

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>%</b>	: Pour cent.
<b>°C</b>	: Degré Celsius.
<b>µL</b>	: Microlitre.
<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribonucléique.
<b>CI<sub>50</sub></b>	: Concentration Inhibitrice 50%.
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Dioxyde de Carbone
<b>CQ</b>	: Chloroquine.
<b>CTA</b>	: Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine.
<b>DP</b>	: Densité parasitaire.
<b>EDTA</b>	: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid.
<b>ICEMR</b>	: Internetional Center of Excellence for Malaria Research.
<b>N<sub>2</sub></b>	: Diazote
<b>O<sub>2</sub></b>	: Dioxygène
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé.
<b><i>P. falciparum</i></b>	: <i>Plasmodium falciparum</i> .
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction.
<b>PNLP</b>	: Programme National de Lutte contre le Paludisme.
<b>QBC</b>	: Quantitative Buffy Coat.
<b>RMB</b>	: Roll Back Malaria
<b>RPMI</b>	: Roswell Park Memorial Institute.
<b>SP</b>	: Sulfadoxine- Pyriméthamine.
<b>SSP</b>	: Soins de Santé Primaire.
<b>Ssp</b>	: Sous espèce.
<b>TDR</b>	: Test de Diagnostic Rapide.
<b>TPI</b>	: Traitement Préventif Intermittent.

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1:</b> Cycle de vie du plasmodium.....	7
<b>Figure 2 :</b> structure de la quinine.....	16
<b>Figure 3 :</b> Structure de l'artémisinine.....	16
<b>Figure 4 :</b> Structure de la chloroquine.....	17
<b>Figure 5 :</b> Structure de l'amodiaquine.....	17
<b>Figure 6 :</b> Structure de la méfloquine.....	18
<b>Figure 7 :</b> Structure de l'Halofantrine .....	18
<b>Figure 8 :</b> Structures de la pyriméthamine et de la sulfadoxine.....	19
<b>Figure 9:</b> Structure générale des triazènes.....	29
<b>Figure 10:</b> Triazènes cycliques.....	32
<b>Figure 11:</b> structure des Benzotriazoles .....	32
<b>Figure 12:</b> Structures de la Dacarbazine et du Témozolide .....	33
<b>Figure 13:</b> Structures du Bérénil et des 1-aryl-3,3-dialkyltriazènes .....	34
<b>Figure 14:</b> Structure du benzotriazole halogéné.....	34
<b>Figure 15 :</b> Découpage administratif de la région de Thiès .....	42
<b>Figure 16:</b> Structure du Sybr Green ou le [2-[N-(3-diméthylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-méthylidène]-1-phényl-quinolinium] <sup>+</sup> .....	47
<b>Figure 17 :</b> Préparation et lecture des plaques après 48 heures d'incubation ....	54
<b>Figure 18:</b> Répartition des CI <sub>50</sub> des triazoles en fonction des souches .....	56
<b>Figure 19:</b> Répartition des CI <sub>50</sub> des dérivés triazolés de la vitamine D <sub>2</sub> en fonction des souches.....	58

## LISTE DES SCHEMAS

---

<b>Schéma 1:</b> Méthode de synthèse des triazènes par diazocopulation .....	30
<b>Schéma 2 :</b> Méthode de synthèse des triazènes à partir d'un dérivé organométallique .....	30
<b>Schéma 3 :</b> Synthèse du 1,3-bis [3-(trifluorométhyl) phényl] triazène .....	31
<b>Schéma 4:</b> Synthèse du 4-Cyano-4'-méthoxy-1,3-diphényl triazène.....	31
<b>Schéma 5:</b> Protection et Régénération d'une amine par un triazène.....	35
<b>Schéma 6:</b> Utilisation des triazènes pour synthétiser des hétérocycles.....	37
<b>Schéma 7:</b> Stratégie de fixation du fluor sur le noyau triazénique.....	38
<b>Schéma 8 :</b> Transformation des triazènes en aryliodides .....	39
<b>Schéma 10:</b> synthèse d'acétate de ter-butyl 2-(4-(3-hydroxypentan-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl) <b>IS43</b> .....	45

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau I</b> : Répartition des concentrations d'antipaludiques sur la plaque 1 ....	51
<b>Tableau II:</b> Disposition de la préparation de parasites sur la plaque.....	52
<b>Tableau IV:</b> Répartition des CI <sub>50</sub> des triazoles.....	55
<b>Tableau V:</b> Répartition des CI <sub>50</sub> des dérivés triazolés de la vitamine D <sub>2</sub> .....	57

## TABLE DES MATIERES

---

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>GENERALITES SUR LE PALUDISME ET LES TRIAZENES .....</b>	<b>4</b>
<b>Chapitre I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LE PALUDISME... </b>	<b>4</b>
I. Définition .....	4
II. Epidémiologie .....	4
<i>II.1. Agent pathogène .....</i>	4
II.1.1 Classification.....	4
II.1.2 Biologie .....	5
II.1.2.1 Habitat.....	5
II.1.2.2 Cycle évolutif du parasite .....	5
II.1.3 Culture du Plasmodium.....	8
<i>II.2. Vecteur du paludisme .....</i>	8
<i>II.3. Modes de transmission .....</i>	8
<i>II.4 Réservoir de parasite.....</i>	8
<i>II.5 Facteurs favorisants .....</i>	9
III. Aspects cliniques du paludisme.....	9
<i>III.1 Paludisme de primo invasion .....</i>	9
<i>III.2. Paludisme à Plasmodium falciparum .....</i>	10
III.2 .1. Accès palustre à fièvre périodique.....	10
III.2.2. Paludisme grave .....	11
III.2.2.1. Accès pernicieux.....	11
III.2.2.2. Paludisme viscéral évolutif.....	12
III.2.2.3. Fièvre bilieuse hémoglobinurique .....	12
<i>III.3. Paludisme et grossesse .....</i>	12
IV. Diagnostic biologique .....	13
<i>IV.1. Diagnostic direct .....</i>	13
<i>IV.2.Diagnostic indirect .....</i>	14
V. Traitements .....	15
<i>V.1 Antipaludiques naturels .....</i>	15
<i>V.2 Antipaludiques de synthèses .....</i>	17
<i>V.3 Antimétaboliques .....</i>	18
<i>V.4. Gamétocytocides.....</i>	19
<i>V.5. Antibiotiques .....</i>	19
<i>V.6. Associations .....</i>	19
VI. Chimiorésistance de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	20
<i>VI.1 Définition .....</i>	21

<i>VI.2 Nature de la chimiorésistance</i> .....	21
<i>VI.3 Apparition de la chimiorésistance</i> .....	21
<i>VI.4 Propagation</i> .....	22
<i>VI.5 Facteurs favorisant l'apparition et la diffusion de la chimiorésistance</i> .....	24
<i>VI.6 Méthodes d'études</i> .....	24
VI.6.1 Méthodes <i>in vivo</i> .....	24
VI.6.2 Méthodes <i>in vitro</i> .....	25
VII. Prophylaxie .....	25
VII.1 Chimioprophylaxie.....	25
VII.2 Protection du sujet sain .....	26
VII.3 Vaccin.....	27
<b>CHAPITRE II : RAPPELS SUR LES TRIAZENES</b> .....	29
I. Structure générale .....	29
II. Méthodes de synthèse .....	29
III. Classification .....	30
IV. Utilisations thérapeutiques des triazènes.....	33
V. Autres utilisations des triazènes .....	35
<b>DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL</b> .....	40
I- CADRE BIOGEOGRAPHIQUE : LA REGION DE THIES .....	41
<i>I.1 Présentation de la région de THIES</i> .....	41
<i>I.2 Endémicité palustre</i> .....	42
<i>I.3 Situation sanitaire</i> .....	43
II- Matériel et méthodes.....	44
<i>II.1 Matériel</i> .....	44
<i>II.2 Méthodes</i> .....	44
II.2.1 Méthodes d'obtention des composés .....	44
II.2.2 Méthodes d'évaluation des tests .....	46
II.2.2.1 Période d'étude .....	46
II.2.2.2 Population d'étude .....	46
II.2.2.2.1 Critères d'inclusion et de non inclusion .....	46
II.2.2.2.1.1 Critères d'inclusion.....	46
II.2.2.2.1.2 Critères de non inclusion .....	46
II.2.2.2.2 Les prélèvements .....	47
II.2.2.3 Technique de SYBR Green.....	47

II.2.2.3.1 Définition .....	47
II.2.2.3.2. Principe .....	48
II.2.2.3.3 Mode opératoire .....	48
II.2.2.3.3.1-Préparation et conservation des antipaludiques pour les tests .....	48
II.2.2.3.3.2 Préparation et supplémentation du milieu RPMI .....	49
II.2.2.3.3.3 Préparation de la solution tampon .....	49
II.2.2.3.3.4 Préparation de la solution tampon SYBR green.....	49
II.2.2.3.3.5 Préparation des séries de dilution sur les plaques de culture .....	50
II.2.2.3.3.6 Préparation des isolats .....	50
II.2.2.3.3.7 Lecture des plaques après 48 heures d’incubation .....	53
 III. Résultats .....	54
<i>III.1 Echantillon .....</i>	54
<i>III.2 Résultats de la chimiosensibilité in vitro de Plasmodium falciparum</i> .....	55
III.2.1 Résultats des tests de sensibilité in vitro aux 1, 2, 3-triazoles.....	55
III.2.2 Résultats des tests de sensibilité des dérivés triazolés de la vitamine D <sub>2</sub> .....	57
 <b>COMMENTAIRE .....</b>	59
 <b>IV. Commentaires .....</b>	60
 <b>CONCLUSION .....</b>	61
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	61

# **INTRODUCTION**

Le paludisme est la première maladie parasitaire humaine au monde et constitue de nos jours un véritable problème de santé publique. Il touche non seulement la santé de millions d'individus mais affecte le développement des pays pauvres. Il sévit de manière endémique en Afrique Sub-saharienne et ce sont les très jeunes enfants qui payent le plus lourd tribut à cette maladie en termes de gravité des cas et de mortalité (**Carneiro I.**, 2010).

En 2015, selon le rapport de l'OMS 214 millions de cas de paludisme ont été enregistré dont 80% en Afrique Sub-saharienne, 3,2 milliards étaient exposés au paludisme soit près de la population mondiale et la mortalité associée au paludisme était estimée à 438000 décès dont plus des 2/3 chez les enfants de moins de 5 ans (**OMS**, 2015).

Au Sénégal le paludisme constitue un problème sanitaire public important. En effet, il sévit de manière quasi permanente avec une recrudescence saisonnière pendant l'hivernage.

En 2009, le taux de morbidité proportionnelle était de 3,07% de cas confirmé et le taux de mortalité proportionnelle de 4,07% (**PNPL Sénégal**, 2011-2015).

Le traitement de cette maladie a été fait pendant plus de 30 ans par la chloroquine puis une résistance du parasite à cette molécule est apparue accompagnée d'une augmentation drastique de la mortalité (**WHO**, 2015).

Ainsi, en Afrique, des taux élevés de chloroquino-resistance ont conduits certains pays endémiques dont le Sénégal à utiliser la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) en première ligne vers les années 2000 avec apparition de souches résistances dans certaines régions (**Gaye O**, 2002 ; **Nuwaha F**, 2001 ; **Shretta R**, 2000).

Au Sénégal, le programme national de lutte contre le paludisme (PNPL) a changé sa politique nationale de traitement de l'accès palustre simple en

introduisant l'association sulfadoxine-pyriméthamine-amodiaquine en 2003 (**PNLP Sénégal**, 2003).

Depuis 2006, l'OMS a recommandé l'utilisation de combinaisons thérapeutiques à bases de dérivés d'artémisinine (CTA) et de retirer progressivement du marché les monothérapies à base d'artémisinine (**PNLP Sénégal**, 2007).

Pour lutter contre le paludisme, des interventions essentielles ont été préconisées par l'OMS ; à savoir, l'utilisation des moustiquaires imprégnées, l'application de pulvérisations intradomiciliaires, ainsi qu'un diagnostic rapide des cas présumés, et un traitement efficace des cas confirmés (**PNLP Sénégal**, 2007) ; le traitement préventif intermittent (TPI) chez les femmes enceintes et chez les nourrissons, et récemment la chimioprévention saisonnière du paludisme (CSP) (**OMS**, 2012).

Par conséquent il est important de développer un nouvel antipaludéen plus efficace. C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'évaluation de l'activité antiplasmodiale des 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués.

Notre objectif général est de déterminer l'activité *in vitro* de dix (10) 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués sur des souches de *Plasmodium falciparum*.

Cet objectif général se décline en objectifs spécifiques :

- Etudier la sensibilité des souches vis à vis des composés
- Mesurer les CI<sub>50</sub> de dix triazoles, de la chloroquine et de l'artémisinine comme références sur des souches de terrains (15) et de laboratoires (2).
- Analyser les résultats selon les modifications structurales.

Notre travail s'est articulé autour de deux grandes parties : une première partie contenant des rappels bibliographiques sur le paludisme et les triazènes ; une deuxième partie où nous présenterons le travail personnel.

Pour finir nous allons conclure en ouvrant des perspectives.

# GENERALITES SUR LE PALUDISME ET LES TRIAZENES

## Chapitre I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LE PALUDISME

### I. Définition

Le paludisme est une maladie transmise par un moustique hématophage du genre anophèles, et est causé par un petit parasite protozoaire du genre *Plasmodium* qui infecte alternativement l'homme et le moustique. C'est une maladie très ancienne qui est probablement originaire d'Afrique et a suivi les migrations humaines vers les côtes de la Méditerranée, jusqu'en Inde et en Asie du Sud-Est. Dans le passé, le paludisme était fréquent dans les marais Pontins, autour de Rome et son nom a été tiré de l'italien (mal-aria ou « mauvais air »). Il était aussi connu sous le nom de fièvre romaine (**Doucet K.G.**, 2006).

### II. Epidémiologie

#### II.1. Agent pathogène

##### II.1.1 Classification

Les agents pathogènes du paludisme sont des protozoaires appartenant au phylum des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoea*, à la sous-classe des *Coccidia*, à l'ordre des *Eucoccidiida*, au sous ordre des *Haemosporina*, à la famille des *Plasmodiidae* et au genre *Plasmodium* (**Khalaj A.**, 2001). Les cinq espèces plasmodiales parasites de l'homme sont :

*Plasmodium falciparum* : c'est l'espèce la plus redoutable responsable de la fièvre tierce maligne. Elle parasite toutes les hématies quel que soit leur âge, responsable aussi de l'accès pernicieux et indirectement de la fièvre bilieuse hémoglobinurique.

*Plasmodium malariae* est l'agent de la fièvre quarte : c'est l'espèce qui parasite les hématies âgées.

*P. ovale* et *P. vivax* responsables de la fièvre tierce bénigne parasitent les plus jeunes hématies (**Ambroise-Thomas-P.**, 1984).

*P. knowlesi*, actuellement la cinquième espèce zoonotique du singe est reconnue responsable d'un nombre important d'infections humaines en Asie du Sud-Est (**Danis M.**, 1991 ; **Moor D.V.**, 1961).

## II.1.2 Biologie

### II.1.2.1 Habitat

Le Plasmodium est un parasite intracellulaire retrouvé chez l'homme au niveau du foie et du sang. Chez l'anophèle on le retrouve au niveau du système digestif et au niveau de la trompe (Fig 1).

### II.1.2.2 Cycle évolutif du parasite

Il est le même pour les quatre espèces à part quelques particularités. Il comprend un cycle sporogonique (sexué) avec multiplication chez l'anophèle femelle et un cycle schizogonique (asexué) chez l'homme (**Desowitz R.S.**, 1991).

#### ➤ La schizogonie

Elle se déroule en deux phases : une phase hépatique et une phase sanguine.

##### ❖ Phase hépatique

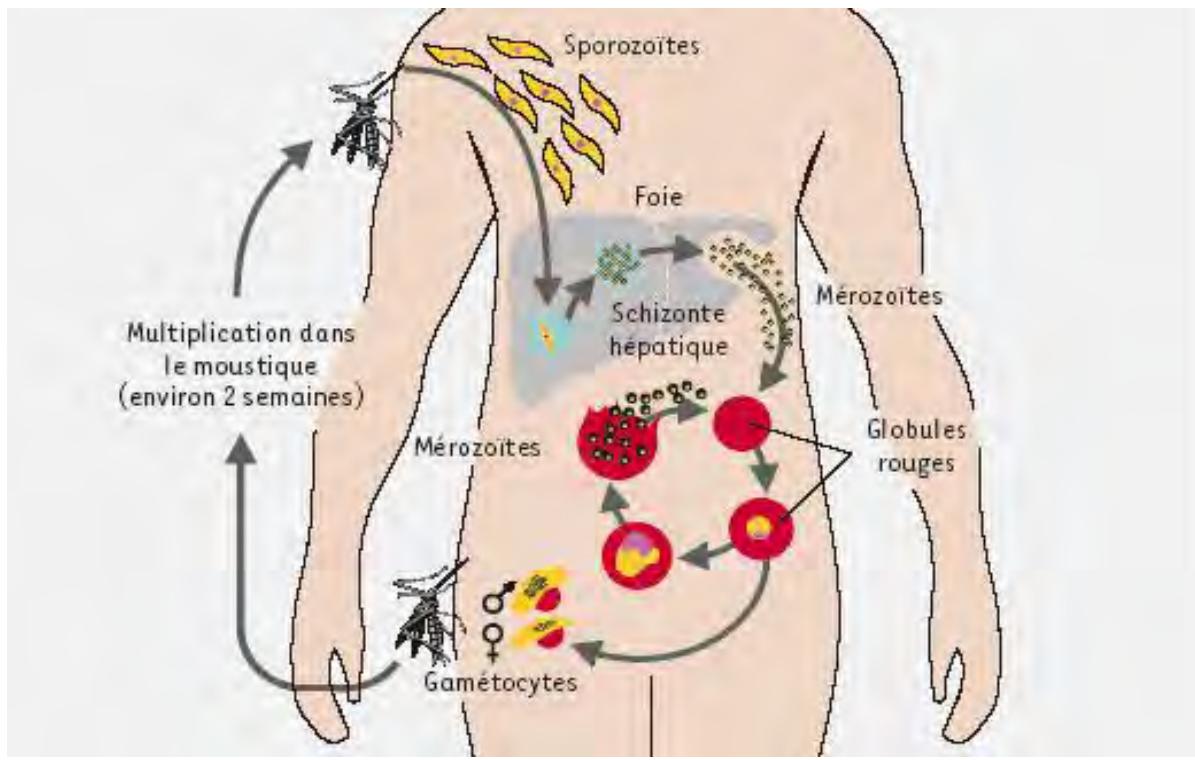
L'homme est infecté lors d'une piqûre de moustique du genre *Anopheles femelle*, qui lui injecte le parasite sous forme de « sporozoites » qui gagnent le foie en moins de 30 minutes. Ils pénètrent dans la cellule hépatique (hépatocyte), ou ils se divisent très activement pour donner naissance, en quelques jours, à des dizaines de milliers de nouveaux parasites : les « merozoites ». L'hépatocyte éclate en libérant ces parasites dans le sang, qui pénètrent et se multiplient à l'intérieur des globules rouges.

