

SOMMAIRE

DEDICACES	ii
REMERCIEMENTS :	iii
RESUME/SUMMARY	1
SOMMAIRE	3
SIGLES ET ABREVIATIONS	5
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES PHOTOS.....	6
INTRODUCTION/ENONCE DU PROBLEME	8
GENERALITES SUR LE PALUDISME.....	10
II.1. Définition	10
II.2. Agent pathogène	10
II.3. Le vecteur	10
II.4. Cycle parasitaire	10
II.4.1. Cycle parasitaire chez l'homme.....	11
II.4.2. Cycle parasitaire chez l'anophèle.	11
II.5. Physiopathologie du paludisme.	13
II.6. Formes cliniques du paludisme à <i>P. falciparum</i>	13
II.6.1 Primo-invasion.....	13
II.6.2 Le paludisme simple	13
II.6.3 Le paludisme grave.	14
II.7. Diagnostic biologique du paludisme.....	14
II.7.1 Diagnostic parasitologique	15
II.7.2 Diagnostic immunologique.....	15
II.7.3. La PCR (Polymérase Chain Réaction) :.....	16
II.8. Les anti paludiques-Mode d'action-Mécanisme de résistance du parasite.....	16
II.8.1. Les schizonticides sanguins	16
II.8.2. Les antifolates	16
II.8.3. Les associations médicamenteuses à base d'artémisinine	17
II.9. Résistance aux antipaludiques	17
II.10 Facteurs favorisant l'apparition de la chimiorésistance.....	18

II.10.1. La pression médicamenteuse et la sélection des mutants résistants.....	18
II.10.2. Les facteurs liés à l'immunité de l'hôte.	19
II.10.3. Les facteurs liés aux parasites et aux vecteurs.....	19
II.10.4. Les voyages.	19
II.11. Les méthodes d'évaluation de la chimiorésistance de <i>P. falciparum</i>	19
II.11.1. Tests <i>in vitro</i>	19
II.11.2. Tests <i>in vivo</i>	19
II.11.3. Tests moléculaires.....	20
II.12. Polymorphisme génétique de <i>P. falciparum</i>	20
II.13. Caractéristiques du gène <i>Pfmdr-1</i> et de son produit d'expression.	21
III. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	23
III.1. Objectif général	23
III.2. Objectifs spécifiques	23
IV METHODOLOGIE.....	24
IV.1 Site et population d'étude	24
IV.2 Recrutement et suivi des patients	24
IV.4. Analyses moléculaires.....	26
IV.3.1 Extraction de l'ADN génomique de <i>Plasmodium</i>	26
IV.3.2 Amplification des séquences spécifiques d'ADN.....	27
IV.4. Analyse des données et interprétation des résultats	32
V RESULTATS	34
V.1 Caractéristiques générales de la population d'étude.	34
V.2 Résultats cliniques et parasitologiques	34
V.3 Fréquence des mutations du point 86 du gène <i>Pfmdr1</i>	35
V.4 Fréquence des allèles du <i>Pfmdr1</i> -86 dans chaque bras (AL & ASAQ).....	35
V.5 Relation entre les mutations du point 86 du gène <i>Pfmdr1</i> et la réponse au traitement.....	36
VI. DISCUSSION.....	37
VI.1. De l'efficacité de ASAQ et AL	37
VI.2 De la fréquence des mutations au point 86 du gène <i>Pfmdr1</i>	38
VI.3 De l'impact du traitement sur la sélection de souches mutantes	39
VI.4. De la relation entre les mutations du point 86 du gène <i>Pfmdr1</i> et la réponse au traitement. ...	39
CONCLUSION.....	41
PERSPECTIVES.....	41
REFERENCES.....	42

SIGLES ET ABREVIATIONS

μmol/L	micromoles/litre
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AL	Artémether-Luméfantrine
ATP:	Adénosine Triphosphate
ART	Artémisinine
ASAQ	Artésunate-Amodiaquine
BET:	Bromure d'Ethidium
Bp :	base paire
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
CQ	Chloroquine
CSPS :	Centre de Santé et de Promotion Sociale
dNTPs:	Désoxyribonucléosides triphosphates
ECT :	Echec Clinique Tardif
EDTA	Ethylene-diamine-tetra-acétique
EPT :	Echec Parasitologique Tardif
ETP :	Echec Thérapeutique Précocce
ETT :	Echec Thérapeutique Tardif
HRP2	Histidin rich protein 2
IC	Intervalle de Confiance
LDH	Lactate déshydrogénase
mA :	Milliampère
<i>msp1</i>, 2 :	Merozoite Surface Protein 1, 2 gene
nm	nanomètre
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
<i>Pfprt</i>:	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter gene
<i>PFCRT</i>:	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter protein
<i>Pfprt K76T</i>	Substitution de la lysine (K) en position 76 par la thréonine (T) du <i>Pfprt-76</i>
<i>Pfdhfr</i>:	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase gene
<i>Pfdhps</i>:	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydropteroate synthetase gene
<i>Pfmdr1</i>:	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1 gene
<i>Pfmdr1</i>-N86Y	Substitution de l'asparagine (N) en position 86 par la tyrosine (Y) du <i>Pfmdr1</i> gene
<i>Pgh1</i>:	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1 protein
RCPA	Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate
SP:	Sulfadoxine–Pyriméthamine
TBE:	Trizma acid-Boric EDTA
WHO :	World Health Organization

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Critères cliniques du paludisme grave [59].....	14
Tableau II : Critères biologiques du paludisme grave [59].....	14
Tableau III : Tableau de suivi des patients pendant les 28 jours.....	25
Tableau IV : Régime de Traitement pour Artémether-Lumefantrine (AL; COARTEM® 20/120mg).	26
Tableau V : Régime de Traitement pour Amodiaquine-Artésunate.	26
Tableau VI : Composition des mélanges réactionnels pour la première et la deuxième PCR pour l'amplification des <i>msp1</i> et <i>msp2</i>	27
Tableau VII : Tableau récapitulatif des amorces et des programmes d'amplification des gènes <i>msp1</i> et <i>msp2</i>	28
Tableau VIII : Exemple non exhaustif d'interprétation des gels	29
Tableau IX : Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR de <i>Pfmdr1</i> -86	30
Tableau X : Programmes d'amplification et séquences des primers pour analyse de <i>Pfmdr1</i> -86	30
Tableau XI : Tableau récapitulatif de la digestion enzymatique.....	31
Tableau XII : Mélange réactionnel pour la digestion enzymatique au point 86	31
Tableau XIII : Caractéristiques démographiques et cliniques des deux groupes de traitement n(%)	34
Tableau XIV : Réponse au traitement par AL et ASAQ avant et après correction par PCR [% (n/N)]	35
Tableau XV : Proportion des mutants dans la population avant et après traitement.....	36
Tableau XVI : Association entre mutation <i>Pfmdr1</i> -N86Y et la réponse au traitement	36

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle évolutif de <i>Plasmodium sp.</i>	12
Figure 2 : Structure du gène merozoïte surface protein-1 [65].	20
Figure 3: Structure du gène merozoïte surface protein-2 [65].	21
Figure 4 : Structure de la protéine <i>pfmdr1</i> indiquant les différents points de mutation	22
Figure 5 : Situation des CSDS du district sanitaire de Nanoro. (Source: Système de Surveillance Démographique et de Santé de Nanoro)	24

LISTE DES PHOTOS

Photo 1: Profil électrophorétique de l'ADN : polymorphisme de <i>msp1</i> à J0 et Jr.....	29
Photo 2: Profil électrophorétique de l'ADN après digestion pour la détection des allèles du gène <i>Pfmdr1</i> -86.	32

INTRODUCTION/ENONCE DU PROBLEME

INTRODUCTION/ENONCE DU PROBLEME

Le paludisme demeure la première endémie parasitaire mondiale. Selon les dernières estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 207 millions de cas de paludisme dont 627 000 décès ont été enregistrés en 2012. La plupart de ces décès ont été enregistrés chez des enfants vivant en Afrique [84].

Au Burkina Faso le paludisme a constitué la première cause de consultation dans les districts sanitaires. Il est passé de 44,5% des causes en 2008 à 47,3% en 2012. En 2012, le paludisme grave avec 62,6% et 47,01% demeurait de loin la première cause d'hospitalisation et de décès dans les districts sanitaires [50].

Des efforts considérables ont été menés dans la lutte contre le paludisme dans le monde par utilisation des médicaments tels que la chloroquine (CQ) et à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP). Cependant la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques constitue un obstacle majeur à cette lutte contre la maladie. Pour faire face à l'émergence de la résistance à la CQ et à la SP, l'OMS a recommandé l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) comme alternative pour le traitement du paludisme [1; 55]. C'est ainsi que plusieurs pays en Afrique ont changé leurs traitements de première ligne du paludisme simple [58]. En Février 2005, les combinaisons Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et Artémether-Luméfántrine (AL) ont été adoptées par le Burkina Faso pour le traitement du paludisme simple [49; 52]. En effet plusieurs études au niveau national ont montré que ces CTA sont efficaces et bien tolérés [67; 68]. Cependant des cas d'échecs cliniques aux CTA sont de plus en plus rapportés en Asie du Sud-est [22; 53]. De plus, plusieurs autres études font cas d'une diminution de la sensibilité à certains composants des ACTs *in vitro* [53; 54]. Dans ce contexte, une surveillance de l'efficacité de ces combinaisons est nécessaire. Cette surveillance peut se faire à travers des études *in vivo* ou *in vitro* mais aussi par l'étude des marqueurs moléculaires de résistance. En effet, l'implication du gène *Pfmdr1* dans la résistance de *P. falciparum* à de nombreux antipalutiques tel que la Chloroquine (CQ) a été déjà rapportée [34; 35; 36]. Les possibilités d'une résistance croisée entre la CQ et l'amodiaquine (AQ) dû à une similarité de structure a été aussi évoquée, et cela a été observée *in vivo* et *in vitro* [13]. Il a aussi été suggéré que le gène *pfmdr1* serait impliqué dans la diminution de la sensibilité à la luméfántrine qui est pourtant une composante de la combinaison AL [69; 70]. De ce fait, le rôle du gène *Pfmdrl* dans la baisse de l'efficacité thérapeutique des CTA est très discuté et nécessite des investigations plus poussées [35; 47]. Au Burkina Faso très peu d'études ont évalué l'efficacité thérapeutique de ces médicaments

en relation avec les mutations du gène *Pfmdr1*, et spécifiquement à son point 86. C'est dans ce contexte, que nous avons conduit la présente étude en 2012 à Nanoro au Burkina Faso afin d'étudier la relation entre la mutation N86Y du gène *Pfmdr1* et la réponse au traitement avec les deux combinaisons recommandées pour le traitement du paludisme simple au Burkina Faso.

GENERALITES SUR LE PALUDISME

II.1. Définition

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à la présence et à la multiplication dans l'organisme d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Il est transmis à l'homme par la piqûre de la femelle infectée d'un moustique du genre *Anopheles* [46].

II.2. Agent pathogène

Le paludisme est causé par un protozoaire appartenant au *phylum* des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoea*, à la sous-classe des *Coccidia*, à l'ordre des *Eucoccididia* au sous-ordre des *Haemosporina*, à la famille des *Plasmodidae*, au genre *Plasmodium*. Cinq espèces infectent l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium knowlesi* [16; 64; 80]. Des études récentes ont montré l'existence de 2 sous-espèces sympatriques de *P. ovale* : *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* [2; 9; 73], présentes en Afrique et en Asie, non distinguables par la microscopie et pouvant être à l'origine de la mauvaise détection de cette espèce par les tests de diagnostic rapides.

De ces cinq espèces, *P. falciparum* est la plus répandue, la plus virulente, responsable des formes cliniques potentiellement mortelles de la maladie. C'est aussi l'espèce concernée par la chimiorésistance [15; 32].

II.3. Le vecteur

Il s'agit d'un moustique appartenant à l'ordre des diptères, de la famille des *Culicidae* et du genre *Anopheles*. Seule la femelle hématophage assure la transmission du parasite [15; 32].

Parmi les 400 espèces d'*Anopheles* actuellement décrites, environ une soixantaine peut avoir un rôle de vecteur du paludisme chez l'homme.

