

Université Cheikh Anta Diop de Dakar



Faculté des Sciences et Techniques
Département de Biologie Animale

Année : 2019

Numéro : 514

Surveillance des marqueurs moléculaires de *Plasmodium falciparum* associés à la résistance aux molécules antipaludiques dans la région de Kédougou (Sénégal)

Mémoire de Diplôme de Master en Biologie Animale

Spécialité : **Parasitologie**

Présenté et soutenu le 30 Juillet 2019

Par

M. Alphonse Birane THIAW

Né le 15/03/1993 à Tambacounda

MEMBRES DU JURY

Président : M. Bhen Sikina TOGUEBAYE Professeur Titulaire, FST/UCAD

Membres : Mme Yaye Dié NDIAYE Biologiste Chercheuse/HALD/Dakar

M. Gora Diop

Maitre-Assistant, FST/UCAD

M. Mame Cheikh SECK

Maitre-Assistant, FMPO/UCAD

M. Arfang DIAMANKA

Maitre-Assistant, FST/UCAD

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mon père et à ma mère pour tous les sacrifices et d'avoir beaucoup investi pour notre réussite intellectuelle. Que Dieu le tout puissant vous accorde une longue vie pleine de santé.

A Tata Emilie et à Papa Joe pour avoir fait de moi un fils. Que Dieu vous accorde aussi une longue vie pleine de santé.

A Claude, Francis, et à tous mes frères et sœurs. Je vous souhaite tout le succès, tout le bonheur.

A Mes instituteurs, enseignants et professeurs.....

A tous mes amis.....

Enfin, à toutes les personnes qui m'ont aidées de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Remerciements

Au Professeur Daouda NDIAYE

Votre rigueur dans le travail, votre sociabilité et vos énormes qualités humaines font de vous une personne vraiment exceptionnelle. Vous nous avez ouvert les portes de votre laboratoire. Nous vous sommes très reconnaissants et nous ne vous remercierons jamais assez. Vous êtes une référence pour nous. Que DIEU le tout puissant vous protège et vous accorde une longue vie, pleine de santé et jalonnée de succès.

Au Professeur Bhen Sikina TOGUEBAYE

Vous nous avez fait le grand honneur d'accepter la présidence de ce jury. Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos enseignements durant notre cursus à l'université. Votre pédagogie et votre rigueur demeureront pour nous une référence. Merci pour votre gentillesse, votre rigueur et votre implication dans notre formation.

Au Docteur Yaye Dié NDIAYE

Merci pour votre accueil, la confiance que vous avez porté à notre égard et de nous avoir confié cette thématique très intéressante. Votre disponibilité, votre compréhension et les précieux conseils nous ont beaucoup marqués. Veuillez croire Docteur à nos sincères remerciements et à notre profonde gratitude.

Au Docteur Gora DIOP

Pour nous avoir transmis les virus de la recherche. Votre disponibilité et votre engagement aux côtés des étudiants sont à saluer. Nous sommes très honorés de vous compter parmi nos juges, vos qualités scientifiques, votre rigueur, votre gentillesse et votre modestie nous rendent fiers de vous.

Au Docteur Mame Cheikh SECK

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de participer à ce jury malgré votre emploi du temps très chargé. Soyez rassuré de notre haute estime à votre égard. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Au Docteur Arfang DIAMANKA

Votre modestie, votre ouverture, votre simplicité et votre engagement aux côtés des étudiants font de vous une personne exceptionnelle. C'est pour nous un grand plaisir de vous compter parmi les membres du jury. Veuillez trouver ici notre reconnaissance et notre profonde gratitude.

Un grand merci à **la famille DIOUF, Tonton Pascal, Tonton Célestin**, pour qui j'ai du mal à trouver les mots pour qualifier à quel point je leur suis reconnaissant.

Au **Professeur Pape Mbacké SEMBENE**. Cher maître, nous avons eu le privilège de bénéficier de vos enseignements durant notre cursus à l'université. Votre pédagogie et votre rigueur demeureront pour nous une référence.

Au **Professeur Ngor FAYE**. Votre générosité humaine et intellectuelle fait de vous une personnalité scientifique exceptionnelle qui force l'admiration. Vos encouragements m'ont toujours fortifié. Merci pour les conseils et les prières.

Au **Professeur Mouhamadou NDIAYE, Dr GARBA, Dr Aminata MBAYE, Mamadou Samb YADE** pour vos précieux conseils, d'avoir lu et contribué à améliorer ce travail.

Au personnel du laboratoire de parasitologie-mycologie de l'hôpital Aristide Le Dantec : **Pr Aida BADIANE, Pr Mouhamadou NDIAYE, Dr Awa DEME, Dr Khadim DIONGUE, Dr Mamadou Alpha DIALLO, Dr Baba DIEYE, Dr Aminata MBAYE Younousse DIEDHIOU, Moctar MBAYE, Lamine NDIAYE, Mme BA, Mme Guette DIALLO, Mme Anna Seck, Mouhamad SY, Tolla NDIAYE, Amy GAYE, Ibrahima NDIAYE, Mamadou Samb YADE, Daba ZOUMAROU Jules F GOMIS, Astou KEITA, Fama NDIAYE et mes co-stagiaires Aita SENE, Abdoulaye TINE, Awa FALL, Mariama TOURE, Fatou Bintou et Fama qualité.**

A **Sékou DRAME, Astou DIONE** du laboratoire de parasitologie général de la faculté des sciences et techniques de l'UCAD.

A **Amy GAYE**. Durant notre séjour au laboratoire vous n'avez cessé de nous apporter tout le soutien et conseils pour mener à bien notre travail.

Je remercie également **Docteur Ngayo SY, Sidya DIATTA, Mme NDIAYE, Aida, Isma** de la section de lutte antiparasitaire de Thiès (SLAP).

A **tous mes amis du « groupe 0 » et ma seconde famille la 9ème promotion «BA Family»**. Merci pour les moments inoubliables passés ensemble.

Liste des sigles, des abréviations et des acronymes

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

ANSD : Agence National de la Statistique et de la Démographie

A-L : Arthéméther-Luméfentrine

ASAQ : Artésunate-Amodiaquine

An.: Anophèle

CTA : Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine

C580Y : Substitution de la cystéine (C) à la position 580 par une tyrosine(Y)

DHFR : Dihydrofolate réductase

DHPS : Dihydroptéroate synthétase

D1246Y : Substitution de l'acide aspartique(D) de la position 1246 par une tyrosine(Y)

ELISA: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

HRM : High Resolution Melting

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

LAMP : Loop mediated isothermal amplification

N86Y : Substitution de l'asparagine(N) de la position 86 par la tyrosine(Y)

OMS/WHO : Organisation mondiale de la santé

PCR: Polymerase Chain Reaction

PET: Photo-induced Electron Transfer

P. falciparum: *Plasmodium falciparum*

Pfprt : *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter

Pfdhfr : *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase

Pfdhps : *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase

Pfmdr 1: *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1

Pfk13: *Plasmodium falciparum* Kelch 13

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

µl : Microlitres

GMS : Greater Mekong Subrégion (Sous-région du grand mékong)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TDR: Test de Diagnostic Rapide

Y184F : substitution de la tyrosine (Y) de la position 184 par la phénylalanine (F)

Liste des figures

Figure 1 : Cycle biologique de <i>P. falciparum</i>	4
Figure 2: Goutte épaisse et frottis mince de sang colorés au Giemsa	7
Figure 3 : TDR de <i>Plasmodium falciparum</i> négatif (a) et positif (b).....	7
Figure 4 : Introduction et apparition de la résistance aux différentes molécules antipaludiques.....	14
Figure 5 : Carte administrative de la région de Kédougou	15
Figure 6 : Spots de sang parasité sur papier filtre	17
Figure 7 : kit d'extraction d'ADN QIA amp DNA Mini.	17
Figure 8 : Lightcycler 96.....	18
Figure 7 : Variation de la fluorescence en fonction de la température. A : courbes normales ; B : dérivé des courbes normales	20
Figure 10 : Courbes de fusion de la sonde.	21
Figure 11 : Répartition de la population d'étude selon l'âge (a) et le sexe (b)	22
Figure 12 : Profil de la courbe des mutations inconnues.....	22

Liste des tableaux

Tableau I : Antipaludiques et marqueurs moléculaires de résistance associés.	14
Tableau II : Séquence des amorces et sondes	19
Tableau III : Composantes et volumes du mélange amorces-sonde.....	20
Tableau IV : Différents contrôles utilisés pour chaque codon	20
Tableau V : Fréquence des mutations des gènes <i>Pfk13</i> , <i>Pfcrt</i> et <i>Pfmdr1</i>	24
Tableau VI : Fréquence des haplotypes au niveau du gène <i>Pfmdr1</i>	24

Table des matières

Dédicaces	i
Remerciements	ii
Liste des sigles, des abréviations et des acronymes	iv
Liste des figures	v
Liste des tableaux	v
Introduction.....	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I. 1. Généralités sur le paludisme.....	3
I. 1. 1. Agents pathogènes	3
I. 1. 1. 1 Classification	3
I. 1. 1. 2 Cycle biologique du parasite.....	3
I. 1. 1. 2. 1 Chez l'homme.....	3
I. 1. 1. 2. 1. 1. Stade pré-érythrocytaire	3
I. 1. 1. 2. 1. 2. Stade érythrocytaire	4
I. 1. 1. 2. 2. Chez le moustique	4
I. 1. 2. Le vecteur	5
I. 1. 3. Les modes de transmission du paludisme.....	5
I. 1. 4. Les signes cliniques de la maladie	5
I. 1. 4. 1. Paludisme non compliqué	5
I. 1. 4. 2. Paludisme grave	5
I. 1. 5 Le diagnostic du paludisme.....	6
I. 1. 6. Le traitement du paludisme	6
I. 1. 7. La prophylaxie du paludisme	8
I. 1. 7. 1. La lutte antivectorielle.....	8
I. 1. 7. 2. La chimioprévention.....	8
I. 1. 7. 3. Le vaccin	8
I. 2. Résistance de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques	8
I. 2. 1. Définition	8
I. 2. 2. Les facteurs favorisant la survenue de la chimiorésistance	8

I. 2. 3. Les mécanismes de chimiorésistance	9
I. 2. 3. 1. Mécanisme de résistance aux lysosomotropes.....	9
I. 2. 3. 1. 1. La Chloroquine	9
I. 2. 3. 1. 2. L’Amodiaquine	10
I. 2. 3. 1. 3. La Luméfantrine.....	10
I. 2. 3. 1. 4. Les dérivés de l’Artémisinine	10
I. 2. 3. 2. Mécanisme de résistance aux antimétaboliques : Sulfadoxine-Pyriméthamine	11
I. 2. 4. Méthodes de surveillance de l’efficacité des antipaludiques.....	12
I. 2. 4. 1 Les Tests <i>in vivo</i>	12
I. 2. 4. 2. Test <i>in vitro</i> / <i>ex vivo</i>	12
I. 2. 4. 3. Etude des marqueurs moléculaires de résistance	13
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	15
II. 1. Cadre de l’étude	15
II. 2. Population d’étude	16
II. 2. 1. Critères d’inclusion.....	16
II. 2. 2. Critères de non inclusion	16
II. 3. Considération éthique.....	16
II. 4. Méthodologie	17
II. 4. 1. Extraction de l’ADN	17
II. 4. 2. La high résolution melting (HRM)	18
II. 4. 2. 1. Principe	18
II. 4. 2. 2. Mode opératoire	18
II. 4. 2. 2. 1. Le mélange réactionnel	19
II. 4. 2. 2. 2. Analyse et interprétation des résultats.....	20
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	22
III. 1. Résultats	22
III. 1. 1. Caractéristiques de la population d’étude.....	22
III. 1. 2. Prévalence de la mutation C580Y de <i>Pfk13</i>	22
III. 1. 3. Prévalence de la mutation K76T du gène <i>Pfcr1</i>	23
III. 1. 4. Prévalence des mutations au niveau des codons 86, 184 et 1246 du gène <i>Pfmdr1</i>	23

III. 1. 4. 1. Au niveau du codon 86	23
III. 1. 4. 2. Au niveau du codon 184	23
III. 1. 4. 3. Au niveau du codon 1246	23
III. 2. Discussion	25
Conclusion et perspectives	27
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	28
WEBOGRAPHIE	32

Introduction

Le paludisme est une parasitose potentiellement mortelle, causé par un hématozoaire du genre *Plasmodium* et transmise à l'homme par un moustique femelle du genre *Anophèles*. Cinq (5) espèces de *Plasmodium* sont retrouvées en pathologie humaine. Parmi ces espèces, *Plasmodium falciparum* est le plus redoutable retrouvé dans 99,7% des cas de paludisme estimés en 2017 dans le monde (OMS, 2018).

Le paludisme demeure un problème majeur de santé publique. Bien qu'évitable et traitable, il constitue la maladie parasitaire la plus meurtrière au monde. Le fardeau mondial est estimé à 219 millions de cas en 2017 avec 435000 décès principalement des enfants de moins de 5 ans. Quatre-vingt-douze pour cent (92%) des cas et 93% des décès liés au paludisme ont été enregistré en Afrique et plus particulièrement en Afrique subsaharienne. Néanmoins, la forte intensification et l'efficacité des interventions de lutte ont contribué à faire reculer considérablement le paludisme ces dernières années dans le monde (OMS, 2017b ; OMS, 2018).

