

Liste des figures :

Figure 1 : Répartition mondiale du paludisme.....	5
Figure 2 : Cycle de développement du <i>Plasmodium</i> , agent du paludisme.....	8
Figure 3 : Structure de la chloroquine.....	11
Figure 4 : Accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive suivant un gradient de pH.....	12
Figure 5 : Structure de la quinine.....	13
Figure 6 : Représentation de la protéine putative <i>Pfnhe</i>	18
Figure 7 : Alignement de séquences de <i>ms4760</i> de plusieurs souches de <i>Plasmodium falciparum</i>	19
Figure 8 : Résumé du principe de la PCR.....	22
Figure 9 : Carte du Mali montrant l'emplacement des trois localités de d'étude..	23
Figure 10 : Technique de confection d'une goutte épaisse.....	27
Figure 11 : Technique de confection d'un frottis mince	28
Figure 12 : papier wattman utilisé pour la confection du confetti	31
Figure 13 : Photographie de gel d'agarose pour la différenciation des formes polymorphiques de la séquence <i>ms4760</i>	38
Figure 14 : Prévalence de <i>ms4760-1</i> et de <i>Pfcr1 K76T</i> dans les trois localités...	43
Figure 15 : Résistance <i>in vivo</i> à la chloroquine et prévalence de <i>ms4760-1</i>	44
Figure 16 : Prévalences de <i>ms4760-1</i> dans les trois localités et de l'utilisation des sels de quinine pour l'année 2003.....	45
Figure 17 : : Prévalences de <i>ms4760-1</i> et de l'utilisation des sels de Quinine à Bandiagara pour les trois années d'étude.....	46

Liste des tableaux :

Tableau 1: Milieu réactionnel pour les premières et deuxièmes amplifications avec un volume final de 25 µl par réaction.....36

Tableau 2 : Programme de la première et de la deuxième amplification du microsatellite ms4760.....37

Tableau 3 : Répartition des échantillons selon les sites et les années d'étude.....41

Tableau 4 : Récapitulatif des analyses moléculaires, résistance *in vivo* et enquête sur l'utilisation des la quinine.....42

Tableau 5 : Nombre d'accès palustres enregistrés et proportion traitée avec la quinine en 2003.....
44

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribo-Nucléique

ASRA: Allele Specific Restriction Analysis

BET: Bromure d'Ethidium

Bgra: Bandiagara

BSA: Bovine Serum Albumine

***Cg2*:** Candidate Gene 2

Cm: Centimètre

Cmax: Concentration maximale

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CQ: Chloroquine

DEAP: Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires

dNTP's: désoxy-Nucléotides Tri-Phosphate

DP: Densité Parasitaire

Fld: Faladié

FM: Frottis mince

GE: Goutte épaisse

Hg: Hémoglobine

J: Jour

K76T: Remplacement de la lysine (K) à la position 76 par la thréonine (T)

Kg: Kilo gramme

µg: micro gramme

mg: milli gramme

MgCl₂: Chlorure de Magnésium

µM: micro mol

mn: minute

MRTC: Malaria Research and Training Center

nM: nanomol

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PCR: Polymerase Chain Reaction

Pfcr1: *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter

Pfmdr1: *Plasmodium falciparum* multi drug resistance

Pfnhe1: *Plasmodium falciparum* sodium-hydrogene exchanger

PNLP: Programme National de Lutte contre le Paludisme

QN: Quinine

QTL: Quantitative Trait Loci

Sec: Seconde

SNPs: Single Nucléotide Polymorphism

TBE: Tri Borate EDTA

UV: Ultra-Violet

I – INTRODUCTION:

Le paludisme représente la plus grande endémie parasitaire avec 2 à 3 milliards d'individus exposés, soit 34% de la population mondiale. Le nombre de cas clinique est estimé entre 300 et 500 millions (dont 90% en Afrique subsaharienne) et la mortalité annuelle entre 1,5 à 2,7 millions [1].

Ces données sont revues à la hausse ces dernières années avec 515 millions d'épisodes cliniques annuels dont 70% en Afrique [2].

En Afrique, 10% de la mortalité chez les enfants de moins de 5 ans est directement lié au paludisme [1, 4, 5].

Au Mali, le paludisme représente la première cause de morbidité avec 15,6% et de mortalité de plus de 13% tout âge confondu [6].

Le contrôle de ce fléau mondial se heurte d'une part à une mauvaise prise en charge des cas et d'autre part à l'extension de la résistance des anophèles et des plasmodies (particulièrement *Plasmodium falciparum*) respectivement aux insecticides et aux antipaludiques d'usage [3,7].

La résistance de *Plasmodium falciparum* aux molécules antipaludiques est un des problèmes les plus inquiétants en santé publique et il a été observé depuis ces dernières décennies des échecs thérapeutiques confirmés par des études cliniques.

Depuis les années 1950 – 60, des cas d'inefficacité du proguanil et de la pyriméthamine sur les souches de *Plasmodium vivax* et de *Plasmodium falciparum* étaient déjà signalés en Asie, en Amérique et en Afrique [8].

La chloroquine, qui était très efficace il y a 50 ans devient de plus en plus inefficace dans diverses parties du monde avec des taux d'échecs thérapeutiques remarquablement croissants au fil des années.

Quand à la quinine elle reste la principale molécule efficace en Afrique pour le traitement des cas de paludisme graves et compliqués.

Cependant, certaines études ont rapporté des cas d'échecs cliniques après traitements à la quinine en Asie et en Amérique du sud [9,10, 11, 12].

D'autres études ont démontré la diminution de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la quinine par des tests *in vitro* [13,14].

A Mayotte, un taux de résistance *in vitro* de 17% des souches de *Plasmodium falciparum* à la quinine a été notée [15]. La résistance *in vitro* *Plasmodium falciparum* à la quinine a également été notée chez des souches Mozambicaines [16] et Gabonaises [17]. En plus des échecs cliniques ont été observés lors de traitement de paludismes simple par les sels de quinine au cours d'une étude effectuée au Soudan [18].

Plusieurs hypothèses sont émises pour tenter d'expliquer le mécanisme de la résistance à la quinine de *Plasmodium falciparum*. A cet effet des études ont été menées sur la relation entre l'expression des formes mutantes des gènes de la chloroquinorésistance (***Pfcr*** et ***Pfmdr***) et la diminution de la sensibilité à la quinine [19] et sur l'association de cette baisse de sensibilité à un polymorphisme au sein d'un gène ***Pfnhe*** codant pour un transporteur d'ions **H⁺/Na⁺** [20].

La forme polymorphique (***ms4760.1***) du microsatellite ***ms4760*** du gène ***Pfnhe*** serait associée à la baisse de la sensibilité de certaines souches de laboratoire au traitement à la quinine [20].

En Afrique, les Programmes Nationaux de lutte contre le Paludisme se sont adaptés à l'évolution remarquable de la chimiorésistance dans plusieurs pays par des modifications de leurs politiques de traitement du paludisme.

Au Mali, une augmentation de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine a été notée. Les premiers cas de chloroquinorésistance furent signalés chez des expatriés français ayant séjourné au Mali en 1987.

Cette résistance a ensuite progressé au cours du temps. Les premiers cas chez les autochtones ont été décrits en 1989 [21]. La surveillance de la dynamique de la chimiorésistance de *P. falciparum* menée dans différents faciès épidémiologiques de au Mali témoigne de la remarquable progression de la chloroquinorésistance.

Ainsi, il a été rapporté un taux de 29,3% de résistance à la chloroquine de *Plasmodium falciparum* à Safo et un taux de 19,8% à Sotuba en 1993[22]. A Kollé il a été rapporté des taux de 25,8% en 1998 [23] et 28,7% en 1999 [24].

Devant cette progression de la résistance dans différentes zones d'étude au Mali, le programme nationale de lutte contre le paludisme (PNLP) en accord avec l'OMS a adopté depuis l'année 2004 la bithérapie pour le traitement des cas simples de paludisme avec comme associations retenues l'arthémeter en combinaison avec la luméfantrine ou l'Artésunate en combinaison avec l'Amodiaquine. La quinine étant réservée pour les cas de paludisme grave et compliqué et pour les cas résistants aux autres traitements.

Aucune étude de la résistance à la quinine n'a encore été menée au Mali. Cependant des cas anecdotiques isolés de résistance à cette molécule ont été rapportés (A. Djimdé communication personnelle). Le but de ce travail est d'explorer la relation entre le polymorphisme de la séquence *ms4760-1* et la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la quinine.

Le présent mémoire comportera trois parties :

- une introduction et des généralités comprenant les objectifs de l'étude
- une présentation du matériel et des méthodes d'étude utilisés
- une description suivie d'une discussion des résultats obtenus.

II- GENERALITES

- OBJECTIFS :

a- Objectif général:

Caractériser les mécanismes moléculaires de la résistance de *P.falciparum* à la quinine.

b- Objectifs spécifiques :

- Déterminer la relation entre la forme mutante (***Pfcr*** T76) du gène ***Pfcr*** fortement associé à la chloroquinorésistance et la forme polymorphique (***ms4760-1***) du gène ***Pfnhe*** impliquée dans la baisse de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la quinine.
- Déterminer la relation entre la prévalence de ***ms4760-1*** de ***Pfnhe*** et l'utilisation de la quinine (effet de la pression médicamenteuse) dans trois localités au Mali.

II. A- Epidémiologie du paludisme

II.A.1- Définition du paludisme

Maladie parasitaire, le paludisme est une protozoose encore appelée malaria, elle est transmise par la piqure infestante d'un vecteur hématophage qui est la femelle d'un moustique du genre Anophèles et qui est hématophage.

L'agent pathogène est un protozoaire du genre *Plasmodium*, famille des *Plasmodidae*, ordre des *Eucoccididae*, classe des *Sporozoidae*, phylum des *Apicomplexa* et sous le règne des Protistes [25].

On connaît quatre espèces de *Plasmodium* inféodées à l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* (qui parasite exceptionnellement les grand singes africains).

Cependant seul *Plasmodium falciparum* est responsable des formes graves de paludisme et du taux élevé de mortalité [26].

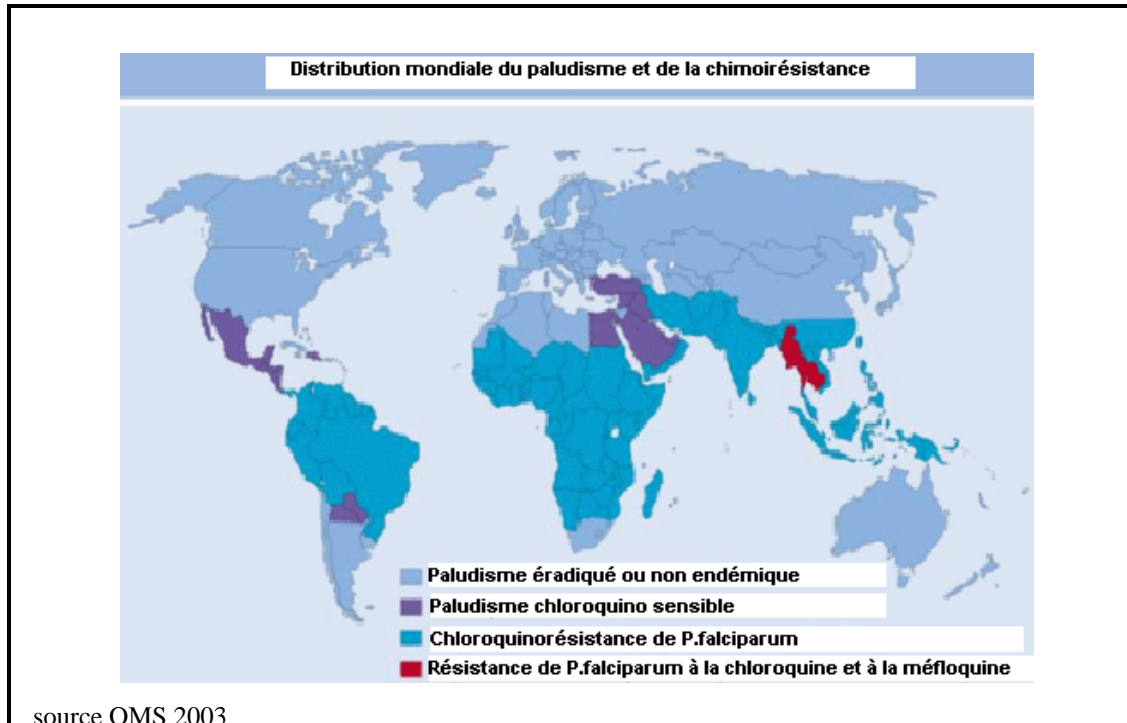


Figure1 : Répartition mondiale du paludisme.

La distribution des 4 espèces n'est pas uniforme à l'échelle mondiale :

- *Plasmodium falciparum* est la plus fréquente et la plus dangereuse, d'abord limitée aux zones tropicales et intertropicales, elle se retrouve un peu partout dans les zones concernées par le paludisme d'Afrique, d'Asie, d'Amérique et d'Océanie.
- *Plasmodium vivax* est plus rare en Afrique à cause de la faiblesse du portage de l'antigène Duffy.
- *Plasmodium ovale*, d'abord localisée en Afrique noire se reprend de plus en plus.
- *Plasmodium malariae* se retrouve un peu partout de manière clairsemée

Le paludisme peut survenir dans la plus part des régions tropicales et subtropicales de la planète (figure 1) avec 2 à 3 milliards de la population exposée et provoquant jusqu'à 2,7 millions de mort par an, le plus souvent des enfants en Afrique au sud du Sahara.

Supportant 70% de cette incidence, l'Afrique reste de loin le continent le plus touché [28].

II.A.2- Cycle biologique du *Plasmodium* [28] (figure 2)

Le *Plasmodium* est un parasite intracellulaire obligatoire dont le cycle, complexe, intervient chez deux hôtes (cycle digène).

Le parasite est transmis à l'homme lors de la piqure de la femelle de l'anophèle elle même infectée au préalable lors de son repas sanguin chez un homme infecté.