Les espèces de *P. vivax* et *P. ovale* donnent parfois des rechutes tardives, 4 à 5 ans après la primo-infection, car le parasite peut subsister sous une forme latente « hypnozoite » dans la cellule hépatique.

❖ Phase sanguine ou érythrocytaire

Les merozoites pénètrent dans les hématies, se transforment en trophozoites puis par multiplication en schizontes. Lorsque ces derniers éclatent les « merozoites » ainsi libérés infectent de nouveaux globules rouges. Pour l'espèce *P.falciparum*, le nombre de merozoites est plus élevé, et dure soit 48 heures (*P.falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*), soit 72 heures (*P.malariae*), rendant compte de la périodicité fréquemment notée au cours des accès fébriles. La plupart des antipaludiques n'agissent que sur les formes érythrocytaires.

Après plusieurs cycles, apparaissent dans les hématies des gamétocytes mâles et femelles.



**Figure 1:** Cycle de vie du plasmodium

[Http www.svtmarcq.over-bloc.com/article-génétique-et-évolution-term-s-64420888](http://www.svtmarcq.over-bloc.com/article-génétique-et-évolution-term-s-64420888)

### ➤ La sporogonie

Lors d'une piqûre chez un paludéen, le moustique absorbe les gamétoctyes. Seuls les gamétoctyes, après différenciation en gamètes mâle et femelle et après fécondation, donnent un œuf ou « ookinète » qui s'implante sous la paroi de l'estomac du moustique en formant l'oocyste, dans lequel vont se développer des sporozoites. Ces sporozoites gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique ; à partir de ce réservoir, ils pourront à leur tour être inoculés à un sujet réceptif. Cette étape, selon les conditions climatiques et les espèces plasmodiales, dure environ 10 à 30 jours. Elle nécessite des températures d'au moins 17 °C à 20 °C et une hygrométrie supérieure à 60 %.

### **II.1.3 Culture du Plasmodium**

Tragger et Jansen en 1976 ont pu cultiver les plasmodes à partir des milieux spécifiques : RPMI auquel on ajoute un tampon HEPES, de l'hypoxanthine, de la soude, de la gentamicine, du bicarbonate de sodium à 3,6%, du serum humain frais à 15%, et du sang du groupe O. Le tout est ramené à un pH à 6,75. L'incubation se fait à 37 °C en atmosphère gazeuse (N<sub>2</sub> : 93%, CO<sub>2</sub> : 4%, O<sub>2</sub> : 3%), pendant 48 à 72 h. Grâce à cette culture on peut préparer des antigènes pour réaliser les études de chimiosensibilité *in vitro*.

### **II.2. Vecteur du paludisme**

Les anophèles femelles hématophages sont les seuls moustiques susceptibles d'assurer la transmission du paludisme par leur piqûre chez l'homme. En effet, c'est chez ces moustiques que s'effectue le cycle sporogonique et sur 400 espèces recensées dans le monde, 60 sont responsables de cette transmission dont une vingtaine d'espèces sont des vecteurs majeurs (Kabore N., 1993). Elle ne pique qu'à partir du coucher du soleil avec un maximum d'activité entre 23 heures et 6 heures du matin. Cela explique que l'utilisation des moustiquaires est le moyen de prévention individuelle le plus efficace (Wery W., 1991).

### **II.3. Modes de transmission**

Le paludisme est transmis à l'homme par la piqûre de l'anophèle femelle lors d'un repas sanguin. Signalons également la possibilité de transmission congénitale, de transmission par transfusion sanguine, ou de contamination accidentelle chez le personnel médical manipulant du sang parasité. Ces modalités ne jouent aucun rôle épidémiologique (Ambroise TP., 1984).

### **II.4 Réservoir de parasite**

Il est essentiellement constitué par l'homme infesté et l'anophèle femelle.

## ***II.5 Facteurs favorisants***

La transmission est liée à plusieurs facteurs qui sont :

**La température** : elle conditionne le cycle sporogonique du parasite.

**L'eau et l'humidité** : en alimentant les gîtes larvaires, elles assurent une multiplication des vecteurs.

**L'altitude** : elle joue un rôle dans l'extension du paludisme en provoquant une distribution locale du vecteur.

**Facteurs anthropiques** : elles sont entre autres les conditions socio-économiques, les modifications du réseau hydrographique, les modifications des couverts végétaux, les mouvements de populations (**Niang M**, 2002).

## **III. Aspects cliniques du paludisme**

Les manifestations cliniques sont diverses dans leur expression et dans leur gravité et dépendent à la fois du parasite (espèce plasmodiale, densité parasitaire) et de son hôte. Ainsi *P. malariae*, *P. vivax* et *P. ovale* sont responsables de la fièvre bénigne alors que *P. falciparum* est redoutable. Il existe deux types de tableaux cliniques :

- les accès simples, qui comprennent le paludisme de primo-invasion et les accès de reviviscence schizogonique à fièvre périodique communs à toutes les espèces plasmodiales ;
- les formes graves dont les accès pernicieux sont dues essentiellement à *P. falciparum*.

### ***III.1 Paludisme de primo invasion***

Il atteint généralement le nourrisson et comporte deux phases :

- Une phase d'incubation qui dure 7 à 20 jours selon l'espèce et correspond à la présence des parasites dans les hépatocytes. Elle est cliniquement muette.

- Une phase d'invasion qui est marquée par une fièvre progressivement croissante qui devient continue, en plateau ou à grandes oscillations irrégulières avec plusieurs pics par jour. Le tableau clinique associe anorexie, douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarrhées, céphalées et myalgies. A l'examen, le foie augmente souvent de volume mais la rate est normale.

Le paludisme de primo-invasion peut être guéri spontanément, dans le cas où il s'agit d'une invasion à *P. falciparum*, elle évolue parfois vers un accès pernicieux secondaire annoncé par la majoration des céphalées et l'apparition de signes encéphaliques.

### ***III.2. Paludisme à Plasmodium falciparum***

#### **III.2 .1. Accès palustre à fièvre périodique**

Elle correspond aux schizogonies érythrocytaires entraînant une fièvre intermittente, en principe rythmée par l'éclatement des schizontes mûrs et le déversement du pigment palustre pyrogène dans le sang. Dans de nombreux cas, il apparaît longtemps après que l'accès fébrile ait été oublié.

Ces accès surviennent souvent le soir et sont caractérisés par la succession de trois phases et à un rythme régulier :

- stade de frissons : violents frissons, froid intense, fièvre élevée à 39 °C, splénomégalie, tension artérielle basse. Il dure une heure environ ;
- stade de chaleur : dure 3 à 4 heures et est caractérisé par une peau sèche brûlante, une température de 40 à 41 °C. Le malade rejette les couvertures ;
- stade de sueurs : la température s'effondre avec hypothermie et il s'en suit une singulière sensation d'euphorie ou de bien-être chez le malade.

L'évolution est rapidement favorable sous traitement. Spontanément la fièvre disparaît après 8 à 12 accès palustre, chez un malade amaigri, asthénique, anémique. Les rechutes sont rares dans le paludisme à *P. falciparum*.

Non traitée, la guérison spontanée est habituelle après quelques accès irréguliers pendant 8 à 15 jours ; mais des complications peuvent survenir : accès pernicieux, risque permanent, engageant le pronostic vital.

### **III.2.2. Paludisme grave**

#### **III.2.2.1. Accès pernicieux**

L'accès pernicieux ou neuropaludisme ou encore paludisme cérébral fait partie des formes graves du paludisme ; il est dû au *P. falciparum*. C'est le grand drame du paludisme. Cette encéphalopathie aiguë fébrile résulte d'une intense multiplication des hématozoaires dans les capillaires viscéraux et notamment intracérébraux. L'OMS définit le paludisme sévère comme la présence d'hématozoaires dans le sang, associée à l'un des signes suivants : fièvre à plus de 40 degrés, pouls à plus de 200 battements/min, coma d'emblée, état de mal convulsif, hypertonie surtout paroxystique, anémie à moins de 3 g/dl, œdème pulmonaire, hépatomégalie, déshydratation et hypoglycémie.

Le neuropaludisme atteint les sujets dépourvus d'immunité. En zone de forte endémie, il s'agit surtout des enfants entre 4 mois et 4 ans et des sujets neufs récemment transplantés, s'ils négligent leur chimioprophylaxie. En zone d'hypo-endémie ou de paludisme saisonnier, les adultes autochtones mal prémunis ne sont pas à l'abri des accès pernicieux. Lié à une parasitémie intense, l'accès pernicieux est surtout fréquent sous les tropiques en fin d'hivernage, période de transmission active du paludisme.

L'évolution de l'accès pernicieux dépend de la rapidité et de la qualité du traitement. Non traité, il est le plus souvent fatal en deux ou trois jours.

Mais, même traité sans trop de retard, le taux de létalité reste élevé 10 à 30% et les séquelles neurologiques sont possibles surtout chez l'enfant.

Rapidement et correctement traité, la guérison survient sans séquelles ; en particulier dans les cas convulsifs, il n'y a pas d'épilepsie résiduelle.

### **III.2.2.2. Paludisme viscéral évolutif**

C'est un paludisme subaigu ou chronique qui survient en zone d'endémie chez les sujets soumis à des infestations massives et répétées à *P. falciparum* ou *P. vivax* suite à une chimioprophylaxie absente ou peu efficace. Le tableau associé est le suivant : anémie avec son cortège habituel

(Pâleur, asthénie, dyspnée, souffle anorganique, œdèmes), amaigrissement, une splénomégalie constante, une fébricule autour de 38 °C et parfois des poussées thermiques plus importantes. Biologiquement on note une leuconeutropénie, une thrombopénie, une hypergammaglobinémie à IgG. La guérison spontanée est rare et l'aggravation fréquente. Dans certains cas les manifestations sont frustrées ou au contraire cachectisantes. Sous traitement antipaludique, l'amélioration est lente mais spectaculaire.

### **III.2.2.3. Fièvre bilieuse hémoglobinurique**

Syndrome décrit entre 1910 et 1940 qui survenait chez les sujets prenant irrégulièrement une chimioprophylaxie et / ou des traitements par la quinine.

La symptomatologie associe : un début brutal avec lombalgie, pâleur, fièvre avec ictere, oligurie. Son pronostic est fonction de la rapidité à corriger l'anémie et à obtenir une reprise de la diurèse.

## **III.3. Paludisme et grossesse**

Les symptômes et les complications du paludisme au cours de la grossesse diffèrent selon l'intensité de la transmission et, par suite, le taux d'immunité acquis par la femme enceinte.

Chez la femme enceinte, l'infection palustre se caractérise par une anémie souvent grave et cette infection risque de provoquer toute une gamme d'effets dommageables : avortement spontané, décès néonatal, insuffisance pondérale à la naissance. (**Nishiwaki K.**, 2007 ; **Desowitz R.S.**, 1991)

#### **IV. Diagnostic biologique**

Les techniques de diagnostics actuellement utilisées comprennent la mise en évidence de parasites ou de matériel parasitaire (ADN) dans les prélèvements et le titrage des anticorps anti-plasmodiaux dans le sérum.

##### ***IV.1. Diagnostic direct***

Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence dans le sang de *Plasmodium* dont l'espèce doit être précisément déterminé (**Wery W**, 1991 ; **Ambroise-Thomas S**, 1992). Plusieurs techniques sont utilisées:

- **Test de Diagnostic Rapide (TDR)** : les TDR sont d'exécution rapide et de lecture facile pouvant être réalisés par un personnel moyennement formé. Ils sont indiqués particulièrement dans les structures non spécialisées lorsque l'examen microscopique n'est pas disponible (**Hance P**, 2005). Leurs performances dépendent essentiellement de la parasitémie (**Minodier P**, 2005). Ils sont également moins performants avec les espèces autres que *P. falciparum*, particulièrement *P. ovale* (**Grobush M P**, 2002). Les TDR doivent être considérés comme un complément des autres méthodes diagnostics. Leurs résultats doivent être vérifiés et complétés si possible par l'examen microscopique. Leur positivité permet une prise en charge adéquate et rapide des patients. En revanche, leur négativité ne doit pas écarter le diagnostic (**Hance P**, 2005).
- **Examen après coloration** est effectué sur frottis mince et sur goutte épaisse colorés au Giemsa. Le prélèvement doit être effectué avant toute prise d'antipaludique. Il consiste à recueillir une à deux gouttes de sang

sur lame, par piqûre à l'aide d'un vaccinostyle au bout du doigt, au lobule de l'oreille ou au talon chez l'enfant après l'infection. Le frottis mince permet l'identification précise de Plasmodium puisque les hématies peuvent être observées de même que la morphologie des parasites. La goutte épaisse réalise une concentration des parasites sur une surface plus petite que dans le frottis, ce qui permet de dépister une parasitémie moindre. De nombreux laboratoires associent ces deux types de prélèvement pour le diagnostic biologique du paludisme (**Wery W**, 1991 ; **Ambroise-Thomas S**, 1992).

- **Quantitative Buffy Coat (Q-B-C)** est une méthode qui associe isolement de l'hématie parasitée à une coloration par un fluorochrome l'acridine orange. Elle ne peut pas permettre une identification précise ni une numération des hématies parasitées (**Wery W**, 1991 ; **Ambroise-Thomas S**, 1992).
- **La Polymérase Chain Réaction (PCR)** est une nouvelle technique résultant de la biologie moléculaire (**Wery W**, 1991; **Ambroise-Thomas S**, 1992) et consiste à l'amplification génique par PCR. C'est la technique la plus sensible qui permet de détecter de très faibles parasitémie de l'ordre de 0,3 parasite/ $\mu$ l de sang avec une possibilité de quantification de l'ADN plasmodial en utilisant la PCR quantitative (**Hanscheid T**, 2002 ; **De Monbrison F**, 2003).

#### ***IV.2.Diagnostic indirect***

Il est surtout utilisé en épidémiologie et permet de poursuivre l'endémicité palustre, l'importance de la transmission et l'efficacité des mesures de prévention (**Wery W**, 1991 ; **Ambroise-Thomas S**, 1992). Il s'agit de l'immunofluorescence indirecte, l'hémaglutination, l'immunodiffusion et le parasight®.

Récemment, notre emminent professeur **Ndiaye** et **col** a mis au point un nouveau test de diagnostic rapide **illumigene malaria** un test innovant qui permet de détecter des parasitoses de densité très faible en moins d'une heure.

## V. Traitements

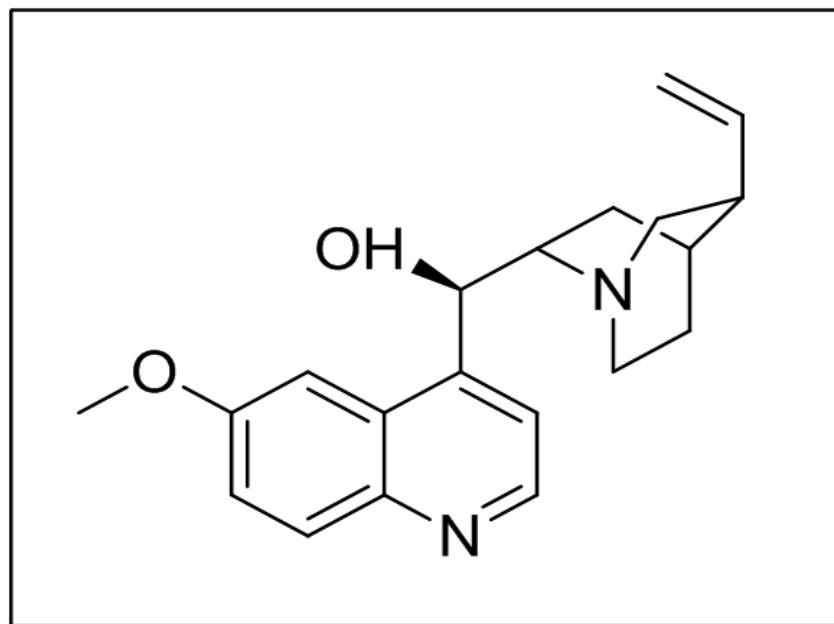
Les médicaments antipaludéens sont classés en fonction de divers critères selon l'origine naturelle ou synthétique. Selon le point d'impact du médicament sur l'un des stades du parasite chez l'homme, on distingue des schizonticides actifs sur les formes asexuées intra-érythrocytaires et les gamétocytocides actifs sur les gamétozytes sanguins, aussi sur les formes intra- hépatiques.

### V.1 Antipaludiques naturels

Ce sont des extraits de plantes. Il y a deux sources : la pharmacopée inca qui utilisait les écorces d'une plante appelé quinquina qui a donné la quinine ; la pharmacopée chinoise utilisait l'armoise douce ou annuelle: *Artemisia Annua* qui a donné l'artémisinine.

#### ➤ La quinine

C'est un arylméthanol, d'action schizonticide puissante. Elle est d'absorption et d'élimination rapide. Il existe de très nombreuses présentations commerciales et génériques de la quinine. On peut citer : Quinimax®, Quinoforme®, Quinine chlorhydrate®, Quinine sulfate® et Paluject.

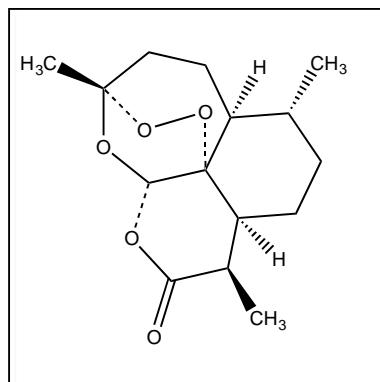


**Figure 2 :** structure de la quinine

➤ L'artémisinine et ses dérivés

Son extraction se fait à partir de l'armoise douce ou annuelle : *Artemisia annua*.

