observance thérapeutique, la posologie et la qualité des médicaments qui doivent normalement être strictement contrôlées au cours des essais, 2) les variations interindividuelles de pharmacocinétique (absorption, élimination, biotransformation-métabolisme du médicament absorbé, prise simultanée d'aliments), 3) l'immunité naturellement acquise des individus qui biaise les résultats vers une meilleure efficacité thérapeutique, 4) l'état nutritionnel du patient qui influence très souvent la pharmacocinétique de l'antipaludique et 5) la sensibilité et la spécificité du diagnostic parasitologique des rechutes ou de l'absence de clairance parasitaire ainsi que de la distinction entre véritable rechute et nouvelle infection. Les tests *in vivo* impliquent le suivi prolongé d'individus (≥ 28 jours) et donc une logistique importante et des

ressources humaines qualifiées pour ce type d'étude clinique. Ils ne permettent de tester qu'un seul médicament par individu et qu'un petit nombre de médicaments par étude.

✓ **études *in vitro* de la sensibilité des plasmodies aux médicaments, en culture**

Les tests *in vitro* (i.e. inhibition de la croissance des parasites en culture par des concentrations déterminées d'antipaludiques) permettent d'étudier simultanément la sensibilité de *P. falciparum* à plusieurs antipaludiques en faisant abstraction des facteurs liés au patient comme l'immunité naturellement acquise, l'état nutritionnel, l'observance du traitement et la pharmacocinétique de l'antipaludique. Ils sont cependant chers et complexes à mettre en œuvre, ils nécessitent des infrastructures importantes, des personnels très qualifiés et spécialisés et nécessitent de plus de disposer des parasites vivants. Cela implique des délais brefs de réalisation après le prélèvement des souches et le respect de règles strictes de biosécurité. Par ailleurs, leurs résultats n'ont pas toujours été corrélés aux résultats des tests *in vivo* et ne sont pas toujours reproductibles d'une équipe à l'autre en raison de différences entre les techniques et les protocoles utilisés. Pour ces raisons, les tests *in vitro* sont utilisés pour la surveillance de la chimiosensibilité mais n'ont pas d'utilité en clinique.

✓ **génotypage moléculaire.**

Il s'agit des méthodes de génotypage (i.e. d'identification des variants génétiques) réalisées sur l'ADN du parasite. Ces méthodes ont profité de l'essor de la biologie moléculaire et de la connaissance récente du génome de *P. falciparum*. Il s'agit de chercher les modifications des gènes du parasite impliqués dans sa résistance aux antipaludiques. Parmi ces différents marqueurs moléculaires de résistance on peut citer : le Pfert, le Pfmdr1, le dhfr, le dhps etc.

3.5 Pharmacodynamie des amino-quinoléines, des antifolates et la sélection de la résistance [16].

Les événements génétiques qui confèrent la pharmacorésistance (tout en conservant la viabilité des plasmodies) sont spontanés et rares. On pense qu'ils sont indépendants du médicament. Les mécanismes de la résistance qui ont été décrits sont des mutations dans des gènes ou des modifications dans le nombre de copies des gènes en rapport avec la cible du médicament ou les mécanismes de transport membranaire qui modifient les concentrations intraplasmodiales du médicament. Un événement génétique unique peut suffire, ou il peut falloir de nombreux événements sans aucun lien (épistasis). Les souches de *P. falciparum* d'Asie du Sud-Est semblent avoir par nature une propension accrue à développer une pharmacorésistance.

Amino-quinoléines

La chloroquinorésistance peut être multigénique chez *P. falciparum* et est au début conférée par des mutations au niveau d'un gène codant pour un transporteur (PfCRT). Ce PfCRT peut être un canal anionique pompant la chloroquine hors de la vacuole nutritive. La mutation initiale, qui confère un niveau modéré de chloroquinorésistance, est le remplacement d'une lysine par une thréonine au niveau du codon 76. Les positions 72 à 76 sont essentielles pour la fixation de la déséthylamodiaquine (le métabolite biologiquement actif de l'amodiaquine) et du vérapamil (qui peut inverser la chloroquinorésistance *in vitro*). Onze autres mutations du PfCRT ont été décrites à ce jour. Ces mutations supplémentaires peuvent jouer un rôle dans la résistance aux amino-quinoléines, bien que les mécanismes précis par lesquels elles agissent n'ont pas encore été élucidés. La résistance à l'amodiaquine est liée à la chloroquinorésistance, mais n'est pas bien caractérisée. En présence de mutations du PfCRT, des mutations ponctuelles dans un deuxième transporteur (le PfMDR1) modulent le degré de résistance de *P. falciparum in vitro*. Les plasmodies qui sont hautement résistantes à la chloroquine ont souvent les mutations Lys76Thr dans le PfCRT et Asn86Tyr dans le PfMDR. Le rôle des mutations du PfMDR1 dans la détermination de la réponse thérapeutique après traitement par la chloroquine ou l'amodiaquine n'est toujours pas élucidé.

Antifoliques

Pour les antifoliques (pyriméthamine et biguanides : cycloguanil et chlorcycloguanil, les métabolites actifs du proguanil et du chlorproguanil, respectivement) la résistance de *P. falciparum* et *P. vivax* résulte de l'acquisition séquentielle de mutations dans le gène (*dhfr*) codant pour la dihydrofolate réductase (DHFR). Chaque mutation confère une diminution progressive de la sensibilité. Chez *P. falciparum*, la mutation initiale est presque invariablement en position 108 (en général, sérine remplacée par l'asparagine), ce qui ne confère qu'une diminution d'un dixième de la sensibilité au médicament et ne modifie pas les réponses thérapeutiques à la sulfadoxine-pyriméthamine. Au début, cela a peu d'importance clinique, mais ensuite des mutations surviennent en position 51 et 59, conférant une résistance accrue aux médicaments contenant de la pyriméthamine. Les infestations par des mutants triples sont relativement résistantes, mais on observe en général une certaine réponse thérapeutique. L'acquisition d'une quatrième mutation en position 164 (remplacement de l'isoleucine par la leucine) rend les antifoliques disponibles complètement inefficaces [29]. Il est intéressant de constater que les mutations qui confèrent une résistance modérée à la pyriméthamine ne confèrent pas nécessairement une résistance au cycloguanil, et vice versa. Par exemple, des mutations en position 16 (valine plutôt qu'alanine) et 108 (thréonine plutôt que sérine) confèrent une résistance élevée au cycloguanil mais pas à la pyriméthamine. En général, les biguanides sont plus actifs que la pyriméthamine contre les mutants résistants (et ils sont plus efficaces en clinique également), mais n'agissent pas sur les plasmodies porteuses de la mutation DHFR en position 164.

Sulfamides et sulfones

La synergie marquée entre sulfamides et sulfones est très importante pour l'activité antipaludique des associations sulfa-pyriméthamine ou sulfonebiguanide. Chez *P. falciparum*, la résistance aux sulfamides et aux sulfones se développe également progressivement au fur et à mesure des mutations du gène codant pour l'enzyme cible, à savoir la PfDHPS (qui est une protéine bifonctionnelle avec l'enzyme PPPK). Des résidus d'acides aminés spécifiquement modifiés ont été retrouvés aux positions 436, 437, 540, 580 et

613 domaine de la PfDHPS. Les mutations en position 581 et 631 n'apparaissent pas isolément, mais toujours à la suite d'une mutation initiale (en général en position 437, la glycine remplaçant l'alanine).

3.6 Rappel sur l'essai du TPI en 2008 (Protocole de l'étude)

C'est un essai clinique, à randomisation individuelle, contrôlé avec placebo du TPI chez des enfants dormant sous des MII. L'étude s'est déroulée, d'août 2008 à novembre 2009, à Djoliba, Siby et Oueléssébougou dans le cercle de Kati au Mali. 3017 enfants de 3-59 mois, ne souffrant d'aucune maladie grave ou chronique et munis d'un consentement éclairé et signé par les parents/tuteurs, ont participé à l'étude. Les enfants enrôlés ont été traités avec des doses curatives de SP+AQ ou des doses équivalentes de placebos en 3 occasions séparées d'un mois d'intervalle pendant la saison de haute transmission c'est-à-dire août-Septembre-Octobre 2008. Le dosage des médicaments est basé sur le poids. L'amodiaquine était donnée à la dose de 70 mg, 140 mg et 220 mg pour les enfants de 5-9 kg ; 10-18 kg et ≥ 19 kg respectivement. Les doses correspondantes pour la sulfadoxine étaient de 175 mg, 350 mg et 550 mg et pour la pyriméthamine de 8,75 mg ; 17,5 mg et 26,25 mg. L'amodiaquine était administré en une prise par jour pendant 3 jours et SP en une prise par jour pendant 1 jour. Les médicaments sont fabriqués sous forme de comprimés contenant la dose exacte requise pour chaque groupe.

Un système de surveillance passif des épisodes de paludisme était mis en place dès le premier jour d'administration des médicaments et était maintenu jusqu'à la fin de l'étude. Des équipes de recherche du projet étaient postées dans les formations sanitaires fréquentées pour les enfants participant à l'étude. Dès qu'un enfant participant à l'étude se présente dans une des formations sanitaires sélectionnées ; la température axillaire était mesurée et un prélèvement de sang était effectué par piqûre à la pulpe du doigt en cas de fièvre (température axillaire $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$) ou un antécédent de fièvre dans les dernières 24 heures pour préparer une goutte épaisse/frottis et pour mesurer le taux d'hémoglobine. Un test de diagnostic rapide était également réalisé. Les cas de paludisme confirmé (TDR positif), sont traités immédiatement, conformément à la politique nationale

de traitement antipaludique du pays. Toutes les autres affections étaient aussi prises en charge.

A la fin chaque saison de haute de transmission du paludisme, une enquête transversale était réalisée. Un examen clinique était effectué chez chaque enfant, le poids et la taille étaient mesurés. Un prélèvement de sang après piqûre à la pulpe du doigt était effectué pour la GE/FM, la détermination du taux d'hémoglobine et sur papier filtre pour la détermination des marqueurs de résistance à la SP et à l'AQ.

4. METHODOLOGIE

4.1 Lieux d'étude

Notre étude a été réalisée dans les villages de Djoliba, Siby et Oueléssébougou dans le cercle de Kati au Mali.

Djoliba

Situation Le village de Djoliba se situe dans la zone géographique du Mandé à environ 55km de la ville historique du Mandé et environ 35km de la ville de Bamako (capitale du Mali). Il est traversé par la route Bamako-Kangaba. Djoliba est limité à 7km au Nord par Samayana, au Sud par Kirina à 3km, à l'Ouest par Dalakana 7km et à l'Est par le fleuve Niger à environ 2km.

Aspects climatiques et géographiques

Le relief est dominé par les plateaux de Kamalé à l'Ouest, prolongement du mont mandingue jusqu'à Koulikoro. Les plaines rizicoles sur la berge du fleuve Niger. La végétation est la savane arborée, elle est en voie de disparition avec la coupe abusive du bois pour l'utilisation domestique. Les aléas climatiques y jouent aussi un rôle important dans ce processus de dégradation, malgré cela beaucoup d'espèces existent : le karité (espèce dominante protégée), le néré, quelques baobab, caïcedrat et autres espèces utilisées en médecine traditionnelle.

Le climat est de type Soudano-Guinéen avec une alternance de deux saisons : une saison sèche et une saison de pluies.

- La saison sèche dure de Novembre en Mai. Elle se divise en une saison froide qui va de novembre en février et une saison chaude allant de mars en mai
- La saison de pluies dure de Juin à Octobre avec le maximum des précipitations en août-septembre avec des hauteurs de pluies atteignant 1500mm/an.

La transmission du paludisme dans cette zone est saisonnière et survient essentiellement pendant la saison des pluies.

Aspects socio-économiques

La population est estimée à 3.278 habitants (**RGPH 2009**). Elle composée en majorité par les malinkés vivant d'agriculture, de pêche, d'élevage et de commerce. L'islam est très répandu. L'architecture des habitations est composée des cases rondes, des maisons carrées en banco et en ciment couvertes en banco ou en tôle. Les ressources économiques, elles portent sur les produits de l'agriculture, de l'élevage, la pêche, le commerce et surtout l'exploitation du sable et de graviers.

Infrastructures

Au fil des ans, le village s'est développé et on assista à la création de l'école et du dispensaire en 1952, la maternité en 1965. En 2004 le dispensaire et la maternité sont érigés en CSCOM. Le CSCOM est dirigé par médecin.

Siby

Situation, le village de Siby est situé à environ 50 km à l'ouest de Bamako (capitale du Mali) sur la route nationale RN°5 (Bamako-Guinée Conakry). Le village de Siby a été fondé par Marignoumanifing Camara venu de Balé bien avant l'empire du Mali au 13^{ème} siècle.

Aspects climatiques et géographiques

Le relief, très accidenté, comprend une partie montagneuse (prolongement des Monts Mandingues), des plateaux et des plaines. Il n'existe pas de points d'eau permanents mais le village est divisé en deux par une rivière temporaire permettant l'évacuation des eaux de pluies. Aux alentours du village il existe deux points d'eau dans la montagne où l'eau coule pendant les 12 mois de l'année. La végétation est dominée par la savane herbeuse, on y trouve le *Khaya senegalensis* (le caïcedrat), *Parkia biglobosa* (le néré), *Adansonia digitata* (le baobab), *Butyrospermum parkii* (le karité), *Ceiba pentandra* (le kapokier), *Borassus aetioipium* (le rônier) etc. Il existe la forêt classée Wanda, classée patrimoine mondial. La faune est composée de lions, de panthères, de singes, de phacochères, de boas, d'hyènes, de biches, de lapins, de pintades, de reptiles, de perdrix, il ya le parc de Keniébaoulé. La gestion de la végétation est assurée par le service de la conservation de nature. Le climat est de type Soudano-

Guinéen avec une alternance de deux saisons : une saison sèche et une saison de pluies.

- La saison sèche dure de Novembre en Mai. Elle se divise en une saison froide qui va de novembre en février et une saison chaude allant de mars en mai
- La saison de pluies dure de Juin à Octobre avec le maximum des précipitations en août-septembre avec des hauteurs de pluies atteignant 1500mm/an.

La transmission du paludisme dans cette zone est saisonnière et survient essentiellement pendant la saison des pluies.