II.A.2.1- Chez l'homme

C'est chez l'homme que se déroule le cycle asexué (encore appelé schizogonie) du *Plasmodium*. Cette phase se déroule en deux étapes :

- Cycle **exoérythrocytaire** où les **sporozoïtes** sont injectés lors du repas sanguin par l'Anophèle femelle infectée. Les sporozoïtes vont migrer en une demi-heure jusqu'au foie et pénétrer dans les hépatocytes où ils prennent le nom de **cryptozoïte**. Au bout d'une semaine et après plusieurs cycles de division apparaissent les **schizontes** hépatiques ou "corps bleu" contenant des milliers de noyaux. L'éclatement de ce "corps bleu" libère de nombreux **mérozoïtes** dans la circulation sanguine dit "mérozoïtes de première génération".

Dans le cas d'une infestation à *P. vivax* ou *P. ovale*, il peut se former des hypnozoïtes dans le foie qui sont des formes quiescentes de certains cryptozoïtes.

- Cycle **intraérythrocytaire** (schizogonie érythrocytaire) qui s'effectue dans le sang et commence par la pénétration de **mérozoïtes** (libérés par l'éclatement des hépatocytes infectés) dans les globules rouges ou érythrocytes. Le **mérozoïte** se transforme alors en **trophozoïte** qui se présente en forme de bague au début de son développement à cause

d'une vacuole digestive volumineuse. Suite à une série de division nucléaire le trophozoïte donne naissance à un **schizonte** qui mûrit en un corps en rosace.

L'éclatement de ce corps libère des **mérozoïtes** de deuxième génération qui sont eux aussi capables de réinfecter d'autres érythrocytes sains.

Après plusieurs schizogonies intra-érythrocytaires apparaissent dans certains érythrocytes parasités des éléments parasites à potentiel sexué. Ce sont les gamétocytes mâle et femelle amorçant ainsi le cycle sexué ou **sporogonie**.

Ces Schizogonies aboutissent à la formation d'éléments parasites haploïdes.

III.A.2.2- Chez l'Anophèle femelle :

Environ 400 d'espèce d'Anophèles sont connues dont une soixantaine capable de transmettre le paludisme dans les conditions naturelles [26]

Lors de son repas sanguin l'anophèle femelle absorbe tous les stades parasites présents dans le sang mais seuls les gamétocytes poursuivent leur développement en se transformant en gamètes une fois dans l'estomac du moustique.

Un des gamètes mâles issus de l'**exflagellation** du gamétocyte mâle va féconder le gamète femelle pour donner un œuf mobile ou **ookinète** (stade diploïde). Ce dernier franchit puis se fixe sur sa face externe la paroi stomacale du moustique pour donner un **oocyste** qui va se diviser en centaines de **sporozoïtes** libérés par éclatement.

Les **sporozoïtes** migrent sélectivement dans les glandes salivaires du moustique avant d'être injectés à un autre hôte (sain) lors du repas du moustique ainsi infecté.

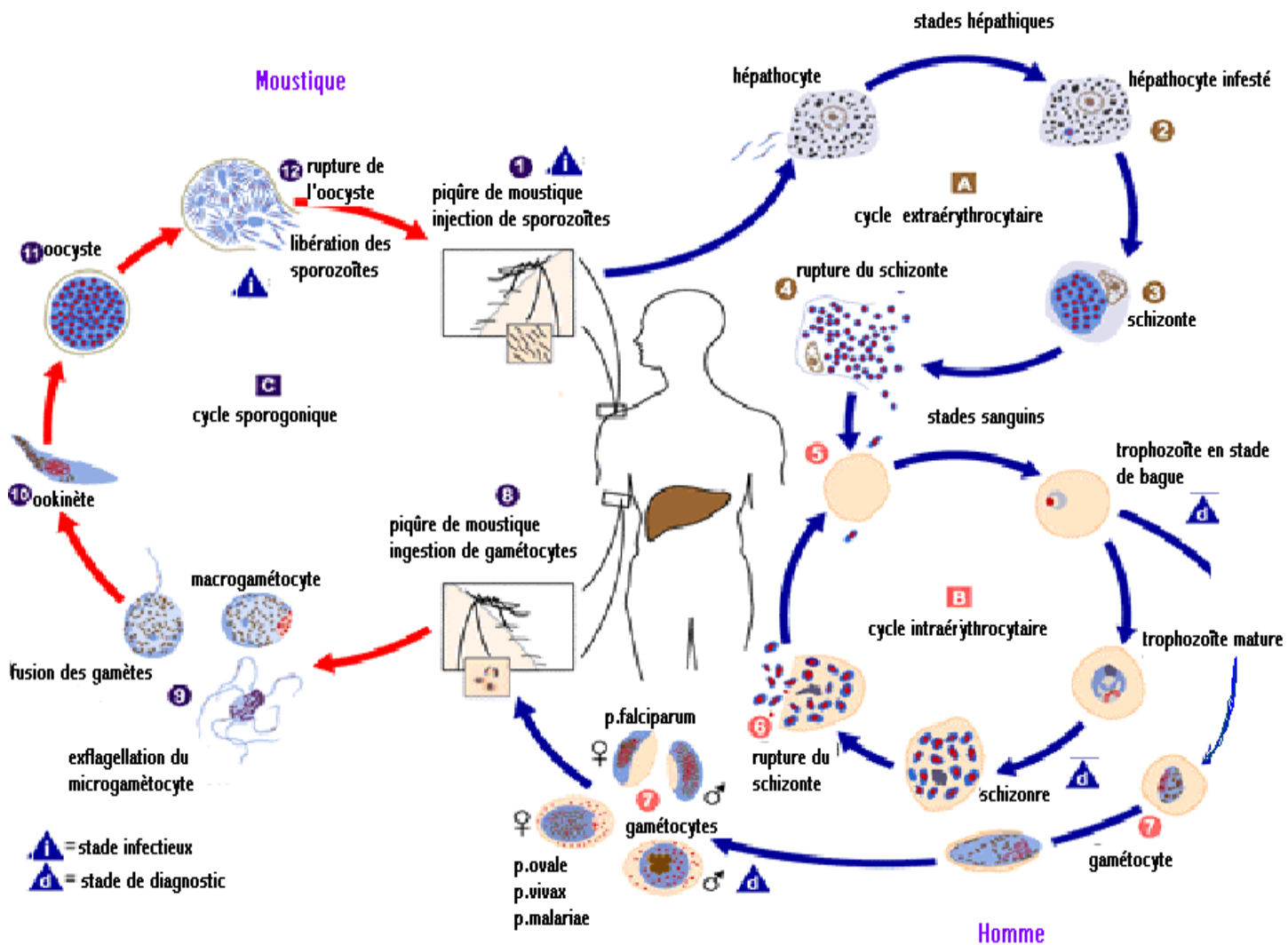


Figure 2
Cycle de développement du *Plasmodium*, agent du paludisme.

(Source : phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/04vol30/30s1/page9_f.html)

Le cycle de développement du *Plasmodium* comprend une phase de multiplication asexuée qui se déroule chez l'Homme, et une phase de multiplication sexuée qui se déroule chez un moustique (Anophèle). Chez l'Homme, le *Plasmodium* vit à l'intérieur des Hématies, se nourrissant d'hémoglobine. Si une femelle d'anophèle vecteur pique un individu infecté, elle aspire avec le sang de nombreux *Plasmodium*. Ceux-ci vont alors effectuer leur reproduction sexuée dans l'estomac du moustique, puis la nouvelle génération va se loger dans les glandes salivaires. Si ce moustique pique alors un Homme sain, il va lui injecter, avec sa salive, de nombreux *Plasmodium*. Ceux-ci vont se multiplier dans les cellules du foie, puis entrer dans les globules rouges.

II.B- Généralités sur la symptomatologie du paludisme : [29]

II.B.1- Accès palustre simple :

Le paludisme de primo-invasion : précédé d'une phase d'incubation muette de 7 jours, la phase d'invasion se caractérise par l'apparition d'une fièvre continue, embarras gastrique, céphalées et myalgie. Il peut évoluer vers l'accès pernicieux.

L'accès palustre à fièvre périodique : elle se manifeste pendant une dizaine d'heure durant lesquelles se succèdent les stades de frisson, de chaleur et de sueurs et se caractérise par des accès thermiques intermittents accompagnés de signes comme la splénomégalie et l'anémie.

Traitement du paludisme simple : Jusqu'à une date récente les cas simples de paludisme étaient traités par la chloroquine sauf en cas de résistance ou dans les zones de chloroquinorésistance. La prise en charge était ainsi faite par l'amodiaquine, la sulfadoxine-pyriméthamine, la quinine ou les autres antipaludiques comme l'halofantrine et la méfloquine [30].

II.B.2- Complications

- **L'accès pernicieux** : ou **neuropaludisme** est caractérisé par une encéphalite aiguë due à un tropisme cérébral de *Plasmodium falciparum* chez les enfants de moins de dix ans en zone endémique. Cet accès se manifeste par une forte fièvre, des troubles neurologiques (convulsions, troubles de la conscience, du tonus musculaire et psychique) et viscérales (ictère, anémie, œdème pulmonaire, insuffisance rénale fonctionnelle). Souvent accompagnée d'acidose lactique l'hypoglycémie est une des complications majeures du **neuropaludisme**. Bien traité, la guérison du **neuropaludisme** peut se faire sans séquelles sinon il est fatal en deux ou trois jours.

- **Le paludisme viscéral évolutif** : forme chronique du paludisme, il se rencontre chez les individus exposés à des infestations répétées mais n'ayant pas encore acquis une prémunition suffisante. Il se manifeste par une anémie, dyspnée, asthénie, œdème et splénomégalie.

- Traitement de l'accès pernicieux : [31]

Cet accès nécessite une prise en charge d'urgence qui doit tenir compte de tous les états du malade. Ainsi un traitement symptomatique (anticonvulsif et anti-infectieux) est associé au traitement antiparasitaire qui est à base de quinine injectable ou des dérivés du quinghaosu. Tout ceci est accompagné du rétablissement de l'équilibre hydroélectrique, hémodynamique et d'une assistance respiratoire ou rénale selon les troubles observés.

II.C- Généralités sur les médicaments antipaludiques

La croissance progressive de la chimiorésistance des parasites aux différents traitements réduit de plus en plus la gamme des antipaludiques efficaces.

Les médicaments antipaludiques sont classés en fonction de différents critères parmi lesquels l'origine naturelle ou de synthèse du médicament; selon que le médicament soit schizonticide, gamétocytocide, ou actif sur les stades intrahépatiques. Le classement peut être effectué sur la base de la vitesse d'action du médicament en distinguant les antipaludiques à action rapide (Quinine et amino-4-quinoléine) et ceux à action lente (antifolique et antifolinique) ou encore selon la structure chimique :

- Les amino-4-quinoléïnes (chloroquines, Hydroxichloroquine, Oxychloroquine, Novaldiamine, Dabequine, Amodiaquine, Amopyroquine, Cycloquine, Tebuquine, Sentoquine).
- Les quinoléïnes méthanol (Quinine, Cinchonine, Quinidine, Cinchoquinidine, Halophantrine, Mefloquine).
- Les Amino-8-quinoléïnes (Primaquine, Pamaquine, Pentaquine, Plasmocide, Quinocide).

- Les antifoliques et antifoliniques (Proguanile, Pyriméthamine, Sulfadoxine, Chorproguanil).
- L'artéminisine et ses dérivés.
- Les antibiotiques à activité schizontocide (cyclines, macrolides ...).

Dans cette étude, seules ont été prises en compte la quinine et la chloroquine (un amino-4-quinoléine).

II.C.1- La chloroquine : (diéthylamino-4' methyl-butylamino)-4 chloro-7 quinoléine $C_{18}H_{26}ClN_3$ (figure 3)

Découverte par des chercheurs allemands en 1934 [32] puis développée aux Etats-Unis en 1944 [33], la chloroquine qui présente une excellente action **schizonticide** sur les souches sensibles de *Plasmodium falciparum* a, comme tous les autres amino-4-quinoléines, une action très rapide de part sa vitesse d'absorption.

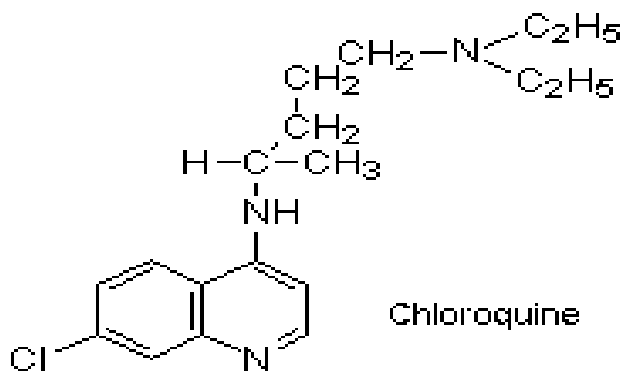


Figure 3 : Structure de la chloroquine.

- **Activité :**

Elle est **lysosomotrophe** et s'accumule de manière plus importante au niveau de la vacuole digestive du parasite et est ainsi retrouvée selon un gradient décroissant de pH (figure 4) dans l'érythrocyte infesté. [34]

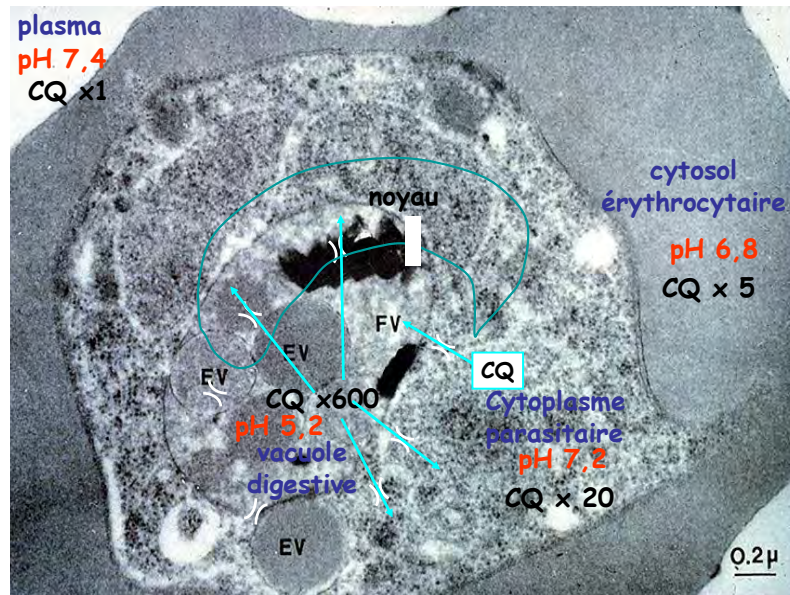


Figure 4

Accumulation de la chloroquine suivant un gradient de pH. Source : (ref 33).

