



**HAL**  
open science

# Polymorphisme des gènes Chloroquine Resistance Transporter (crt), dihydrofolate reductase (dhfr) et Kelch13 propeller (K13 propeller) de Plasmodium falciparum dans la salive et les urines chez le sujet atteint de paludisme

Olefongo Dagnogo

## ► To cite this version:

Olefongo Dagnogo. Polymorphisme des gènes Chloroquine Resistance Transporter (crt), dihydrofolate reductase (dhfr) et Kelch13 propeller (K13 propeller) de Plasmodium falciparum dans la salive et les urines chez le sujet atteint de paludisme. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire), 2018. Français. NNT : . tel-02358468

**HAL Id: tel-02358468**

**<https://theses.hal.science/tel-02358468>**

Submitted on 12 Nov 2019

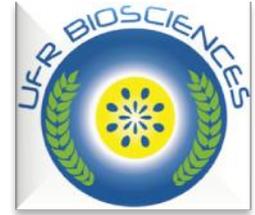
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE  
*Union-Discipline-Travail*

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de  
Pharmacodynamie – Biochimique

Année Universitaire  
2017-2018

# THESE

Présentée pour l'obtention du titre de Docteur de  
l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

**Spécialité : Biologie Fonctionnelle et Moléculaire**

Numéro d'ordre  
2107 / 2018

**DAGNOGO OLEFONGO**

Polymorphisme des gènes *Chloroquine Resistance Transporter (crt)*, *dihydrofolate reductase (dhfr)* et *Kelch13 propeller (K13 propeller)* de *Plasmodium falciparum* dans la salive et les urines chez le sujet atteint de paludisme

Soutenue publiquement  
Le 23 Mars 2018

## Commission du jury

DOSSO Mireille	Professeur Titulaire	UFHB	Président
DJAMAN Allico Joseph	Professeur Titulaire	UFHB	Directeur
N'NAN Oulo Epouse ALLA	Maître de Conférences	UFHB	Rapporteur
SILUE Souleymane	Maître de Conférences	UPGC	Rapporteur
DJOHAN Vincent	Maître de Conférences Ag.	UFHB	Examineur

## **DEDICACES**

### **A mon Dieu,**

Voici le fruit des efforts fournis à la mesure des talents et grâces que Tu as daignés m'accorder. Puisses-Tu accepter l'humble expression de ma gratitude pour Ta bonté.

### **A mes défunts Père et Mère**

Feu DAGNOGO Oufongo et Feue OUATTARA Tiépé,

Les mots me manquent pour vous témoigner mon amour et ma reconnaissance. Ce travail est entièrement le vôtre. Votre amour et dévouement envers vos enfants ont été sans égaux. Merci de m'avoir toujours soutenu, encouragé dans mes études et pour les sacrifices que vous avez consentis pour l'éducation de vos enfants. Continuez toujours à prier pour nous à partir de votre nouvelle demeure.

### **A mon directeur de thèse**

Mr DJAMAN Allico Joseph,

Pour m'avoir confié ce projet,

Pour m'avoir fait partager votre expérience scientifique,

Pour avoir encadré ce travail avec autant de confiance, de respect et d'humanité,

Cette thèse est aussi la vôtre.

### **A mon épouse**

KONE Epse DAGNOGO Porytio

Ton soutien avant et tout au long de mon inscription à cette thèse a été inestimable. Tu m'as toujours pardonné les moments où je ne me suis pas rendu disponible pour toi et nos chouchous DAGNOGO Otian Gilchrist, DAGNOGO Dodjomo Ariel et DAGNOGO Nababin Ghamiel. Le travail accompli aujourd'hui est aussi le tiens et j'espère qu'il renforcera davantage notre amour. J'espère qu'il sera aussi un exemple pour nos enfants. Je vous embrasse et que Dieu vous bénisse..

### **A mes frères et sœurs**

Votre grande complicité m'a permis d'être à cette étape. Ce travail résulte en partie de vos modestes contributions individuelles.

Merci pour vos prières persévérantes et pour l'égard que vous ne cessez de me témoigner...

## REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, et notamment :

### **\* A mon Directeur de Thèse, Professeur DJAMAN Allico Joseph**

Professeur Titulaire de Biochimie-parasitologie (UFR Biosciences), Directeur du laboratoire de Pharmacodynamie-biochimique, chef du Département de Biochimie Clinique et Fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Il me faut d'abord vous remercier d'avoir accepté de diriger ce travail malgré vos multiples occupations. Votre grande disponibilité, votre rigueur dans le travail, vos qualités humaines et votre érudition sont autant de caractères que forcent le respect et l'admiration.

Je vous remercie de la confiance que vous m'avez faite en me proposant ce travail. J'ai vite apprécié vos qualités scientifiques, humaines et surtout votre amour pour le travail bien fait. Ces qualités couplées à votre simplicité et votre générosité font de vous un directeur exemplaire. Homme de terrain, vous avez cultivé en moi l'esprit d'équipe, le dévouement, l'endurance et la persévérance; des qualités sans doute indispensables à la réalisation d'un travail scientifique et qui m'aideront dans les combats futurs. Je suis très honoré d'être parmi vos élèves. Soyez assuré cher directeur, de ma profonde gratitude et de mes sincères remerciements.

Je voudrais exprimer mes remerciements aux membres du jury de cette thèse pour avoir accepté de juger et corriger ce travail malgré les charges qui sont les leurs.

Je remercie également les membres du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët Boigny (UFHB) de Cocody ; ce sont : Messieurs les Professeurs **DJAMAN Allico Joseph, N'GUESSAN Jean David, COULIBALY Adama** et **YAPI Houphouët Félix**, Professeurs Titulaires, Messieurs les Professeurs **BAHI Calixte, KRA Adou Mathieu, OUATTARA Karamoko, TREBISSOU Johnson Jean Noël, YAPO Adou Francis, BIDIE Alain Dit Philippe, YEO Dodéhé, COULIBALY founzégué Amadou** et **DOUMBIA Idrissa**, Maîtres de Conférences, Mesdames et Messieurs les Docteurs **DJYH Bernard Nazaire, THES Péhé Marie Epse SOUMAHORO, BLA Kouakou Brice, BAGRE Issa, AHUA Maximin, OUATTARA Sitapha** et **KOUASSI Kouakou Serge**, Maîtres-Assistants,

Mesdames et Messieurs les Docteurs **AKAKPO Akué Joël**, **ASSOHOU Constance Epse LUTY** et **KIPRE Gueyraud Rolland**, Chargés de Recherche,

Mesdames et Messieurs les Docteurs **PAKORA Gilles Alex**, **KOUASSI Konan** et **AGRE Don Josette Epse KOUADIO**, Assistants,

Madame **COULIBALY Salimata Epse KONE**, Professeure certifiée (détachée),

Je vous remercie pour votre gentillesse, vos encouragements et votre sympathie. Je vous suis reconnaissant pour votre soutien et vos conseils.

Je remercie aussi l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI), avec à sa tête madame **Mireille BRETIN-DOSSO**, Professeur Titulaire de Microbiologie à l'UFR Sciences Médicales de l'UFHB qui a fait de cet institut un pôle Ouest-africain de référence en matière de recherche scientifique et biomédicale. Merci de m'avoir donné l'opportunité de bénéficier de votre plateau technique tout en acceptant de m'accueillir au sein de votre illustre institution dans le cadre de cette thèse.

Je remercie particulièrement le Docteur **TOURE Offianan André**, Maître de Recherches et le Docteur **AKO Ako Aristide Berenger**, Attaché de Recherche, du département de Parasitologie Mycologie de l'IPCI. Votre esprit méthodique, vos suggestions et vos conseils ont été d'un apport indéniable dans la finalisation de cette thèse. Je vous remercie du plus profond du cœur.

Je remercie et suis reconnaissant à tous les membres du département de Biochimie Clinique et Fondamentale de l'IPCI et particulièrement aux Professeurs **EDJEM** et **FOUNZEGUE**, aux Docteurs **BOYVIN**, **MEITE**, **M'BOH** et **BAHI**, aux Doctorants **KIPRE**, **N'GUESSAN**, **AYEKOUE**, **N'ZI**, **AKRE**, **YEO** et tous les Techniciens département.

J'exprime également ma gratitude à tous les autres membres du département de Parasitologie Mycologie de l'IPCI et particulièrement aux Docteurs **JAMBOU**, **BEOUROU**, **TUO**, **LANDRY** et **HIRA**.

Je ne saurais oublier les Docteurs **N'GAZOA** et **N'GOLO DAVID** et **MEITE** de la Plate Forme de Biologie Moléculaire de l'IPCI

Je remercie le Docteur **TOURE Kalpi Julien**, Chargé de Recherches à l'IPCI pour m'avoir accordé son bureau pendant toute la période de mon stage doctoral. Merci pour votre soutien.

Je me réjouis également de la collaboration des techniciens-biologistes de la Plate Forme de Biologie Moléculaire de l'IPCI que sont **M. SYLLA**, **M. YAVO**, **Mme MAMBE** et **HELENE**.

Je remercie également Monsieur **DIARRASSOUBA Nafan**, Maître de Conférences de Génétique et Directeur de l'UFR des Sciences Biologiques de l'Université Péléforo Gon Coulibaly (UPGC) de Korhogo pour ses conseils avisés pendant tout mon parcours scolaire et universitaire.

Je tiens également à exprimer ma vive reconnaissance à Monsieur **DAGO Dougba Noel**, Maître Assistant à l'UFR des Sciences Biologiques de l'UPGC de Korhogo. Vos conseils et suggestions ont été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail. Je vous remercie du plus profond du cœur.

Je tiens en particulier à remercier Monsieur **ZIE DAGNOGO**, « Notre frère aîné » qui a cru en moi et m'a soutenu durant toutes ces années d'études.

Je n'oublie pas mon frère **DIARRASSOUBA Siriky**, Maître Assistant à l'UFR Mathématiques et Informatique de l'UFHB. Merci cher frère pour tes conseils avisés et ton soutien pendant toutes ces années,

Je remercie de façon très particulière, tous les Techniciens et Ingénieurs biologistes des Hôpitaux Généraux de Port-Bouët et Ayamé et ceux de la Formation sanitaire urbaine à base communautaire d'Anonkoua-kouté pour la bonne collaboration pendant la collecte des échantillons.

#### **A mes amis et collègues**

Je ne vous remercierai jamais assez pour l'implication personnelle, la motivation, le soutien spirituel, moral et matériel apporté. Puisse Dieu, dans sa grande miséricorde, se souvenir toujours de vous.

## **AVANT PROPOS**

Ce travail s'inscrit dans le cadre du programme de recherche portant sur l'étude des chimiorésistances en Côte d'Ivoire. Il nous a permis d'explorer une méthode non invasive de prélèvement d'échantillons pour l'étude du polymorphisme des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques dans trois localités du pays. Le travail a été réalisé grâce à une excellente collaboration entre le Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët Boigny dirigé par le Professeur DJAMAN Allico Joseph et plusieurs institutions dont:

- L'unité de paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.
- L'Université Paris Descartes (France); Unité Mixte de Recherche 216 (UMR 216, CNRS ).
- L'Université de Technologie de Compiègne (France); Laboratoire Génie Enzymatique et Cellulaire (GEC)

Elle a servi de cadre à la réalisation du séquençage des produits d'amplification.

## TABLE DES MATIERES

	Pages
<b>Dédicaces</b> .....	I
Remerciements.....	II
Avant propos.....	V
Table des matières.....	VI
Liste des abréviations.....	IX
Liste des tableaux.....	XII
Liste des figures.....	XIV
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>I- GENERALITES</b> .....	7
<b>I-1- LE PALUDISME</b> .....	8
I-1-1. Définition et classification phylogénétique.....	8
I-1-2. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> .....	8
I-1-3- Epidémiologie du paludisme.....	12
I-1-4- Diagnostic biologique du paludisme.....	17
I-1-5- Cibles thérapeutiques.....	19
I-1-6- Antipaludiques.....	24
I-1-7- Mode d'action des antipaludiques.....	28
I-1-8- Méthodes d'études de la chimiorésistance.....	36
I-1-9- Résistance aux antipaludiques.....	38

<b>I-2- LA SALIVE ET L'URINE COMME OUTILS DE DIAGNOSTIC DU PALUDISME.....</b>	<b>49</b>
I-2-1- Salive.....	50
I-2-2- Urine.....	51
<b>II- MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>54</b>
<b>II-1- SITES DE L'ETUDE.....</b>	<b>55</b>
II-1-1- Anonkoua-Kouté.....	55
II-1- 2- Port-Bouët.....	55
II-1-3- Ayamé.....	56
<b>II-2- MATERIEL.....</b>	<b>58</b>
II-2-1- Matériel biologique.....	58
II-2-2- Gènes de <i>Plasmodium falciparum</i> amplifiés.....	58
II-2-3- Autres matériels.....	59
<b>II-3- METHODE.....</b>	<b>62</b>
II-3-1- Critères d'inclusion.....	62
II-3-2- Déroulement de l'étude.....	62
II-3-3- Questions éthiques et réglementaires.....	63
II-3-4- Collecte des échantillons.....	63
II-3-5-Examen microscopique des parasites.....	64
II-3-6- Techniques de biologie moléculaire.....	65
II-3-7- Analyse des résultats.....	72
<b>III- RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>77</b>

<b>III-1- RESULTATS.....</b>	<b>78</b>
III-1-1- Evaluation de la performance de la salive et de l'urine pour l'étude des marqueurs de résistance aux antipaludiques.....	78
III-1-2- Analyse comparée de la performance de la salive, l'urine et le sang pour la détection des gènes de résistance aux antipaludiques.....	87
III-1-3-Polymorphisme des gènes <i>pfcr</i> , <i>pfdhfr-ts</i> et <i>pf K13 propeller</i> sur l'ensemble des sites d'étude.....	95
III-1-4- Etude de la relation entre les produits biologiques : Cas de la résistance à la pyriméthamine avec le gène <i>pfdhf</i> .....	108
III-1-5- Etude du polymorphisme des gènes <i>pfdhfr</i> , <i>pfcr</i> et <i>K13 propeller</i> à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé.....	112
<b>III-2- DISCUSSION.....</b>	<b>116</b>
III-2-1- Performance de détection de l'ADN plasmodial dans la salive, les urines et le sang.....	116
III-2-2-Surveillance de la chimiorésistance à la sulfadoxine-pyriméthamine, à la chloroquine et aux dérivés de l'artémisinine.....	119
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>126</b>
<b>RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>129</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>131</b>
<b>ANNEXES</b>	

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>°C</b>	:	Dégré Celsius
<b>ADN</b>	:	Acide désoxyribonucléique
<b>AQ</b>	:	Amodiaquine
<b>ARN</b>	:	Acide Ribonucléique
<b>ASAQ</b>	:	Artésunate-Amodiaquine
<b>ATP</b>	:	Adénosine triphosphate
<b>BET</b>	:	Bromure d'éthidium
<b>BSA</b>	:	Bovin serum albumin
<b>CCD</b>	:	Charge Couple Dispositif
<b>CEDEAO</b>	:	Communauté Economique des Etats de l'Afrique de l'Ouest
<b>CI50</b>	:	Concentration inhibitrice à 50%
<b>C3</b>	:	Fraction C3 du complément
<b>CK</b>	:	Cellules de Kupffer
<b>CQ</b>	:	Chloroquine
<b>CQR</b>	:	Chloroquinorésistant
<b>CSP</b>	:	<i>Circumsporozoit surface protein</i>
<b>CTA</b>	:	Combinaisons Thérapeutiques à base de dérivés d'Artémisinine
<b><i>dhfr-ts</i></b>	:	<i>dihydrofolate réductase-thymidylate synthétase</i>
<b>dGTP</b>	:	Désoxyguanine triphosphate
<b>DP</b>	:	Densité parasitaire
<b>DHOD</b>	:	dihydro-orotate déshydrogénase
<b>DNA Pol</b>	:	ADN Polymerase
<b>DHFR-TS</b>	:	Protéine codée par <i>dhfr-ts</i>
<b><i>dhps</i></b>	:	<i>dihydroptérote synthétase</i>
<b>DNTP</b>	:	Désoxyribonucléotide triphosphate
<b>dTMP</b>	:	Désoxythymidine monophosphate
<b>dUMP</b>	:	Desoxyuracilemonophosphate
<b>EDTA</b>	:	Ethylène diamine tétra-acétate
<b>ELISA</b>	:	Enzyme-linked immunoabsorbant assay
<b>FBH</b>	:	Fièvre bilieuse hémoglobinurique
<b>FPP</b>	:	Ferriprotoporphyrine
<b>FSUCOM</b>	:	Formation sanitaire urbaine à base communautaire
<b>GE/FS</b>	:	Goutte épaisse et de frottis sanguin

<b>HRP</b>	:	<i>Histidine Rich Protein</i>
<b>IC 95 %</b>	:	Intervalle de confiance 95 %
<b>Ig</b>	:	Immunoglobuline
<b>INS</b>	:	Institut National de la Statistique
<b><i>K13 propeller</i></b>	:	<i>Kelch 13 propeller</i>
<b>kb</b>	:	Kilobase
<b>MilliQ</b>	:	Eau permutée filtrée sur membrane millipore
<b>MSHP</b>	:	Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique
<b>MSLS</b>	:	Ministère de la Santé et de la Lutte contre le Sida
<b>MSP</b>	:	<i>Merozoit surface protein</i>
<b>NAD</b>	:	Nicotinamide adénosine dinucléotide
<b>OMS</b>	:	Organisation Mondiale de la Santé
<b>OMS/AFRO</b>	:	Organisation Mondiale de la Santé /Region Afrique de l'Ouest
<b>PABA</b>	:	Para-Amino benzoïc acid
<b>PBS</b>	:	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	:	Polymerase chain reaction
<b><i>pfatp6</i></b>	:	<i>Plasmodium falciparum</i> atpase 6
<b>PFATPase6</b>	:	Protéine codée par <i>pfatp6</i>
<b><i>pfert</i></b>	:	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine résistance transporter
<b>PfCRT</b>	:	Protéine codée par <i>pfert</i>
<b>PfDHPS</b>	:	Protéine codée par <i>pfdhps</i>
<b>PfLDH</b>	:	Enzyme de la lactate déshydrogénase de <i>Plasmodium falciparum</i>
<b><i>pfmdr</i></b>	:	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug résistance
<b><i>pfnhe</i></b>	:	<i>Plasmodium falciparum</i> natrium hydrogen exchanger (gène)
<b>PfNHE</b>	:	Protéine codée par <i>pfnhe</i>
<b>PfSHMT</b>	:	Serine hydroxyméthyl transférase de <i>Plasmodium falciparum</i>
<b>pgh</b>	:	P-glycoprotéine homologue
<b>PH</b>	:	Potentiel d'Hydrogène
<b>pLDH</b>	:	<i>Plasmodium</i> Lactate Deshydrogenase
<b>PPi</b>	:	Pyrophosphate inorganique
<b>PNC</b>	:	Primary negative control
<b>PNLP</b>	:	Programme National de Lutte contre le Paludisme
<b>QBC</b>	:	Quantitative Buffy Coat
<b>QN</b>	:	Quinine