Au Sénégal, entre 2013-2017, le paludisme a connu une régression significative de 40% et 77% respectivement pour la morbidité et la mortalité. Toutefois, il faut noter qu'il reste très endémique dans certaines régions du pays. En effet, en 2017, sur les 88% de cas de paludisme enregistrés dans les cinq (5) régions qui portent l'essentiel de la charge de la maladie à savoir les régions de Kédougou, Kolda, Tambacounda, Kaolack et Diourbel, la région de Kédougou, à elle seule, a enregistré 21,23% des cas de paludisme (PNLP, 2018).

L'une des stratégies clés de contrôle et d'élimination du paludisme dans le monde est une bonne prise en charge des cas d'infections palustres avec des médicaments efficaces. Toutefois, le phénomène de chimiorésistance de *P. falciparum* aux molécules antipaludiques constitue un des obstacles majeurs dans la prise en charge de la maladie. En effet, malgré les efforts déployés pour la découverte de médicaments antipaludiques efficaces, le parasite s'adapte et développe des résistances pour chaque molécule utilisée. C'est le cas de la Quinine, de la Chloroquine, de la Sulfadoxine-Pyriméthamine, de l'Amodiaquine et de la Mefloquine (Pradines *et al.*, 2010). Pour faire face à ces résistances, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a fait plusieurs recommandations dont l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) comme traitement de première ligne (Pradines *et al.*, 2010). Ceci a permis de réduire considérablement, au niveau mondial, le nombre de cas de paludisme passant de 239 millions en 2010 à 219 millions en 2017 et le nombre de décès dus au paludisme est passé de 607 000 en 2010 à 435 000 en 2017 (OMS, 2018).

Malheureusement, la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'Artémisinine a été très tôt rapportée en Asie du Sud-Est. Ce qui représente une menace pour les succès enregistrés ces dernières années dans la lutte contre le paludisme (Noedl *et al.*, 2008 ; OMS, 2018).

Les CTA étant des médicaments antipaludiques de qualité disponibles pour le traitement du paludisme simple leur efficacité pourrait être compromise si l'on n'y prend pas garde. C'est pourquoi, l'OMS a préconisé une surveillance régulière de l'efficacité des CTA au niveau des sites sentinelles au moins une fois tous les 24 mois. Cela permettrait de détecter des changements d'efficacité thérapeutique et de s'assurer que les traitements recommandés dans les politiques de prise en charge national au niveau des programmes national de lutte contre la paludisme (PNLP) sont efficaces (White *et al.* 2013 ; OMS, 2017a).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés de surveiller la prévalence des marqueurs moléculaires impliqués dans la chimiorésistance de *P. falciparum* aux molécules antipaludiques en déterminant :

- La prévalence de la mutation C580Y au niveau du gène *Pfk13* associée à la résistance de *P. falciparum* aux dérivés d'Artémisinine;
- La Prévalence de la mutation K76T du gène *Pfcr1* associées à la résistance à la Chloroquine ;
- La Prévalence des mutations situées sur les codons 86, 184 et 1246 au niveau du gène *Pfmdr1*, associée à la résistance à la Luméfantrine et à l'Amodiaquine.

Cette étude s'articulera autour de trois chapitres :

- Le chapitre I : synthèse bibliographique ;
- Le Chapitre II : matériels et méthodes;
- Le chapitre III : résultats et discussion.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. 1. Généralités sur le paludisme

I. 1. 1. Agents pathogènes

I. 1. 1. 1 Classification

Le parasite est un protozoaire appartenant au phylum des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoa*, à l'ordre des *Haemosporidae*, à la famille des *Plasmodiidae* et au genre *Plasmodium*. Cet embranchement est caractérisé par la présence d'un complexe apical. Ce complexe est constitué d'un ensemble d'organites qui interviennent dans les processus d'invasion et de la mobilité du parasite.

Cinq espèces de *Plasmodium* sont retrouvées en pathologie humaine : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*. *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* sont plus prévalentes ; cependant *P. falciparum* est l'espèce la plus mortelle. *P. knowlesi* est une espèce zoonotique infectant aussi bien l'Homme que le singe (ANOFEL, 2014 ; OMS, 2016).

I. 1. 1. 2 Cycle biologique du parasite

Le cycle de développement de *Plasmodium* est « dixène », c'est-à-dire nécessite deux hôtes : l'homme chez qui a lieu la phase asexuée ou la schizogonie et l'anophèle femelle où se déroule la phase sexuée ou la sporogonie.

I. 1. 1. 2. 1 Chez l'homme

La phase asexuée se déroule en deux étapes : le stade pré-érythrocytaire et le stade érythrocytaire.

I. 1. 1. 2. 1. 1. Stade pré-érythrocytaire

Lors d'un repas sanguin chez l'homme, le moustique femelle infecté injecte des sporozoïtes dans le sang. A travers les vaisseaux, ils sont acheminés vers le foie où ils envahissent les hépatocytes. Une fois à l'intérieur de l'hépatocyte, le parasite se développe par schizogonie et donne une schizonte hépatique. La rupture du schizonte conduit à la libération de mérozoïtes hépatiques dans la circulation sanguine. Cette étape asymptomatique dure sept (7) à quinze (15) jours (White *et al.*, 2013).

Chez *P. vivax* et *P. ovale*, certains parasites peuvent rester dans le foie sous forme dormante appelés « hypnozoïtes » durant des semaines voire des mois ou des années. Ces formes hypnozoïtes sont responsables des rechutes après une infection à *P. vivax* ou *P. ovale*.

I. 1. 1. 2. 1. 2. Stade érythrocytaire

Les mérozoïtes hépatiques ainsi libérés (10000 à 30000 par le schizonte hépatique chez *P. falciparum*) envahissent les érythrocytes. C'est le début du stade érythrocytaire qui est la phase symptomatique de l'infection. La pénétration du mérozoïte dans l'érythrocyte et sa maturation en trophozoïte puis en schizonte prend environ 48H chez *P. falciparum*. Le parasite se développe dans l'érythrocyte, en passant du stade ring (0-24H), trophozoïte (24-36H) au stade schizonte (36-48H) au cours duquel il se réplique pour former une nouvelle génération de mérozoïtes érythrocytaires. Ces mérozoïtes vont ensuite envahir d'autres globules rouges. La libération des mérozoïtes suite à l'éclatement des hématies est à l'origine des symptômes cliniques de la maladie (White *et al.*, 2013).

Au cours de ces cycles successifs d'invasion de nouveaux érythrocytes et de libération de mérozoïtes, certains parasites se différencient en gamétocyte mâle ou femelle. L'engagement vers la différenciation sexuelle semble être déclencher par le surpeuplement parasitaire, un stress métabolique ou par traitement antipaludique (White *et al.*, 2013).

I. 1. 1. 2. 2. Chez le moustique

Lors d'un repas sanguin sur un être humain infecté, la femelle anophèle ingère du sang contenant des gamétocytes mâle et femelle et s'infeste à son tour. La fécondation a alors lieu dans le tractus digestif. Elle conduit à la production massive de sporozoïtes (jusqu'à 20000 sporozoïtes par sporogonie). Ces sporozoïtes rejoignent les glandes salivaires via l'hémocèle pour être transmises à un nouvel être humain (figure 1). Cette étape dure environ deux semaines.

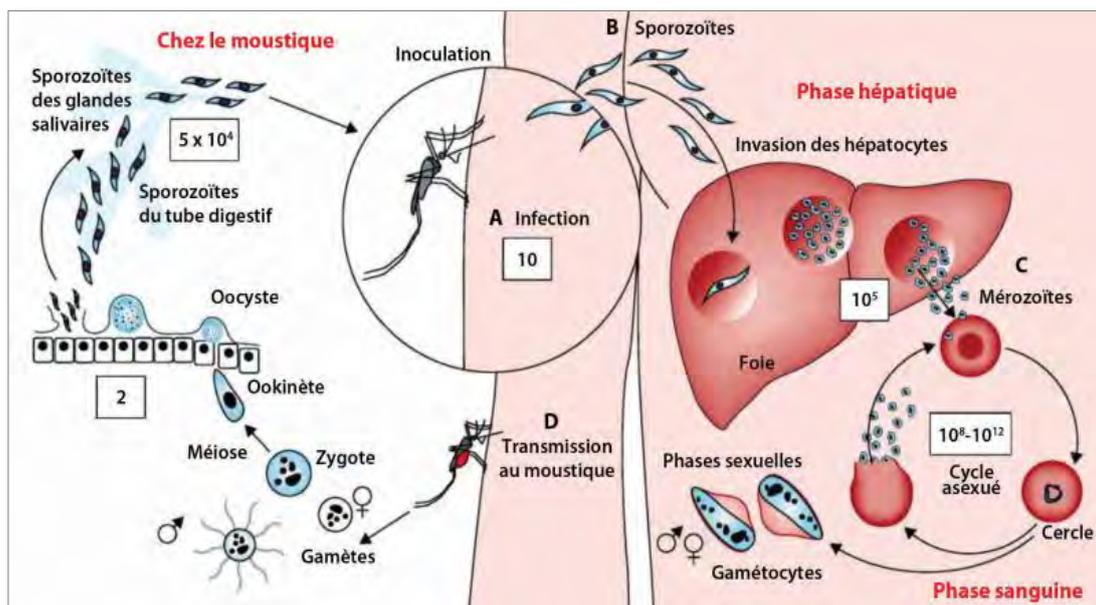


Figure 1 : Cycle biologique de *P. falciparum* (White *et al.*, 2013)

I. 1. 2. Le vecteur

Les vecteurs du paludisme sont des moustiques femelles du genre anophèles. Les anophèles appartiennent à l'embranchement des arthropodes, à la classe des insectes, à l'ordre des diptères, à la famille des *Culicidae* et à la sous-famille des *Anophélinae*. Sur une centaine d'espèces signalées en Afrique vingt sont connues au Sénégal, *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. coluzzii*, *An. pharoensis*, *An. nili* et *An. melas* étant les principaux vecteurs (Diagne *et al.*, 1994 ; PNLP, 2015).

I. 1. 3. Les modes de transmission du paludisme

L'homme peut s'infester de différente manière. La plus répandue est l'inoculation des parasites par la femelle d'anophèle au cours de son repas sanguin. Le parasite peut être transmis aussi, par voie placentaire de la mère au fœtus (paludisme congénital), par partage de seringues souillées ou par transfusion sanguine.

I. 1. 4. Les signes cliniques de la maladie

Le paludisme est une affection fébrile aiguë. Les symptômes apparaissent généralement une dizaine de jours après la piqûre infectieuse chez les personnes non immunisées, mais la période d'incubation peut être beaucoup plus longue chez les personnes ayant acquis un certain degré d'immunité.

I. 1. 4. 1. Paludisme non compliqué

Les manifestations cliniques sont diverses et non spécifiques. Elles comprennent des maux de tête, de la lassitude, de la fatigue, des douleurs abdominales et musculaires. Ces symptômes sont généralement accompagnés de fièvre, de frisson, de transpiration, d'anorexie, et de vomissement (OMS, 2015a).

I. 1. 4. 2. Paludisme grave

Elle est fatale dans la majorité des cas. Elle survient suite à un retard ou absence de traitement du paludisme simple ou une mauvaise prise en charge. Le paludisme grave se manifeste généralement par un ou plusieurs des symptômes suivants : anémie sévère due à l'éclatement des érythrocytes infectées, une acidose lactique associée à de l'hypoglycémie, un neuropaludisme entraîné par la séquestration des érythrocytes infectées dans les capillaires cérébraux, une défaillance de certains organes : insuffisance rénale, détresse respiratoire (Pongponratn *et al.*, 2003 ; Calis *et al.*, 2008 ; OMS, 2015a).

I. 1. 5 Le diagnostic du paludisme

Le diagnostic rapide et précis du paludisme fait partie d'une gestion efficace de la maladie. L'OMS recommande un diagnostic rapide au moyen d'un examen microscopique ou d'un test de diagnostic rapide (TDR) chez tous les patients dont on suppose qu'ils sont atteints de paludisme, avant d'administrer le traitement (OMS, 2019).

La goutte épaisse et le frottis mince (**Figure 2**) sont les méthodes microscopiques les plus utilisées du fait de leur simplicité, de leur faible coût, leur capacité à détecter des parasites, à les identifier et à les quantifier. La sensibilité de ces méthodes est relative et dépend en grande partie de l'opérateur. (Milne *et al.*, 1994).

Le TDR (**Figure 3**) est un dispositif qui détecte un antigène plasmodial dans une petite quantité de sang (environ 5µl), par dosage immuno-chromatographique avec des anticorps monoclonaux. Ces derniers sont dirigés contre l'antigène du parasite cible et imprégnés sur une bande de test. Les résultats apparaissent sous forme de bande colorée au bout de 5 à 20 minutes. Les antigènes plasmodiaux couramment ciblés sont le HRP-2 (histidine rich protein 2), la pLDH (*Plasmodium* lactate dehydrogenase), et l'aldolase. Le TDR n'exige aucun investissement en capital ou en électricité. Il est simple à réaliser et facile à interpréter. Cependant différentes études ont montré que la sensibilité et la spécificité de ce test étaient comprises entre 90-95% et 85-92% respectivement en comparaison avec la microscopie (Moody *et al.*, 2002 ; Anchinmane *et al.*, 2010 ; Duru, 2017).