- La dihydroartémisinine (DHA) : Cotecxin® ; Alaxin® ; Artémax®
- Artéméther : Paluther®; Artésiane®; Artémédine®; Gvither®
- Artésunate: Arsumax®; Plasmotrium®; Arinate®; Arthésis®

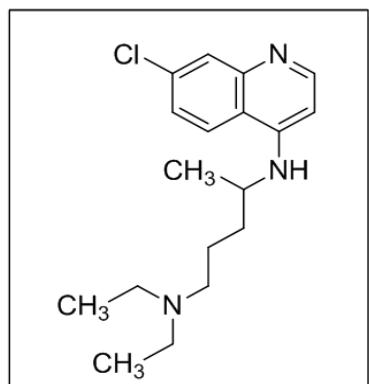


**Figure 3 :** Structure de l'artémisinine

## V.2 Antipaludiques de synthèses

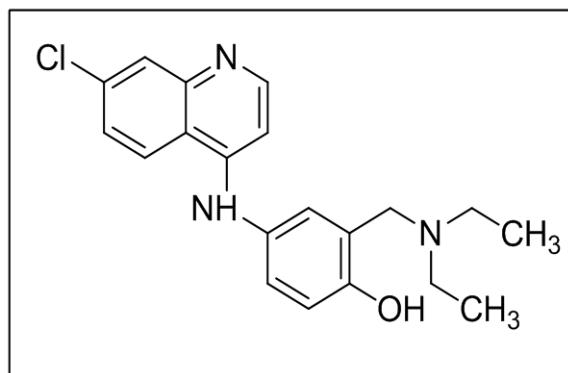
➤ Les 4-aminoquinoléines : Ce sont les antipaludiques synthétisés entre 1930 et 1945. La chloroquine et l'amodiaquine sont les plus utilisées du fait de leur bonne tolérance, de leur efficacité et de leur faible coût.

- Chloroquine : Nivaquine® ; Résorchine®



**Figure 4 :** Structure de la chloroquine

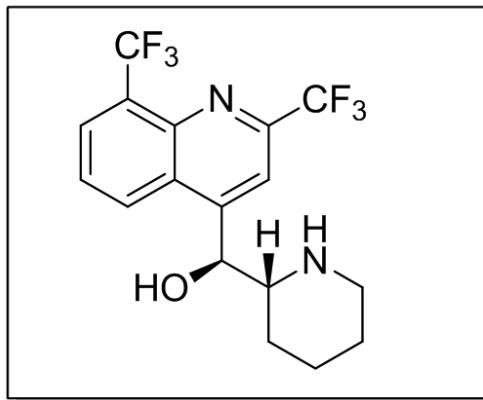
- Amodiaquine : Flavoquine® ; Camoquin®



**Figure 5 :** Structure de l'amodiaquine

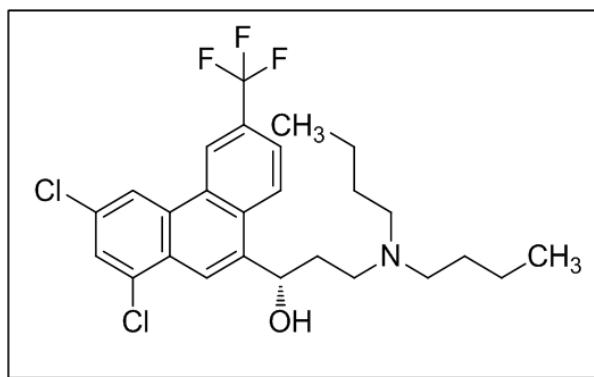
➤ Les aryl-alcools :

- La Méfloquine : LARIAM®



**Figure 6 :** Structure de la m&eflloquine

- Halofantrine : HALFAN®



**Figure 7 :** Structure de l'Halofantrine

### V.3 Antim&egravetaboliques

Ce sont des schizonticides & action lente qui agissent par inhibition de la synth&eacutese des acides nucl&eacuteiques des plasmodiums et sont r&eacutepartis en deux familles:

➤ Les antifoliques :

- Sulfamides : Sulfadoxine = Fansil®
  - Sulfones : Diamino-diph&eacutenyle sulfone = Disulfone® ou Dapsone®
- Les antifoliniques
- Pyrim&eacutethamine : Daraprim® ou Malocide®
  - Proguanil : Paludrine®

#### V.4. Gamétocytocides

Ce sont des dérivés des 8- aminoquinoléines qui agissent par inhibition de la synthèse de l'ADN des gamétocytes présents dans le sang humain. La primaquine est le chef de file utilisé comme anti-rechute dans le cas de paludisme à *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* ; son utilisation est limitée du fait de sa toxicité et de sa mauvaise tolérance. Elle est méthémoglobinisante et hémolytique notamment chez les sujets déficitaires enzymatiques en glucose-6 -phosphate déshydrogénase (G -6-PD).

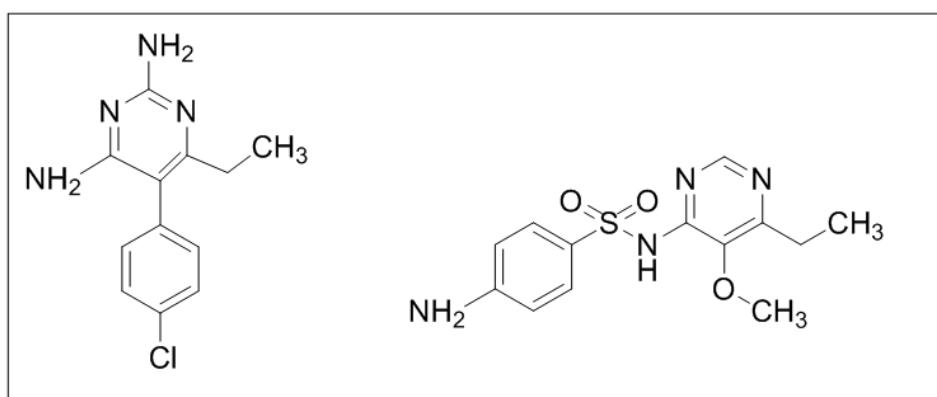
#### V.5. Antibiotiques

Ce sont les cyclines, macrolides, fluoroquinolones ; leur action est très lente. Ils ne doivent être utilisés que comme antipaludique de troisième intention, surtout dans les formes chroniques.

#### V.6. Associations

Elles sont appelées nouvelles combinaisons thérapeutiques et permettent d'améliorer leur efficacité sur les souches chimiorésistants. On peut citer :

- Sulfadoxine + Pyriméthamine : Fansidar®



**Figure 8 :** Structures de la pyriméthamine et de la sulfadoxine

- Dapsone + Pyriméthamine: Maloprim®
- Sulfadoxine + Pyriméthamine + dihydroartémisine: Alaxin-SP®
- Sulfadoxine + Pyriméthamine + Mefloquine: Fansimef®
- Chloroquine+ Proguanil: Savarine®

Pour la lutte contre la résistance du *Plasmodium falciparum* aux antimalariques classiques de synthèses et pour prévenir la résistance de ce *Plasmodium falciparum* aux dérivés de l'artémisinine, L'OMS a recommandé des combinaisons de ces dérivés de l'artémisinine avec ces antipaludiques de synthèses. Ces combinaisons sont connues sous le nom d'ACT (Artemisinin Combinaison therapy) et sont utilisées dans de nombreux pays africains d'endémies palustres. Cinq options d'ACT ont été proposées par L'O.M.S.

Ce sont les suivantes :

Artéméther +Luméfantrine : Coartem®, Co-artésiane®, Artefan, Cofantrine®

Artésunate + Amodiaquine : Arsucam®, Amonate®

Artésunate + Mefloquine : Artequin®

Artésunate + Sulfaméthoxypyrazine +Pyriméthamine : Co-Arinate®

Artésunate + Sulfadoxine + Pyriméthamine : Arsudar® (**Badiane M**, 1995 ; **Boulos M**, 1992 ; **Charmot G**, 1991 ; **Charmot G**, 1990 ; **Danis M**, 1991)

## VI. Chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*

Malgré les efforts déployés pour la découverte de nouveaux médicaments antiplasmodiques et la mise en place effective par les systèmes de santé de combinaisons thérapeutiques pour le traitement antipaludique, *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances, y compris les CTA (**PNLP Sénégal**, 2010).

## **VI.1 Définition**

La chimiorésistance selon l'OMS est définie comme l'aptitude d'une souche de parasite du paludisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinaires recommandées mais comprises dans les limites de tolérances du sujet (**Basco L, 2000**).

## **VI.2 Nature de la chimiorésistance**

La génétique de la chimiorésistance de plasmodium a été étudiée. Il en résulte que la résistance aux inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (Pyriméthamine) et aux 4-aminoquinoléines est due à une mutation spontanée de gènes nucléaires. Les gènes pharmacorésistants sont donc très stables en l'absence de la pression d'antipaludique. Il a été également démontré que le nombre de mutations nécessaires à l'obtention de parasites hautement résistants varie avec l'antipaludique. Avec la pyriméthamine, une seule mutation au niveau du gène codant pour la dihydrofolate suffit ; de même que la chloroquine.

## **VI.3 Apparition de la chimiorésistance**

L'apparition de la chimiorésistance de *P. falciparum* nécessite l'intervention de trois principaux facteurs : le parasite, l'antipaludique et l'hôte humain. Ainsi, l'utilisation de faibles doses d'antipaludiques (doses prophylactiques ou infra thérapeutiques lors d'automédication ou de traitement dans les dispensaires), va sélectionner, chez le malade, des parasites asexués résistants. « La rapidité de cette sélection est directement proportionnelle à la pression médicamenteuse, au nombre de parasites exposés, au taux de mutation chez les parasites ». Elle augmente également avec la longueur de la demi-vie de l'antipaludique utilisé. D'autre part, l'apparition de la résistance peut être due à l'existence d'une résistance croisée entre des antipaludiques présentant une parenté structurale ou un mécanisme d'action semblable. En zone d'endémie palustre, cette sélection va être dépendante ou non de l'apparition de la

résistance de *P. falciparum* à l'antipaludique, cela dépendant de l'état de l'immunité anti palustre du sujet vis-à-vis de cette espèce.

#### **VI.4 Propagation**

L'apparition de la résistance de *Plasmodium falciparum* à un antipaludique dans une zone endémique donnée est inéluctablement suivie par sa propagation (Augmentation de la fréquence et du niveau de résistance) si aucune mesure de lutte n'est entreprise (**Thaithong S**, 1983).

Cette propagation est en effet avant tout liée à des facteurs biologiques : au cycle évolutif du parasite et aux fondements génétiques de la chimiorésistance des plasmadiums à des rongeurs et l'aptitude des gènes chimiorésistants à se recombiner qui ont été extrapolés à *Plasmodium falciparum*.

Mais la rapidité de cette propagation est liée à d'autres facteurs, essentiellement épidémiologiques qui sont intimement liés. Ils sont relatifs à l'hôte humain, à l'anophèle et à la manière d'utiliser les antipaludiques.

L'un des pires facteurs est la pression médicamenteuse (**Baudon D**, 1985). Les antipaludiques par la pression médicamenteuse qu'ils exercent permettent ainsi la multiplication des souches résistantes (**Bamba S**, 2003). Les autres sont les suivants :

La présence d'une population non immune ou faiblement immune : c'est la population à haut risque pour la morbidité et la mortalité liée au paludisme donc le groupe cible pour le traitement et la prophylaxie de cette maladie. C'est donc principalement sur elle que va s'exercer la pression sélective de l'antipaludique. Cette dernière va conduire à des cas de paludisme à *Plasmodium falciparum* chimiorésistants (avec ou sans accès), avec l'apparition de gamétocytes porteurs de gènes chimiorésistants source de contamination des anophèles vecteurs. La composition de cette population varie avec le niveau de l'endémie palustre. Dans

les zones de forte transmission où l'immunité de prémunition s'acquierte très tôt, elle est représentée par les nourrissons et les jeunes enfants (**Moor D.V**, 1961).

En zone de faible transmission où l'immunité de prémunition s'acquierte très lentement ou pas du tout (**Pradines B**, 1998), elle est plus importante concernant en outre les grands enfants et les adultes.

La densité anophélien vectrice : la transmission des parasites chimiorésistants dans la population humaine était assurée par les anophèles, la propagation de la résistance va augmenter avec la fréquence des contacts homme-anophèle.

L'avantage biologique des souches chloroquino-résistantes sur les souches chloroquinosensibles : cela a été démontré dans le cycle érythrocytaire pour les souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium chabaudi* chez les souris et de *Plasmodium falciparum* en culture.

D'autre part une fois devenues chloroquino-résistantes les plasmadies, si elles sont de nouveau exposées à la chloroquine, peuvent provoquer des infestations plus fortes chez les moustiques ce qui augmenterait la capacité vectorielle, donc la propagation de la résistance, même en zone de faible transmission du paludisme.

Cependant pour Guiguemde et collaborateurs (**Guiguemde T. R**, 1987), il semble que cette transmission sélective des parasites résistants soit plutôt due au fait que les parasites sensibles ont disparu sous l'effet de l'antipaludique.

Les mouvements de population (professionnels, touristes ou suites à des catastrophes et révoltes dans les pays tropicaux) vers les zones d'endémie palustre : ils jouent un rôle important dans la propagation géographique de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*.

Cette propagation se fait selon deux modalités : le déplacement de porteurs de gamétocytes avec des gènes chimiorésistants dans une telle zone en période de

transmission du paludisme, va permettre l'apparition de la résistance dans la population autochtone non immune.

## ***VI.5 Facteurs favorisant l'apparition et la diffusion de la chimiorésistance***

Les facteurs sont constitués par :

- la pression médicamenteuse ;
- les mouvements de population humaine et/ou anophélien ;
- le niveau de transmission ;
- le degré d'immunité de l'hôte.

## ***VI.6 Méthodes d'études***

### ***VI.6.1 Méthodes *in vivo****

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 (**Pradines B, 2010**).

Elles consistent à administrer à un sujet porteur de *P. falciparum* la dose ordinaire recommandée de l'antipaludique à tester, et à contrôler la disparition des parasites du sang au bout d'un temps donné. Le temps nécessaire pour apprécier la réponse *in vivo* d'un traitement fait l'objet de beaucoup de discussions. L'OMS recommande de faire un test *in vivo* de 28 ou 42 jours.

Les tests *in vivo* comprennent :

- un suivi clinique par une vérification de la présence ou non de symptômes. Cela permet la recherche d'un éventuel échec thérapeutique mais aussi, de réactions indésirables au traitement.

La réponse clinique est appréciée de manière suivante :

- Une réponse clinique satisfaisante
- Un échec thérapeutique précoce entre J1 et J3

- Un échec thérapeutique tardif entre J7 et J42
- un suivi parasitologique par un étalement de sang servant à la numérotation des plasmodesies

La réponse clinique et parasitologique adéquate ne peut être confirmée qu'après une correction par les techniques moléculaires (PCR) afin de pouvoir distinguer une réinfestation d'une recrudescence (**OMS**, 1968).

### **VI.6.2 Méthodes *in vitro***

Comme pour les tests *in vivo*, ils existent plusieurs tests *in vitro*, parmi lesquels le plus fiable, le plus reproductible et le plus utilisé est le microtest isotopique. Il est réalisé par incubation des parasites dans un milieu de culture standardisé réparti dans des puits contenant une gamme de concentration des médicaments (**Desjardins R E**, 1996). L'inhibition de la concentration parasitaire est tracée en fonction de la concentration des médicaments et de la concentration inhibitrice à 50%, puis calculée par régression linéaire ou non linéaire.

On peut aussi citer d'autres tests :

- Le microtest colorimétrique : DELI (Double Site Enzyme Linked Lactate déshydrogénase immunodétection) (**Druilhe**, 1996)
- Le DAPI test (Diaminophényl indole)
- Le SYBR green

## **VII. Prophylaxie**

### **VII.1 Chimioprophylaxie**

- Chimioprophylaxie de l'enfant

L'OMS recommande actuellement la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) en zone de forte transmission saisonnière dans toute la sous-

région du Sahel. Un traitement complet d'amodiaquine et de sulfadoxine-pyriméthamine (AQ+SP) doit être administré aux enfants âgés de 3 à 120 mois à intervalles réguliers d'un mois, en commençant au début de la saison de transmission et en donnant au maximum quatre doses pendant celle-ci (dans la mesure où les deux médicaments conservent une efficacité antipaludique suffisante) (**OMS**, 2012).

➤ Chimioprophylaxie de la femme enceinte

Le traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPI) est essentiel à la prévention du paludisme chez les femmes enceintes vivant dans des zones de paludisme endémique. Le traitement se compose d'au moins de deux doses de sulfadoxine-pyriméthamine (SP) administrées pendant le deuxième et le troisième trimestre de la grossesse (**Roll Back Malaria**, 2010).

➤ Chimioprophylaxie du voyageur

Pour les sujets séjournant pour la première fois en zone d'endémie palustre, il est particulièrement recommandé de prendre un médicament préventif de l'accès palustre (**Van Gompel F**, 1989). En fonction des zones de voyages prévus, la chimioprophylaxie est basée sur plusieurs produits : Savarine<sup>R</sup>, Malarone<sup>R</sup>, Lariame<sup>R</sup>, ou cyclines (Tolexine<sup>R</sup>, Doxypalu<sup>R</sup>). Ces produits sont utilisables chez la femme enceinte sauf les cyclines (**Bourée P**, 2006).

## **VII.2 Protection du sujet sain**

➤ Les moustiquaires imprégnées d'insecticides

La moustiquaire imprégnée de pyréthrinoïdes (deltméthrine ou perméthrine) assure la meilleure protection contre les piqûres de moustiques nocturnes du fait de son effet insecticide et insectifuge. Elle doit être en bon état et utilisée correctement (soit bordé sur le matelas, soit touchant le sol). Il est recommandé de se procurer des moustiquaires déjà imprégnées ou de les imprégner soi-même

par des kits d'imprégnations. La rémanence du produit est de six mois mais il existe des moustiquaires imprégnées à longue durée d'efficacité, résistantes à des lavages successifs (**Buxeraud J**, 2008).

➤ Le port de vêtements

Le port de vêtements longs, de toile épaisse si possible, permet de limiter le nombre de piqûres. Les vêtements peuvent être traités avec des répulsifs, souvent de type synthétique ou naturel, mais la protection est en général de courte durée (**Banerjee A**, 2001).

➤ Les répulsifs

Les répulsifs cutanés contiennent un principe actif qui éloigne les insectes sans toutefois les tuer. Ils sont appliqués sur toutes les parties découvertes du corps, visage compris, ainsi que sur les parties pouvant se trouver découvertes à l'occasion de mouvements (**Buxeraud J**, 2008).

➤ La pulvérisation intradomiciliaire

La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent (PID) est une méthode de prévention efficace dans les zones où elle est appropriée d'un point de vue épidémiologique et logistique (**Roll Back Malaria**, 2010). Parmi les insecticides les plus couramment utilisés on peut citer les pyréthrinoïdes (**Roll Back Malaria**, 2008).

### **VII.3 Vaccin**

Il existe au moins 94 candidats vaccins antipaludiques. Ils sont dérivés de seulement une vingtaine d'antigènes. Comme il peut être nécessaire d'ajuster la formulation ou le système d'administration de chacune de ces molécules, le nombre d'essais à effectuer est encore supérieur. Même si le nombre de ces molécules en développement ont pu donner des résultats encourageants, il

n'existe aucune garantie qu'une d'elles ou qu'une de leurs combinaisons permettra d'induire un niveau suffisant d'immunité. Cela continue à justifier l'exploration de nouvelles approches de recherche de vaccins. Les candidats vaccins se distinguent d'abord par les stades parasitaires auxquels les antigènes sont exprimés. De ces stades dépendent l'effet attendu du vaccin et le type de réponse immune susceptible d'être protectrice (**Rogier C, 2006**).