<b>RFLP :</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RT-PCR :</b>	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
<b>SDS:</b>	Sodium dodécyl sulfate
<b>Sec :</b>	seconde
<b>SP:</b>	Sulfadoxine-pyriméthamine
<b>SNC :</b>	<i>Secondary negative control</i>
<b>SNP:</b>	Polymorphisme de nucléotide unique
<b>SERCA :</b>	milieu nutritif complet Luria Bertani
<b>Taq :</b>	<i>Thermophilus aquaticus (bactérie)</i>
<b>TBE :</b>	Tris-Borate EDTA
<b>TDR :</b>	Test de Diagnostic Rapide
<b>TPI :</b>	Traitement Préventif Intermittent
<b>TS :</b>	Triméthoprime sulfaméthoxazole
<b>ubp :</b>	Gène de l'enzyme de-ubiquitination
<b>UFHB :</b>	Université Félix Houphouët-Boigny
<b>UFR :</b>	Unité de Formation et de Recherche
<b>UNA :</b>	Université Nangui Abrogoua
<b>UV :</b>	Ultra Violet
<b>VIH / SIDA :</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine/Syndrome de l'Immunodéficience Acquis
<b>WHO :</b>	World Health Organization
<b>WARN :</b>	Worldwide Antimalarial Resistance Network

## LISTE DES TABLEAUX

	Pages
<b>Tableau I :</b> Marqueurs génétiques de résistance aux antipaludiques.....	44
<b>Tableau II :</b> Séquences des amorces utilisées pour amplifier les différents fragments d'ADN des gènes <i>dhfr-ts</i> , <i>pfk13 propeller</i> et <i>pfcr</i> t ainsi que pour le Séquençage.....	61
<b>Tableau III :</b> Mélange réactionnel de chaque tube pour l'amplification des séquences des gènes.....	68
<b>Tableau IV :</b> Programmes d'amplification des fragments d'ADN des gènes ( <i>pfcr</i> t, <i>pfdhfr</i> et <i>pfk13 propeller</i> ).....	69
<b>Tableau V :</b> Tableau de contingence pour le calcul du coefficient de Kappa (K).....	75
<b>Tableau VI :</b> Profil des patients et échantillons collectés.....	79
<b>Tableau VII :</b> Isolats sélectionnés pour l'analyse moléculaire des marqueurs de la résistance.....	82
<b>Tableau VIII :</b> Statistique descriptive évaluant l'abondance de l'ADN correspondant aux gènes <i>pfK13 propeller</i> , <i>pfdhfr</i> et <i>pfcr</i> t dans le sang, la salive et l'urine des patients atteints de paludisme.....	89
<b>Tableau IX :</b> Corrélation de Pearson entre les gènes <i>pfdhfr</i> , <i>pfK13 propeller</i> et <i>pfcr</i> t détectés dans le sang, la salive et l'urine.....	92
<b>Tableau X :</b> Évaluation de la performance des échantillons d'urine et de salive comme produits biologiques pour l'étude des marqueurs génétiques de la chimiorésistance.....	94
<b>Tableau XI :</b> Bilan du séquençage de l'ADN extrait d'isolats issus du sang, de la salive et l'urine en fonction des loci.....	97

<b>Tableau XII</b> : Fréquence des allèles individuels du gène <i>pf<sub>dhfr</sub></i> dans le sang, la salive et les urines.....	99
<b>Tableau XIII</b> : Fréquence des différentes formes alléliques du gène <i>pf<sub>dhfr</sub></i> dans le sang, la salive et les urines après mutation.....	100
<b>Tableau XIV</b> : Fréquence des allèles individuels du gène <i>pf<sub>crt</sub></i> dans le sang, la salive et les urines.....	102
<b>Tableau XV</b> : Fréquence des différentes formes alléliques du gène <i>pf<sub>crt</sub></i> dans le sang, la salive et les urines après mutation.....	103
<b>Tableau XVI</b> : Fréquence des allèles individuels du gène <i>pf<sub>K13 propeller</sub></i> dans le sang, la salive et les urines.....	106
<b>Tableau XVII</b> : Fréquence des différentes formes alléliques du gène <i>pf<sub>K13 propeller</sub></i> dans les isolats sanguins, salivaires et urinaires après mutation.....	107
<b>Tableau XVIII</b> : Tableau de contingence pour le calcul du coefficient kappa de Cohen par rapport à la salive ( $K_{\text{salive}}$ ).....	109
<b>Tableau XIX</b> : Tableau de contingence pour le calcul du coefficient kappa de Cohen par rapport à l'urine ( $K_{\text{urine}}$ ).....	111
<b>Tableau XX</b> : Prévalence des mutations Asn-108 du polypeptide du gène <i>pf<sub>dhfr</sub></i> et Tyr-580 du polypeptide du gène <i>K13 propeller</i> à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé.....	113
<b>Tableau XXI</b> : Prévalence des souches sauvages Lys-76 et mutantes Thr-76 du gène <i>pf<sub>crt</sub></i> à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé.....	115

## LISTE DES FIGURES

	Pages
<b>Figure 1 :</b> Cycle évolutif de <i>Plasmodium</i> .....	11
<b>Figure 2 :</b> Distribution mondiale du paludisme à <i>Plasmodium</i> .....	14
<b>Figure 3 :</b> Prévalence de <i>Plasmodium falciparum</i> en Côte d'Ivoire.....	16
<b>Figure 4 :</b> Cibles thérapeutiques des antipaludiques.....	20
<b>Figure 5 :</b> Métabolisme de l'hémoglobine dans la vacuole digestive du parasite.....	22
<b>Figure 6 :</b> Accumulation de la chloroquine dans le <i>Plasmodium</i> .....	31
<b>Figure 7 :</b> Voie et mode d'action des antimétabolites.....	35
<b>Figure 8 :</b> Distribution géographique de la résistance de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques.....	40
<b>Figure 9 :</b> Modèle du gène <i>dhfr</i> de <i>P. falciparum</i> et son NADPH.....	48
<b>Figure 10 :</b> Sites de prélèvement des échantillons de sang, salive et urine.....	57
<b>Figure 11 :</b> Photo du marqueur de taille (Smart Ladder® Eurogentec) de 100 à 1500 pb.....	71
<b>Figure 12 :</b> Densités parasitaires moyennes en fonction du site de prélèvement (A) et taux de produit d'amplification en fonction du produit biologique (B).....	81
<b>Figure 13 :</b> Taux des produits d'amplification des fragments de gènes par produit biologique.....	84
<b>Figure 14 :</b> Surveillance graphique de l'expression des gènes <i>pfK13 propeller</i> , <i>pfdhfr</i> et <i>pfprt</i> dans les extraits sanguins, salivaires et urinaires.....	86
<b>Figure 15 :</b> Évaluation de la variabilité entre patients sur la base de la détection des gènes <i>pfK13 propeller</i> , <i>pfdhfr</i> et <i>pfprt</i> dans le sang, la salive et l'urine.....	88
<b>Figure 16 :</b> Analyse comparative de la relation entre les gènes <i>pfk13 propeller</i> , <i>pfdhfr</i> , et <i>pfprt</i> détectés dans le sang, la salive et l'urine.....	91

## RESUME

Le paludisme est une parasitose transmise à l'homme par un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Sa prise en charge implique un diagnostic précoce et le traitement rapide au moyen d'antipaludiques efficaces. Cependant, en Côte d'Ivoire comme dans d'autres pays, la prise en charge de la maladie se heurte à la résistance à la plupart des antipaludiques. La surveillance de la résistance aux antipaludiques ainsi que le diagnostic du paludisme nécessitent un prélèvement de sang. La prise de sang, avec son exigence de personnel qualifié et le risque biologique lié à l'inévitable utilisation des aiguilles, peut entraîner une mauvaise observance lorsqu'une répétition du test biologique est nécessaire. Pour couvrir les besoins d'études d'épidémiologie moléculaire du paludisme, une méthode de prélèvement non invasive qui peut se substituer à la collecte d'échantillons de sang est nécessaire.

Cette thèse évalue les performances de la salive et l'urine pour la détection des marqueurs moléculaires de résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques par une approche d'étude du polymorphisme de ces marqueurs. L'évaluation de la performance de la salive et l'urine pour la détection des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques a été faite en comparant les taux d'amplification de l'ADN génomique de *P. falciparum* extrait à partir des urines, la salive et le sang et les taux de détectabilité des gènes *pfcr*, *pfdhfr* et *pfK13 propeller* dans ces produits biologiques. L'analyse a permis d'identifier la salive comme meilleure alternative au sang pour l'étude des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques. L'étude du polymorphisme des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques a montré que les prévalences des génotypes conférant la résistance à la pyréméthamine (P), à la chloroquine (CQ) et aux dérivés d'artémisinine en 2015 ont atteint des niveaux comparables dans les isolats issus des trois produits biologiques (sang, urine et salive). La prévalence des allèles associés à la chimiorésistance de la chloroquine représentés par la mutation Thr-76 du gène *pfcr* a baissé tandis que celle des allèles associés à la chimiorésistance de la pyriméthamine représentés par la mutation Asn-108 du gène *pfdhfr-ts* a augmenté à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé. Aucune mutation des allèles mutants du gène *K13 propeller* conférant la résistance aux dérivés d'artémisinine n'a été observée aussi bien dans les trois produits biologiques (salive, urine et sang) que sur l'ensemble des sites d'étude. L'étude a ainsi montré que les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine utilisées pour le traitement de première ligne du paludisme en Côte d'Ivoire sont toujours efficaces.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, *pfcr*, *pfdhfr*, *pfK13 propeller*, salive, urine, polymorphisme.

## ABSTRACT

Malaria is a parasitosis transmitted to humans by a protozoan belonging to the genus *Plasmodium*. Its management involves early diagnosis and prompt treatment with effective antimalarials. However, in Côte d'Ivoire as in other countries, the management of the disease faces resistance to most antimalarials. Antimalarial drug resistance surveillance and malaria diagnosis require blood collection. Blood collection, with its requirement for qualified personnel and biological risk associated with the use of needles, can lead to poor compliance when a repeat bioassay is required. To cover needs for malaria molecular epidemiology studies, a non-invasive sampling method that can substitute blood collection is necessary.

This thesis evaluates the performance of saliva and urine for detection of antimalarial drug resistance molecular markers by polymorphism study approach of these markers. Saliva and urine performance for antimalarial drug resistance molecular markers detection was evaluated by comparing genomic DNA amplification yield for *Plasmodium falciparum* extracted from urine, saliva and blood and *pfcr*, *pfdhfr* and *pfK13 propeller* genes detectability in these biological products. The analysis identified saliva as the best alternative to blood for antimalarial drug resistance molecular markers studies.

Antimalarial drug resistance molecular markers polymorphism study showed that the prevalence of genotypes conferring resistance to pyremethamine (P), chloroquine (CQ) and artemisinin derivatives in 2015 reached comparable levels in the isolates from the three biological products (blood, urine and saliva). Prevalence of alleles associated with chloroquine chemoresistance represented by *pfcr* gene Thr-76 decreased while that of the alleles associated with pyrimethamine chemoresistance represented by *dhfr-ts* gene mutation Asn-108 increased in Anonkoua-Kouté, Port-Bouet and Ayamé. No mutations of *K13 propeller* gene conferring resistance to artemisinin derivatives were observed as well in the three biological products (saliva, urine and blood) as on all study sites. The study showed that artemisinin-based combination therapies used for the first-line treatment of malaria in Côte d'Ivoire are still effective.

Key words: *Plasmodium falciparum*, *pfcr*, *pfdhfr*, *pfK13 propeller*, saliva, urine, polymorphism,

# INTRODUCTION

Le paludisme est une parasitose transmise à l'homme par un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Parmi les cinq espèces du parasite qui infectent l'homme, *Plasmodium falciparum* est la plus virulente et est responsable des formes cliniques graves et de la majorité de la mortalité associée au paludisme (**Vythilingam, 2010**). Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est l'une des plus importantes maladies infectieuses du monde.

Selon les dernières estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 212 millions de cas de paludisme auraient été enregistrés en 2015 dont 429000 décès (**WHO, 2016**). Parmi ces décès, 92% de cas étaient observés en Afrique dont 70% seraient des enfants âgés de moins de cinq ans. L'immense majorité (99 %) des décès sont dus au paludisme à *Plasmodium falciparum* (**WHO, 2016**).

En Côte d'Ivoire, le paludisme demeure le premier motif de consultation dans les formations sanitaires du pays même si les résultats des enquêtes d'analyse situationnelle montrent une tendance à la baisse passant de 50,17 % en 2010 à 43 % en 2012 puis à 33% en 2014 (**MSLS, 2015**). Chez les femmes enceintes et les enfants de moins de cinq ans en particulier, le paludisme représente respectivement 36% et 62% des causes d'hospitalisation (**OMS/AFRO, 2009**). En 2015, l'incidence du paludisme dans la population générale de la Côte d'Ivoire a été de 155,4 ‰. Chez les enfants de moins de 5 ans, cette pathologie a eu une incidence de 291,7 ‰ (**MSLS, 2015**).

La prise en charge des cas de paludisme demeure l'une des composantes essentielles de la stratégie de lutte contre le paludisme. Elle implique un diagnostic précoce et le traitement sans retard de la maladie au moyen d'un traitement antipaludique efficace. Depuis 2005, la Côte d'Ivoire a adopté de nouvelles stratégies de contrôle de la maladie parmi lesquelles figure la dispensation gratuite des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) pour les cas confirmés de paludisme chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes (**MSHP, 2013 ; MSLS, 2015**).

Les outils développés à ce jour aussi bien pour le diagnostic du paludisme que pour les études des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques nécessitent tous un prélèvement de sang par ponction capillaire (au bout du doigt) ou par ponction veineuse (**Putaporntip et al., 2011**). Bien que le prélèvement de sang n'ait pas généralement de conséquences graves s'il est effectué dans des conditions aseptiques strictes, certains groupes dans la population, comme certaines femmes enceintes, les nourrissons et certains enfants de bas âge coopèrent peu lorsqu'il est nécessaire de faire des prélèvements répétés (**Snounou et al., 1993 ; Murray et al., 2008 ; Colin et al., 2009**). En effet, la prise de sang, avec son exigence de personnel qualifié et le risque biologique lié à l'inévitable utilisation des aiguilles, peut entraîner une mauvaise observance lorsqu'une répétition du test biologique est nécessaire. La nécessité de

prélever du sang cause des problèmes dans certaines communautés avec les tabous du sang. Elle pose aussi des limites liées à la peur de la piqûre, particulièrement chez les jeunes enfants qui représentent la principale cible pour la plupart des enquêtes épidémiologiques relatives au paludisme. Pour couvrir tous les besoins d'études d'épidémiologie moléculaire du paludisme, une méthode de prélèvement non invasive pouvant se substituer à la collecte d'échantillons de sang, avec une performance comparable de détectabilité des marqueurs de résistance est nécessaire. Cette méthode sera particulièrement utile dans la surveillance épidémiologique et dans les études de résistance aux antipaludiques parce que les échantillons pourraient être obtenus plus fréquemment avec le minimum d'inconvénients pour les patients. Cet outil d'analyse moléculaire non invasif pourrait aussi aider à clarifier ou compléter les résultats de surveillance de la résistance aux antipaludiques pour mieux guider des politiques d'utilisation des médicaments antipaludiques. Des études antérieures ont montré que l'ADN du *Plasmodium* peut être détecté dans la salive et l'urine (**Mharakurwa et al., 2006 ; Nwakanma et al., 2009 ; Putaporntip et al., 2011**). Ceci permet d'envisager la salive et l'urine comme de réels potentiels produits biologiques pouvant remplacer le sang pour les études du polymorphisme des gènes de résistance aux antipaludiques.

Le traitement et le contrôle du paludisme ont été compliqués par la survenue de la résistance des parasites aux antipaludiques. Chez *P. falciparum*, la résistance a été observée vis-à-vis de presque tous les médicaments antipaludiques (amodiaquine, chloroquine, mefloquine, quinine et sulfadoxine pyriméthamine) et plus récemment, vis-à-vis des dérivés de l'artémisinine (**Amaratunga et al., 2012 ; Phyto et al., 2012**). Le fort taux de résistance à la chloroquine, utilisée jusqu'alors en prophylaxie du paludisme gestationnel, a amené l'OMS à recommander dès 2004, l'usage de la Sulfadoxine Pyriméthamine (SP) pour le traitement préventif intermittent (TPI) au cours de la grossesse et l'utilisation de combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) pour le traitement curatif du paludisme (**WHO, 2011**).

L'utilisation des CTA a permis une diminution de la morbidité et de la mortalité dues au paludisme dans de nombreuses zones d'endémie en Afrique sub-saharienne (**Nyarango et al., 2006 ; WHO, 2008**). Malgré la mise en place des combinaisons thérapeutiques par les systèmes de santé, *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances, même contre les CTA (**Noedl et al., 2008 ; Wongsrichanalai & Meshnick, 2008 ; Dondorp et al., 2009**).

Les variations du poids du paludisme en fonction des résistances de *P. falciparum* et de la disponibilité de médicaments auxquels ce parasite est sensible démontrent l'importance majeure de la surveillance des résistances et du maintien de l'accès à des traitements efficaces. Plusieurs méthodes ont couramment été utilisées pour la surveillance de la

chimiorésistance. Avec l'essor de la biologie moléculaire et la connaissance actuelle du génome de *P. falciparum*, la caractérisation des marqueurs moléculaires est de nos jours introduite dans les méthodes d'évaluation et de surveillance de la chimiorésistance aux antipaludiques. Ainsi, la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine (CQ) a été associée aux mutations M74I, N75E et K76T au niveau du gène *pfcr* (*Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter) (Fidock *et al.*, 2000 ; Djimde *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2002). La mutation S108N du gène *pfdhfr* (*Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase) est corrélée avec les tests *in vitro* de résistance du parasite à la pyriméthamine et la présence d'autres mutations au niveau des codons 51, 59 et 164 renforce le niveau de cette résistance (Kublin *et al.*, 2002 ; Gregson & Plowe, 2005). L'apparition récente de phénotype résistant à l'artémisinine à la frontière Thaï-Cambodgiennes (Denis *et al.*, 2006 ; Dondorp *et al.*, 2009) suscite de nos jours de réelles inquiétudes pour le contrôle du paludisme, menaçant de ce fait tous les efforts de contrôle et d'élimination de la maladie. Des mutations au niveau de plusieurs gènes candidats ont été associées à la résistance *in vitro* de l'artémisinine. Très récemment, Ariey et ses collaborateurs ont identifié un marqueur de résistance à l'artémisinine en établissant une forte corrélation entre la présence des mutations du gène *Kelch 13 propeller* (*K13-propeller* ou *K13*), la survie *in vitro* des parasites et la clairance parasitaire *in vivo* (Ariey *et al.*, 2014). L'évaluation du polymorphisme des gènes conférant la résistance des parasites récurrents à la suite d'un traitement antipaludique est l'une des méthodes les plus sensibles permettant d'identifier la sélection précoce des souches de parasites présentant une diminution de sensibilité aux antipaludiques.