Par ailleurs il existe d'autres techniques biologiques beaucoup plus sensibles et complexes : le QBC (Quantitative Buffy Coat) Malaria test, la PCR (Polymerase Chain Reaction), la PET-PCR (Photo-induced Electron Transfer Polymerase Chain Reaction), Illumigen-Malaria LAMP (Loop mediated isothermal amplification), ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), Immunofluorescence indirect.

I. 1. 6. Le traitement du paludisme

Le développement de la résistance aux antipaludiques les plus anciens a fait que les combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) soient maintenant recommandées pour le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* (Nosten *et al.*, 2007).

Les CTA préconisées par l'OMS sont : Artemeter-Lumefantrine ; Artésunate-Amodiaquine ; Artésunate-Méfloquine ; Artésunate-Pyronaridine ; Dihydroartémisinine-Pipéraquline ; Artésunate-Sulfadoxine Pyriméthamine (OMS, 2015b). Au Sénégal, les différentes CTA recommandées pour le traitement du paludisme simple sont les suivantes : Artemeter-

Lumefantrine (A-L) ; Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et la DihydroArtémisinine-Pipéraquline (DHA-P) (PNLP, 2013).

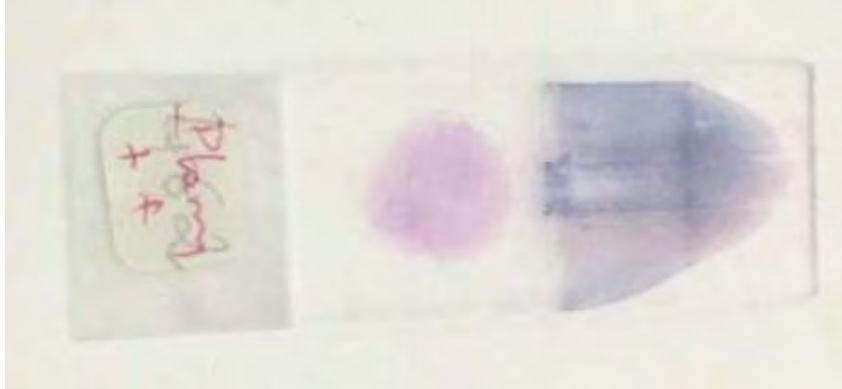


Figure 2: Goutte épaisse et frottis mince de sang colorés au Giemsa

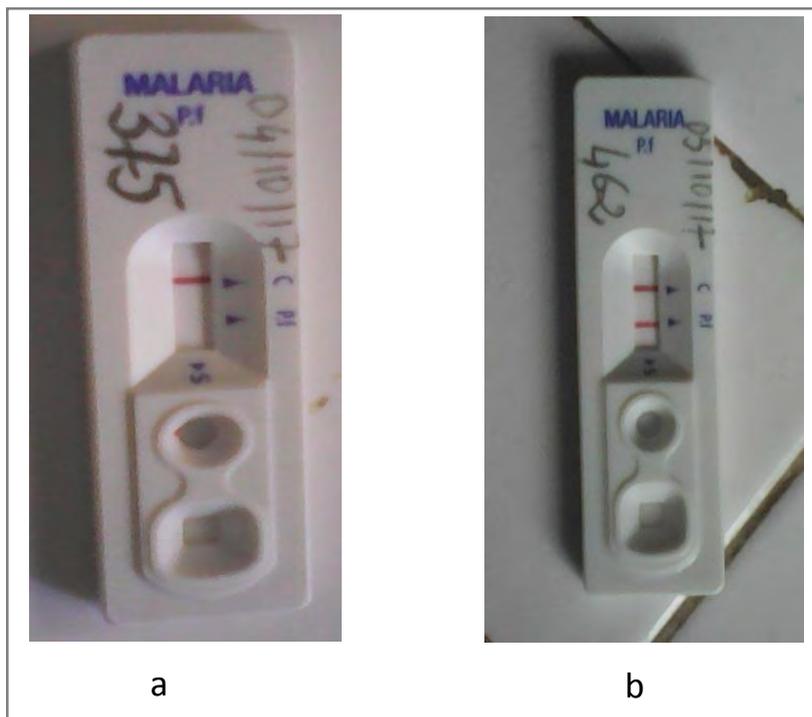


Figure 3 : TDR de *Plasmodium falciparum* négatif (a) et positif (b)

I. 1. 7. La prophylaxie du paludisme

I. 1. 7. 1. La lutte antivectorielle

C'est un volet essentiel pour la lutte contre le paludisme et son élimination. L'usage des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILDA) et les pulvérisations intra domiciliaires à effet rémanent constituent les deux interventions de base applicables à grande échelle. Les objectifs visés sont la réduction de la densité des moustiques et la limitation des contacts Homme-moustique (OMS, 2015b).

I. 1. 7. 2. La chimioprévention

Les stratégies de traitement préventif sont des éléments clés pour réduire la charge de morbidité et la transmission. La chimioprévention, consistant à une prise de médicaments à titre préventif, est recommandée chez les groupes les plus vulnérables que sont les femmes enceintes, les enfants de moins de 5 ans, les sujets neufs voyageurs et migrants dans les zones où la transmission est endémique.

I. 1. 7. 3. Le vaccin

Beaucoup d'efforts ont été consacrés à la mise au point d'un vaccin antipaludique, mais les résultats sont peu satisfaisants. Jusqu'à présent, aucun vaccin n'est encore commercialisé même s'il existe des vaccins candidats. Cependant, le vaccin RTS,S/AS01 (RTS,S) a atteint un niveau d'étude de phase 3 avec une efficacité limitée aux jeunes enfants (White *et al.*, 2013).

I. 2. Résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques

I. 2. 1. Définition

La résistance est définie comme la capacité d'une souche parasitaire à survivre ou à se développer en dépit de l'administration et de l'absorption d'un médicament donné à des doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées mais dans les limites de la tolérance du médicament. La forme active du médicament doit pouvoir atteindre le parasite ou accéder à l'intérieur du globule rouge infecté pendant la durée nécessaire à son action normale (Pradines *et al.*, 2010).

L'émergence et la propagation de la résistance aux antipaludiques posent un sérieux problème de santé publique. En effet, les échecs prophylactiques ou thérapeutiques entraînent une réémergence de la maladie. Les conséquences sanitaires sont : une augmentation de cas d'hospitalisation, de mortalité infantile et la transmission de la maladie.

I. 2. 2. Les facteurs favorisant la survenue de la chimiorésistance

La résistance permanente de *P. falciparum* aux médicaments antipaludiques s'explique d'abord

par sa grande diversité génétique due à un taux élevé de mutations dans son génome et par les masses très importantes de parasites portées par les individus infectés (**Pradines *et al.*, 2010**).

Les facteurs qui favorisent l'émergence de la chimiorésistance sont :

- La mauvaise utilisation des antipaludiques par les individus infectés : automédication abusive, mauvaise observance, la prescription irrationnelle des antipaludiques, vente illicite des médicaments ;
- L'indisponibilité des médicaments efficaces ou le déploiement inadéquat des médicaments sous forme de monothérapie ;
- La consommation de contrefaçon ;
- L'absence ou non-respect des directives nationales ;
- La production rapide de gamétocytes porteurs du gène de résistance. (**Bouchaud, 2008 ; Pradines *et al.*, 2010**)

I. 2. 3. Les mécanismes de chimiorésistance

Selon leur mécanisme d'action, les médicaments antipaludiques peuvent être classés en deux groupes : les lysosomotropes et les antimétaboliques. Ces mécanismes d'action sont à l'origine de deux mécanismes de résistance (**Le Bras *et al.*, 2006**).

I. 2. 3. 1. Mécanisme de résistance aux lysosomotropes

Les lysosomotropes sont des schizonticides, ayant pour cible la vacuole digestive du parasite. Ils comprennent toutes les molécules possédant un noyau quinoléine (Chloroquine, Amodiaquine, Pipéraquline), les aminoalcools (Quinine, Méfloquine et Halofantrine) et les dérivés de l'Artémisinine.

I. 2. 3. 1. 1. La Chloroquine

La Chloroquine est un antipaludique de synthèse mise sur le marché en 1934. Elle a joué un rôle prépondérant dans la thérapie et la chimioprophylaxie du paludisme grâce à ses propriétés exceptionnelles et la lenteur d'apparition de la chloroquinorésistance en 1957 (**Thompson et Werbel, 1972 ; Wellem et Plowe, 2001 ; Talisuna *et al.*, 2004**).

Son activité est liée à ses propriétés d'accumulation sélective dans l'hématie parasitée et sa localisation préférentielle dans la vacuole digestive. A l'intérieur de cette vacuole, elle est protonée et ne peut plus traverser librement la membrane vacuolaire. La Chloroquine perturbe la formation de l'hémozoïne. En effet, elle inhibe la cristallisation de l'hème (substance toxique issue de la dégradation de l'hémoglobine érythrocytaire) en hémozoïne substance non toxique (**Petersen *et al.*, 2011**).

Le principal mécanisme de résistance à la Chloroquine est l'efflux de médicament par PfCRT (*Plasmodium falciparum* Chloroquinorésistance) (Djimé *et al.*, 2001). PfCRT est une protéine de transport membranaire de la vacuole digestive codée par le gène *Pfcr*t localisé au niveau du chromosome 7. Cette protéine pourrait expulser activement la Chloroquine de la vacuole digestive. Elle est capable aussi d'altérer le pH ou la Chloroquine protonée pourrait être transportée passivement à l'extérieur de la vacuole. Ces phénomènes sont dus à des mutations au niveau du gène *Pfcr*t. La mutation K76T au niveau de ce gène est associée à la résistance de *P. falciparum* à la Chloroquine au point qu'elle soit présente dans toutes les souches résistantes (Johnson *et al.*, 2004 ; Sanchez *et al.*, 2004 ; Picot *et al.*, 2009).

I. 2. 3. 1. 2. L'Amodiaquine

L'Amodiaquine a récemment connu un regain d'intérêt dans le traitement de l'accès palustre simple, en association avec les dérivés de l'Artémisinine et plus particulièrement l'Artésunate. Le mode d'action de l'Amodiaquine semble être le même que celui de la Chloroquine. Son accumulation est corrélée à celle de la Chloroquine et est aussi diminuée chez les isolats chloroquinorésistants (Bray *et al.*, 1996).

Les mutations N86Y, Y184F et D1246Y, au niveau du gène *Pfmdr*1 ont été associées à une sensibilité réduite à l'Amodiaquine (Durrand *et al.*, 2004). De plus, la combinaison des allèles mutants 76T et 86Y au niveau des gènes *Pfcr*t et *Pfmdr*1 respectivement a été associée à une réduction de la sensibilité de *P. falciparum* à l'Amodiaquine (Happi *et al.*, 2006 ; Djimé *et al.*, 2008).

I. 2. 3. 1. 3. La Luméfantrine

C'est un schizonticide sanguin contre les stades érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*. La Luméfantrine est administrée en association avec l'Artéméther pour une efficacité améliorée. Avec une demi-vie plus longue que l'Artéméther, elle élimine les parasites résiduels.

Le mécanisme exact d'action de la Luméfantrine reste inconnu. Cependant, des études suggèrent qu'elle inhibe la formation de β -hématine en formant un complexe avec l'hémine. Elle inhibe aussi la synthèse d'acide nucléique et de protéine (DrugBank, 2018).

La chimiorésistance de *P. falciparum* à la Luméfantrine est liée à des modifications au niveau du gène *Pfmdr*1. Les mutations N86Y, Y184F, D1246Y et l'augmentation du nombre de copie du gène *Pfmdr*1 ont été associées à une sensibilité réduite de *P. falciparum* à la Luméfantrine (Sisowath *et al.*, 2007 ; Pradines *et al.*, 2010).

I. 2. 3. 1. 4. Les dérivés de l'Artémisinine

Découvert par le Professeur Youyou TU prix Nobel de médecine en 2015, l'Artémisinine et ses

dérivés ont radicalement améliorés le traitement contre le paludisme. Dans les CTA, les dérivés de l'Artémisinine confèrent une efficacité rapide et puissante. Leur taux élevé de clairance plasmatique (demi-vie < à 1 heure) est compensé par un deuxième antipaludique à demi-vie plasmatique plus longue (comme la Luméfántrine, la Méfloquine, l'Amodiaquine, la Pipéraquline ou la Sulfadoxine-Pyrimétamine) en tant que médicament associé (**Haldar et al., 2018**).

L'Artémisinine et ses dérivés empêchent la désintoxication des déchets de l'hémoglobine (hème) par le parasite. Ils sont responsables de l'alkylation des protéines et de l'hème entraînant des dommages oxydatifs. La résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'Artémisinine se traduit par une réduction importante de la vitesse d'élimination des parasites chez les patients traités (demi-vie de clairance parasitaire) par un dérivé d'artémisinine seul ou en association avec une molécule partenaire (CTA) (**Robert et al., 2005 ; Flegg et al., 2011**). Cette clairance parasitaire retardée est due au nombre accru de stade anneau (jeune trophozoite) qui entre dans un état de quiescence lors de l'exposition aux dérivés de l'Artémisinine. Ces trophozoites reprennent rapidement leur croissance une fois le médicament éliminé. Cette capacité est conférée par des mutations au niveau du gène *Pfk13* (**Dondorp et al., 2009 ; Witkowski et al., 2010**).