Aspects socio-économiques

Avec plus de 5600 habitants (enquête du district sanitaire de Kati en 2009), la population de Siby est composée de malinké (ethnie majoritaire), de peulh, de bambara, et des maures. La langue de communication est le bambara. Les principales religions pratiquées sont : l'islam, le christianisme, et l'animisme. L'islam est la religion dominante. L'architecture des habitations est composée des cases rondes, des maisons carrées en banco et en ciment couvertes en banco ou en tôle. Les ressources économiques portent sur les produits de l'agriculture de l'élevage, le commerce et surtout le tourisme. L'agriculture reste l'activité principale et est pratiquée par 80% à 90% de la population. Elle concerne les cultures de rente (arachides, pastèques et sésame) et les cultures vivrières (mil, sorgho, maïs, niébé, riz). L'arboriculture basée sur la production des mangues occupe une place importante dans l'économie.

Infrastructures

Le village possède un centre de santé communautaire (CSCOM) doté d'un médecin, deux infirmiers du premier cycle et une infirmière obstétricienne; 3 garderies d'enfants; 6 écoles fondamentales (dont 3 premiers cycles et 3 seconds cycles) fonctionnelles durant toute l'année scolaire; 1 lycée ; 1 Médersa ; 5 mosquées et 2 églises. La population dispose de plusieurs pompes à motricité

humaine et des forages alimentés par des plaques solaires. Notre étude s'est déroulée dans les locaux du centre de santé communautaire (CSCOM).

Ouelessebougou

Situation, le village est situé à 80 km au sud de Bamako sur la route nationale N°7

Aspects climatiques et géographiques

Le relief est très accidenté, il comprend une partie montagneuse, des plateaux et des plaines. C'est la savane herbeuse, on y trouve le karité, le néré, le baobab, le caïcedrat, le kapokier, le rônier etc. La faune est composée de lions, de panthères, de singes, de phacochères, de boas, d'hyènes, de biches, de lapins, de pintades, de reptiles, de perdrix. La gestion de la végétation est assurée par le service de la conservation de nature. Le climat est de type Soudano-Guinéen avec une alternance de deux saisons : une saison sèche et une saison de pluies.

- La saison sèche dure de Novembre en Mai. Elle se divise en une saison froide qui va de novembre en février et une saison chaude allant de mars en mai
- La saison de pluies dure de Juin à Octobre avec le maximum des précipitations en août-septembre avec des hauteurs de pluies atteignant 1500mm/an.

La transmission du paludisme dans cette zone est saisonnière et survient essentiellement pendant la saison des pluies.

Aspects socio-économiques

Le village compte environ une population de 10 589 habitants (**Enquête RGPH 2009**) ; une population composée surtout de Bambanans en majorité, de Koroko ou Marka, Peuls, Dogons etc. L'islam est pratiqué par la majorité de la population ensuite viennent le christianisme et l'animisme. L'architecture traditionnelle des habitations est composée des cases rondes, des maisons carrées en banco et en ciment couvertes en banco ou en tôle. Avec l'urbanisation croissante du village,

les maisons en ciment modernes à un ou deux niveaux prennent place à celles en banco.

Les ressources économiques portent sur les produits de l'agriculture de l'élevage, et surtout le commerce. Le trafic intense en toute saison par la RN7 vers Sikasso, la Côte d'Ivoire, le Ghana, le Nigeria, le Burkina et la Guinée, est très favorable au commerce. L'exode vers le monde extérieur est aussi un facteur important dans le changement.

Infrastructures

Le village compte un centre de santé de référence, un centre de santé communautaire, une clinique, deux officines de pharmacie, deux dépôts de vente de médicaments. Notre étude s'est déroulée dans les locaux du CSCOM. Le village compte onze écoles fondamentales dont six seconds cycles, deux garderies d'enfants et trois lycées dont un public.

4.2 Type d'étude

Il s'agit dans un premier temps de deux enquêtes transversales pour déterminer la fréquence des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à l'AQ en 2008 puis d'une étude d'observation effectuée en 2009 pour évaluer l'efficacité *in vivo* de la combinaison SP-AQ chez les enfants asymptomatiques impliqués dans l'essai clinique au TPI à la SP + AQ.

4.3 Période d'étude

La 1^{ère} enquête transversale s'était déroulée en Août 2008 au moment de l'inclusion des enfants dans l'essai du TPI ; la seconde a eu lieu en Novembre-Décembre 2008 à la fin de l'intervention du TPI. L'étude d'observation a eu lieu en Novembre-Décembre 2009 à la fin de la saison de haute transmission du paludisme.

4.4 Estimation de la taille de l'échantillon

La taille de l'échantillon pour la comparaison des fréquences des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* a été calculée sur la base de la fréquence attendue de la quadruple mutation (dhfr 51, 59 et 108 plus dhps 437) estimée à 20%. Pour détecter une augmentation à 40% avec une puissance de

80% et un seuil de signification de 5%, nous avons besoin de 80 sujets par groupe de traitement soit un total de 160 sujets. Pour l'étude de l'efficacité *in vivo* de SP+AQ, pour une efficacité à jour 28 attendue de 90% avec précision de 5% et un niveau de confiance de 95%, nous avons besoin de 139 sujets. Ces tailles ont été légèrement augmentées pour tenir compte des perdus de vue et échantillons non analysables.

4.5 Population d'étude

Est constituée par les enfants qui avaient 3 à 59 mois en Aout 2008 recensés dans les villages de Djoliba, Siby et Ouelessebougou dans le cercle de Kati.

4.6 Critères d'éligibilité

4.6.1 Pour la détermination des marqueurs moléculaires de résistance

- Etre âgé de 3 à 59 mois.
- Etre résident permanent de la zone d'étude sans projet de voyage pendant la période de l'étude.
- Consentement informé signé par les parents/tuteurs de l'enfant.
- Absence de maladie grave ou chronique qui pourrait affecter les résultats de l'essai (ex. malnutrition grave ou VIH/SIDA).
- Absence d'antécédents d'effets indésirables graves liés à la SP et à l'AQ.

4.6.2 Pour l'évaluation de l'efficacité de SP+AQ

- Age 3 – 59 mois au moment de l'enrôlement dans l'essai du TPI en 2008
- Consentement éclairé du parent ou du tuteur légal
- Résident d'un des villages de l'étude
- Absence de fièvre ou d'antécédent de fièvre dans les dernières 24 heures (fièvre définie comme température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$)
- Présence de formes asexuées de *P. falciparum*
- Aucun traitement avec un antipaludique dans les 7 jours précédents
- Absence d'antécédents d'allergie à la SP et à l'AQ
- Absence de signes de malnutrition grave
- Absence de toute autre maladie chronique ou aiguë

- Disponibilité à retourner au centre de santé pour le suivi.

4.7 Organisation pratique du travail

⇒ Au niveau des sites

Pour la détermination de la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance, dans chacun des sites le travail s'était déroulé au niveau de 4 postes : *Poste d'identification* : il était tenu par un guide assisté d'un investigateur, ils prenaient le consentement éclairé individuel ou le papier de contact avec les participants sur lequel est écrit leur numéro de randomisation, leurs noms et prénoms. Après identification, les participants étaient orientés au poste clinique.

Poste clinique: au niveau de ce poste le participant était reçu par un clinicien de l'équipe qui avant tout vérifiait son identité. Ensuite il l'examinait physiquement et procédant à la mesure du poids, de la température et de la taille ; il demandait également si l'enfant avait de la fièvre les dernières 24 heures.

Poste de prélèvement: un biologiste occupait ce poste et était chargé de la confection de la goutte épaisse, du frottis, des confettis, de l'OptiMAL-IT et à la mesure du taux d'hémoglobine. Il tenait aussi une feuille de paillasse sur lequel il marquait les résultats.

Poste d'administration : Les enfants enrôlés ont été traités avec des doses curatives de SP+AQ ou des doses équivalentes de placebos en 3 occasions séparées d'un mois d'intervalle pendant la saison de haute transmission c'est-à-dire Août-Septembre-Octobre 2008. Le dosage des médicaments est basé sur le poids. L'amodiaquine était donné à la dose de 70 mg, 140 mg et 220 mg pour les enfants de 5-9 kg ; 10-18 kg et ≥ 19 kg respectivement. Les doses correspondantes pour la sulfadoxine étaient de 175 mg, 350 mg et 550 mg et pour la pyriméthamine de 8,75 mg ; 17,5 mg et 26,25 mg. L'amodiaquine était administré en une prise par jour pendant 3 jours et SP en une prise par jour pendant 1 jour. Les médicaments sont fabriqués sous forme de comprimés contenant la dose exacte requise pour chaque groupe.

Poste de réception, coloration et stockage avant l'envoi pour la lecture : un investigateur recevait chaque soir toutes les lames de la journée, il les colorait et

les stockait après séchage dans des boîtes de collection.

Pour l'évaluation de l'efficacité de la combinaison SP+AQ, dans chacun des sites le travail s'était déroulé au niveau de 6 postes :

Poste d'identification: Il était tenu par un guide qui prenait le papier de contact avec les participants. Il établissait ainsi une liste qu'il remettait aux autres guides qui à leur tour cherchaient les dossiers dans les armoires. Il est à noter que chaque participant possède un dossier qui porte son numéro de randomisation, son nom, son prénom et sa photo.

Poste clinique pour le passage de fin transmission: au niveau de ce poste le participant était reçu par un clinicien de l'équipe qui avant tout vérifiait son identité. Ensuite il l'examinait physiquement et procédant à la mesure du poids, de la température et de la taille ; il demandait également si l'enfant avait de la fièvre les dernières 24 heures et s'il dormait sous MII.

Poste de prélèvement: un biologiste occupait ce poste et était chargé de la confection de la goutte épaisse, du frottis, des confettis, de l'OptiMAL-IT et à la mesure du taux d'hémoglobine. Il tenait aussi une feuille de paillasse sur lequel il marquait les résultats.

Poste de coloration et de lecture des lames: un biologiste recevait à ce niveau toutes lames des participants asymptomatiques dont leur TDR est positif. Il les colorait puis les lisait.

Poste pour le consentement : les parents des enfants asymptomatiques qui avaient un TDR positif et une goutte positive étaient appelés pour l'obtention du consentement éclairé en présence d'un témoin indépendant. Seuls les enfants dont les parents ont donné leur consentement ont été enrôlés.

Poste d'administration et de suivi : la SP était administrée en une dose unique de 25mg/kg, l'AQ était donnée pendant 3 jours (30 mg/kg). Le jour 0, après confirmation du statut d'éligibilité d'un enfant, 25 mg/kg de SP et 10 mg/kg d'AQ étaient donnés. Le jour 1 et le jour 2, 10 mg/kg d'AQ étaient administrés. L'administration des médicaments avait lieu au centre de santé ou dans un autre endroit convenable sous la surveillance d'un membre du personnel de recherche. Après la prise des médicaments, les enfants étaient observés pendant 30 minutes pour s'assurer qu'ils n'ont pas vomi ou ne pas rejeté les médicaments. Les

médicaments étaient ré-administrés en cas de vomissements dans les 30 minutes qui suivent la première administration.

Les enfants enrôlés étaient invités à retourner au centre de santé ou à tout autre endroit qui était convenu les jours 1 et 2 pour le traitement et les jours 7, 14, 21 et 28 pour le suivi de la suppression de la parasitémie. Les enfants qui n'étaient pas retournés pas au centre de santé ou à l'endroit convenu étaient visités à la maison. La température axillaire était enregistrée à chaque visite après enrôlement (jours 0, 1, 2, 7, 14, 21 et 28). Des gouttes épaisses ont été préparées à partir d'une piqûre à la pulpe du doigt. Les lames des gouttes épaisses étaient préparées en double et marquées avec le code du village, le code d'identification de l'enfant, la date et le jour de suivi. Des spots de sang étaient préparées sur papier filtre et le taux d'hémoglobine était mesuré les jours 0, 7, 14, 21, 28 et à n'importe quel jour de visite non-programmée entre le jour 0 et le jour 28. Les spots de sang étaient séchés à l'air, placés dans différents sachets en plastique et stockés à 20°C jusqu'au traitement pour distinguer les recrudescences des réinfections par génotypage du gène de la protéine 2 de surface du mérozoite (*mSP2*).

Des cliniciens étaient disponibles dans les centres de santé pour fournir des soins médicaux pendant le suivi. Des tests de diagnostic rapide et de spots de sang sur papier filtre étaient réalisés ainsi que des gouttes épaisses/frottis mince étaient préparés pour tout enfant avec la fièvre ou antécédent de fièvre qui se présentait à tout moment au centre de santé.

Traitements alternatifs : Les enfants avec la fièvre ou antécédent de fièvre dans les dernières 24 heures avec parasitémie asexuée les jours 7, 14, 21 ou 28 étaient traités avec Coartem. Les enfants porteurs de parasites asexués les jours 7, 14, 21 et 28 étaient également traités avec Coartem qu'ils aient la fièvre/histoire de fièvre ou pas. Les coûts de traitement ont été supportés par le projet.

4.8 Techniques et matériels utilisés pour la récolte des données

4.8.1 Evaluation clinique

Matériels :

- Balance (pèse –personne)

- Thermomètre électronique
- Fiche de suivi clinique
- Registre de consultation,
- Liste de recensement des enfants (census),
- Bureau de consultation (tables et chaises),
- Bics noirs,
- Gants,
- Toise,
- Stock de médicaments essentiels (antipaludiques, antibiotiques, antipyrétiques etc.....),
- De l'eau pour la prise des médicaments

⇒ **Les paramètres évalués à l'examen clinique**

✓ *Mesure de la température :*

La mesure de la température était effectuée avec un thermomètre électronique placé sous l'aisselle. Toute température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C était considérée comme témoin d'une fièvre.

✓ *Mesure du poids :*

Le poids exprimé en kilogrammes (kg) était mesuré à l'aide d'une balance pèse-personne.

✓ *Mesure de la taille :*

La taille exprimée en centimètres (cm) était mesurée à l'aide d'une toise.

4.8.2 Techniques biologiques :

a. Matériels et réactifs:

- Microscope optique avec objectif à immersion (x100)
- Lames porte-objets
- Vaccinostyles stériles
- Gants
- Coton hydrophile
- Alcool à 70°C

- Méthanol
- Colorant Giemsa
- Détergent (Ajax)
- Bac à coloration avec portoir à lames
- Papier absorbant
- Tissu doux et non pelucheux
- Marqueur indélébile
- Crayon
- Stylo
- Séchoir
- Chronomètre
- Eau de javel
- Pot d'étalement
- Bassine
- Eau de robinet
- Eau distillée à PH=7.2
- PH-mètre
- Huile à immersion
- Compteur manuel
- Poubelles
- Registre + cahiers de paillasse
- Fiches de report des résultats
- Boîtes de rangement des lames
- HemoCue (Hb301)
- Cuvette de calibration
- Microcuvette pour dosage de l'hémoglobine (à conserver entre 15 et 30°C)
- Adaptateur secteur ou 4 piles de type AA
- Outils de prélèvement
- Une bandelette d'essai
- Tube capillaire (micropipette)

- Un dispositif portant deux puits (puits conjugué et puits de lavage)
- Une solution tampon
- Papier Whatman
- Sachets en plastique
- Silicagel
- Carton de séchage des spots.

b. Confection, coloration et lecture de la goutte épaisse et du frottis

✓ **Mode opératoire :**

➤ ***Étiquetage de la goutte épaisse frottis***

Les lames étaient étiquetées de façon correcte et lisible avant la collecte de sang sur la lame. L'étiquetage était fait sur la partie rugueuse de la lame.