En Côte d'Ivoire, comme dans d'autres pays, le paludisme sévit dans toutes les régions et la prise en charge thérapeutique de la maladie se heurte à la résistance du parasite à la plupart des antipaludiques. En 1986, le premier cas de chloroquinorésistance a été suspecté à Adzopé et confirmé en 1987 (Henry *et al.*, 1998). Jusqu'en 2004, trois sous-familles de médicaments antipaludiques (chloroquine, sulfadoxine pyriméthamine et quinine) étaient recommandées pour le traitement de l'accès palustre non compliqué à *P. falciparum*. Cependant, eu égard au nombre relativement élevé d'isolats résistants (Djaman *et al.*, 2002 ; Henry *et al.*, 2002 ; Touré *et al.*, 2008), la mise en place d'un système de surveillance de la chimiorésistance a semblé nécessaire. Ainsi, au moment de l'introduction des CTA en Côte d'Ivoire comme traitement de première ligne du paludisme en remplacement de l'amodiaquine (AQ) et la sulfadoxine pyriméthamine (SP), une surveillance continue des marqueurs de résistance à ces molécules (CQ et SP) a été recommandée du fait de la forte prévalence de la pharmacorésistance plasmodiale dans certaines localités hors d'Abidjan (Ako *et al.*, 2012).

En 2007, le niveau de résistance à la CQ est resté élevé en Côte d'Ivoire en dépit de son retrait (**Djaman et al., 2007**). En 2010, sept ans après l'utilisation des CTA et le retrait de la CQ et la SP comme médicament pour le traitement de première et deuxième ligne respectivement, la fréquence des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la CQ (*pfcr*) et à la SP (*dhfr-ts* et *dhps*) n'a pas baissé significativement dans la zone d'Abidjan et certaines localités proches (**Djaman et al., 2010, Ouattara et al., 2010**). L'évaluation du niveau de résistance aux CTA dans 12 pays d'Afrique subsaharienne dont la Côte d'Ivoire a indiqué qu'il n'existait pas encore de résistance aux CTA en Côte d'Ivoire (**Kamau et al., 2015**). Plus d'une décennie après l'abandon de la CQ et l'utilisation des CTA et la SP en TPI, il nous a semblé important de déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires associés à la résistance à ces antipaludiques (CTA, SP et CQ) dans certaines localités de la Côte d'Ivoire afin de vérifier si des souches de parasites présentant une diminution de sensibilité à ces antipaludiques y circulent.

De plus, étant donné que le sang des personnes infectées par *Plasmodium* reste le liquide biologique de référence naturellement utilisé pour l'étude des marqueurs moléculaires de la chimiorésistance plasmodiale, il nous a paru utile d'évaluer la performance de deux autres fluides biologiques que sont la salive et l'urine des mêmes sujets porteurs de plasmodie au cours de cette étude.

En s'inscrivant dans cette dynamique de surveillance des résistances aux antipaludiques en Côte d'Ivoire, les questions suivantes ont été abordées :

- ❖ Quelle est la performance de détection des gènes de résistance de *Plasmodium falciparum* dans la salive et l'urine par rapport au sang ?
- ❖ Quelle est la prévalence des marqueurs moléculaires conférant la résistance de *P. falciparum* à la CQ, la SP et aux dérivés d'artémisinine dans le sang, la salive et les urines ?
- ❖ Quelle est la répartition des marqueurs moléculaires conférant la résistance de *P. falciparum* à la CQ, la SP et aux dérivés d'artémisinine à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé ?

En rapport avec ces questions, les hypothèses suivantes tenteront d'être vérifiées :

- La salive et l'urine pourraient être utilisées comme des produits biologiques pour l'étude de la résistance aux antipaludiques.
- La prévalence des marqueurs moléculaires associés à la résistance à la CQ et à la SP serait élevée à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé malgré le retrait de ces molécules en traitement curatif.

- La prévalence des mutations au niveau du gène *K13 propeller* conférant la résistance aux dérivés d'artémisinine serait faible dans la population d'étude.

Cette étude vise ainsi à générer davantage de données pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux antipaludiques en Côte d'Ivoire. De plus ce travail explore une méthode non invasive de prélèvement qui peut se substituer à la collecte d'échantillons de sang pour les études de surveillance de la résistance aux antipaludiques.

Le travail est structuré en cinq parties. La première partie est consacrée aux généralités bibliographiques sur le paludisme, la seconde concerne le matériel et les méthodes utilisés, la troisième partie présente les résultats obtenus qui sont ensuite discutés dans la quatrième partie. Les références bibliographiques sont présentées dans la cinquième partie.

L'objectif général de cette étude est de proposer une méthode non invasive de prélèvement pour évaluer l'efficacité des antipaludiques à travers l'étude du polymorphisme des gènes de résistance de *Plasmodium falciparum*.

Il s'est agi plus spécifiquement de :

1. Evaluer les performances de la salive et de l'urine comme produits biologiques pour l'étude des marqueurs de résistance aux antipaludiques

2. Déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires conférant la résistance de *Plasmodium falciparum* à la CQ, la SP et aux dérivés d'artémisinine dans la salive, l'urine et le sang.

3. Déterminer la répartition des marqueurs moléculaires conférant la résistance de *Plasmodium falciparum* à la CQ, la SP et aux dérivés d'artémisinine à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé.

# **I - GENERALITES**

## **I-1- LE PALUDISME**

### **I-1-1. Définition et classification taxonomique de *Plasmodium falciparum***

Endémie parasitaire majeure, le paludisme ou malaria est une érythropathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis par la pique d'un moustique, l'anophèle femelle. Elle se caractérise par l'apparition d'un accès fébrile provoqué par l'hémolyse due à la présence et au développement du parasite dans les hématies. La maladie sévit sous le mode endémo-épidémique et son incidence dépend étroitement de l'écologie du vecteur donc de la climatologie, de l'aménagement de l'espace (déforestation, hydro-agriculture), des migrations des populations et des capacités économiques à entreprendre des travaux d'assainissement. Il n'est donc pas surprenant que de nos jours le niveau d'endémicité soit étroitement lié au développement (Malvy *et al.*, 2000).

Le mot paludisme vient de "palus" qui signifie marais et le mot malaria a été tiré de l'Italien « malaria » qui veut dire mauvaise air, aussi connu autrefois sous le nom de fièvre romaine. L'agent pathogène de cette parasitose est un eucaryote unicellulaire appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa*, à la classe des *Aconoidasida*, à l'ordre des *Haemosporida*, à la famille des *Plasmodiidae* et au genre *Plasmodium* (Levine, 1988). Cette classification taxonomique fine des Apicomplexes a fait l'objet de nombreuses révisions dont la plus récente est celle de la Société des Protozoologistes (Adl *et al.*, 2005) qui tient compte des avancées de la recherche fondamentale accomplies depuis la dernière version (Levine *et al.*, 1980).

Cinq espèces de *Plasmodium* sont responsables du paludisme chez l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*, dont les infections chez l'homme ont jusqu'à récemment été attribuées par erreur à *P. malariae* (Singh *et al.*, 2004). Mais l'essentiel de la mortalité liée au paludisme est due à *P. falciparum*.

L'agent responsable du paludisme est transmis à l'homme par des moustiques femelles du genre *Anopheles*. En Afrique subsaharienne, les principaux vecteurs du paludisme sont *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus* et *Anopheles arabiensis* (Carnevale *et al.*, 1984 ; Mouchet *et al.*, 1993).

### **I-1-2. Cycle biologique du *Plasmodium***

Le cycle de développement de *Plasmodium* se subdivise en deux parties ou phases. Une phase asexuée encore appelée schizogonie qui se déroule chez l'homme, l'hôte intermédiaire et une phase sexuée ou sporogonie qui a lieu chez l'hôte définitif, l'anophèle femelle (Figure 1).

### **I-1-2-1. Cycle asexué ou schizogonique chez l'homme**

Le cycle asexué se déroule en deux étapes : une étape hépatique et une étape sanguine :

#### ***- La phase hépatique***

La phase hépatique débute avec la pique de l'anophèle femelle. Lors de cette pique, le moustique infecté inocule de la salive contenant des sporozoïtes aux tissus sous-cutanés de l'hôte humain. Une fois inoculés, les sporozoïtes développent des mouvements qui leur permettent d'atteindre les capillaires dermiques. Ils traversent alors les couches vasculaires endothéliales pour se retrouver dans la circulation sanguine (**Figure 1**) (**Mota et al., 2001 ; Frevert, 2004**). Les sporozoïtes activés entament les phases du cycle dans un état dit de compétence d'infectivité (**Siau et al., 2008**).

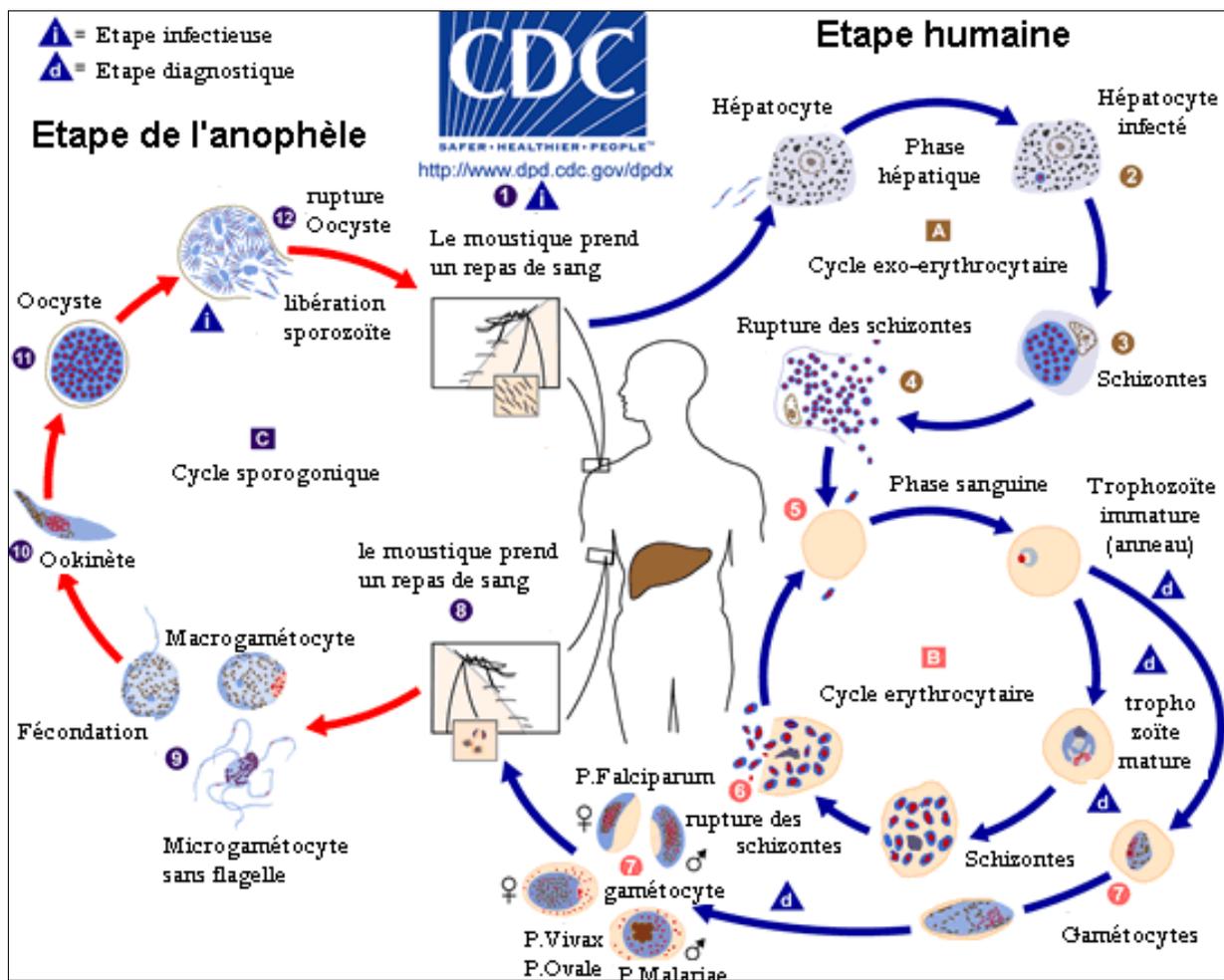
Les sporozoïtes du sang périphérique atteignent les cellules hépatiques en passant à travers les cellules de Kupffer (CK). Une fois à destination, les sporozoïtes pénètrent dans l'hépatocyte par invagination. La vacuole parasitophore se forme au moment de son entrée dans la cellule hôte. Son rôle est de protéger le parasite du cytosol de l'érythrocyte de l'hôte (**Frevert et al., 2008**). Dans le foie, le parasite se multiplie par division cellulaire pendant 7 à 20 jours, ce qui aboutit à la production de dizaines de milliers de mérozoïtes. Après 6 à 10 jours (cas de *P. falciparum*) d'infestation, les hépatocytes éclatent et larguent leur contenu dans le sang périphérique (**Robert & Boudin, 2003**). Cette phase, appelée exo-érythrocytaire ou hépatique, permet aussi au parasite de survivre longtemps dans l'organisme sous une forme dormante (hypnozoïtes), alors qu'il aura disparu du sang. Les mérozoïtes hépatiques atteignent alors la circulation sanguine sous forme de paquets de parasites de taille et de forme variables. L'enveloppe de ces paquets appelée « mérosome » ou « extrusome » est celle d'un hépatocyte nécrosé grâce à laquelle le parasite mime une cellule vivante afin d'être reconnue comme cellule du soi pour échapper aux CK (**Sturn et al., 2006**). La libération de mérozoïtes hépatocytaires est un processus continu et asynchrone dans le paludisme à *P. falciparum* (**Murphy et al., 1990**). Les mérozoïtes libérés après éclatement des corps bleus vont, soit infecter de nouveau d'autres cellules hépatiques, soit infecter les globules rouges pour entamer la phase érythrocytaire.

#### ***- La phase érythrocytaire***

Les mérozoïtes issus des schizontes hépatiques pénètrent ainsi les érythrocytes à l'intérieur desquels ils se multiplient à nouveau (**Figure 1**), c'est l'invasion (**Robert & Boudin, 2003**).

Après l'infestation de l'hématie, le parasite, entouré d'une vacuole parasitophore, se développe en anneau (**Bannister et al., 2000**), puis en trophozoïte qui digère le contenu de la

cellule hôte (**Figure 1**). A l'intérieur de l'hématie, les mérozoïtes se nourrissent de l'hémoglobine, se transforment en trophozoïtes puis en schizontes et se libèrent ensuite en faisant éclater les hématies. Ce sont ces éclatements brutaux et synchrones avec libération de l'hémozoïne (pigment malarique) qui sont à l'origine des accès de fièvre. Les mérozoïtes libérés après éclatement de l'hématie envahissent de nouveaux globules rouges et bouclent ainsi le cycle schizogonique érythrocytaire. Après l'invasion des globules rouges, certains mérozoïtes se séquestrent dans la rate ou la moelle osseuse. Ils se différencient en gamétocytes mâles ou femelles. Cette étape, appelée gamétocytogenèse, se déroule en parallèle du cycle érythrocytaire (**Day et al., 1998 ; Talman et al., 2004**). Chez *P. falciparum* et *P. malariae*, la parasitémie découle de la réactivation de stades érythrocytaires préexistants appelée la récurrence, qui se produit lors du déclin de l'immunité efficace.



**Figure 1:** Cycle évolutif de *Plasmodium*

Source: <http://www.cdc.gov/dpdx/malarial/index.html>,

consulté le 2 octobre 2016.

### **I-1-2-2. Cycle sexué ou sporogonique chez l'anophèle**

L'anophèle femelle, au cours d'un repas sanguin (chez un sujet infesté porteurs de gamétocytes) nécessaire pour la maturation de ses œufs, ingère des trophozoïtes, des schizontes et des gamétocytes. Dans l'estomac du moustique, les trophozoïtes et les schizontes sont digérés tandis que subsistent les gamétocytes qui se transforment en gamètes mâles et femelles (**Figure 1**). Les gamètes mâles et femelles fusionnent pour former d'abord un zygote (immobile), qui devient un œuf mobile, l'ookinète (**Sinden, 1983 ; Matuschewski, 2006**). L'ookinète migre dans le tube digestif de l'insecte et se fixe à la paroi de l'estomac. Dans les heures qui suivent sa formation, l'ookinète diploïde devient à la suite d'une méiose (**Sinden & Hartley 1985 ; Sinden et al., 1985 ; Janse et al., 1986**) un oocyste haploïde, immobile et arrondi. A l'intérieur de l'oocyste, surviennent des divisions mitotiques successives qui aboutissent à la formation de milliers de sporozoïtes haploïdes (**Siden-Kiamos & Louis, 2004**). L'oocyste mature est appelé sporocyste. Le sporocyste va éclater et libérer les sporozoïtes. Ces derniers regagnent avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle. Après maturation des sporozoïtes par l'expression différenciée de certains gènes, le moustique devient alors infectieux et reste dans cet état pendant environ un mois (**Kaiser et al., 2004**).

Dans l'hypothèse où le moustique ingérait du sang contenant des gamétocytes d'un seul clone, il y aurait fécondation entre gamètes génétiquement identiques, avec production de zygotes homozygotes pour tous les gènes. Si des gamétocytes de plusieurs clones sont absorbés, des croisements entre des clones génétiquement différents peuvent survenir et être à l'origine de polymorphisme. La reproduction sexuée assure donc un brassage génétique important : constitution de nouveaux individus (génotypes), génération de nouvelles associations chromosomiques («crossing-over» et création de nouveaux allèles par recombinaison intragénique). La durée du cycle sporogonique varie de 10 à 40 jours et est fonction de la température et l'espèce plasmodiale. D'une manière générale, en dessous de 16°C, le cycle sporogonique ne peut s'accomplir. Les conditions optimales sont, une température de 20°C à 30°C et une humidité d'au moins 60% (**Golvan, 1983**).

### **I-1-3- Epidémiologie du paludisme**

#### **I-1-3-1- Paludisme dans le monde**

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde (**WHO, 2016**). La répartition géographique du paludisme est extrêmement variable d'un continent à l'autre, d'un pays à l'autre, mais également au sein d'un même pays. Cette répartition géographique est

fortement influencée par la distribution des anophèles vecteurs, la capacité vectorielle, les caractéristiques biologiques des différentes espèces de *Plasmodium*, les conditions climatiques etc. Après avoir sévi presque dans tout le monde entier, le paludisme touche de nos jours environ 97 pays et territoires.

Selon les estimations de l'OMS en 2015, environ 3,2 milliards de personnes, soit près de la moitié de la population mondiale, ont été exposées au risque palustre. Le nombre de nouveaux cas a été estimé à 212 millions, et les décès à environ 429 000. Quinze pays, principalement de l'Afrique sub-saharienne, représentent 80% des cas de paludisme et 78% des décès dans le monde (WHO, 2016). Selon le rapport de l'OMS sur le paludisme dans le monde, la baisse de l'incidence dans ces pays où la charge de morbidité est élevée, a été plus faible (32 %) que dans les autres pays (53 %). Dans bon nombre d'entre eux, la faiblesse des systèmes de santé continue à entraver les progrès dans la lutte contre le paludisme.