Le gène *Pfk13* est localisé au niveau du chromosome 13. Il ne code ni pour un transporteur ni pour une enzyme. Sa fonction exacte n'est pas encore connue, mais des analogies sont possibles avec la fonction de la protéine Keap1 humaine, en particulier dans la réponse au stress oxydatif. *PfK13* et *Keap1* partagent des homologies dans le domaine BTB/POZ du C-terminale et les 6 domaines du *kelch* (**Ariey et al., 2014 ; Fairhurst, 2015 ; Haldar et al., 2018**).

A ce jour plus de 200 mutations non synonymes ont été signalées dans le gène *Pfk13* dont neuf (9) ont été associées à la résistance aux dérivés d'Artémisinine dans le sud-est de l'Asie. Il s'agit des mutations C580Y, R539T, Y493H, et I543T dans le GMS (Sous-Région du grand Mékong) oriental (Cambodge, Laos et Vietnam) ; F446L, N458Y, P574L et R561H dans le GMS occidental (Chine Myanmar et Thaïlande) et la mutation P553L, retrouvée dans les 2 zones. Des études ont établi que la mutation C580Y était la mutation majeure (représentant 80% des cas de résistance) responsable de la résistance clinique aux dérivés d'Artémisinine en Asie du sud-est (**Ashley et al., 2014 ; OMS, 2017a ; Ménard et al., 2016**).

I. 2. 3. 2. Mécanisme de résistance aux antimétaboliques : Sulfadoxine-Pyriméthamine

La Sulfadoxine et la Pyriméthamine inhibent respectivement les enzymes *P. falciparum* dihydroptéroate synthase (PfDHPS) et dihydrofolate réductase (PfDHFR) qui fonctionnent

dans la voie des folates. La résistance à ces antipaludiques est conférée par des mutations au niveau des gènes *Pfdhps* et *Pfdhfr*. Les mutations N51I, C59R, S108N du gène *Pfdhfr* et les mutations A437G, K540E du gène *Pfdhps* ont été associées à la résistance à la combinaison Sulfadoxine-Pyriméthamine (Gregson et Plowe, 2005 ; Shah *et al.*, 2011).

I. 2. 4. Méthodes de surveillance de l'efficacité des antipaludiques

La surveillance de la résistance aux médicaments antipaludiques repose sur 3 approches différentes et complémentaires :

- Le test *in vivo* visant à évaluer l'efficacité des médicaments chez les patients ;
- Les tests *in vitro/ex vivo* pour évaluer la sensibilité des parasites aux médicaments ;
- Les tests moléculaires pour détecter des mutations génétiques validées ou des modifications du nombre de copies de gènes associées à la résistance aux antipaludiques (Nsanzabana *et al.*, 2018).

I. 2. 4. 1 Les Tests *in vivo*

L'évaluation *in vivo* des médicaments est le " gold standard " de l'OMS pour le suivi de l'efficacité des antipaludiques. Les tests *in vivo* fournissent des informations sur l'efficacité du médicament étudié chez les patients. Néanmoins, elles sont difficiles à réaliser en raison de la lourdeur de la logistique et du coût.

La technique consiste à prescrire la dose requise de médicament antipaludique aux patients infestés par des parasites. Après avoir reçu un traitement approprié, les patients sont suivis par des évaluations parasitologiques et cliniques pendant un nombre de jours spécifiés (de 28 à 63 jours en fonction de la demi-vie du médicament évalué). Dans le protocole actuel de l'étude d'efficacité thérapeutique, le génotypage systématique est recommandé en cas d'échec clinique ou parasitologique. Ceci permet de distinguer la recrudescence des réinfections. Pour cela, trois gènes hautement polymorphes du parasites sont utilisés : les *protéines de surface mérozoïte 1 et 2* (*msh1*, *msh2*) et les *protéines riches en glutamate* (*glurp*) (OMS, 2009).

I. 2. 4. 2. Test *in vitro* / *ex vivo*

L'évaluation de la sensibilité de *P. falciparum* aux médicaments antipaludiques peut être effectuée de manière phénotypique, en utilisant des souches de parasites collectées chez des patients (*ex vivo*) ou avec des isolats adaptés à la culture (*in vitro*). Les méthodes *in vitro* / *ex vivo* fournissent des informations utiles sur la sensibilité du parasite. Toutefois, elles nécessitent un équipement de laboratoire lourd et un personnel hautement qualifié. L'évaluation peut être réalisée en cultivant des parasites en présence de médicaments antipaludiques à des concentrations variables pour déterminer l'effet inhibiteur de croissance des médicaments ou en

exposant les parasites à une concentration élevée d'un antipaludique spécifique pendant une période relativement courte (**Witkowski et al., 2013 ; Nsanzabana et al., 2018**).

La croissance du parasite est ensuite mesurée à l'aide de diverses techniques et les résultats permettent de déterminer la concentration inhibant la croissance parasitaire de 50% (concentration inhibitrice 50%; CI50) ou le taux de survie (**Witkowski et al., 2013 ; Woodrow et al., 2013**).

I. 2. 4. 3. Etude des marqueurs moléculaires de résistance

Les marqueurs moléculaires validés sont très pertinents pour détecter et surveiller en temps réel la résistance. Leur prévalence dans une population parasitaire est souvent un bon indicateur du niveau de résistance clinique. Cette technique permet d'éliminer les facteurs humains. Elle est très sûre pour détecter les vraies résistances, plusieurs molécules aussi peuvent être testées avec seulement une tache de sang sur un papier filtre. De plus, les échantillons sont facilement conservés et transportés. Cependant l'analyse des marqueurs moléculaires, nécessite un équipement spécifique et un personnel hautement qualifié.

Diverses méthodes ont été développées pour évaluer ces marqueurs de résistance connus. Le principe de base de la plupart des méthodologies d'évaluation des marqueurs génomiques associés à la pharmacorésistance est basé, sur l'amplification du gène ou des loci d'intérêt (**Nsanzabana et al., 2018**).

Les marqueurs moléculaires associés à la résistance de *P falciparum* aux différentes molécules antipaludiques sont (**Tableau I**) :

- le *Plasmodium falciparum multidrug résistance 1 (pfmdr1)* situé sur le chromosome 5 ;
- le *Plasmodium falciparum chloroquinorésistance (pfcr1)* situé sur le chromosome 7 ;
- le *Plasmodium falciparum dihydrofolate réductase (pfdhfr)* situé sur le chromosome 4 ;
- le *Plasmodium falciparum dihydrofolate synthéase (pfdhps)* situé sur le chromosome 8 (**Pradines et al., 2010**) ;
- *Le Plasmodium falciparum Cytochrome b (PfCyt b)* ;
- *Le Plasmodium falciparum kelch propeller (PfK13)* situé sur le chromosome 13 (**Ariey et al., 2014**) ;
- *Le Plasmodium falciparum plasmepsine 2 copy number* (**Witkowski et al., 2017**). (**voir Tableau I**)

Tableau I : Antipaludiques et marqueurs moléculaires de résistance associés.

(Haldar *et al.*, 2018)

Classe chimique	Nom commun	Stade parasite ciblé	Marqueur de résistance de <i>Plasmodium falciparum</i>
Sesquiterpene lactone	Artemisinin	Tous les stades du parasite	pfkclch13
	Artesunate	Tous les stades du parasite	pfkclch13
Endoperoxydes	Artemether	Tous les stades du parasite	pfkclch13
	Dihydroartemisinin	Tous les stades du parasite	pfkclch13
4-Aminoquinolines	Chloroquine	Stades sanguins (trophozoite et schizonte)	pfcr
	Amodiaquine	Stade sanguin (trophozoite et schizonte)	pfcr, pfmdr1
	Piperaquine	Stade sanguin (trophozoite et schizonte)	pfplm2, pfcr
	Pyronaridine	Stade sanguin (anneau, trophozoite et schizonte)	Pfcr
	Naphthoquine	Stades sanguins (trophozoite et schizonte)	Unknown
Amino alcohols	Quinine	Stades sanguins (trophozoite et stades I à III des gametocytes)	pfcr, pfmdr1
	Mefloquine	Stades sanguins (trophozoite et schizonte)	pfmdr1
	Lumefantrine	Stades sanguins (trophozoite et schizonte)	pfcr, pfmdr1
	Halofantrine	Stades sanguins (trophozoite et schizonte)	pfcr, pfmdr1
8-Aminoquinoline	Primaquine	Formes sanguins (gametocyte) et hépatiques (schizonte)	Unknown
Antifolates	Pyriméthamine	Schizonte sanguine et hépatique et oocystes	Pfdhfr
	Sulfadoxine	Blood and liver schizont	Pfdhps
	Proguanil	Stades sanguins (schizonte et gametocyte) Schizonte hépatique	pfhdfr
Naphthoquinone	Atovaquone	Stades sanguins (schizonte et gametocyte) Schizonte hépatique	Pficyt
Antibiotics	Clindamycine	Stades sanguins	Cible Apicoplast
	Doxycycline	Stades sanguins	Cible Apicoplast
	Tétracycline	Stades sanguins	Cible Apicoplast

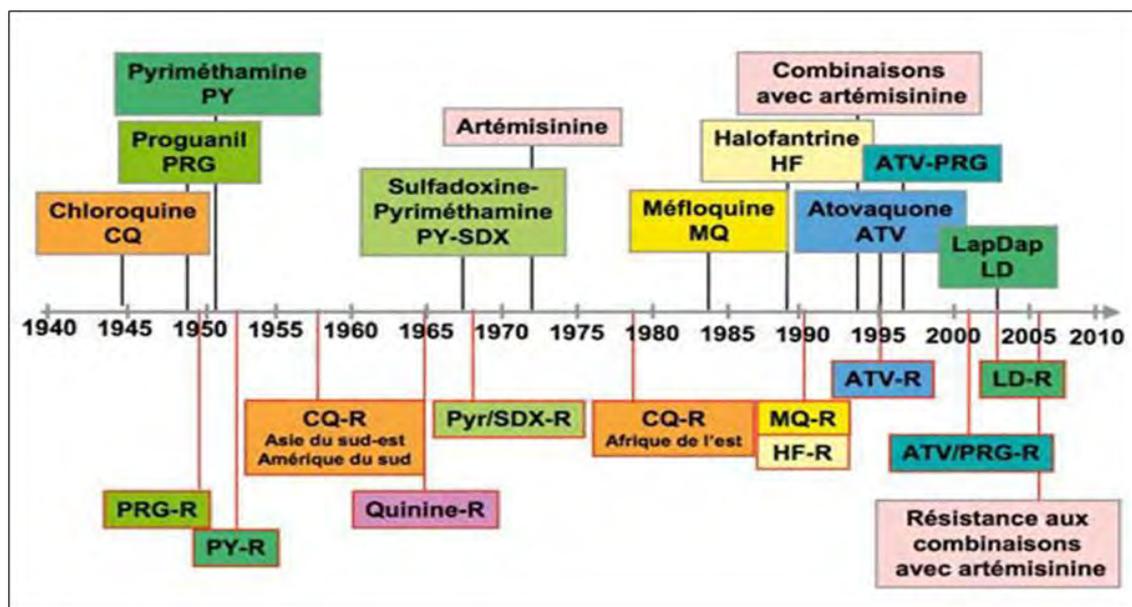


Figure 4 : Introduction et apparition de la résistance aux différents molécules antipaludiques (Pradines *et al.*, 2010)

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II. 1. Cadre de l'étude

La région de Kédougou est située au sud-est du Sénégal, à environ 700km de Dakar. Elle est un véritable carrefour frontalier du Mali, à l'est et de la Guinée, au sud (**Figure 5**). Sa population est estimée 172 482 habitants sur une superficie de 16 896km².

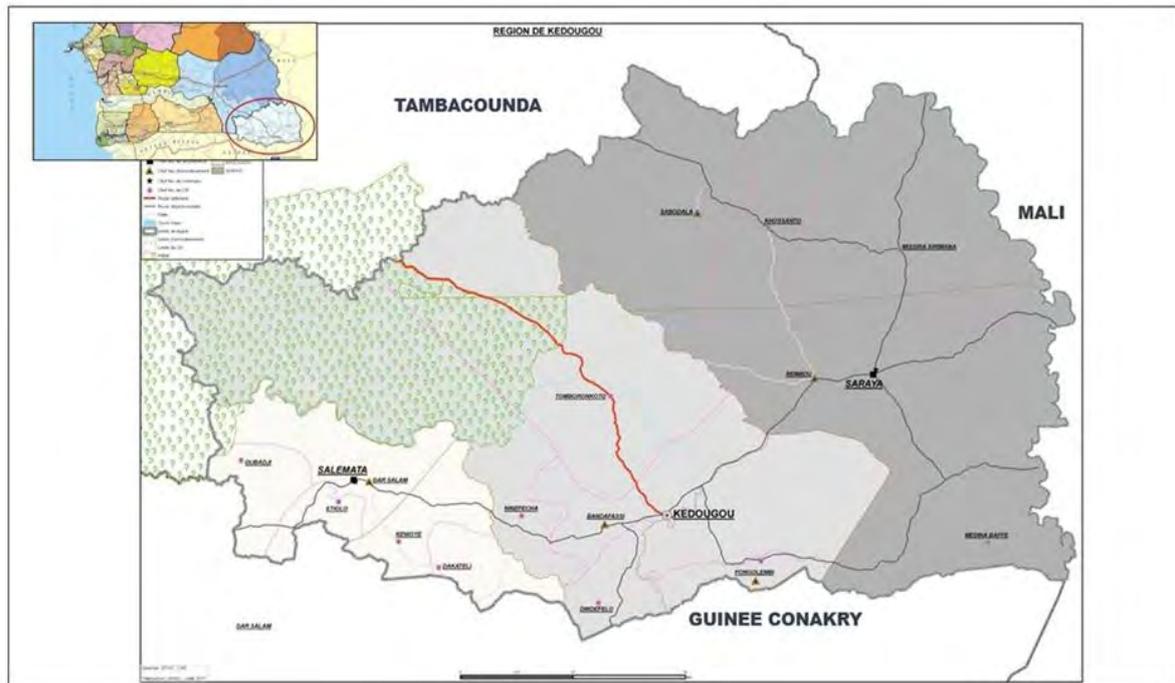


Figure 5 : Carte administrative de la région de Kédougou (ANSD, 2014)

Cette région est caractérisée par un climat de type soudano-sahélien avec deux saisons : saison sèche de Décembre à Mai et une saison des pluies de Juin à Novembre. La saison de transmission du paludisme est donc longue avec un taux d'inoculation entomologique d'environ 100 piqûres infectantes par homme et par an. Le paludisme y est endémique avec une recrudescence saisonnière. Selon le bulletin épidémiologique annuel du PNLP 2017, la région de Kédougou a enregistré environ 18,71% (74049/395706) des cas de paludisme au Sénégal, 9,73% (1018/10463 cas) ont développé un paludisme grave. Cette région a enregistré aussi 14,43% (41/284) des cas de décès liés au paludisme en 2017 (ANSD, 2014 ; PNLP, 2018). En raison de ce niveau d'endémicité, Kédougou est une des régions éligible, sélectionnée depuis 2013 par le PNLP pour l'application de la chimio prévention (CPS) du paludisme saisonnière chez les enfants de moins de 5ans.