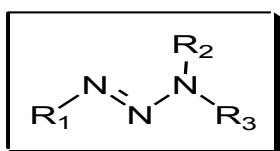
## CHAPITRE II : RAPPELS SUR LES TRIAZENES

### I. Structure générale

Les triazènes sont des composés caractérisés par un groupement

|

fonctionnel — N = N — N — comme une partie des triazèno (**Hill D. T**, 1983). La structure générale du triazène est indiquée dans la figure 9 où les radicaux R peuvent être des groupements alkyles ou aryles. Selon le système de nomenclature de l'IUPAC, les atomes d'azote du groupement azénique sont numérotés consécutivement d'un bout à l'autre, en attribuant le plus petit nombre à la double liaison à savoir le N(1) = N(2) N(3) (**Stefane B**, 1997). Tous les composés qui ont ce motif sont appelés des triazènes.

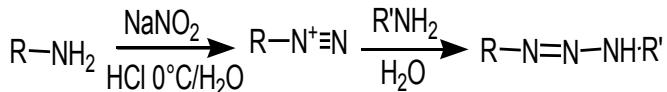


**Figure 9:** Structure générale des triazènes

### II. Méthodes de synthèse

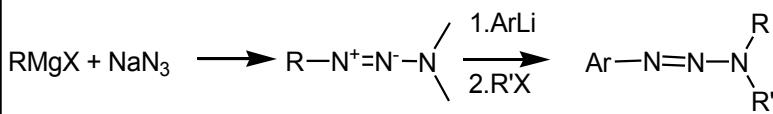
Les triazènes ou diazoamines constituent une classe de composés possédant trois atomes d'azote consécutifs dans un arrangement acyclique ou cyclique (**Khramov D.M**, 2007). Les triazènes peuvent être obtenus par diverses voies de synthèses qui sont réparties en deux grandes méthodes :

- la réaction de couplage d'un sel de diazonium, avec une amine primaire ou secondaire en milieu acide (**Rouzer C.A**, 1996 ; **Doucet K.G**, 2006)



**Schéma 1:** Méthode de synthèse des triazènes par diazocouplation

- la réaction d'un dérivé organométallique avec un azoture de sodium peut être suivie de la réaction d'un alkyl azide avec un réactif de Grignard ou d'un alkylolithium. Les dialkyltriazènes peuvent également être obtenus à partir de cette méthode (**David B**, 2002).



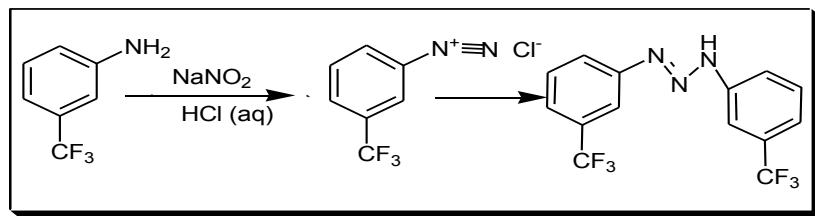
**Schéma 2 :** Méthode de synthèse des triazènes à partir d'un dérivé organométallique

### III. Classification

Selon leur structure on distingue deux types de triazènes :

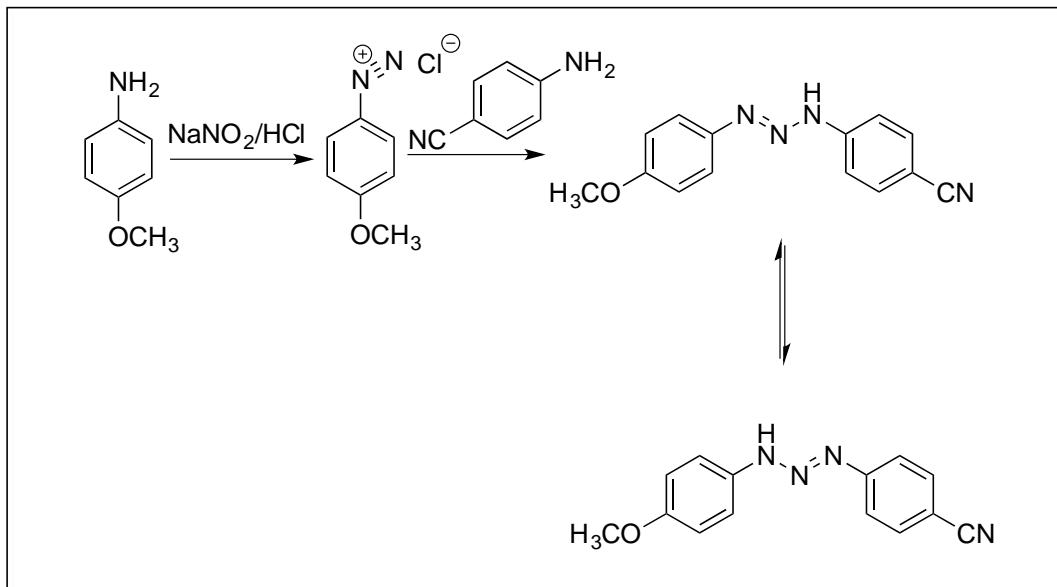
- triazènes acycliques

Ils peuvent être symétriques ou dissymétriques. Dans le cas des triazènes symétriques les substituants portés par N1 et N3 sont identiques. Dans cette classe on peut prendre comme exemple le 1,3-bis [3- (trifluorométhyl) phényl] triazène qui peut être obtenu par la méthode de synthèse la plus courante avec formation du sel de diazonium (**Lim H**, 2006).



**Schéma 3 :** Synthèse du 1,3-bis [3-(trifluorométhyl) phényl] triazène

Nous avons la formation d'un sel de diazonium suivie du couplage avec l'amine primaire qui est le composé de départ. Dans le cas de cette réaction, pour obtenir un composé symétrique la diazotation se fait donc sur moitié des produits de départ. Dans le cas des triazènes dissymétriques : les substituants portés par N1 et N3 sont différents. Ils peuvent être produits aussi par la méthode classique avec formation de sel de diazonium. Nous pouvons prendre comme l'exemple le 4-cyano-4'-méthoxy-1,3-diphényltriazène (**Lim H**, 2006).

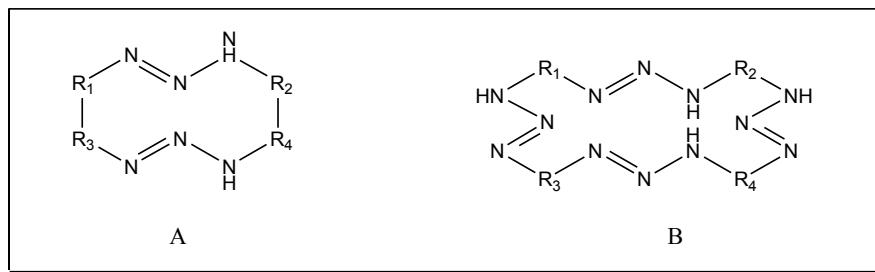


**Schéma 4:** Synthèse du 4-Cyano-4'-méthoxy-1,3-diphényl triazène

Nous avons la formation d'un sel de diazonium suivie du couplage avec l'amine primaire. Ainsi, nous obtenons deux tautomères du fait de l'existence d'un proton au niveau de l'atome d'azote N3.

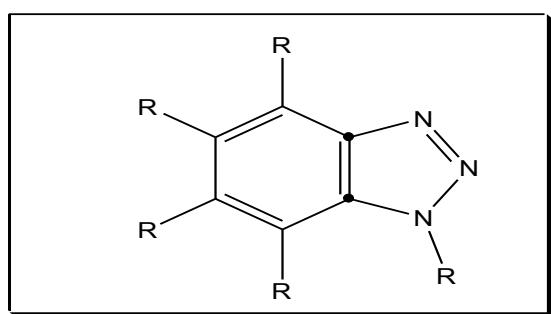
## ➤ Les triazènes cycliques

Ils peuvent être obtenus par combinaison de motifs de triazène en formant un cycle. Ainsi nous pouvons avoir deux cas : les radicaux reliés directement entre eux (A) et les radicaux reliés entre eux par des atomes d'azote (B).



**Figure 10:** Triazènes cycliques

Les triazènes cycliques pourraient avoir une activité antipaludique intéressante du fait de l'originalité de leur structure. Grâce à la densité électronique importante au niveau des motifs triazènes, le fer pourrait être complexé. Le *Plasmodium falciparum* a besoin du fer pour son développement intra-érythrocytaire. C'est pour cette raison qu'il a besoin de l'hémoglobuline. Ainsi, en complexant le fer à un triazène antipaludique on peut combiner l'appât au poison.



**Figure 11:** structure des Benzotriazoles

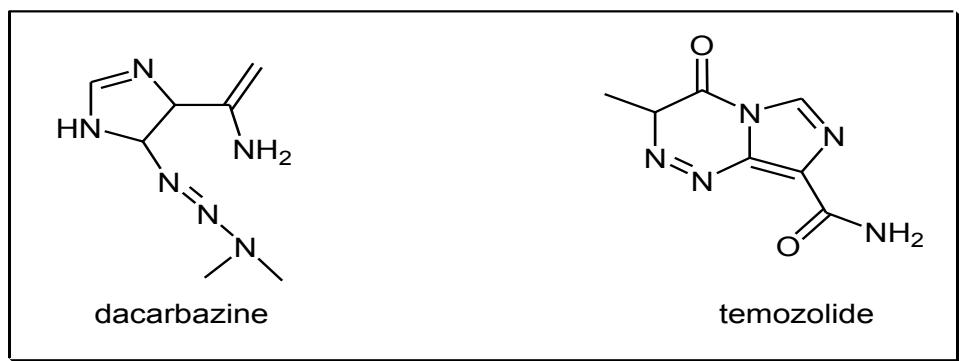
Les benzotriazoles pourraient être considérés comme des triazènes cycliques (**Borowski P**, 2003). Les benzotriazoles sont des composés bicycliques constitués d'un cycle benzénique accolé à un cycle à cinq triazoté.

## IV. Utilisations thérapeutiques des triazènes

Les triazènes sont des éléments importants en synthèse organique. Ils sont doués de plusieurs activités tels que :

➤ Activité anticancéreuse

Les triazènes sont également des agents chimio thérapeutiques pour beaucoup de tumeurs, tels que la tumeur cérébrale, la leucémie, le mélanome, le lymphome et le sarcome (**Nishiwaki K**, 2007 ; **Kanjeekal S**, 2005). Le 3,3-diméthyl-1-aryltriazène ou la dacarbazine peut méthylérer l'ADN des cellules cancéreuses et ainsi inhiber leur multiplication. Elle est utilisée pour le traitement du mélanome malin, du lymphome (**Gesher J. A**, 1981). Le témozolomide de Hodgkin, (**Prous J**, 1994) qui est aussi un triazène, est actuellement utilisé pour traiter le glycome.



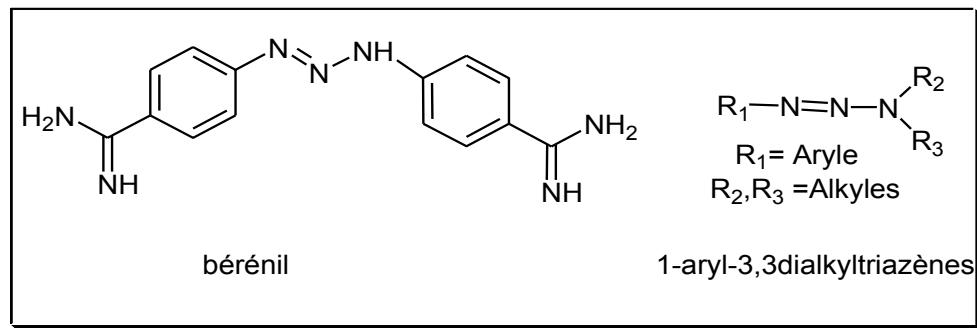
**Figure 12:** Structures de la Dacarbazine et du Témozolide

L'insertion d'un motif de triazène dans la molécule de pyriméthamine génère un potentiel antitumoral avec l'inhibition de la dihydrofolate réductase (**Stevens M. F. G**, 1997).

➤ Activité antipaludique

L'activité antipaludique de plusieurs 1-aryl-3,3-dialkyltriazènes (**fig 13**) a été évaluée chez le *Plasmodium berghei* NK-65 sur des souris infectées. On a constaté que certains de ces 1-aryl-3,3-dialkyltriazènes ont une activité

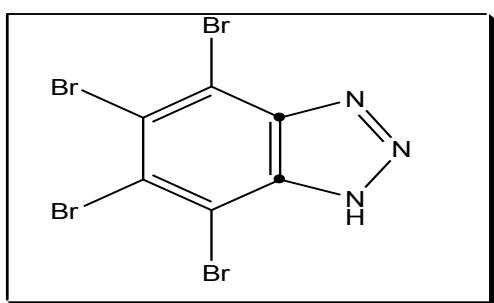
antipaludique puissante avec une dose de 100 mg / kg de poids corporel. Il est également décrit que le Bérénil® (**fig 13**) qui est un triazène est 125 fois plus actifs que la chloroquine(CQ) en activité antipaludique *in vivo* (**O' Reilly S, 1993**).



**Figure 13:** Structures du Bérénil et des 1-aryl-3,3-dialkyltriazènes

#### ➤ Activité antivirale

L'activité antivirale a été démontrée par plusieurs dérivés halogénés du benzotriazole qui sont considérés comme des triazènes cycliques. Une étude faite sur ces molécules a montré qu'elles inhibent l'activité de la NTP ase / Hélicase du virus de l'hépatite C (**Borowski P, 2003**).



**Figure 14:** Structure du benzotriazole halogéné

Les benzotriazoles hétéroaromatiques et le 1-hydroxybenzotriazole à une concentration de 7,5 nM inhibent fortement la 3-Cl-protéase qui est essentielle pour la réPLICATION du coronavirus responsable du SRAS (**Wu C.-Y, 2006**). Plus récemment, un ensemble de dérivés de benzotriazole dotés d'une activité

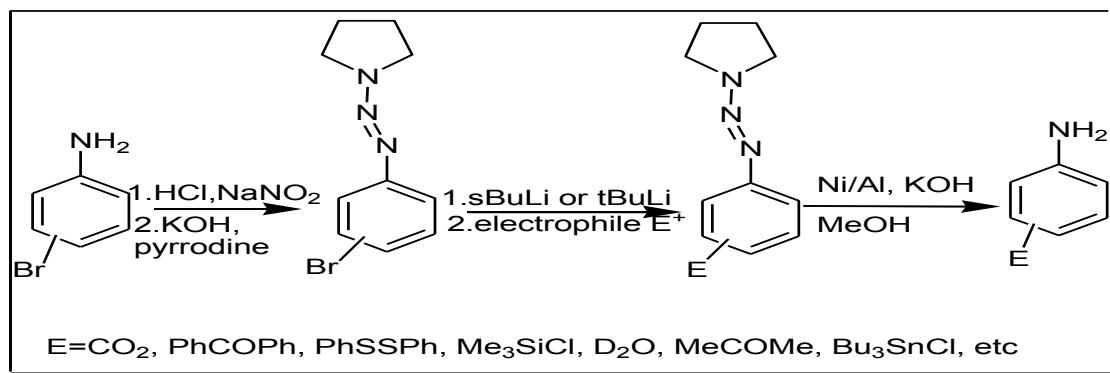
puissante contre le VRS et une activité modérée contre YFV,BVDV et CVB-2 ont été trouvés (**Tonelli M**, 2008).

### ➤ Activité antiparasitaire

L'insertion du motif triazène entre deux unités de benzamidine donne le Bérénil® (**figure 13**), qui est un puissant agent contre la trypanosomiase africaine (**Wu C.-Y**, 2006).

## V. Autres utilisations des triazènes

Les triazènes sont des composés utiles et polyvalents en chimie préparatoire parce qu'ils sont stables et adaptables à de nombreuses transformations synthétiques (**Rouzer C.A**, 1996). Ils sont utilisés comme groupements protecteurs dans la synthèse de produits naturels (**Nicolaou K.C**, 1999). Par exemple, les triazènes particulièrement sont utiles pour la protection des groupes anilines en subissant l'échange halogène-métal. Gross, Blank, et Welch ont utilisé une série de triazènes protégés bromoanilines pour l'échange Br/Li et suivie de la réaction avec des électrophiles (**Gross Blank D.H**, 1993).

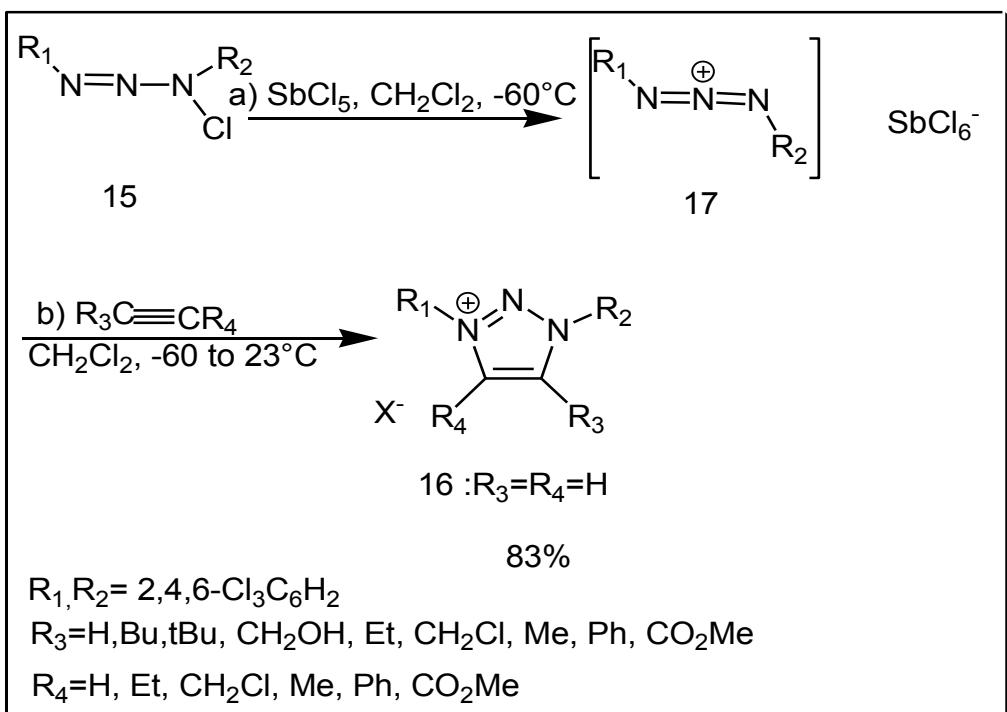


**Schéma 5:** Protection et Régénération d'une amine par un triazène

Ils sont utilisés aussi comme groupements protecteurs dans la chimie combinatoire, (**Bräse S**, 2000) incorporés dans la synthèse des polymères (**Jones II L**, 1997) et des oligomères (**Moore J. S**, 1997). Moore et collaborateurs ont fait une étude sur les macrocycles et les dendrimères.