L'OMS estime également que chez les enfants de moins de cinq ans plus des deux tiers du total des décès sont liés au paludisme. Cependant, entre 2000 et 2014, le taux de mortalité des moins de 5 ans a baissé de 65%, ce qui représente 5,9 millions de vies d'enfants épargnées, sur 6,2 millions au total (enfants et adultes) (WHO, 2016).

La répartition géographique des différentes espèces de *Plasmodium* peut se résumer ainsi (Hay *et al.*, 2009) :

\* *P. falciparum* : est largement distribué dans toute la ceinture tropicale du globe : Afrique subsaharienne, Amérique du sud, et Asie du sud-Est.

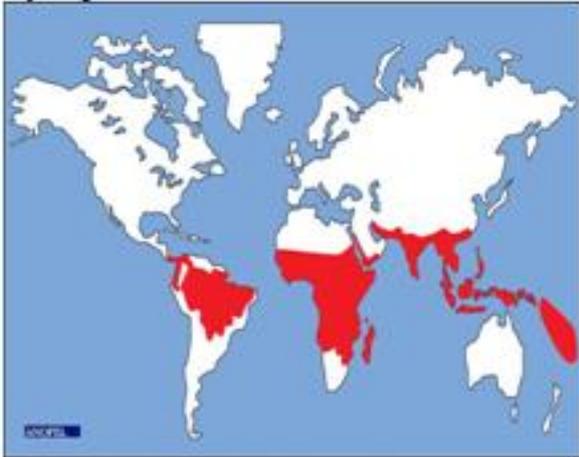
\* *P. malariae* : peut se développer sous les tropiques comme en zone tempérée mais aujourd'hui sa distribution est sporadique et surtout tropicale.

\* *P. ovale* : est essentiellement observé en Afrique tropicale mais il est aussi signalé en Asie du sud-est (Vietnam).

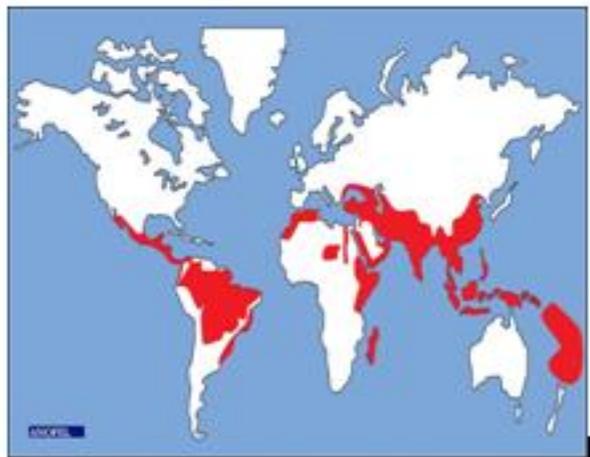
\* *P. vivax* : sévit en zone tropicale et subtropicale (surtout Amérique du centre et du sud, Asie du sud-est, Afrique de l'est, Proche et Moyen – Orient).

Quant à la cinquième espèce, *Plasmodium knowlesi* découverte en 2004, elle sévit dans le Sud-Est asiatique (Lee *et al.*, 2009). La **figure 2** ci-dessous donne la cartographie de la distribution mondiale du paludisme en 2015.

*P. falciparum*



*P. vivax*



*P. ovale*



*P. malariae*



**Figure 2 :** Distribution mondiale du paludisme à *Plasmodium*.

*Sources :* <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/1.html>,

Consulté le 10 octobre 2016

## **I-1-3-2- Paludisme en Côte d'Ivoire**

### **I-1-3-2-1-Données environnementales et climatiques**

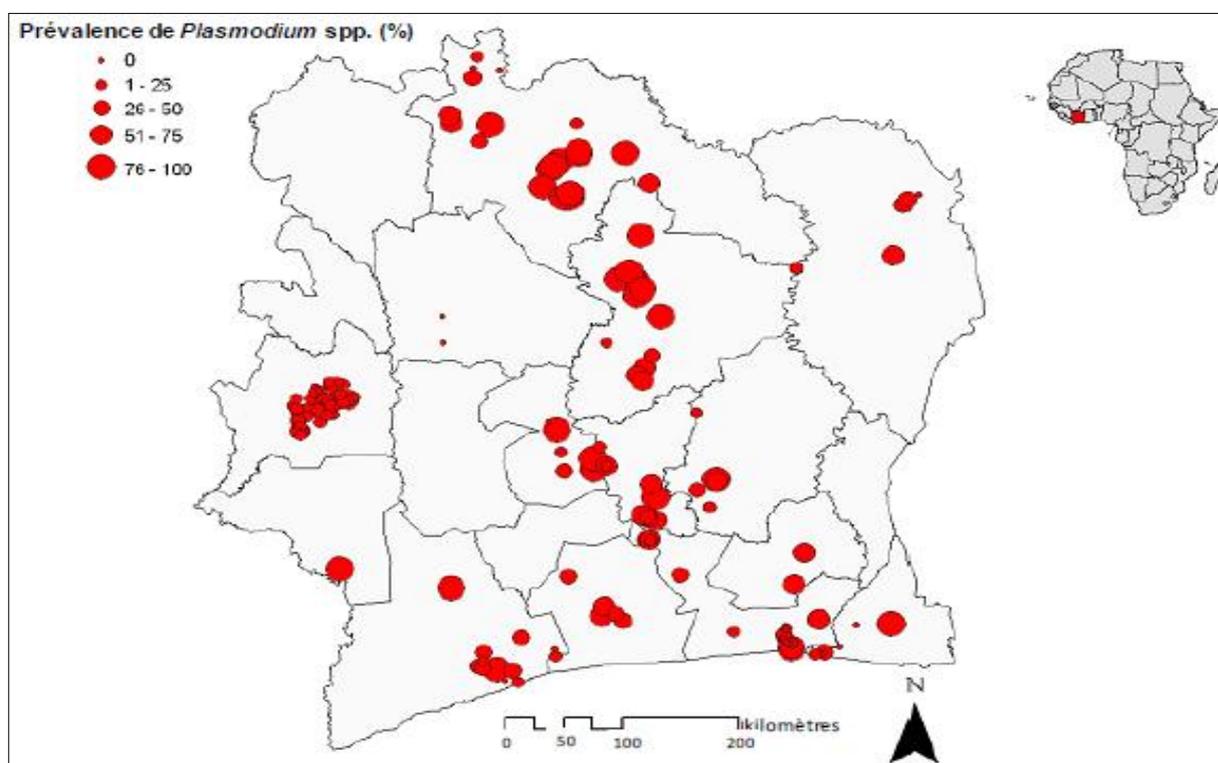
Le climat général en Côte d'Ivoire est chaud et humide. Il est de type équatorial dans le Sud côtier, tropical au Centre et semi-aride au Nord. L'année est répartie en trois saisons : une modérément chaude et sèche de Novembre à Mars, une autre très chaude et sèche de Mars à Mai et une autre chaude et humide de Juin à Octobre (**Raso et al., 2012**). Les températures moyennes oscillent entre 25 et 32°C avec des extrêmes de 10 à 40°C. Il y a une importante variation climatique du Nord au Sud, d'où l'existence de zones écologiques ou faciès épidémiologiques différentes (**Mouchet et al., 2004 ; Raso et al., 2012**). Le Sud-Est de la Côte d'Ivoire est marqué par la présence de lagunes costales qui s'étendent sur 300 km le long de la moitié Est des côtes ivoiriennes en partant de la frontière ghanéenne. Le Sud et plus spécifiquement le Sud-ouest est pluvieux et recouvert d'une forêt dense tropicale. La ceinture guinéenne représentant une mosaïque forêt-savane traverse le pays d'Est en Ouest. Le Nord fait partie de la savane Ouest soudanaise (**Raso et al., 2012**).

### **I-1-3-2-2- Données épidémiologiques du paludisme**

La transmission du paludisme est assurée en Côte d'Ivoire par des vecteurs anophéliens appartenant à trois complexes. Le complexe *Anopheles gambiae* Giles, 1902 (Diptera : Culicidae) constitué des vecteurs *An. gambiae s. s.*, principal vecteur de transmission, *Anopheles melas* Théobald, 1903 et *Anopheles arabiensis* Patton, 1905. Les deux autres complexes sont *Anopheles funestus* Giles, 1900 et *Anopheles nili* Théobald, 1904 (**Adja et al., 2011**). Selon l'OMS, en 2013, en Côte d'Ivoire, le paludisme représentait :

- 43% des motifs de consultations et 62% des hospitalisations des moins de 5 ans ;
- Près de 12% de cas avérés, et 11,8% de mortalité infantile due en grande partie au paludisme ;
- 40% des causes d'absentéisme scolaire ;
- 50% des pertes de revenus agricoles ;
- 25% des revenus des ménages engagés pour la prévention et le traitement et ce malgré la gratuité instaurée depuis 2009, sans doute du fait de l'insuffisance et de la mauvaise répartition des acteurs de santé et des infrastructures (**WHO, 2013**).

La transmission de la maladie se fait dans toutes les régions de la Côte d'Ivoire (**figure 3**).



**Figure 3 : Prévalence de *Plasmodium. falciparum* en Côte d'Ivoire (Raso *et al.*, 2012)**

**Note :** Ces valeurs ont été obtenues à partir d'enquêtes menées entre 1988 et 2007 chez des individus de moins de 16 ans. La prévalence moyenne générale est de 54,10 %. En subdivisant le pays en trois strates égales allant du Sud au Nord, la prévalence moyenne de *P. falciparum* est estimée à 37,30 %, 61,50 % et 61 %, respectivement, adapté de Raso *et al* en 2012.

La prévalence n'a pas été étudiée dans les zones où on observe un vide.

#### **I-1-4- Diagnostic biologique du paludisme**

##### **I-1-4-1- Diagnostic microscopique classique**

La méthode de référence de détection du paludisme repose sur la mise en évidence microscopique directe des parasites dans du sang étalé en goutte épaisse (GE) ou en frottis sanguin (FS) sur une lame de verre et colorée, généralement au Giemsa (**Wongsrichanalai et al., 2007 ; De Gentile, 2008 ; Ngasala et al., 2008**). Ces deux examens qui restent à ce jour le «gold standard» (**Parajuli et al., 2009 ; A-Elgayoum et al., 2009**) permettent une quantification de la parasitémie (GE) et le diagnostic différentiel de l'espèce plasmodiale en cause (FS), ce qui a une importance considérable sur le plan clinique et thérapeutique (**De Pina et al., 2007 ; Long 2009**).

En général, la procédure à suivre se compose de la collecte de l'échantillon de sang par piqûre au bout du doigt, la réalisation des gouttes épaisses et des frottis sanguins, la fixation du frottis au méthanol ou au Grundwald, leur coloration au Giemsa et la lecture au microscope à l'objectif 100 à immersion. Les parasites, colorés en rouge (noyau) et bleu (cytoplasme) sont retrouvés à l'intérieur des hématies (**Payne, 1989 ; De Pina et al., 2007**).

La technique du «Quantitative Buffy Coat» (QBC) est aussi une technique de détection du paludisme par microscopie. Elle possède une sensibilité proche voire égale à celle de la goutte épaisse (**Yavo et al., 2002**). Il s'agit d'une coloration à l'état frais par l'acridine orange des noyaux des éléments figurés du sang (cellules sanguines et des parasites), séparés par centrifugation différentielle en fonction de leur densité en tube microcapillaire. Les globules rouges parasités ont des densités différentes des autres cellules sanguines nucléés ce qui permet de les différencier (**Kakkilaya, 2003**). Cependant, le coût relativement élevée du matériel de QBC limite son utilisation à grande échelle dans les laboratoires de routine des pays endémiques.

##### **I-1-4-2- Diagnostic basé sur la détection des antigènes parasitaires**

La détection d'antigènes parasitaires se fait avec les tests de diagnostic rapide (TDR). Ces tests reposent sur la migration d'antigènes de *Plasmodium* contenus dans le sang périphérique sur une membrane de nitrocellulose et sur leur détection par immuno-capture (anticorps fixés sur membrane) et immuno-marquage (anticorps marqués par de l'or colloïdal ou du sélénium) (**Murray et al, 2008**). Plusieurs tests de ce type sont commercialisés. Ils utilisent des bandelettes sensibilisées par des anticorps monoclonaux spécifiques détectant des antigènes plasmodiaux (**Colin et al, 2000**). Ces antigènes parasitaires sont présents dans le sang des

sujets infectés ou qui l'ont été (**WHO, 2006**). Certains TDR peuvent détecter une seule espèce plasmodiale (par exemple *P. falciparum*) ou plusieurs espèces à la fois pour d'autres (*P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*).

Il s'agit de cassettes de détection prêtes à l'emploi qui permettent en quelques minutes et sans matériel particulier de mettre en évidence la présence de *Plasmodium*.

Les trois principaux groupes d'antigènes parasitaires visés par les TDR sont :

- Histidin-Rich Protein 2 (ou HRP-2 spécifiques à *P. falciparum* ; antigène soluble abondant, thermostable présent dans le cytoplasme et la membrane des hématies parasitées),
- *Plasmodium* Lactate Deshydrogenase (ou pLDH spécifique pour *P. falciparum* et *P. vivax*)
- Aldolase (panspécifique ; enzyme glycolytique du parasite) (**Moulin & Gendrel, 2009**).

#### **I-1-4-3- La sérologie**

La sérologie utilise des techniques d'immunofluorescence indirecte (IFI, méthode de référence en sérologie) et des tests immuno-enzymatiques (ELISA). Elle est basée sur la détection des anticorps antipaludiques spécifiques (IgG, IgM) dans le sérum des patients. Des marqueurs sérologiques ont été identifiés pour chacune des quatre espèces plasmodiales. En zone d'endémie palustre, la sérologie n'a pas sa place dans le diagnostic des accès palustres (apparition tardive des anticorps anti-palustres et leur persistance dans le sang après la parasitémie), parce qu'elle ne permet pas de distinguer une infection palustre en cours d'un accès antérieur. En outre, le test est relativement coûteux et peu disponible sur le marché. La sérologie reste indiquée dans l'étude d'une fièvre prolongée hors zone d'endémie, dans le dépistage chez les donneurs de sang ; dans les études épidémiologiques et pour le diagnostic de certaines formes cliniques telles que le paludisme viscéral évolutif, au cours duquel le taux d'anticorps est très élevé ou en recherche vaccinale pour la surveillance des anticorps protecteurs (**Corran et al., 2008 ; Stewart et al., 2009**).

#### **I-1-4-4- Diagnostic basé sur la détection du matériel génétique du parasite**

Il consiste à mettre en évidence le matériel génétique du parasite. Parmi ces techniques, il y a la PCR (Polymerase Chain Reaction) et la sonde génomique. Ces tests moléculaires sont des outils utilisés dans le diagnostic du paludisme, mais surtout dans la surveillance épidémiologique de la pharmacorésistance du *Plasmodium* (**Figueiredo et al., 2008**). Ces techniques moléculaires, très sensibles et spécifiques, qui peuvent détecter 1 à 5 parasites/ $\mu$ L

de sang (De Pina *et al.*, 2007 ; Tangpukdee *et al.*, 2009), permettent l'identification des espèces plasmodiales responsables du paludisme humain (Bharti *et al.*, 2009 ; Parajuli *et al.*, 2009). La cinquième espèce, *Plasmodium knowlesi* est aussi détectable par ces techniques (Babady *et al.*, 2009).

La PCR et ses variantes amplifient les séquences reconnues et les rendent facilement repérables grâce à un agent intercalaire, le bromure d'éthidium (BET) ou le Syber green par illumination UV du gel d'agarose. Ainsi, on note la Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) proposée en 1996 par Abdullah *et al.* (Abdullah *et al.*, 1996) et spécifique à *P. falciparum*. On a aussi la Nested PCR qui est une méthode d'amplification à double paliers proposée par Snounou *et al.* en 1993. Elle est très utilisée du fait de sa sensibilité et de sa spécificité d'espèce (Snounou *et al.*, 1993). La technique de PCR nichée (nested PCR) a été utilisée pour détecter la présence du parasite dans les urines, salive et sang (Mharakurwa *et al.*, 2006 ; Nwakanma *et al.*, 2009).

### **I-1-5- Cibles thérapeutiques**

Face à la résistance plasmodiale, il est nécessaire de comprendre le mode d'action cellulaire des antipaludiques afin d'optimiser leur emploi et mieux comprendre les mécanismes qui sont impliqués dans la résistance. Le *Plasmodium* dispose pour son développement intra-érythrocytaire d'un métabolisme et de moyens de défense spécifiques qui constituent autant de cibles pour un criblage de molécules de synthèse ou de principes actifs de substances naturelles (Figure 4) (Touze *et al.*, 2002). On distingue :

- la vacuole nutritive du parasite :

Elle est le siège de la digestion de l'hémoglobine, de la cristallisation de l'hème. On y trouve également des moyens de défense contre le stress oxydant,

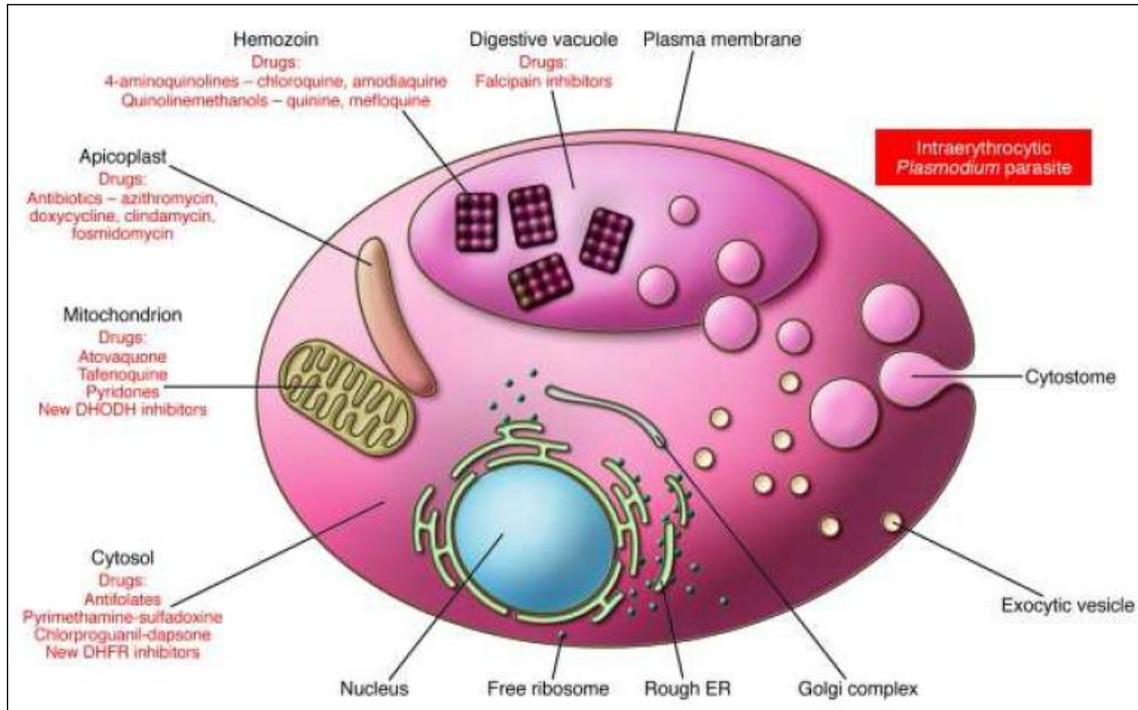
- le cytoplasme :

Il comporte le cytosol et deux organites essentiels, les mitochondries et l'apicoplaste. Ces deux organites sont nécessaires à la biosynthèse des acides nucléiques,

- la membrane plasmique :

Elle est constituée de phospholipides, de canaux calciques et parasitophores ; elle est le siège du trafic nutritionnel.