Au Burkina Faso, les études entomologiques révèlent que les principaux vecteurs du paludisme sont: *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles funestus* et *Anopheles nili*. Ces espèces sont réparties selon les différentes zones climatiques du pays [18; 19].

II.4. Cycle parasitaire

Le cycle de développement du *Plasmodium* nécessite deux hôtes obligatoires : l'homme (cas des *Plasmodium* humains) et le moustique [62].

II.4.1. Cycle parasitaire chez l'homme

Il se déroule en deux phases : une phase hépatique (ou exo-érythrocytaire) et une phase sanguine (ou érythrocytaire)

II.4.1.1. La phase hépatique

L'anophèle femelle infesté en piquant l'homme lui inocule dans le sang, le parasite sous forme de sporozoïtes. Ceux-ci restent dans la circulation sanguine pendant une demi-heure avant de pénétrer dans les cellules du foie.

Une fois dans l'hépatocyte, les sporozoïtes restent quiescents (hypnozoïtes) pour *P. ovale* et *P. vivax* ou par multiplication nucléaire, ils deviennent des schizontes intra hépatocytaires (corps bleus). Cette phase dure 7 à 21 jours en fonction de l'espèce plasmodiale. Elle est cliniquement muette et correspond à la phase d'incubation de la maladie [15; 32; 62].

II.4.1.2. La phase sanguine

La rupture des corps bleus libère des mérozoïtes qui pénètrent les globules rouges par endocytose, et se transforment en trophozoïte. Le trophozoïte grossit et se transforme en schizonte sanguin qui est appelé corps en rosace à maturité et qui contient de nombreux mérozoïtes dont le nombre varie selon l'espèce plasmodiale. L'éclatement de l'hématie libère les mérozoïtes dans la circulation sanguine. Chaque mérozoïte envahit une nouvelle hématie, poursuivant ainsi le cycle intra érythrocytaire. Au cours de la multiplication dans les hématies, le parasite va produire au dépend de l'hémoglobine un pigment appelé hémozoïne. Parallèlement apparaissent dans l'hématie des taches de Maurer (*P. falciparum*), des granulations de Schuffner (*P. vivax* et *P. ovale*) ou des ponctuations de Ziemann (*P. malariae*). La phase sanguine dure 48 heures chez le *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, 72 heures chez le *P. malariae*. C'est l'éclatement simultané des rosaces d'une même génération qui provoque l'accès fébrile observé au cours du paludisme. Après plusieurs cycles schizogoniques sanguins, certains mérozoïtes se différencient en élément à potentiel sexué: les gamétocytes. Ceux-ci ne poursuivront leur développement que s'ils sont absorbés par un anophèle femelle [15; 32; 62].

II.4.2. Cycle parasitaire chez l'anophèle.

Le cycle chez l'anophèle encore appelé cycle sporogonique, débute dès l'infection de l'anophèle femelle ayant piqué un impaludé porteur de gamétocytes.

Les gamétocytes absorbés passent dans l'estomac du moustique. Le gamétocyte femelle (macrogamétocyte) se transforme en gamète femelle et devient immobile. Le gamétocyte

mâle (microgamétocyte) se divise en huit (08) gamètes qui vont subir une exflagellation qui les allongera et les rendra mobile.

La fécondation des gamètes aboutit à la formation dans la lumière du tube digestif d'un œuf mobile appelé, ookinète. Celui-ci va traverser et aller s'enkyster sur sa face externe formant un oocyste. Une fois mûr l'oocyste éclate et libère des sporozoïtes qui vont gagner les glandes salivaires de l'anophèle d'où ils seront inoculés à l'homme lors d'une nouvelle piqûre.

La durée du cycle chez l'anophèle est de 10 à 40 jours selon la température extérieure et les espèces [15; 32; 62].

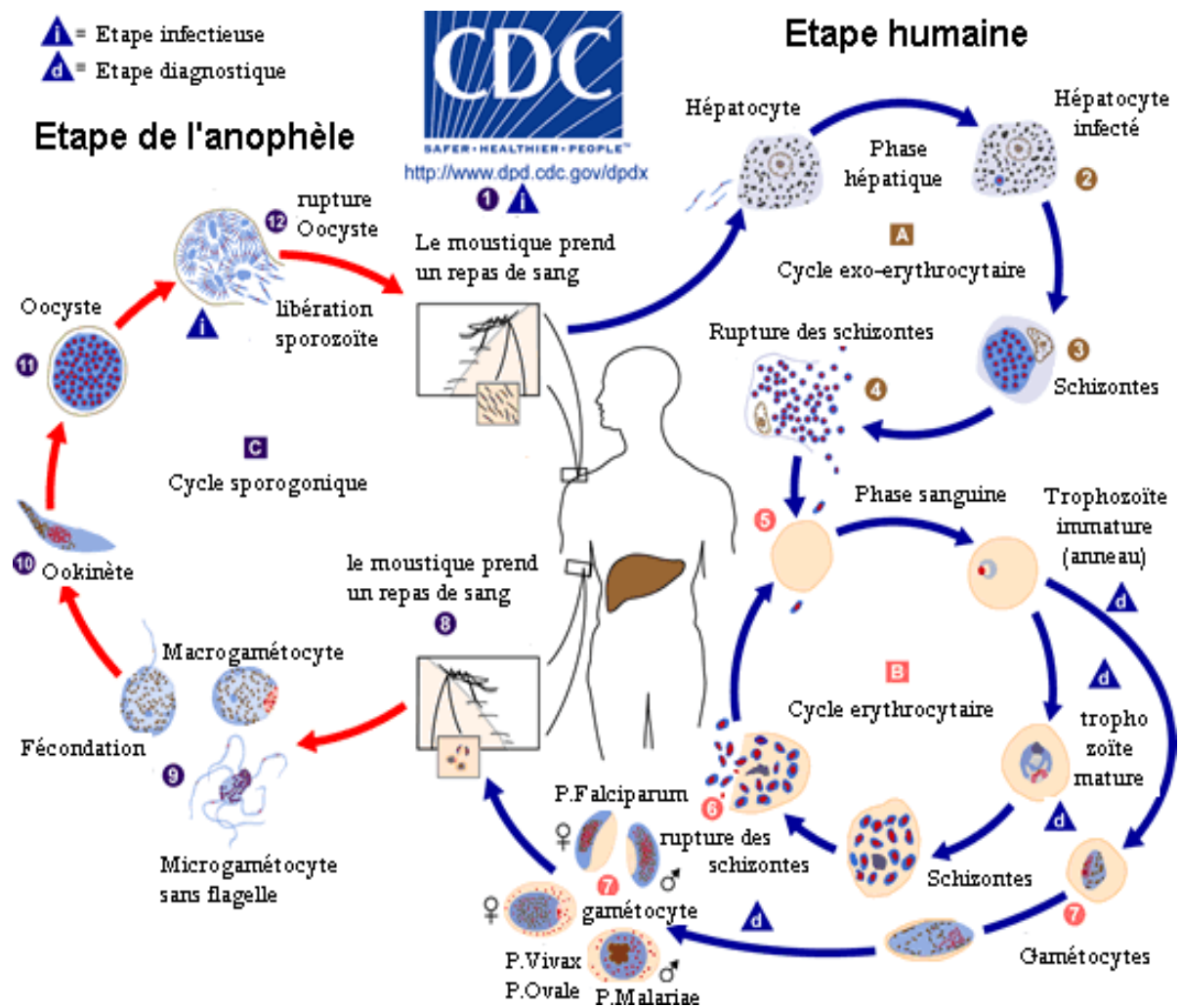


Figure 1 : Cycle évolutif de *Plasmodium* sp.

Source: Center for Disease Control: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

II.5. Physiopathologie du paludisme.

La physiopathologie du paludisme n'est pas encore clairement élucidée, mais les répercussions de l'infection palustre sur certains organes ont été bien décrites.

- Pendant la phase érythrocytaire, il se produit une hémolyse, responsable d'une anémie. L'hémoglobine issue de l'hémolyse se métabolise entraînant l'hémoglobinurie et une hausse de la bilirubine, d'où l'installation quelques fois de l'ictère. Aussi, la digestion de l'hémoglobine par le parasite occasionne dans son cytoplasme une précipitation de granules de pigments appelées hémozoïnes. L'hémozoïne et l'hémoglobine transformées par les histiocytes donnent lieu à l'hémossidérine de couleur jaune sombre.
- La rate est également l'un des organes cibles du paludisme; on note une hypertrophie, cause d'une augmentation de la pulpe blanche. Elle devient molle et congestive, sa couleur caractéristique rouge foncée parfois brune est due à une accumulation de pigments internalisés dans les phagocytes.
- Au niveau du foie, il se produit la destruction d'un certain nombre de cellules parenchymateuses, mais sans aucune lésion inflammatoire dans la plupart des cas.
- Pour le neuroludisme qui est la complication majeure du paludisme à *P. falciparum*, plusieurs théories probablement complémentaires, prônent une séquestration d'hématies parasitées par des formes mûres de *Plasmodium* adhérents aux cellules endothéliales des micro-vaisseaux et l'internalisation des cytokines et autres médiateurs [32].

II.6. Formes cliniques du paludisme à *P. falciparum*.

II.6.1 Primo-invasion

Il est marqué par l'apparition :

- d'une fièvre à 39-40°C, continue, parfois irrégulière;
- d'un malaise général : courbatures, céphalées, douleurs abdominales, nausées, vomissements et diarrhée (classique « embarras gastrique fébrile ») et des myalgies.

L'examen physique révèle une discrète hépatomégalie douloureuse sans splénomégalie [15].

II.6.2 Le paludisme simple

Classiquement, trois phases succèdent dans les accès simples à savoir :

- La sensation de froid avec frisson intense, céphalée et vomissement.

- La chaleur, la peau du malade est sèche et brûlante, sa température atteint 40 à 41 °C, sa rate diminue de volume, le pouls est très rapide ou lent.
- Les sueurs profuses accompagnent la défervescence, laissant le patient asthénique et courbaturé [15; 32].

II.6.3 Le paludisme grave.

Le paludisme grave regroupe un large éventail de manifestations traduisant les différentes atteintes viscérales et les complications qui peuvent s'observer au cours des formes sévères du paludisme à *P. falciparum*. Selon l'OMS, il se définit comme la présence chez un sujet présentant des formes asexuées de *P. falciparum* à l'examen sanguin associée à une ou plusieurs des manifestations contenues dans les **tableaux I et II**.

Tableau I : Critères cliniques du paludisme grave [59].

Critères cliniques	Précision du texte de l'OMS
Coma vrai : neuropaludisme	Score de Glasgow < 10 Score de Blantyre < 3
Trouble de la conscience	Score de Glasgow <15 et > 9 Score de Blantyre <5 et > 2
Respiration acidotique	Détresse respiratoire chez l'enfant
Convulsions répétées	> 1/24 heures
Collapsus cardiovasculaire	pression artérielle systolique < 80mm Hg Signe périphérique d'insuffisance Respiratoire
Œdème pulmonaire	définition radiologique
Saignement anormal	définition clinique
Ictère	définition clinique
hémoglobininurie macroscopique	urines rouges foncées ou noires

Tableau II : Critères biologiques du paludisme grave [59].

Critères cliniques	précision du texte de l'OMS
Anémie sévère	Enfant : Hb< 5g/dl Adulte : Hb< 7g/dl
Hypoglycémie	Glycémie < 2.2 mmol/l (40mg/dl)
Acidose	Bicarbonate plasmatique < 15mmol/l
Hyperlactatémie	Lactate plasmatique > 5 mmol/l
Hyperparasitémie	Parasitémie ≥4% chez le sujet non immun Parasitémie >20% chez le sujet immun
Insuffisance rénale	Creatininémie >265 μmol/l (> 3mg/dl)

II.7. Diagnostic biologique du paludisme

Le diagnostic de certitude du paludisme est apporté par la mise en évidence du parasite dans le sang.

II.7.1 Diagnostic parasitologique

Il se réalise par l'examen direct au microscope optique de prélèvements sanguins effectués de préférence avant tout traitement antipaludique, au moment des pics fébriles. Les techniques les plus utilisées sont la goutte épaisse et le frottis sanguin.