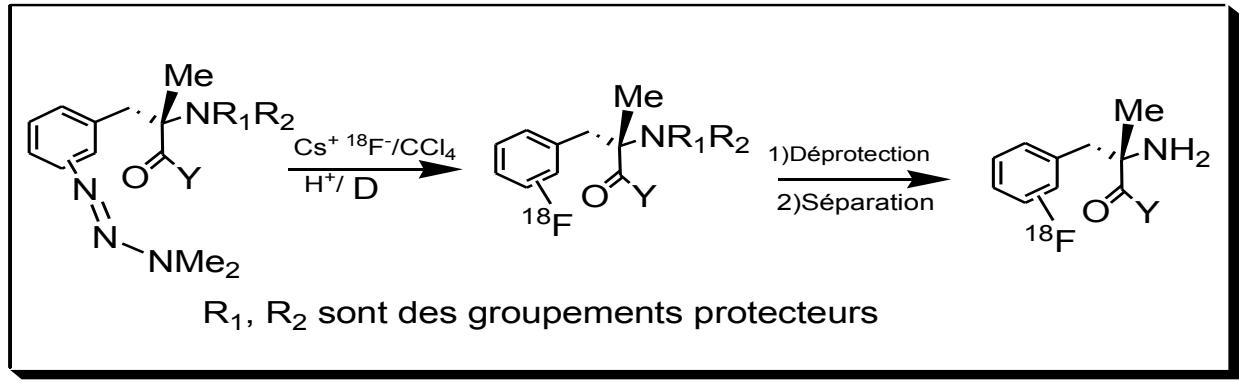
Leur procédé de synthèse générale est basé sur une stratégie très efficace : une déprotection et un couplage d'acétylène, suivi d'une décomposition des triazènes. Ces mesures peuvent rapidement donner une large gamme d'architectures de phénylacétylène de formes spécifiques et avec de bons rendements. Ce processus relativement simple est appliqué par une bande large mais aussi permet l'obtention d'une variété de produits. Quelques exemples de composés synthétisés par Moore et collaborateurs : les dendrimères de phénylcarbazole (**Zhu Z**, 2000) et les dendrimères de phénylacétylène (**Moore J. S**, 1997).

Les triazènes sont aussi utilisés pour préparer des hétérocycles (**Wirshun W**, 1998). Ils peuvent être utilisés comme précurseurs pour la synthèse des hétérocycles qui sont inaccessibles par d'autres voies. Par exemple, la N-chloro-substitué triazène de type 15 peut réagir avec dipolarophiles pour donner des produits hétérocycliques de type 16. Jochims et collègues ont observé une cyclo addition [3 + 2] entre les ions 1,3- diaza-2-azoniaallene (17) et dipolarophiles tels que les alcènes (**David B**, 2002) 1,3- butadiènes (**Wirschum W**, 1997) les alcynes, les carbodiimides et les cyanamides (**Wirschum W**, 1998).



**Schéma 6:** Utilisation des triazènes pour synthétiser des hétérocycles

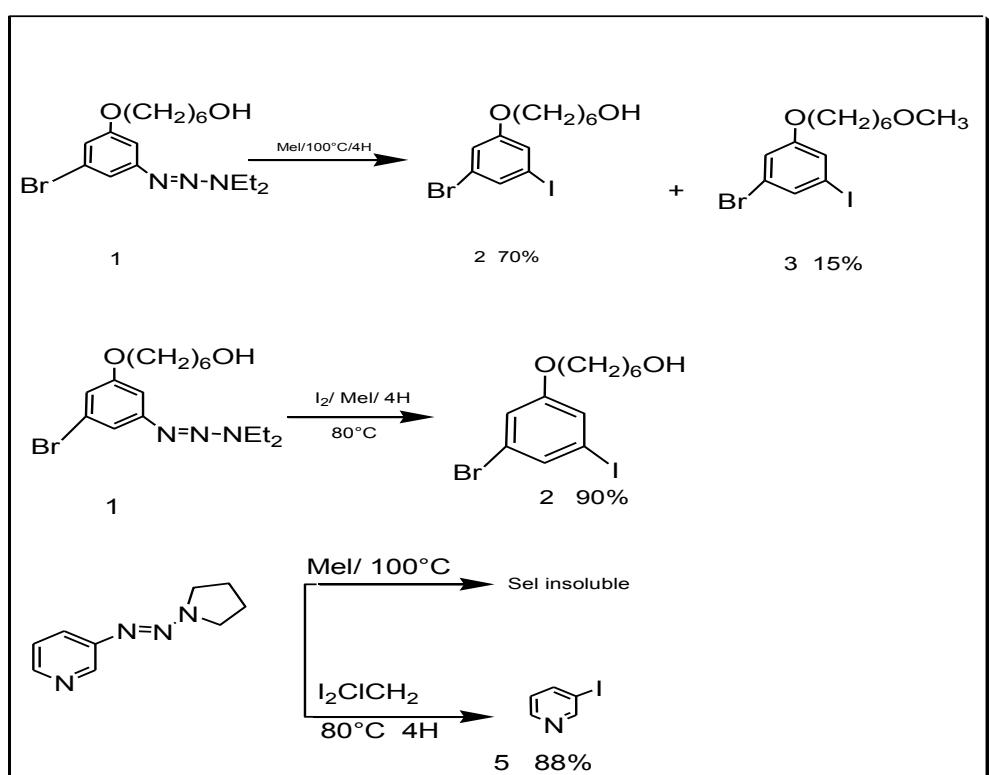
Les triazènes peuvent également être convertis en différents groupes fonctionnels après le traitement avec des réactifs appropriés. Les triazènes ont été utilisés pour produire de nombreux types de groupes fonctionnels autres que les amines et les hétérocycles. La synthèse des halogénures est un exemple notable. En d'autres termes, les triazènes peuvent être décomposés pour donner des aryles fluorides (**Pages T**, 2001). La fixation du fluor ( $^{18}\text{F}$ ) sur le noyau aromatique des 1-aryl-3,3-dialkyltriazènes en milieu acide se fait par la décomposition de ce triazène en présence des anions fluorides (schéma 7).



**Schéma 7:** Stratégie de fixation du fluor sur le noyau triazénique

Les triazènes peuvent être aussi décomposés en aryliodides (**Khalaj A**, 2001). Barrio et collaborateurs ont décrit la conversion des aryltriazènes en des aryliodures utilisant l'iodure triméthylsilylène dans l'acétonitrile (**Ku H**, 1981). Alors que les groupes fonctionnels tels que des éthers ou des esters sont clivés dans ces conditions, ils ont utilisés avec succès le groupe triazène pour masquer les substrats d'iodure dans les schémas de synthèse séquentielle d'oligomères basés sur les réactions de couplage croisées, catalysées par le palladium (**Pearson D.L**, 1994). Ces réactions ne sont pas souvent adaptées à certaines méthodes de transformation des triazènes en iodure. Ils ont travaillé à une température moins de 100 °C lors du traitement des aryltriazènes avec de l'iode. Auparavant, ils faisaient une procédure de décomposition thermique d'aryltriazènes en aryl iodure en présence d'iodométhane à 100-120 °C (**Moore J.S**, 1991). Bien que ces conditions neutres puissent tolérer une large gamme de groupes fonctionnels, la température reste très élevée, en particulier avec les aryltriazènes contenant des substituants avec une densité électronique importante. Par exemple, la décomposition de la 1-(4'-nitrophényl)-3,3-diéthyltriazène se fait à une température élevée (150°C). L'inconvénient de cette méthode est que certains groupes fonctionnels sont méthylés dans ces conditions (schéma 8). Par exemple, l'alcool (2) a été isolé à 70 % en même temps que le composé méthylé (3) à (15%). En outre, la pyridine (4) donne immédiatement

un sel insoluble en présence d'iodométhane. Les tentatives pour accélérer la réaction par addition de sels d'iodométhane n'ont eu aucun effet. Ils avaient alors découvert que l'addition d'une grande quantité d'iode peut accélérer la vitesse de réaction et éliminer les produits méthylés. Le schéma montre que les deux triazènes (1) et (4) sont convertis avec succès en iodure d'aryle en modifiant les conditions. Par exemple, l'addition d'une quantité d'iode à une solution d'iodométhane (1) a permis d'abaisser la température de la réaction de 100 °C à 80 °C et à entraîner une diminution du temps de réaction de 10 h à 4 h. L'alcool (2) a été isolé avec un rendement de 90 % sans méthylation du groupe hydroxyle, ce qui évite l'utilisation d'un groupement protecteur. L'utilisation de solvants autres que l'iodométhane, peut transformer les substrats solubles en sels. Par exemple, ils ont trouvé que le groupement triazène de la pyridine (4) pourrait être transformé en iodure (5) avec un rendement de 88 % en présence d'iode et du 1,2 dichlorométhane à 80 °C. Il est intéressant de noter que dans ce cas, l'iode moléculaire sert comme unique source de l'iodure (Moore J.S, 1991).



**Schéma 8 :** Transformation des triazènes en aryl iodides

**DEUXIEME PARTIE :  
TRAVAIL EXPERIMENTAL**

## I- CADRE BIOGEOGRAPHIQUE : LA REGION DE THIES

### *I.1 Présentation de la région de THIES*

Située à 70 km de Dakar, la région de Thiès est limitée au Nord par la région de Louga, au Sud par la région de Fatick, à l'Est par les régions de Diourbel et de Fatick, à l'Ouest par la région de Dakar et l'océan Atlantique.

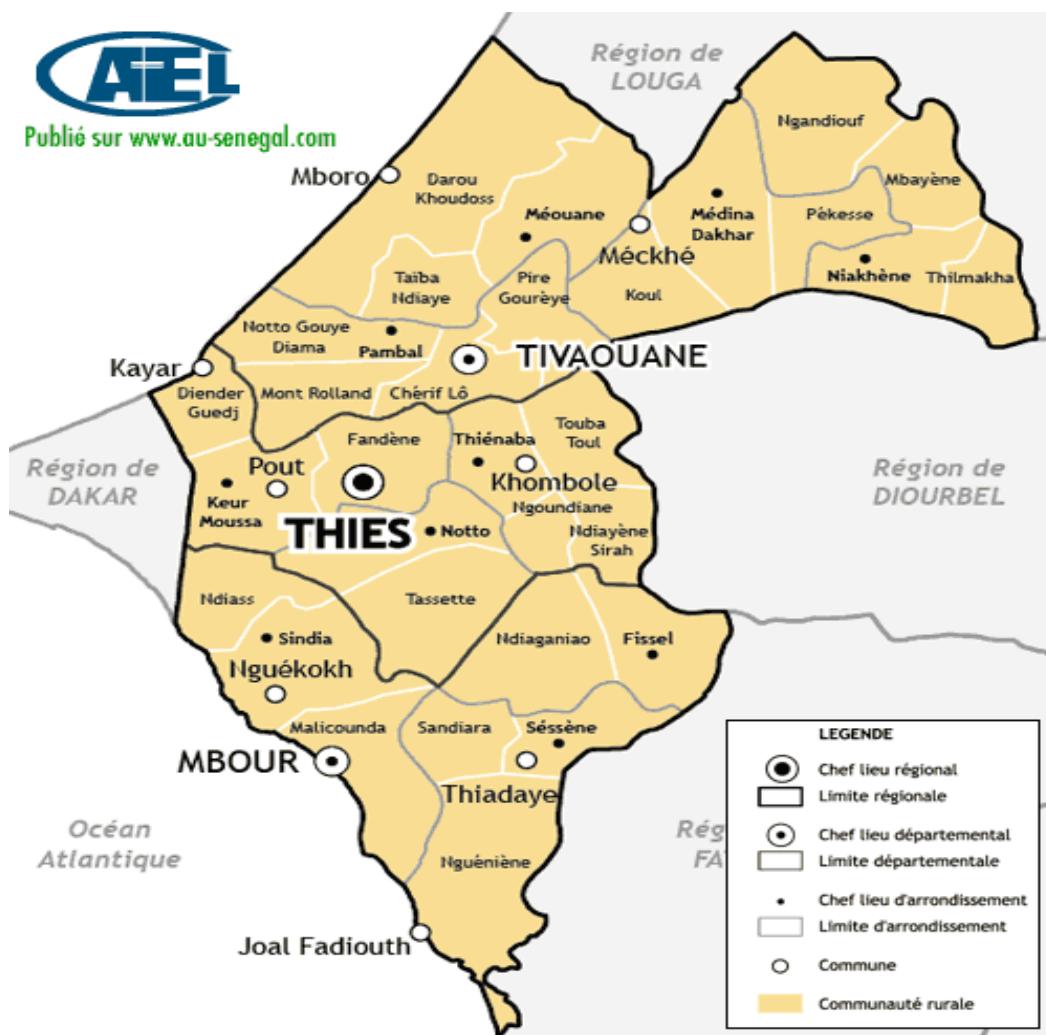
Sa population est estimée à 1.788.864 habitants en 2013 soit 13,24% de la population sénégalaise avec une densité de 268 habitants/km<sup>2</sup> (**ANSD**, 2013) pour une superficie de 6601 km<sup>2</sup> soit 3,35% du territoire national. C'est une population rurale, à 73% de Wolof et musulmane en majorité.

Le climat est de type Soudano-sahélien avec une moyenne pluviométrique de l'ordre de 400 mm/an.

Sur le plan administratif, la région de Thiès est découpée en trois départements (Thiès, Mbour et Tivaouane), dix arrondissements et 43 collectivités locales (**ANSD**, 2010).

Avec un potentiel économique important, l'économie régionale se situe à la deuxième place après Dakar du fait du dynamisme des secteurs de l'agriculture, de l'élevage, de la pêche, du tourisme, de l'artisanat, du commerce et des mines.

L'étendue de la façade maritime, la richesse et la diversité des produits touristiques offerts, concourent à la promotion de ce secteur dans la région (**figure 15**).



**Figure 15 :** Découpage administratif de la région de Thiès

(Ministère de l'intérieur, 2012)

### I.2 Endémicité palustre

Le paludisme sévit à l'état hypo-endémique dans le département de Thiès avec cependant une recrudescence pendant la saison des pluies et au décours de celle-ci.

A Thiès, la morbidité palustre est passée de 20,7% en 2007 à 3% en 2010 et la mortalité de 6,26% (2008) à moins de 5,2% (2010) (MSS, 2008 ; PNLP).

*P. falciparum* est le principal agent responsable du paludisme dans ce département. La transmission est assurée par *Anopheles arabiensis* avec un taux

d'inoculation entomologique inférieur à 5 et dont les gîtes larvaires sont constitués par les "céanes" (puits peu profonds) et par les eaux stagnantes.

L'acquisition de la prémunition y est tardive : vers 10 ans

### ***I.3 Situation sanitaire***

Malgré une couverture en infrastructures assez correcte (1 poste de santé pour 9832 habitants), l'accès des populations urbaines aux soins sanitaires et aux médicaments demeure difficile.

La région médicale est organisée en district socio-sanitaires avec des infrastructures répartie comme suit :

- Le Centre Hospitalier Régional de Thiès
- L'Hôpital Saint Jean de Dieu(H.S.J.D) qui est privé
- un hôpital psychiatrique Dalal Xel
- Le District Sanitaire
- La Section de Lutte Antiparasitaire (SLAP)
- 8 centres de santé
- 144 postes de santé dont le tiers est concentré en milieu urbain
- 319 cases de santé et 53 maternités rurales
- 49 cabinets médicaux, 2 cliniques et 62 officines privés

Notre étude s'est déroulée d'Octobre à Décembre 2015 à Thiès (pour le recrutement) et au laboratoire de biologie Moléculaire de l'Hôpital Aristide le Dantec pour l'étude de la chimiosensibilité.

## **II- Matériel et méthodes**

### ***II.1 Matériel***

Dans le cadre de notre travail nous avons utilisé comme matériel :

- Sang parasité dans les tubes héparines prélevés chez les patients sélectionnés,
- Milieu RPMI dépourvu de bicarbonate (JRH biosciences cat.56509-50L),
- HEPES (Gibco HEPES 11344-041),
- Hypoxanthine (SIGMA H 9636-5G),
- Solution de Gentamycine (SIGMA G1397),
- Solution de bicarbonate de sodium 3,6% (SIGMA S 5761),
- Sérum humain inactivé à la chaleur,
- Albumax II (sérum fœtal bovine),
- Solution de SYBR green dilué,
- Composés à tester sous forme de sels de poudre,
- Appareil fluoroskan®
- Dispositif de filtration,
- Hotte à flux laminaire
- Centrifugeuse à plaque
- Etuve (37°C)
- Source de mélange Gazeux (5% CO<sub>2</sub> et 1 à 4% O<sub>2</sub>)
- Microscope optique

### ***II.2 Méthodes***

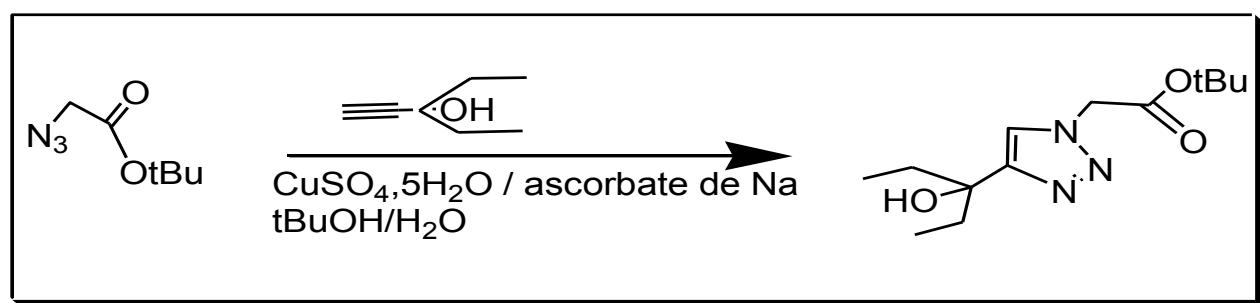
#### ***II.2.1 Méthodes d'obtention des composés***

Deux méthodologies sont utilisées pour accéder aux triazènes et aux triazoles (**Seck I, 2015**).

Les triazènes linéaires sont synthétisés par la méthode classique de diazocouplation. Le précurseur principal du sel de diazonium est une amine primaire par exemple l'aniline qui peut être substitué en position para par des groupements qui sont mésomères attracteur ou donneur. Le sel de diazonium est par la suite mis à réagir avec une amine primaire ou secondaire pour donner le triazène voulu.