La lame doit porter les informations suivantes: le numéro de traitement de l'enfant, la date de l'enquête ou date de visite et le code de l'enquête.

➤ ***Prélèvement de sang capillaire pour la goutte épaisse***

Le 3^{ème} ou le 4^{ème} doigt de la main gauche était choisi. Les doigts enflés ou tuméfiés ainsi que les doigts présentant une éruption cutanée ou les doigts très froids étaient évités. Le doigt était nettoyé avec un tampon d'alcool (70%)

- Laisser sécher ou nettoyer avec du coton sec pour ôter le reste de l'alcool avant la piqûre.

- Retirer un vaccinostyle de son emballage en évitant de toucher au bout pointu.

Ne pas piquer près de l'ongle et éviter les cotés du doigt

- Piquer fermement d'un coup au centre de la pulpe du doigt. Le bout du vaccinostyle doit bien pénétrer le doigt pour un écoulement adéquat de sang.

- Nettoyer la première goutte de sang avec du coton sec.

- Recueillir assez de goutte de sang pour la GE pour la confection du frottis.

- Presser le doigt vers l'extrémité si nécessaire pour recueillir suffisamment de gouttes de sang.
- Disposer les gouttes de sang sur la lame comme indiqué ci-dessous.
- Placer un tampon d'alcool sur la zone de la piqûre et demander à l'enfant ou à son parent/tuteur de le tenir environ 2-3 minutes jusqu'à l'arrêt de l'écoulement de sang.

➤ **Préparation de la GE et du frottis**

Une lame était déposée sur une surface ferme et plate, une lame d'étalement était utilisée pour préparer la GE et le frottis.

- Placer un bout de la lame d'étalement juste après la goutte de sang déposé pour le frottis.
- Permettre un léger contact de la lame avec la goutte de sang et laisser le sang se répandre sur les bords de la lame d'étalement. En tenant la lame d'étalement, former un angle de 45 degré avec la lame de GE/FM et pousser doucement et régulièrement vers l'avant vers le bout de la lame de GE/FM jusqu'à ce que le sang soit entièrement reparti sur la surface de la lame pour former le frottis mince.

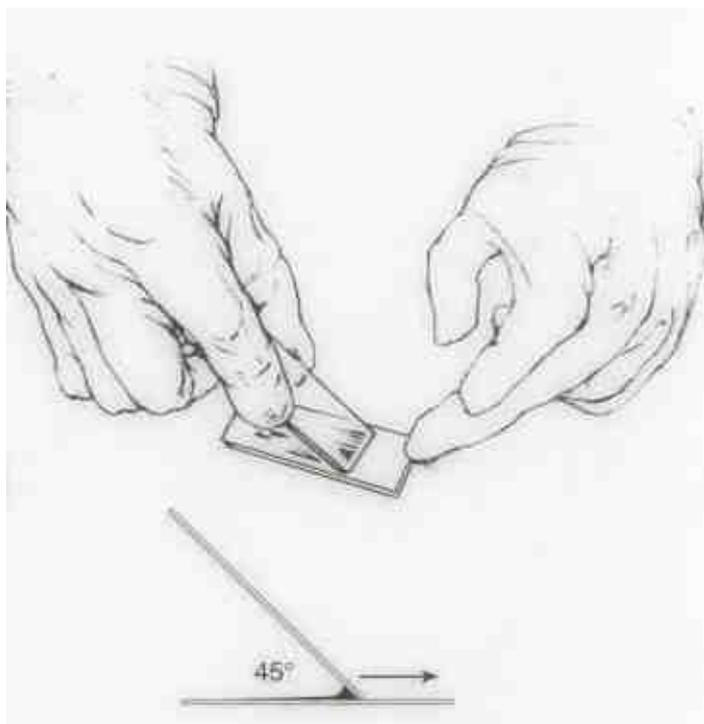


Figure 2 : Technique d'étalement pour la confection du frottis mince

- S'assurer que la lame d'étalement est bien en contact avec la surface de la lame de GE/frottis au moment de la confection du frottis. En utilisant un coin de la lame d'étalement joindre les gouttes de sang recueilli pour la GE en formant un cercle de 1 à 1,5 cm de diamètre.
- Ne pas triturer excessivement le sang
- Laisser sécher et étiqueter le frottis mince à l'aide d'un crayon de papier. Les informations portées sur le frottis doivent être identiques à celle inscrites sur la partie rugueuse de la lame (près de la GE). Toutes les tâches doivent être exécutées rapidement afin d'éviter la coagulation du sang. Les GE trop épaisses ou les frottis trop fins étaient évités.
- Laisser la GE et le frottis sécher à l'air libre en les protégeant des mouches, puis les placer dans des boîtes de rangement.

➤ **Coloration des lames**

Le nombre de lames reçues était noté sur une fiche avant de procéder à la coloration et la fiche était gardée soigneusement. Les lames étaient colorées

immédiatement après avoir été transportées au laboratoire. Avant la coloration, vérifier toujours que la GE a bien séché.

- Fixer le frottis mince avec du méthanol après avoir placé la lame dans une position oblique (le frottis mince positionné sur le bas et la GE vers le haut). -

Eviter le contact de la GE avec le méthanol.

- Préparer du Giemsa à 5% avec de l'eau distillée

- Placer les lames sur le côté dans un portoir et tremper dans un bassin contenant le colorant de Giemsa fraîchement préparé pour 45 minutes.

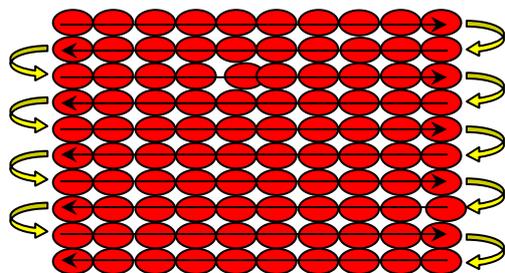
- Retirer les lames du bassin, rincer avec de l'eau distillée (pH 7,2), les placer dans une position oblique et laisser sécher à l'air libre.

Préparer les lames pour la lecture au microscope.

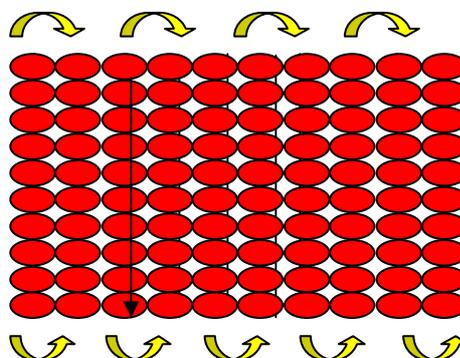
➤ **Lecture des lames**

La procédure de double lecture systématique par 2 lecteurs indépendants était adoptée. Aucun des 2 lecteurs ne connaissait les résultats de l'autre avant la lecture. Une goutte d'huile à immersion est placée sur la GE et le frottis mince

Les parasites sont recherchés en utilisant l'objectif à immersion (x100) du microscope. Pour le comptage des parasites, la lame est examinée de gauche à droite ou de haut en bas comme indiqué ci-dessous afin d'identifier les parties de la GE épaisse où la répartition des leucocytes est distribuée de façon homogène.



Sens de lecture d'une lame (1)



Sens de lecture d'une lame (2)

Figure 3 : technique lecture d'une lame

Les formes asexuées (trophozoites) et les formes sexuées (gamétocytes) de chaque espèce plasmodiale observée sont comptées en notant simultanément les leucocytes. Les formes asexuées et sexuées sont comptées contre 200 leucocytes. Une lame n'est déclarée négative qu'après lecture de toute la GE sans détecter une forme plasmodiale. En cas d'infection mixte, un comptage des formes asexuées sur la GE est fait d'abord sans distinction des espèces. Ensuite les espèces séparément sont comptées sur le frottis. Faire comptage sur 100 parasites et utiliser la distribution des espèces observée sur le frottis pour déterminer le nombre de parasites par espèce sur la GE.

Inscrire le nombre de parasites comptés par espèce et le nombre de leucocytes dans le registre du laboratoire, le numéro de traitement de l'enfant et la date de l'enquête.

Le superviseur des activités de laboratoire a désigné un membre de l'équipe de laboratoire qui est chargé d'enregistrer les résultats.

La densité parasitaire est calculée après la saisie de la fiche sur ordinateur en utilisant un programme informatique selon la formule suivante :

Nombre de parasites par μL = nombre de parasites comptés, multiplié par 8000 divisé par le nombre de leucocytes comptés (200)

Après la saisie un programme informatique est utilisé pour comparer les résultats de la double lecture afin de déterminer s'il y a une différence de plus de 30% entre les 2 lectures. Si le ratio plus forte densité parasitaire/faible densité parasitaire était supérieur à 1,3 une troisième lecture est réalisée par un technicien de laboratoire plus expérimenté. Une 3ème lecture est aussi effectuée au cas de différence entre les 2 lectures en termes de présence ou d'absence de parasites. La médiane de parasitemie des 2 ou 3 lecteurs est utilisée.

c. La technique de l'OptiMAL-IT

✓ Principe :

Il est basé sur la détection d'une enzyme métabolique intracellulaire abondante produite par les plasmodies dans le sang. Cette enzyme, le lactate

déshydrogénase des plasmodies (pLDH), est produite par toutes les formes du parasite et elle est rapidement détectée par une série d'anticorps monoclonaux dirigés contre des iso-formes de l'enzyme permettant de faire une différenciation entre les espèces plasmodiales. Il n'y a aucune réaction croisée avec la LDH humaine.

✓ **Mode opératoire**

Le paquet en aluminium est ouvert pour sortir tout le matériel et le réactif ci dessous.



Figure 4 : Matériel nécessaire pour réaliser un test d'OptiMAL-IT

Placer horizontalement le dispositif portant les deux puits (un puits conjugué contenant des anticorps monoclonaux et un puits-lavage) sur une surface plane, écrire l'identification du patient et la date sur l'étiquette.

Ouvrir l'ampoule contenant la solution tampon et distribuer une goutte (environ 10 μ l) de la solution tampon au puits-conjugué indiqué par le fond rouge et quatre gouttes (environ 80 μ l) au puits-lavage. Attendre une minute.

Nettoyer le bout du 3^{ème} ou 4^{ème} doigt avec le tampon désinfectant, laisser sécher puis piquer d'un coup sec la partie latérale du doigt avec la lancette stérile (jeter

le tampon désinfectant et la lancette dans une poubelle appropriée). Prendre une pipette, la presser doucement et appliquer l'extrémité ouverte à la goutte de sang. Relâcher ensuite la pression pour aspirer la goutte de sang avec la micropipette jusqu'à la ligne noire. Le sang veineux peut être utilisé en aspirant avec la pipette de la même manière.

Ajouter le volume total de sang prélevé avec la micropipette (environ 8-12 μ l) dans le puits-conjugué.

Mélanger doucement avec l'une des extrémités de la pipette ; puis jeter la pipette dans une poubelle et attendre une minute.

1. Tenir le dispositif avec les puits entre le pouce et l'index et avec l'autre main retirer le support de la bandelette (avec l'étiquette). Insérer les crochets du support de la bandelette dans les trous près du conjugué de telle sorte que l'extrémité de la bandelette atteigne le fond du conjugué. Laisser dans le puits pendant 10 minutes (le sang montera vers le filtre et la ligne de contrôle apparaîtra progressivement).
2. Transférer la bandelette du puits-conjugué au puits-lavage. Attendre 10 minutes à peu près pour que le sang ne soit plus présent au niveau de la zone de réaction. Vérifier que la ligne de contrôle est clairement visible.
3. Sortir la bandelette du puits de lavage et replacer la dans le support en plastique. Fermer les deux puits avec le couvercle en plastique. Casser les poses pied et les jeter dans la poubelle.
4. Lire la réaction et interpréter les résultats. Conserver la bandelette testée comme référence ultérieure et pour le contrôle d'un suivi thérapeutique.

✓ **Interprétation des résultats (voir figure 5)**

Réaction négative : la pLDH n'est pas détectée dans l'échantillon. Aucune réaction n'a eu lieu avec les anticorps contre la pLDH et seule la bande de contrôle sera visible.

Réaction positive : la pLDH présente dans l'échantillon réagit avec l'anti-pLDH conjugué et migre sur la bandelette où elle sera capturée par l'un ou les deux anticorps spécifiques contre la pLDH, provoquant l'apparition d'une bande colorée. **(Voir figure 5)**

Dans le cas d'une seule bande supplémentaire, le test est positif soit à *P. malariae*, *P. vivax* ou *P. ovale*

Mais quand il y a 3 bandes le test est positif à *P. falciparum*

Le test n'est pas valide :

Lorsque la bandelette n'est pas suffisamment claire.

Lorsque la bande de contrôle n'apparaît pas.

- Lorsque la bande de contrôle n'est pas visible et même si une ou toutes les deux bandes de diagnostic sont présentes.