La richesse de cette zone en ressources naturelles, telle qu'aurifère a encouragé la forte implantation de diverses communautés qui pratiquent cette activité de façon artisanale. Plus de 10 nationalités sont représentées dans cette région, avec une forte représentation des Maliens, Burkinabés, et des Guinéens. Cette affluence relative générée par l'orpaillage favorise la vente informelle de médicaments qui est un des facteurs clé de l'émergence de la chimiorésistance. En effet, elle favorise l'automédication abusive et la consommation de médicaments contrefaits. (ANSD, 2018)

II. 2. Population d'étude

Dans le cadre de notre étude, nous avons travaillé sur 150 échantillons collectés entre 2015 et 2017 dont 50 chaque année. Ces derniers sont obtenus à partir de patients atteints de paludisme simple, venus en consultation dans le centre de santé de Dalaba.

II. 2. 1. Critères d'inclusion

Les patients inclus dans notre étude ont été sélectionnés selon les critères suivants :

- Une monoinfection à *P. falciparum*, confirmée par TDR et microscopie
- Age supérieur ou égal à 6 mois
- Poids supérieur ou égal à 9 kg
- Taux d'hémoglobine supérieur ou égal à 5 g/dL
- Glucose sanguin supérieur ou égal à 40 mg/dl
- Consentement libre et éclairé

II. 2. 2. Critères de non inclusion

- Co-infection avec d'autres espèces plasmodiales
- Signes de paludisme grave ou cérébral, d'abattement physique/psychologique
- Hypersensibilité à l'Artéméther ou à la Luméfantrine
- Vomissement et/ou incapable de prendre des médicaments par voie orale
- Co-morbidité aiguë (pneumonie, la malnutrition sévère)
- Vivre à plus de 10 km du centre de santé

II. 3. Considération éthique

Le protocole de recherche avait été soumis au Comité d'Éthique National de Recherche en Santé du Sénégal et une autorisation administrative avait été aussi demandée au Ministère de la Santé et l'Action Sociale. Une lettre d'acceptation de l'étude avait aussi été adressée au Médecin Chef de District de Kédougou qui avait donné un avis favorable pour le déroulement de l'étude.

II. 4. Méthodologie

Un prélèvement de sang veineux (5 mL sur tube EDTA) a été effectué sur chaque patient éligible. Quatre (4) spots de sang ont été réalisés sur un papier filtre (Whatmann® 3MM CHR CAT N° 3030-662) pour chaque prélèvement (**Figure 6**). Ces papiers filtres ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN du parasite.



Figure 6 : Spots de sang parasité sur papier filtre

Au cours de l'étude, les marqueurs de résistance suivant : *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistance (K76T *Pfert*), *Plasmodium falciparum* multidrug résistant 1 (N86Y, Y184F, D1246Y *Pfmdr1*) et le *Kelch* (C580Y *Pfk13*) ont été génotypé. Pour cela la High Résolution Meelting (HRM) a été utilisée.

II. 4. 1. Extraction de l'ADN

L'ADN est obtenu à partir des spots de sang des papiers filtres. L'extraction est faite conformément au protocole d'extraction d'ADN à partir de papier filtre du QIA amp DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) (**figure 7**).



Figure 7 : kit d'extraction d'ADN QIA amp DNA Mini (Qiagen, Valencia, CA, USA).

II. 4. 2. La high résolution melting (HRM)

II. 4. 2. 1. Principe

La « High Résolution Melting » (HRM) ou courbe de fusion à haute résolution est une technique d'analyse post-PCR. Elle est utilisée pour identifier des variations au niveau de l'ADN.

La HRM se déroule en deux (2) étapes, une amplification (PCR) suivie d'une fusion de l'ADN amplifiée. Elle repose sur l'intégration dans l'ADN amplifié d'un fluorochrome intercalant. L'augmentation de la température programmée et progressive entraîne ainsi une dénaturation. Cette dénaturation provoque l'élimination du fluorochrome et induit donc une baisse de la fluorescence ; son extinction est totale lorsque la dénaturation est complète. Chaque séquence d'ADN aura donc, une température standard, une signature lumineuse spécifique représentée par une courbe de fusion. Un changement de la séquence d'ADN (mutation, délétion...) induit une modification de la cinétique de fusion de l'ADN, détectée par l'existence d'un autre profil. Pour une mutation inconnue, la HRM ne permettant pas d'identifier précisément la nature de cette dernière, une confirmation des résultats mutés par séquençage est nécessaire.

II. 4. 2. 2. Mode opératoire

Le light cycle 96 a été utilisé pour faire la réaction (**figure 8**). C'est un instrument destiné à réaliser une PCR rapide et précise, associé à la détection en ligne et en temps réel de colorant fluorescent se liant à l'ADN ou de sondes marquées, permettant la quantification ou la caractérisation d'un acide nucléique cible.



Figure 8 : Lightcycler 96

Nous avons utilisé des sondes spécifiques à chaque codon étudié et des amorces sens et anti-sens spécifiques à chaque marqueur (**Tableau II**). La PCR est asymétrique, elle consiste à utiliser 5 fois plus d'amorces anti-sens que d'amorces sens. L'excès de simples brins d'ADN qui en résulte sert de substrat pour la sonde.

Pour lancer une réaction HRM il faut au préalable disposer de l'ADN ensuite préparer les mélanges réactionnels.

Tableau II : Séquence des amorces et sondes (Daniels *et al.*, 2012)

Codons	Amorces sens	Amorces anti-sens	sondes
C580Y (Pfk13)	GGA ACC TTT GAA TAC CC	CAT TAG TTC CAG CAA TGA CA	AGC TAT GTG TAT TGC TTT TGA T-block
K76T (Pfcrt)	GTA AAA CGA CGG CCA GTT TCT TGT CTT GGT AAA TGT GCT CA	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GGA TGT TAC AAA ACT ATA GTT ACC AAT	GTG TAT GTG TAA TGA ATA AAA TTT TTG AC-block
N86Y (Pfmldr1)	TTA TTA TTT ATA TCA TTT GTA TGT GCT GTA TTA TCA GG	CAG GAA ACA GCT ATG ACA TCA TTG ATA ATA TAA ATT GTA CTA AAC CTA TAG ATA CT	GAA CAT GAA TTT AGG TGA TGA TAT TAA TCC GC-block
Y184F (Pfmldr1)	AGT TCA GGA ATT GGT ACG AAA TTT ATA ACA	ACG CAA GTA ATA CAT AAA GTC AAA CG	CCT TTT TAG GTT TAT ATA TTT GGT CAT GG-block
D1246Y (Pfmldr1)	GCA GAA GAT TAT ACT GTA TTT AAT AAT AAT GGA GA	TTT CAT ATA TGG ACA TAT TAA ATA ACA TGG GT	GTG ATT ATA ACT TAA GAG ATC TTA GAA ACT GG-block

II. 4. 2. 2. 1. Le mélange réactionnel

Le mélange réactionnel est constitué de lightscanner mix et d'un mélange amorces-sonde. Ce dernier comprend : les amorces sens et anti-sens, la sonde spécifique au codon étudié et de l'eau (grade water) (**Tableau III**). Ce mélange réactionnel est obtenu selon la proportion suivante : 1ul du mélange amorces-sonde dans 4 µl de lightscanner mix

Le light cycle 96 est une machine très sensible qui ne nécessite pas beaucoup d'ADN. Par conséquent, l'ADN est au préalable dilué : 5 µl d'ADN dans 75 µl d'H₂O (nulécasse free water). Chaque échantillon doit contenir 2,5 µl d'ADN dilué et 2,5 µl de master mix pour la réaction HRM. Les échantillons sont distribués sur une plaque de 96 puits. Le mélange est d'abord mixé au vortex puis centrifugé avant d'introduire la plaque dans la machine qui se charge de faire la réaction. Des contrôles sauvages et mutants sont utilisés lors de la manipulation pour l'interprétation des résultats (**Tableau IV**).

Tableau III : Composantes et volumes du mélange amorces-sonde

Réactifs	Volumes
H2O (grade water)	92 µl
Amorces sens	1 µl
Amorces anti-sens	5 µl
Sonde	2 µl

Tableau IV : Différents contrôles utilisés pour chaque codon

Marqueurs	Allèles	Contrôles sauvages	Contrôles mutants
<i>Pfk13</i>	C580Y	NF54	Clone 7
<i>Pfcrt</i>	K76T	3D7	Dd2
<i>Pfmdr1</i>	N86Y	3D7	Dd2, K1
	Y184F	3D7	TM90
	D1246Y	3D7	TM90

II. 4. 2. 2. 2. Analyse et interprétation des résultats

A la fin de la réaction, les résultats sont exploités à l'aide du logiciel LightCycler Application version 1.1.0.1320. Ils se présentent sous formes de courbes de fusion qui traduisent la variation de la fluorescence en fonction de la température (**figure 9A**). Les dérivés de ces courbes donnent deux types de courbes avec un pic chacune ; l'une représente la sonde et l'autre l'amplicon (**figure 9B**).

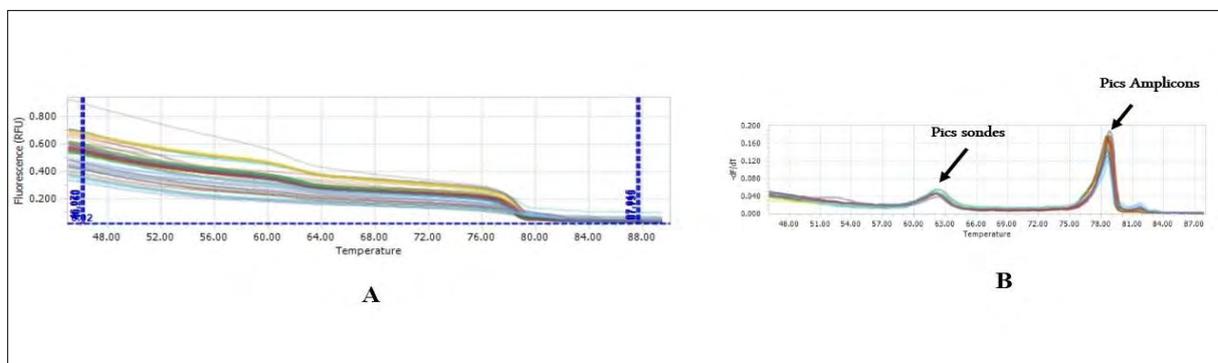


Figure 7 : Variation de la fluorescence en fonction de la température. **A :** courbes normales ;
B : dérivé des courbes normales

L'analyse et l'interprétation des résultats sont effectuées à partir des courbes de fusion de la sonde. En effet cette dernière est un oligonucléotide, donc ces courbes donnent plus de précision sur la nature de la mutation.

Ainsi après normalisation, le profil de la courbe de chaque échantillon est comparé aux profils des contrôles mutants et sauvages utilisés lors de la réaction. La comparaison des profils permet de déduire si l'échantillon présente une mutation ou non (**figure 10**). Cependant, les échantillons qui ont des profils autres que ceux des contrôles devront être séquencés pour l'identification de la mutation.