En variant l'amine primaire de départ et les amines primaires et secondaires dans la seconde étape nous avons pu accéder à une librairie de triazènes qui pourrait par la suite être évaluées pour leurs propriétés thérapeutiques. Ainsi une pharmacomodulation devrait nous permettre d'accéder à un Lead pour chacune des différentes maladies sur lesquelles seront évalués les triazènes.

Les 1,2,3-triazoles sont synthétisés par la « click chemistry ». Il s'agit d'une réaction de couplage entre un azide et un alcyne. Cette réaction peut être réalisée en une étape avec la formation de l'azide *in situ* en utilisant les peaux d'orange contenant l'acide ascorbique nécessaire à la réalisation de la réaction. Elle peut également être réalisée en deux étapes en passant par la formation de l'azide d'abord (Seck I, 2015).



**Schéma 9:** synthèse d'acétate de ter-butyl 2-(4-(3-hydroxypentan-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl) **IS43**

## **II.2.2 Méthodes d'évaluation des tests**

### **II.2.2.1 Période d'étude**

Notre étude s'est déroulée d'Octobre à Décembre 2015 à Thiès (pour le recrutement) et au laboratoire de biologie Moléculaire de l'Hôpital Aristide le Dantec pour l'étude de la chimiosensibilité.

### **II.2.2.2 Population d'étude**

Elle est constituée par des patients, souffrant d'accès palustre, venue en consultation durant cette période.

#### **II.2.2.2.1 Critères d'inclusion et de non inclusion**

##### **II.2.2.2.1.1 Critères d'inclusion**

- Patient âgé entre 2 et 20 ans ;
- Patient capable de recevoir un traitement par voie orale ;
- Infestation à *P. falciparum* uniquement, confirmée par une goutte épaisse et un frottis mince ;
- Une densité parasitaire comprise entre 1.999 et 200.000 formes asexuées/ $\mu$ l ;
- Une température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C ;
- Une absence de réaction d'hypersensibilité aux molécules évaluées ;
- Un consentement éclairé de chaque participant ou des parents (tuteurs) pour les mineurs ;
- Un accès facile à la structure de santé ;

##### **II.2.2.2.1.2 Critères de non inclusion**

- Paludisme forme grave
- grossesse et allaitement ;
- infections autre que *Plasmodium falciparum*
- accès difficile à la structure de santé

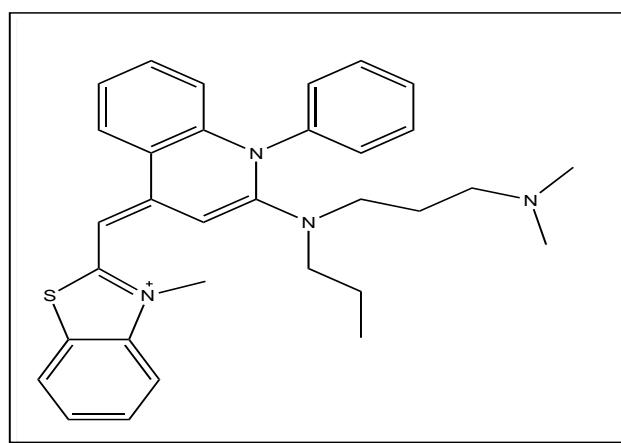
### **II.2.2.2.2 Les prélèvements**

Une goutte de sang est prélevée pour réaliser la goutte épaisse et le frottis sanguin. Concernant la technique d'évaluation de la chimiosensibilité *in vitro* par le « SYBR green » on prélève 5 ml de sang total sur tube héparine à partir d'une ponction veineuse. Les prélèvements sont ensuite conservés à l'abri de la lumière dans des sacs thermostatés munis d'accumulateurs (+4° C) pour être transportés jusqu'à Dakar au niveau du laboratoire de parasitologie de l'hôpital Aristide Le Dantec. Une fois sur place, le traitement des échantillons est effectué dans les 6 heures qui suivent le prélèvement par la méthode de SYBR green.

### **II.2.2.3 Technique de SYBR Green**

#### **II.2.2.3.1 Définition**

Le SYBR Green est un composé organique aromatique de formule brute chimique  $C_{32}H_{37}N_4S$  faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores). Il a la capacité à se lier aux acides nucléiques et à émettre une fluorescence. Ce qui fait qu'il est utilisé en biologie moléculaire comme agent fluorescent, notamment lors de la réalisation des PCR quantitatives.



**Figure 16:** Structure du Sybr Green ou le [2-[N-(3-diméthylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-méthyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-méthyldène]-1- phényl-quinolinium]<sup>+</sup>

### **II.2.2.3.2. Principe**

Le SYBR green est un agent intercalant dont l'émission de fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. L'émission de la fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle d'elongation avec une longueur d'onde comprise entre 485 et 530 nm.

### **II.2.2.3.3 Mode opératoire**

L'évaluation de la chimiosensibilité *in vitro* des souches de *P. falciparum* retrouvées à Thiès, a fait l'objet de plusieurs étapes de manipulations parmi lesquelles on peut citer : la préparation et la conservation des antipaludiques, la préparation et la supplémentation du RPMI, la préparation de la solution tampon, la préparation de la solution Tampon-SYBR, la préparation des séries de dilution sur les plaques de détermination des CI<sub>50</sub>, la préparation des isolats et la lecture après 48 heures d'incubation.

#### **II.2.2.3.3.1-Préparation et conservation des antipaludiques pour les tests**

- ❖ Préparation des solutions mères de drogues.

Les solutions mères étaient déjà préparées et ensuite aliquotées dans de petits tubes en volume de 1,5ml, recouverts de feuilles d'aluminium et conservées à -20° C jusqu'à leur utilisation. Leur concentration est de 0,005 mmol/l.

Un nouveau tube de solution mère doit être utilisé chaque fois pour préparer les plaques de culture.

- ❖ Préparation de solutions filles des différentes drogues

Ces solutions filles sont préparées à partir des solutions mères en utilisant la formule suivante  $C_1V_1 = C_2V_2$ .

Les solutions filles préparées sont conservées à 4 °C dans des tubes coniques (Falcon) bien fermés.

### **II.2.2.3.3.2 Préparation et supplémentation du milieu RPMI**

#### **❖ Préparation**

Pour 1000 millilitre de milieu RPMI à préparer, nous avons besoin d'eau distillée 959 ml, RPMI poudre 10,44 g, HEPES 5,94 g, Gentamycine 0,5 ml, Hypoxanthine 50 mg et NaOH 5N 0,75 ml

#### **❖ Supplémentation**

La supplémentation est réalisée par addition dans le milieu RPMI de sérum humain AB inactivé à la chaleur, d'Albumax II à 5% et de bicarbonate de sodium à 3,6%.

### **II.2.2.3.3.3 Préparation de la solution tampon**

Pour 1000 ml de solution tampon à préparer, nous avons besoin de:

0,5M Tris-HCL	40 ml
0,5M EDTA pH = 8)	10 ml
1.0 % saponine	4 ml
Triton X-100	0,8 ml
1X PBS	945,2 ml

Ce faisant, nous avons ajouté après avoir mélangé tous ces composés, un volume de 1000 ml de tampon conservable à 4° C. Il faut juste rappeler que le pH du tampon doit être égal à 7,5. L'ajustement se fait par addition d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) ou de soude (NaOH).

### **II.2.2.3.3.4 Préparation de la solution tampon SYBR green**

Pour la préparation de la solution SYBR Green tampon, nous procédons à la dilution de SYBR Green par la solution tampon à raison de :

0,2 µl de SYBR Green pour → 1ml de tampon lyse

X µl de SYBR Green à ajouter ? → 500ml de tampon

Le SYBR Green est sensible à la lumière donc il est impérativement recommandé de recouvrir la solution tampon Green de papier aluminium.

### **II.2.2.3.3.5 Préparation des séries de dilution sur les plaques de culture**

Pour déterminer les CI<sub>50</sub>, des dilutions ont été réalisées sur les colonnes et les lignes de la même plaque. Les colonnes vont de A à H et les lignes de 1 à 12. Chaque antipaludique occupe 2 colonnes à partir de la colonne B et des lignes allant de 1 à 11. La ligne 12 ne contient pas de drogue et représente le blanc avec le RPMI supplémenté. Les deux premiers puits de la 12<sup>ème</sup> ligne ont servi de contrôle positif (20 µl de RPMI et 180 µl de mélange de parasite). La ligne 2 contient les concentrations des solutions filles des antipaludiques qui sont de 5 mg/ml. A partir de la ligne 3, on a des séries de prélèvements sur la ligne précédente et des dilutions avec le RPMI jusqu'à la ligne 11.

On a répété le schéma de dilution en cascade jusqu'à la 11<sup>ème</sup> ligne ce qui fait que dans chaque puits à compter de la 2<sup>ème</sup> à la 11<sup>ème</sup> ligne la concentration antipaludique a été chaque fois diminuée de moitié.

### **II.2.2.3.3.6 Préparation des isolats**

Ces isolats ont été préparés par une centrifugation des prélèvements à 2500 trs/mn pendant 5 mn ensuite les sérums sont aliquotés dans de petits tubes puis conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. On rappelle que ces sérums seront utilisés pour d'autres études allant toujours dans le sens de mieux connaître *Plasmodium falciparum* et plus particulièrement dans les phénomènes d'invasion érythrocytaire.

**Tableau I** : Répartition des concentrations d'antipaludiques sur la plaque 1

Plaque1													
Molécules	A	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	C+
IS69	B		1,11.10 <sup>6</sup>	5,51.10 <sup>6</sup>	2,75.10 <sup>5</sup>	1,37.10 <sup>6</sup>	6,88.10 <sup>5</sup>	3,44.10 <sup>5</sup>	1,72.10 <sup>5</sup>	8,50.10 <sup>4</sup>	4,30.10 <sup>4</sup>	0	C+
IS69	C		1,11.10 <sup>6</sup>	5,51.10 <sup>6</sup>	2,75.10 <sup>5</sup>	1,37.10 <sup>6</sup>	6,88.10 <sup>5</sup>	3,44.10 <sup>5</sup>	1,72.10 <sup>5</sup>	8,50.10 <sup>4</sup>	4,30.10 <sup>4</sup>	0	RPMI
IS61	D		2,10.10 <sup>7</sup>	1,05.10 <sup>7</sup>	5,26.10 <sup>6</sup>	2,63.10 <sup>6</sup>	1,31.10 <sup>6</sup>	6,57.10 <sup>5</sup>	3,29.10 <sup>5</sup>	1,64.10 <sup>5</sup>	8,22.10 <sup>4</sup>	0	RPMI
IS61	E		2,10.10 <sup>7</sup>	1,05.10 <sup>7</sup>	5,26.10 <sup>6</sup>	2,63.10 <sup>6</sup>	1,31.10 <sup>6</sup>	6,57.10 <sup>5</sup>	3,29.10 <sup>5</sup>	1,64.10 <sup>5</sup>	8,22.10 <sup>4</sup>	0	RPMI
IS76	F		1,14.10 <sup>7</sup>	5,73.10 <sup>6</sup>	2,86.10 <sup>6</sup>	1,43.10 <sup>6</sup>	7,17.10 <sup>5</sup>	3,58.10 <sup>5</sup>	1,79.10 <sup>5</sup>	8,96.10 <sup>4</sup>	4,48.10 <sup>4</sup>	0	RPMI
IS76	G		1,14.10 <sup>7</sup>	5,73.10 <sup>6</sup>	2,86.10 <sup>6</sup>	1,43.10 <sup>6</sup>	7,17.10 <sup>5</sup>	3,58.10 <sup>5</sup>	1,79.10 <sup>5</sup>	8,96.10 <sup>4</sup>	4,48.10 <sup>4</sup>	0	RPMI
ME	H	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	C-

C+ : Contrôle positif

C- : Contrôle négatif

Un volume égal de RPMI non supplémenté est additionné au volume du culot globulaire puis centrifugé à nouveau à 2500 trs/mn pendant 5 mn et ensuite le surnageant (lavage du culot) est rejeté. Cette étape doit être répétée à 3 reprises. Ceci permettra le lavage de l'échantillon afin d'éliminer les composantes de l'immunité qu'il peut concocter (anticorps et leucocytes). Après ces étapes de lavages, on procède au réajustement de la parasitémie qui doit être dans l'intervalle [0,1-1 %] et de l'hématocrite qui doit être de l'ordre de 2 %.

**Tableau II:** Disposition de la préparation de parasites sur la plaque.

<b>A</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>B</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>C</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>D</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>E</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>F</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>G</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>H</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Rouge : les puits contenant les parasites et le milieu de détermination de leur  $CI_{50}$  ;

Blanc : le milieu constitué uniquement de RPMI supplémenté

### **II.2.2.3.3.7 Lecture des plaques après 48 heures d'incubation**

#### **Préparation des plaques de culture après 48 heures d'incubation**

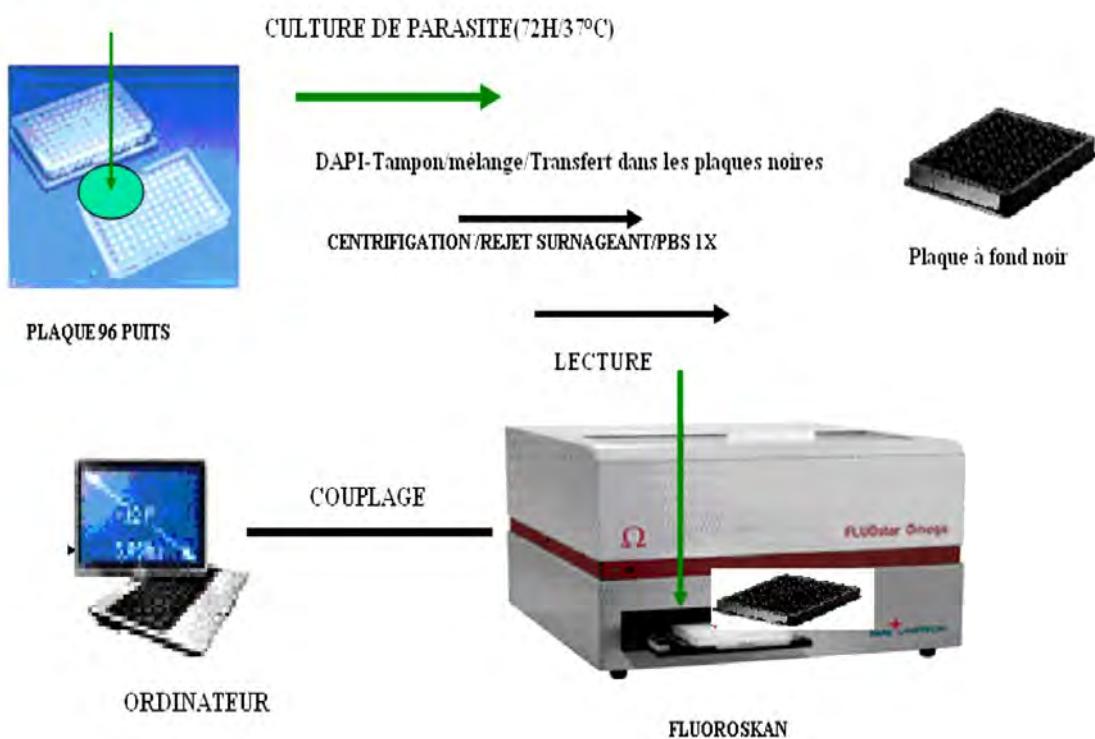
Après 48 heures d'incubation dans l'étuve à 37° C sortir les plaques puis on ajoute 100 µl de solution tampon-SYBR Green buffer dans chaque puits. Nous effectuons une deuxième incubation pendant 1 heure dans l'obscurité en recouvrant les plaques de feuilles d'aluminium. Après avoir mélangé transférer le contenu dans les plaques à fond noir et centrifuger à 4000 trs/mn pendant 14mn. En aspirant prendre 200 µl grâce à un aspirateur sous vide puis rajouter 200 µl de 1xPBS, ensuite mélanger et procéder à la lecture au Fluoroskan.

Si la lecture n'est pas possible dans l'immédiat, recouvrir toutes les plaques de feuilles d'aluminium adhésives et les conserver à -20° C. Par ailleurs il faut noter qu'il est nécessaire de ramener la température des plaques à celle ambiante avant toute lecture.

#### **Lecture proprement dite**

Les données de la fluorescence sont obtenues par l'appareil Fluoroskan qui donne les absorbances proportionnellement à la charge parasitaire dans chaque puits après inhibition. Ces données recueillies, par l'intermédiaire d'un ordinateur couplé à l'appareil, sont analysées par un logiciel appelé GRAPH PAD PRISM qui transforme les données brutes en données standardisées par la formule  $Y = \log X$ , Y étant la valeur recherchée qui sera analysée sous forme de graphe de régression : Le NON LINEAR REGRESSION qui donne la CI<sub>50</sub>.