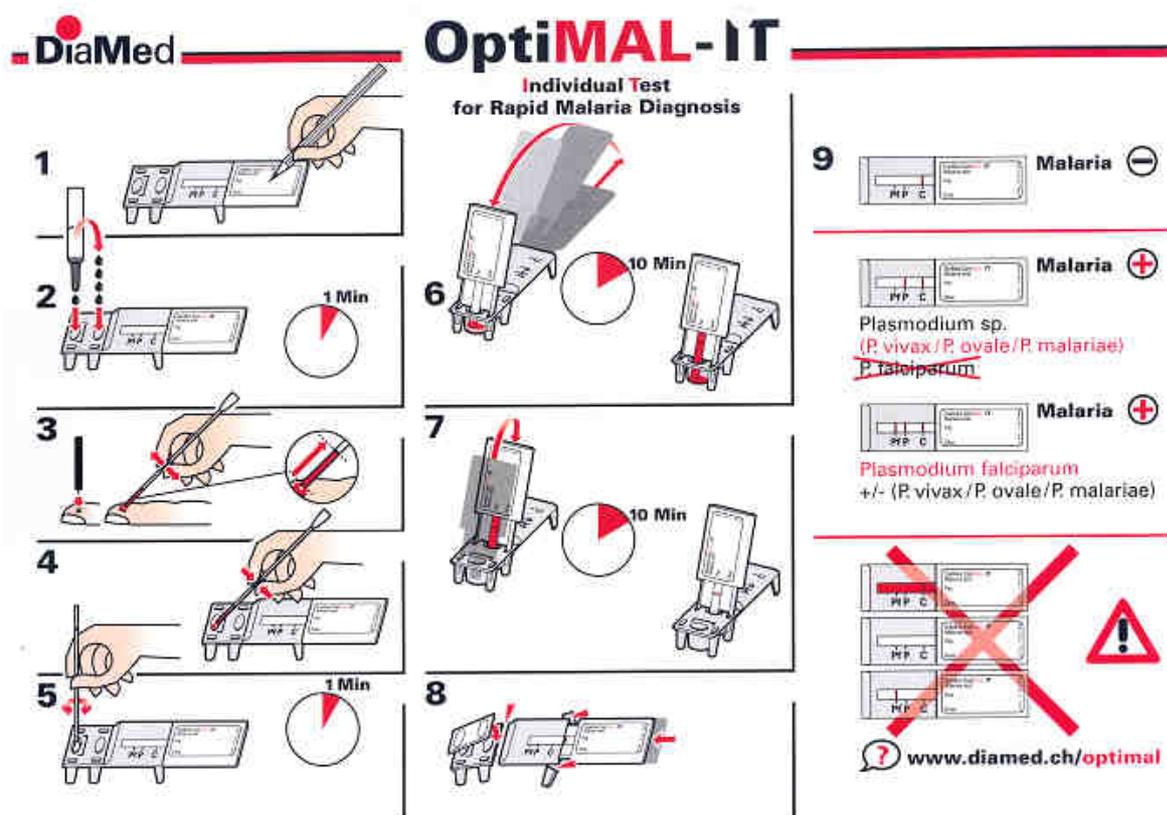


Figure 5 : Mode opératoire et interprétation des résultats du test OptiMAL-IT

d. La mesure du taux d'hémoglobine

✓ Introduction

La détermination du taux d'hémoglobine dans le sang par l'HemoCue est réalisée à l'aide d'une cuvette contenant un réactif sec. La lecture de la densité optique est

faite sur 2 longueurs d'onde. Cette procédure facilitera la standardisation de la méthode de détermination du taux d'hémoglobine à l'aide de l'HemoCue Hb301.

✓ **Procédures**

- Mettre en marche l'HemoCue (appuyer sur le bouton ON/OFF pendant 30 secondes). Un symbole de cloche (clignotante) apparaîtra.
- Presser le bouton (marche (ON) et arrêt (OFF)) rapidement pour activer/désactiver le signal sonore.
- Presser le bouton pendant 3 secondes jusqu'à ce que la cloche arrête de clignoter.
- L'appareil passe au mode « prêt ».
- Retirer un nombre approprié de cuvettes de la boîte. NB: ne pas remettre les cuvettes non utilisées dans la boîte originale
- Refermer la boîte après avoir retiré le nombre de cuvettes voulues.
- Noter la date à laquelle la boîte a été ouverte.
- Ne pas retirer le dessiccateur de la boîte
- Mettre le support de cuvette en position de chargement
- Piquer à la pulpe du doigt pour obtenir une goutte de sang
- Éviter l'hémolyse ou la coagulation après la piqûre
- Nettoyer les 2 ou 3 premières gouttes de sang
- Si nécessaire, presser légèrement afin qu'une goutte de sang se forme
- Remplir la micro cuvette d'un trait avec une large goutte de sang tout en évitant la formation de bulles d'air.
- Ne pas remplir la micro cuvette une seconde fois.
- S'il y a des bulles d'air dans la micro cuvette, un nouveau prélèvement de sang doit être effectué avec une nouvelle micro cuvette.
- Nettoyer l'excès de sang à l'extérieure de la micro cuvette.
- Ignorer les petites bulles d'air sur les parois de la micro cuvette car elles n'affectent pas les résultats
- Placer la cuvette remplie de sang dans le support de la cuvette dans les 40 secondes qui suivent le prélèvement.

- Pousser légèrement le support de cuvette afin qu'il se mette sur la position de mesure de l'hémoglobine.
- Après 10 secondes environ, la valeur de l'hémoglobine s'affiche.
- Vérifier que la valeur se situe dans les limites acceptables définies par le fabricant. Sinon, reprendre l'analyse avec un nouveau prélèvement de sang
- Noter le résultat sur la fiche de l'enfant (précision un chiffre après la décimale).
- Retirer la micro cuvette et la disposer dans une poubelle.

e. La confection du papier filtre ou confettis

✓ Procédures

- Découper de petits morceaux de papier filtre à partir du papier Wattman (environ 2 cm de long sur 1.5 cm de large)
- Disposer d'un petit carton pour le séchage et le stockage des spécimens sur le terrain
- Porter des gants
- Inscrire l'ID de l'enfant, la date de prélèvement et le code l'enquête pour laquelle le spot de sang a été préparé sur un coté du papier filtre.
- Nettoyer bien le doigt avec un tampon d'alcool
- Laisser sécher le doigt avant de piquer avec un vaccinostyle
- Recueillir le sang sur la partie inférieure du papier filtre (environ 1/2cm) comme indiqué ci-dessous
- Suspendre verticalement le papier filtre préparé en collant sa partie supérieure sur la bande adhésive au dessus du carton.
- Eviter le contact entre spécimens non encore complètement secs
- Fermer le carton afin de protéger les spécimens des mouches et de la poussière
- Laisser les spécimens sécher à l'air libre pendant 30 minutes.
- Après séchage, placer le spécimen dans un sachet en plastic contenant un dessiccateur ou du silicagel.

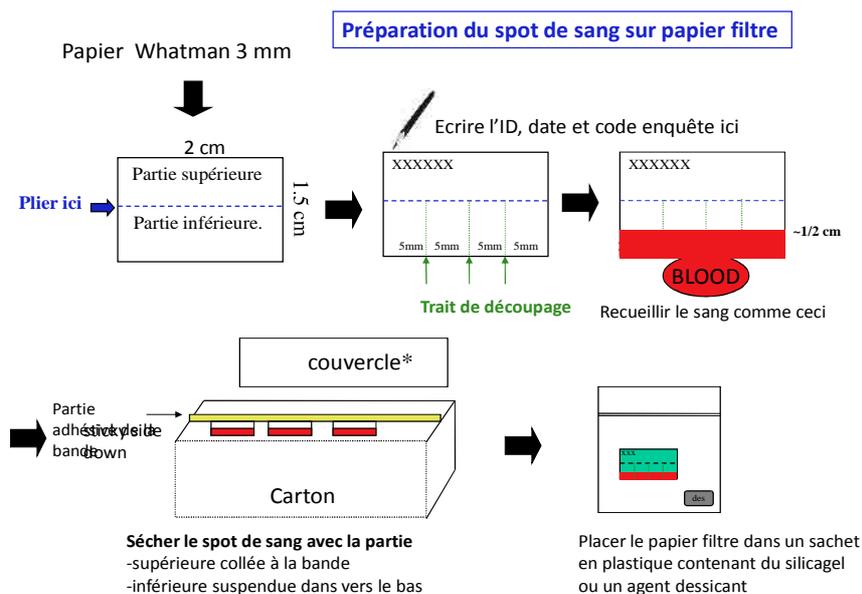


Figure 6 : Préparation du spot de sang sur papier filtre

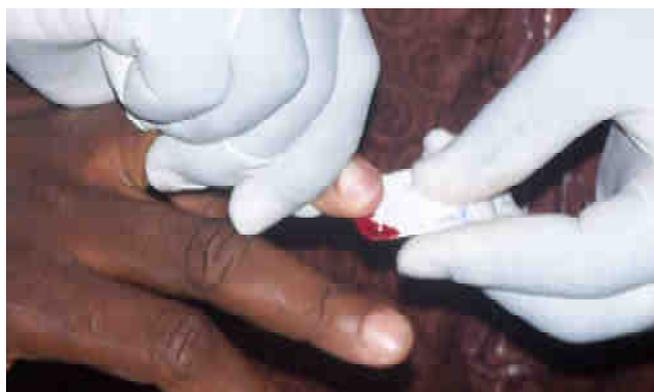


Figure 7 : Piqûre du doigt avec un vaccinostyle en vue de la préparation d'un spot de sang

f. extraction de l'ADN plasmodial

La méthode de méthanol était utilisée

✓ Principe

Il consiste à extraire l'ADN de *P. falciparum* des confettis en utilisant le méthanol.

✓ Matériel et réactifs

Le matériel utilisé pour l'extraction de l'ADN plasmodial se composait de: papier buvard, gants stériles, ciseaux, micropipettes de 200 et 1000 µl, embouts de 200 et 1000 µl, tubes de 500 µl, tubes de 1,5 ml, plaque chauffante, agitateur, papier hygiénique, méthanol, eau stérile, marqueurs à bout fin indélébile, minuterie, portoir, congélateur à -20°C, Becher, poubelle.

✓ Contrôle de qualité

Respecter rigoureusement le protocole d'extraction et tester le solvant d'extraction (eau) comme un témoin négatif au cours de la PCR d'essai. Contrôler la température en sorte que les aérosols ne passent d'un tube à un autre entraînant une intercontamination.

✓ Mode opératoire

- Porter des gants stériles
- Identifier les tubes de 500 µl conformément aux numéros des confettis à traiter
- Découper approximativement 4 morceaux de 3 mm² du confetti dans le tube eppendorf correspondant ;
- Ajouter 75 à 100 µl de méthanol dans chaque tube contenant les morceaux de confettis préalablement découpés de manière à les immerger entièrement ;
- Recouvrir les tubes ouverts à l'aide de papier hygiénique et les laisser incuber pendant 15 minutes à la température ambiante du laboratoire
- Puis, verser le méthanol contenu dans les tubes sans faire tomber les morceaux de confettis et les sécher complètement sous vide ou à l'air libre

- Après séchage, ajouter dans chaque tube 150µl d'eau stérile ou déionisée puis les fermer
- Mettre 150µl de l'eau utilisée pour l'extraction dans un tube vide sans confettis qui servira de contrôle négatif pour cette eau d'extraction
- Chauffer les tubes dans un bloc chauffant pendant 15 minutes entre 95 - 100°C. Agiter les tubes toutes les 5 minutes pendant l'incubation
- Enfin, stocker les ADN ainsi extraits dans un congélateur à -20°C après les avoir refroidi sous température ambiante

Mise en évidence des génotypes *Pfprt K76T*, *Pfmdr1Y86N*, *dhps A437G* et *dhps K540E*, *dhfr 51*, *dhfr 59*, *dhfr 108*

Principe

Une double amplification (double PCR = Nested-PCR ou PCR nichée) d'une portion du gène susceptible de comporter la mutation cible est tout d'abord réalisé ; le produit de la première amplification étant utilisé pour effectuer la seconde. L'ADN extrait des confettis étant de faible quantité, la PCR nichée permet d'obtenir des produits de PCR détectable sur gel d'agarose. A chaque PCR, des amorces spécifiques par point de mutation sont utilisées. Les génotypes des gènes *Pfprt* et *Pfdhps* sont ensuite déterminés par restriction enzymatique au niveau du codon 76 pour *Pfprt* et des codons 437 et 540 pour *Pfdhps*.

Echantillon

Les échantillons sont constitués de l'ADN extrait des confettis au méthanol.

Témoin positif du codon sauvage : PS-Mali

Témoin positif du codon mutant : PS-Perou

Matériel

La mise en évidence de ces mutations a nécessité ce matériel ci-après : ADN plasmodial, gants stériles, tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 15 ml, 50 ml), pipettes (2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl), embouts stériles (2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl), ciseaux, agitateur électrique, portoirs, chronomètre, papiers hygiéniques,

papiers aluminium, marqueurs, bac de migration, moule et peigne à gel, scotch à papier, para-film, cahier de paillasse, bics, centrifugeuse électrique, thermocycleur, balance pèse produit, erlenmeyer, appareil photo UV, film polaroid 667, éprouvette graduée de 100 ml, spectrophotomètre, hotte, réfrigérateur-congélateur, incubateur, poubelle.

Réactifs

✓ Pour déterminer le génotype au codon 76 de *Pfprt*:

1. Paire d'amorces utilisées pour la 1^{ère} amplification :

P1 : CCGTTAATAATAAATACACGCAG

P2 : CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACC

La taille attendue du produit de PCR est de 537 pb

2. Paire d'amorces utilisées pour la 2^{ème} amplification:

D1: TGTGCTCATGTGTTTAAACTT

D2: CAAAACCTATAGTTACCAATTTTG

La taille attendue pour les produits de PCR de 134 pb.

3. Enzyme de restriction utilisée : *ApoI*, l'enzyme coupe les souches de génotypes sensibles

✓ Pour déterminer le génotype au codon 86 de *Pfmdr1*

1. Paire d'amorces utilisées pour la 1^{ère} amplification :

MDR-1 : ATGGGGTAAAGAGAGAAAGA

MDR-2 : AACGCAAGTAATACATAAAGTCA

La taille attendue du produit de PCR est de 603 pb.

2. Paire d'amorces utilisées pour la 2^{ème} amplification:

MDR-3 : TGGTAACCTCAGTATCAAAGAA

MDR-4 : ATAAACCTAAAAAGGAACTGG

La taille attendue du produit de PCR est de 521pb.