II.7.1.1 La goutte épaisse/Le frottis sanguin :

La goutte épaisse constitue l'examen de référence, c'est une technique de concentration des parasites. L'examen se fait au microscope optique, à l'objectif 100 en utilisant de l'huile à immersion. La numération se fait en comptant les parasites rapportés au nombre de leucocytes. L'examen peut mettre en évidence de faibles taux de parasitémie. En effet la limite de détection de la goutte épaisse est de 6 parasites/ μ L pour 400 champs observés [15; 32; 37; 63]. Le frottis mince est l'étalement mince d'une goutte de sang sur une lame porte objet. L'examen se fait après fixation à l'alcool et coloration au Giemsa. Il permet un diagnostic d'espèce plus précis mais ne permet pas de dépister des parasitémies faibles [37].

II.7.2 Diagnostic immunologique

Le principe des différents tests est globalement superposable et repose sur l'immunochromatographie: l'échantillon à tester est déposé à l'une des extrémités d'une membrane de nitrocellulose fixée sur un support plastique ou carton. Si l'antigène recherché est présent (HRP2, LDH, Aldolase), il va se lier avec un anticorps marqué le plus souvent à l'or colloïdal. Afin de faciliter la lyse des globules rouges ainsi que la migration de l'échantillon sur la bandelette, quelques gouttes de solution tampon/lyse sont déposées. Les complexes antigènes - anticorps vont alors migrer par chromatographie et l'antigène sera capturé en sandwich par un anticorps de capture fixé sur la membrane. Cette capture va alors se traduire par l'apparition d'une ligne mauve. La performance diagnostique recommandée par l'OMS pour ces TDR est de 200 *Plasmodium*/ μ L [57]. Plusieurs kits de TDR sont actuellement disponibles, et reposent sur différents principes. On distingue entre autre :

- les tests qui vont rechercher la glycoprotéine HRP2 (Histidin Rich Protein 2) spécifique de *P. falciparum* : le test Kat-Quick Malaria, Palutop ;
- les tests qui détectent une enzyme isomère de la lactate deshydrogénase (LDH) spécifique de *P. falciparum* et une LDH commune à toutes les espèces : Optimal-It
- les tests qui détectent l'antigène HRP2, la LDH spécifique à *P. vivax*, et une LDH commune autres espèces : Palutop+4

- Un test détecte l'antigène HRP2 et une aldolase commune à 4 espèces plasmodiales (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*): NOW® Malaria (Fumouze-France). [5; 23; 33; 43; 51].

II.7.3. La PCR (Polymérase Chain Réaction) :

C'est un processus d'amplification de l'ADN parasitaire. Elle consiste en une série de dénaturation, d'annealing (appariement des amorces) et d'extension [72]. C'est une méthode très couteuse et est de ce faite utilisée uniquement dans le cadre de la recherche.

II.8. Les anti paludiques-Mode d'action-Mécanisme de résistance du parasite

II.8.1. Les schizonticides sanguins

Ce sont la CQ, la méfloquine, l'amodiaquine, l'artémisinine, la quinine.

Ce sont des antipaludiques actifs sur les formes schizontes du parasite. Ils ont la propriété d'agir généralement par accumulation dans la vacuole digestive du parasite. La CQ, dont le mécanisme d'action est le plus documenté, est active exclusivement sur les formes érythrocytaires du parasite. La CQ, base soluble, traverse les différentes membranes de l'érythrocyte et du parasite et s'accumule dans la vacuole digestive acide suivant le gradient de pH. À l'intérieur de la vacuole, la CQ est protonée et ne peut plus traverser librement la membrane vacuolaire. Prise au piège dans la vacuole, elle y exerce son action létale pour le parasite.

II.8.2. Les antifolates

Les principaux antifolates utilisés dans le traitement du paludisme sont la pyriméthamine, la sulfadoxine et le cycloguanil. Les *Plasmodium* humains ne peuvent pas utiliser la pyrimidine de l'hôte, précurseur des acides nucléiques pour se multiplier. Pour synthétiser ses propres pyrimidines, les *Plasmodium* utilisent l'acide folique, un co-facteur enzymatique essentiel de la biosynthèse de l'ADN. Le mécanisme d'action des antifolates est donc principalement une inhibition enzymatique compétitive de l'ADN du parasite. La pyriméthamine et le cycloguanil analogues structuraux du dihydrofolate réductase (DHFR) sont des inhibiteurs compétitifs de cette enzyme de *P. falciparum*. Quant à la sulfadoxine, analogue structurale de l'acide para-aminobenzoïque (PABA), elle inhibe spécifiquement l'activité de la dihydroptéroate synthétase (dhps) du parasite. Ces inhibitions enzymatiques de la synthèse de l'ADN ont donc pour conséquence un arrêt de la multiplication des parasites.

II.8.3. Les associations médicamenteuses à base d'artémisinine

Issue de la pharmacopée chinoise, l'artémisinine (ART) est un alcaloïde naturel extrait de l'armoise *Artemisia annua* [7]. En 2001, l'OMS considérait que l'ART était « le plus grand espoir mondial contre le paludisme ». Elle agit très rapidement (C_{max} par voie orale < 2h et demi-vie < 1h) mais elle ne permet pas d'éliminer complètement tous les parasites, d'où la nécessité de l'associer à d'autres antipaludiques.

Le mécanisme d'action de cette classe de médicament est régi par un pont endopéroxyde (O-O) qui est à la base de l'activité de l'ART et de ses dérivés. En présence du fer de l'hème, ces ponts se rompent pour former un radical libre de type alkyl qui forme un lien covalent avec l'hème. L'ART peut donc être considéré comme un composé pro-oxydant. De plus, l'alkylation de protéines spécifiques par l'ART a été rapportée [85]. Une de ces cibles pourrait être la *PfATPase6* (*PfSERCA*), une enzyme ATPase calcium-dépendante, essentielle pour la survie du parasite [11; 38; 44].

II.9. Résistance aux antipaludiques

L'OMS définit la résistance comme étant la capacité du parasite à survivre et/ou à se multiplier en dépit de l'administration et de l'absorption d'un médicament donné à doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées mais restant dans les limites de la tolérance du malade [82; 83]. Il a été ajouté en 1986 que la forme active du médicament devait pouvoir atteindre le parasite ou accéder à l'intérieur de l'érythrocyte infecté pendant la durée nécessaire à son action normale.

De nombreuses études établissant une association entre le génotypage d'isolats et leur phénotype ont mis en évidence l'implication directe du gène *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*Pfcr1*) (chromosome 7) dans la résistance à la CQ [8; 28]. Il existe plusieurs hypothèses concernant la fonction de *PfCRT*, la protéine de transport de la membrane de la vacuole digestive codée par *Pfcr1*. La protéine *PfCRT* pourrait expulser activement la CQ de la vacuole digestive [66], altérer le pH ou la CQ diprotonée pourrait être transportée passivement à l'extérieur de la vacuole par *PfCRT* muté [40]. La mutation Lys76Thr du gène *Pfcr1* (c'est-à-dire remplacement d'un acide aminé lysine par une thréonine au niveau du codon 76) est associée à la résistance à la CQ au point qu'elle est présente dans toutes les souches résistantes.

Les mutations ponctuelles du gène codant pour la dihydrofolate réductase (*Pfdhfr*) sont les bases moléculaires de la résistance à la pyriméthamine et au cycloguanil. Egalement, des

mutations ponctuelles du gène de la dihydroptéroate synthétase (*Pfdhps*) sont les bases moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine en association avec la pyriméthamine (fansidar®).

Bien qu'il n'y ait pas de marqueurs moléculaires validés associés à la résistance aux CTA, il a été suggéré qu'une mutation Ser769Asn du gène *PfATPase6* serait associée à une diminution de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à l'artéméther (concentration inhibitrice 50 % > 30 nmol/L) en Guyane mais pas au Cambodge ni au Sénégal [38]. Cette mutation n'a pas été associée à la résistance *in vivo* à l'artésunate à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande [22]. De plus, ce gène présente une grande diversité génétique qui varie selon les zones géographiques [10; 39].

Récemment, **ARIEY F. et al.**, ont fait une découverte majeure: l'identification d'un marqueur moléculaire étroitement associé à la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine. Associant génomique, biologie, clinique et épidémiologie, les chercheurs ont d'abord séquencé le génome d'une souche de *P. falciparum* rendue résistante et celui de sa souche jumelle non résistante en laboratoire pour comparaison. Ils ont ainsi identifié l'acquisition de la mutation dans le domaine kelch *PF3D7_1343700* (hélice K13) qui confère à la souche de laboratoire sa résistance à de fortes doses d'artémisinine [3].

II.10 Facteurs favorisant l'apparition de la chimiorésistance.

Quatre facteurs contribuent à l'apparition et à l'émergence de la chimiorésistance de *P. falciparum*.

II.10.1. La pression médicamenteuse et la sélection des mutants résistants.

Dans une zone d'endémie palustre, les premiers parasites mutants qui apparaissent sont généralement très peu nombreux par rapport aux parasites sauvages. Selon la loi des équilibres biologiques, leur nombre reste longtemps peu élevé tant qu'il n'y a pas d'intervention de facteurs extrinsèques. Dans cette zone, l'utilisation d'un médicament aura pour conséquence l'élimination des souches sauvages (sensibles), ce qui va faire rompre l'équilibre en faveur des souches mutantes résistantes. Ainsi, plus ce médicament sera utilisé, plus des mutants résistants seront sélectionnés. C'est donc la pression médicamenteuse qui permet l'émergence des mutants préexistants et non l'adaptation progressive des parasites à des doses croissantes de produits.

II.10.2. Les facteurs liés à l'immunité de l'hôte.

L'immunité (humorale ou cellulaire) agit de manière similaire aussi bien sur les isolats sensibles que résistants à un médicament [45; 71]. Dans une zone à transmission stable, le degré d'immunité de la population est élevé et les mutants résistants qui échappent à l'action du médicament sont attaqués par les facteurs de l'immunité. Si le niveau d'immunité n'est pas suffisant (sujets expatriés, jeunes enfants non encore immunisés, adultes en état de déficit immunitaire), les mutants résistants se multiplieront et engendreront des manifestations cliniques [4].

II.10.3. Les facteurs liés aux parasites et aux vecteurs.

Indépendamment de toute pression médicamenteuse, des mutations spontanées susceptibles d'induire une résistance peuvent survenir au niveau des génomes plasmodiales. Moins le nombre de mutations requis pour la chimiorésistance est élevé, plus vite celle-ci intervient [79]. De plus, certaines souches résistantes se reproduisent plus facilement chez certains vecteurs (*Anopheles dirus*) que les souches chimiosensibles [78].

II.10.4. Les voyages.

Un voyageur non immun va transporter des mutants résistants d'une zone de chimiorésistance dans une zone où ces mutants résistants n'existaient pas. Les sujets non immuns et non prémunis de cette zone d'accueil vont permettre le développement et la dissémination de la résistance [29; 48].

II.11. Les méthodes d'évaluation de la chimiorésistance de *P. falciparum*.

II.11.1. Tests *in vitro*.

Les tests *in vitro* sont basés sur la capacité de certains médicaments à inhiber la croissance de *Plasmodium* en milieu de culture. Les tests les plus couramment utilisés sont:

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

II.11.2. Tests *in vivo*.

Standardisés par l'OMS, ces tests rendent compte de la nature biologique des traitements antipaludiques [81]. Des patients souffrant de paludisme sont sélectionnés, traités avec un antipaludique puis sont suivis sur le plan clinique et biologique pendant 28 ou 42 jours

- *msp2*: ce gène situé sur le chromosome 2 est divisé en 5 blocs et code pour une glycoprotéine de surface de 28 kDa (Merozoïte surface Protein 2). La variabilité du bloc 3 (IC3D7 ou FC27) est utilisée pour différencier les clones de *P. falciparum* (Figure 3).



Figure 3: Structure du gène merozoïte surface protein-2 [65].

Les brassages inter et intra chromosomiques affectant certains gènes et les pressions immunitaires sont les principales sources de l'émergence du polymorphisme au niveau des antigènes, origine des résistances.

II.13. Caractéristiques du gène *Pfmdr-1* et de son produit d'expression.