DROGUES + SANG PARASITE



**Figure 17 :** Préparation et lecture des plaques après 48 heures d’incubation

### III. Résultats

#### *III.1 Echantillon*

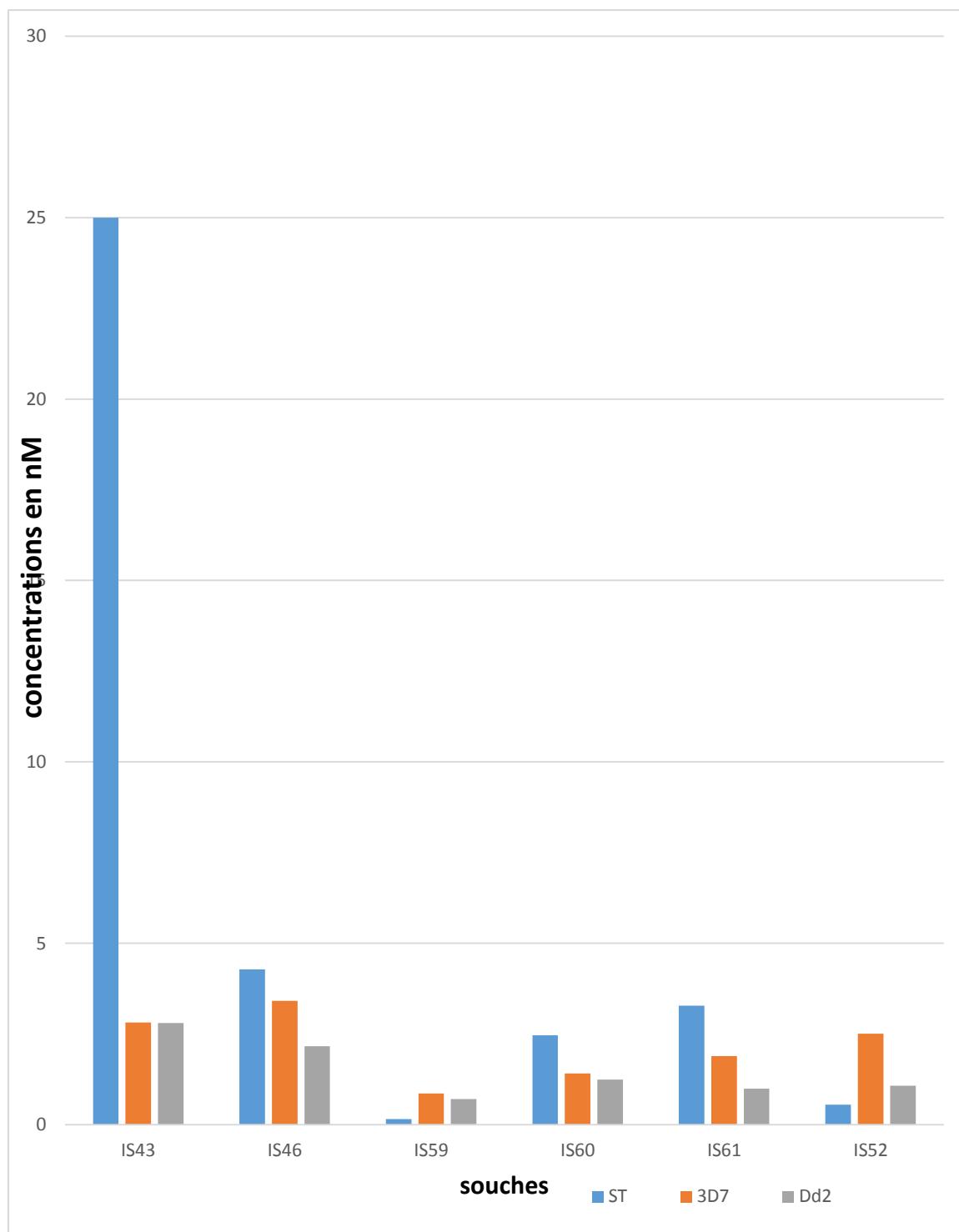
Nous avons effectué le test de la chimiosensibilité *in vitro* de 10 triazoles sur 15 souches de terrains et de 2 souches de laboratoire à savoir 3D7 et Dd2. Les souches de laboratoire 3D7 (chloroquinosensible) et Dd2 (chloroquinorésistant) nous ont permis de valider la méthode de SYBR Green. Les seuils limites de résistance ont été estimés à 100nM pour la chloroquine.

### **III.2 Résultats de la chimiosensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum***

#### **III.2.1 Résultats des tests de sensibilité *in vitro* aux 1, 2, 3-triazoles**

**Tableau III:** Répartition des CI<sub>50</sub> des triazoles

Entrée	Produits		Moyenne géométrique des souches de terrains nM	CI <sub>50</sub> de <b>3D7</b> nM	CI <sub>50</sub> de <b>Dd2</b> Nm
1		IS43	2,50.10 <sup>7</sup>	2,82.10 <sup>6</sup>	2,80.10 <sup>6</sup>
2		IS46	4,28.10 <sup>6</sup>	3,41.10 <sup>6</sup>	2,16.10 <sup>6</sup>
3		IS59	1,51.10 <sup>5</sup>	8,62.10 <sup>5</sup>	7,09.10 <sup>5</sup>
4		IS60	2,46.10 <sup>6</sup>	1,41.10 <sup>6</sup>	1,24.10 <sup>6</sup>
5		IS61	3,28.10 <sup>6</sup>	1,89.10 <sup>6</sup>	9,90.10 <sup>5</sup>
6		IS52	5,52.10 <sup>5</sup>	2,51.10 <sup>6</sup>	1,07.10 <sup>6</sup>
		Chloroquine	8,45	0,29	12,75
		artémisine	3,55	45,70	40,8



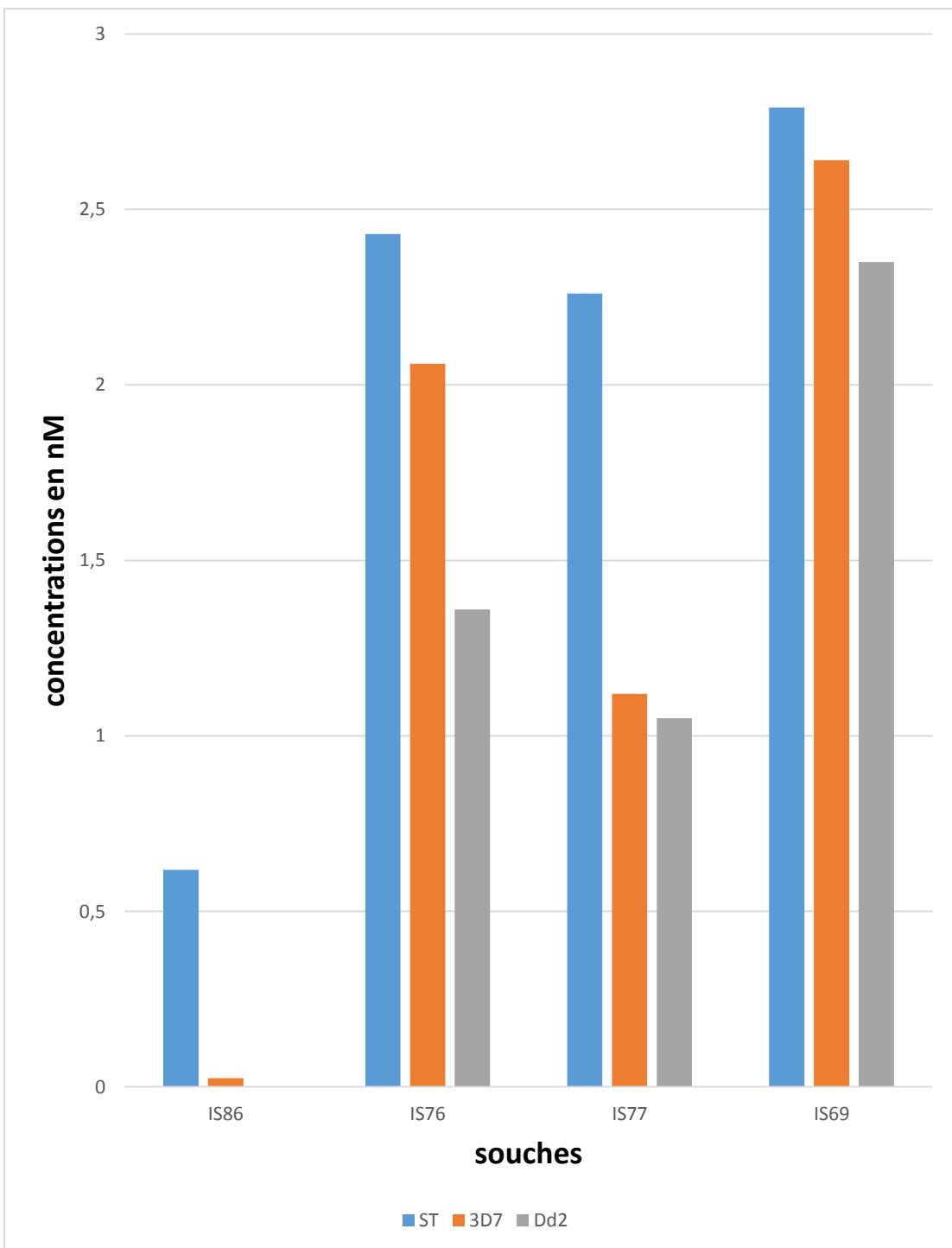
**Figure 18:** Répartition des CI<sub>50</sub> des triazoles en fonction des souches

ST : souches de terrains

### III.2.2 Résultats des tests de sensibilité des dérivés triazolés de la vitamine D<sub>2</sub>

**Tableau IV:** Répartition des CI<sub>50</sub> des dérivés triazolés de la vitamine D<sub>2</sub>

Entrée	Produits		Moyenne géométrique des souches de terrains nM	CI <sub>50</sub> de 3D7 nM	CI <sub>50</sub> de Dd2 Nm
1		IS86	<b>6,18.10<sup>5</sup></b>	<b>2,48.10<sup>4</sup></b>	NC
2		IS76	2,43.10 <sup>6</sup>	2,06.10 <sup>6</sup>	1,36.10 <sup>6</sup>
3		IS77	2,26.10 <sup>6</sup>	1,12.10 <sup>6</sup>	1,05.10 <sup>6</sup>
4		IS69	2,79.10 <sup>6</sup>	2,64.10 <sup>6</sup>	2,35.10 <sup>6</sup>



**Figure 19:** Répartition des  $CL_{50}$  des dérivés triazolés de la vitamine D<sub>2</sub> en fonction des souches

## **COMMENTAIRE**

#### **IV. Commentaires**

Notre étude avait pour but d'évaluer, par la méthode SYBR green, l'activité *in vitro* de dix (10) 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués sur quinze souches plasmodiales isolées dans la région de Thiès en 2015.

Pour cela, quinze échantillons de *Plasmodium falciparum* ont été collectés chez des patients atteints de paludisme simple avec la confirmation par goutte épaisse et par frottis ; et ont été cultivés avec succès sur nos plaques.

L'interprétation des résultats biologiques est faite en premier temps par famille de molécules. Ces dernières ont été classées en fonction de leur identité structurale.

Les tableaux des CI<sub>50</sub> ont été reportés pour chaque groupe, ceux-ci sont ensuite présentés en histogramme qui nous permettra de mieux comparer les activités et voir l'influence des substituants sur le motif principal de chaque famille de composés.

Les résultats obtenus au cours de notre étude nous révèlent que les triazoles sont tous actifs contre le *Plasmodium falciparum* (tableau III).

La moyenne géométrique des CI<sub>50</sub> varie entre 1,51.10<sup>5</sup> nM pour **IS59** (tableau III, entrée 3) à 2,50.10<sup>7</sup> nM pour **IS43** (tableau III, entrée 1) pour les souches de terrains. Mais les résultats obtenus avec les triazoles sont moins bons comparés à ceux obtenus avec les triazènes.

L'activité la plus intéressante a été donc obtenue avec le composé **IS59** (tableau III, entrée 3) sur l'ensemble des trois souches. On note une activité moyenne avec les composés **IS52, IS60, IS61 et IS46**.

L'activité est meilleure lorsque le triazole est substitué en 4 par un alcool primaire protégé par un méthyldihydropyrane.

En ce qui concerne les composés **IS43** et **IS46** nous notons une différence significative où l'activité augmente en faveur du composé **IS46** avec une  $\text{CI}_{50}$  de  $4,26 \cdot 10^6 \text{ nM}$  (tableau III, entrée 2) sur lequel nous avons une substitution en 4 par un phényl alors que pour **IS43** (tableau III, entrée 1) il est substitué par un hydroxyle tertiaire. Donc le groupement phényl aurait un effet positif sur l'activité en comparaison avec le groupement hydroxyle tertiaire.

Pour les composés **IS59** (entrée 3) et **IS60** (entrée 4), la différence est très significative sur l'ensemble des souches à l'avantage de **IS59** substitué en 4 par un alcool primaire protégé par un méthyldihydropyrane alors que pour **IS60** nous avons un acétal.

De même que pour les composés **IS60** et **IS61** (tableau III, entrée 5) où nous notons une substitution en 4- par un phényle l'activité diminue légèrement. Donc l'hydroxyle tertiaire en 4- du triazole ne semble pas jouer positivement sur l'activité.

Pour les composés **IS61** et **IS52** qui ont en commun un phényle en 4-, nous notons une augmentation de l'activité en faveur de **IS52**, substitué en 1- par un radical méthylphénylcétone sur les souches de terrains.

En remplaçant le groupement hydroxyle tertiaire en 4- du composé **IS43** en groupement phényl **IS46**, l'activité antiplasmodiale est augmentée.

L'étude de la relation structure-activité nous montre qu'une substitution en position 4- par un phényl n'a pas d'effet majeur sur la  $\text{CI}_{50}$ .

Dans ce groupe de composés les meilleures activités ont été obtenues pour **IS59** (entrée 3) et **IS52** (entrée 6).

L'analyse des résultats montrent que tous les composés de cette série sauf **IS52** sur 3D7 sont plus actifs sur les souches 3D7 et Dd2 que sur les souches de terrains.

Les meilleures activités contre la souche chloroquinosensible sont observées pour **IS60**, **IS61** et **IS59** qui est le plus actif. Si **IS60**, qui s'est montré aussi actif qu'**IS61** sur 3D7, présente une efficacité similaire sur 3D7 sur Dd2, **IS59** et **IS60** sont par contre, plus actifs sur la souche chloroquinorésistante.

Dans cette dernière partie quatre composés ont été évalués sur les trois souches (tableau IV). Tous les dérivés de la vitamine D<sub>2</sub> ont une sensibilité moyenne allant de  $6,18 \cdot 10^5$  pour **IS86** (tableau IV, entrée 1) à  $2,79 \cdot 10^6$  pour **IS69** (tableau IV, entrée 4).

Les deux composés **IS86** et **IS76** ayant en communs un alcool tertiaire en position 4- du 1, 2, 3-triazole, l'activité augmente en faveur d'**IS86** sur lequel l'hydroxyle du motif bicyclo [4.3.2] nonane n'est pas protégé contrairement à **IS76**.

Pour les composés **IS76** (entrée 2), **IS77** (entrée 3) et **IS69** qui ont en commun un groupement hydroxyle du motif [4.3.2] bicyclononane protégé par un groupement tertiobutyldiméthylsylile, nous n'avons pas noté une différence significative entre les trois composés sur les souches de terrains.

**IS77** substitué en position 4- du motif 1, 2, 3-triazole par un carboxylate d'éthyle est plus actif qu'**IS76** et **IS69** aussi bien sur la souche chloroquinosensible 3D7 et Dd2.

Les 1,2,3-triazoles sont moins actifs que la chloroquine et l'artémisinine sur les souches de terrains et les souches de laboratoire.

Dans cette série nous pouvons dire que la forme protégée des groupements hydroxylés reste toujours la forme la moins active sur les souches. Donc l'encombrement de l'hydroxyle sur le motif 1, 2, 3-triazole semble jouer un rôle négatif sur l'activité. La meilleure activité est obtenue avec le composé **IS86** qui est plus actif sur les souches 3D7 que les souches de terrain.

Les meilleures activités contre la souche 3D7 sont observées pour les composés **IS86** et **IS77**. Le composé **IS69** est le moins actif sur l'ensemble de souches utilisées. Cela pourrait être expliqué par la présence en position 4 du 1, 2, 3-triazole d'un phényle et de plus, par la protection de l'hydroxyle du bicyclononane.

La chloroquine et l'artémisinine sont beaucoup plus actives que les dérivés de la vitamine D<sub>2</sub> aussi bien sur les souches de terrains que sur les souches de laboratoire. Cependant vu que l'étude vient de démarrer une étude bio guidée pourrait permettre d'accéder à une structure avec une meilleure activité.

## **CONCLUSION**

Le travail s'inscrit dans le cadre de l'interface entre la chimie et la biologie puisqu'il a pour objectif d'étudier l'activité antipaludique de dix 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués synthétisés.

Le paludisme est l'une des maladies endémo-épidémiques les plus répandues dans le monde. Le parasite *Plasmodium falciparum* occupe une place importante dans la morbidité et la mortalité en Afrique du sud du Sahara. Jadis, traité avec succès par la chloroquine, le parasite développe maintenant une résistance dans la plupart des zones d'endémie. La résistance vis-à-vis de nombreux antipaludiques disponibles demeure inquiétante dans beaucoup de pays.

La chimiorésistance constitue un des obstacles majeurs qu'entraînent les programmes nationaux de lutte contre le paludisme.

Face à l'urgence que constitue ce fléau de nouvelles initiatives ont été prises parmi lesquelles la recherche opérationnelle qui en occupe une place de choix.

Cette recherche opérationnelle comprend entre autres axes principaux, la prise en charge des cas de paludisme, la surveillance régulière de la morbidité palustre, la surveillance de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques, la mise en œuvre de nouvelles classes thérapeutiques et de tester leur activité.

C'est sur ce dernier axe que s'était inscrit notre étude qui a eu lieu à Thiès où la situation géographique et les conditions sont favorables au développement du paludisme.

Pour évaluer l'activité des composés synthétisés sur les isolats de *Plasmodium falciparum*, nous avons utilisé une nouvelle méthode : le SYBR green.

Le SYBR green est un agent intercalant dont l'émission de fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. L'émission de la fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle d'elongation avec une longueur d'onde comprise entre 485 et 530 nm.

Cette étude préliminaire a permis d'évaluer l'activité sur *Plasmodium falciparum* de dix 1,2,3-triazoles-1,4-disubstitués. Cette évaluation a été menée sur quinze souches de terrains et deux souches de laboratoire.

En résumé, nous pouvons dire que les 1,2,3-triazoles-1,4-disubstitués ont de bonnes activités aussi bien sur les souches de terrains (**6,18.10<sup>5</sup>** nM IS86 et **1,51.10<sup>5</sup>** nM pour IS59) que sur les souches de laboratoire (**2,48.10<sup>4</sup>** nM et **8,62.10<sup>5</sup>** nM). Mais leur activité est moins bonne comparée à celle de la chloroquine et l'artémisinine.

Dans le groupe des 1,2,3-triazoles-1,4-disubstitués la comparaison des structures par rapport à l'activité nous permet d'en déduire que la fonction hydroxyle a beaucoup influé sur l'activité du composé **IS59** en comparaison avec celle de **IS60**. Ce qui semble être logique du fait de la contribution de la fonction alcool sur les activités biologiques des composés organiques. Pour le composé protégé par l'éther nous notons une activité moins importante.

Avec les dérivés de la vitamine D<sub>2</sub>, nous avons des formes protégées et des formes non protégées. La forme déprotégée reste la forme la plus active sur l'ensemble des souches. Ce qui veut dire que la déprotection de la fonction OH augmente l'activité de ce type de composé.

En perspective, à ce travail il conviendra de diversifier les groupements activant ou désactivant et de tester à nouveaux ces composés avec des concentrations similaires à la chloroquine et à l'artémisinine afin de s'assurer de leur efficacité *in vitro* avant de passer aux expériences *in vivo*.

**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## **Agence Nationale de la Statistique et de la Démographique (ANSD)**

Situation économique et sociale de la région de Thiès en **2009**, Aout 2010.

## **Agence Nationale de la Statistique et de la Démographique**

Recensement général de la population et de l'habitat, de l'agriculture et de l'élevage (RGPHAE). **2013**.

**Ambroise TP.** Le paludisme. Maladies infectieuses.

Le paludisme encyclopédie .med. Chir. Paris France. *Maladies infectieuses*. EMC. Paris. **1984**,8089 : A10-A20

**Ambroise-Thomas S., Pinel C., Pellious H., Pico T.** Le diagnostic du paludisme : actualités et perspectives *Cahier de santé*. **1992**, 3 : 280-284.

**Association Française des Professeurs de Parasitologie (A. F. P. P)**  
Parasitologie Mycologie. Maladies parasitaires et fongiques. **1992** *Edition C et R*, 5<sup>ème</sup> édition : 481p.