3. Enzyme de restriction utilisée : *AflIII*, l'enzyme coupe les souches de génotypes sensibles

✓ Pour déterminer le génotype au codon 437 de *dhps*

1. Paire d'amorces utilisées pour la 1^{ère} amplification (amorces «ASRA») :

Amorce sens PS400-A : GGGGTATTAAATGTTAATTATGATTCT

Amorce anti-sens PS400-B : GGGGTCACATTTAACAATTTTATT

2. Paire d'amorces utilisées pour la 2^{ème} amplification (amorces «ASRA») :

Amorce sens : PS400-D1 : TGTTCAAAGAATGTTTCAAATGA

Amorce anti-sens : PS400-D2 : CCATTCTTTTTGAAATAATTGTAAT

La taille attendue du produit de PCR est de 150 pb

3. Enzyme de restriction utilisée : *Ava* II, l'enzyme coupe les souches de génotype mutant en 75 pb.

✓ **Pour déterminer le génotype au codon 540 de *Pfdhps***

1. Paire d'amorces utilisées pour la 1^{ère} amplification (amorces «ASRA») :

Amorce sens PS500-A : GGGCCCAAACAAATTCTATAGTG

Amorce anti-sens PS500-B : GGCCGGTGGATACTCATCATATA

2. Paire d'amorces utilisées pour la 2^{ème} amplification (amorces «ASRA») :

Amorce sens : PS500-D1 : GCGCGCGTTCTAATGCATAAAAGAGG

Amorce anti-sens PS500-D2 : CGGGTAAGAGTTTAATAGATTGATCAGCTTTCTTC

La taille attendue du produit de PCR est 201 pb

3. Enzyme de restriction utilisée : *Fok*-I; l'enzyme coupe les souches de génotype mutant en 145 pb.

✓ **Pour déterminer le génotype de *Pfdhfr***

1^{ère} amplification

Paire d'amorces utilisées pour le :

AMP1 : TTTATATTTTCTCCTTTTAA

AMP2 : CATTTTATTATTCGTTTTCT

2^{ème} amplification

- Amorces utilisées pour génotyper le codon *Pfdhfr* 51

Amorces sens:

- Codon sauvage (AAT=Asn) : FR-51WB1: GGAGTATTACCATGGAAATGTCA

- Codon mutant (ATT=Ile) : FR-51MB1 : GGAGTATTACCATGGAAATGTCT

Amorce anti-sens : MUM-D : TTTATCCTATTGCTTAAAGGTTTA

La taille du produit d'amplification est de 238 pb

- Amorces utilisées pour génotyper le codon *Pfdhfr* 59

Amorces sens:

- Codon sauvage (TGT = Cys): FR59W: ATGTTGTA ACTGCACA
- Codon mutant (CGT = Arg) FR59M: ATGTTGTA ACTGCACG

Amorce anti-sens : SP1 : ATGATGGAACAAGTCTGCGAC

La taille du produit d'amplification est de 190 pb

- Amorces utilisées pour géotyper le codon *Pfdhfr* 108

Amorces sens:

- Codon sauvage (AGC = Ser) : DIA-3: GAATGCTTTCCCAGC
- Codon mutant (AAC = Asn) : DIA-12: GGAATGCTTTCCCAGT

Amorce anti-sens : SP1: ATGATGGAACAAGTCTGCGAC

La taille du produit d'amplification est de 337 pb

Autres réactifs utilisés : Méthanol, agarose, bromure d'éthidium, tampon de PCR 10 X, dNTP, chlorure de magnésium , Taq polymérase, eau déionisée, eau stérile, Tris Borate EDTA (TBE), sérum albumine de bovins (BSA), tampon de digestion, , colorant de migration (Dye).

✓ **Méthodes**

Première amplification

- Inscrire le numéro d'identification du confetti sur le tube eppendorf
- Préparer le milieu réactionnel en fonction du nombre d'échantillons à traiter. Ce milieu est composé de: H₂O, 5X Tampon, 10X dNTPs, 100X Amorces P1+P2, Taq Palymérase, ADN plasmodial
- Repartir dans chaque tube 20µl du milieu réactionnel
- Ajouter 5µl d'ADN dans chaque tube correspondant
- Placer les tubes bien fermés dans le thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié.

❖ **Programme de la première amplification de *Pfcrt***

1. Dissociation initiale à 94°C pendant 3 minutes
2. Dissociation à 94°C pendant 30 secondes
3. Association à 56°C pendant 30 secondes

4. Elongation à 60°C pendant 1 minute
5. Retourner à l'étape 2, 44 fois
6. Elongation finale à 60°C pendant 3 minutes
7. Fin du programme à 4°C pendant un temps infini

❖ **Programme de la première amplification de *Pfmdr1***

1. Dissociation initiale à 95°C pendant 3 minutes
2. Dissociation à 92°C pendant 30 secondes
3. Association à 48°C pendant 45 secondes
4. Elongation à 48°C pendant 1 minute
5. Retourner à l'étape 2, 44 fois
6. Elongation finale à 60°C pendant 5 minutes
7. Fin du programme à 4°C pendant un temps infini

❖ **Programme de la première amplification de *dhps***

1. Dissociation initiale à 95°C pendant 5 minutes
2. Dissociation à 92°C pendant 30 secondes
3. Association à 45°C pendant 30 secondes
4. Elongation à 65°C pendant 45 secondes
5. Retourner à l'étape 2, 44 fois
6. Elongation finale à 72°C pendant 15 minutes
7. Fin du programme à 4°C pendant un temps infini

❖ **Programme de la première amplification du gène *dhfr***

1. Dissociation initiale à 95°C pendant 5 minutes
2. Dissociation à 92°C pendant 30 secondes
3. Association à 45°C pendant 30 secondes
4. Elongation à 65°C pendant 45 secondes
5. Retourner à l'étape 2, 24 fois
6. Elongation finale à 72°C pendant 15 minutes
7. Fin du programme à 4°C pendant un temps infini

Deuxième amplification

- Inscrire le numéro du tube de la première amplification sur le tube de la 2^e amplification;
- Préparer le milieu réactionnel pour la 2^{ème} amplification en fonction du nombre d'échantillons à traiter. Ce milieu est composé de : H₂O, 5X Tampon, 10X dNTPs, 100X Amorces D1+D2, Taq polymérase, Produit PCR1
- Repartir dans chaque tube 24 µl du milieu réactionnel;
- Ajouter 1µl du produit de la 1^{ère} amplification dans chaque tube correspondant soit un total de 25 µl par réaction;
- Placer les tubes dans le thermocycleur pour la 2^{ème} amplification suivant le programme approprié.

❖ Programme de la deuxième amplification de *Pfprt*

1. Dissociation initiale à 95°C pendant 5 minutes
2. Dissociation à 92°C pendant 30 secondes
3. Association à 48°C pendant 30 secondes
4. Elongation à 65°C pendant 1 minute
5. Retourner à l'étape 2, 25 fois
6. Elongation finale à 65°C pendant 3 minutes
7. Fin du programme à 4°C pendant un temps infini

❖ Programme de la deuxième amplification de *Pfmdr1*

1. Dissociation initiale à 95°C pendant 5 minutes
2. Dissociation à 92°C pendant 30 secondes
3. Association à 48°C pendant 30 secondes
4. Elongation à 65°C pendant 1 minute
5. Retourner à l'étape 2, 15-20 fois
6. Elongation finale à 65°C pendant 3 minutes
7. Fin du programme à 4°C pendant un temps infini

❖ Programme de la deuxième amplification des mutations sur *dhps*

1. Dissociation initiale à 95°C pendant 5 minutes
2. Dissociation à 92°C pendant 30 secondes

3. Association à 45°C pendant 30 secondes
4. Elongation à 65°C pendant 45 secondes
5. Retourner à l'étape 2, 24 fois
6. Elongation finale à 72°C pendant 15 minutes
7. Fin du programme à 4°C pendant un temps infini

❖ **Programme de la deuxième amplification du codon Pfdhfr51**

1. Dissociation initiale à 95°C pendant 3 minutes
2. Dissociation à 92°C pendant 30 secondes
3. Association à 54°C pendant 45 secondes
4. Elongation à 72°C pendant 1 minute
5. Retourner à l'étape 2, 15 - 20 fois
6. Elongation finale à 72°C pendant 3 minutes
7. Fin du programme à 4°C pendant un temps infini

❖ **Programme de la deuxième amplification du codon Pfdhfr 59**

1. Dissociation initiale à 95°C pendant 3 minutes
2. Dissociation à 92°C pendant 30 secondes
3. Association à 54°C pendant 30 secondes
4. Elongation à 72°C pendant 30 secondes
5. Retourner à l'étape 2, 15 - 20 fois
6. Elongation finale à 72°C pendant 3 minutes
7. Fin du programme à 4°C pendant un temps infini

❖ **Programme de la deuxième amplification du codon Pfdhfr 108**

1. Dissociation initiale à 95°C pendant 5 minutes
2. Dissociation à 92°C pendant 30 secondes
3. Association à 55°C pendant 45 secondes
4. Elongation à 72°C pendant 45 secondes
5. Retourner à l'étape 2, 15 - 20 fois
6. Elongation finale à 72°C pendant 3 minutes
7. Fin du programme à 4°C pendant un temps infini

- Enlever les tubes de la machine et les placer à +4°C dans le réfrigérateur
- Migrer les produits de la deuxième amplification sur un gel d'agarose à 2%

- Le résultat est validé lorsque les conditions suivantes sont remplies
 1. Conformité de la taille du produit de la deuxième amplification avec celle attendue ;
 2. Concordance des contrôles positifs (sauvage et mutant) par rapport à ceux qui sont énoncés dans le protocole ;
 3. L'absence effective de bandes au niveau des contrôles négatifs.

Après validation des produits de la deuxième amplification, on procède à la digestion.

Digestion enzymatique du produit de la 2^{ème} amplification

- Inscrire sur les tubes les numéros des différents échantillons
- Préparer le milieu réactionnel pour la digestion
- Distribuer dans chacun des tubes correspondants 15 µl de ce mélange réactionnel
- Ajouter 5 µl du produit de la 2^{ème} amplification dans les tubes correspondant et les fermer
- Mettre en incubation dans un thermocycleur ou un incubateur ou un bain-marie les tubes à 50°C pour l'enzyme *Apo I* ou à 37°C pour les enzymes *Ava II* et *Fok I* pendant 6 heures au minimum.
- Enlever les tubes du thermocycleur après le temps requis et les placer à + 4°C dans un réfrigérateur ;
- Procéder à la migration sur gel d'agarose à 2%.

Electrophorèse

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

- Dissoudre 2g d'agarose dans 100ml de TBE à 0,5X (solution de tampon à une concentration de 0,5)
- Faire bouillir ce mélange
- Ajouter 5 µl de Bromure d'éthidium dans l'agarose bouillie ;
- Couler le gel dans la moule et attendre sa solidification ;
- Enlever les peignes et placer le gel avec le moule dans le bac de migration contenant le TBE à 0,5X ; le gel doit être (immergé) ;

- Découper le papier parafilm;
- Placer sur le parafilm 3 μ l de colorant (Dye) pour chaque échantillon à migrer ;
- Placer 5 μ l du marqueur de poids moléculaire dans le 1^{er} puits ;
- Mélanger 5 μ l de chaque échantillon au Dye puis loger dans le puits le mélange ;
- Faire migrer à 100 Volts pendant 30 – 45 min ;
- Sortir le gel du moule et le placer sur l'appareil à ultra violet (UV) pour la photographie ;
- Marquer devant chaque bande le numéro de l'échantillon correspondant.

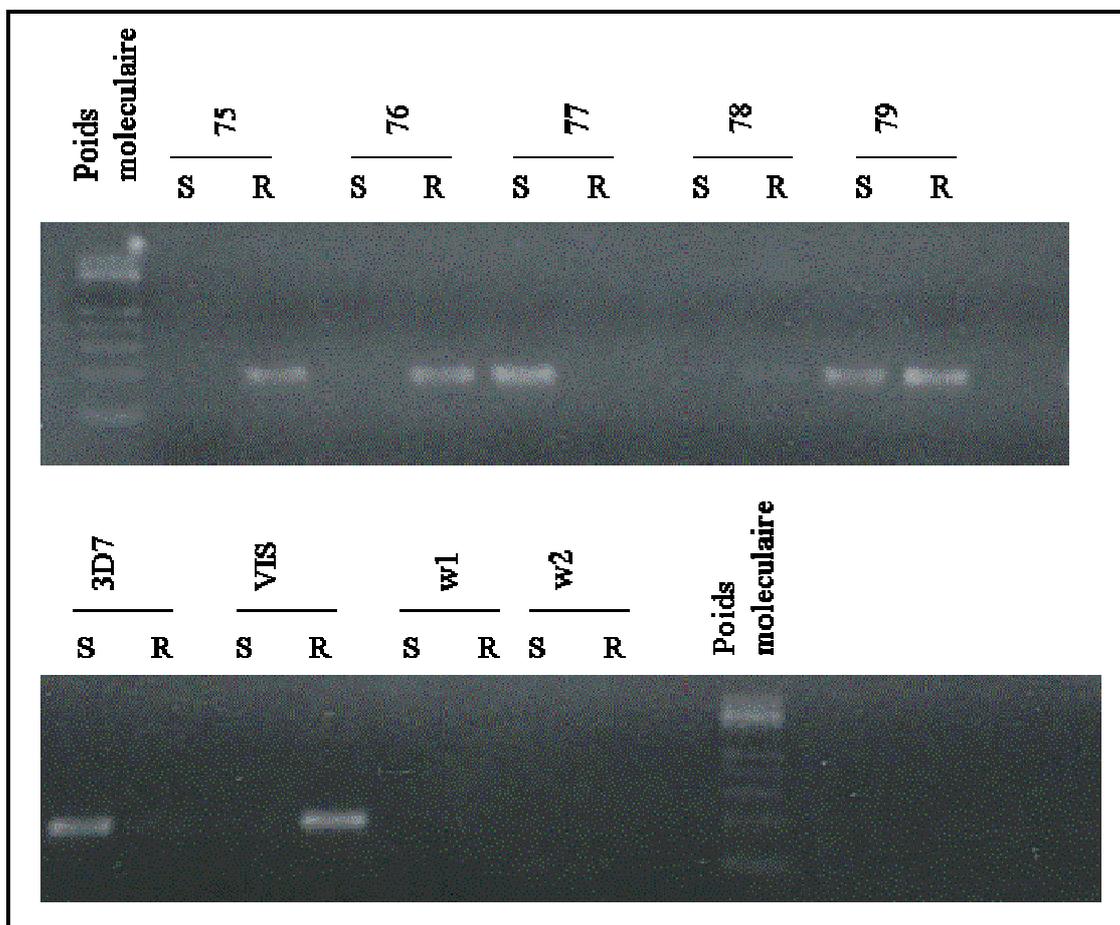
Interprétation de la photographie :

L'interprétation de la photographie du gel tient compte des trois conditions suivantes :

1. Conformité de la taille du produit de la deuxième amplification avec celle attendue ;
2. Concordance des contrôles positifs (sauvage et mutant) avec ceux qui sont énoncés dans le protocole ;
3. L'absence effective de bandes au niveau des contrôles négatifs.

Une fois ces conditions remplies, un échantillon est jugé sauvage lorsque la taille de sa bande correspond à celle du contrôle sensible. Il est dit mutant quand la taille du produit digéré est au même niveau que le contrôle résistant. En revanche le caractère mixte est évoqué devant un échantillon présentant deux bandes correspondant contrôles sensible et mutant.