Situé sur le chromosome 5 de *P. falciparum*, le gène *Pfmdr1* comporte 4260 pb et code pour une protéine dénommée «*Pfmdr* protein». C'est un polypeptide transmembranaire au niveau de la vacuole digestive du parasite, d'environ 162 kDa et comportant 1419 acides aminés. Cette protéine intervient dans la régulation de la concentration intra vacuolaire des médicaments antipaludiques. Le gène *Pfmdr-1* subit souvent des mutations ponctuelles dont la conséquence immédiate est la synthèse de la protéine mutée capable de lui conférer une résistance aux antipaludiques [30; 61]. Les polymorphismes de la protéine sont observés au niveau des positions 86, 184, 1034, 1042 et 1246 [60].

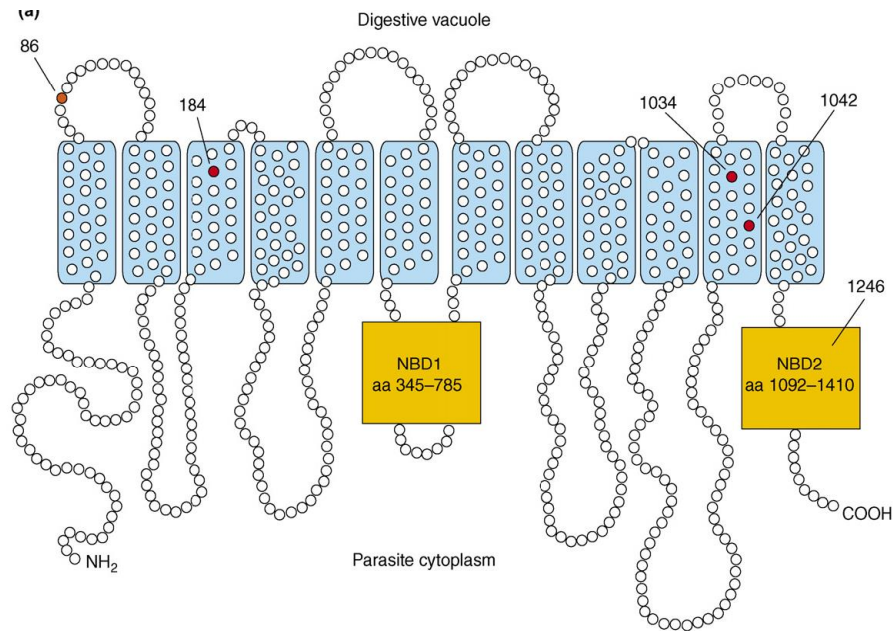


Figure 4 : Structure de la protéine *pfmdr-1* indiquant les différents points de mutation

OBJECTIFS

III. OBJECTIFS DE L'ETUDE

III.1. Objectif général

Etudier la relation entre la mutation du point 86 du gène *Pfmdr1* de *Plasmodium falciparum* et la réponse au traitement avec Artémether-Lumefantrine (AL) et Artésunate-Amodiaquine (ASAQ).

III.2. Objectifs spécifiques

1. Comparer l'efficacité des deux combinaisons ASAQ et AL avant et après correction par PCR à l'issue des 28 jours de suivi;
2. Déterminer la fréquence de la mutation N86Y du gène *Pfmdr1* dans la population avant la prise du traitement et dans les cas de recrudescence ;
3. Déterminer la relation entre la présence de la mutation N86Y du gène *Pfmdr1* et les échecs thérapeutiques observés avec les combinaisons AL et ASAQ.

METHODOLOGIE

IV METHODOLOGIE

IV.1 Site et population d'étude

Les échantillons (confettis) que nous avons analysés proviennent d'une étude randomisée ouverte conduite à Nanoro (Burkina Faso) en 2012, qui visait à évaluer l'efficacité des combinaisons AL et ASAQ chez des patients souffrant de paludisme simple à *P. falciparum*. Nanoro est un site sentinelle de l'initiative "Faire Reculer le Paludisme" situé au centre-ouest du Burkina Faso (figure 5). La population du district est estimée à 158127 habitants en 2014 [50]. Le paludisme y est holoendémique avec un pic de transmission pendant la saison pluvieuse (Mai à Octobre). Les patients ont été recrutés dans 4 CSPPS du district sanitaire de Nanoro à savoir : Godo, Nanoro, Nazoanga, et Seguedin.

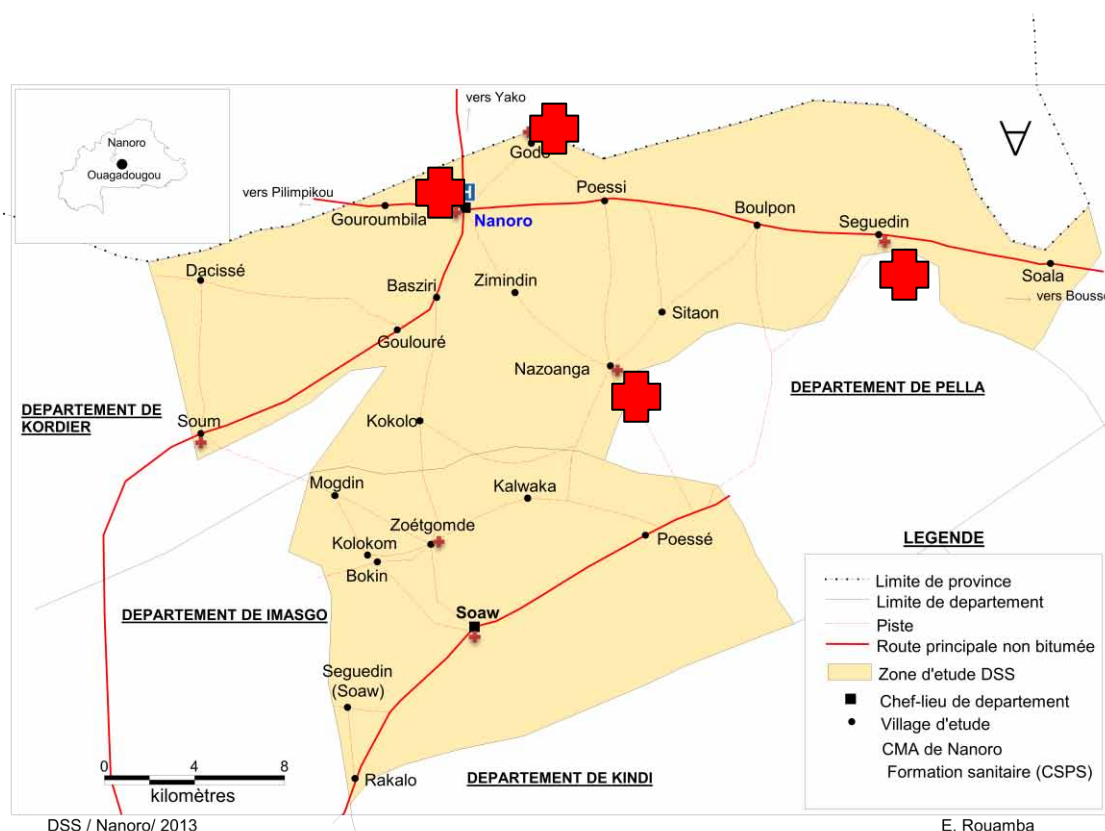


Figure 5 : Situation des CSPPS du district sanitaire de Nanoro. (Source: Système de Surveillance Démographique et de Santé de Nanoro)

IV.2 Recrutement et suivi des patients

Le planning de suivi clinique et biologique des patients est résumé dans le tableau III. Les patients inclus étaient suivis pendant 28 jours avec des visites programmées au jour 2, 3, 7, 14, 21 et 28. A chaque jour de visite un examen clinique, un prélèvement sanguin pour une

goutte épaisse/frottis mince, la mesure du taux d'hémoglobine et la confection de confettis pour des analyses PCR ultérieures étaient réalisés. Les patients étaient invités à revenir au centre de santé à tout moment en dehors des visites programmées en cas de problèmes médicaux. Au cours de ces visites non programmées il était pratiqué les mêmes examens qu'au jour de visites programmés.

Tableau III : Tableau de suivi des patients pendant les 28 jours

Jour	0	1	2	3	4	5	6	7 +/-1 Jour (²)	14 +/-1 Jour (²)	21 +/- 2 Jour (²)	28 +/- 2 Jour (²)	Tout autre jour ¹
Histoire (symptômes)	X	X	X	X				X	X	X	X	X
Consentement éclairé	X											
Examen (clinique)	X	X	X	X				X	X	X	X	X
Température	X	X	X	X				X	X	X	X	X
TDR	X											
GE/FM , Confettis	X		X	X				X	X	X	X	X
Effets Adverses	X	X	X	X				X	X	X	X	X
Traitements concomitants	X	X	X	X				X	X	X	X	X
Hématologie (Hb)	X							X	X		X	X
Traitement	X	X	X									

IV.3 Administration des traitements

Les médicaments de l'étude étaient Artésunate-Amodiaquine Co formulée (ASAQ Winthrop®, SANOFI) avec 3 dosages 25/67,5mg 50/135mg 100/270mg et Artémether-Luméfantrine (AL) 20/120mg (COARTEM®, NOVARTIS). Ces médicaments étaient sous forme de comprimés. L'administration des médicaments de l'étude a été faite au niveau de la structure de santé sous la supervision directe des infirmiers de l'équipe de recherche en utilisant le diagramme de dosage en fonction du poids corporel. Les tableaux IV et V ci-dessous présentent les modes d'administration de chacun des deux traitements AL et l'ASAQ respectivement:

Tableau IV : Régime de Traitement pour Artémether-Lumefantrine (AL; COARTEM® 20/120mg).

Poids	Dosage		
	Interaction avec une alimentation:		
	Jour 0	Jour 1	Jour 2
5 – 15 kg	Matin: 01 comprimé	Matin : 01 comprimé	Matin : 01 comprimé
	Soir : 01 comprimé	Soir : 01 comprimé	Soir : 01 comprimé
15 – 25 kg	Matin: 02 comprimés	Matin : 02 comprimés	Matin : 02 comprimés
	Soir : 02 comprimés	Soir : 02 comprimés	Soir: 02 comprimés
25 – 34.9 kg	Matin: 03 comprimés	Matin : 03 comprimés	Matin : 03 comprimés
	Soir: 03 comprimés	Soir : 03 comprimés	Soir : 03 comprimés
≥35 Kg	Matin: 04 comprimés	Matin: 04 comprimés	Matin: 04 comprimés
	Soir: 04 comprimés	Soir: 04 comprimés	Soir: 04 comprimés

Tableau V : Régime de Traitement pour Amodiaquine-Artésunate.

Poids	Formulation	Dosage (comprimé /Jour) pour 3 Jours
<9 Kg	ASAQ Winthrop TM 25 mg/67,5 mg	01 comprimé
9-17.9Kg	ASAQ Winthrop TM 50 mg/135 mg	01 comprimé
18-35.9 Kg	ASAQ Winthrop TM 100 mg/270 mg	01 comprimé
≥36 Kg	ASAQ Winthrop TM 100 mg/270 mg	02 comprimés

IV.4. Analyses moléculaires.

IV.3.1 Extraction de l'ADN génomique de *Plasmodium*

L'ADN a été extrait à partir des confettis du jour 0 avant le traitement, et ceux du jour de parasitémie récurrente à l'aide du Mini kit QIAamp® DNA (Qiagen®) selon les instructions du fabricant.

Un volume de 100 microlitre d'extrait d'ADN était obtenu et conservé à +4°C. Cet extrait d'ADN nous a servi de produit de travail pour la réalisation des réactions d'amplification par PCR.

IV.3.2 Amplification des séquences spécifiques d'ADN

Nous avons utilisé la méthode de «Nested PCR» ou PCR nichée pour l'amplification des séquences d'ADN de *P. falciparum*. Cette variante de la PCR, consiste en une série de deux PCR au moyen de deux paires différentes d'amorces. Les fragments d'ADN amplifiés au cours de la première PCR contiennent les séquences qui seront appariées avec la deuxième paire d'amorces. Cette deuxième amplification dite «nichée» rend la technique très sensible.

Ces analyses PCR avaient deux composantes essentielles. Dans une première phase de notre travail nous avons étudié le polymorphisme génétique de *msp1* et *msp2* de *P. falciparum* pour la distinction entre les recrudescences et les nouvelles infections. Dans la deuxième étape de notre travail nous avons analysé la mutation N86Y du gène *Pfmdrl*.