Il s'agit par exemple d'agir au niveau de la membrane plasmique du parasite pour empêcher les échanges nutritifs et énergétiques (transport du glucose) ou d'inhiber des synthèses spécifiques dans l'apicoplaste, le cytosol ou la vacuole lysosomiale (Figure 4) (Millet, 2005).



**Figure 4:** Cibles thérapeutiques des antipaludiques

Schema récapitulatif des cibles thérapeutiques des antimalariques. Les composés déploient leurs effets en interrompant plusieurs procédés et voies métaboliques situés au sein de différents organelles.

Les 4-aminoquinolines (incluant la chloroquine et l'amodiaquine) et les quinolinemethanols (incluant la quinine et la mefloquine) se concentrent au niveau de la vacuole digestive où ils se fixent à la  $\beta$ -hématine et interfèrent avec la détoxification de l'hème.

Les inhibiteurs de la falcipaine (en développement) ciblent les protéases qui participent à la dégradation de l'hémoglobine de la vacuole digestive. Certains antibiotiques tels que l'azithromycine, la doxycycline et la clindamycine agissent au sein de l'apicoplaste où ils inhibent la traduction protéique entraînant la mort des progénies des parasites traités.

L'atovaquone et d'autres composés inhibent le transport des électrons dans la mitochondrie. Les antifolates empêchent la synthèse *de novo* du folate au niveau du cytosol.

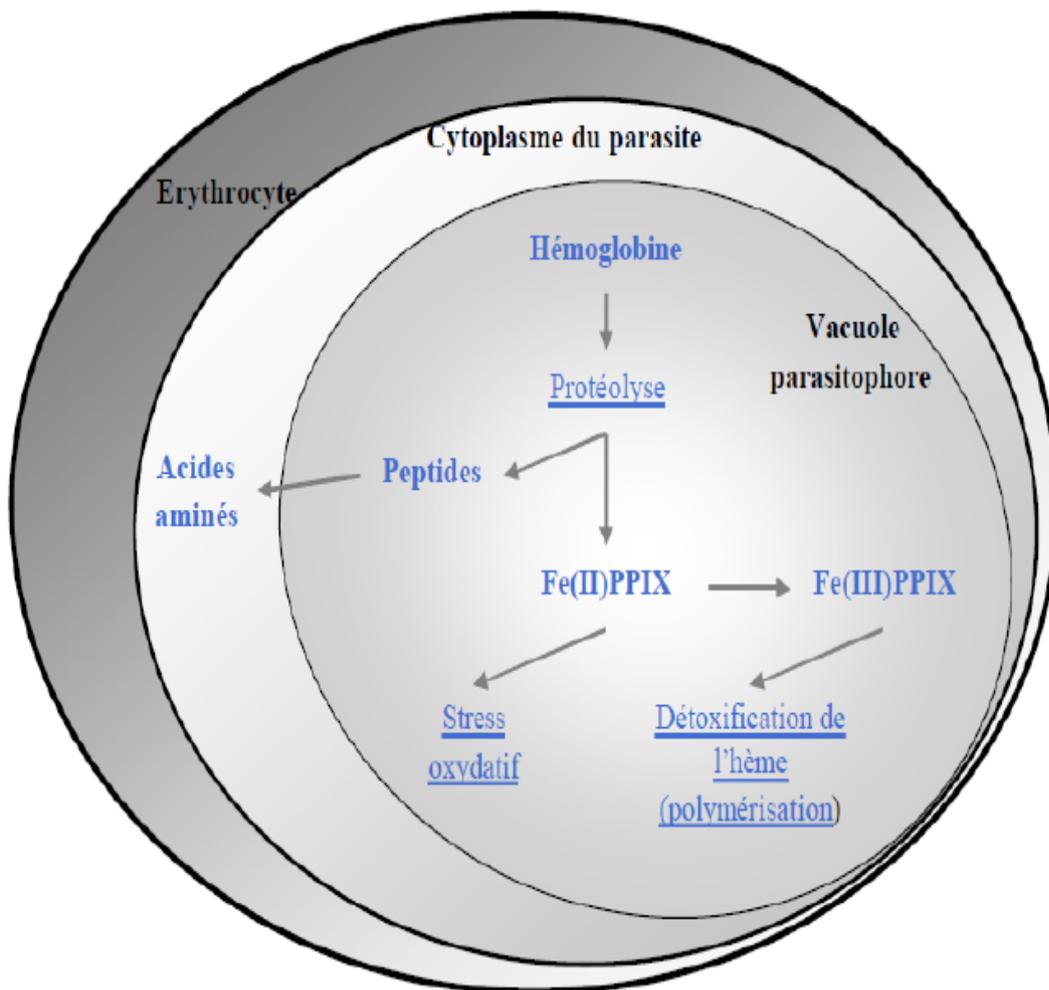
Les sites d'action des autres composés, incluant l'artémisine et ses dérivés restent mal connus et font l'objet de travaux de recherche (Greenwood *et al.*, 2008).

### **I-1-5-1- La vacuole nutritive**

La vacuole digestive est un compartiment acide de type lysosomal adapté pour le métabolisme de digestion de l'hémoglobine (**Figure 5**) (**Olliaro & Yuthavong, 1999**). Cette vacuole est un site d'acidification (pH 5-5,4), de protéolyse de l'hémoglobine, de transport peptidique, de détoxification de l'hème et des radicaux libres. *Plasmodium falciparum* dispose d'une voie métabolique de synthèse *de novo* des acides aminés très limitée. La digestion de l'hémoglobine est la principale source d'acides aminés indispensables pour la synthèse des protéines et la formation de l'ADN de parasite. Les antipaludiques spécifiques de cette voie inhibent la croissance parasitaire.

La vacuole digestive est d'autre part le site de détoxification de l'hème par sa conversion en un pigment insoluble : l'hémozoïne (**Jackson et al., 2004 ; Schwarzer et al., 2008**). Son pH est de l'ordre de 5,2 pour un pH cytoplasmique qui est de l'ordre de 7,2 (**Kuhn et al., 2007**). La vacuole digestive semble se mettre en place dès l'emprisonnement initial de cytoplasme érythrocytaire par le parasite qui constitue la première «gorgée d'hémoglobine» (**Elliott et al., 2008**). Elle peut aisément être visualisée par immunodétection dirigée contre une de ses protéines de membrane, la protéine PFCRT (Chloroquine Resistant Transporter) (**Martin & Kirk, 2004**).

La dégradation de l'hémoglobine se produit au sein de la vacuole digestive du parasite et engendre la production d'hème libre toxique (Fer II protoporphyrin-IX : Fpp-IX) induisant la production d'espèces radicalaires oxygénées ( $O_2^-$ ,  $OH$ ,  $H_2O_2$ ), source d'un stress oxydant (**figure 5**). Pour se protéger, le parasite sous l'action de protéases de la vacuole, séquestre l'hème sous une forme cristalline appelée hémozoïne ou pigment malarique (**Goldberg, 1992 ; Gluzman et al., 1994**). L'hémozoïne est un polymère constitué de monomères d'hème assemblés par un oxygène lié au Fe III (**Ridley, 1998**).



**Figure 5:** Métabolisme de l'hémoglobine dans la vacuole digestive du parasite (Olliaro & Yuthavong, 1999).

### **I-1-5-2- Le cytoplasme de *Plasmodium falciparum***

Ce cytoplasme de *Plasmodium falciparum* renferme le cytosol et deux organites semi-autonomes délimités par de multiples membranes : une mitochondrie qui contient un génome de 6kb (**Feagin, 2000**) où se déroule le transfert d'électron et la glycolyse et l'apicoplaste qui contient un génome de 35kb (**Wilson & Williamson, 1997**). Ces deux organites sont nécessaires à la biosynthèse des acides nucléiques. Dans les stades jeunes précédant la schizogonie, ils se ramifient tous deux, puis se divisent de sorte que chaque mérozoïte formé soit doté d'une mitochondrie et d'un apicoplaste unique (**Van Dooren et al., 2005**).

#### **I-1-5-2-1- Le cytosol et le métabolisme des folates**

La métabolisation des folates est à la base de la synthèse des nucléotides, la biosynthèse des pyrimidines et des acides aminés. Plusieurs enzymes de cette voie métabolique sont des cibles antipaludiques. Ils se répartissent en deux groupes :

- les antifoliques (sulfamides et sulfanes) inhibent par compétition avec l'acide paraaminobenzoïque (PABA) l'action de la dihydroptéroate synthase (DHPS).
- les antifoliniques (pyriméthamine, cycloguanil) ont pour cible la dihydrofolate réductase (DHFR). En se fixant sur le site actif de l'enzyme, ils empêchent la synthèse ; ce qui aboutit nécessairement à un arrêt de la croissance du parasite (**Winkler et al., 1994**).

#### **I-1-5-2-2- L'apicoplaste et le métabolisme des acides nucléiques**

La synthèse d'ADN se produit tout au long du cycle, dans l'hôte et le parasite. Mais les deux sont incapables de synthétiser le noyau purique. Le parasite récupère les purines de l'hôte pour la synthèse de ses acides nucléiques. Le tétrahydrofolate est un coenzyme principal dans le métabolisme des nucléotides. Dans le *Plasmodium*, il peut être synthétisé ou récupéré dans la cellule hôte (**Krungkrai et al., 1989 ; Asawamahsakda & Yuthavong, 1993**). Deux enzymes de cette voie sont déjà utilisées comme cibles : il s'agit de la dihydroptéroate synthase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR) (**Pink et al., 2005**).

#### **I-1-5-2-3- La mitochondrie**

Le parasite réalise le métabolisme mitochondrial pour avoir de l'énergie, grâce aux deux enzymes : le cytochrome *c* réductase et la déhydroorotate déshydrogénase. Cette dernière, est l'enzyme clé dans la biosynthèse des nucléotides.

### **I-1-5-3- La membrane plasmique**

La membrane plasmique est constituée de phospholipides, de canaux calciques et parasitophores. Elle est le siège du trafic nutritionnel. Le mécanisme d'efflux actif des médicaments et de régulation du pH vacuolaire au cours du cycle érythrocytaire peut être ciblé en bloquant les canaux calciques par des inhibiteurs spécifiques (vérapamil) ou en modulant l'efflux vacuolaire par les antidépresseurs tricycliques (desipramine, amitriptyline), les phénothiazines (chlorpromazine) et des antihistaminiques de classe I (**Touze et al., 2002**). Cette nouvelle voie métabolique fonctionne d'autant plus que les parasites sont fortement diffusés à l'intérieur des cellules sanguines humaines. Des investigations sont encore nécessaires pour comprendre si le parasite utilise cette même voie au cours des autres étapes de son cycle de vie.

### **I-1-6- Antipaludiques**

La découverte du *Plasmodium* et la synthèse des alcaloïdes extraits de l'écorce de *Quinquina* ont permis d'innombrables progrès dans le traitement du paludisme (**Laveran, 1881**). A partir de 1941, la mise au point d'un important programme de recherche et de screening des anti-infectieux par l'armée Américaine a abouti à la synthèse des principaux antipaludiques. L'émergence de la chloroquinorésistance à partir de 1959 a donné une nouvelle orientation à la recherche afin de synthétiser des molécules actives sur les souches plasmodiales chloroquinorésistantes. Cette nouvelle orientation a conduit à la naissance de la méfloquine (**Ohnmacher et al., 1971**), de l'halofantrine (**Coatney et al., 1972**) et de l'artémisinine ou *Quinghaosu* (extrait de la plante *Artemisia annua L*) (**De luo & Shen, 1984**). Selon leur mode d'action sur le parasite, les antipaludiques peuvent être classés en deux groupes: Les lysosomotropes et les antimétabolites.

#### **I-1-6-1- Les lysosomotropes**

Les lysosomotropes sont des inhibiteurs de détoxification de l'hème. Ils se concentrent à des degrés divers dans la vacuole digestive, d'où leur toxicité sélective pour le parasite. Les lysosomotropes comprennent trois familles d'antipaludiques: Les amino-4-quinoléines (chloroquines, amodiaquine, pipéraquline) et les amino-2-alcools (quinine, méfloquine, halofantrine, luméfántrine) et les dérivés d'artémisinine (Artémisinine, Artéméther, etc.).

### **I-1-6-1- 1- Les amino-4-quinoléines**

C'est en 1934 que l'allemand Andersag décrit les amino 4 quinoléines, dont le chef de file est la chloroquine (**Andersag et al., 1934**). Ce sont des lysosomotropes - cette dénomination vient du fait de l'analogie de pH observée dans la vacuole digestive des parasites et dans les lysosomes des cellules de mammifères. En effet, au cours de son développement intraérythrocytaire normal, *P. falciparum* ingère une importante quantité d'hémoglobine qui est ensuite dégradée dans l'organelle. L'hème toxique qui résulte de la protéolyse de l'hémoglobine se minéralise en hémozoïne, dans un processus catalysé par la protéine de détoxification de l'hème. Une fois dans la vacuole digestive, la chloroquine (CQ) inhibe la détoxification de l'hème en hémozoïne selon un mécanisme moléculaire encore débattu (**Jani et al., 2008**).

La CQ, d'abord appelée Resorchin® a été synthétisée en 1934 par l'entreprise allemande Bayer (**Andersag et al., 1934**). À partir de 1944, son principe actif est utilisé en prophylaxie et en traitement curatif des accès palustres non compliqués. Considérée comme la molécule antipaludique la plus utilisée du XXe siècle, la CQ pourtant bon marché, est abandonnée à cause des niveaux de résistance devenus inacceptables. La famille des Amino-4-quinoléines comprend également l'amodiaquine (AQ) (**Annexe 1B**) qui garde encore une efficacité relative malgré sa découverte en 1948, d'où son utilisation actuelle en association avec les dérivés de l'artémisinine.

### **I-1-6-1- 2- Les amino-2-alcools**

Les amino-2-alcools se composent d'antipaludiques naturels comme la Quinine (QN), d'antipaludiques synthétiques comme l'Halofantrine, la Lumefantrine et la Méfloquine (**Annexe 1B**). La QN est le premier antipaludique naturel utilisé en thérapeutique sous la forme de sels basiques de formiate de QN ou Quinoforme®, d'Acétarsolate de QN ou Arsiquinoforme®, de Bichlorhydrate de QN ou Quinimax®. Elle est métabolisée dans le foie et son excrétion est biliaire et urinaire. Ces molécules exercent une action rapide uniquement sur les schizontes sanguins (**Wells et al., 2009**). Hautement active sur toutes les espèces plasmodiales, la QN est actuellement utilisée à titre curatif au cours des accès palustres graves à *P. falciparum* et dans les cas d'allergie ou d'échecs thérapeutiques aux autres antipaludiques (**MSHP, 2013**).

### **I-1-6-1- 3- L'artémisinine et ses dérivés**

Actuellement, l'artémisinine et ses dérivés sont considérés comme les antipaludiques les plus importants dans la prise en charge du paludisme (**WHO, 2016**). Connue des herboristes chinois depuis 168 avant Jésus-Christ, l'artémisinine ou « *qinghaosu* » est une molécule issue d'une substance naturelle, l'armoise *Artemisia annua* (*Asteraceae*) utilisée en médecine traditionnelle chinoise comme fébrifuge et anti-hémorroïdaire. Jusqu'à 42 % du contenu total en artémisinine est extrait des feuilles apicales de *A. annua* ou « qing hao », c'est-à-dire "herbe verte" chez qui la substance s'accumule dans les trichomes granulaires (**Bhakuni et al., 1988 ; Bhakuni et al., 1990**). L'artémisinine a été caractérisée comme le constituant antipaludique de *A. annua* par des chercheurs chinois. Le principe actif est retrouvé aussi en très faibles quantités chez *Artemisia apiacea* Hance et *Artemisia lancea* Vaniot (**Hsu, 2006**). Il s'agit d'une sesquiterpène (**Annexe 1B**) lactone avec une liaison endopéroxyde unique, essentielle pour l'activité antiplasmodiale et l'action antipaludique.

L'artémisinine et ses dérivés (Artesunate, Artemether,  $\beta$ -Artemether, Arté-éther, Artéinate) sont largement utilisés contre les plasmodies résistantes. Selon Eckstein-Ludwig et al (2003), ils pourraient interagir avec l'hème au cours d'un mécanisme à deux étapes (**Eckstein-Ludwig et al., 2003**). Dans un premier temps, ils pourraient se fixer de façon covalente à l'hème pour donner un radical libre qui pourrait réagir avec des protéines spécifiques des membranes du système endomembranaire du parasite pour les détruire (**Meshnick, 1994 ; Van Agtmael et al., 1999**). Ces composés agissent très rapidement sur les stades allant du trophozoïte au schizonte. Leur rapidité d'action et leur demi-vie très courte limitent le délai d'exposition à des doses subthérapeutiques. Ils réduisent la probabilité de survie des parasites résistants et font baisser les taux globaux de transmission du paludisme. Chez les individus pris en charge avec les CTA, la gamétocytémie diminue de 90 % et la densité parasitaire baisse plus rapidement qu'avec les autres antipaludiques (**Hastings et al., 2002 ; White et Pongtavornpinyo, 2003**).

L'OMS recommande que les dérivés de l'artémisinine soient utilisés sous forme de CTA, c'est-à-dire en associations avec d'autres molécules dans la thérapeutique du paludisme (**WHO, 2003**). Parmi les combinaisons existantes, l'Artesunate-Amodiaquine ou ASAQ et l'Artemether-Lumefantrine ou AL sont celles recommandées par le programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) dans la prise en charge des accès palustres simples en Côte d'Ivoire (**MSHP, 2013**). Ces composés sont aussi utilisés dans la prise en charge des infections à *Schistosoma* spp., *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, au cytomégalovirus

humain, au virus de l'*Herpes simplex*, dans les cas d'hépatites B et C (Efferth *et al.*, 2008). *In vitro*, elles ont même montré une activité contre certaines tumeurs (Efferth, 2007).

### **I-1-6-2- Les antimétabolites**

Les antimétabolites sont des inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques. Ils inhibent la division du noyau du parasite. Les antimétabolites comprennent trois familles d'antipaludiques: les antifolates (Sulfadoxine, Pyriméthamine etc.), les naphtoquinones (atovaquone) et les antibiotiques (Doxycycline, Tétracycline etc.)