Exemple de détermination du génotype du codon 59 du gène *Pfdhfr*.



3D7 : Le témoin positif sensible ; **VIS** : Le témoin positif résistant ; **W1** : Le témoin négatif de la première amplification ; **W2** : Le témoin négatif de la deuxième amplification ; Taille normale du produit= 190 paires de base ; **R** = résistant ; **S** = sensible

Figure 08: Photographie de gel d'agarose à 2% de la technique de mutations spécifiques (MS-PCR) du codon 59 du gène *Pfdhfr*.

4.9 Critères de jugement

Pour les marqueurs moléculaires de résistance, le critère principal de jugement était la fréquence de la quadruple mutation (dhfr 51, 59 et 108 et dhps 437). Les critères secondaires d'évaluation étaient les fréquences des mutations simples de la dhfr (dhfr 51, dhfr 59, dhfr 108) et de la dhps (dhps 437 et dhps 540) ainsi que la triple mutation (dhfr 51 + 59 + 108).

Pour l'efficacité *in vivo* du *P. falciparum* à la SP + AQ, le critère de jugement était la suppression des parasites, définie comme l'absence de formes asexuées de parasites du paludisme entre le jour 4 et le jour 28, après correction par la PCR.

4.10 Méthodes de gestion et analyse des données

Les fiches d'examen individuel, les lames de microscopie et les confettis portaient le même numéro pour chaque patient. Les lames préparées étaient rangées dans des boîtes de collection. Les confettis étaient mis dans des enveloppes portant le même numéro que les lames et étaient conservés dans un endroit sûr. Ces fichiers étaient vérifiés systématiquement, sur le terrain, à la fin de la journée par l'investigateur principal ou par le chef d'équipe. Les dossiers étaient complétés et rangés dans des armoires fermés à clé.

Les données étaient saisies en double au logiciel MS ACCESS, puis réconciliées par Epi Info et exportées sur STATA pour analyse.

Les tests de chi 2 de Pearson ou la probabilité exacte de Fischer a été utilisé pour la comparaison des proportions.

La fréquence d'une mutation particulière a été calculée comme la proportion d'échantillons porteurs de la mutation parmi le nombre total d'échantillons analysés avec succès pour cette mutation. Les fréquences de la triple, quadruple et quintuple mutations ont été déterminés comme étant la proportion de sujets

avec les trois, quatre et cinq mutations parmi le nombre total d'échantillons testés pour chacun.

4.11 Considérations d'éthiques

Le protocole d'étude finalisé avait été approuvé par le comité d'éthique de la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université de Bamako et le comité d'éthique de l'Ecole d'Hygiène et de Médecine Tropicale de Londres au Royaume-Uni.

L'étude a été menée selon les Bonnes Pratiques Cliniques (BPCs) et les bonnes pratiques de Laboratoires (BPLs).

Les consentements éclairés individuels ont été obtenus avant le screening et l'inclusion des sujets dans l'étude.

5. RESULTATS

5.1 Marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et l'AQ

5.1.1 Caractéristiques de base des sujets inclus dans les enquêtes transversales pour la détermination des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et l'AQ

Enquête de base avant intervention du TPI.

Au total 270 sujets ont été inclus dans l'enquête de base dont 130 (48,2%) étaient de sexe masculin et 140 (51,8%) étaient de sexe féminin. 49 sujets soit 18,2% avaient une goutte épaisse positive à *P. falciparum*. Les analyses moléculaires pour la détermination des marqueurs de la résistance ont porté sur 48 des 49 sujets.

Enquête de fin de saison de transmission après intervention du TPI

Au total 2,826 inclus dans l'essai TPI ont examinés en enquête transversale de fin d'intervention TPI dont 1382 (48,9%) étaient de sexe masculin et 1444 (51,1%) étaient de sexe féminin. Au total 248 enfants avec une goutte épaisse positive à *P. falciparum* (formes asexuées) ont été inclus dans l'étude des marqueurs moléculaires de résistance. Parmi les 248 sujets dont les échantillons ont été analysés pour les marqueurs moléculaires de la résistance, 148 étaient du groupe Placebo et 78 du groupe TPI.

5.1.2 Fréquence des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et l'AQ au cours de l'enquête de base (avant intervention TPI).

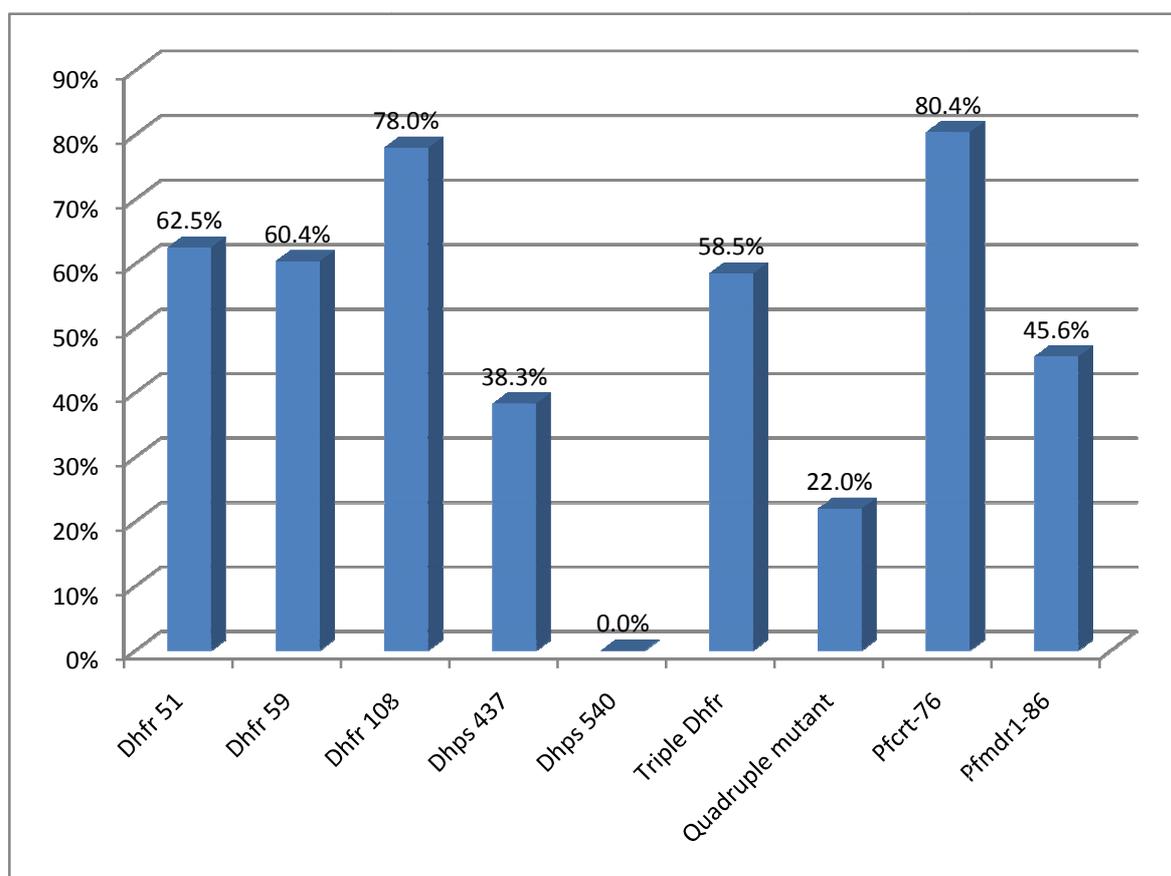


Figure 9: Fréquences des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et AQ au cours de l'enquête de base en Août 2008.

Au total, 58,5% des échantillons analysés en enquête de base avaient la triple mutation dhfr, 22% avaient la quadruple mutation (triple mutation dhfr + mutation dhps 437). La mutation Pfcrf-76 était présente chez 80,4% et la mutation Pfmdr1-86 chez 45,6% des sujets testés.

5.1.3 Fréquence des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et l'AQ au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI.

Tableau 01: Fréquence de la mutation dhfr 51 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008.

Mutation dhfr 51	Placebo		SP-AQ		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	98	66,2	59	75,6	157	69,5
Absente	50	33,8	19	24,4	69	30,5
Total	148	100,0	78	100,0	226	100,0

La fréquence de la mutation dhfr 51 était de 66,2% dans le groupe qui avait le Placebo contre 75,6% dans le groupe qui avait reçu le TPI avec SP +AQ. La différence entre les deux groupes n'était pas statistiquement significative, $\chi^2 = 2,1$; $p = 0,14$.

Tableau 02: Fréquence de la mutation *dhfr* 59 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008

Mutation <i>dhfr</i> 59	Placebo		SP-AQ		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	88	59,5	60	76,9	148	65,5
Absente	60	40,5	18	23,1	78	34,5
Total	148	100,0	78	100,0	226	100,0

La fréquence de la mutation *dhfr* 59 était de 59,5% dans le groupe placebo et 76,9% dans le groupe TPI. La différence entre les deux groupes était statistiquement significative, $\chi^2 = 6,9$; $p = 0,009$.

Tableau 03: Fréquence de la mutation *dhfr* 108 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008

Mutation <i>dhfr</i> 108	Placebo		SP-AQ		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	99	71,2	60	78,9	159	73,9
Absente	40	28,8	16	21,1	56	26,1
Total	139	100,0	76	100,0	215	100,0

Les fréquences de la mutation *dhfr* 108 étaient comparables dans les deux groupes, 71,2% dans le groupe placebo contre 78,9% dans groupe TPI, Chi 2 = 2,1 ; p = 0,14.

Tableau 04: Fréquence de la mutation dhps 437 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008

Mutation dhps 437	Placebo		SP-AQ		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	67	45,3	52	67,5	119	52,9
Absente	81	54,7	25	32,5	106	47,1
Total	148	100,0	77	100,0	225	100,0

La fréquence de la mutation dhps 437 était de 45,3% dans le groupe placebo TPI contre 67,5% dans le groupe TPI. La différence entre les deux groupes était statistiquement significative, Chi 2 = 10,1 ; p = 0,002.

Tableau 05: Fréquence de la mutation dhps 540 en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008

Mutation dhps 540	Placebo		SP-AQ		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	6	4,1	6	7,9	12	5,4
Absente	142	95,9	70	92,1	212	94,6
Total	148	100,0	76	100,0	224	100,0

La mutation dhps 540 étaient présente chez 4,1% des sujets dans le groupe placebo contre 7,9% des sujets dans le groupe TPI. La différence entre les deux groupes n'était pas statistiquement significative $\chi^2 = 1,5$; $p = 0,23$.

Tableau 06: Fréquence de la mutation triple dhfr en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008

Mutation triple dhfr	Placebo		SP-AQ		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	75	54,0	53	69,7	128	59,5
Absente	64	46,0	23	30,3	87	40,5
Total	139	100,0	76	100,0	215	100,0

La fréquence de la triple mutation *dhfr* était significativement plus élevée dans le groupe TPI avec 69,7% que dans le groupe placebo où elle était de 54,0% ; $\chi^2 = 5,1$; $p = 0,02$.

Tableau 07: Fréquence de la quadruple mutation (triple dhfr + dhps 437) en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008

Mutation	Placebo		SP-AQ		Total	
	n	%	n	%	n	%
triple dhfr + dhps 437						
Présente	39	28,1	40	53,3	79	36,9
Absente	100	71,9	35	46,7	135	63,1
Total	139	100,0	75	100,0	214	100,0

La fréquence de la quadruple mutation (triple dhfr + dhps 437) était significativement plus basse dans le groupe placebo avec 28,1% que dans le groupe TPI avec 53,3% ; Chi = 13,4 ; p < 0,001.

Tableau 08: Fréquence de la quintuple mutation en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008

Quintuple mutation	Placebo		SP-AQ		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	2	1,4	3	4,1	5	2,4
Absente	137	98,6	70	95,9	207	97,6
Total	139	100,0	73	100,0	212	100,0

La fréquence de la quintuple mutation était de 1,4% dans le groupe placebo contre 4,1% dans le groupe TPI. La différence entre les deux groupes n'était pas statistiquement significative, $\chi^2 = 1,5$; $p = 0,22$.

Tableau 09: Fréquence de la mutation *Pfcr-t76* en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008

Mutation <i>Pfcr-t76</i>	Placebo		SP-AQ		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	117	75,0	67	84,8	184	78,3
Absente	39	25,5	12	15,2	51	21,7
Total	156	100,0	79	100,0	235	100,0

Les fréquences de la mutation *Pfcr1-76* était de 75,0% dans le groupe placebo et de 84,8% dans le groupe TPI. La différence entre les deux groupes n'était pas statistiquement significative, Chi 2 = 3,0 ; p = 0,09.

Tableau 10: Fréquence de la mutation *Pfmdr1-86* en fonction des groupes de traitement au cours de l'enquête de fin de saison de transmission après intervention TPI en Novembre-Décembre 2008

Mutation <i>Pfmdr1-86</i>	Placebo		SP-AQ		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	54	34,6	28	36,8	82	35,3
Absente	102	65,4	48	63,2	150	64,7
Total	156	100,0	76	100,0	232	100,0

Les fréquences de la mutation *Pfmdr1-86* étaient comparables dans le groupe placebo et le groupe TPI avec 34,6% et 36,8% respectivement ; Chi 2 = 0,1 ; p = 0,74.

5.1.4 Comparaison des fréquences des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et à l'AQ avant et après intervention.

Tableau 11: Fréquence de la mutation *dhfr* 51 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008

Mutation <i>dhfr</i> 51	Avant TPI		Après TPI		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	30	62,5	157	69,5	187	68,2
Absente	18	37,5	69	30,5	87	31,8
Total	48	100,0	226	100,0	274	100,0

La fréquence de la mutation *dhfr* 51 était de 62,5% avant intervention contre 69,5% après intervention. La différence entre les deux périodes n'était pas statistiquement significative, Chi 2 = 0,9 ; p = 0,35.

Tableau 12: Fréquence de la mutation *dhfr* 59 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008

Mutation <i>dhfr</i> 59	Avant TPI		Après TPI		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	29	60,4	148	65,5	177	64,6
Absente	19	39,6	78	34,5	97	35,4
Total	48	100,0	226	100,0	274	100,0

Les fréquences de la mutation *dhfr* 59 étaient comparables avant et après l'intervention 60,4% contre 65,5% ; $\chi^2 = 0,5$; $p = 0,50$.