IV.3.2.1 Détermination du polymorphisme génétique de *msp1* et *msp2*

- Mélange réactionnel et programme d'amplification de *msp1* et *msp2*

Pour *msp1* et *msp2*, les constituants (volume et concentration des réactifs) étaient identiques hormis les séquences des paires d'amorces. Les composants des mélanges réactionnels pour la première et la deuxième PCR de *msp1* et *msp2* sont présentés dans le Tableau VI. Le produit de la première amplification a servi de source d'ADN pour la deuxième amplification.

Tableau VI : Composition des mélanges réactionnels pour la première et la deuxième PCR pour l'amplification des *msp1* et *msp2*

Réactifs	Concentration de la solution mère	Concentration finale	Volume (µl) à prélever
H2O ultra pure			16,05
Primer sens	10µM	0,2µM	0,5
Primer anti sens	10µM	0,2µM	0,5
Buffer	10X	1X	2,5
dNTPs	2mM	200µM	2,5
MgCl2	50mM	1,5mM	0,75
Taq polymérase	5U/µl	1 unité	0,2
Extrait d'ADN			2,0
Volume final=25ul,			

Lors de la première PCR les couples d'amorces utilisés étaient : O1/O2 pour *msp1* et S2/S3 pour *msp2* et les amorces N1/N2, et S1/S4 ont été utilisés pour *msp1* et *msp2* respectivement au cours de la seconde PCR. Les 25 µl, contenus dans un micro tube stérile, ont été incubés dans

un thermocycler (Master cycler gradient) sous un programme spécifique à chaque gène (Tableau VII).

Tableau VII : Tableau récapitulatif des amorces et des programmes d'amplification des gènes *msp1* et *msp2*.

Gènes		Amorce et séquences (5'→3')	Programme d'amplification
<i>msp1</i>	1 ^{ère} amplification.	O1:5'CACATGAAAGTTATCAAGAACTIGTC3 O2:5'-GTACGTCTAATTCATTTGCACG 3	94°C x 3min;(94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x 30; 72°Cx 3min
	2 ^{ème} amplification.	N1:5'-GCAGTATTGACAGGTTATGG-3' N2: 5' -GATTGAAAGGTATTTGAC-3'	94°C x 3min;(94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x30; 72°Cx 3min
<i>msp2</i>	1 ^{ère} amplification.	S3:5'-GAAGGTAATTAAAACATTGTC-3' S2:5'-GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 42°C x 1min; 65°C x 2min,) x30; 72°Cx 3min
	2 ^{ème} amplification.	S1: 5' -GAGTATAAGGAGAAGTATG-3 S4 :5'-CTAGAACCATGCATATGTCC-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 1min; 70°C x 2min,) x30; 72°Cx 3min

- **Analyse des produits de la PCR nichée**

Les produits obtenus après la PCR nichée ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, mélangé à 5µl de bromure d'éthidium (5-éthyl-3,8-diamino-6-phénylphénanthidine). Dans les puits du gel placé dans une cuve à électrophorèse contenant un tampon TBE (Trizma Borie acid EDTA) 0.5X, 5µl de chaque produit de la PCR nichée a été déposé. L'électrophorèse a été réalisée à une intensité de 400mA sous une tension de 100 volts pendant 1 heure 30 minutes. Le bromure d'éthidium a la propriété de s'insérer entre les fragments des molécules d'ADN, et d'émettre une fluorescence à 622 nm quand il est excité aux rayons ultra- violets. Sous illumination ultra-violet, les fragments d'ADN apparaissent sous forme de bandes à des positions différentes sur le gel. Nous avons ensuite mesuré la taille des bandes après l'électrophorèse à l'aide du logiciel **photo-captMw (version11.02)**. Pour un même patient, nous avons comparé le nombre et la taille des bandes de fragments d'ADN du jour d'inclusion (J0) et du jour de parasitémie récurrente (Jr). Les résultats ont été exprimés en termes de recrudescence, nouvelle infection, ou indéterminé.

Tableau VIII : Exemple non exhaustif d'interprétation des gels

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

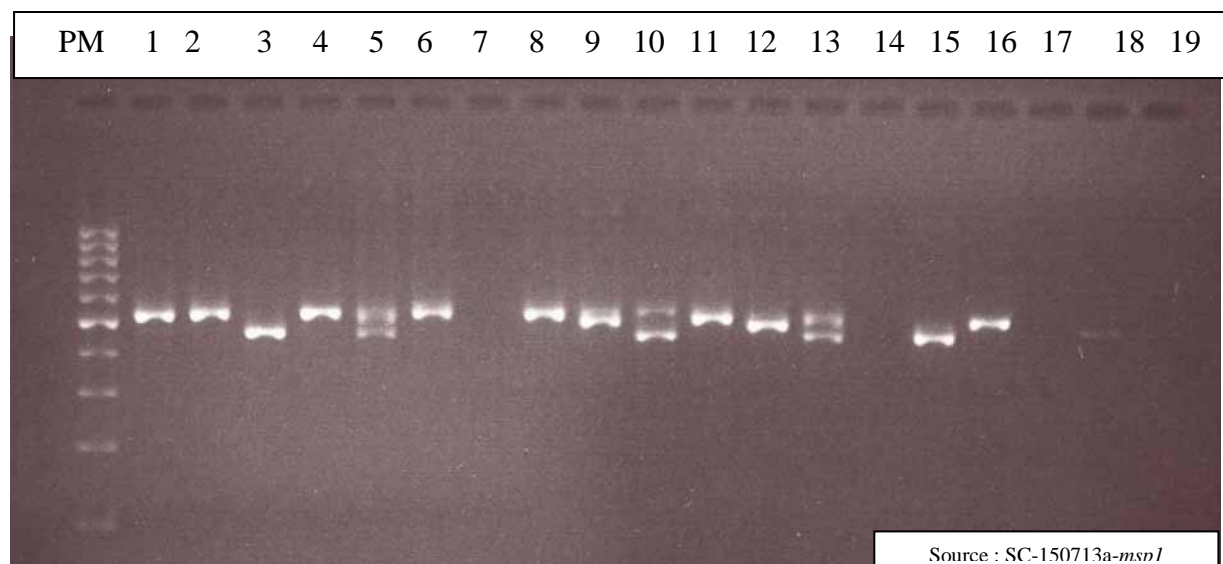


Photo 1: Profil électrophorétique de l'ADN : polymorphisme de *msp1* à J0 et Jr.

Source : SC-150713a-*msp1*

PM= marqueur de poids moléculaire 100pb ; 19=NTC (560 pb), 18=RO33. 17=MIX. 1(jo)-2(jr), 5(jo)-6(jr), 9(jo)-10(jr)=recrudescences. 3(jo)-4(jr), 11(jo)-12(jr), 15(jo)-16(jr)=nouvelles infections. 7(jo)-8(jr), 13(jo)-14(jr)=indéterminés.

IV.3.2.2 Génotypage des allèles du gène *Pfmdr1*-86

- **Amplification**

La détermination du statut sauvage ou mutant de l'allèle *Pfmdr1*-86, a été effectuée par la PCR nichée. Les amorces utilisées ainsi que les milieux réactionnels sont présentés dans les tableaux IX et X

Tableau IX : Mélange réactionnel pour la première et la deuxième série de PCR de *Pfmdr1*-86

Réactifs		Concentration de la solution mère	Concentration finale	Volume (en µl)
PCR1	H ₂ O			12,8
	Primer sens: MDR-A1	10µM	0,2µM	0,5
	Primer anti sens: MDR-A3	10µM	0,2µM	0,5
	Tampon	5X	1X	5
	dNTPs	2mM	200µM	2,5
	MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5
	Taq	5U/µL	1U	0,2
	Extrait d'ADN			2
	Volume final		25	
PCR2	H ₂ O			12,8
	Primer sens: MDR-A2	10µM	0,2µM	0,5
	Primer anti-sens: MDR-A4	10µM	0,2µM	0,5
	Tampon:	5X	1X	5
	dNTPs	2mM	200µM	2,5
	MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5
	Taq	5U/µL	1U	0,2
	Extrait d'ADN			2
	Volume final		25	

Tableau X : Programmes d'amplification et séquences des primers pour analyse de *Pfmdr1*-86

PCR <i>Pfmdr</i> -1 86	Primers (5'→3')	Programmes d'amplification
PCR1	MDR-A1:(30 bp) TGTTGAAAGATGGGTAAAGAGCAGAAAGAG	Dénaturation initiale 94°C x 2mn PCR 30 cycles ; 94°C x 1mn, 45°C x 1mn, 72°Cx 45s Élongation finale 72°Cx 5 mn Conservation à 4°C
	MDR-A3: (33 bp) TACTTTCTTATTACATATGACACCACAAACA	
PCR2	MDR-A4: (30 bp) AAAGATGGTAACCTCAGTATCAAAGAAGAG	Dénaturation initiale 94°C x 2mn PCR 30 cycles ; 94°C x 1mn, 52°C x 1mn, 72°Cx 45s Élongation finale 72°Cx 5 mn Conservation à 4°C
	MDR-A2: (33 bp) GTCAAACGTGCATTTTTTTATTAATGACCATTTA	

Comme témoins, nous avons utilisé l'ADN d'une souche sauvage 3D7 et celui d'une souche mutante DD2 qui ont été simultanément amplifiés avec les échantillons.

- **Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction et Electrophorèse du produit de la digestion**

La digestion des produits de la PCR nichée au point 86 a été faite avec l'enzyme de restriction Afl III, dont le site de restriction et la taille des fragments obtenus sont consignés dans le tableau (tableau XI).

Tableau XI : Tableau récapitulatif de la digestion enzymatique

Enzyme	Site de reconnaissance et de coupure.	Nombre et taille (en pb) des bandes des sauvages	Nombre et taille (en pb) des bandes des mutants
Afl III	5'...A/CRYGT...3' 3'...TGYRC/A...5'	Pas de coupure:560	2bandes:232, 328

Afin de digérer le produit de la PCR nichée, un mélange réactionnel a été préparé conformément aux indications du tableau XII et incubé à la température optimale de 37°C pendant 1 heure 30mn.

Tableau XII : Mélange réactionnel pour la digestion enzymatique au point 86

Réactifs	Concentration du stocke	Concentration finale	Volume à prélever (µl)
H2O			7,4
NEB3	10X	1X	2,0
BSA	100X	1X	0,2
Afl III (NEB)	5U/µL	2U	0,4
Produit de Nested PCR			10
Volume final= 20µl			

A l'issue de la digestion, 5µl du produit final a été déposé sur gel d'agarose 2 % contenant 5µl, de BET pour 100µl, de TBE 0,5X. L'électrophorèse a été réalisée à une intensité de 400 mA sous une tension de 90V pendant un temps de 1heure 30 minutes. Parallèlement à l'ADN issu des parasites des patients, un marqueur de poids 100pb et les témoins sauvages et mutants ont été migrés par électrophorèse pour l'interprétation des bandes. Le caractère sauvage, mutant ou mixte d'un échantillon a été déterminé en fonction de la taille de ses bandes par rapport à celles de DD2 et de 3D7, tout en se référant au marqueur de poids moléculaire.