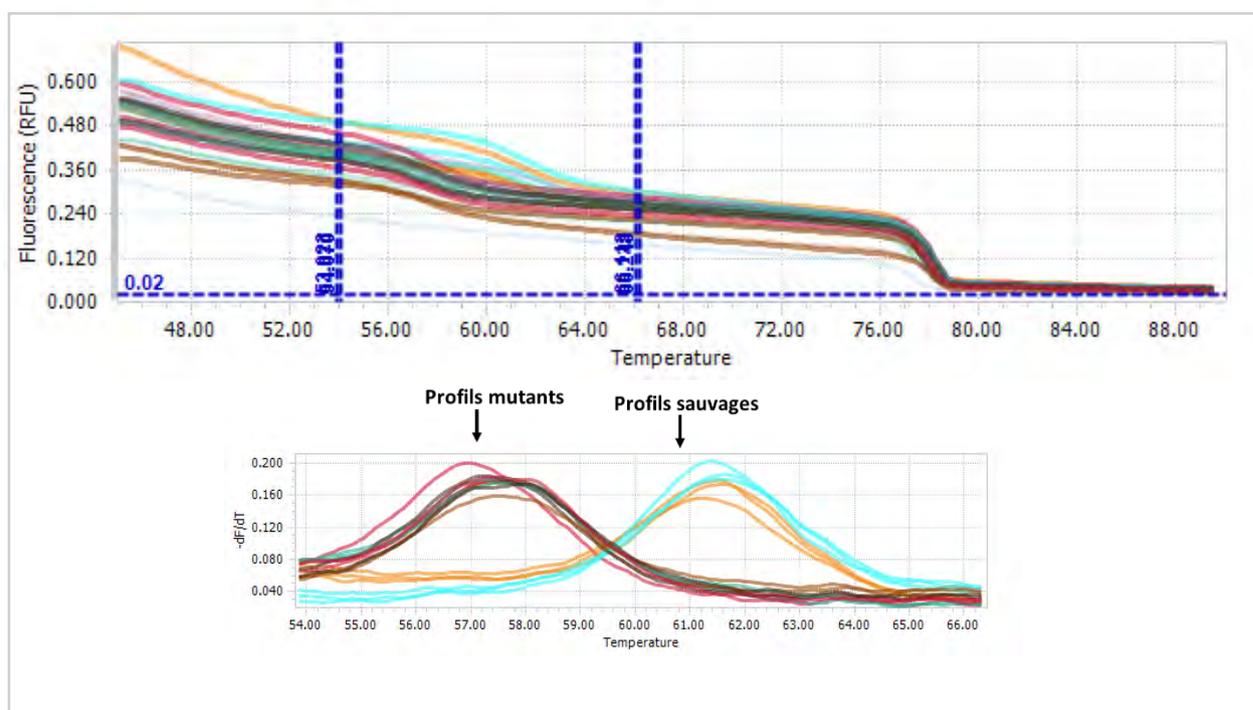


Figure 10 : Courbes de fusion de la sonde.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III. 1. Résultats

III. 1. 1. Caractéristiques de la population d'étude

Notre population d'étude était constituée par des patients âgés entre 2 et 80 ans avec une moyenne d'âge de 21 ans. Les 26% avaient plus de 25 ans ; 34% avaient un âge compris entre 6 et 14ans ; 33,33% entre 15 et 25ans et 6,67% étaient âgés de 5ans ou moins. Les patients de sexe masculin étaient plus représentés avec 52,67% (79/150) contre 47,33% (71/150) pour le sexe féminin ; soit un sex-ratio de 1,11 en faveur des hommes (**figure 11**). Ces patients avaient une parasitémie comprise entre 0,02 et 8,4%.

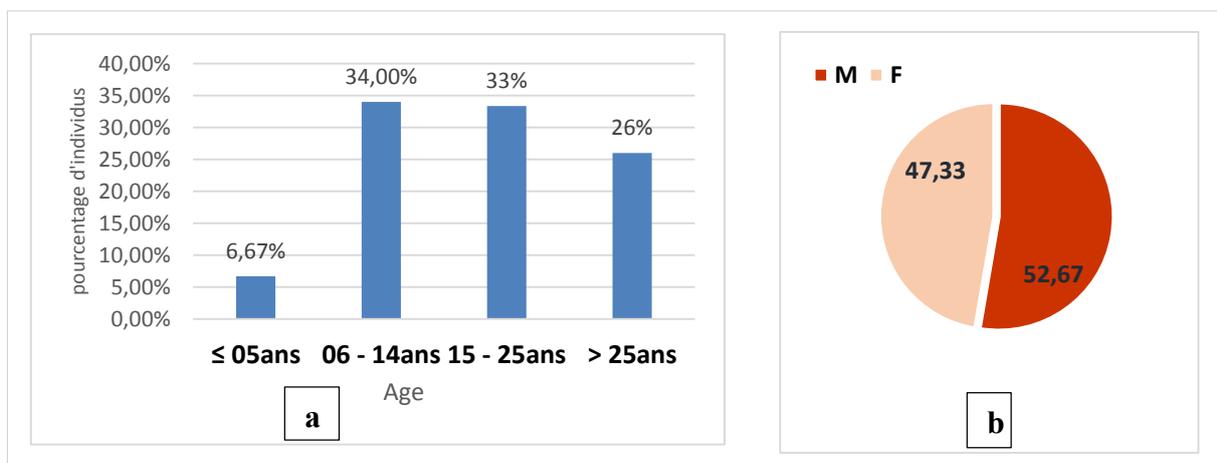


Figure 11 : Répartition de la population d'étude selon l'âge (a) et le sexe (b)

III. 1. 2. Prévalence de la mutation C580Y de *Pfk13*

Sur l'ensemble des échantillons analysés chaque année, nous n'avons pas observé la mutation C580Y (**Tableau V**). Néanmoins, nous avons identifié trois échantillons, un en 2015 et deux en 2017 avec un profil différent des profils mutant et sauvage (**figure 12**).

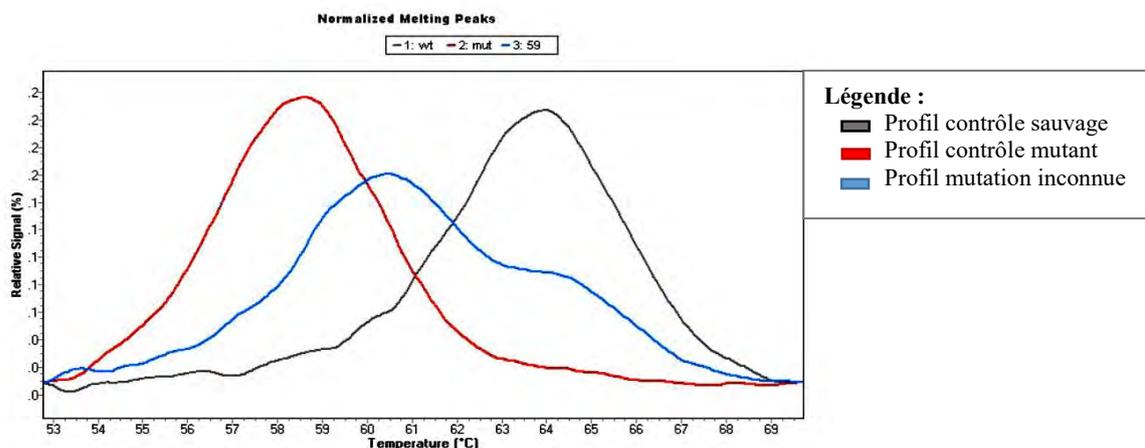


Figure 12 : Profil de la courbe des mutations inconnues

III. 1. 3. Prévalence de la mutation K76T du gène *Pfcr*

En 2015 nos résultats ont montré sur le gène *pfcr*, 57% des échantillons (24/42) présentaient l'allèle sauvage (K76), 31% (13/42) l'allèle mutant (76T) et 12% (5/42) étaient mixtes (K76T). De même en 2016, 16,33% des échantillons (8/49) avaient l'allèle mutant; 65,30% (32/49) l'allèle de type sauvage et 18,37% (9/49) présentaient une infection mixte. Enfin pour les échantillons de 2017, 24% étaient mutants (11/46), 63% (29/46) sauvages et 13% (6/46) mixtes. (Tableau V)

III. 1. 4. Prévalence des mutations au niveau des codons 86, 184 et 1246 du gène *Pfmdr1*

L'analyse des échantillons a été réussie pour chaque codon du gène *Pfmdr1*

III. 1. 4. 1. Au niveau du codon 86

La plus part des échantillons génotypés (82,14%, 115/140) portées l'allèle sauvage N86 : avec une prévalence qui est passée de 86,05% (37/43) en 2015, 77,55% (38/49) en 2016 et 83,33% (40/48) en 2017. La prévalence de l'allèle mutant 86Y était de 4,65%, 12,25% et 12,50% respectivement en 2015, 2016 et 2017 (Tableau V).

III. 1. 4. 2. Au niveau du codon 184

La prévalence de la mutation 184F était plus importante. Nous avons identifié 52,8% (25/48), 61,70% (29/47) et 58,33% (28/48) d'allèle mutant respectivement en 2015, 2016 et 2017. En revanche pour l'allèle sauvage, nous avons observé 27,08% en 2015 ; 23,40% en 2016 et 25,00% en 2017 (Tableau V).

III. 1. 4. 3. Au niveau du codon 1246

Tous les échantillons étaient pratiquement de type sauvage. Seul 1 sur les 45 échantillons génotypés avec succès en 2015 portés l'allèle mutant 1246Y. Pour les échantillons de 2016 nous avons noté 2 échantillons mutants sur 42. Par contre aucune mutation n'a été observée en 2017 ; tous les isolats analysés étaient de type sauvage (47/47) (Tableau V).

Remarque : En combinant les codons 86, 184 et 1246, dans le gène *Pfmdr1*, nous avons identifié trois haplotypes : N₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆, N₈₆Y₁₈₄D₁₂₄₆ et Y₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆ (Tableau VI).

Tableau V : Fréquence des mutations des gènes *Pfk13*, *Pfcr1* et *Pfmdr1* de 2015 à 2017

<i>codons</i>	<i>Années</i>	<i>Allèles mutants (%)</i>	<i>Allèles sauvages (%)</i>	<i>Allèles mixtes (%)</i>
C580Y	2015	0,00 (0/50)	100,0 (0/50)	0,00 (0/50)
	2016	0,00 (0/39)	100,0 (39/39)	0,00 (0/39)
	2017	0,00 (0/46)	100,0 (46/46)	0,00 (0/46)
K76T	2015	31,00 (13/42)	57,00 (24/42)	12,00 (5/42)
	2016	16,33 (8/49)	65,30 (32/49)	18,37 (9/49)
	2017	24,00 (11/46)	63,00 (29/46)	13,00 (6/46)
N86Y	2015	04,65 (2/43)	86,05 (37/43)	09,30 (4/43)
	2016	12,25 (6/49)	77,55 (38/49)	10,20 (5/49)
	2017	12,50 (6/48)	83,33 (40/48)	04,17 (2/48)
Y184F	2015	52,08 (25/48)	27,08 (13/48)	27,08 (13/48)
	2016	61,70 (29/47)	23,40 (11/47)	14,90 (7/47)
	2017	58,33 (28/48)	25,00 (12/48)	16,67 (8/48)
D1246Y	2015	02,22 (1/45)	97,77 (44/45)	00,00 (0/45)
	2016	04,76 (2/42)	95,23 (20/42)	00,00 (0/42)
	2017	00,00 (0/47)	100,0 (47/47)	00,00 (0/47)

Tableau VI : Fréquence des haplotypes au niveau du gène *Pfmdr1*

	2015	2016	2017
N₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆	72,97% (27/37)	65,00% (26/40)	60,00% (27/45)
N₈₆Y₁₈₄D₁₂₄₆	40,32% (16/37)	30,00% (12/40)	40,00% (18/45)
Y₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆	10,81% (4/37)	15,00% (6/40)	15,55% (7/45)

III. 2. Discussion

Le paludisme demeure la maladie parasitaire la plus meurtrière du monde. Pour une lutte efficace contre cette maladie, il est fondamental de disposer de médicaments antipaludiques de qualité. C'est ainsi que l'OMS recommande les combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) pour une bonne prise en charge des cas de paludisme mais aussi répondre aux phénomènes de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques utilisés. Les CTA constituent les seuls antipaludiques disponibles pour le traitement efficace des accès palustres simples. Cependant, leur efficacité est compromise suite à l'émergence et à la propagation de parasites résistants aux dérivés de l'Artémisinine en Asie du sud-est. Par conséquent, la surveillance de l'efficacité des médicaments antipaludiques est indispensable pour une bonne politique de prise en charge du paludisme. C'est ainsi que dans le cadre de notre mémoire nous avons évalué la prévalence de marqueurs moléculaires (*Pfk13*, *Pmdr1* et *Pfcr1*) associés à la résistance de *P. falciparum* aux molécules antipaludiques.

L'étude des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux médicaments antipaludiques à Kédougou nous a permis d'obtenir des résultats similaires et des résultats contradictoires à ceux d'autres études du Sénégal et d'ailleurs.

Les marqueurs moléculaires ciblés ont été étudiés par la technique d'HRM. Ce qui nous a permis de génotyper les codons 86, 184, et 1246 au niveau du gène *Pfmdr1*, le codon 76 de *Pfcr1* et le codon 580 de *Pfk13*.

Pour le codon 580 au niveau du gène *Pfk13*, l'allèle mutant 580Y n'a pas été observé durant notre étude. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Madamet et al. (2017)** lors d'une étude sur le polymorphisme du gène *Pfk13* menée à Dakar ; de même que **Talundzic et al. (2017)** à Thiès (Sénégal). Cette observation a été aussi rapportée par **Kamu et al. (2014)** dans une étude réalisée dans 12 pays d'Afrique sub-saharienne ainsi que Plucinski et ses collaborateurs en Angola en 2015 (**Plucinski et al., 2017**).

Lors de l'étude du gène *Pfk13*, nous avons identifié une autre mutation différente de la mutation 580Y. Cependant, la HRM ne donne pas d'information précise sur la nature de cette mutation. Le séquençage du gène *Pfk13* pour ces échantillons devient indispensable afin de déterminer l'allèle et son impact sur la résistance aux dérivés de l'Artémisinine.