Tableau 13: Fréquence de la mutation *dhfr* 108 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008

Mutation <i>dhfr</i> 108	Avant intervention		Après intervention		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	32	78,1	159	73,9	191	74,6
Absente	9	21,9	56	26,1	65	25,4
Total	41	100,0	215	100,0	256	100,0

La fréquence de la mutation *dhfr* 108 était 78,1% avant intervention contre 73,9% après l'intervention. La différence entre la période pré-intervention et la période post-intervention n'est pas statistiquement significative ; $\chi^2 = 0,3$; $p = 0,58$.

Tableau 14: Fréquence de la mutation *dhps* 437 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008

Mutation <i>dhps</i> 437	Avant intervention		Après intervention		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	18	38,3	119	52,9	137	50,4
Absente	29	61,7	106	47,1	135	49,6
Total	47	100,0	225	100,0	272	100,0

Les fréquences de la mutation *dhps* 437 était 38,3% avant intervention. Elle était de 52,9%, cependant les deux proportions ne sont pas significativement différentes ; p exacte de Fisher = 0,08.

Tableau 15: Fréquence de la mutation *dhps* 540 avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008

Mutation	Avant intervention		Après intervention		Total	
	n	%	n	%	n	%
dhps 540						
Présente	0	0,0	12	5,4	12	4,5
Absente	45	100,0	212	94,6	257	95,5
Total	45	100,0	224	100,0	269	100,0

La mutation *dhps* 540 n'était pas trouvée parmi les sujets échantillons examinés au cours de l'enquête de base c'est-à-dire avant intervention. Au cours de l'enquête après intervention, elle était présente chez 5,4% des échantillons testés. La comparaison des deux proportions en utilisant le test de Fisher exacte montre qu'elles ne sont pas significativement différentes ; p = 0,23.

Tableau 16: Fréquence de la mutation triple dhfr avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008

Mutation triple dhfr	Avant intervention		Après intervention		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	24	58,5	128	59,5	152	59,4
Absente	17	41,5	87	40,5	104	40,6
Total	41	100,0	215	100,0	256	100,0

Les fréquences de la mutation triple *dhfr* au cours des deux périodes étaient similaires, 58,5% et 59,5% respectivement avant et après intervention ; $\chi^2 = 0,01$; $p = 0,90$.

Tableau 17: Fréquence de la quadruple mutation (triple dhfr + dhps 437) avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.

Mutation triple dhfr + dhps 437	Avant intervention		Après intervention		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	9	21,9	79	36,9	88	34,5
Absente	32	78,1	135	63,1	167	65,5
Total	41	100,0	214	100,0	255	100,0

Il n'existait pas de différence statistiquement significative entre la période pré-intervention et la période post-intervention quant à la fréquence de la quadruple mutation (triple *dhfr* + *dhps* 437), p (exacte de Fisher) = 0,07.

Tableau 18: Fréquence de la mutation *Pfcr7-76* avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.

Mutation	Avant intervention		Après intervention		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	37	80,4	184	78,3	221	78,6
Absente	9	19,6	51	21,7	60	21,4
Total	46	100,0	235	100,0	281	100,0

Les fréquences de la mutation *Pfcr7-76* étaient similaires au cours des deux périodes avec 80,4% et 78,3% respectivement avant et après intervention ; $\chi^2 = 0,1$; $p = 0,75$.

Tableau 19: Fréquence de la mutation *Pfdmr1-86* avant et après intervention TPI à la SP + AQ en 2008.

Mutation	Avant intervention		Après intervention		Total	
	n	%	n	%	n	%
Présente	21	45,7	82	35,3	103	37,1
Absente	25	54,3	150	64,7	175	62,1
Total	46	100,0	232	100,0	278	100,0

La fréquence de la mutation *Pfmdr1-86* était de 45,7% avant intervention contre 35,3% après intervention. La différence entre les deux périodes n'était pas statistiquement significative ; $\chi^2 = 1,8$; $p = 0,19$.

5.2 Réponse *in vivo* de *P. falciparum* à la combinaison SP + AQ

5.2.1 Caractéristiques des sujets inclus dans l'étude

L'étude *in vivo* a porté sur 147 sujets au total dont 69 (46,9%) étaient de sexe masculin et 78 (53,1%) étaient de sexe féminin. 75 enfants (51%) étaient du groupe Placebo et 72 enfants (49,0%) du groupe TPI. Sur les 147 sujets inclus, un sujet était exclu au jour 1 pour allergie aux médicaments de l'étude. Deux sujets avaient reçu un traitement antipaludique à base d'Artemether - Lumefantrine (un à Jour 7 et l'autre à Jour 9) sur un TDR positif malgré alors qu'il n'y avait pas de formes asexuées de parasite à la goutte épaisse

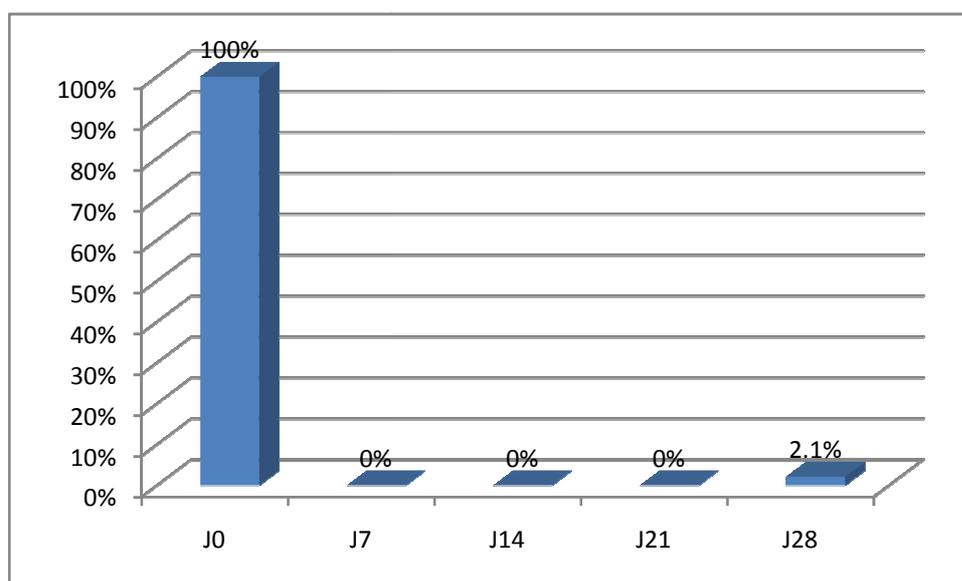


Figure 10: Evolution de la proportion des enfants porteurs de formes asexuées de *P. falciparum* du jour 0 au jour 28 de suivi après traitement en Novembre – Décembre 2009.

Au total les parasitémies (formes asexuées) étaient négatives à la goutte épaisse chez l'ensemble des sujets aux jours 7, 14 et 21. Trois sujets avaient formes

asexuées de parasitémie à *P. falciparum* à J28 ; deux étaient du groupes TPI et un du groupe Placebo. Les analyses génotypiques en utilisant (MSP1, MSP2) ont montré que les trois cas étaient des réinfections. L'efficacité *in vivo* de SP +AQ était donc de 100%.

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

6.1 Au plan méthodologique

L'étude TPI et nos enquêtes se sont déroulées dans trois localités dans le cercle de Kati. Tous les trois villages disposent d'un Centre de Santé Communautaire (CSCoM). Nous avons fait un recensement général de tous les enfants de 0 à 59 mois. Pour déterminer la fréquence des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à l'AQ, 270 enfants ont été sélectionnés de façon aléatoire sur la liste des enfants de 3 à 59 mois recensés dans les trois localités pour l'enquête de base. Un total de 3017 autres enfants de 3-59 mois ont été inclus dans l'étude TPI. La fréquence des marqueurs moléculaires de la résistante a été déterminée chez les enfants inclus dans l'étude TPI et qui avaient une parasitémie assexuée à *P. falciparum* au cours de l'enquête transversale réalisée 6 semaines environ après le troisième et dernier round de TPI en Novembre-Décembre 2008. Une année après, les enfants avec une parasitémie assexuée à *P. falciparum* sans symptômes, au cours d'une deuxième enquête transversale réalisée en Novembre-Décembre 2009, ont été inclus dans l'étude *in vivo* de la réponse *P. falciparum* à SP +AQ.

6.2 Au plan des résultats

Au total sur les 270 enfants inclus pour déterminer les fréquences des marqueurs moléculaires associées à la résistance à la SP et à l'AQ, 48 étaient porteurs de formes assexuée à *P. falciparum*. A la fin de la saison de haute transmission du paludisme, après lecture des échantillons collectés nous avons trouvé que 226 étaient porteurs de formes assexuées à *P. falciparum* dont 148 étaient dans le groupe Placebo et 78 dans le groupe TPI.

Les fréquences des mutations individuelles dhfr 51, dhfr 108, dhps 540, pfcrt-76, pfmdr1-86 avant intervention étaient comparables à celles obtenues après la

période d'intervention. Elles étaient aussi similaires entre le groupe TPI et le groupe Placebo à la fin de l'intervention

Les fréquences des mutations *dhfr* 59, *dhps* 437 étaient par contre significativement plus élevées dans le groupe TPI comparée que le groupe placebo à la fin de l'intervention entraînant une différence significative dans les fréquences des mutations multiples (triple mutation *dhfr* et quadruple mutation [triple *dhfr* + mutation *dhps* 437]). Cependant les fréquences de ces mutations individuelles et multiples étaient restées similaires avant et après le TPI.

Des fréquences plus élevées de mutations *dhfr* et *dhps* ont été rapportées parmi les sujets avec parasitemiques (*P. falciparum*) qui ont reçu le TPI à la SP que ceux qui ne l'ont pas reçu au Sénégal [10]. Cependant dans cette étude au Sénégal, tout comme dans notre étude, le nombre total d'enfants dans le groupe TPI porteurs de parasites était beaucoup plus bas que dans le groupe placebo de sorte que les proportions des sujets avec parasites mutants n'étaient pas plus élevées dans le groupe TPI.

Les fréquences des mutations *Pfprt*-76 et le *Pfmdr1*-86 associées à la résistance à l'AQ étaient comparables avant et après intervention et entre les deux groupes après intervention.

Il n'y a pas donc d'évidence que le TPI a entraîné une augmentation de la fréquence de ces mutations comme cela a été reporté dans d'autres études [10, 11, 30]. Cependant, il se peut que la durée de l'intervention soit trop courte entre les deux périodes pour entraîner une augmentation des fréquences des mutations. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact du TPI sur les marqueurs de la résistance après plusieurs années d'intervention.

Les fréquences des mutations *dhfr* dans notre étude étaient comparables à celles trouvées par Menegon M au Soudan en 2007 [31], elles étaient aussi comparables à celles trouvées par Konaté en 2008 au Burkina-Faso. Elles étaient largement supérieures à celles reportées à Kolokani en 2007 [32].

Les fréquences des mutations dhps dans notre étude étaient inférieures à celles reportées au Congo-Brazza par Ndounga et coll [33], et largement inférieures à celles obtenues à Kasangati en Ouganda (89% pour le dhps 437 et 83,9% pour le dhps 540) [34].

La fréquence de la quadruple mutation (triple dhfr + dhps 437) dans notre étude était comparable à celle trouvée par Konaté à la même période au Burkina-Faso (22,0% versus 25,0%), elle était plus élevée que celle trouvée par Dicko et coll en 2007 à Kolokani.

La mutation dhps 540 a été retrouvée dans notre étude à la fréquence de 5,4% au cours de l'enquête de novembre-décembre 2008. Cette mutation a été retrouvée la première fois au Mali par Dicko et al à Kolokani dans des proportions plus basses que notre étude.

La réponse *in vivo* de *P. falciparum* à la combinaison SP plus AQ a été étudiée chez des porteurs de *P. falciparum* asymptomatiques suivis pendant 28 jours après administration de SP + AQ. Nous avons trouvé une efficacité parasitologique au jour 28 de 100%. Le taux de sensibilité *in vivo* de *P. falciparum* à la combinaison SP+AQ que nous avons trouvé était supérieur à ceux obtenus au Cameroun (80,9% à Garoua ; 81,9% à Mutengene et seulement 76,2% à Yaoundé) [35]. Ceci peut s'expliquer par les fréquences fortement élevées des mutations Pfcrf-76 et Pfmddr1-86 qui étaient de 87,1% et 73,8 respectivement de sud du pays. En Ouganda Ubua C et coll, trouvait une efficacité de 97,4% au jour 14 avec la combinaison SP +AQ [36].

Au Mali SOGOBA (1998) avait trouvé 97,2% et 97,5% d'efficacité de la SP respectivement à Sotuba et à Donéguébougou [37]. Koné (2005) trouvait 93,4% à Kambila [38] alors que DIOURTE et al, (1995) rapportaient un taux de 99% à Sotuba [39].

Une inquiétude majeure concernant le déploiement du TPI à large échelle est la possibilité d'augmentation rapide de la résistance des parasites aux médicaments utilisés. Dans notre étude nous n'avons pas trouvé

d'augmentation notable des marqueurs de la résistance à la SP et à l'AQ, et la combinaison était efficace à 100% chez les porteurs asymptomatiques.

7. CONCLUSIONS

Nous n'avons pas mis en évidence une augmentation des marqueurs moléculaires de la résistance à SP ou AQ dans le cadre du TPI à la SP +AQ. Il se peut que TPI contribue à l'augmentation de la fréquence des marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et AQ mais qu'une période plus longue soit nécessaire pour déceler et mieux quantifier cette augmentation. En dépit d'une fréquence de quadruple mutants (triple dhfr + mutation dhps 437) de l'ordre de 37%, la combinaison SP + AQ était très efficace dans le traitement des enfants asymptomatiques dans la zone d'étude.

8. RECOMMANDATIONS

➤ *Aux chercheurs*

- Poursuivre les études d'impact du TPI sur la résistance de *P. falciparum* des médicaments utilisés.
- Envisager la possibilité d'associer le SP et AQ dans une même forme galénique et mettre au point une forme pédiatrique.

➤ *Aux autorités sanitaires et au PNL*

- Sensibiliser les populations sur la gravité d'une évolution croissante de la pharmaco-résistance, et promouvoir ainsi la lutte contre l'usage anarchique des médicaments à visée antipaludique.

➤ *Aux prescripteurs*

- Prescrire les combinaisons thérapeutiques efficaces tolérées conformément aux recommandations du PNL et éviter traitements curatifs mono thérapeutiques à la SP ou l'AQ à fin de limiter la pression médicamenteuse pouvant entraîner la résistance à ces deux médicaments.