#### **I-1-6-2-1- Les antifolates: Antifoliniques et antifoliques**

Les antifolates comprennent les antifoliniques et antifoliques et font partie de la grande famille des antimétabolites (**annexe 1A**). Ce sont deux classes de molécules qui ont pour cibles les enzymes impliquées dans la synthèse des acides nucléiques. Ces molécules agissent aussi sur tous les stades du développement parasitaire qui requièrent la synthèse d'acide nucléique. Après leur absorption, ces molécules ne s'accumulent pas directement dans le plasma mais se lient aux tissus, aux protéines et aux lipides de l'organisme, d'où leur effet prolongé. Leur bonne activité antipaludique est liée à la présence de groupements chlorophényl et isopropyl pour le Proguanil, à la présence du substituant 5-para-chlorophényl et du groupement 6-éthyl pour la pyriméthamine. Les antifoliques sont les sulfamides, c'est-à-dire des dérivés de l'amide-4-aminobenzène, l'acide sulfonique et les sulfones. Ils sont le plus souvent utilisés en association avec la pyriméthamine. C'est le cas avec la Sulfadoxine. Les antifoliniques et les antifoliques ont pour cible la dihydrofolate réductase thymidylate synthase, (*pdfhfr-ts*); enzyme bifonctionnel chez *Plasmodium*, et la dihydroptéroate synthase ou *pdfhps* respectivement (Ferone, 1977 ; Triglia *et al.*, 1998).

Les lysosomotropes et les antimétabolites schizonticides agissent uniquement sur les formes intra-érythrocytaires asexuées du parasite. Le seul gamétocytocide encore utilisable à ce jour est la Primaquine, une amino-8-quinoléine. Elle est majoritairement indiquée pour prévenir les rechutes à *P. vivax* ou *P. ovale* qui peuvent générer des accès palustres à distance de l'accès initial grâce aux hypnozoïtes. Ces derniers sont des stades parasitaires dormants au niveau hépatique (Cooper *et al.*, 1953).

### **I-1-6-2-2- Les naphthoquinones (atovaquone)**

L'atovaquone, en bloquant la chaîne de transfert d'électrons au niveau de son enzyme clé, la dihydroorotate deshydrogénase (DHODase) : est un inhibiteur puissant des fonctions mitochondriales (Touze, et al., 2002).

### **I-1-6-2-3- Les antibiotiques**

Ils peuvent inhiber la synthèse protéique par inhibition de certaines fonctions de l'apicoplaste, un reliquat d'un ancien chloroplaste identifié chez *P. falciparum*. Par exemple :

- Inhibiteurs de l'ARN polymérase : ansamycines.
- Inhibiteurs de l'ADN-gyrase et de la topoisomérase IV : quinolones et fluoroquinolones.
- Inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique : sulfamides et diaminopyridines. (Touze, et al., 2002).

### **I-1-7- Mode d'action des antipaludiques**

Il est possible de classer les antipaludiques selon leur site d'action. Ainsi, on distingue les schizonticides tissulaires, les schizonticides érythrocytaires et les gamétocytocides (**annexe 1**).

\* *Les schizonticides tissulaires* : ils agissent sur les formes intra hépatocytaires : Ce groupe comprend les amino-8-quinoléines (Primaquine, Pamaquine) et les antifolates (Proguanil, Pyriméthamine). En 1940, on s'est rendu compte que la chloroquine n'empêchait pas les rechutes chez les patients infestés par *P. vivax* et *P. ovale* alors que les amino-8-quinoléines avaient une action sur les hypnozoïtes de ces deux espèces plasmodiales. Cependant, leur toxicité limite fortement leur utilisation.

\* *Les schizonticides érythrocytaires* : ils agissent sur les formes intra-érythrocytaires : Ce groupe peut être scindé en deux sous groupes selon leur rapidité d'action. Les schizonticides érythrocytaires d'action rapide que sont la chloroquine, l'amodiaquine, la quinine, la méfloquine, l'halofantrine et l'artémisinine puis les schizonticides d'action lente à savoir les sulfamides, les sulfones et les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase. Contrairement aux premiers sous groupe, ces molécules peuvent agir seules dans le traitement des accès palustres aigus.

\* *Les gamétocytocides* : ils ont une action sur les gamétocytes. Ce sont les 8-amino-quinoléines (primaquine, pamaquine) (**Annexe 1A**), l'artémisinine et ses dérivés à action anti-

gamétocyte vraie et les antifolates (proguanil et pyriméthamine). On ne connaît pas encore de molécule qui agit sur les sporozoïtes (**Baudon et al., 1984**).

Malgré les évolutions récentes dans le domaine de la biologie moléculaire et de la génomique du *Plasmodium*, beaucoup de points de la biologie du *Plasmodium* restent non élucidés et inexplorés à ce jour. Pourtant la connaissance de la structure et du métabolisme du *Plasmodium* est indispensable afin de savoir le point d'impact des antipaludiques. L'acquisition des connaissances sur la structure, la biologie, le métabolisme, et la physiologie du parasite pourrait permettre la mise au point de molécules antipaludiques à action anti-métabolite ou contre certaines structures parasitaires. Le *Plasmodium* est un parasite intracellulaire obligatoire et cela lui permet d'être à l'abri du système immunitaire de l'hôte. Par ailleurs, toute molécule active sur le *plasmodium* doit traverser les membranes de l'hématie ou de l'hépatocyte afin d'agir.

Face à la chimiorésistance, la compréhension des modes d'action des médicaments antipaludiques est essentielle pour optimiser leur emploi et pour comprendre les mécanismes qui sont impliqués dans la résistance. En effet, le *plasmodium* dispose pour son développement intra-érythrocytaire d'un métabolisme et de moyens de défense spécifiques qui constituent autant de cibles pour les antipaludiques. Il s'agit :

- \* De la vacuole nutritive du parasite qui est le siège de la digestion de l'hémoglobine et de la cristallisation de l'hème

- \* Du cytoplasme comportant le cytosol avec de nombreuses enzymes et deux organites essentiels tels la mitochondrie et l'apicoplaste.

- \* Du noyau contenant le matériel génétique.

- \* De la membrane parasitophore qui est le siège du trafic nutritionnel.

- \* De la membrane plasmique, constituée de phospholipides.

### **I-1-7-1. Mode d'action des lysosomotropes**

Les schizonticides érythrocytaires (chloroquine, l'amodiaquine, la quinine, la méfloquine, l'halofantrine, la luméfántrine, artémisinine) agissent tous sur le mécanisme ou les produits de la digestion de l'hémoglobine par le parasite intra érythrocytaire. Ces lysosomotropes ont un mode d'action encore mal élucidé et même la chloroquine qui est la plus étudiée possède un mode d'action imparfaitement connu. En effet, les lysosomotropes sont des bases faibles qui s'accumulent de façon sélective dans la vacuole digestive des plasmodies grâce à un gradient de pH (**Le Bras, 1995 ; Wengelnik et al., 2002**). La concentration pouvant passer du nano

mole dans le plasma au milli mole dans la vacuole digestive. Sous sa forme non protonée, la chloroquine ne peut diffuser à travers la membrane digestive (**Hyde., 2002**). Le pH du plasma est de 7,4 et la chloroquine monoprotinée peut traverser la membrane érythrocytaire. Le pH intra érythrocytaire est de 6,8 et la chloroquine devient diprotinée et donc incapable de traverser la membrane à nouveau pour se retrouver dans le plasma; la présence d'une perméase *ATPase* dépendante est nécessaire. A l'intérieur du parasite, le pH est de 7,2 et la chloroquine devient monoprotinée et peut traverser la membrane lysosomiale. Le pH intra lysosomiale étant de 5,2, la chloroquine se trouve piégée à l'intérieur du lysosome où elle interfère avec le mécanisme de la digestion de l'hémoglobine (**Figure 6**). Les protéases acides permettent la dégradation de l'hémoglobine à l'intérieur du *Plasmodium*. Des inhibiteurs des protéases ont été utilisés récemment pour étudier le mode d'action des lysosomotropes. Ces inhibiteurs réduisent l'incorporation des lysosomotropes dans le pigment malarique, témoignant du lien entre la digestion de l'hémoglobine et le mode d'action des lysosomotropes (**Hyde, 2002**).

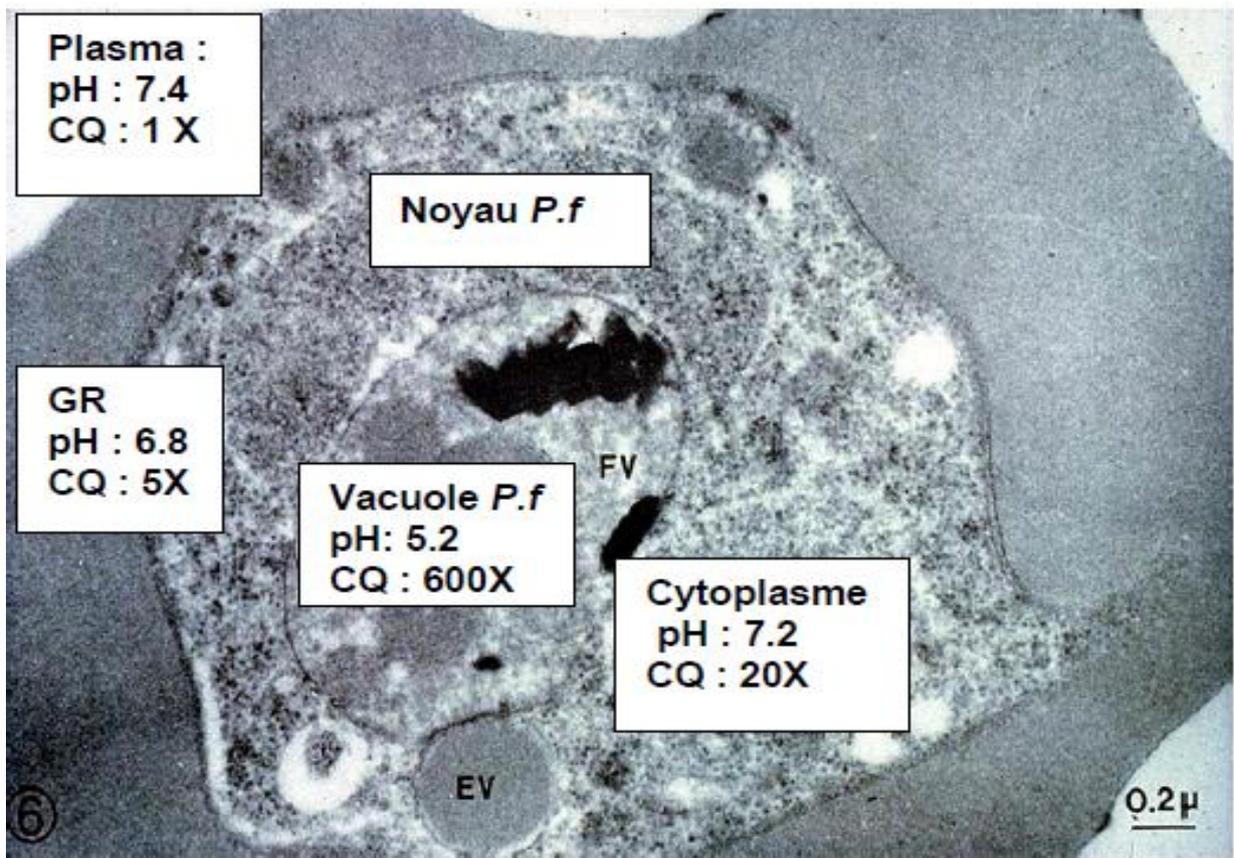


Figure 6 : Accumulation de la chloroquine dans le *Plasmodium* (Le bras, 1995)

#### **I-1-7-1-1- Mode d'action des 4-amino-quinoléines**

Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer le mode d'action des amino-4-quinoléines (chloroquine et amodiaquine) dont la théorie selon laquelle la dégradation de l'hémoglobine dont se nourrit le *Plasmodium* produit la ferriprotoporphyrine IX (FPP). Or cette substance est toxique pour le parasite, aussi celui-ci sécrète-t-il une protéine qui se lie à la FPP empêchant celle-ci d'agir sur lui. Les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine) retarderaient la séquestration de FPP toxique, lui permettant d'exercer son action cytotoxique (**Fitch, 1986**). Le parasite meurt donc par exposition à ses propres déchets de digestion d'hémoglobine.

La chloroquine pourrait aussi inhiber la digestion de l'hémoglobine en se liant à la FPP pour former un complexe (toxique pour le parasite) de type chloroquine – hème par élévation du pH intra vacuolaire et diminution de la disponibilité en fer à partir de l'hème.

Selon Warhurst (1986), la chloroquine pénétrerait dans le cytoplasme parasitaire par l'intermédiaire de transporteur (perméases) agissant sous l'influence d'un gradient de pH. La chloroquine interférant avec le catabolisme de l'hémoglobine affamerait le *plasmodium* en acides aminés essentiels à la synthèse protéique (**Warhurst, 1986**). La chloroquine bloque la dégradation de l'hémoglobine, source principale des acides aminés du parasite. La cible serait l'hème polymérase, enzyme qui détoxifierait l'hème par la formation d'hémozoïne insoluble ou pigment malarique (**Le Bras, 1995**). Autrement, il y'a une inhibition de l'hème polymérase qui transforme l'hème toxique pour le parasite en hémozoïne atoxique, etc.

Le mécanisme d'action de la chloroquine demeure mal élucidé mais l'accumulation de la chloroquine grâce à un gradient de pH, suivie de l'inhibition de la digestion de l'hémoglobine semble être la théorie la plus plausible et la plus acceptée actuellement. La résistance aux amino-4-quinoléines serait la conséquence du développement par les parasites de mécanismes d'expulsion des antipaludiques hors de leur vacuole. Cet efflux pourrait être inhibé par certains médicaments comme les anticalciques (**Bitonti et al., 1988**).

#### **I-1-7-1-2- Mode d'action des amino-alcools**

Le mode d'action de la quinine et de la méfloquine n'est pas plus connu que celui de la chloroquine. Du fait d'une faible résistance aux amino-alcools, le mode d'action de la quinine n'est pas aussi étudié. La quinine et la méfloquine agissent au niveau de la vacuole digestive en bloquant la dégradation enzymatique de l'hémoglobine, source principale en acides aminés du parasite par divers mécanismes dont :

- L'inhibition de divers enzymes dont celles de dégradation de l'hémoglobine,

- La fixation à l'ADN plasmodiale et
- L'inhibition de la réplication (**Baudon et al., 1984**).

### **I-1-7-1-3- Mode d'action de l'artémisinine**

L'artémisinine et ses dérivés sont des antipaludiques de type peroxyde qui libèrent des radicaux libres par rupture du pont peroxyde. L'artémisinine a une action gamétocytocide qui a pour avantage de réduire la transmission et de limiter les risques de voir émerger des résistances (**Bessard, 2002**).

La digestion de l'hémoglobine dans les érythrocytes parasités libère de l'hème libre. L'artémisinine est capable grâce à sa structure endopéroxyde d'alkyler l'hème ou des protéines spécifiques de parasites comme l'Histidine Rich Proteines (HRP). Il a été montré que l'artémisinine et ses dérivés réagissent facilement avec l'hème et que les deux éléments se fixent *in vitro* l'un à l'autre pour donner des produits de couplage hème-artémisinine. Cette réaction d'alkylation du noyau porphyrinique de l'hème inhibe la formation de l'hémozoïne inerte (**Robert & Meunier, 1997**). La même équipe de recherche a utilisé des souris infestées expérimentalement afin de démontrer que la réaction a lieu également *in vivo*. Après traitement à l'artémisinine, l'hème des souris infectées a été alkylé au noyau trioxane de l'artémisinine car les produits de couplage hème-artémisinine ont été détectés dans la rate et l'urine des souris malades (**Meunier, 2000**). Aucun de ces produits n'a été retrouvé chez les souris saines traitées à l'artémisinine. Ainsi cette équipe a mis en évidence les propriétés alkylantes de l'artémisinine non seulement *in vitro* mais également *in vivo* (**Robert & Meunier, 1997**).

### **I-1-7-2- Mode d'action des antimétabolites**

Les antimétabolites qui sont répartis en deux grandes familles, les antifoliques (les sulfamides et les sulfones) et les antifoliniques (les biguanides et les diamino-pyrimidines) agissent au niveau de la voie de synthèse des folates. Ces derniers sont essentiels à la biosynthèse des acides nucléiques du parasite. En effet, le parasite ne peut utiliser qu'une très faible quantité des folates présents dans le plasma de l'hôte si bien qu'il doit assurer la synthèse *de novo* à partir de l'acide para-amino benzoïque (PABA). L'association de l'acide para-amino benzoïque à la ptéridine donne le dihydroptéroate qui deviendra le dihydrofolate. Cette voie métabolique spécifique aux micro-organismes est catalysée par une enzyme : la dihydroptéroate synthétase (DHPS).

Le dihydrofolate est converti en acide tétrahydrofolique grâce à une enzyme : la dihydrofolate réductase thymidilate synthétase (DHFR-TS). Cette enzyme bi-fonctionnelle chez les plantes supérieures et les protozoaires permet aussi la transformation de l'UMP en dTMP. Les nucléotides formés permettront la synthèse de l'ADN (**Yuthavong, 2002**). Les antimétabolites agissent à deux niveaux de cette synthèse. La dihydro-orotate déshydrogénase (DHOD) catalyse non seulement la transformation du dihydroorotate en orotate mais aussi la chaîne de transport d'électrons du cytochrome (**Figure 7**).

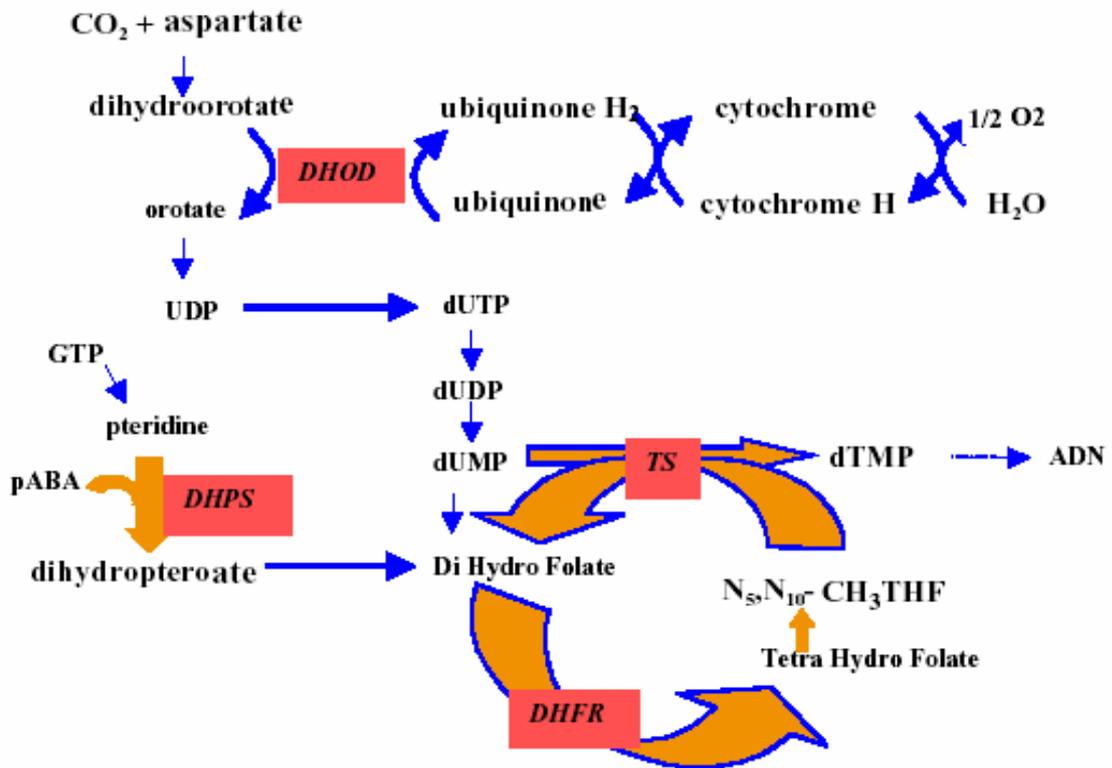


Figure 7: Voie et mode d'action des antimétabolites (Le bras, 1999).