**Badiane M., Ba D.** Le point sur les antipaludiques. *Bulletin trimestriel de la représentation de l'O.M.S au Sénégal*, **1995**; 5: 11-13.

**Bamba S.** Evaluation *in vivo* et *in vitro* de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine, à l'amodiaquine et à la quinine. Etude menée en milieu urbain de BOBO Dioulasso/ Burkina Faso. **2003**. *Thèse de Pharmacie*, Dakar, N° 24.

**Banerjee A., Lagardere B., et Le Groupe De Pédiatrie Tropicale** Prévention du paludisme **2001** *Arch. Pédiatr* ; 8 Suppl : 275-7.

**Bascot L., Defrance C., Molklovec T.** Chimiorésistance du paludisme : problèmes de la définition et de l'approche technique **2000**. *Cahiers santé* ; 10 : 47-50.

**Baudon D., Guiguemde T.R., Carnavale P., Gabary A.R** Proposition pour une stratégie de surveillance de la sensibilité de Plasmodium falciparum au Burkina Faso **1985**. *Doc. Tech. OCCGE*, N° 8700, 1-15.

**Borowski P., Deinert J., Schalinski S., Bretner M., Ginalski K., Kulikowski T., Shugar D.** Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as inhibitors of the NTPase/helicase activities of hepatitis C and related viruses *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270(8): 1645-53.

**Boulos M., Santini M.O., Segurago A. A. C., Carvalho N. B. et Amato N. V.** Artémisinine derivatives in Falciparum malaria. *Abstract of 13 th International congress for tropical medecin and malaria, Thailand*, **1992**.

**Bourree P.** Aspects actuels du paludisme. *Revue francophone des laboratoires*, septembre-octobre **2006**, N°385.

**Bräse S., Dahmen S., Pfefferkorn M.** Solid-Phase Synthesis of Urea and Amide Libraries Using the T2 Triazene Linker *J. Comb. Chem.* **2000**, 2 (6) :710-715.

**Buxeraud J.** Mise en place d'une prophylaxie efficace du paludisme *Actualités pharmaceutiques* **2008** N°476 Juillet-Aout P13.

**Carneiro I., Roca-Felter A., Griffin JT. And AL.** Age-patterns of malaria vary with severity, transmission intensity and seasonality in Sub-saharan Africa : a systematic review and pooled analysis. *PLoS One* **2010** ; 5(2) :e8988.

**Charmot G.** Protocoles thérapeutiques. In: Paludisme *Edition Marketing*, *Ellipse/AUPELP*. **1991**. 240 p.

**Charmot G., Coulaud J. P.** Propositions thérapeutiques dans le paludisme à «*Plasmodium falciparum* ». Le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* en Afrique (à l'exception des formes pernicieux). *Med Trop.* **1990**. pp. 103-108.

**Cox-Singh J., Davis T. M., Lee K. S., Shamsul S. S., Matusop A., Ratnam S., Rahman H. A., Conway D. J. and Singh B.** *Plasmodium falciparum* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.* **2008**. 46(2): 165-71.

**Danis M.** Médicaments antipaludiques. In: Paludisme *Edition Marketing* *Ellipse/AUPEL*. **1991**. 240 p.

**David B. Kimball And Michael M. Haley\***. Triazènes: A Versatile Tool in organic synthesis *Angew.chem.Into. Ed.* **2002**, 41:3338-3351.

**De Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K And Picot S.** Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **2003**. 97 : 387-90.

**Desjardins R. E., Canfield C.J., Hayness J.D., Chulay J.D.,**

Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrob Agent Chemother.* **1976.** 16: 710-8.

**Desowitz R.S.** The malaria capers. *Research and Reality (ed.W.W.N.Company), New York.1991.*

**Donald L. Hooper, Ian R. Pottie, Marc Vacheresse, And Keith Vaughan.**  
1, 2-Bis (1-aryl-3-alkyltriazen-3-yl) ethanes and related compound *J. Chem.* **1998.** 76: 125.135.

**Doucet K.G., Pye C.C., Vaughan K., Enright T.G.** “An ab initio study of the SN2 reaction of 1-and 3-methyltriazene with ions” *THEOCHEM.* **2006.** 801:21-28.

**Druilhe P., Brasseur PH., Brandicourt O., Kouamouo J., Richard-Lenoble D., Diouf F., Gay F., Moyou R.S., Danis M., Koumbila M.Y., Diallo P., Gentili M.**

*Plasmodium falciparum* drug resistance in West Africa *Ann. Soc. Belge Med. Trop* **1986.** pp.33-37.

**Gaye O.** Surveillance de la chimiorésistance du paludisme au Sénégal. Rapport final de la surveillance dans 8 sites sentinelles. **2002.**

**Gentillini M.** Le paludisme en médecine tropicale. Paris : Flammarion, MIS. **1993.** 4<sup>ème</sup> édition: 99-118.

**Gesher J. A., Hickman J. A., Simmonds R. G., Stevens M. F. G, Vaughan K.** Antimicrobial and cytotoxic arylazoenamines *Biochem. Pharmacol.* **1981**, 18:30, 89.

**Grobush M P, Hanscheid T, Zoller T, Jelinek T and Burchard G D.** Rapid immunochromatographic malaria antigen detection unreliable for detecting *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis.* **2002**, 21: 818–20.

**Gross Blank D.H, Welch W.M.** Preparation of Polyfunctional Aryl magnesium, or Arylzinc Reagents Bearing a Triazene Moiety and Their Applications in Organic Synthesis *J.Org.Chem.* **1993**. 58: 2104-2109.

**Guiguemde T. R., Ouedraogo J. B., Viravan C.** Enquête sur la chimiosensibilité du paludisme et formation d'une équipe Nationale au Bénin. *Doc. Tech. OCCDE*, **1987**. 9039: 1- 18.

**Hance P, Garnotel E, De Pina JJ ET AL.** Tests immunochromatographiques rapides de détection du paludisme, principes et stratégies d'utilisation. *Med .Trop* .**2005**. 65: 389–93.

**Hänscheid T., Grobusch MP.** How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends in Parasitology*.**2002**. 18: 395-8.

**Hill D. T., Stanley K. G., Williams J. E. K., Loev B., Fowler P. J. 1, 3-Diaryltriazenes:** a new class of anorectic agents. *J. Med. Chem.* **1983**. 26(6): 865-869.

**Jones II L., Schumm J. S., Tour J.M.** Rapid Solution and Solid Phase Syntheses of Oligo (1, 4-phenylene ethynylene)s with Thioester Termini: Molecular Scale Wires with Alligator Clips. Derivation of Iterative Reaction Efficiencies on a Polymer Support *J.Org .Chem.* **1997**. 62(5):1388-1410.

**Kabore N.** Contribution à l'étude du paludisme grave chez l'enfant à Dakar à propos de 76 cas. *Thèse Pharm.* **1993**. Dakar N°14; p 6.

**Kanjeekal S., Chambers A., Fung M.F., Verma S.** Systemic therapy for advanced uterine sarcoma: a systematic review of the literature. *GYNECOL.Oncol.* **2005**, 97: 624-37.

**Khalaj A., Beiki D., Rafiee H., Najafi R.** A new and simple synthesis of N-succinimidyl-4-[127/125I] iodobenzoate involving a microwave – accelerate iodination step *J. Labelled Compd.Radiopharm.* **2001**. 44 (3): 235-240.

**Khramov D.M., Belawski C. W.** *In vitro*, l'évaluation des triazènes: clivage de l'ADN, l'activité antibactérienne et la cytotoxicité contre les cellules leucémiques myéloïdes aiguës *J. Org. Chem.* **2007**. 72, 9407.

**Ku H., Barrio J.R.,** Iodine-Promoted Decomposition of 1-Aryl-3, 3\_dialkyltriazenes: A Mild Method for the Synthesis of Aryl Iodides *J.Org.Chem.* **1981**. 46, 5239 90.

**Lim H.** Multiple Substituent Effects on the Rate Constants for N (2)-N (3) Restricted Rotation of Cis-1, 3-Diphenyltriazenes *These Master of Science in Chemistry*, Waterloo, Ontario, Canada, **2006**, p78- 89.

**Ministère de la Santé du Sénégal.** Morbidité et mortalité palustre au Sénégal en 2008. Archives Programme de Lutte contre le Paludisme. **2008**.

**Minodier P.** Dépistage du paludisme : tests rapides. *J. Pédiatr Puériculture*. **2005**, 18 : 386-8.

**Moor D.V., Lanier J. E.** Observation on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal Response to chloroquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1961**; 10: 5-9.

**Moore J. S.** Preparation of Polyfunctional Arylmagnesium, or Arylzinc Reagents Bearing a Triazene Moiety and Their Applications in Organic Synthesis *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30: 402 – 413.

**Moore J.S., Weinstein E.J., WU Z.** Composition of 1-Aryl-3, 3\_dialkyltriazenes: A Mild Method for the Synthesis of Aryl Iodides *Tetrahedron L&t.* **1991**, 32, 2465.

**Ndoye N.R.** Etude du paludisme dans le district sanitaire de Mbao : Aspects épidémiologique, biologique et thérapeutique. *Thèse Pharm.*, Dakar, Juin **2000**, n°26.

**Niang M.** Evaluation de l'efficacité de la thérapeutique de la chloroquine et de la Sulfadoxine R pyrimethamine dans le traitement des accès palustres simples à *Plasmodium falciparum*. *Thèse de Doctorat en médecine*, **2002**, Dakar, n°63.

**Nicolaou K.C., Boddy C.N.C., LI H., Koumbis A.E., Hughes R., Natarajan S., Jain N.F., Ramanjulu J.M., Brase S., Solomon M.E.** Total Synthesis of Vancomycin Part 2: Retro synthetic Analysis, Synthesis of Amino Acid Building Blocks and Strategy Evaluations *J. Eur. Chem.* **1999**, 5 (9): 2602-2621.

**Nissiwaki K., Okamotoa. , Matsuok. , Kawaguchiy. Hayaseb Y. and Ohbabk.** Antimalarial activity of 1 -aryl -3,3-dialkyltriazenes *Bioorganic& Medicinal Chemistry*. **2007**, 15: 2856-2859.

**Nuwaha F.** The challenge of chloroquine -résistant malaria in Sub-Saharan Africa. *Health policy plan* **2001**. 16 :1-12.

**Shretta R., Omumbo J., Rapuoda B., Snow RW.** Using evidence to change antimalarial drugs policy in Kenya. *Trop Med Int Health* **2000**. 5:755-64.

**O' Reilly S. M., Newlands E.S., Glaser M. G., Brampton M, Rice–Edwards J.M, Illingworth R.D, Richarrds P.G. Kennard C., Colquohoum I.R, Lewis P., Stevens M.F.G.**

Temozolomide: a new oral cytotoxic chemotherapeutic agent with promising activity against primary brain tumours. *Eur J Cancer*. **1993**, 29A (7):940-2.

**Organisation Mondiale de Santé.** Rapport sur le paludisme dans le monde, résumé **2015**.

**Organisation Mondiale de Santé.** Chimioprévention du paludisme saisonnier pour lutter contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* en zone de forte transmission saisonnière dans la sous-région du Sahel, Mars **2012**, p 4.

**Organisation Mondiale de Santé (OMS)** Méthodes statistiques utilisables dans les campagnes d'éradication du paludisme. Séries de monographies, **1968**, 51 :163p.

**Pages T., Langlois B.R., Le Bars D., Landais P.** Fluorination of aromatic compound from 1-aryl-3, 3-dimethyltriazenes and Fluoride anions in acidic medium<sup>2</sup>. Synthesis of (S)-[18F]-3-Fuoro α- methylphenylalanine *J.Fluorine Chem.* **2001**, 107: 329-335.

**Pearson D.L., Schumm J.S., Jones L., Tour J.M.** Polym. Prepr. *Am.Chem.Sot, Div.Polym.Chem.* **1994**, 35 (1), 202-03.

**PRADINES B.** *In vitro* activity of pyronaridine and Amodiaquine against African isolates (Sénégal) of Plasmodium falciparum in comparison with standard Antimalarial agents. *I Antimicrob. Chemother.* **1998**, 42: 333-339

**Pradines B., Dormoi J., Briolant S., Bogreau H., Rogier C.** La résistance aux antipaludiques. *Revue francophones des laboratoires*. Mai **2010**, N° 422 :62p

**Programme National De Lutte Contre Le Paludisme.** Plan stratégique de lutte au Sénégal **2011-2015**.

**Programme National de lutte Contre le Paludisme.** Plan stratégique de lutte au Sénégal **2006-2010**.

**Programme National de lutte Contre le Paludisme (PNPL).** Trimestriel d'information n°006 *Palu info.* **2007**.

**Programme National de Lutte Contre le Paludisme (PNPL).** Directives nationales sur la politique du traitement antipaludique, **2003**.

**Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP).** Programme d'Amélioration de la Qualité, de l'Equité et de la Transparence (PAQUET). Guide sur le paludisme destiné à l'enseignant.

[www.schoolhealth.org](http://www.schoolhealth.org)

**Prous J., Graul A., Castaner.** Temozolomide;Sch-52365;CCRG-81045;NSC-362856;M&B 39831;Temodar;Temodal By reaction of 5- diazoimidazole-4-carboxamide (II),prepared by diazotization of amino midazole-4-carboxamide (I) with nitrous acid, with methylisocyanate (III) either alone or in dichloromethane. *J. Drugs Fut.* **1994**, 19: 8-746.

**Rogier C., Orlandi-pransines E., Fusai T., Pradines B., Briolant S., Almeras L.** Vaccins contre le paludisme : perspectives et réalité Médecine et maladies infectieuses **2006**. 36 : 414-422.

**Roll Back Malaria.** Journée mondiale contre le paludisme. La situation en Afrique. Collection progrès et impact numéro 2-avril **2010**.

**Roll Back Malaria.** Pour un monde sans paludisme. Plan d'action mondiale contre le paludisme, **2008**.

**Rouzer C.A., Sabourin M., Skinner T.L., Thompson E.J., Wood T.O., Chùurny G.N., Klose J.R., Roman J.M., Smith R.H.JR., Michejda C.J.** Oxidative Metabolism of 1-(2-Chloroethyl)-3-alkyl-3-(methylcarbamoyl) triazenes: Formation of Chloroacetaldehyde and Relevance to Biological Activity *Chem .Res.Toxicol.* **1996**. 9(1):172-178.

**Seck I.** Synthèse et évaluation des propriétés antibactériennes des 1,2,3-triazènes et 1,2,3-triazoles application à des analogues du cholestérol. *Thèse de doctorat en médecine*. 2015. Dakar n°166.

**Stefane B., Kocevar M., Polvanc S.** Direct synthesis of sulfonylazides from sulfonic acids *J. Org. Chem.* **1997**, 62: 7165-7169.

**Stevens M. F. G., Phillips K. S., Rathbone D. L., O' Shea D.M., Queener S. F., Schwalbe C. H., Lambert P. A.** Pharmaceutically active compound and methods of use thereof *J. Med. Chem.* **1997**, 40: 1886-1893.

**Thaithong S.** Clones of different sensitivities in drug resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **1983**, 61 (4): 709 -712.

**Tonelli M., Paglietti G., Boido V., Sparatore F., Marongiu F., Marongiu, E.LA Colla, P., Loddo R.** Antiviral activity of benzimidazole derivatives. I. Antiviral activity of 1- substituted-2-[ (benzotriazol-1/2-yl) methyl] benzimidazoles. *Chem. Biodiversité*. **2008**, 5 (11): 2386-401.

**Van Gompel F., Van Den Eende J., Clerinx J., Taelman H.**

Prophylaxie et traitement du paludisme. Informations à l'attention des personnes séjournant pendant une période prolongée dans une zone à endémie palustre *Tropicultura*, **1989**, 7, 1, 36-40.

**Wery W.** Paludisme: diagnostic biologique Edition Marketing-Ellipse/AUPELF. **1991**, 111-127.

**While N.J. and al.** *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite *Clin Infect Dis.* **2008**, 46(2):172-3.

**Wirschum W., Maierg-M., Jochim J.C.**, Crystalline 1h-1, 2, 3-triazol-5-ylidenes *TETRAHEDRON*. **1997**. 53:5755-5766.

**Wirschum W., Winkler M., Lutz K., Jochims J.C.** Cycloadditions of 1-aza-2-azoniaallene cations to isothiocyanates *j. chem.Soc. Perkin Trans.* **1998**. 1: 1755-1762.

**Wirshum W., Winkler M., Lutz K., Jochims J.C.** Preparation of Polyfunctional Arylmagnesium, or Arylzinc Reagents Bearing a Triazene Moiety and Their Applications in Organic Synthesis *J.Chem .Soc. Perkin Trans.* **1998**. 2: 1755-1762.

**Wu C.-Y., King K.-J. Kuo C.-J., Fang J.-M., Wu J.-T., Ho M.-Y., Liao C.-L., Shie J.-J., Liang P.-H., Wong C.-H.** Structure-based chemotherapy of SARS -where do we stand, three years after The global out break? *Chem. Biol.* **2006**. 10: 13-261.

**Yousif. H. Khalaf., Hameed H.Ali., Ahmed .M. Mohamed.**  
Synthesis a Number of Triazene Compounds Derived from Purine and Studying their Biological Activity on Pathogenic Bacteria *J. of al-anbar university for pure science*: **2009**. 3: No.1.

**World Health Organisation** Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. Report on global monitoring: 1996-2004. World health organization Ed. Geneva. **2005**. Report No: WHO/HTM/MAL/2015.1103.

**XU.Z. Moore J.S.** Dendrimers II: Architecture, Nanostructure and Supra molecular ..., *Angew.Chem.Znt.Ed.Engl.* **1993**. 32, 1354.

**Zang J., Moore J.S, XU Z., Agure R.A.** Iodine-Promoted Decomposition of 1-Aryl-3, 3\_dialkyltriazenes: A Mild Method for the Synthesis of Aryl Iodides *J. Am. Gem. Sot.* **1992**. 114, 2273.

**ZHANG J., PESAK D.J., LUDWICK J.J., MOORE J.S.** Iodine-Promoted Decomposition of 1-Aryl-3, 3\_dialkyltriazenes: A Mild Method for the Synthesis of Aryl Iodides *J. Am. Chem. Soc. In press.* **1994**. 116, 4227:4239

**Zhu Z., Moore J. S.** Functionalizing the Interior of Dendrimers: Synthetic Challenges and Applications *J. Org. Chem.* **2000**. 65: 116-123.

# SERMENT DE GALIEN

---

*Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes Condisciples.*

*D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*

*D'exercer, dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.*

## **PERMIS D'IMPRIMER**

Vu :

Le président du jury

Vu :

Le Doyen.....

Vu et Permis d'imprimer

Pour le recteur, le Président de l'assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et par  
délégation

Le Doyen