➤ *Aux dispensateurs*

- Eviter la dispensation sans ordonnance médicale des médicaments antipaludiques y compris la SP et de l'AQ.

➤ *A la population*

- Eviter l'usage anarchique en automédication des médicaments antipaludiques y compris la SP et de l'AQ.
- Consulter autant que possible rapidement au niveau des centres de santé pour un diagnostic et traitement adéquat.

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **WHO**/World malaria report 2009
2. **OMS**. Comité d'expert du paludisme : vingtième rapport, 2000.
3. **Anonyme**. *The Abuja Declaration on Roll Back Malaria in Africa, 2000*.
4. **Brooker S, Guyatt H, Omumbo J, Shretta R, Drake L, Ouma J**. Situation analysis of malaria in school-aged children in Kenya . *Parasitol Today*. 2000 May;16(5):183-6. PMID: 10782073 [PubMed - indexed for MEDLINE].
5. **Anonyme** : Annuaire Système Local d'Informations Sanitaires 2008, Mali.
6. **Sidibé T, Sangho H, Traore M, Cissé M, Togo B, Sy O, Keita M** : Morbidité et mortalité dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré au Mali. *Mali Med*. 2008;23(4):34-37.
7. **Barry A** : Morbidité palustre dans deux localités du cercle de Kolokani : Nossoumbougou et Didieni. Thèse de Médecine ; Bamako 2009, 09-M-431.
8. **WHO**/ malaria Report 2010
9. **Aponte JJ, Schellenberg D, Egan A, Breckenridge A, Carneiro I, Critchley J, Danquah I, Dodoo A, Kobbe R, Lell B, May J, Premji Z, Sanz S, Sevene E, Soulaymani-Becheikh R, Winstanley P, Adjei S, Anemana S, Chandramohan D, Issifou S, Mockenhaupt F, Owusu-Agyei S, Greenwood B, Grobusch MP, Kremsner PG, Macete E, Mshinda H, Newman RD, Slutsker L, Tanner M, Alonso P, Menendez C**. Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants: a pooled analysis of six randomised, placebo-

- controlled trials. Lancet. 2009 Oct 31;374(9700):1533-42. Epub 2009 Sep 16.
10. **Cissé B, Sokhna C, Boulanger D, Milet J, Bâ el H et al. (2006)** Seasonal intermittent preventive treatment with artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. Lancet 367:659-67.
 11. **Dicko A, Diallo AI, Doumbo OK, Greenwood B et al.** Intermittent preventive treatment of malaria provides substantial protection against malaria in children already protected by an insecticide treated bednet in Mali: a randomized double blind placebo-controlled trial. PLoS Med. 2011 Feb 1;8(2):e1000407.
 12. **Sokhna C, Cisse B, Ba EH, Milligan P, Hallett R, et al. (2008)** A trial of the efficacy, safety and impact on drug resistance of four drug regimens for seasonal intermittent preventive treatment in Senegalese children. PLoS One 3: e1471
 13. **Gentillini M., Caumes E, Duflo B et coll. 1993.** MédecineTropicale. Médecine-Sciences 5e ed. Flammarion Paris 928P.
 14. **Longworth D L.** Drug-resistant malaria in childhood travelers. Antimicrobial resistant in pediatrics 1995; 42: 649-664.
 15. **Bouchaud O, Le Bras J, Regnierb, Saimot G, Vilde JL, Yeni P.** Paludisme : dans Médicaments anti-infectieux de Carbon C.1^{ère} édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1995; 506 p.
 16. **OMS.** Directives pour le traitement du paludisme, 2006 (Guideline for the treatment of malaria OMS 2006).
 17. **Adjuik M, Agnamey P, Babiker A, Borrmann S, Brasseur P, Cisse M, Cobelens F, Diallo S, Faucher JF, Garner P, Gikunda S, Kremsner PG, Krishna S, Lell B, Loolpapit M, Matsiegui P-B, Missinou MA, Mwanza J, Ntoumi F, Olliaro P, Osimbo P, Rezbach P, Some E, Taylor WR J.** Essai

randomisé multicentrique de la combinaison amodiaquine+artesunate comparé à l'amodiaquine chez les enfants en Afrique. *Lancet* 2002; 359:1365-72.

18. **Rapport d'une consultation technique de l'OMS**, 4-5 Avril 2001. Les combinaisons thérapeutiques antipaludiques.
19. **Lebrun-vignes B.** Les antimalariques: Pharmacologie, pharmacocinétique et toxicité chez l'adulte. *Méd Mal Infect* 29 (suppl 2) : 229-248. (1999)
20. **Royal Pharmaceutical Society of Great Britain** (1993) Martindale, The extra-pharmacopoeia, 30th edition.

www.santetropicale.com/rwanda/antipalu.htm
21. **Jaeger A. et al.** Clinical features and management of poisoning due to antimalarial drugs. *Med toxicol* 1987, 2:242-273.
22. **Schellenberg D, Kahigwa E, Drakeley C et al.** The safety and efficacy of sulfadoxine/pyriméthamine, amodiaquine, and their combination in the treatment of uncomplicated *p. falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2002, 67(1): 17-23.
23. **Rwagacondo CE, Niyitegeka F, Sarushi J, Karema C, Mugisha V et al.** Efficacy of amodiaquine alone and in combination with sulfadoxine-pyriméthamine and of sulfadoxine-pyriméthamine combined with artesunate. *Am J Trop Med Hyg* 2003, 68(6): 743-747.
24. **Dorsey G, Njama D, Kanya MR.** Sulfadoxine/pyriméthamine alone or with amodiaquine or artesunate for treatment of uncomplicated malaria/ a longitudinal randomised trial. *The lancet* 2002, 360: 2031-2038.
25. **Noedl H, Se Y, Schaecher K, et al.** Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 2008; 359:2619-20.

26. **Wongsrichanalai C, Meshnick SR.** Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis* 2008;14:716-9.
27. **Dondorp A, Nosten F, Yi P, et al.** Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2009;361:455-67.
28. **Gatton ML, Martin LB, Cheng Q.** Evolution of resistance to sulfadoxinepyrimethamine in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48:2116–2123.
29. **WHO.** Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring: 1996-2004.
30. **Konaté AT, Yaro JB, Ouédraogo AZ, Diallo D, Greenwood B et al.** Intermittent preventive treatment of malaria provides substantial protection against malaria in children already protected by an insecticide treated bednet in Burkina Faso: a randomized double blind placebo-controlled trial. *PLoS Med.* 2011 Feb 1;8(2):e1000408.
31. **Menegon M, Talha AA, Severini C, Elbushra SM, Mohamedani AA, Malik EM, Mohamed TA, Wernsdorfer WH, Majori G, Nour BY.** Frequency Distribution of Antimalarial Drug Resistance Alleles among *Plasmodium falciparum* Isolates from Gezira State, Central Sudan, and Gedarif State, Eastern Sudan. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Aug; 83(2):250-257.
32. **Dicko A, Sagara I, Djimdé AA, Touré SO, Traore M et al. (2010)** Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine one year after implementation of intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali. *Malar J* 9:9.
33. **Ndounga M, Tahar R, Basco LK, Casimiro PN, Malonga DA, Ntoumi F.** Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and the prevalence of molecular markers of resistance in under 5-year olds in Brazzaville, Congo. *Trop Med Int Health.* 2007 Oct;12(10):1164-71.
34. **Sendagire H, Kyabayinze D, Swedberg G, Kironde F. Plasmodium falciparum:** higher incidence of molecular resistance markers for

sulphadoxine than for pyrimethamine in Kasangati, Uganda. *Trop Med Int Health*. 2005 Jun;10(6):537-43.

- 35. Mbacham WF, Evehe MS, Netongo PM, Ateh IA, Mimche PN, Ajua A, Nji AM, Irene D, Echouffo-tcheugui JB, Tawe B, Hallett R, Roper C, Targett G, Greenwood B.** Efficacy of amodiaquine, sulphadoxine-pyrimethamine and their combination for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children in Cameroon at the time of policy change to artemisinin-based combination therapy. *Malaria J*. 2010 Jan 27, 9:34.
- 36. Obua C, Gustafsson LL, Aguttu C, Anokbonggo WW, Ogwal-Okeng JW, Chiria J, Hellgren U.** Improved efficacy with amodiaquine instead of chloroquine in sulfadoxine/pyrimethamine combination treatment of falciparum malaria in Uganda: experience with fixed-dose formulation. *Acta Trop*. 2006 Nov; 100(1-2):142-50.
- 37. Sogoba M,** Epidémiologie, chloroquinorésistance, et Etude de la réinfection après traitement au FANSIDAR dans deux zones d'endémicité différente au Mali. *Thèse de médecine, Bamako 1999, 64p, 99- M-67.*
- 38. Koné M,** Incidence du paludisme après cessation du Traitement préventif intermittent a la Sulfadoxine-Pyrimethamine et chimiosensibilité de *P. falciparum* ce à médicament à kambila ; Cercle de Kati, Mali. *Thèse de Médecine, Bamako 2005, 49p, 05-M-230.*
- 39. Diourté Y, Djimde A, Doumbo O, Sagara I, Coulibaly Y, Dicko A, Diallo M, Diakite M, Cortese JF and Plowe CV.** Pyrimethamine Sulfadoxine efficacy and selection for mutations in *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate synthase in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 1999 Mar;60(3):475-8.

10. FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : MAHAMAR

Prénom : Almahamoudou

Nationalité : Malienne

Année de soutenance : 2011

Ville de soutenance : Bamako

Titre de thèse : Chimiosensibilité de *P. falciparum* à la Sulfadoxine pyriméthamine (SP) plus l'Amodiaquine (AQ) dans le cadre du traitement préventif intermittent (TPI) à la SP plus AQ chez les enfants à Djoliba, Siby et Ouelessebouyou, Cercle de Kati, Mali.

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

Secteur d'intérêt : Santé publique, Épidémiologie, Parasitologie

Origine de la thèse : Mali

Résumé : Le paludisme est un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne surtout chez les enfants de moins de 5 ans. Le traitement préventif intermittent (TPI) définie comme l'administration d'un antipaludique à dose curative à des intervalles de temps prédéfinis est une stratégie est une stratégie très efficace et très prometteuse de lutte contre le paludisme. Une des questions importantes concernant l'utilisation de cette stratégie, est de savoir si elle n'entraînait pas une augmentation rapide de la résistance des parasites aux médicaments utilisés. L'objectif de notre étude était d'évaluer les réponses *in*

in vivo et moléculaires de *P. falciparum* à la SP et à l'AQ dans le cadre du TPI chez les enfants

Les fréquences des mutations dhfr 51, 59 108 et dhps 437 et 540 associées à la résistance de *P. falciparum* à la SP et celles des mutations Pfcr1 76 et Pfmdr1-86 associées à la résistance de *P. falciparum* à l'AQ ont été mesurées par enquête transversale avant et après le TPI effectué chez les enfants de 3-59 mois au cours de la saison de transmission du paludisme en 2008 à Djoliba, Siby et Ouelessebouyou dans le cercle de Kati au Mali. En 2009, une enquête d'observation a été effectuée pour déterminer la sensibilité *in vivo* de *P. falciparum* à la SP +AQ a été évaluée par enquête d'observation dans les trois localités en fin de saison de transmission 2009.

Les fréquences des mutations individuelles dhfr 51, dhfr 108, dhps 540, pfcr1-76, pfmdr1-86 avant le TPI étaient comparables à celles obtenues après le TPI. Elles étaient aussi similaires entre le groupe TPI et le groupe Placebo à la fin de l'intervention. Les fréquences des mutations dhfr 59, dhps 437 étaient par contre significativement plus élevées dans le groupe TPI comparée que le groupe Placebo à la fin de l'intervention entraînant une différence significative dans les fréquences de la quadruple mutation (triple dhfr + mutation dhps 437) qui était de 28,1% dans le groupe Placebo contre 53,3% dans le groupe TPI ; $p < 0,001$. L'efficacité *in vivo* de *P. falciparum* à la SP +AQ à jour 28 était de 100%.

En conclusion en dépit de l'augmentation de la fréquence de la quadruple mutation (triple dhfr + mutation dhps 437), la combinaison SP +AQ reste très efficace dans la zone d'étude.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, résistance, traitement préventif intermittent, amodiaquine, sulfadoxine-pyriméthamine, Mali.

Name: MAHAMAR

Surname: Almahamoudou

Nationality: Malian

Year: 2011

City: Bamako

Thesis title: Chemosensitivity of *P. falciparum* to Sulfadoxine pyrimethamine (SP) and Amodiaquine AQ in a context of intermittent preventive treatment with SP and AQ in children to Djoliba, Siby and Ouelessebougou, in the district of Kati, Mali.

Site of thesis: Library of Faculty of Medicine Pharmacy and Dentistry.

Focus Area: Public Health, Epidemiology, Parasitology

Origin of thesis: Mali

Abstract:

Malaria is a major public health problem in Sub-Saharan Africa especially in children under 5 years of age. Malaria intermittent preventive treatment (IPT) defined as the administration of curative dose of anti-malarial drug at predefined time intervals, is a very efficacious and very promising strategy for malaria control. An important question is whether the use of this strategy will not result to a rapid increase of resistance of the parasites to the drugs used.

The aim of our study was to assess the *in vivo* and molecular responses of *P. falciparum* to SP and AQ in a context of IPT in children. Frequencies of mutations on dhfr 51, 59 and 108 and dhps 437 and 540 associated with resistance to SP and on Pfprt 76 and Pfmdr1-86 associated with resistance to AQ were measured using cross-sectional survey before and after IPT in children aged 3-59 months of age during the 2008 malaria transmission season in Djoliba, Siby and Ouelessebougou, in the district of Kati, Mali. In 2009 another observation study was conducted to assess the efficacy the *in vivo* response of *P. falciparum* to SP +AQ in the three localities.

The frequencies of individual mutations dhfr 51, dhfr 108, dhps 540, pfprt-76, pfmdr1-86 were similar before and after IPT. These frequencies were also similar in the intervention and Placebo group at the end of the intervention. The frequencies of mutations dhfr 59 and dhps 437 were significantly higher in intervention group compared to Placebo at the end of the intervention leading to a significant difference in frequency of quadruple mutant (triple dhfr + mutation dhps 437) in the intervention group (53.3%) compared to the Placebo group (28.1%), $p < 0.001$. The *in vivo* efficacy of *P. falciparum* to SP+AQ was 100%. In summary despite the increase in quadruple mutant (triple dhfr + mutation dhps 437), SP+AQ was highly efficacious in the study area.

Key words: *Plasmodium falciparum*, resistance, intermittent preventive treatment, amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine, Mali.