### **I-1-7-2-1- Mode d'action des antifoliques**

Les sulfamides et les sulfones sont des analogues structuraux de l'acide para aminobenzoïque (PABA). Ils agissent en inhibant par compétition avec le PABA l'action de la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui catalyse la synthèse de l'acide dihydrofolique (**Roland et al., 1979**).

### **I-1-7-2-2- Mode d'action des antifoliniques**

Les biguanides et les 2.4 diamino-benzyl-pyrimidines ont pour cible la dihydrofolate réductase (DHFR) : En se fixant sur le site de l'enzyme, ils bloquent la synthèse des bases pyrimidiques puis de l'ADN d'où un arrêt de la croissance du parasite (**Le Bras, 1995**).

### **I-1-7-3- Mode d'action des gamétocytocides**

L'une des indications de la primaquine et de la pamaquine est leur utilisation comme gamétocytocides et comme hypnozoïtociques. *In vivo*, la primaquine modifie la morphologie des mitochondries tant chez les trophozoïtes érythrocytaires de *Plasmodium berghei* que chez les schizontes pré érythrocytaires de *Plasmodium yoellii* d'où l'hypothèse selon laquelle le mode d'action de la primaquine serait en relation avec la chaîne de transport d'électrons et d'oxydo-réduction des ubiquinones (**Bryskier & Labro, 1988**). Il est admis que ces molécules sont actives par l'intermédiaire de leurs métabolites. Le principal métabolite de la primaquine chez l'homme est la carboxyprimaquine. L'artémisinine présente aussi une action gamétocytocide ce qui présente l'avantage de réduire la transmission et de limiter les risques de voir émerger des résistances (**Bessard, 2002**).

### **I-1-8- Méthodes d'études de la chimiorésistance**

Etant donné qu'il est fréquent que la résistance se développe contre un ou plusieurs antipaludiques, les programmes de lutte contre le paludisme et les institutions de recherche doivent être en mesure d'évaluer leur efficacité de façon à obtenir en temps utiles, des informations pertinentes, fiables et compréhensibles.

#### **I-1-8-1- Test *in vivo* ou test de l'efficacité thérapeutique**

Méthodes de référence standardisées par l'OMS (**WHO, 2009**), ces tests permettent d'évaluer l'efficacité clinique des schémas thérapeutiques recommandés pour traiter les accès palustres non compliqués. L'efficacité du principe actif est déduite de la disparition de la parasitémie et de l'amélioration du tableau clinique du patient. Le suivi biologique et parasitologique, pendant 28 ou 42 jours, des patients traités permet de distinguer quatre types de réponse au

traitement : (1) l'échec thérapeutique précoce (ETP), (2) l'échec parasitologique tardif (EPT), (3) l'échec clinique tardif (ECT), et (4) une réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) qui caractérise un parasite sensible. Ces études cliniques sont généralement coordonnées avec des tests *in vitro* et moléculaires.

#### **I-1-8-2-Tests de sensibilité *in vitro***

Ils consistent à mettre en culture, soit directement (test *ex vivo*), soit après adaptation en culture continue (test *in vitro*), un isolat sauvage de *P. falciparum* en présence de concentrations croissantes d'antipaludique (**Basco, 2007**). La mesure de la croissance des parasites (microscopique, isotopique, ELISA ou fluorimétrique) en fonction de la concentration en antipaludique permet de définir son niveau de sensibilité. Le résultat est objectivé par la concentration inhibitrice 50 % (IC50), valeur correspondante à la concentration d'antipaludique permettant d'inhiber la croissance de 50 % des parasites (par rapport au témoin sans drogue). Même si cette technique nécessite une logistique et un plateau technique de qualité, elle permet de tester plusieurs antipaludiques en parallèle et de s'affranchir des facteurs liés à l'hôte (immunité, variation individuelle de la concentration sérique en antipaludique).

#### **I-1-8-3- Tests moléculaires**

Il s'agit des méthodes de génotypage (identification des variants génétiques) réalisées sur l'ADN du parasite. Ces méthodes ont profité de l'essor de la biologie moléculaire et de la connaissance récente du génome de *P. falciparum* (**Gardner et al., 2002**). La recherche est basée sur la détection des modifications des gènes du parasite impliqués dans la résistance aux antipaludiques. Dans ce cas, l'objectif vise plutôt à prédire la possibilité d'une résistance associée à un mécanisme précis, mais pas à vérifier l'efficacité d'un médicament dans une population (**Djimde et al., 2001 ; Picot, 2001 ; Plowe, 2003 ; Plowe et al., 2007**). Les avancées des techniques de biologie moléculaire ont permis l'identification d'un certain nombre de marqueurs moléculaires de résistance (**Steketee, 2009**). Les tests génotypiques consistent à détecter à partir du sang total de patients, des marqueurs génétiques établis comme étant responsables de la résistance du parasite à un antipaludique. Les mécanismes de résistance connus pour le moment sont essentiellement des mutations géniques ponctuelles sur plusieurs gènes de résistance (*Pfcr1*, *Pfmdr1*, *Pfdhps*, *Pfdhr*, *PfNHE*, *PfATPase6*, *Cytochrome b*, *K13 propeller* etc.) impliqués dans la résistance (**Eckstein-Ludwig et al., 2003 ; Mita, 2009 ; Tahar et al., 2009 ; Henry et al., 2009 ; Ariey et al., 2014**).

L'identification de ces mutations chez les parasites résistant aux concentrations thérapeutiques sanguines et la démonstration que ces mutations sont liées à des échecs en font des marqueurs moléculaires des résistances.

### **I-1-9- Résistance aux antipaludiques**

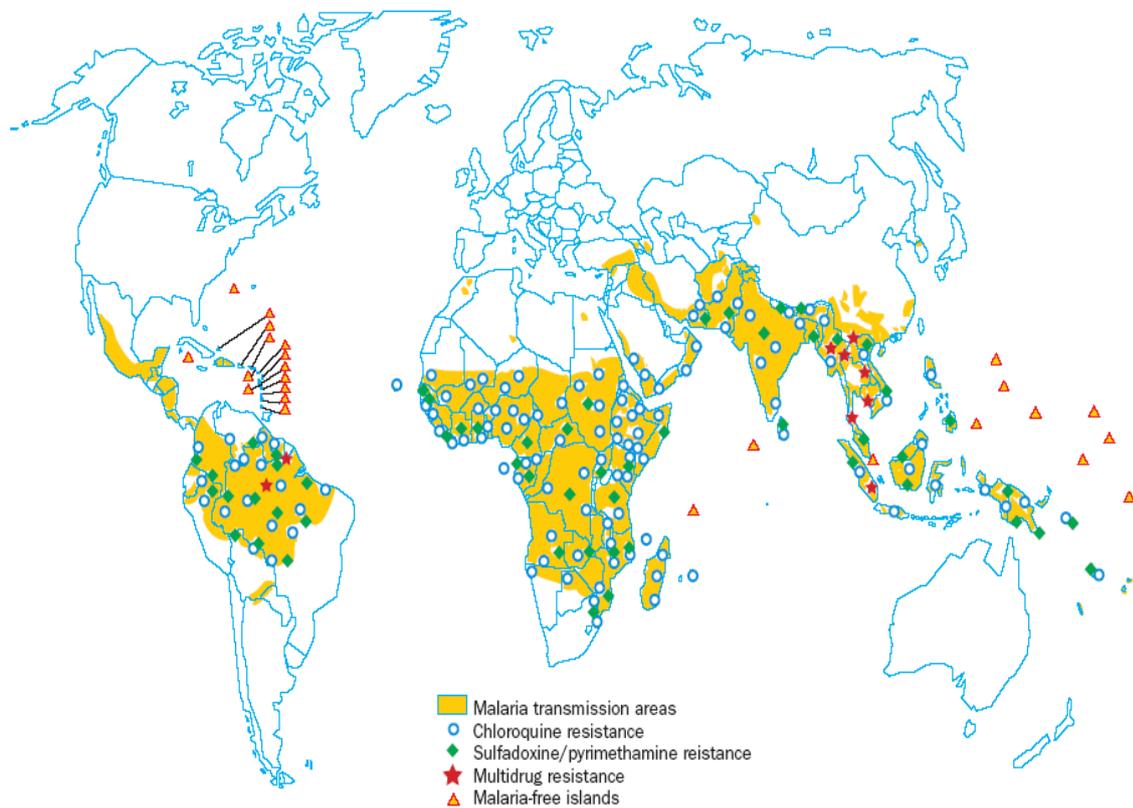
Le terme «résistance du parasite» se définit comme l'aptitude du parasite à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinaires recommandées mais comprises dans les limites de la tolérance du sujet (WHO, 1973). Cependant, le médicament devrait accéder au parasite ou au globule rouge infecté pendant toute la durée nécessaire pour l'activité normale de la molécule (Bruce-Chwatt *et al.*, 1986).

Le développement et la diffusion de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux médicaments antipaludiques sont l'un des obstacles majeurs qui entravent le contrôle de l'endémie palustre, en particulier en l'absence d'un vaccin efficace disponible dans un avenir proche (Ringwald, 2007). De nos jours, aucun continent n'est épargné par le phénomène de chimiorésistance de *P. falciparum* aux antipaludiques (figure 8). L'apparition des souches de *Plasmodium* résistantes aux antipaludiques reste encore incomplètement élucidée. Toutefois, les principaux mécanismes évoqués se résument : 1) à l'inactivation enzymatique ou à la dégradation du médicament, 2) à une altération du site de fixation du médicament, 3) à une inhibition de l'entrée du médicament ou 4) à une excrétion active du médicament (Nikaido, 2001). On pense aussi que l'utilisation abusive des antipaludiques (pression médicamenteuse) et surtout à des doses inadéquates (sous dosage) aurait probablement entraîné la sélection et l'extension de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*. On évoque également la propagation préférentielle des souches de *P. falciparum* résistantes aux amino - 4 quinoléines (Basco & Ringwald, 2000 ; Gardella *et al.*, 2008).

La résistance aux antipaludiques résulte aussi de mutations qui modifient la structure du parasite ou l'activité du médicament au niveau de sa cible ou empêche le médicament de parvenir à cette cible (Hyde., 2002).

La résistance de *Plasmodium falciparum* aux précédentes générations de médicaments comme la chloroquine et la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) s'est généralisée au cours des années 1950 et 1960 en Asie du sud-est et en Amérique latine (WHO, 2016). A partir de ces deux foyers originels, la chloroquinorésistance de *P. falciparum* s'est étendue à une grande partie des pays de l'Amérique centrale et du Sud, à la quasi-totalité du Sud-est Asiatique, à la Chine et en Inde. En 1978, apparurent les premiers cas de chloroquinorésistance en Afrique de l'est,

au Kenya et en Tanzanie (**Parzy *et al.*, 1995**). Ces dernières années, une résistance à l'artémisinine a été signalée dans cinq pays du Bassin du Mékong : le Cambodge, le Myanmar, la République démocratique populaire lao, la Thaïlande et le Vietnam. L'OMS préconise une surveillance systématique de la résistance aux médicaments antipaludiques et aide les pays à renforcer leurs efforts dans ce domaine important (**WHO, 2016**).



**Figure 8:** Distribution géographique de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques (OMS, 2005) ; <http://www.rbm.who.int/wmr2005/html/map5.htm>

Consulté le 12 Novembre 2016

### **I-1-9-1- Mécanismes de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques**

#### **I-1-9-1-1- Mécanisme de la résistance à la chloroquine**

L'activité la plus remarquable de la chloroquine est sa capacité de se concentrer sélectivement dans la vacuole digestive du trophozoïte érythrocytaire où elle inhibe la digestion de l'hémoglobine. Chez le parasite non traité, l'hème est polymérisé sous une forme inerte appelée hémozoïne (pigment malarique) qui est ultérieurement phagocytée par les macrophages et accumulée dans la rate. Cependant, toutes les souches de *P. falciparum* chloroquinorésistantes présentent un déficit de concentration en chloroquine dans la vacuole digestive (Nessler *et al.*, 2004, Huaman *et al.*, 2004). Cette réduction de l'accumulation de la chloroquine résulte soit d'une diminution de l'influx de la chloroquine, soit d'une augmentation de l'efflux ou des deux par réduction de l'affinité de la molécule à son site d'action (Hyde, 2002). Plusieurs théories ont été émises pour expliquer la résistance de *P. falciparum* aux amino-4-quinoléines dont :

\* La réduction de la pénétration de la molécule dans la vacuole par diminution qualitative ou quantitative de la perméase qui permettrait la pénétration des 4-amino-quinoléines. L'hémozoïne des souches chloroquinosensibles et chloroquinorésistantes présente la même affinité pour le complexe hème-chloroquine, témoignant que le mécanisme de la chloroquino-résistance est lié à une diminution de l'influx plutôt qu'à une augmentation de l'efflux de la chloroquine (Hyde, 2002).

\* L'augmentation de l'efflux de la molécule par la présence d'une perméase dans la membrane vacuolaire permettant la sortie de la chloroquine diprotonée. En effet, selon Krogstad *et al.* (1987), les souches résistantes accumulent moins de chloroquine que les souches sensibles dans leurs vacuoles digestives et cela serait à la base du mécanisme de la résistance. L'efflux de la chloroquine des souches résistantes est 40 à 50 fois plus important que celui des souches sensibles malgré leurs degrés initiaux d'accumulation de la chloroquine identiques. Le vérapamil, la vinblastine et la dannomycine, des inhibiteurs de canaux calciques (Krogstad *et al.*, 1987), tout comme la désipramine un antidépresseur tricyclique (Bitonti *et al.*, 1988), entraînent une réversion de la chloroquinorésistance (efflux massif de la chloroquine).

\* La diminution de la liaison chloroquine-ferriprotoporphyrine IX. La ferriprotoporphyrine est un composé transitoire de la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole digestive parasitaire qui, couplée à la chloroquine est toxique et lytique pour le parasite. Dans cette théorie, la ferriprotoporphyrine IX va rejoindre sa voie physiologique de détoxification

qui aboutit à un polymère insoluble, soit par liaison avec une protéine liant l'hème soit par l'action d'une hème polymérase (**Parzy et al., 1995**).

\* L'alcalinisation vacuolaire, due à la déficience de pompe à protons dépendant de l'ATP. Dans ce cas la protonation des amino-4 quinoléines qui sont des bases faibles sera alors diminuée. La conséquence directe est la diffusion de la chloroquine hors de la vacuole. Si le mécanisme biochimique de la chloroquinorésistance est difficile à élucider, toutes les théories s'accordent à reconnaître que la caractéristique commune des parasites résistants est une altération de l'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive (**Halidou et al., 2004**). La polychimiorésistance est une résistance à plusieurs antipaludiques. Elle peut être croisée ou simultanée. La résistance simultanée résulte de l'utilisation abondante et concomitante de plusieurs antipaludiques alors que la résistance croisée résulte de l'utilisation d'antipaludiques ayant un mode d'action commun. La résistance aux lysosomotropes pourrait faire intervenir un mécanisme de type *mdr* (*multi drug resistance*) (**Le Bras, 1995**). La résistance croisée entre les amino-4-quinoléines, les arylméthanol et les dérivés phénanthréniques est un phénomène lié à leur mode d'action et à leur mécanisme de résistance identique. En effet, la découverte du gène *pfmdr-1* et *pfcr1* ont permis d'explicitier le mécanisme moléculaire de la résistance aux lysosomotropes en général et à la chloroquine en particulier.

#### \* **Le gène *pfmdr-1***

Un regain d'intérêt pour les composés quinoléiques a suivi la démonstration de réversion de la chloroquinorésistance par le vérapamil, un modulateur de la résistance des cellules cancéreuses multirésistantes de mammifères. Cette découverte a abouti à la localisation dans la membrane de la vacuole digestive de *P. falciparum* de la protéine pgh1, analogue aux P-glycoprotéines surexprimées sur les cellules cancéreuses des mammifères, où elles fonctionnent comme des pompes expulsant les médicaments cytotoxiques (**Le Bras, 1999**). Cette glycoprotéine est codée par le gène *Pfmdr1*, situé sur le chromosome 5. Des mutations ponctuelles de ce gène seraient liées à la chloroquinorésistance. La mutation de la protéine PFMDR dans laquelle il y a un remplacement de la tyrosine (Y) par l'asparagine (N) au niveau du codon 86 serait lié à un efflux de la chloroquine hors de la vacuole digestive (**Foote et al., 1990, Adugu et al., 1996**).

Le transport de la chloroquine par des plasmodies disposant du gène de la protéine pgh1 mutée est altéré suite à la substitution de la tyrosine (Y) par l'asparagine (N) au niveau de la protéine pgh1. Cependant, la mise en évidence d'une mutation *PfmdrN86Y* n'a pas permis de

confirmer une chloroquinorésistance. Une étude du polymorphisme du gène *pfmdr1* sur les souches plasmodiales du Sénégal et du Cameroun a montré que l'allèle muté *pfmdr86Y* est présent aussi bien chez les souches résistantes (CI50 > 100nM) que sensibles (**Basco & Ringwald, 1998 ; Thomas *et al.*, 2002**). La répétition du nombre de copie du gène *pfmdr* est suspectée d'être responsable de la résistance à méfloquine (**Price *et al.*, 1997**) en Asie du Sud-Est. Le phénotype efflux rapide qui caractérise la chloroquinorésistance semble donc polygénique, faisant intervenir une ou plusieurs mutations au niveau du gène *Pfmdr1*. D'autres mutations notamment des codons en position 1034, 1042 et surtout 1246 du polypeptide du gène *Pfmdr1* pourraient être impliquées. Il se pourrait aussi qu'il ait plusieurs gènes (*pfmdr2* ou *pfcr1*) à effet complémentaire à celui du *pfmdr1*. La mutation *pfmdr86Y* est plus fréquente dans les souches d'Afrique tandis que la mutation *pfmd1246-Y* est surtout présente en Amérique latine. Une étude sur la valeur prédictive des marqueurs moléculaires *Pfmdr1*, *pfcr1* a montré que c'est surtout la mutation *pfcr1K76T* qui est corrélée à l'échec thérapeutique (**Tableau I**) (**Djimde *et al.*, 2001**).