Cette vacuole est en effet un organe intracellulaire acide spécialisée dans la digestion de l'hémoglobine de l'érythrocyte infesté en acides aminés pour la croissance du parasite mais aussi en un dérivé de l'hème : l'hématine toxique. Le parasite polymérise ce dérivé en hémotoïne qui donne par accumulation le pigment malarique.

Le processus de polymérisation est entravé en présence de chloroquine dans la vacuole. Le médicament en empêchant la formation de l'hémotoïne forme un complexe lithique avec l'hématine dont l'accumulation aboutit à la lyse de la cellule [35, 36].

La chloroquine inhibe également l'ADN-polymérase des hématozoaires, et les protéases acides parasites.

II.C.2- La Quinine

La quinine (figure 5) est un alcaloïde naturel du quinquina, la plus ancienne et la plus utilisées des amino-alcools (découverte depuis le 18^{ème} siècle). Elle est le médicament de prédilection lors du traitement des cas graves de paludisme de part ses propriétés pharmacologiques et les possibilités de son administration intraveineuse et intra rectale.

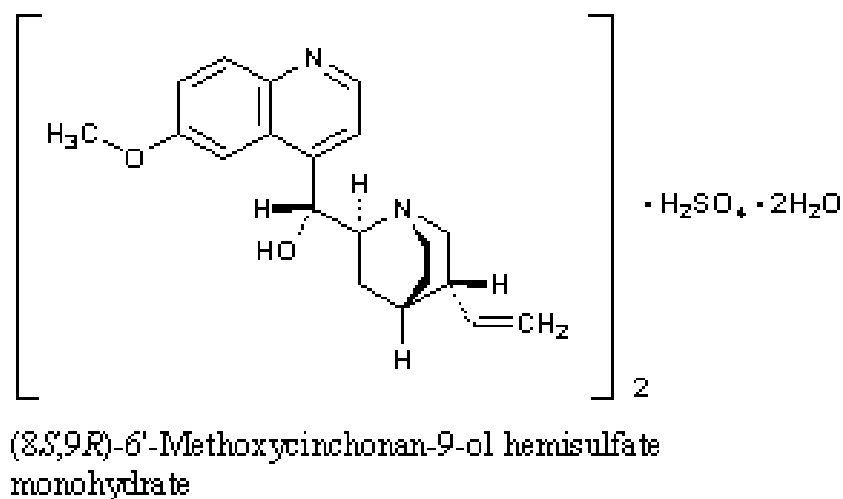


Figure 5: Structure de la quinine.

-Activité :

C'est un **schizonticide** sanguin à action rapide ayant peu d'action sur les sporozoïtes et les stades exo-érythrocytaires des *Plasmodia*. Elle est aussi **gamétocytoicide** pour *P.vivax* et *P.malariae* mais pas pour *P.falciparum*.

La quinine est une base faible qui s'accumule dans la vacuole digestive du parasite et agirait en inhibant l'action de l'hème polymérase, une enzyme qui intervient dans la polymérisation des hémines issues de la dégradation de l'hémoglobine.

Il s'en suit une accumulation néfaste de l'hémine lithique dans la vacuole entraînant une lyse du parasite [37].

II. D- Les vaccins :

La liste déjà longue des «protéines-candidates» à une utilisation vaccinale a été sensiblement allongée à la suite des découvertes récentes [38]. Pour l'essentiel, il s'agit de protéines de stade avec, notamment, des antigènes de stades pré-érythrocytaires (intra-hépatiques ou des sporozoïtes) érythrocytaires et gamétocytaires. Comme pour les nouvelles cibles thérapeutiques, le problème sera d'opérer une sélection rigoureuse entre ces diverses possibilités, avant de passer à une évaluation préclinique et éventuellement clinique.

Du point de vue technique, une des difficultés de la vaccination antipalustre est la production d'antigènes en quantité suffisante, ce que ne permettent pas les cultures *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. Sur le plan général, les futurs vaccins antipaludiques devront, pour être efficaces, entraîner une immunité aussi bien cellulaire qu'humorale. Ils devront aussi être « polyvalents », en couvrant le plus possible la gamme des antigènes qui varient pour un stade parasitaire donné ou d'un stade parasitaire à un autre (vaccin ant sporozoïte, anti-mérozoïte ou anti-gamétocyte). Ces différents objectifs peuvent être atteints grâce aux vaccins à ADN, constitués de plasmides auxquels sont incorporés les gènes codant les protéines vaccinales. Ces plasmides sont injectés dans le derme ou dans les masses musculaires. Les gènes qu'ils apportent sont localement incorporés dans le génome des cellules au niveau du point d'injection. Il s'ensuit une endosynthèse des antigènes par le sujet vacciné lui-même, avec induction d'une immunité humorale et cellulaire.

Ces vaccins à ADN ont été très étudiés durant ces dernières années, grâce aux progrès de la génomique et de la biologie moléculaire [39]. Ils offrent notamment la possibilité d'associer plusieurs gènes et donc plusieurs sources d'immunisation.

Au total, ces vaccins à ADN apportent des solutions très originales et apparemment très prometteuses.

Leur utilisation en clinique exigera cependant de nombreux contrôles d'efficacité mais surtout d'innocuité, compte tenu de la crainte que peut entraîner l'idée de voir incorporer des gènes de *Plasmodium* dans le génome de cellules humaines, même si seules des cellules somatiques sont concernées.

II. E- Chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques:

La chimiorésistance du *Plasmodium* a été définie par l'OMS comme étant l'aptitude du parasite à survivre et à se développer malgré la présence d'antipaludiques utilisés à des doses ordinairement recommandées ou plus mais toujours dans les limites de tolérance de l'organisme [40].

Actuellement la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux différents antipaludiques se répand progressivement sur tous les continents.

Comme chez les bactéries, cette résistance peut s'expliquer par les différents mécanismes de l'inactivation du médicament, de l'altération du site de fixation du médicament [41], de l'inhibition de l'entrée du médicament et/ou de son efflux actif [42] observé dans la chloroquinorésistance [43].

III.E.1- Résistance à la chloroquine:

Les souches chloroquinorésistantes deviennent de plus en plus fréquentes et ceci à travers tous les continents. Pendant les dix dernières années un certain nombre de gènes ont été associés à cette résistance parmi lesquels *Pfmdr1*, *cg2* et *Pfcr1*.

Des études plus récentes ont démontré que le gène *cg2* malgré une forte association statistique n'aurait pas un rôle important dans la chloroquinorésistance [44].

Quant au gène *Pfmdr1* situé sur le chromosome 5 et qui code pour une glycoprotéine, il serait impliqué dans le transport transmembranaire de diverses molécules y compris les médicaments antipaludiques comme la chloroquine [45].

Une mutation ponctuelle au niveau du codon **86** de ce gène entraînant ainsi une substitution de l'**Asparagine** par la **Tyrosine** pourrait contribuer à moduler la résistance de *Plasmodium falciparum* au traitement à la chloroquine. [46]. Le gène le plus récent dans le phénomène de chloroquinorésistance est le *Pfcr*t (*Plasmodium falciparum* chloroquine résistance transporter) identifié par Fidock *et al* [47] sur le chromosome 7. Une mutation au niveau du codon **76** de ce gène aboutit à une substitution de la **Lysine** (K) par la **Thréonine** (T) (mutation **K76T**) au niveau de la protéine transmembranaire (*Pfcr*t) de la vacuole digestive de *p.falciparum*. Cette mutation serait la cause de la résistance à la chloroquine des différentes souches de *P. falciparum* [48].

En effet des études ont montré que la transfection de souches de *P.falciparum* sensibles par ce gène muté à lui seul conférait une résistance à la chloroquine. D'autres études ont montré que tous les patients ayant fait un échec thérapeutique à la chloroquine selon les critères du protocole de l'**OMS** [57] portaient des souches avec la mutation **K76T** [49].

II.E.2- Résistance à la quinine:

La résistance à la quinine est encore peu répandue.

Des cas d'échecs cliniques ont été observés un peu partout dans le monde avec les premiers cas observés en Asie, Amérique latine et en Océanie [50] et plus récemment en Afrique [51, 52]. Des CI 50 (concentration inhibitrice de 50% des parasites) dépassant les seuils de la sensibilité à la quinine (CI 50>500nM) ont été observées lors de tests *in vitro* réalisés sur des souches de Plasmodium à Mayotte avec 17% de résistance [15]. La résistance à la quinine n'est pas encore vraiment élucidée mais face à ces cas isolés d'échec au traitement du paludisme à la quinine, un certain nombre de méthodes

d'analyse ont été utilisées pour identifier les gènes responsables de cette baisse de sensibilité à la quinine des souches de *Plasmodium falciparum*.

Selon une étude récente, le gène ***Pfmdr1*** (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance) est impliqué dans la réponse du parasite à la chloroquine, à la quinine et aux autres antipaludiques de même que ***Pfcr1*** déjà connu comme étant l'acteur de la résistance à la chloroquine [19].

Cette même étude démontre par la recherche de **SNPs**(Single Nucléotide Polymorphisms) au niveau de 49 gènes pouvant coder pour des transporteurs membranaires que 11 d'entre eux y compris ***Pfmdr1*** et ***Pfcr1*** ont une association statistique significative avec la baisse de sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine à la quinine.

Une autre étude d'association menée plus récemment avec la recherche et l'analyse des **QTL** apporte des liens entre ***Pfcr1***, ***Pfnhe*** et la baisse de la sensibilité du parasite à la quinine [20].

II.E.2.1- QTL et recherche de QTL :

- Définition d'un QTL :

Chaque caractère phénotypique est déterminé par un certain nombre de gènes ou famille de gènes qui occupent différents loci sur les différents chromosomes d'un organisme. Ce caractère peut être qualitatif ou quantitatif selon son mode de transmission à travers différentes générations.

Un « Quantitative Trait Locus » ou QTL désigne ainsi tout un locus (ou région) du chromosome qui contrôle ou qui serait associé à un trait de caractère lorsque ce dernier est défini comme quantitatif donc avec un caractère continu lors de sa transmission. Sans être nécessairement le gène lui-même il est lié au gène qui souligne le trait.

- Détection de QTL et déterminisme génétique des caractères :

La cartographie des marqueurs d'un QTL est une étude statistique qui identifie les régions du génome qui peuvent être impliquées dans l'expression du trait quantitatif.

Cette association du QTL avec le phénotype ressort avec une association statistique entre l'observation de l'expression du phénotype et un ou plusieurs loci.

Cette technique fut développée à partir de méthodes statistiques des années 1980 [53] et adaptée à la cartographie génétique en 1995[54].

Après l'analyse d'un certain nombre de parasites de la malaria, la recherche de QTL a ainsi permis d'impliquer essentiellement des loci sur les chromosomes 7, 5 et 13 avec un intérêt particulier pour les gènes *Pfcr1* du chromosome 7 et *Pfnhe* du chromosome 13[20].

Le gène *Pfnhe* (*Plasmodium falciparum* Sodium-Hydrogen Exchanger) qui coderait pour une protéine de transport transmembranaire d'ions révèle des variations à différents niveaux de sa structure (figure 6).

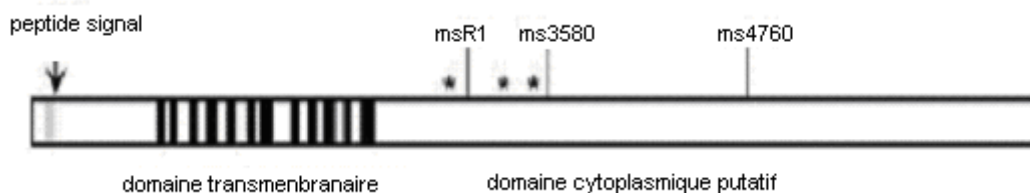


Figure 6
Représentation de la protéine putative *Pfnhe* (Ferdig *et al.*, Mol Mic, (2004), 52 (4), 985-997)

Les *msR1*, *ms3580* et *ms4760* représentent des motifs **micro satellitaires** répétés et seules les variations *ms4760* furent associées au comportement des souches de *Plasmodium falciparum* vis à vis du traitement à la quinine.

Les répétitions au sein de cette séquence sont constituées par un motif **DNNND** de Asparagine (N) et de Acide aspartique (D). Le nombre du motif va de un à plus de trois (voir figure7).

Ferdig et al., Mol Mic, (2004), 52 (4), 985-997

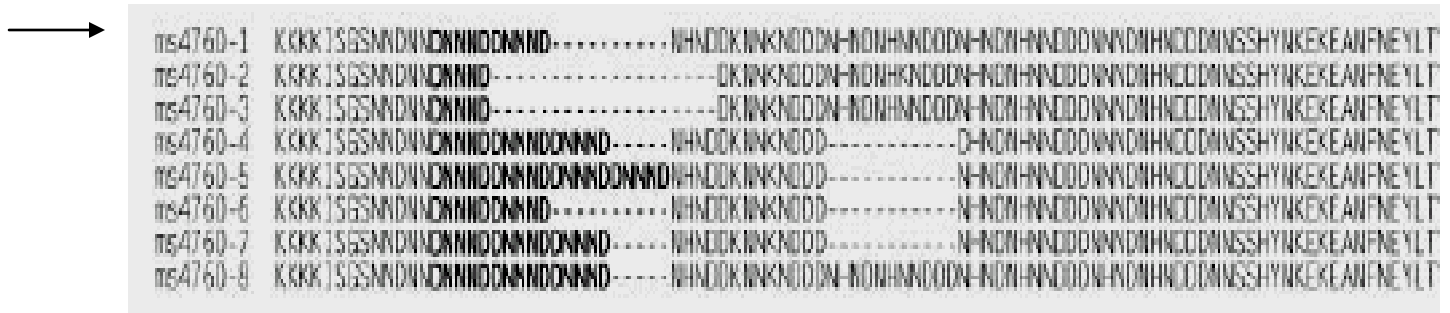


Figure 7

Alignement de séquences de *ms4760* de plusieurs souches de *Plasmodium falciparum*.

Ainsi la forme *ms4760-1* avec deux copies du motif est celle qui se trouve associée à la réduction de la sensibilité du parasite à la quinine [20].

II.F- Généralités sur les méthodes d'évaluation de la chimiorésistance :

Plusieurs tests et méthodes ont été standardisés par l'OMS pour évaluer la sensibilité des souches de *Plasmodium falciparum* aux différentes molécules. On distinguera ainsi les évaluations *in vivo* [55] et *in vitro* [56].