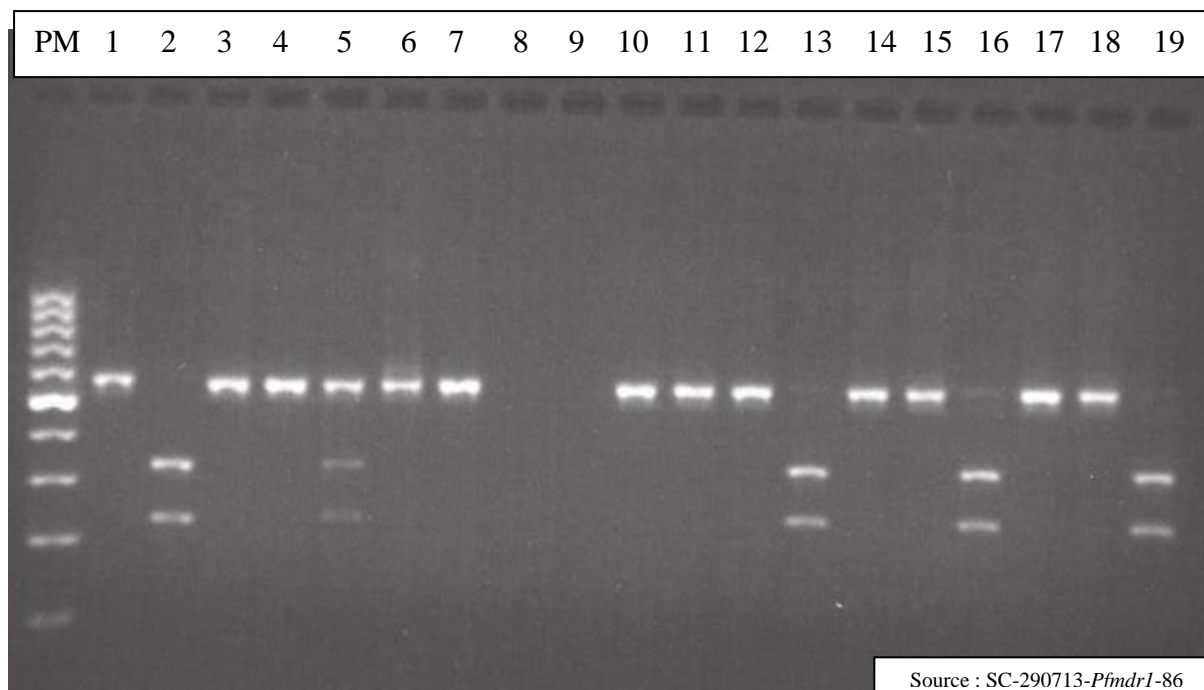


Photo 2: Profil électrophorétique de l'ADN après digestion pour la détection des allèles du gène *PfmDr1*-86.

PM: marqueur de poids moléculaire 100pb ; 1=3D7 (560 pb) : contrôle sauvage ; 2=DD2 (232 et 328 pb): contrôle mutant. 3,4,6,7,10,11,12,14,15,17,18=souches sauvages. 5=mixte. 13,16,19= souches mutantes. 8=NTC. 9=MIX.

IV.4. Analyse des données et interprétation des résultats

Les données ont été saisies sur le logiciel Microsoft Excel version 2007 et analysées avec le logiciel Epi Info7 (version 7.1.3.10). Le test de Chi2 a été utilisé pour comparer les variables catégorielles et mesurer leur association avec un niveau de significativité de 5% ($p < 0,05$).

Les résultats de l'efficacité thérapeutique ont été présentés en terme de:

Échec thérapeutique précoce (ETP) :

- apparition de signes de danger ou de paludisme grave aux jours 1, 2 ou 3, en présence d'une parasitémie ;
- parasitémie au jour 2 supérieure à celle du jour 0, quelle que soit la température axillaire ;
- parasitémie au jour 3, et température axillaire supérieure ou égale à 37,5 °C ;
- parasitémie au jour 3 dépassant d'au moins 25 % celle du jour 0 [81].

Échec thérapeutique tardif (ETT) divisé en :

a) échec clinique tardif (ECT) :

- apparition de signes de danger ou de paludisme grave après le jour 3 en présence d'une parasitémie, en l'absence préalable de tout critère d'échec thérapeutique précoce ;
- présence d'une parasitémie et d'une température axillaire supérieure ou égale à 37,5 C un jour quelconque entre le jour 4 et le jour 14 ou 28, en l'absence préalable de tout critère d'ETP [81].

b) *échec parasitologique tardif (EPT) :*

- présence d'une parasitémie au jour 14 ou 28 et température axillaire inférieure à 37,5 C, en l'absence préalable de tout critère d'ETP ou d'ECT.

Le taux d'échec thérapeutique constitue la somme des ETP et des ETT rapportés à l'ensemble de l'échantillon [81].

Réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) :

Absence de parasitémie au jour 14 ou 28, quelle que soit la température axillaire, en l'absence préalable de tout critère d'ETP, d'ECT ou d'EPT. Dans les estimations ajustées, les patients qui auront une réapparition tardive de parasite (avec ou sans fièvre) seront considérés comme RCPA si l'analyse de la PCR montre une nouvelle infection plutôt qu'une recrudescence [81].

RESULTATS

V RESULTATS

V.1 Caractéristiques générales de la population d'étude.

Au cours de cette étude, cent cinquante (150) patients ont été inclus. Au terme du suivi de 28 jours nous avons enregistré 2 perdus de vue. Parmi les 148 patients ayant terminé le suivi, soixante-treize (73) ont reçu la combinaison AL, et soixante-quinze (75) la combinaison ASAQ. Le tableau XIII résume les caractéristiques démographiques et cliniques des patients des deux groupes de traitement au jour d'inclusion. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes de traitement ($p > 0,05$).

Tableau XIII : Caractéristiques démographiques et cliniques des deux groupes de traitement n(%)

	Groupe AL (N=75)	Groupe ASAQ (N=75)	<i>P value</i>
Sexe ratio (M/F)	1,02	1,20	0,62
Age (mois)			
Moyenne (écart type)	40,47(28,36)	37,76(30,15)	
Extrêmes	12-120	12-144	0,57
Température (°C)			
Moyenne (écart type)	36,65(0,47)	36,60(0,52)	0,52
Extrêmes	35,9-38,0	35,6-38,3	
Densité Parasitaire à J0			
Moyenne Géométrique	47659,07	50762,52	0,67
Etendu	2246,0-197500	2019-182500	
Poids à J0 (en kg)			
Moyenne (écart type)	12,55(5,40)	12,01(5,15)	0,53
Etendu	5,10-32,0	5,80-34,0	
Taux de gamétocyte			
Moyenne	48,06	61,46	0,82

V.2 Résultats cliniques et parasitologiques

Le tableau XIV présente la réponse au traitement des 148 patients qui ont terminé leur suivi de 28 jours. Les taux d'échecs thérapeutiques bruts (avant correction par la PCR) étaient de 38,35% et de 16,00% pour AL et ASAQ respectivement. La différence entre ces 2 taux était statistiquement significative [OR =1,79; IC 95%(0,90 - 3,58)] $P=0,005$. Après correction par la PCR (*msp1/msp2*), les taux d'échecs étaient de 12,33% et 0% pour AL et ASAQ respectivement. Là également, la différence observée entre ces 2 taux était statistiquement significative [OR=5,73 ; IC 95% (1,33 – 39,72)] $P=0,001$.

Tableau XIV : Réponse au traitement par AL et ASAQ avant et après correction par PCR [% (n/N)]

		AL (N=73)		ASAQ (N=75)		<i>P value</i>
		ETT	RCPA	ETT	RCPA	
Classification corrigée par la PCR	non	38,98 (27/73)	61,64 (45/73)	12 (9/75)	84 (63/75)	0,0052
Classification par la PCR	corrigée	12,33 (9/73)	87,67 (64/73)	0	100 (75/75)	0,001

V.3 Fréquence des mutations du point 86 du gène *Pfmdr1*.

Les 150 échantillons prélevés au jour d'inclusion avant l'administration du traitement (J0), ont été analysés par la PCR. Les analyses moléculaires ont été réalisées avec succès sur tous les 150 (100%) confettis collectés. La fréquence de l'allèle mutant *Pfmdr1*-Y86 (constitué des purs mutants et de 12 allèles mixtes) était de 18,67% [IC 95% (12,78-25,84)], et celle de l'allèle sauvage *Pfmdr1*-86N était de 81,33% [IC 95% (74,16-87,22)].

V.4 Fréquence des allèles du *Pfmdr1*-86 dans chaque bras (AL & ASAQ)

Au jour d'inclusion avant l'administration du traitement (J0), l'allèle sauvage *Pfmdr1*-86N était représenté à une fréquence de 82,67% et 80% dans le groupe AL et ASAQ respectivement. L'allèle mutant a été observé à une fréquence de 20% dans le groupe ASAQ, contre 17,33% dans le groupe AL (tableau XV). Avant donc la prise du traitement les fréquences des différents allèles (sauvage et mutant) étaient similaires dans les deux groupes de traitement (Chi2=0,176 ; p=0,675).

Après traitement, la fréquence de l'allèle mutant était plus élevée dans le groupe ASAQ qu'avant traitement. Mais la différence observée n'était pas statistiquement significative (15/75 :20% contre 4/9 : 44,4% ; p= 0,20). L'allèle sauvage a été le seul retrouvé après traitement avec AL. Sa fréquence a significativement augmenté dans les échantillons de post traitement en passant de 82,6% avant le traitement (62/75) à 100% (27/27) en post-traitement (p<0,05) (tableau XV).

Tableau XV : Proportion des mutants dans la population avant et après traitement

<u>Génotypes</u>	pré traitement		post traitement	
	AL (n=75)	ASAQ (n=75)	AL (n=27)	ASAQ (n=9)
Mutant	17,33 (13/75)	20 (15/75)	0	44,40 (4/9)
Sauvage	82,67 (62/75)	80 (60/75)	100 (27/27)	55,60 (5/9)

V.5 Relation entre les mutations du point 86 du gène *Pfmdr1* et la réponse au traitement.

Pour étudier la relation entre la mutation N86Y du gène *Pfmdr1* et la réponse au traitement, nous avons déterminé la fréquence des allèles sauvages et mutants du *Pfmdr1* dans le groupe des patients ayant montré une RCPA et dans le groupe de patients classés comme recrudescant. Dans le bras AL, nos résultats indiquent une fréquence de 85,94% et de 14,06% pour l'allèle sauvage et mutant respectivement dans la population des RCPA (tableau XVI). Ces valeurs étaient de 66,67% et de 33,33% dans le groupe de patients où un échec au traitement a été observé.

Pour ce qui est de la relation entre la réponse au traitement avec ASAQ et la présence des différents allèles du gène *Pfmdr1*-86, nous n'avons pas pu établir cette relation du fait que tous les patients de ce groupe ont montré une RCPA.

Tableau XVI : Association entre mutation *Pfmdr1*-N86Y et la réponse au traitement

	AL		ASAQ	
	ETT (n=9)	RCPA (n=64)	ETT (n=0)	RCPA (n=75)
Mutant	33,33 (3/9)	14,06 (9/64)	0	20 (15/75)
Sauvage	66,67 (6/9)	85,94 (55/64)	0	80 (60/75)

DISCUSSION

VI. DISCUSSION

Le but de cette étude était de déterminer d'une part l'efficacité de la combinaison ASAQ et AL et d'autre part étudier la relation entre la mutation N86Y du gène *Pfmdr1* et la réponse au traitement.

VI.1. De l'efficacité de ASAQ et AL

A l'issu des 28 jours de suivi nos résultats ont montré que la combinaison ASAQ était encore très efficace pour le traitement du paludisme simple dans notre zone d'étude. Cependant nous notons une baisse d'efficacité de la combinaison AL comparativement aux résultats des études antérieures [26; 67; 86]. D'autres auteurs, optant pour les même conditions d'administration des traitements (c'est à dire la prise observée des traitements), ont rapporté des taux de guérison comparables aux nôtres pour ASAQ [24; 41; 68]. Cela corrobore les hypothèses selon lesquelles le respect des prescriptions médicales (posologies et modes d'administration), dans le cadre du traitement du paludisme simple peut contribuer à garantir l'efficacité des CTA et à retarder ainsi l'émergence et la propagation des souches de *Plasmodium* résistantes. Nos résultats confirment également ceux rapportés par **TINTO et al** au cours d'une étude réalisée sur le même site et qui alertait déjà sur une baisse d'efficacité des deux combinaisons [77]. Si pour ASAQ nous avons rapporté une efficacité meilleure, la tendance à la baisse se confirme pour AL qui est en dessous du seuil critique de taux d'efficacité de 90% recommandé par l'Organisation mondiale de la Santé [81]. Ces résultats sont surprenants car toutes les études conduites jusqu'à ce jour sur l'efficacité comparée de ces deux combinaisons ont toujours rapporté une efficacité similaire des deux combinaisons après correction par la PCR [12; 67; 68; 75; 77]. L'une des hypothèses pouvant être évoquée pour expliquer la faible efficacité de AL pourrait être la taille très réduite de notre échantillon qui était de 75 patients par bras contre 167 patients par bras dans l'étude de **TINTO et al**. [75]. La deuxième hypothèse possible est le fait que la prise du traitement était supervisée dans notre étude alors qu'elle ne l'était pas dans l'étude de **TINTO et al**. En effet lorsque l'administration des traitements n'est pas supervisée, il ya un risque de sous-dosage des traitements ou de traitements inachevés, surtout lorsque le patient se sent guérit. Toutefois si toutes ces deux hypothèses étaient plausibles, cette baisse de l'efficacité devait concerner aussi bien AL que ASAQ. Nous pensons donc qu'il y a probablement une baisse de sensibilité du parasite à la combinaison AL au Burkina Faso. Ces résultats en ce qui concerne AL, semblent confirmer les résultats *ex vivo* publiés en 2014 par **TINTO et al**, et qui rapportait

une baisse de sensibilité à la luméfantrine ainsi que les résultats d'une étude conduite au Kenya qui rapportait un début de baisse de sensibilité des souches de *P. falciparum* aux CTA en Afrique [14; 74]. Ces résultats sont inquiétants car au Burkina Faso, AL est le traitement alternatif lorsque ASAQ n'est pas accessible. Cela devra interpeller les autorités nationales sur la nécessité de conduire des études similaires dans tous les facies épidémiologiques du Burkina Faso afin de confirmer nos résultats et de proposer si besoin en était, d'autres traitements alternatifs comme les combinaisons Dihydro artémisinine-Pipéraquine ou Méfloquine-Artesunate qui sont des médicaments également enregistrés au Burkina Faso.