Le *Pfk13*-C580Y peut entraîner des niveaux élevés de résistance (**Ghorbal et al., 2014** ; **Straimer et al., 2015**). Ainsi, selon Ashley et ces associés, elle est décrite comme étant la mutation majeure (représentant 80% des cas résistants) responsable de la résistance clinique aux dérivés de l'Artémisinine en Asie du Sud-Est (**Ashley et al. 2014b**). L'absence de cette

mutation dans notre étude nous permet de supposer que les dérivés de l'Artémisinine sont toujours efficaces pour le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* au Sénégal.

Pour le codon 76 au niveau du gène *Pfcrtr*, nous avons constaté une prédominance de l'allèle sauvage K76 aussi bien en 2015, 2016 qu'en 2017. Des résultats similaires ont été obtenus par **Mbaye et al. (2016)** à Thiès (Sénégal) sur des échantillons de 2012 et 2013. La même tendance a été notée par **Abiola et al. (2016)** à Pikine (Sénégal) sur des isolats de 2010 et 2012.

Cependant dans une étude réalisée par **Bertin et al. (2005)** à Thiadiaye (Sénégal), la prévalence de l'allèle mutant 76T était très élevée (75,80%) comparés à nos résultats (31% en 2015 ; 16,33% en 2016 et 24% en 2017).

Nos résultats ont montré une baisse de la fréquence de l'allèle mutant 76T ; donc un retour progressif de la sensibilité de *P. falciparum* à la Chloroquine. Cette remarque a été faite à Kilifi (Kenya) par **Mwai et al. (2009)**, au Blantyre (Malawi) par **Laufer et al. (2010)** et à Nanoro (Burkina Faso) par **Sondo et al. (2015)**. L'allèle mutant 76T est impliqué dans la chimiorésistance du parasite à la Chloroquine. En outre, des études ont montré que la réduction de la sensibilité de *P. falciparum* à l'Amodiaquine est accompagnée d'une sélection de l'allèle 76T et de l'allèle 86Y du gène *Pfmdr1* (**Happi et al., 2006 ; Djimde et al., 2008**).

Ces résultats obtenus peuvent être expliqués par l'abandon de la Chloroquine dans la prise en charge du paludisme simple au Sénégal depuis 2003.

Concernant le gène *Pfmdr1*, nous avons remarqué une faible fréquence des allèles mutants 86Y et de 1246Y; contrairement à l'allèle 184F qui était prédominant dans notre population d'étude. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Mbaye et al. (2016)** à Thiès. Dans des études menées à Dakar, **Wurtz et al. (2012)** de même que **Boussaroque et al. (2016)** avaient aussi noté une prédominance de l'allèle sauvage N86 et de l'allèle mutant 184F. La forte prévalence de l'allèle N86 a été constatée à Nanoro au Burkina Faso (**Sondo et al., 2016**) et au Mali (**Dama et al., 2017**). Cet allèle est impliqué dans la chimiorésistance de *P. falciparum* à la Luméfantrine de même à une forte sensibilité du parasite à l'amodiaquine (**Pradines et al., 2010**). Ces résultats pourraient s'expliquer d'une part par l'utilisation de la combinaison Artémether-Luméfantrine dans les CTA et d'autre part par le retrait de la Chloroquine dans la prise en charge du paludisme simple. En effet l'Artémether-Luméfantrine représente le traitement de première intention du paludisme simple au Sénégal. De plus l'allèle N86 est associé à une résistance croisée à la Chloroquine et à l'Amodiaquine (**Björkman et al., 1990 ; Pradines et al., 2010**).

Pour l'analyse des haplotypes au niveau du gène *Pfmdr1*, nous avons observé trois (3) haplotypes à savoir N₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆, N₈₆Y₁₈₄D₁₂₄₆ et Y₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆ avec une forte prévalence de

l'haplotype N₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆ (72,97% en 2015, 65% en 2016 et 60% en 2017). Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus par **Mbaye et al. (2016)** à Thiès (79% en 2012, 62,26% en 2013) et par **Plucinski et al. (2017)** en Angola. Des études *in vitro* ont montré que cet haplotype est sélectionné par une forte pression médicamenteuse dans le traitement par Artémether-Luméfantrine (**Happi et al., 2009 ; Kavishe et al., 2014**). Tandis qu'une pression d'Artésunate-Amodiaquine sélectionne l'haplotype Y₈₆Y₁₈₄Y₁₂₄₆ (**Tumwebaze et al., 2015 ; Boussaroque et al., 2016**). De plus la sélection de l'haplotype N₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆ a déjà été rapportée comme étant associée à un échec de traitement à base d'Artémether-Luméfantrine (**Some et al., 2010 ; Plucinski et al., 2015**).

Conclusion et perspectives

Le traitement du paludisme simple par les combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) occupe une place stratégique dans les processus de contrôle et d'élimination du paludisme dans le monde. Les CTA restent les seuls antipaludiques disponibles pour le traitement efficace des infections palustres simples. Par conséquent, la surveillance de l'efficacité des médicaments antipaludiques est indispensable dans les zones où le paludisme est endémique.

Ainsi, nos résultats ont montré une absence de la mutation C580Y. Ce qui permet de supposer que les dérivés de l'Artémisinine restent toujours efficaces à Kédougou (Sénégal). Nous avons également constaté une baisse de la fréquence de la mutation K76T ; donc un retour progressif de la sensibilité de *P. falciparum* à la Chloroquine.

Par ailleurs, nos résultats ont montré une prédominance des allèles sauvages N86, D1246 et de l'allèle mutant 184F de même que la présence de l'haplotype N₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆. Cet haplotype présent à des fréquences élevées suggère que l'efficacité de L'A-L est très menacée contrairement à l'ASAQ. D'où la nécessité de réduire l'usage de L'A-L au profit des autres antipaludiques (ASAQ et DHAP) sur tout l'étendue du territoire.

Au terme de ce travail nous constatons qu'il serait judicieux de mener cette étude dans plusieurs régions du pays en :

- Tenant compte des différents strates épidémiologiques et de la taille de l'échantillon ;
- Impliquant le nombre de copies du gène *Pfmdr1* ;

Nous envisageons aussi de séquencer le gène *Pfkl3* afin de déterminer la nature des mutations que nous avons identifiées lors de notre étude ; de faire des études *in vitro/ex vitro* pour

- évaluer la sensibilité de *P. falciparum* à l'Amodiaquine
- étudier le polymorphisme des gènes *Pfprt* et *Pfmdr1* et de faire une corrélation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abiola A., Ndiaye M., Tine R., Sylla K., Lo A.C., Gaye A, Lam A, Diedhiou S, Diallo M.B., Sow D., Ndiaye J.L., Faye O., Dieng Y., Gaye O. et Faye B.** (2016). Assessment of *Pfmdr1* and *Pfcr1* Mutations After Six Years of Implementation of Artemisinin-Based Combination Therapy in Dakar Senegal. *GJRA - Glob. J. Res* 5: 223-27.
2. **Anchinmane V.T., et Shedje R.T.** (2010). A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test. *As. J. Med. Sc* 1 (2): 75-79.
3. **ANSD** (2014). Situation Economique et Sociale de la Région de Kédougou, *édition 2014*. 154p
4. **ANSD** (2018). Rapport de l'étude monographique sur l'orpillage au Sénégal. 48p
5. **Ariey F., Witkowski B., Amaratunga C., Beghain J., Langlois AC., Khim Nimol., Kim S., Duru V., Bouchier C., et Ma L.** (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505 (7481): 50.
6. **Ashley E.A., Dhorda M., Fairhurst R.M., Amaratunga C., Lim P., Suon S., Sreng S., Anderson J.M., Mao S., et Sam B.** (2014). Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 371 (5): 411-23
7. **Bouchaud, O.** (2008). Mémento thérapeutique du paludisme en Afrique. Wolters Kluwer France.
8. **Boussaroque A., Fall B., Madamet M., Wade K.A., Fall M., Nakoulima A., Ba K.F., Dionne P., Benoit N., et Diatta B.** (2016). Prévalence of anti-malarial resistance genes in Dakar, Sénégal from 2013 to 2014. *Malaria journal* 15 (1): 347.
9. **Bray P.G., Hawley S.R., et Ward S.A.** (1996). 4-Aminoquinoline resistance of *Plasmodium falciparum*: insights from the study of Amodiaquine uptake. *Molecular Pharmacology* 50 (6): 155-58.
10. **Calis J.C.J., Phiri K.S., Faragher B.E., Brabin B.J., Bates I., Cuevas L.E., Haan R.J., Ajib I. Phiri, M.D., Pelani Malange, M.Sc., Mirriam Khoka, B.Sc., Paul J.M. Hulshof, M.Sc., Lieshout L.V., Beld M.G.H.M., Teo Y.Y., Rockett K.A., Richardson A., Kwiatkowski D.P., Molyneux M.E., et Hensbroek M.B.V.** (2008). Severe Anemia in Malawian Children. *N Engl J Med* 358 (9): 888-99.
11. **Cui L., Mharakurwa S., Ndiaye D., Rathod P.K., et Rosenthal Philip J.** (2015). Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. *Am J Trop Med Hyg* 93 (3): 57-68.
12. **Diagne N., Fontenille D., Konate L., Faye O., Legros F., et Lamizana M.T.** (1994). Les anophèles du Sénégal. *Bull Soc Path Exot* 87: 267-77.
13. **Djimde A.A., Fofana B., Sagara I., Sidibe B., Toure S., Dembele D., Dama S., Ouologuem D., Dicko A., et Doumbo O.K.** (2008). Efficacy, safety, and selection of molecular markers of drug resistance by two ACTs in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 78 (3): 455-61.
14. **Djimé A., Doumbo O.K., Cortese J.F., Kayentao K., Doumbo S., Diourté Y., Coulibaly D., Dicko A., Su X., et Nomura T.** (2001). A molecular marker for Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 344 (4): 257-63.
15. **Dondorp A.M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyto A.P., Tarning J., Lwin K.M., Ariey F., Hanpithakpong W., et Lee S.J.** (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361 (5): 455-67.
16. **Durrand V., Berry A., Sem R., Glaziou P., Beaudou J., et Fandeur T.** (2004). Variations in the sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* Chloroquine resistance transporter (*Pfcr1*) and their relationship to Chloroquine resistance in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 136 (2): 273-85.

- 17. Duru, Valentine.** (2017). Etudes des mécanismes cellulaires et moléculaires de *Plasmodium falciparum* impliqués dans les résistances aux combinaisons à bases de dérivés de l'Artémisinine. Université de Montpellier.
- 18. Fairhurst R.M.** 2015. Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes. *Current opinion in infectious diseases* 28 (5): 417.
- 19. Flegg J.A., Guerin P.J., White N.J. et Stepniewska K.** (2011). Standardizing the measurement of parasite clearance in *falciparum* malaria: the parasite clearance estimator. *Malar J* 10 (1): 339.
- 20. Ghorbal M., Gorman M., Macpherson C.R., Martins R.M., Scherf A. et Lopez-Rubio J.** (2014). Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. *Nature biotechnology* 32 (8): 819.
- 21. Gregson A., et Plowe C.V.** (2005). Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacological reviews* 57 (1): 117-45.
- 22. Haldar K., Bhattacharjee S. et Safeukui I.** (2018). Drug resistance in *Plasmodium*. *Nature Reviews Microbiology* 16 (3): 156.
- 23. Happi, C.T, Gbotosho G.O., Folarin O.A., Bolaji O.M., Sowunmi A., Kyle D.E., Milhous W., Wirth D.F. et Oduola A.M.J.** (2006). Association between mutations in *Plasmodium falciparum* Chloroquine resistance transporter and *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 genes and in vivo Amodiaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria-infected children in Nigeria. *N Engl J Med* 75 (1): 155-61.
- 24. Happi, C.T, Gbotosho G.O., Folarin O.A., Sowunmi A., Hudson T., O'Neil M., Milhous W., Wirth D.F. et Oduola A.M.J.** (2009). Selection of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 alleles in asexual stages and gametocytes by Artemether-Lumefantrine in Nigerian children with uncomplicated *falciparum* malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 53 (3): 888-95.
- 25. Johnson D.J., Fidock D.A., Mungthin M., Lakshmanan V., Sidhu A.B.S., Bray P.G. et Ward S.A.** (2004). Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Molecular cell* 15 (6): 867-77.
- 26. Kamau E., Campino S., Amenga-Etego L., Drury E., Ishengoma D., Johnson K., Mumba D., Kekre M., Yavo W. et Mead D.** (2014). K13-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasites from sub-Saharan Africa. *J Infect Dis.* 211 (8): 1352-55.
- 27. Kavishe R.A., Paulo P., Kaaya R.D., Kalinga A., Zwetselaar M.V., Chilongola J., Roper C. et Alifrangis M.** (2014). Surveillance of Artemether-Lumefantrine associated *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein-1 gene polymorphisms in Tanzania. *Malar J* 13 (1): 264.
- 28. Laufer M.K., Takala-Harrison S., Dzinjalama F.K., Stine O.C., Taylor T.E. et Plowe C.V.** (2010). Return of Chloroquine-susceptible *falciparum* malaria in Malawi was a reexpansion of diverse susceptible parasites. *J Infect Dis* 202 (5): 801-8.
- 29. Le Bras J, Musset L. et Clain J.** (2006). Les résistances aux médicaments antipaludiques. *Med M Infect* 36 (8): 401-5.
- 30. Madamet M., Kounta M.B., Wade K.A., Lo G., Diawara S., Fall M., Bercion R., Nakoulima A., Fall K.B., Benoit N., Gueye M.W., Fall B., Diatta B. et Pradines B.** (2017). Absence of association between polymorphisms in the *k13* gene and the presence of *Plasmodium falciparum* parasites at day 3 after treatment with Artemisinin derivatives in senegal. *Am J Trop Med Hyg* 49 (6): 754-56.
- 31. Mbaye A, Dieye B., Ndiaye Y.D., Bei A.K., Muna A., Deme A.B., Yade M.S., Diongue K., Gaye A. et Ndiaye I.M.** (2016). Selection of N₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆ haplotype of *Pfmr1* gene by Artemether-Lumefantrine drug pressure on *Plasmodium falciparum* populations in Senegal. *Malar J* 15 (1): 433.