II.F.1-Test *in vivo*:

Une dose ordinairement recommandée d'un antipaludique à tester est administrée à un sujet portant des parasites du paludisme (*Plasmodium falciparum*) et son efficacité est mesurée par le contrôle de la disparition des parasites du sang au bout d'un temps donné. Plusieurs variantes de ce test *in vivo* sont utilisées pour évaluer l'efficacité des différents schémas thérapeutiques : Le test pratique standard de 7 jours (OMS 1973) [57], le test standard de 14 jours (OMS1996) [58], le test prolongée de 28 jours (OMS 1973) [57] et le test simplifié du C.R.C.P/O.C.C.G.E.

II.F.2- Tests *in vitro*:

Comprend tous les tests *in vitro* d'inhibition de la maturation des schizontes d'isolats de parasites issus de prélèvement de patients infestés.

Les principaux tests *in vitro* sont :

- **Test optique** : Le micro-test OMS [59] et le semi-microtest de Lebras [60] ont été mis au point à la fin des années 1970. Des parasites prélevés chez des patients sont incubés à 37°C en présence de CO₂ et d'O₂ avec des concentrations croissantes de l'antipaludique à tester pendant 24 à 48heures. Les résultats sont exprimés en CMI (concentration minimale inhibitrice) pour le micro-test OMS et en CI50% (concentration inhibitrice 50%) pour le semi-microtest.
- **Test isotopique [61]** : Le test *in vitro* de chimiosensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques majeurs est effectué selon la méthode du microtest isotopique, basée sur l'inhibition de l'incorporation de l'hypoxanthine marquée au tritium par des doses croissantes de différents antipaludiques. Les seuils de résistance à la chloroquine, à l'amodiaquine, à la quinine et à la pyriméthamine, sont fixés à 110 nM, 70 nM, 800 nM, et à 2000 nM.

- **Test enzymatique PLDH ou DELI test** [62]: Test in vitro de chimiosensibilité rapide et sensible développé à partir de la technique ELISA, ce test permet le dosage de l'enzyme parasite de la lactate déshydrogénase qui est exprimé au cours du métabolisme des parasites intraérythrocytaires.

II.F.3- Tests moléculaires:

-Technique de la PCR

Principe de la PCR :

La **PCR** revient à copier un fragment du matériel génétique en plusieurs millions d'exemplaires. A partir d'une seule séquence cible d'**ADN**, la technique **PCR** produit en moins de trois heures 100 millions de copie. On comprend son intérêt dans le domaine de la biologie moléculaire lorsqu'on souhaite identifier une séquence précise d'**ADN**, la modifier, rechercher une mutation puisqu'on peut travailler sur une énorme quantité de matériel génétique.

Décrite en 1985 par Mullis *et al* cette technique permet de faire une polymérisation en chaîne de l'ADN d'où le nom de réaction de polymérisation en chaîne ou PCR.

Son principe est basé sur celui de la réplication de l'ADN.

Avec les acteurs de la réaction comme l'ADN à amplifier, les amorces, l'enzyme de polymérisation de l'ADN, les différents nucléotides, le tampon de la réaction à pH 7, $MgCl_2$, H_2O , la réaction de PCR correspond à une succession d'une trentaine de cycles comportant chacun trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation correspondant à des cycles de température réalisés automatiquement par un *thermocycleur*.

La quantité d'**ADN** obtenue est assez suffisante pour permettre l'observation des bandes rendus visibles par le **BET** (Bromure d'Ethidium) qui s'intercale entre les bases et qui a une fluorescence orange a l'ultra-violet (**UV**).

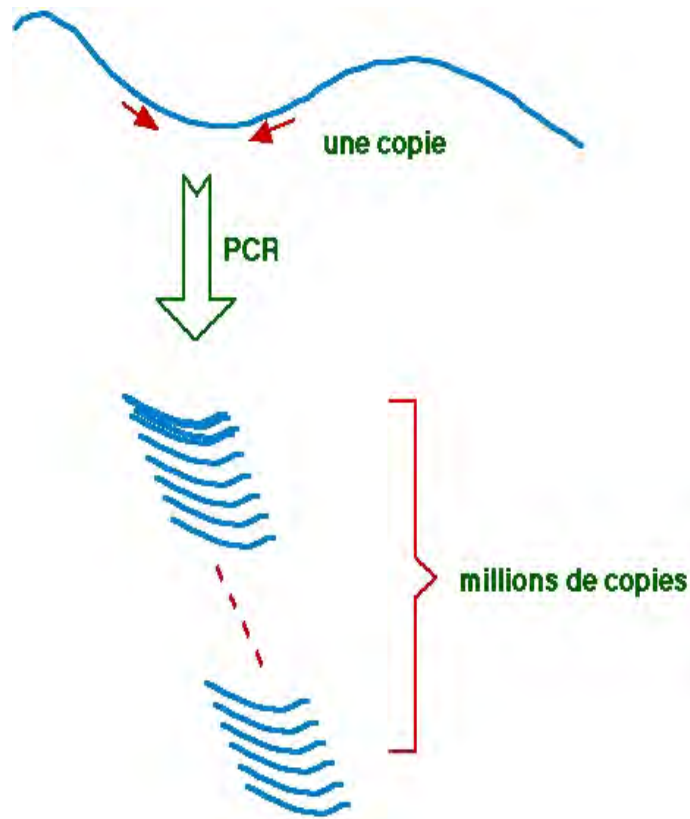


Figure 8: résumé du principe de la PCR

III- METHODOLOGIE:

III. A- Lieu d'étude :

Cette étude est effectuée au Mali, dans trois zones endémiques de situation géographique (figure 9) et d'endémicités différentes avec des taux de résistance *in vivo* à la chloroquine remarquablement variables selon les sites et les années. Il s'agit de Faladié (60% de résistance parasitologique en 2000 contre 37.2% en 2003), Kollé (31,1% en 2002) et Bandiagara qui avec 10,0% en 2002, a le plus bas taux de résistance *in vivo*.

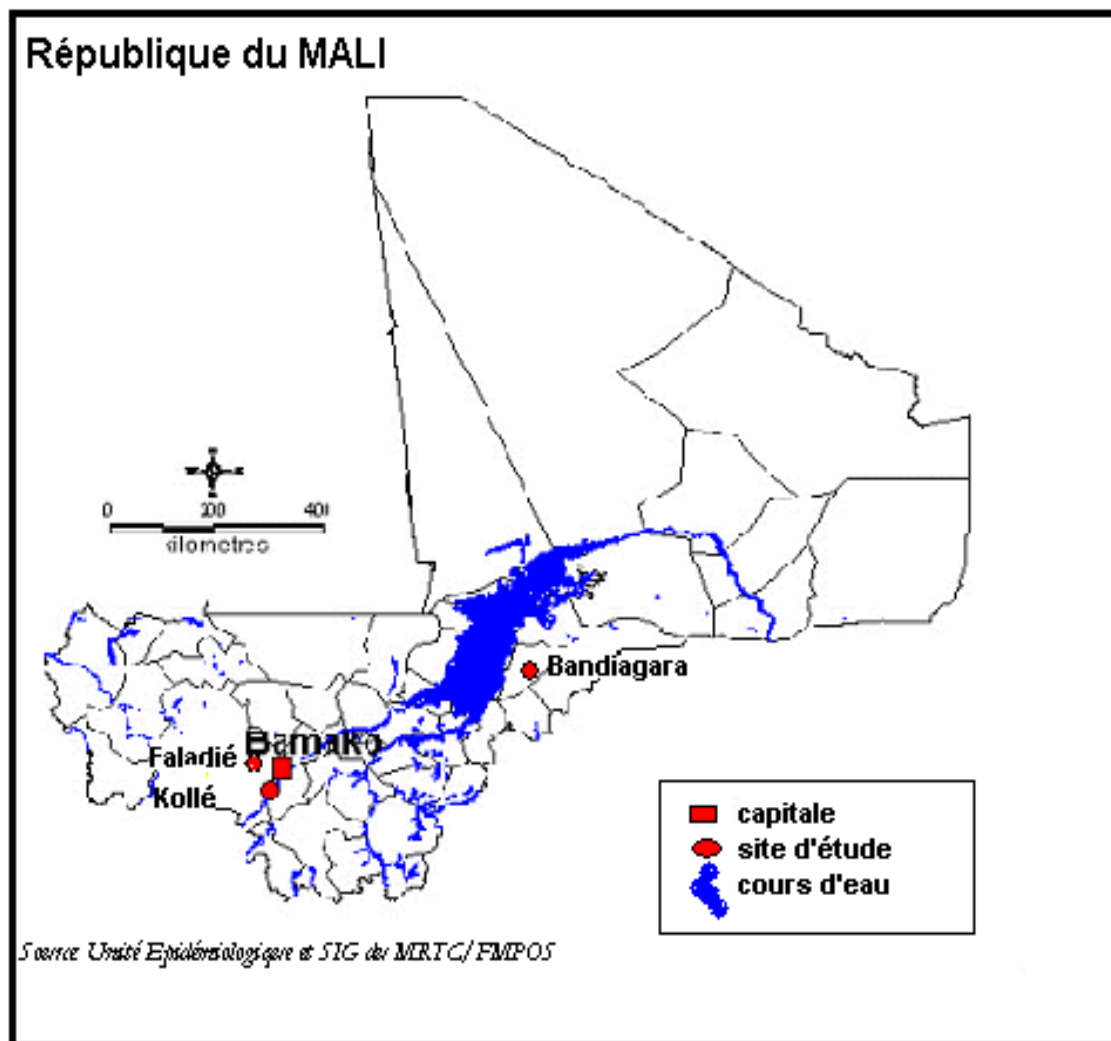


Figure 9
Carte du Mali montrant l'emplacement des trois localités de l'étude

III. B- Type d'étude

C'est une étude longitudinale prospective chez des patients souffrant de paludisme simple qui a été réalisé à Kollé.

Pour les sites de Bandiagara et de Faladié, les analyses ont été effectuées sur des confettis provenant d'autres études.

III. C- Période d'étude :

Pour le site de Kollé, nous avons travaillé sur des échantillons de sang collectés sur confettis durant la saison de transmission d'Octobre à Décembre 2002.

Pour les sites de Bandiagara et de Faladié, les confettis ont été collectés pendant les saisons de transmission de 1999 à 2003.

III. D- Population d'étude :

Cette étude a concerné tous les sujets ayant présenté un paludisme simple, âgés de plus de 6 mois, ayant consulté pendant la période de l'étude et résidant à Kollé.

III. E- Echantillonnage :

Un échantillonnage exhaustif a été effectué sur l'ensemble de la population consultant pour un accès palustre simple au fur et à mesure que les malades se présentaient au dispensaire durant les périodes de l'étude

III.E.1- Critères d'inclusion des patients

Les critères d'inclusion sont basés sur la définition stricte des cas à savoir:

- Etre résident de la localité de Kollé depuis au moins 6 mois.
- Avoir un âge ≥ 6 mois.
- Avoir des signes cliniques évocateurs d'un accès palustre simple (température axillaire non corrigée comprise entre 37,5 °C et 39,0°C ...)
- Avoir une goutte épaisse positive monospécifique à *P. falciparum* avec une densité parasitaire minimale de 2 000 formes asexuées (trophozoïtes) par millimètre cube de sang.

- Ne pas avoir de signes cliniques de paludisme grave ou compliqué (incapacité de boire, vomissements, obnubilation, notion de convulsion récente, anémie sévère, détresse respiratoire ...)
- Avoir le consentement éclairé du sujet ou des parents à participer entièrement à l'étude.
- Ne pas avoir une grossesse cliniquement patente.

III.E.2- Critères de non - inclusion

N'ont pas été inclus dans cette étude, tous les sujets qui n'ont pas répondu à ces critères d'inclusion ci-dessus mentionnés.

III. F- Méthode de collectes des données

Les données ont été collectées dans les locaux du dispensaire de Kollé par l'équipe de recherche du DEAP (constituée de médecins, pharmaciens, biologistes et infirmiers).

Trois grands types de données ont été collectés : renseignements généraux, données cliniques et biologiques.

III.F.1- Renseignements généraux

Les renseignements généraux recueillis au poste d'accueil par la technique d'interview directe ont porté essentiellement sur les variables d'identification et les motifs de consultation. Ces données ont ensuite été consignées dans un registre d'information par l'infirmier de l'équipe.

III.F.2- Données cliniques

Elles ont été recueillies au poste clinique par interview directe ou indirecte et par l'examen physique complet des sujets par le médecin biologiste de l'équipe de recherche. Ces données sont ensuite consignées dans le dossier individuel du malade (annexe 1).

III.F.3- Données biologiques

Elles ont été collectées au poste de biologie à partir de prélèvements directs de sang capillaire effectués le premier jour de consultation (J0) avant administration des antipaludiques conformément aux recommandations du PNLP en vigueur. Ces prélèvements ont servi à la confection de goutte épaisse, de frottis mince, de confettis sur papier buvard et à la mesure du taux d'hémoglobine. Les variables biologiques mesurées ont été détaillées dans la rubrique "techniques de laboratoire".

III.F.4- Techniques de laboratoire

III.F.4.1- Examens parasitologiques

La recherche de *Plasmodium falciparum* a été effectuée sur les gouttes épaisses et frottis minces selon les modes opératoires normalisés pour la confection d'une goutte épaisse et d'un frottis mince [Manuel **OMS**, 1982]. La goutte épaisse a servi à la détermination de la densité parasitaire (**DP**), et le frottis mince à celle de l'espèce plasmodiale.

- Matériel et réactifs :

Matériels : Lames porte-objet propres et dégraissées, boîte de collection **OMS**, vaccinostyles stériles à usage unique, minuterie, éprouvette graduée de 100 ml, gants, cuves de coloration, râtelier à lames, poubelle conteneur, séchoir électrique, coton hydrophile sec.

Réactifs : alcool à 70°, méthanol absolu, solution de Giemsa pur, eau tamponnée.

III.F.4.1.a- Goutte épaisse :

- Principe :

Il consiste à déposer une goutte de sang prélevée au niveau du troisième doigt de la main gauche au milieu d'une lame porte – objet dégraissée (figure 10) où elle est étalée, séchée et colorée à l'aide d'un colorant spécifique (Giemsa) dilué à 10%. Après coloration et rinçage, il ne reste sur la lame que les parasites et les leucocytes qui peuvent être identifiés au microscope.