VI.2 De la fréquence des mutations au point 86 du gène *Pfmdr1*.

Cette étude nous a permis de déterminer la fréquence des mutations du point 86 du gène *Pfmdr1* de *P. falciparum*. Nous avons trouvé une fréquence élevée (81,33%) de l'allèle sauvage *Pfmdr1*-N86 dans la population. Cette valeur est supérieure à celle de 65,64% observée par DA au cours d'une étude conduite au Burkina Faso en 2008 [17]. Nous pouvons dire que la population de *P. falciparum* au moment de l'étude de DA subissait probablement plus de pression médicamenteuse liée à l'utilisation en son temps de la CQ et de l'AQ en monothérapie. Par contre, notre étude s'est déroulée sept ans après l'adoption des CTA comme médicaments de première ligne pour la prise en charge du paludisme simple à *P. falciparum* au Burkina-Faso et on pourrait penser qu'il y a eu progressivement une réémergence des souches sauvages sensibles après le retrait de la CQ.

Cela nous conduit à avancer l'hypothèse d'une possibilité de réintroduction de la CQ au Burkina Faso surtout comme traitement alternatif dans un contexte où une diminution de la sensibilité aux CTA est de plus en plus rapportée. Cette hypothèse est également évoquée au Malawi où Neuf ans après le retrait de la CQ et son remplacement par la Sulfadoxine-Pyriméthame, aucune souche chloroquino-résistante ne circulait plus [42].

Pour la mutation *Pfmdr1*-86Y nous avons rapporté une fréquence de 18,67%. FALL et al avaient rapporté des résultats similaires (14,90%) au cours d'une étude menée en 2010, (5 ans après l'adoption des CTA) au Sénégal [27]. Par contre cette fréquence était inférieure à celle qui avait été rapportée par DA en 2008 au Burkina Faso qui était de 34,36% [17]. La mutation *Pfmdr1*-86Y étant le plus souvent associée à la résistance à la CQ et à l'AQ [69; 76], cette baisse de fréquence de l'allèle *Pfmdr1*-86Y que nous avons observé pourrait soutenir l'hypothèse que nous avons mentionné plus haut, qui stipule un retour de souches sensibles à la CQ au Burkina Faso. Ainsi donc, la baisse de la fréquence de l'allèle *Pfmdr1*-86Y serait

due à la diminution au fil des années de la pression de sélection de cette mutation exercée par la CQ. En effet, au Sénégal, **FRÖBERGET et al. en 2012**, ainsi que **FALL et al. en 2013** ont également observé une baisse de fréquence de l'allèle mutant après plusieurs années d'utilisation de ASAQ comme médicament de première ligne pour le traitement du paludisme simple [27; 31]. Le même constat a été fait au Kenya par **EYASE et al.**, quatre(4) ans après le déploiement des CTA dans le pays [25].

VI.3 De l'impact du traitement sur la sélection de souches mutantes

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les fréquences des allèles (sauvages et mutants) du gène *Pfmdr1*-86 des 2 groupes à J0 avant l'administration des traitements. Après administration de la combinaison AL nous avons noté une sélection des allèles sauvages. D'autres études, avec des fréquences de pré-traitement et de post traitement différentes des nôtres ont constaté la sélection des allèles sauvages lors des traitements avec AL. Cela a conduit ces auteurs à émettre l'hypothèse selon laquelle il y aurait une relation entre la présence de l'allèle sauvage du gène *Pfmdr1*-86 et les échecs au traitement avec la combinaison AL [21; 36; 42; 70].

Nous avons observé une sélection des mutants *Pfmdr1*-86Y dans le groupe ASAQ qui étaient plus élevés dans le post-traitement que dans les échantillons de prétraitement. Même si cette différence n'était pas statistiquement significative du fait sans doute de la faiblesse de notre échantillon. Elle corrobore les hypothèses émises par plusieurs auteurs qui pensent que cette sélection découlerait d'une possible résistance croisée due à une similarité de structure entre la CQ et l'AQ, une composante de l'ASAQ [6; 56; 76].

VI.4. De la relation entre les mutations du point 86 du gène *Pfmdr1* et la réponse au traitement.

Nous avons observé une variation de la fréquence des allèles sauvages et mutants du *Pfmdr1*-86 dans le groupe de patients traités avec AL et classés comme RCPA comparativement à ceux classés comme ETT, mais cette différence n'était pas statistiquement significative. On pourrait dire alors que l'issue du traitement avec AL n'est pas influencée par le fait que les parasites hébergés par le patient soient du type sauvage ou mutant au niveau du gène *Pfmdr1*-86. La présence de souches mutantes ne signifie donc pas que le traitement avec AL ne sera pas efficace.

Quant à la relation avec l'ASAQ, notre étude ne nous permettait pas de l'établir du fait qu'aucun cas d'échec au traitement n'a été observé après correction par la PCR. Nous expliquons cela par le fait que la taille de notre échantillon était faible, ce qui constitue d'ailleurs une des limites de notre étude. Nous n'avons donc pas observé de relation entre la réponse au traitement et la présence des mutations *Pfmdr1*-86Y. Cependant, plusieurs publications ont rapporté une relation entre cette mutation et la résistance à l'AQ [34; 76]. Toutefois il a été démontré que des souches mutantes *Pfmdr1*-86Y bien que présentant des échecs à l'AQ étaient sensibles à la combinaison ASAQ [36; 56]. Nos résultats corroborent cette observation car malgré la présence de la mutation dans la population prétraitement, nous avons obtenu 100% de RCPA après correction par la PCR. Une autre hypothèse qui pourrait expliquer l'absence de cette association est l'effet de l'immunité. En effet comme mentionné plus haut, l'immunité (humorale ou cellulaire) agit de manière similaire aussi bien sur les isolats sensibles que résistants à un médicament [45; 71]. Dans une zone à transmission stable, le degré d'immunité de la population est élevé et les mutants résistants qui échappent à l'action du médicament peuvent être éliminés par les facteurs de l'immunité. Si le niveau d'immunité n'est pas suffisant (sujets expatriés, jeunes enfants non encore immunisés, adultes en état de déficit immunitaire), les mutants résistants se multiplieront et engendreront des manifestations cliniques [4].

CONCLUSION

CONCLUSION

Cette étude a montré que la combinaison ASAQ est toujours efficace comme médicament de première ligne pour le traitement de paludisme simple à *P. falciparum* dans cette région du Burkina Faso. Toutefois, nous notons une baisse d'efficacité de la combinaison AL comparativement aux résultats des études antérieures [67; 75]. Ces résultats sont inquiétants et devront inciter les autorités nationales du Burkina Faso à conduire des études similaires dans tous les faciès épidémiologiques du Burkina Faso afin de confirmer nos résultats et de proposer si besoin en était, d'autres traitements alternatifs. Nous avons observé l'allèle sauvage *Pfmdr1*-N86 à une fréquence plus importante que la mutation *Pfmdr1*-86Y. L'allèle sauvage a été majoritairement retrouvé au cours des réinfections dans le groupe AL où nous avons observé un fort taux de réinfections. Cependant nous n'avons pas pu établir de relation entre les différents allèles et la réponse au traitement avec ASAQ, liée sans doute à la faible taille de notre échantillon. Nous n'avons pas observé de relation entre les différents allèles et la réponse au traitement avec AL. Une étude similaire avec une taille d'échantillon plus importante combinée à un dosage du médicament dans le sang devra être initiée afin de mieux explorer le rôle de ce gène dans l'efficacité des traitements avec les deux combinaisons étudiées.

PERSPECTIVES

Pour les études ultérieures, il sera nécessaire de procéder à la détermination du polymorphisme des autres mutations ponctuelles du gène *Pfmdr1* avec un échantillon plus grand afin de compléter les résultats de la présente étude et d'avoir des données plus exhaustives pour une meilleure explication de la baisse de sensibilité à AL .

REFERENCES

REFERENCES

1. **Adjuik M Agnamey P, Babiker A et al.** Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomised, multicentre trial. . *Lancet* 2002 359:1365-72.
2. **Alemu et al.** *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* in North-West Ethiopia. *Malaria Journal* 2013 12:346
3. **Ariey F., Witkowski B., Amaratunga C., Beghain J., Langlois A. C., Khim N., et al** A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2014 505:50-5
4. **Artavanis-Tsakonas K. Tongren J.E., Riley E.M.,** The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* 2003 133:145-52
5. **Aubry P.** La lettre d'information du diplôme et de la capacité de médecine tropicale des pays de l'Océan indien. www.medicinetropicale.free.fr Date de dernière consultation : 22/02/14 2006
6. **Baliraine F.N., Rosenthal P.J.** Prolonged selection of *pfmdr1* polymorphisms after treatment of falciparum malaria with artemether-lumefantrine in Uganda. *J Infect Dis* 2011 204:1120-4
7. **Basco L.K. Ruggere C., Le Bras J.** Molécules antipaludiques, mécanismes d'action, mécanismes de résistance, relations structure-activité des schizonticides sanguins. *Paris Masson* 1994:364
8. **Basco LK Ringwald P.** Analysis of the key *pfprt* point mutation and *in vitro* and *in vivo* response to chloroquine in Yaounde, Cameroon. . *J Infect Dis* 2001 183:1828-31
9. **Bauffe F. Desplans J., Fraissier C., and Parzy D.,** Real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* in the Ivory Coast and in the Comoros Islands. *Malaria Journal* 2012 11
10. **Bertaux L Quang Le H, Sinou V, et al.** New *PfATP6* mutations found in *Plasmodium falciparum* isolates from Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 53:4570-1
11. **Bhisutthibhan J Pan XQ, Hossler PA, et al.** The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J Biol Chem* 1998 273:16192-8
12. **Biebo B.** Etude comparée de l'efficacité de la combinaison Arthemether-Lumefantrine versus Artesunate-Amodiaquine dans le traitement du paludisme simple à *Plasmodium*

falciparum chez les enfants de 6 à 59 mois à Nanoro (Burkina Faso). *Université de Ouagadougou*. Thèse de Médecine, mai 2009

13. Bjorkman A Phillips-Howard PA. Drug-resistant malaria: mechanisms of development and inferences for malaria control. . *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990 84:323-4

14. Borrmann S. Sasi P., Mwai L., Bashraheil M., Abdallah A., Muriithi S., et al., Declining responsiveness of *Plasmodium falciparum* infections to artemisinin-based combination treatments on the Kenyan coast. *PLoS ONE* 2011 6:e26005

15. Chabasse D. Miegerville M. Enseignement de parasitologie et mycologie. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. <http://www.uvp5.univ-paris5.fr/campus-parasitologie> 3e édition (septembre 2007)

16. Cox-singh. et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life-threatening. *Clin Infect Dis*. 2008 January 15 46:165-71

17. Da D.F.Y. Etude de la relation entre les mutations du gène *Pfmdr-1* de *Plasmodium falciparum* et la réponse au traitement avec deux combinaisons à base d'artémisinine. Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, 2008. 38 pp.