32. **Ménard D., Khim N., Beghain J., Adegnika A.A., Shafiul-Alam M., Amodu O., Rahim-Awab G. et al.** (2016). « A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms ». *N Engl J Med* 374 (2453): 64.
33. **Milne L.M., MS Kyi, PL Chiodini et DC Warhurst.** (1994). « Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. » *Journal of clinical pathology* 47 (8): 740-42.
34. **Moody A.H. et Chiodini P.L.** (2002). Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. *British J Biomed Sc* 59 (4): 228-31.
35. **Mwai L., Ochong E., Abdirahman A., Kiara S.M., Ward S., Kokwaro G., Sasi P., Marsh K., Borrmann S. et Mackinnon M.** (2009). Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. *Malar J* 8 (1): 106.
36. **Noedl H., Se Y., Schaecher K., Smith B.L., Socheat D. et Fukuda M.M.** (2008). Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 359 (24): 2619-20.
37. **Nosten F. et White N.J.** (2007). Artemisinin-based combination treatment of *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 77 (6_Suppl): 181-92.
38. **Nsanzabana C., Djalle D., Guérin P.J., Ménard D. et González I.J.** (2018). Tools for surveillance of anti-malarial drug resistance: an assessment of the current landscape. *Malar J* 17 (1): 75.
39. **OMS.** (2015a). Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization. 317p
40. **OMS** (2015b). *Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016–2030*. Genève: Organisation mondiale de la santé. 39p
41. **OMS.** (2016). Rapport sur le paludisme dans le monde en 2015 Résumé. Genève: Organisation mondiale de la santé. 32p
42. **OMS** (2017a). Artemisinin and Artemisinin-based combination therapy resistance. Global malaria programme. 11p
43. **OMS** (2017b). World malaria report 2017. Geneva: World Health Organization. 169p
44. **OMS** (2018). World malaria report 2018. Geneva: World Health Organization. 210p
45. **Petersen I., Eastman F. et Lanzer M.** (2011). Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS letters* 585 (11): 1551-62.
46. **Picot S., Oliaro P., Monbrison F., Bienvenu A., Price R.N., et Ringwald P.** (2009). A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in *falciparum* malaria. *Malar J* 8 (1): 89.
47. **Plucinski M.M., Talundzic E., Morton L., Dimbu PR., Macaia AP., Fortes F., Goldman I., Lucchi N., Stennies G., MacArthur JR., Udhayakumar V.** (2015). Efficacy of Artemether-Lumefantrine and Dihydroartemisinin-Piperaquine for treatment of uncomplicated malaria in children in Zaire and Uige Provinces, Angola. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(1): p. 437-43.
48. **Plucinski M.M., Dimbu P.R., Macaia A.P., Ferreira C.M., Samutondo C., Quivinja J., Afonso M., Kiniffo R., Mbounga E. et Kelley J.S.** (2017). Efficacy of Artemether-Lumefantrine, Artesunate-Amodiaquine, and Dihydroartemisinin-Piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Angola, 2015. *Malar J* 16 (1): 62.
49. **PNLP** (2013). Directives nationales de prévention et de prise en charge du paludisme. 24p
50. **PNLP** (2015). Plan stratégique national de lutte contre le paludisme au Sénégal 2016-2020. 171p
51. **PNLP** (2018). Bulletin épidémiologique annuel 2017 du paludisme au Sénégal. 40p

- 52. Pongponratn E., Turner G.D.H., Day N.P.J., Phu N.H., Simpson J.A., Stepniewska K., Mai N.T.H., Viriyavejakul P., Looareesuwan S. et Hien T.T. (2003).** An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 69 (4): 345-59.
- 53. Pradines B., Dormoi J., Briolant S., Bogreau H. et Christophe Rogier. (2010).** La résistance aux antipaludiques. *Revue francophone des laboratoires*, n° 422: 51-62.
- 54. Robert A, Benoit-Vical F., Claparols C. et Meunier B. (2005).** « The antimalarial drug Artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (38): 13676-80.
- 55. Sanchez C.P., McLean J.E., Stein W. et Lanzer M. (2004).** Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in Chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry* 43 (51): 16365-73.
- 56. Shah N.K., Dhillon G.P.S., Dash A.P., Arora U., Meshnick S.R. et Valecha N. (2011).** Antimalarial drug resistance of *Plasmodium falciparum* in India: changes over time and space. *The Lancet infectious diseases* 11 (1): 57-64.
- 57. Sisowath C., Ferreira P.E, Bustamante L.Y., Dahlström S., Mårtensson A., Björkman A., Krishna S. et Gil J.P. (2007).** The role of *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* tolerance to Artemether-Lumefantrine in Africa. *Tropical Medicine & International Health* 12 (6): 736-42.
- 58. Some, A.F., Sere Y. Y., Dokomajilar C., Zongo I., Rouamba N., Greenhouse B., Ouedraogo JB., et Rosenthal P. J. (2010).** Selection of known *Plasmodium falciparum* resistance-mediating polymorphisms by Artemether-Lumefantrine and Amodiaquine-Sulfadoxine-Pyrimethamine but not Dihydroartemisinin-Piperaquine in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(5): 1949-54.
- 59. Sondo P., Derra K., Nakanabo S.D., Tarnagda Z., Kazienga A., Zampa O., Valéa I., Sorgho H., Owusu-Dabo E. et Ouédraogo JB. (2016).** Artesunate-Amodiaquine and Artemether-Lumefantrine therapies and selection of *Pfprt* and *Pfmdr1* alleles in Nanoro, Burkina Faso. *PLoS One* 11 (3): e0151565.
- 60. Sondo P., Derra K., Tarnagda Z., Nakanabo S.D., Zampa O, Kazienga A., Valea I., Sorgho H., Ouedraogo J. et Guiguemde T.R. (2015).** Dynamic of *Plasmodium falciparum* Chloroquine resistance transporter gene *Pfprt* K76T mutation five years after withdrawal of Chloroquine in Burkina Faso. *Pan African Medical Journal* 21 (1).
- 61. Straimer J., Nina F.G., Witkowski B., Amaratunga C., Duru V., Ramadani A.P., Dacheux M., Khim N., Zhang L. et Lam S. (2015).** *K13-propeller* mutations confer Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science* 347 (6220): 428-31.
- 62. Talundzic E., Ndiaye Y. D., Deme A. B., Olsen C., Patel D. S., Biliya S., Daniels R., Vannberg F.O., Volkman S. K., Udhayakumar V., Ndiaye D. (2017).** The molecular epidemiology of *Pfk13* mutations in Senegal using targeted amplicon deep sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (3): e02116.
- 63. Talisuna A.O., Bloland P. et d’Alessandro U. (2004).** History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clinical microbiology reviews* 17 (1): 235-54.
- 64. Thompson, P.E. et L.M Werbel. (1972).** Antimalarial agents: chemistry and pharmacology. *Academic Press Inc*, New York.
- 65. Tumwebaze P., Melissa D.C., Walakira A., LeClair N., Byaruhanga O., Nakazibwe C., Kozak B., Bloome J., Okiring J., et Kakuru A. (2015).** Impact of antimalarial treatment and chemoprevention on the drug sensitivity of malaria parasites isolated from Ugandan children. *Antimicrob Agents Chemother* 59 (6): 3018-30.
- 66. Wellem T.E. et Plowe C.V. (2001).** Chloroquine-resistant malaria. *J infect dis* 184 (6): 770-76.

67. White, N.J., Pukrittayakamee S., Hien T.T., Faiz M.A., Mokuolu O.A. et Dondorp A.M. (2013). Malaria. *The Lancet* 383 (9918): 723-35.
68. Witkowski B., Amaratunga C., Khim N., Sreng S., Chim P., Kim S., Lim P., Mao S., Sopha C. et Sam B. (2013). Novel phenotypic assays for the detection of Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *The Lancet infectious diseases* 13 (12): 1043-49.
69. Witkowski B., Duru V., Khim N., Ross L.S., Saintpierre B., Beghain J., Chy S., Kim S., Ke S., et Kloeung N. (2017). A surrogate marker of Piperaquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype–genotype association study. *The Lancet Infectious Diseases* 17 (2): 174-83.
70. Witkowski B., Lelièvre J., Barragán M.J.L., Laurent V., Su XZ., Berry A. et Benoit-Vical F. (2010). Increased tolerance to Artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 54 (5): 1872-77.
71. Woodrow C.J., Dahlström S., Cooksey R, Flegg J.A., Le Nagard H., Mentré F., Murillo C., Ménard D., Nosten F., et Sriprawat K. (2013). High-throughput analysis of antimalarial susceptibility data by the WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) in vitro analysis and reporting tool. *Antimicrob Agents Chemother* 57 (7): 3121-30.
72. Wurtz N., Fall B., Pascual A., Diawara S., Sow K., Baret E., Diatta B., Fall K.B., Mbaye P.S., et Fall F. (2012). Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Dakar, Senegal. *Malar J* 11 (1): 197.

WEBOGRAPHIE

73. DrugBank (2018). [En ligne]. LUMEFENTRINE. Disponible sur «<https://www.drugbank.ca/drugs/DB06708>». Consulté le 14/03/2019.
74. ANOFEL (2014). [En ligne]. Paludisme. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. Disponible sur «<http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf>». Consulté le 10/11/2018.
75. OMS (2009). [En ligne]. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva, World Health Organization. Disponible sur «http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44048/1/9789241597531_eng.pdf». Consulté le 10/11/2018.
76. OMS (2019). [En ligne]. Diagnostic du paludisme. Geneva, World Health Organization. Disponible sur «<https://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/fr/>». Consulté le 20/08/2019.

Titre : Surveillance des marqueurs moléculaires de *Plasmodium falciparum* associés à la résistance aux molécules antipaludiques dans la région de Kédougou (Sénégal).

Nature du mémoire : Diplôme de Master 2 en Biologie Animale, Spécialité Parasitologie

Nom du candidat : Alphonse Birane THIAW

Jury :

Président : M. Bhen Sikina TOGUEBAYE Professeur Titulaire, FST/UCAD

Membres : Mme Yaye Dié NDIAYE Chercheur CHUALD/Dakar

M. Gora Diop Maitre-Assistant, FST/UCAD

M. Mame Cheikh SECK Maitre-Assistant, FMPO/UCAD

M. Arfang DIAMANKA Maitre-Assistant, FST/UCAD

Résumé

La chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux médicaments antipaludiques constitue un des obstacles majeurs dans le processus de contrôle et d'élimination du paludisme dans le monde. Etudier les marqueurs moléculaires de résistance est un aspect important permettant de détecter, prédire l'émergence d'une chimiorésistance et de surveiller aussi en temps réel la résistance. D'où l'intérêt d'étudier les marqueurs moléculaires (*Pfk13*, *Pfmdr1*, *Pfcr1*) impliqués dans la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux médicaments antipaludiques. Pour ce faire, nous avons utilisé la High Resolution Melting (HRM) pour évaluer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance. La mutation C580Y n'a pas été retrouvée mais une autre mutation qui reste à être identifiée, a été observée au niveau du gène *Pfk13*. Une baisse de la fréquence de la mutation K76T au niveau du gène *Pfcr1* a été notée. Pour le gène *Pfmdr1*, une prédominance des allèles sauvages N86 et D1246 et de l'allèle mutant 184F de même que la présence de l'haplotype N₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆, N₈₆Y₁₈₄D₁₂₄₆ et Y₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆.

Mots clés : Paludisme, *Plasmodium falciparum*, Marqueurs moléculaires, HRM, Antipaludique.

Abstract

The resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs is one of the major obstacles in the process of controlling and eliminating malaria in the world. Studying molecular markers of resistance is an important aspect to detect, predict the emergence of drug resistance and also monitor in real time the resistance. Hence our interest in studying molecular markers (*Pfk13*, *Pfmdr1*, *Pfcr1*) involved in the chemoresistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. To do this, we used High Resolution Melting (HRM) to evaluate the prevalence of molecular markers of resistance. The C580Y mutation was not found but another mutation that remains to be identified was observed on the *Pfk13* gene. A decrease in the frequency of the K76T mutation on the *Pfcr1* gene was noted. For the *Pfmdr1* gene, a predominance of the wild-type N86 and D1246 and mutant 184F alleles was observed, as well as the presence of the N₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆, N₈₆Y₁₈₄D₁₂₄₆ and Y₈₆F₁₈₄D₁₂₄₆ haplotypes.

Keywords : Malaria, *Plasmodium falciparum*, Molecular markers, HRM, Drug.