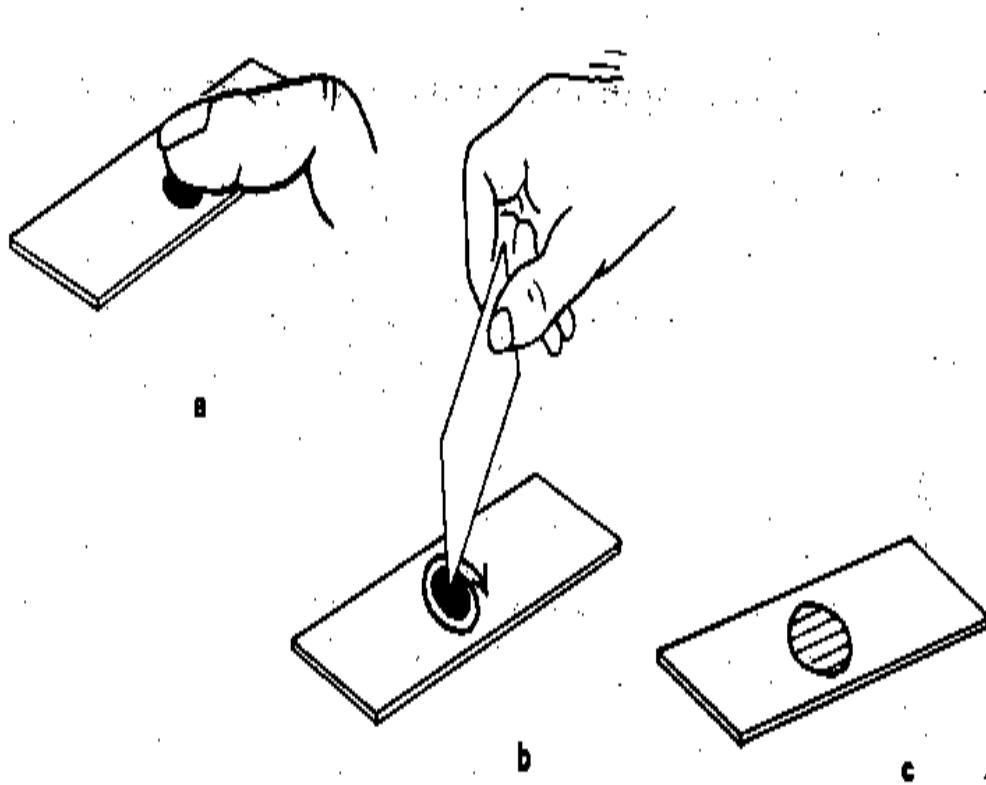


Figure 10
Technique de confection d'une goutte épaisse.

III.F.4.1.b- frottis mince :

-Principe :

Il consiste à prélever du troisième doigt de la main gauche une petite goutte de sang et à l'étaler de façon uniforme sur une lame porte – objet propre et dégraissée, pour qu'il n'y ait qu'une seule épaisseur de globules après étalement à l'aide d'une seconde lame (figure11).

L'identification des espèces plasmodiales se fait après fixation et coloration au Giemsa.

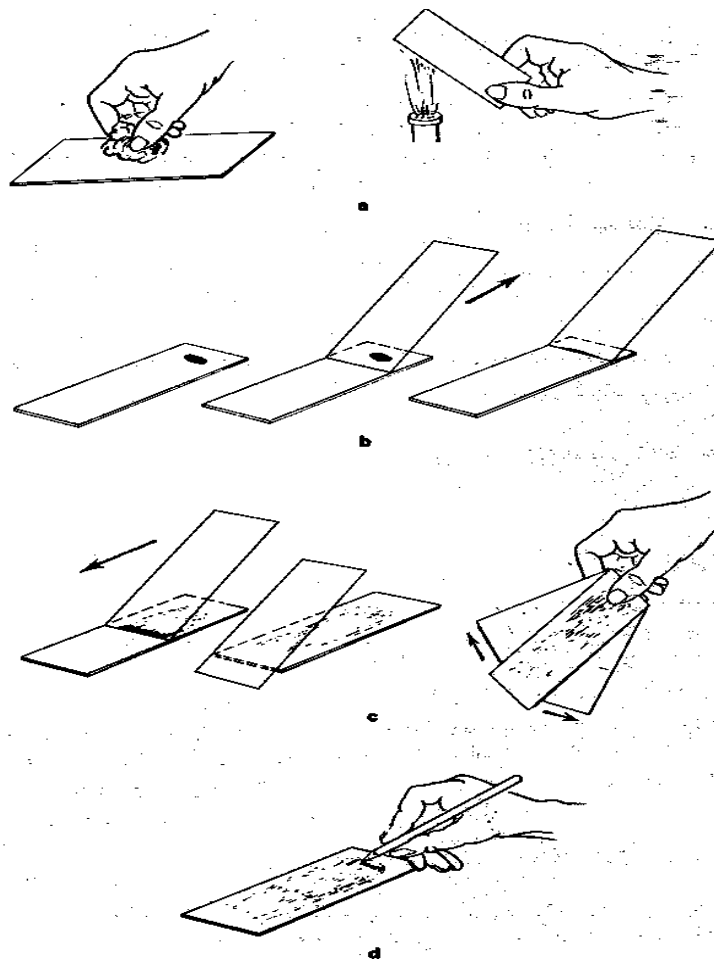


Figure 11
Technique de confection d'un frottis mince

- Examen microscopique :

Pour la goutte épaisse, la parasitémie, exprimé en parasites (trophozoïtes et gamétocytes) par mm³ de sang est obtenue par la formule suivante : $P = (X / Y) \times 7500$ où X est le nombre de parasites comptés au microscope, Y le nombre de leucocytes comptés (300 leucocytes) et 7500 la moyenne leucocytaire par mm³ de sang chez l'homme.

Les différentes espèces de *Plasmodium* ainsi que les stades parasitaires sont identifiés à travers la forme et l'aspect des globules rouges parasités (couleur et pigmentations) restés entiers sur le frottis.

III.F.4.3- Etudes de biologie moléculaire :

Les analyses moléculaires consistent :

- D'une part en la recherche de mutations ponctuelles chez *P. falciparum* au niveau du gène de la résistance à la chloroquine *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*Pfcr*). Le marqueur moléculaire utilisé était le codon 76 du gène *Pfcr*.
- D'autre part en la recherche de polymorphisme au sein du gène *Pfhe* (*Plasmodium falciparum* sodium-hydrogen exchanger) impliqué dans la baisse de sensibilité à la quinine. Le marqueur utilisé est une séquence répétée correspondant à une des formes du microsatellite (*ms4760*) au sein de ce gène, la forme *ms4760-1*.

Le matériel biologique qui sert à ces études moléculaires est l'ADN génomique plasmodial extrait à partir des confettis réalisés sur le terrain.

■ Mode opératoire normalisé pour la confection de confettis

- Principe :

Le principe consiste à imbiber du papier buvard (3MM, Wattman, Hillsboro, OR) avec le prélèvement sanguin du patient.

- Echantillon et lieux de prélèvement :

- Il s'agit de sang capillaire prélevé par ponction au niveau de :
 - La pulpe d'un doigt de la main gauche.
 - Le lobe de l'oreille, après l'avoir réchauffé entre les doigts.

-Le talon ou le gros orteil chez le nourrisson, après l'avoir réchauffé.

- Matériel et réactifs :

Pour la confection des confettis, nous avons utilisé le matériel suivant : papier buvard (3MM Wattman, Hillsboro, OR), gants, vaccinostyles stériles, coton hydrophile sec, ciseaux, poubelle pour vaccinostyles utilisés, registres, enveloppes standards, agrafeuse, scotch et l'alcool à 70%.

- Mode opératoire :

- Découper du papier buvard Wattman d'environ 4 cm de long sur 2 cm de large à l'aide d'une paire de ciseaux (figure 12).
- Diviser un des bouts du papier buvard en quatre dents (1/2 cm de largeur sur 1 cm de hauteur).
- Incrire le numéro d'identification du patient et la date sur l'autre bout du papier buvard.
- Désinfecter la face latérale du doigt à prélever à l'aide d'un coton hydrophile imbibé d'alcool à 70%.
- Prendre le dit doigt et le piquer d'un seul coup à l'aide d'un vaccinostyle stérile à usage unique.
- Essuyer la première goutte de sang à l'aide d'un morceau de coton sec, ensuite imbiber les 4 dents du papier buvard de sang tout en massant le doigt piqué.
- Après le prélèvement, appliquer du coton sec sur la partie piquée du doigt pour faire l'hémostase.
- Faire sécher le confetti à l'abri des mouches et de la poussière en le fixant sur une bande de scotch.

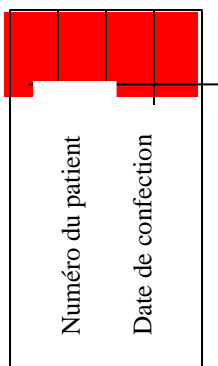


Figure 12. Papier wattman utilisé pour la confection du confetti

- Contrôle de qualité :

S'assurer que le confetti est bien imbibé de sang et correspond bien au sujet prélevé (conformité par le numéro d'identification).

- Gestion des confettis :

Après séchage, mettre chaque confetti dans une enveloppe portant également le numéro d'identification du sujet et les garder soigneusement dans une cantine sous clefs à l'abri de la poussière, des insectes et des rongeurs. Consigner chaque jour dans un registre les numéros des confettis confectionnés.

III.F.5- Travail au laboratoire :

Ce travail consiste en l'analyse moléculaire.

III.F.5.1- Analyse moléculaire :

Elle est faite à l'aide de la PCR à partir de l'ADN extrait des papiers confettis.

III.F.5.1.1- Modes opératoires normalisés pour l'extraction de l'ADN par la méthode au méthanol

- Principe :

Il consiste à extraire au méthanol l'ADN contenu dans l'échantillon sanguin du patient à partir des confettis préalablement confectionnés.

- *Echantillon :*

L'échantillon est constitué de confettis réalisés chez des patients souffrant de paludisme simple à *P. falciparum*.

- *Matériel et réactifs :*

Le matériel utilisé pour l'extraction de l'ADN est le suivant : confettis, gants stériles, paires de ciseaux, pipettes de 200 et 1000 µl, embouts de 200 et 1000 µl, tubes eppendorf de 500 µl, tubes eppendorf de 1,5 ml, plaque chauffante, minuterie, agitateur électrique (vortex), papiers hygiéniques, Becher.

Réactifs: méthanol, eau stérile ou dé-ionisée et eau potable.

- Mode opératoire :

- Numéroter avec un marqueur indélébile les tubes de 500 µl conformément aux numéros des confettis à traiter.
- Découper 3 à 5 morceaux de 3 mm² de confettis dans le tube eppendorf lui correspondant tout en rinçant les ciseaux dans de l'eau potable et en l'essuyant avec du papier hygiénique après chaque confetti.
- Ajouter 75 - 100 µl de méthanol dans chaque tube contenant les morceaux de confettis de manière à les immerger entièrement.
- Recouvrir les tubes ouverts à l'aide de papier hygiénique et les laisser incuber pendant 15mn à la température ambiante du laboratoire.

- Après 15 minutes d'incubation, verser sur papier hygiénique le méthanol contenu dans les tubes sans faire tomber les morceaux de confettis et les sécher complètement sous vide 1 à 2 heures ou à l'air libre pendant une nuit.
- Après séchage, ajouter dans chaque tube 150µl d'eau stérile ou dé-ionisée et les fermer.
- Chauffer les tubes sur un bloc chauffant pendant 15mn entre 95-100°C. Agiter les tubes toutes les 5 minutes pendant l'incubation.
- Enfin, stocker les l'ADNs ainsi extraits dans un congélateur à -20°C.

- Contrôle de qualité :

Respecter rigoureusement le protocole d'extraction et tester 150µl de l'eau utilisée pour l'extraction comme un témoin négatif au cours de la **PCR** d'essai.

III.F.5.1.2- Mise en évidence des mutations du codon 76 du gène *Pfcr* et du polymorphisme *ms4760* du gène *Pfhr*:

La recherche du point de mutation **76** du gène *Pfcr* responsable de la résistance de *P.falciparum* à la chloroquine et du polymorphisme au sein du gène *Pfhr* impliqué dans la sensibilité du parasite à la quinine est faite par la technique de l'amplification de l'ADN ou **PCR**[®] (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de polymérisation en chaîne).

■ Mode opératoire normalisé:

- Matériel :

- La mise en évidence de ces variations nécessite un certain nombre de matériel : ADN plasmodial, gants stériles, tubes (0,5 ml, 1,5ml, 15ml, 50 ml), pipettes (2µl, 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl), embouts stériles (2 µl, 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl), bac de migration, moule et peigne à gel, scotch à papier, para-film, registres de

paillasse, balance pèse produit, Erlenmeyer, appareil photo UV (FOTODYNE[®]), plaque à UV, film polaroid 667, centrifugeuse électrique, thermocycleur, éprouvette graduée de 100 ml, Spectrophotomètre, hotte (LABCONGO[®]), réfrigérateur-congélateur, incubateur, poubelles, conteneur pour gel.

- Réactifs :

Les réactifs qui entrent dans les réactions sont : eau stérile GIBCOBRL[®], eau déionisée, PCR 10x Buffer, 50 mM MgCl₂, DésoxyNucléotideTri-Phosphate (dNTP's), amorces, taq polymerase, RNase AWAY, agarose ultra pure GIBCOBRL[®], bromure d'éthidium (BET), tris borate d'EDTA (TBE), colorant pour la migration (xylène cyanol, bleu de bromophénol), marqueur de poids moléculaire, bovine sérum albumine (BSA), Tampon de digestion, enzyme de digestion (Apo1).

- Principe de la mise en évidence de la mutation de *Pfcr1* au niveau du codon 76 par la technique de la restriction enzymatique (ASRA) [Djimé et al.][49]:

C'est la réalisation de deux amplifications successives, la seconde utilisant le produit de la première comme matrice (double PCR ou nested PCR). Des amorces spécifiques à chaque amplification sont utilisés et une digestion du produit de l'amplification permet de détecter la mutation au niveau du codon 76 avec une digestion par l'enzyme de restriction **APO1** uniquement des échantillons sauvages donc sensibles.

- Principe de la mise en évidence de la forme polymorphique *ms4760-1* du gène *Pfnhe* impliqué dans la baisse de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la quinine par la technique de la double PCR.