18. Dabiré K.R. Balde T.T., Diabaté A., Dia I., Costantini C., Cohuet A., et al. *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a Humid Savannah Area of Western Burkina-Faso: Bionomics, Insecticide Resistance Status, and Role in Malaria Transmission. . *Journal of medical entomology*. 2007 44:990-7

19. Diabaté A. Brengues C., Balde T.T., Dabiré K.R., Hougard J.M., et al. The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Tropical Medicine and International Health*. 2004 9:1267-73

20. Djimdé A Doumbo OK, Cortese JF, et al. Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *Lancet* 2001 358:890-1

21. Dokomajilar C. et al. Roles of specific *Plasmodium falciparum* mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine- pyrimethamine in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006 75:162-5

22. Dondorp A Nosten F, Yi P, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. . *N Engl J Med* 2009 361:455-67

23. Dugue M. Consommables et produits non médicaux pour le paludisme.

24. Espié E. Lima A., Atua B., Dhorda M., Flévaud L., Sompwe E.M., et al. Efficacy of fixed-dose combination artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine for

uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Democratic Republic of Congo: a randomized non-inferiority trial. *Malaria Journal* 2012 11:174

25. Eyase F. L., Akala H. M., Ingasia L., Cheruiyot A., Omondi A., Okudo C., et al The role of *Pfmdr1* and *Pfprt* in changing chloroquine, amodiaquine, mefloquine and lumefantrine susceptibility in western-Kenya *P. falciparum* samples during 2008-2011. *PLoS ONE* 2013 8:e64299

26. Falade C. O., Ogundele A. O., Yusuf B. O., Ademowo O. G., Ladipo S. M. High efficacy of two artemisinin-based combinations (artemether-lumefantrine and artesunate plus amodiaquine) for acute uncomplicated malaria in Ibadan, Nigeria. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 2008 13:635-43

27. Fall B. Pascual A., Sarr F.D., Wurtz N., Richard V., Baret E., et al., *Plasmodium falciparum* susceptibility to antimalarial drugs in Dakar, Senegal, in 2010: an *ex vivo* and drug resistance molecular markers study. *Malaria Journal* 2013 12:107

28. Fidock DA Nomura T, Talley AK, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *PfCRT* and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000 6:861-71

29. Filler S. Causer L.M., Newman R.D., Barber A.M., Roberts J.M., et al., Malaria surveillance-united states. *MMWR Surveill Summ* 2003 52:1-14

30. Foote S.J. Kyle D.E, Martin R.K, et al. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1990 345:255-8

31. Fröberget G. et al. Decreased prevalence of *Plasmodium falciparum* resistance markers to amodiaquine despite its wide scale use as ACT partner drug in Zanzibar. *Malaria Journal* 2012 11:321

32. Golvan Y.J. *Éléments de parasitologie médicale.* 1983. pp 571.

33. Hance P. Garnotel E., De Pina J.J., et al. Tests immunochromato-graphiques rapides de détection du paludisme, principes et stratégies d'utilisation. . *Med. Trop.* 2005 65:389-93

34. Happi CT Gbotosho GO, Folarin OA, et al. Association between mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and *P. falciparum* multidrug resistance 1 genes and *in vivo* amodiaquine resistance in *P. falciparum* malaria-infected children in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 2006 75:155-61

35. Holmgren G. Gil J.P., Ferreira P.M., Veiga M.I., Obonyo CO., Björkman A., Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria *in vivo* is associated with selection of *Pfprt* 76T and *Pfmdr1* 86Y. *Infect Genet Evol.* 2006 6:309-14

36. **Humphreys G. S., Merinopoulos I., Ahmed J., Whitty C. J., Mutabingwa T. K., Sutherland C. J., et al** Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 51:991-7
37. **Imbert P. Banerje E, A., .** 2002. Paludisme de l'enfant. In *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, p. 24. 4-320-A-20 – 8-507-A-30.
38. **Jambou R Legrand E, Niang M, et al.** Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type *PfATPase6*. *Lancet* 2005 366:1960-3
39. **Jambou R Martinelli A, Pinto J, et al.** Geographic structuring of the *Plasmodium falciparum* Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (*PfSERCA*) gene diversity. . *PlosOne* 2010 5:9424
40. **Johnson DJ Fidock DA, Mungthin M, et al.** Evidence for a central role for *PfCRT* in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Mol Cell* 2004 15:867-77
41. **Kamugisha E. Jing S., Minde M., Kataraihya J., Kongola G., Kironde F., et al.,** Efficacy of artemether-lumefantrine in treatment of malaria among under-fives and prevalence of drug resistance markers in Igombe- Mwanza, north-western Tanzania. *Malaria Journal* 2012 11:58
42. **Kublin JG Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RAG, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimdé AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe C V.,** Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *The Journal of Infectious Diseases* 2003 187:1870-5
43. **Lavigne J-P. Jeandrot A., Sotto A.** Les tests rapides de diagnostic des infections virales et parasitaires. *Spectra Biologie* Avril 2006.
44. **Legrand E Vojney B, Meynard JB, et al.** Resistance to dihydroartemisinin. *Emerg Infect Dis* 2007 13:808-9
45. **Leri O. Perinelli P., Losi T., Mastropasqua M. et al.** Malaria: recent immunological acquisitions and therapeutic prospects. *Clin Ter.* 1997 148:655-65
46. **Malvy D. Djossou F., Thiebaut R., et al. .** 2000. Plasmodies-malaria : formes cliniques, diagnostique. In *Encycl Med Chir Maladies infectieuses*
47. **Martensson A Strömberg J, Sisowath C, Msellem MI, Gil JP, Montgomery SM, et al.** Efficacy of artesunate plus amodiaquine versus that of artemether-lumefantrine for the

treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania. . *Clin Infect Dis*. 2005 41:1079-86.

48. Merritt A. Ewald D., Van den hurk A.F., Stephen S., Langrell J. Malaria acquired in the Torres Strait. *Commun Dis Intell*. 1998 22:1-2

49. Ministère de la santé. Plan stratégique de lutte contre le paludisme 2006-2010. Mars 2007. pp 26. Burkina-Faso. 80 pp.

50. Ministère de la Sante. Burkina Faso. Annuaire statistique 2012 Mai 2013:193-209

51. Ministère de la Santé. Burkina Faso. Manuel de formation pour la prise en charge du paludisme au niveau du district. . Mai 2005:88

52. Ministère de la Sante/PNLP. Directives Nationales pour la prise en charge du paludisme au Burkina Faso. 2006

53. Noedel H Se Y, Schaecher K, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. . *N Engl J Med* 2008 359:2619-20

54. Noedel H. Artemisinin resistance: how can we find it? *Trends in Parasitol* 2005 21:404-5

55. Nosten F. van-Vugt M., Price R., et al. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. *Lancet* 2000 356:297-302.

56. Nsohya S. L., Dokomajilar C., Joloba M., Dorsey G., Rosenthal P. J. Resistance-mediating *Plasmodium falciparum* *Pfcr* and *Pfmdr1* alleles after treatment with artesunate-amodiaquine in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 51:3023-5

57. OMS Bilan des résultats d'évaluation des produits par l'OMS :Performance des tests de diagnostic rapide du paludisme. 2011:1-12

58. OMS Newsdesk. *Lancet Infect Dis* 2009 9:147

59. OMS severe falciparum malaria. . *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2000 94:90

60. Pova M. Adagu I.S., Oliveira S.G., Machado R.L.D., Miles M.A. and Warhurst D.C., *Pfmdr1* Asn1042Asp1246Tyr Polymorphisms, Thought to Be Associated with Chloroquine Resistance, Are Present in Chloroquine-Resistant and -Sensitive Brazilian Field Isolates of *Plasmodium falciparum*. *Experimental Parasitology* 1998 88:64-8

61. Reed M.B. Saliba K.J., Caruana S.R., Kirk K., and Cowman A.F., Pgh1 modulates sensibility and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. . *Nature* 2000 403:906- 09

62. Robert V. & Boudin C. Biology of man-mosquito *Plasmodium* transmission. *Bull Soc Path Exo* 2003 96:6-20

- 63. Rogier C.; Henry M-C. Trape J-F.** Evaluation épidémiologique du paludisme en zone d'endémie. *Med Trop* 2009 69:13-142
- 64. Sabbatani S. Fiorino S., Manfredi R., et al.** The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern? *Braz J Infect Dis* 2010 14:299-309
- 65. Sakihama N. Nakamurab M., Palanca Jr.c A.A.; Argubanoc R.A., et al.** Allelic diversity in the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium falciparum* on Palawan Island, the Philippines. *Parasitology International* 2007 56:185-94
- 66. Sanchez CP McLean JE, Stein W, et al.** Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry* 2004 43:16365-73
- 67. Siribie M., Diarra A., Tiono A. B., Soulama I., Sirima S. B.** Efficacy of artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated malaria in children living in a rural area of Burkina Faso in 2009. *Bull Soc Pathol Exot* 2012 105:202-7
- 68. Sirima S. B., Tiono A. B., Gansane A., Diarra A., Ouedraogo A., Konate A. T., et al** The efficacy and safety of a new fixed-dose combination of amodiaquine and artesunate in young African children with acute uncomplicated *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 2009 8:48
- 69. Sisowath C. Ferreira P.F., Bustamante L.Y., Dahlström S., et al.** The role of *Pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. *Trop. Med. and Int. Health* 2007 12:736-42
- 70. Sisowath C. Stromberg J., Mårtensson A., Msellem M., Obondo C., Björkman A., Gil J.P.,** *In vivo* selection of *Plasmodium falciparum* *Pfmdr1* 86 N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). *J Infect Dis* 2005 191:1014-7
- 71. Smith T.G. Ayi K., Serghides L., McAllister C.D., Kai K.C.,** Innate immunity to malaria caused by *P. falciparum*. *Clin Invest Med.* 2002 25:262-72
- 72. Snounou G. Viriyakosoln S., Zxu X.P., et al.** High sensitivity detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular. Biochemiq and parasitology.* 1993 1993 61:315-20
- 73. Sutherland C.J. Tanomsing N., Nolder D., Oguike M., Jennison C., et al.** Two Nonrecombining Sympatric Formsof the Human Malaria Parasite *Plasmodium ovale* Occur Globally. *The Journal of Infectious Diseases* 2010 201:1544-50.
- 74. Tinto H. Bonkian L.N., Nana L.A., Yerbanga I., Lingani M., Kazienga A., Valéa I, Hermann Sorgho H., et al.** *Ex vivo* anti-malarial drugs sensitivity profile of *Plasmodium falciparum* field isolates from Burkina Faso five years after the national policy change. *Malaria Journal* 2014 13:207

- 75. Tinto H., Diallo S., Zongo I., Guiraud I., Valea I., Kazienga A., et al** Effectiveness of artesunate-amodiaquine vs. artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Nanoro, Burkina Faso: a non-inferiority randomised trial. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 2014 19:469-75
- 76. Tinto H., Guekoun L., Zongo I., Guiguemde R. T., D'Alessandro U., Ouedraogo J. B.** Chloroquine-resistance molecular markers (*Pfcr* T76 and *Pfmdr-1* Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 2008 13:238-40
- 77. Tinto H. Zongo I., Niekima R., Da D.F., Kpoda H., et al.** Etude de l'efficacité thérapeutique des combinaisons artésunate+ amodiaquine versus Artéméther-luméfamtrine en prise non supervisée dans le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* au Burkina Faso. *Science et technique* Janvier-décembre 2012 35:103-17
- 78. Wernsdorfer W.H. et al.** Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica* 1994 56
- 79. White N.J.** Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. *Parasitologia* 1999 41:301-8
- 80. White N.J.** *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clinical Infectious Diseases* 2008 46:172-3
- 81. WHO.** Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria. 2003:62
- 82. WHO.** Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. *Report of a WHO Scientific Group.: World Health Organization* 1973
- 83. WHO.** Resistance of malaria parasites to drugs. *World Health Organization* 1965
- 84. WHO.** World malaria report. 2013
- 85. Yang YZ Little B, Meshnick SR.** Alkylation of proteins by artemisinin. *Biochem Pharmacol* 1994 48:569-74
- 86. Zongo I., Dorsey G., Rouamba N., Dokomajilar C., Sere Y., Rosenthal P. J., et al** Randomized comparison of amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine, artemether-lumefantrine, and dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Burkina Faso. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2007 45:1453-61