C'est la réalisation de deux amplifications successives, la seconde utilisant le produit de la première comme matrice (double PCR ou nested PCR). Des amorces spécifiques à chaque amplification sont utilisées et l'analyse de la taille du produit permet de différencier les polymorphismes au niveau du microsatellite *ms4760*.

Amorces « nhe » spécifiques au gène *Pfnhe*

Première amplification :

Amorce sens **F1** : GACAATTTTCGGTAGATGCCCTAT

Amorce anti-sens **R1** : GGTCTTGCAGTGCATGGA

Témoin positif ayant la forme *ms4760-1* de *Pfnhe* **V1S**

Témoin positif ayant la forme sauvage **3D7**

Deuxième amplification

Amorce sens **F2** : AGTGGTAGTAATAATGATA

Amorce anti-sens **R2** : CTTTATTATAATGACTAC

Les témoins utilisés sont les mêmes que dans la première amplification.

La taille du produit de la deuxième amplification pour **3D7** est de 187 paires de bases, et celle de **DD2** est de 203 paires de bases.

- Méthode :

❖ *Préparation du milieu réactionnel*

Les réactions d'amplification ont été faites dans un volume final de 25 µl.

Les concentrations finales des différentes composantes et leurs volumes sont indiqués dans le tableau 1.

Tableau 1: Milieu réactionnel pour les premières et deuxièmes amplifications avec un volume final de 25 µl par réaction.

Composante de la PCR	Première amplification		Deuxième amplification	
	concentration finale	Volume par réaction en µl	concentration finale	Volume par réaction en µl
H ₂ O		12,125		17,025
5X PCR Buffer	1,5 mM MgCl ₂	5	2,5 mM MgCl ₂	5
10X dNTP's	200 µM	2,5	200 µM	2,5
100X Amorces (F1+R1)	1µM	0,25	1µM	0,25
Taq polymérase (de 500 U)	0,625U	0,125	0,625U	0,125
ADN extrait		5		0,1
Total		25		25

❖ *Amplification*

- Identifier les tubes pour la PCR.
- Préparer le milieu réactionnel en fonction du nombre d'échantillons à traiter.
- Répartir dans chaque tube 20µl du milieu réactionnel pour la première amplification et 24,9 µl pour la deuxième amplification.
- Ajouter dans chaque tube 5 µl d'ADN extrait des papiers confettis pour la première amplification et 0,1 µl pour la deuxième amplification.
- Les placer dans le thermocycleur pour l'amplification selon les programmes indiqués dans le tableau 2.

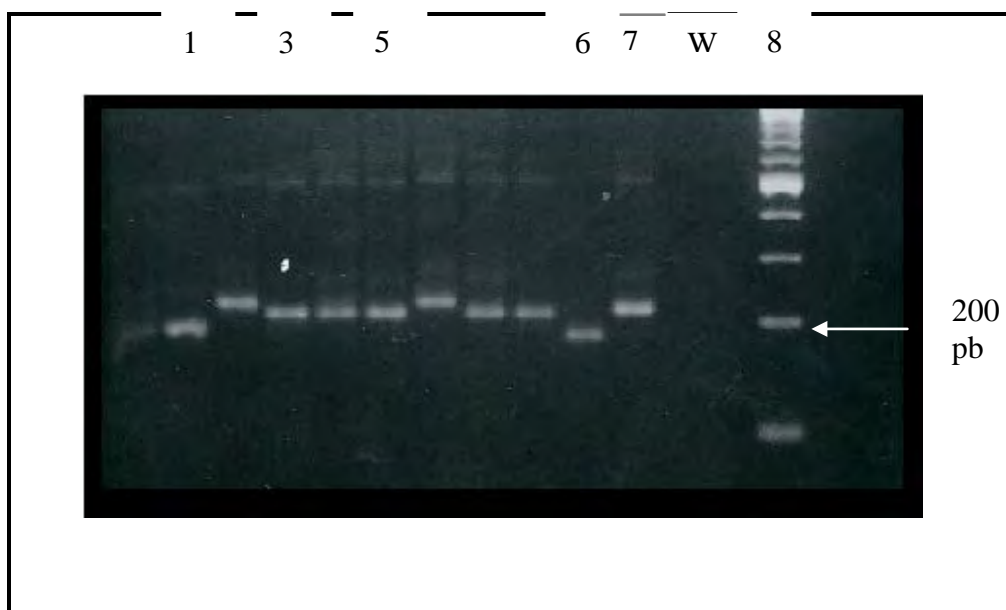


Tableau 2 : Programme de la première et de la deuxième amplification du microsatellite *ms4760*.

Première amplification			Deuxième amplification		
Etapes	T°C	Temps	Etapes	T°C	Temps
Dénaturation initiale	95	3 mn	Dénaturation initiale	95	3 mn
Dénaturation	95	30sec	Dénaturation	95	30sec
Hybridation	55	30sec	Hybridation	45	30sec
Extension	62	45mn	Extension	62	1mn
Nombre de cycles	44		Nombre de cycles	24	
Extension finale	62	3 mn	Extension finale	62	3 mn
Fin de programme	4	X	Fin de programme	4	X

- mn = minute, sec = seconde

A la fin de la réaction les produits sont gardés à +4 °C dans le réfrigérateur s'ils ne sont pas mis à migrer.

- Pour la migration les produits sont déposés sur un gel d'agarose à 2,5% et migrés pendant 4 heures à 80 Volt.
- La visualisation des bandes se fait sur une plaque à Ultra-violet.

Figure 13
Photographie de gel d'agarose de 2.5% pour la différenciation des formes polymorphiques de la séquence *ms4760*.

1, 2, 3 et 5 : sont des échantillons d'ADN de prélèvements de terrain.

6 et 7 : les deux témoins 3D7 et V1S migrent respectivement à 187 et 203 paires de bases.

8 : marqueur de poids moléculaire.

W : témoin négatif correspondant aux eaux d'extraction et du milieu de réaction.

Les échantillons présentant la même taille de migration que le témoin V1S sont considérés comme ayant la double répétition du motif DNNND donc comme étant des formes *ms4760-1* (Ex : l'échantillon 2).

Le contrôle qualité est assuré par l'analyse de l'eau utilisée pour les extractions et le milieu réactionnel pour s'assurer de l'absence de toutes contaminations en ADN.

Les résultats de la PCR sont validés par l'absence de contamination dans les témoins négatifs et la présence de bande pour les témoins positifs à la taille attendue.

III.F.6- Enquête sur le taux d'utilisation de la quinine :

Cette enquête a eu comme objectif de déterminer le niveau d'utilisation des sels de quinine dans chacune des trois localités ayant fait l'objet de l'étude.

III.F.6.1- Méthodologie : pour mener à bien cette enquête une fiche a été établie conformément aux objectifs que nous nous sommes fixés (annexe 2).

Cette enquête fut menée de juin à juillet 2005 après avoir été validée par un médecin. Pour chacune des trois localités les données ont été relevées à partir des registres de consultation, d'hospitalisation et de garde pour faire ressortir tous les cas de paludisme enregistrés pendant deux, trois ou quatre saisons de transmission selon les données disponibles tout en faisant ressortir les cas de paludisme traités avec les sels de quinine.

Ainsi un taux d'utilisation de la quinine a pu être établi pour chacune des localités et en fonction des années.

III. G- Considérations éthiques :

- Le protocole de l'étude a fait l'objet d'une soumission et d'une approbation du comité d'éthique de la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odontostomatologie de l'université de Bamako.
- Les inclusions se sont effectuées sur consentement éclairé des sujets après explication des objectifs de l'étude.
- Exclusion et traitement adéquat si paludisme grave.
- Arrêt et changement de traitement si réaction rapportées.
- Prise en charge gratuite pour les autres pathologies.
- Assistance gratuite en cas d'urgence médicale.
- Respect de la confidentialité des résultats du malade.
- Respect de la liberté du participant de continuer ou d'arrêter la poursuite du suivi.

III. E- Analyse des données :

Les données ont été saisies sur le logiciel Excel et analysées avec SPSS 11.0 et EPI-INFO version 6fr et Stata.

Les comparaisons de proportion ont été réalisées en utilisant EPI-INFO version 6fr.

La recherche d'association a été réalisée à l'aide du logiciel Stata.

Pour toutes les comparaisons le seuil de signification a été fixé à 0.05.

RESULATS :

IV. A- Analyse moléculaire :

Les analyses de la prévalence du gène *Pfcr* **K76T** et de la variation *Pf**h**e* *ms4760* ont été effectuées sur chacun des **358** échantillons provenant des trois sites de l'étude: 86 de l'année 2002 pour le village de Kollé, 111 des deux années 2000 et 2003 pour Faladié et 161 pour les trois années de 1999, 2002 et 2003 pour la ville de Bandiagara (Tableau 3).

Des taux de réussite de la technique PCR de 94,1% pour l'amplification de *ms4760* et de 84,1% pour l'amplification de *Pfcr* ont été obtenus.

Tableau 3 : Répartition des échantillons selon les sites et les années d'étude.

	Kollé	Bandiagara			Faladié	
Années	2002	1999	2002	2003	2000	2003
Nombre d'échantillons analysés	86	36	68	57	48	63
échantillons positifs pour <i>ms4760</i>	84	33	67	56	36	61
échantillons positifs pour <i>Pfcr</i>	79	16	68	57	43	38

Les prévalences cumulées des deux gènes *Pfcr* et *Pfhr* ainsi que les taux d'utilisation de la quinine et de résistances *in vivo* à la chloroquine sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4: Récapitulatif des analyses moléculaires, résistance *in vivo* et enquête sur l'utilisation de la quinine.

	Kollé	Bandiagara	Faladié	P
<i>ms4760-1</i> %(n)	18,29(84)	24,84(156)	41,24(97)	◀ 0,001
<i>Pfcr</i> T76 %(n)	87,34(79)	49,65(141)	78,75(81)	◀ 0,001
Résistance <i>in vivo</i> à la CQ (%)	31,1	10	37,2	
Taux d'utilisation Des sels de quinine %(n)	11,7(884)	40(2446)	91,1(1374)	◀ 0,005

n: effectifs cumulés

IV. A-1- Prévalence cumulée de *ms4760-1* et de *Pfcrtr* K76T dans les trois localités pour les différentes années d'étude:

La figure 14 montre que la prévalence de **K76T** a été statistiquement plus faible à Bandiagara que dans les deux autres sites ou la différence notée n'est pas significative.

Une prévalence variable de *ms4760-1* entre les trois localités a été observée. Le taux de *ms4760-1* a été significativement plus élevé à Faladié. La différence notée entre Kollé et Bandiagara n'est pas significative

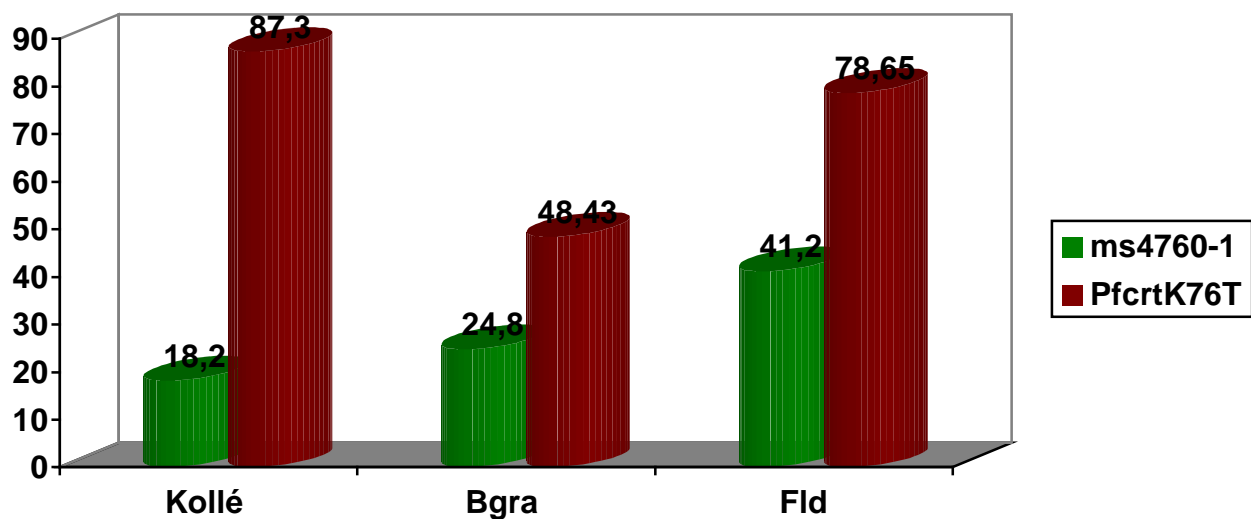


FIGURE 14
Prévalence de *ms4760-1* et de *Pfcrtr* K76T dans les trois localités.

IV. A-2- Taux de résistance *in vivo* à la chloroquine et prévalence de *ms4760-1*

Cette figure montre également l'absence d'association entre la prévalence de *ms4760-1* et le taux de résistance *in vivo* à la chloroquine.

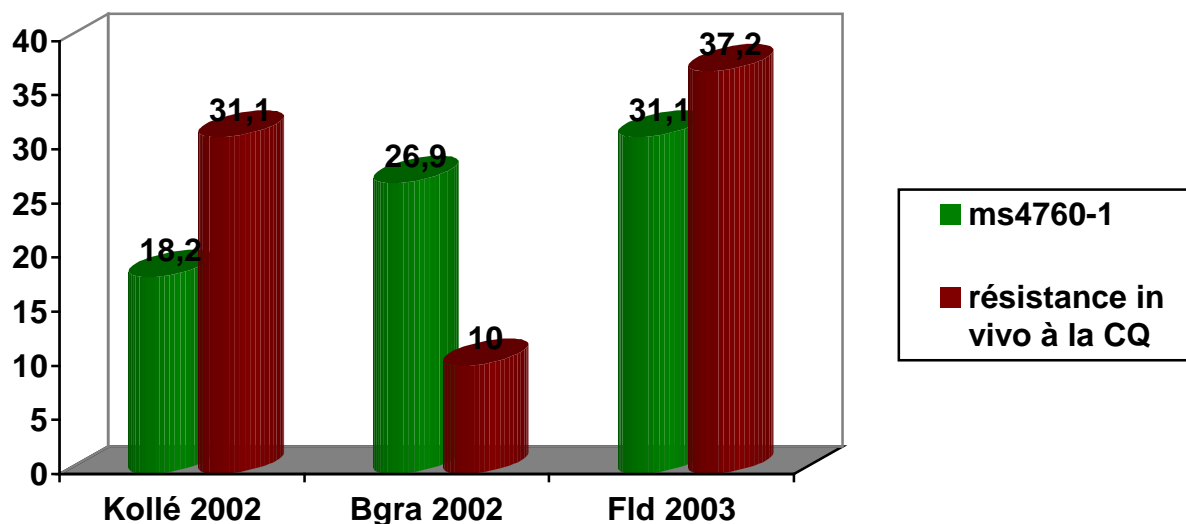


Figure 15

Taux de résistance *in vivo* à la chloroquine et prévalence de *ms4760-1*

IV.B- Enquête sur l'utilisation de la quinine dans les trois localités

Pour l'année 2003, le taux d'utilisation des sels de quinine a été significativement plus élevé ($P < 0,001$) à Faladié que dans les deux autres sites (Tableau 5).

Tableau 5 : Nombre d'accès palustre enregistrés et proportion traitée avec la quinine en 2003

	Kollé	Bandiagara	Faladié
Nombre d'accès palustres enregistrés	884	2446	1374
Nombre traités avec les sels de quinine	104	979	1252
Taux d'utilisation des sels de quinine(%)	11,7	40	91,1

IV.C- analyse comparative des prévalences de *ms4760-1* et de l'utilisation des sels de Quinine :

Le taux d'utilisation de la quinine ($P < 0.005$) tout comme le taux de *ms4760-1* ($P < 0.001$) ont été significativement plus élevés à Faladié que les autres localités où ils n'ont pas été significativement différents (Figure 16). Cette figure montre que le taux de prévalence de *ms4760-1* augmente avec celle de l'utilisation des sels de quinine dans les trois localités.

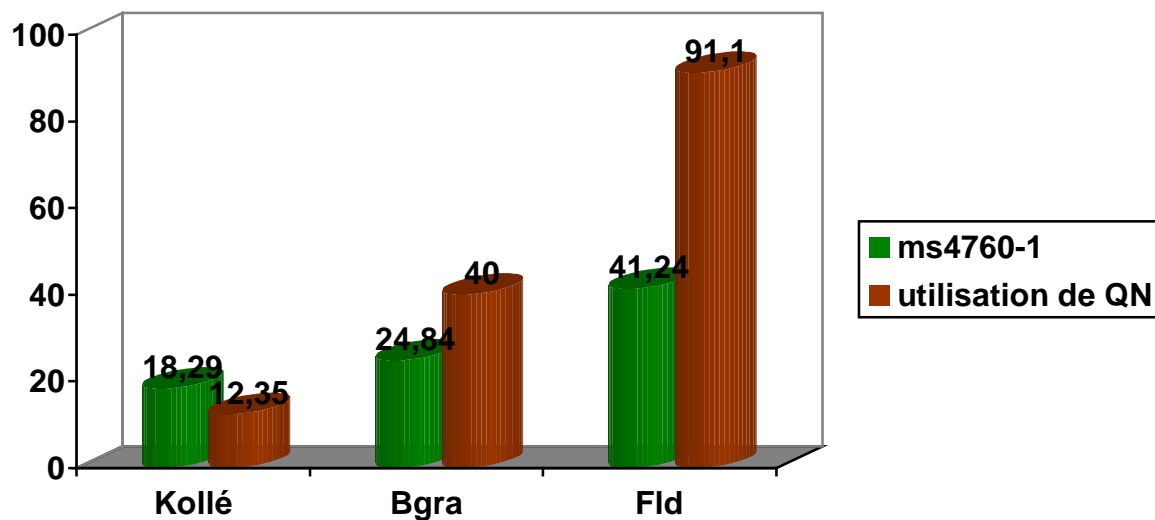


Figure 16

Prévalence de *ms4760-1* dans les trois localités et utilisation des sels de quinine pour l'année 2003.

- Prévalences de *ms4760-1* et utilisation des sels de quinine à Bandiagara pour les trois années d'étude.

A Bandiagara, le taux d'utilisation de la quinine tout comme la prévalence de *ms4760-1* ne montrent pas de différence statistiquement significative ($P>0.05$) entre les trois années d'étude (figure 17). Cependant ils semblent évoluer dans le même sens. La relation entre le taux d'utilisation de la quinine et le taux de prévalence de *ms4760-1* a déjà été constaté dans la figure 16.

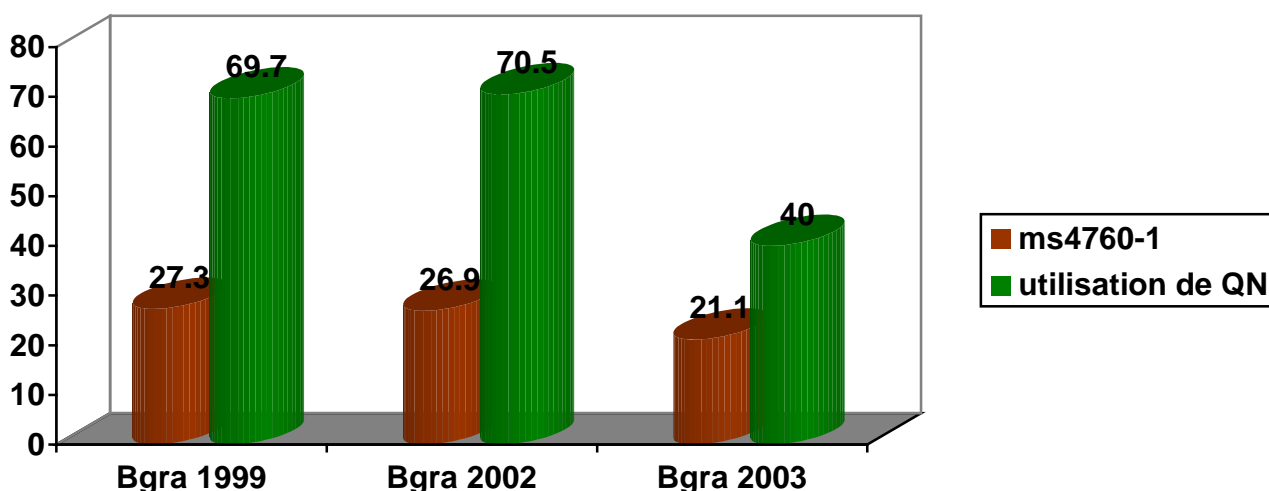


Figure 17
prévalence de *ms4760-1* et utilisation des sels de quinine à Bandiagara pour les trois années d'étude.

V- DISCUSSION:

V.1- Méthodologie :

L'étude a été effectuée dans les trois localités de Bandiagara, Kollé et Faladié. Le choix de ces sites était justifié par leurs différences en terme d'endémicité, de pratique médicale, de niveau de chloroquinorésistance mais aussi par l'existence de données fiables sur les résistances *in vivo* à la chloroquine des souches de *plasmodium falciparum*, l'adhésion des populations à des études antérieures et l'existence de centre de santé permettant une bonne collecte des données.

Une étude prospective a été menée chez des sujets âgés de plus de 6 mois à Kollé pour évaluer la chloroquinorésistance et la prévalence de ***ms4760-1***. L'analyse moléculaire a été effectuée sur les prélèvements de J0. Les échantillons de suivis n'ayant pas d'intérêt pour une détermination moléculaire de la prévalence d'un marqueur car ils sont constitués de parasites qui pourraient être sélectionnés par un médicament.

Les recherches de la mutation de ***Pfcr*** **K76T** et du polymorphisme de la séquence ***ms4760*** ont été effectuées par la technique de la double ou nested **PCR** qui permet d'obtenir une quantité d'**ADN** suffisante pour une visualisation sur gel d'agarose après digestion par une enzyme de restriction pour le gène ***Pfcr***. Pour la séquence ***ms4760***, cette double PCR permet de différencier les formes polymorphiques dont les tailles sont différentes. L'analyse moléculaire a été réalisée sur de l'**ADN** extrait d'échantillon collectés sur des papier confettis. L'extraction a été effectuée par une méthode utilisant du méthanol qui présente des risques d'accident de laboratoire moindre pour le manipulateur. Cette méthode est également moins coûteuse par rapport à celle du Quiagen® et du chelex.

L'enquête sur l'utilisation des sels de quinine dans les trois localités a été réalisée à l'aide de fiches d'enquête établies selon les besoins de l'étude et à partir des données disponibles répertoriées. Seules les années pour lesquelles les données étaient les plus

complètes ont été incluses dans l'analyse finale. Le taux d'utilisation de quinine a été déterminé par la proportion d'accès palustre traitée avec les sels de quinine par rapport à l'ensemble des cas de paludisme enregistrés pour une même année.

V.2- Résultats

Les résultats de l'analyse du gène *Pfcr* pour les 358 échantillons a montré que la prévalence de la mutation *K76T* a été significativement plus faible à Badiagara. Pour le site de Kollé, la prévalence de la mutation *K76T* a été comparable à celle obtenue en 2002 dans une autre étude antérieure [63]. Pour *ms4760*, L'analyse des mêmes échantillons a révélé l'existence non négligeable de la forme *ms4760-1* du gène *Pfhe* dans les trois localités de l'étude. Ceci pourrait témoigner de l'existence au Mali de souches de *Plasmodium falciparum* à sensibilité réduite à la quinine. La prévalence de la forme *ms4760-1* a été variable selon le site d'étude, avec un taux plus élevé à Faladié qu'à Badiagara et Kollé.

La recherche d'association entre le polymorphisme de *ms4760* et la mutation *K76T* du gène *Pfcr* sur l'ensemble des échantillons a révélé une absence d'association entre les deux génotypes. En effet, la localité de Kollé qui a présenté la plus forte prévalence de mutation *PfcrK76T* avait la plus basse prévalence de *ms4760-1*. Cette observation est différente de celle de Ferdig et al. (2004) qui avaient rapporté que la diminution de la sensibilité à la quinine n'était observée que chez les souches chloroquinorésistantes. Cependant, leurs observations avaient été rapportées sur des souches de laboratoire, contrairement à notre étude où le travail a porté sur des souches de terrain avec un échantillon plus large.

Par ailleurs, nous avons observé que la présence de la mutation *K76T* n'est pas un facteur d'induction de celle de *ms4760-1*. En effet, dans notre étude, les souches chloroquinosensibles autant que chloroquinorésistantes présentaient la forme *ms4760-1*.

Nos données précédentes sur la résistance *in vivo* de *P. falciparum* à la chloroquine et les différentes prévalences de ***ms4760-1*** dans les trois localités sont en accord avec celles obtenues dans la présente étude.

Les résultats de l'enquête sur l'utilisation de la quinine dans les trois localités ont fait ressortir une très forte utilisation de la quinine à Faladié. L'association entre et le taux d'utilisation des sels de quinine et la prévalence de ***ms4760-1*** dans les 3 localités a fait ressortir que les deux phénomènes évoluent dans le même sens. Autrement dit, la prévalence de ***ms4760-1*** a été plus élevée dans les sites où les taux d'utilisation de la quinine sont plus élevés.

Ceci a été confirmé dans la localité de Bandiagara. En effet, des taux différents d'utilisation des sels de quinine obtenus sur 3 années dans cette localité ont corroboré la relation entre l'évolution de la prévalence de ***ms4760-1*** et les taux différentiels d'utilisation des sels de quinine. Ceci pourrait être expliqué par le phénomène de sélection de souches sous traitement intensif à la quinine.

Conclusion :

Les résultats préliminaires montrent une prévalence non négligeable de la forme ***ms4760-1*** du gène ***Pfnhe*** dans les populations parasites de terrain de *Plasmodium falciparum* dans les localités étudiées (Faladié, Bandiagara et Kollé).

Après une analyse comparative entre la présence de la mutation **K76T** du gène ***Pfcr*** et la prévalence de ***ms4760-1***, il n'a pas été trouvé une implication de la chloroquinorésistance (ni moléculaire ni *in vivo*) dans l'apparition des souches portant la forme ***ms4760-1*** du gène ***Pfnhe***.

Par ailleurs, l'analyse des données de l'enquête sur la consommation de la quinine a montré que la prévalence de ***ms4760-1*** croît avec l'utilisation des sels de quinine dans les trois localités.

On pourrait dire que au Mali, la prévalence de la forme ***ms4760-1*** du gène ***Pfnhe*** chez les souches de *Plasmodium falciparum* serait associée à l'utilisation des sels de quinine.

Ceci va dans le même sens que les phénomènes d'apparition et de propagation des résistances sous les pressions médicamenteuses de la plupart des médicaments antipaludiques.

En perspective une meilleure connaissance du génotype des souches présentant la forme ***ms4760-1*** et leur comportement *in vitro* vis à vis de la quinine aideraient à mieux caractériser le phénomène de la baisse de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* au traitement par les sels de quinine au Mali.

Références bibliographiques

1. **OMS – Genève.** Rapport sur la santé dans le monde. La vie au 21^{ème} siècle. Une perspective pour tous. OMS, 1998: 58, 90, 103-104
2. **Snow R. W., Guerra C. A.** The global distribution of clinical episode of *Plasmodium falciparum* malaria, *Nature*, 2005 (10 mars), 434(7030): 214-7.
3. **Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson J.** in. Section 16: Protozooses et helminthiases; généralités. Biologie moléculaire et immunologie des infections parasitaires. In *Harrison, Médecine interne*, 13^{ème} édition, 1995 : 865-882.
4. **Khare AK.** Politique pharmaceutique pour le traitement du paludisme. Paludisme et maladies infectieuses en Afrique, 1999, 9 : 17-21.
5. **Danis M, Mouchet J.** Paludisme In UREF, éditions *Ellipses /AUPELF*, 1991 : 13-21 ; 131-230.
6. **Diani F :** Evaluation de la situation sanitaire au Mali. Thèse de doctorat pharmacie, Bamako, 1995.
7. **Costello R.** Paludisme, une solution pour l'an 2000 ? Concours médical 1992, 114 : 1945-1947.
8. **Publications médicales anciennes,** Quinine et paludisme aujourd'hui, premier symposium Africain, Numéro spécial 91 bis-Aout 1988 : 4-57.
9. **Peter W.** Resistance of human Malaria I, III and IV. Chemotherapy and drug resistance in Malaria. Second edition. London: Academic press, 1987. 543-568. 593-658. 659-786.
10. **Giboda M., Denis M.B.** Response of Kampuchean strains of *Plasmodium falciparum* to antimalarials: in vivo assessment of quinine and quinine plus tetracycline: multiple drug resistance in vivo. 1988. *J trop Med Hyg* 91: 205-211
11. **Pukrittayakamee, S., Supanaranond, W., Looareesuwan, S.** Quinine in severe Malaria: evidence of declining efficacy in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994. **88**: 324-327.
12. **Magalie D., Bernard C.** *Plasmodium falciparum* in vivo resistance to Quinine: Description of two RIII responses in French Guiana. *Trop Med Hyg.*, 70(2). 2004. 125-127.

13. Noedl. H., Faiz. M.A., Yunus. E.B., Rahman. M.R., Hossain. M.A., Samad. R., Miller. R.S., Pang. L.W., Wongsrichanalai. C. Drug-resistant malaria in Bangladesh: an in vitro assessment. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68(2):140-2.
14. Lim P., Chim P., Sem R., Nemh S., Poravuth Y. In vitro monitoring of *Plasmodium falciparum* susceptibility to artesunate, mefloquine, quinine and chloroquine in Cambodia: 2001-2002. *Acta Trop.* 2005 Jan; 93(1):31-40.
15. François. P., Marie. E.P., Philippe. P., Julie. M., Delphine. M., Philippe. B., Pierre. D. High prevalence of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in the french territory of Mayotte. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70(6), 2004 : 635-637.
16. Palmieri F., Petrosillo N., Paglia MG. Genetic confirmation of quinine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria followed by postmalaria neurological syndrome in a traveler from Mozambique. *J Clin Microbiol.* 2004 Nov; 42(11): 5424-6.
17. Ramharther M., Wernsdorfer W. H., Kremsner P. G. In vitro activity of quinolines against *Plasmodium falciparum* in Gabon. *Acta Trop.* 2004 Mar; 90(1): 55-60.
18. Ishag A., Isam S., Moustafa I. E. Quinine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in eastern Soudan. *Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2005; 99, 736-38.
19. Mu J, Ferdig MT, Feng X, Joy DA, Duan J. Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol.* 2003 Aug; 49(4): 977-89.
20. Ferdig M., Cooper RA., Mu J. Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol Microbiol.* 2004 May; 52(4):985-97.
21. Camara F. Evaluation de la chimiosensibilité des souches maliennes de *Plasmodium falciparum* aux amino-4-quinoléines de 1985 à 1991. Thèse de médecine Bamako, ENMP 1991 Num 41.
22. Coulybaly Y. Epidémiologie du paludisme en milieu péri-urbain de Bamako et essai d'une stratégie de lutte basée sur l'utilisation des supports imprégnés de perméthrine et le traitement systématique des cas fébriles.
23. Traore O. Evaluation du niveau de la réponse clinique, parasitologique in vivo et des mutations du pfcr de *Plasmodium falciparum* à Kollé (Mali) Thèse de pharmacie, Bamako, Num 239.

24. **Tekete M.M.** Sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine dans deux villages de la savane malienne : Kollé et Bancoumana. Thèse de pharmacie, Bamako, 1999.
25. **Datry A., Nozais JP.** Chap. 7. Paludisme. Traité de parasitologie médicale. Editions pradel, 1996. 99-138.
26. <http://www.nomadrsi.org/20gp/html/bul07.html>
27. **Mazier D.** In. Paludisme. Chap Cycle et Biologie des Plasmodiums. UREF, éditions *Ellipses/Aupelf*, 1991 : 25-33.
28. http://encyclopedia.learn.in.th/content.php?encid=53&p_encid=84
29. ANN O'FEL 96-97; Parasitologie, Mycology. Page 29-34.
30. **Touze. J.E., Moustafghir. A.W., J.P., Fourcade. L., Mlinier. S., Mafart. B., Laroche. R.** Physiopathologie du neuropaludisme. Information médicale d'Asie-francophone 1994; 7-10.
31. **Gachot. B., Rinwald. P.** Paludisme pernicieux Rev Prat 1998; 48: 273-278.
32. **Thompson P.E., Werbel L.M.** Antimalarial agents: Chemistry and pharmacology. In: Medical chemistry, Vol. 12. New York: *Academic Press*, 1972.
33. **Coatney G.R.** Pitfalls in a discovery: The chronicle of chloroquine. *Am J Trop Med Hyg* 1963; 12: 121-8.
34. **Yayon A., Cabantchick Z.I., Ginsberg H.** *EMBO J* 1984.3, 2695-2700.
35. **Fitch C.D.** *Proc. Helminth.Soc.* 1972. Washington 39,265-270.
36. **David. J. Sullivan., Ilya. Y. Gluzman.** On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 96: 11865-11870.
37. **N.J.White, S. Looareesuwan, D.A. Warrell, M.J. Warrell, D. Bunnag, T. Harinasuta** (1982) Quinine pharmacokinetics and toxicity in cerebral and uncomplicated falciparum malaria. *Am J Med Hyg* 73: 564-572.
38. **RITCHIE TL & SAUL A** - Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature*, 2002, **415**, 694-701.
39. **BHARDWA JD, HORA B, SINGH N.** - Immunogenicity and protective efficacy of three DNA vaccines encoding preerythrocytic and erythrocytic stage antigens

- of *Plasmodium falciparum* in rhesus monkey. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2002, **34**, 33-43
40. **An OMS – Genève.** Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS. Séries rapports techniques, 1973 ; 259 : 30-39.
 41. **SPRATT. B.G.** Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, 1994; 264: 388-393.
 42. **Schlesinger. P.H.** Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: Mechanism of chloroquine resistance. *Science*, 1987, *J Cell Biol* 101 :2302-2309.
 43. **Sanchez. C.P., McLean. J.E., Stein. W., Lanzer. M.** Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry* 2004; 16365-16373.
 44. **Durand. R., Gabbett.E., Di Piazza J.P.** Analysis of kappa and omega repeats of the *cg2* gene and allele-specific PCR detection of *Pfmdr-1* Asn86Tyr polymorphism in Lambarene, Gabon. *Parasitology* 1998: 116: 211-217.
 45. **Foote. S. J., Kyle. D. E.** Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1990; 345: 255-258.
 46. **Duraisingh. M.T., Drakrley. C.J., Muller. O., Bayley. R., Snounou. G.** Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *Pfmdr 1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology*, 1997 ; 177 : 1429-1433.
 47. **Fidock. D.A., Nomura. T., Talley. A.K., Cooper. R.A., Dzekunov. S.M., Ferdig. M.T.** Mutation in the *P.falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *PfCRT* and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol cell* 2000; 6: 861-871.
 48. **Cooper. R. A., Ferdig. M.T., Su. X. Z., Ursos. L. M., Mu. J., Nomura. T., Fujioka. H., Fidock. D. A., Roepe. P. D., and Wellems. T. E.** Alternative mutation at position 76 of the vacuolar transmembrane protein *PfCRT* are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* 2002 ; 61 : 35-42
 49. **Djimde. A., Doumbo. O.K., Cortese. J.F., Kayantao. K., Doumbo. S., Diourte. Y., Dicko. A., Su. X.Z., Nomura. T., Fidock. D.A., Wellems. T.E., Plowe. C.V.** A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2001; 344: 257-267.

50. **Segurado. A. A., di Santi. S. M., and Schiroma. M.** *in vivo* and *vitro* *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine, amodiaquine and quinine in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 39: 85-90
51. **Simon. F., Le Bras. J., Charmot. G., Girard. P. M., Faucher. C., Pichon. F., Clair. B.** Severe chloroquine resistant *falciparum* malaria in Gabon with decreased sensitivity to quinine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1986 ; 80 : 996-997.
52. **Jelinek.T., Schelbert. P., Loscher. T., and Eichenlaub. D.** Quinine resistant *falciparum* malaria acquired in east Africa. *Trop Med Parasitol* 46: 38-40.
53. **Lander. E.S., Botstein. D.** Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage map. *Genetics* 1989; 212: 185-199.
54. **Jiang. C., Zeng. Z.B.** Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 1995: 140: 1111-1127.
55. **Payne. D.** Aspects pratiques des épreuves *in vivo* de sensibilité des antipaludiques. *WHO/MAL* 1982; 82.988: 22p.
56. **Payne. D.** Aspect pratique de l'utilisation des systèmes standards OMS d'épreuves *in vitro* (macro et microtest) pour la détermination de la chimiosensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine, la méfloquine, l'amodiaquine et la quinine. *WHO/MAL*. 1984; 84.2: 1p.
57. **OMS, 1973**(OMS, Série de Rapports techniques, N529).
58. **OMS, 1996**(Documents non publiés WHO/MAL/96. 1076).
59. **Le Bras. J., Deloron. P.** In vitro study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-microtest. *Am J Trop Med Hyg* 1983 ; 447-453.
60. **Le Bras. J., Andrieu. B., Hatin. I., Savel. J., Coulaud. J.P.** *Plasmodium falciparum* : interprétation du semi-microtest de chimiosensibilité *in vitro* par incorporation de 3-hypoxanthine. *Paht Bio* 1984; 32: 463-466.
61. **Desjardin. R.E., Canfield. C.J., Haynes. J.P., Chnulay. J.D.** Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16: 710-718.
62. **Le Bras et al. 2003.** ELISA-Malaria antigen test *Plasmodium* spp. LDH detection.(Data non published).

63. Ouologuem D. Determinants immunologiques et génomiques de la clairance des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la chloroquine. Thèse de pharmacie Bamako, FMPOS 2004.

Jour 0

Critères d'inclusion :

Age \geq 6 mois, GE ou FM positif et fièvre, frisson, signes de paludisme simple ou parasitémie \geq 2000.

Critères d'exclusion :

Avoir des antécédents d'œdèmes de quinck ou d'autres manifestation cutanées graves, coma, obnubilation, convulsion, prostration, détresse respiratoire, vomissement sévère, hémorragie diffuse.

Hmg < 5mg /ml, glycémie < 40mg/ml.

ID_____ Age____ Sexe_____

Nom_____ Prénom_____

Nom de la mère_____

Ethnie_____

Résidence/adresse_____

Symptômes :

Fièvre__ Céphalées__ Dx abdominales__ Vomissement__ Diarrhées__ Courbatures__

Citez les médicaments consommés durant les deux dernières semaines

Avez-vous consommé un des médicaments cités ci-dessous durant les deux dernières semaines ?

Fansidar_ pyriméthamine_ tétracycline_ méfloquine_ cotrimoxazole_ quinine_ chloroquine_
halofantrine_ fansifem_ proguanil_ paluter_ malarial_

Examen physique

Température_____°C Rash cutané Oui____ Non____

Décrire_____

Fréquences respiratoire_____/min

Score splénique de Hackett_____

Œdème Oui__ Non__

Poids _____Kg Taille _____ cm

Traitement antipaludique _____
Dose _____

Tests de laboratoire :

FM_____ GE _____ Sang veineux _____ Confettis _____
Hémoglobine _____mg/ml

Numéro de l'étude (ID) _____

Annexe 2

Fiche d'enquête

Titre: Evaluation du niveau d'utilisation des sels de quinine dans les structures sanitaires périphériques en république du Mali.

Introduction : Le Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) a initié une étude sur la baisse de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* (responsables des formes graves de paludisme) aux sels de quinine au Mali. Des travaux menés au laboratoire indiquent que la forme ms4760.1 du gène Pfnhe serait impliquée dans la baisse de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux sels de quinine. Le but de cette étude est de déterminer la corrélation entre le niveau d'utilisation des sels de quinine et la prévalence de la forme ms4760.1 du gène Pfnhe. Pour les besoins de l'enquête, nous aurons besoin de vos registres de consultation et de traitement pour le relevé des données. Pour cela, nous utiliserons une fiche d'enquête conçue conformément aux objectifs de cette étude.

Date : --- /---/---/

1. Localité : -----

2. Nom de la structure sanitaire : -----

3. Année évaluée : -----

4. Nombre de cas de paludisme diagnostiqués :

4.1. Nombre de cas de paludisme simple : ---/

4.1.1. Cas confirmé par l'examen parasitologique -----/ non confirmés : -----/

Préciser la nature de l'examen parasitologique : -----

4.1.2. Traitement administré :

4.1.2.1. Chloroquine : -----/

4.1.2.2. Sulfadoxine-Pyriméthamine : -----/

4.1.2.3. Sels quinine voie orale : -----/

4.1.2.4. Sels quinine voie injectable : -----/

4.1.2.4.1. Chloroquine après administration de la quinine injectable : ---/

4.1.2.4.2. Sulfadoxine – pyriméthamine après administration de la quinine injectable: ---/

4.1.2.4.3. Autres antipaludiques (A préciser) :-----/

4.1.3. Durée du traitement : 1 jour -----/ 2 jour -----/ 3 jour -----/ ou plus -----/

4.2. Nombre de cas de paludisme grave et compliqué : -----/

4.2.1. Cas confirmé par l'examen parasitologique -----/ Cas non confirmés : -----/

Préciser la nature de l'examen parasitologique : -----/

4.2.2. Traitement administré :

4.2.2.1. Sels quinine voie injectable : -----/

4.2.2.1.1. Durée du traitement : 1 jour -----/ 2 jour -----/ 3 jour -----/ ou plus -----/

4.2.2.2. Sels quinine voie orale après administration de la quinine : -----/

4.2.2.2.1 Durée du traitement : 1 jour -----/ 2 jour -----/ 3 jour -----/ ou plus -----/

4.2.2.3. Chloroquine après administration de la quinine : ----/

4.2.2.4. Sulfadoxine – pyriméthamine après administration de la quinine : -----/

4.2.2.5. Autres antipaludiques (A préciser) :-----

5. Nombre de cas de paludisme aux autres espèces de Plasmodium :

5.1. Cas confirmé par l'examen parasitologique -----/ non confirmés : -----/

Préciser la nature de l'examen parasitologique : -----

5.2. Traitement administré :

5.2.1. Chloroquine : -----/

5.2.2. Sulfadoxine-Pyriméthamine : -----/

5.2.3. Sels quinine voie orale : -----/

5.2.3.1. Durée du traitement : 1 jour -----/ 2 jour -----/ 3 jour -----/ ou plus -----/

5.2.4. Sels quinine voie injectable : -----/

5.2.4.1. Durée du traitement : 1 jour -----/ 2 jour -----/ 3 jour -----/ ou plus -----/

5.2.5. Autres antipaludiques (A préciser) :-----

Prénoms et nom de l'enquêteur : -----

Signature