**Tableau I : Marqueurs génétiques de résistance aux antipaludiques (Hyde, 2005 ; World Health Organisation, 2005)**

Molécule	Gène	Mutations principales	Références
Chloroquine	<i>Pfcr</i>	K76T (causale)	Djimde <i>et al.</i> , 2001
Amodiaquine	<i>pfmdr1</i>	N86Y (associé)	Holmgren <i>et al.</i> , 2006
	<i>Pfcr</i>	K76T	
Pyriméthamine	<i>pfmdr1</i> <i>Pfdhfr</i>	N86Y S108N+N51I + C59R (causale)	Kublin <i>et al.</i> , 2002
Proguanil / Cycloguanil	<i>Pfdhfr</i>	S108N+ (A16V ou I164L) + (N51I et / ou C59R)	Kublin <i>et al.</i> , 2002
Sulfadoxine	<i>pfdhps</i>	A437G + K540E (causales)	Kublin <i>et al.</i> , 2002
Méfloquine, halofantrine, luméfantrine, quinine	<i>pfmdr1</i>	N86Y et autres mutations ponctuelles (184, 1034, 1042 et 1246)	Price <i>et al.</i> , 2004
Méfloquine, halofantrine, luméfantrine, quinine	<i>pfmdr1</i>	Nombre de copies >1	
Atovaquone	<i>Pfcytb</i>	Y268S, Y268C, Y268N	Gil <i>et al.</i> , 2003
Artémisinine et ses dérivés	<i>pfatp6</i>		

**Note:** La mutation K76T signifie que la lysine (K) en position 76 du polypeptide PfCRT est remplacée par la théonine (T) .

La mutation S108N signifie que la sérine (S) en position 108 du polypeptide PfDHFR est remplacée par l'asparagine (N)

Les abréviations d'une lettre pour chaque acide aminé se trouve en annexe. (Annexe 2)

### \* Le gène *pfert*

Une analyse du génome des souches chloroquinosensibles (Dd2, Indochine) et chloroquinorésistantes (HB3, Honduras) a permis d'identifier récemment un gène candidat, conférant à *P. falciparum* une résistance à la chloroquine. Il s'agit du gène *pfert* (**Fidock et al., 2000**). Ce gène situé sur le chromosome 7 code pour une protéine transmembranaire de la vacuole digestive du *Plasmodium*. Il est polymorphe au niveau de 30 bases mais seule la mutation ponctuelle *K76T* est associée à la chloroquinorésistance (**Tableau I**) (**Sidhu et al., 2002 ; Holmgren et al., 2006**).

Une étude randomisée comparant la prévalence de ce marqueur avant et après traitement à la chloroquine de sujets impaludés au Mali, a montré que la mutation *pfertK76T* est présente chez tous les sujets présentant un échec thérapeutique (**Djimde et al., 2001**).

Une étude analogue menée en Mauritanie pour calculer la valeur diagnostic des marqueurs *pfertK76T* et *pfmdrN86Y* en comparaison avec le test *in vivo* comme méthode de référence a montré une sensibilité et une spécificité de 60,6% et 65,4% pour le *pfmdr* et de 100% et 65,3% pour le *pfertK76T* (**Jelinek et al., 2002a**). La mutation *pfertK76T* est donc la plus prédictive de la résistance des souches plasmodiales d'Afrique.

Comme pour le gène *pfmdr1*, la mutation *pfertK76T* n'est pas suffisante pour qu'une souche soit résistante. Plusieurs codons pourraient intervenir dont le 72, 74, 75, 220, 271, 326, 356 et 371. La démonstration évidente du rôle des haplotypes du gène *pfert* dans le mécanisme de la chloroquinorésistance des souches d'Afrique, d'Asie et d'Amérique a été réalisée par mutagenèse. Des souches chloroquinosensibles (GC03) ont été transformées en souches chloroquino-résistants par intégration de plasmides. La recombinaison génétique a été confirmée par western blot et test de chimiosensibilité (CI50 > 100nM).

L'utilisation du vérapamil a entraîné une réversion de l'acquisition de cette chloroquinorésistance, montrant de façon concluante le rôle clé de la mutation *pfertK76T*, dans le mécanisme de la chloroquinorésistance (**Chen et al., 2001 ; Sidhu et al., 2002 ; Cooper et al., 2002**). Une analyse du polymorphisme du gène *pfert* des souches en Asie (Cambodge) par PCR/Séquençage a montré que c'est plutôt la mutation D/N75E qui serait corrélée de façon significative à la chloroquinorésistance *in vitro* (60%). La mutation *pfertK76T* est présente aussi bien dans les souches résistantes (55,2%) que sensibles d'Asie, suggérant l'existence de facteurs additionnels dans le mécanisme de la chloroquinorésistance (**Lim et al., 2003**).

L'amplification suivie du séquençage d'un fragment de 426 pb (du nucléotide 44 de l'exon 1 au nucléotide 468 de l'exon 2), centré autour du codon 76 et d'un autre fragment de 309 pb centré autour du codon 220 (du nucléotide 1042 de l'exon 4 au nucléotide 1349 de l'exon 5) montre un polymorphisme des bases de la position 222 à la position 231 et celles en position 660. Les autres bases en position 216, 219, 234, 240, 663 et 666) étant conservées.

La caractérisation du segment allant du codon 72 au codon 76 révèle plusieurs haplotypes selon l'origine géographique des souches. Les souches chloroquinosensibles présentent l'haplotype CVMNK (Allèle sauvage) alors que les souches chloroquinorésistantes présentent l'haplotype CVIET (Allèle muté) en Afrique et en Asie et SVMNT en Amérique du Sud et en Papouasie Nouvelle Guinée. A titre d'exemple au Cambodge, l'haplotype CVIETIF est prédominant avec une prévalence de 92% à l'ouest et 11% à l'est où prédominent les haplotypes CVMNKIF et CVIDTIF (**Lim et al., 2003**). En résumé, un parasite résistant présente une ou plusieurs mutation(s) génétique(s) au niveau du gène *pfcr* (**Babiker et al., 2001**). La mutation *pfcrK76T* étant la plus prédictive de l'échec thérapeutique à la chloroquine dans les souches d'Afrique. La mutation D/N75E du codon 75 et celle du codon 220 semblent avoir un effet additionnel chez les souches d'Asie.

#### **I-1-9-1-2- Mécanisme de la résistance aux antifolates**

L'introduction des antifolates utilisés en monothérapie s'est accompagnée d'une émergence rapide des souches résistantes à la pyriméthamine qui est associée à la sulfadoxine où ils agissent de façon synergique (**Biswas et al., 2000**). Les plasmodies humaines peuvent synthétiser leurs bases pyrimidiques mais ne peuvent synthétiser leurs purines et utilisent celle de l'hôte. Les deux cibles des antimétabolites sont la dihydrofolate réductase (*dhfr*) et la dihydroptéroate synthétase (*dhps*) dont les gènes se trouvent respectivement sur les chromosomes 4 et 8 (**Parzy et al., 1995**).

Les gènes *dhfr* et *dhps* ont été séquencés puis clonés. La résistance aux antifoliques et aux antifoliques est respectivement consécutive à une baisse de leur affinité pour la *dhfr* et la *dhps*, liée à une modification structurale du site actif des enzymes. En effet, la pyriméthamine a une analogie de structure avec la *dhfr* lui permettant d'inhiber son action par compétition. On a identifié aussi chez *P. falciparum* plusieurs mutants résistants aux antimétabolites :

- La résistance à la pyriméthamine et au proguanil est associée à des mutations du gène *dhfr* et

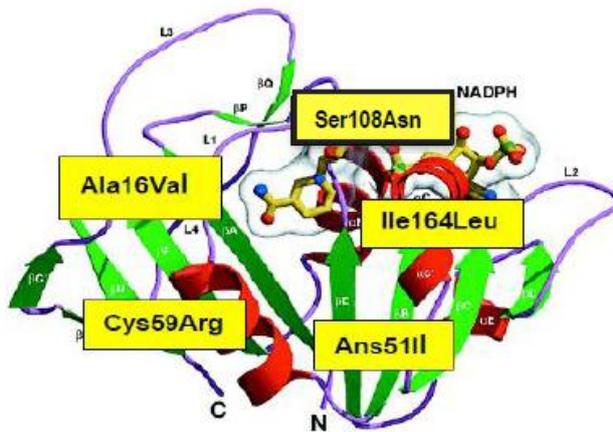
- La résistance aux sulfamides et sulfones est associée à des mutations du gène *dhps* (**Tanaka et al., 1990 ; Thomas et al., 2005**).

### \* Le gène *pfdhfr*

Le gène *pfdhfr* est séquencé et cloné. L'analyse de la séquence révèle que l'évènement majeur de la pyriméthaminorésistance est due à une mutation ponctuelle (*Ser108Asn*) au niveau du codon 108 du gène de la dihydrofolate réductase (**Figure 9**). Elle se traduit par la substitution de la sérine par l'asparagine dans la séquence des acides aminés de l'enzyme. Cette mutation entraîne consécutivement une baisse de l'affinité de la pyriméthamine pour la *dhfr*, liée à une modification structurale du site actif de l'enzyme. L'apparition rapide en Asie du Sud-est, de la pyriméthamino-résistance en 1967, un an après l'introduction de la sulfadoxinepyriméthamine, suggère qu'une seule mutation est suffisante pour induire une résistance. Cependant, des mutations additives associées ont été décrites notamment au niveau des codons 16, 51, 59, et 164. La pyriméthamino-résistance est surtout corrélée à la mutation des codons 108, 51 et 59 alors que la résistance au cycloguanil, le métabolite du proguanil est surtout corrélée à la mutation du codon 16 et 164 (**Hyde, 2002**). En effet, la mutation *Ser108Asn* confère la résistance *in vitro* à la pyriméthamine et une baisse de la sensibilité au proguanil et chlorguanil (**Cowman & Lew, 1990**).

Les mutations additives *Ser108Asn* et/ou *Cys59Arg* augmentent le niveau de la résistance à la pyriméthamine et modère la sensibilité aux proguanil et chlorguanil. La double mutation *Ser108Asn / Ser16Thr* accentue la résistance au proguanil et au chlorguanil avec une légère baisse de sensibilité à la pyriméthamine. La mutation *Ile164Leu* observée dans certaines régions d'Asie du sud-est et d'Amérique du Sud, couplée à la mutation 108, 51 et 59 confère la résistance à la fois à la pyriméthamine et au proguanil. Alors que dans certaines régions d'Amérique c'est la mutation du codon 50 qui semble avoir le même effet que celle du codon 59, en Afrique ce sont surtout les trois mutations 108, 59 et 51 qui sont le plus corrélées à la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine (**Tableau I**) (**Kublin et al., 2002**).

En résumé, le niveau de la résistance aux antifolates augmente avec le nombre de mutations sur le gène de la dihydrofolate réductase et la mutation la plus prédictive est la mutation *dhfrSer108Asn*. Les mutations du codon 51 et 59 baissent l'affinité de la pyriméthamine sans affecter le fonctionnement de l'enzyme. Les souches les plus résistantes sont celles qui présentent une triple mutation au niveau des codons 108, 59, 51(**Hyde, 2002**).



**Figure 9:** Modèle du gène *dhfr* de *P. falciparum* et son NADPH (Yuthavong, 2002).

**\* Le gène *pf dhps***

La cible de la sulfadoxine est la dihydroptéroate synthétase (DHPS). L'analyse des séquences du gène *dhps* des souches plasmodiales résistantes et sensibles a permis d'identifier des mutations pouvant expliquer le mécanisme de la résistance à la sulfadoxine (Triglia *et al.*, 1998). Les mutations ponctuelles *Ser436Ala*, *Ala437Gly*, *Lys540Glu* et *Ala581Gly* ont été associées à la résistance *in vitro* aux antifoliniques (Parzy *et al.*, 1995). Cependant, les mutations au niveau du codon 437 et 540 sont le plus corrélées à cette résistance (tableau 1) (Kublin *et al.*, 2002). En effet, le risque d'échec thérapeutique au Fansidar® est très élevé lorsque le parasite porte ces mutations. Lors d'une étude d'efficacité au Fansidar®, Kublin *et al.* ont montré que les parasites qui ont moins de trois mutations du gène *pf dhfr* sont éliminés (Kublin *et al.*, 2002). Cependant, les parasites ayant les trois mutations majeures du gène *pf dhfr* et les deux du gène *pf dhps* résistent au traitement. C'est le cas du traitement au Fansidar® qui sélectionne aussi bien le gène *pf dhfr* que le gène *pf dhps*. Une étude semblable au Mali montre que c'est la double mutation des codons 108/59 qui est significativement sélectionnée. La mutation du codon 51 est rare, celle du codon 164 est absente. Les mutations *Phe436* et *Thr / Ser613* ne sont pas sélectionnées par le traitement (Diourte *et al.*, 1999).

L'évolution de la résistance au Fansidar® se fait par paliers progressifs en trois étapes :

- Sélection des gènes *dhfr* et *dhps* mutés
- Multiplication de gènes mutés avec apparition des mutations corrélées à la forte résistance et enfin
- Expression de l'échec thérapeutique où le parasite porte des fragments d'ADN de gènes avec assez de mutations pour survivre à des doses thérapeutiques (Wernsdorfer & Paye, 1991).

Les mutations *Ser108Ans*, *Asn51Ile*, *Cys59Arg*, *Ala437Gly*, *Lys540Glu*, portées par le même parasite sont statistiquement associées à l'échec thérapeutique *in vivo* et à une très forte résistance *in vitro*.

### **I-1-9-1-3- Mécanisme de la résistance à l'artémisinine**

Le *SERCA-pfATPase6* est un gène candidat à la résistance des souches de *P.falciparum* à l'artémisinine. Le *pfATPase* est une pompe ionique ATPase dépendante de la membrane du réticulum endoplasmique granulaire du *Plasmodium* transportant des cations. Elle régule la concentration cytoplasmique et l'équilibre électrolytique du *Plasmodium*. L'artémisinine et ses dérivés agissent par un mécanisme d'action qui inhiberait cette pompe. La mutation *pfATPase6Ser769Asn* située sur le chromosome 6 du *P.falciparum* serait associée à une augmentation des concentrations d'inhibition ( $CI_{50}$ ) des souches plasmodiales en Guyane française (**Jambou et al., 2005**). Toutefois, d'autres études ont montré après séquençage que *Plasmodium* peut aussi développer une résistance à l'artémisinine sans mutation *pfATPaseSer769Asn* (**Afonso et al., 2006**). En fait, la résistance à l'artémisinine n'est pas encore formellement établie et les études sont au stade expérimental.

En 2014 fut publiée la découverte d'un marqueur moléculaire de résistance adopté par l'ensemble de la communauté scientifique. La présence de certaines mutations sur le gène *Kelch 13 propeller* fut fortement corrélée à la résistance à l'artémisinine (**Ariey et al., 2014**).

De plus en plus d'études à ce jour ont été publiées sur la recherche de cette mutation affectant *K13 propeller* en Afrique (où aucun cas de résistance à l'artémisinine n'a encore été formellement répertorié). Les mutations décrites en Asie du sud-est conférant de la résistance à l'artémisinine n'y ont pas encore été retrouvées. Par contre de nouvelles mutations ont été décrites sur ce gène dans certains pays comme la République Démocratique du Congo (RDC) mais aucun lien n'a encore été établi à ce jour entre celles-ci et une résistance clinique (**Kamau et al., 2014 ; Taylor et al., 2014**).

### **I-2- LA SALIVE ET L'URINE COMME OUTILS DE DIAGNOSTIC DU PALUDISME**

La salive et l'urine sont des produits biologiques qui ont été évalués pour la détection non invasive du paludisme (**Mharakurwa et al., 2006 ; Nwakanma et al., 2009 ; Putaporntip et al., 2011**). Ces produits biologiques ont été utilisés comme des "matériaux" pour évaluer les conditions physiologiques et pathologiques chez l'homme en raison de leur facilité d'accès (**Admin, 2008**). En effet, la salive et l'urine sont des produits biologiques faciles à recueillir.

Ils peuvent être conservés à un faible coût et leur collecte est non invasive et ne nécessite aucun équipement spécial (**Admin, 2008**).

### **I-2-1- La salive**

La salive est un liquide biologique sécrété par les glandes salivaires à l'intérieur de la bouche. Elle joue un grand rôle dans la bonne santé bucco-dentaire, la préparation du bol alimentaire et la digestion ainsi que dans les fonctions de phonation, mastication et déglutition. Elle est produite par les glandes salivaires majeures (parotide, sub-mandibulaire ou sublinguale) ou mineurs qui tapissent la cavité buccale.

La salive totale est un mélange de fluides oraux incluant les sécrétions venant des deux glandes salivaires (mineures et majeures) associé à plusieurs constituants d'origine non salivaire tels que les fluides de la crevasse gingivale (débris de nourriture, cellules épithéliales desquamées, dérivés du sang et du sérum des plaies buccales, etc.) (**Eliaz & Ira, 2002 ; Kaufman & Lamster, 2002**). Ces constituants qui ne font pas partie de la salive normale peuvent y accéder par ultrafiltration ou par diffusion passive (**Schipper et al., 2007**). La salive totale contient aussi des enzymes protéolytiques dérivées de l'hôte et de microorganismes oraux. Ces enzymes peuvent affecter la stabilité de certains marqueurs de diagnostic surtout lorsque la salive est utilisée comme source de l'acide nucléique pour des tests moléculaires.

Cependant, il a toujours été prouvé que la salive est un précieux outil de diagnostic non invasif (**Parry et al., 1989**). En effet, la salive contient plusieurs composés qui peuvent aider à détecter des maladies comme les maladies cardiovasculaires (**Floriano et al., 2009**), les maladies rénales (**Arregger et al., 2008**), les maladies auto-immunes (**Hu et al., 2007**) et les maladies infectieuses y compris le paludisme (**Sutherland & Hallett, 2009**).

L'utilisation de la salive comme liquide biologique pour le diagnostic du paludisme doit permettre la détection d'anticorps anti-paludiques, d'antigènes du paludisme ou d'acide nucléique plasmodial dans la salive du patient par diverses méthodes (ELISA, TDR, PCR....). Bien que l'on ne connaisse pas encore la voie exacte d'introduction des antigènes du paludisme dans la salive, les biomarqueurs tels que la protéine II riche en histidine de *P. falciparum* (PfHRP II) ou la lactate déshydrogénase de *P. falciparum* (pLDH) libérés lors de la rupture du schizonte en circulation peuvent atteindre la salive via une ultrafiltration pericellulaire du système vasculaire environnant (**Fung et al., 2012**). Ainsi, il a été possible de détecter soit des antigènes du paludisme, soit des anticorps antipaludiques dans la salive (**Wilson et al., 2008 ; Fung et al., 2012**). La salive est également riche en IgA et IgG sériques. Il existe une corrélation entre le niveau d'anticorps antipaludiques dans la salive et le

plasma et ceci a permis d'envisager la salive comme un outil utile pour la surveillance communautaire (**Chidi et al., 2011 ; Estevez et al., 2011**).

Même si la détection des antigènes ou anticorps contre le paludisme présente des avantages, elle peut présenter des résultats faussement positifs en raison de la présence d'antigènes ou d'anticorps après la disparition de l'infection. En outre, la détection des antigènes ou anticorps contre le paludisme ne permet pas de quantifier le niveau d'infection. Les méthodes moléculaires basées sur l'amplification de l'ADN plasmodial sont sensibles et appropriées pour détecter les marqueurs de résistance aux antipaludiques. Elles sont capables de quantifier le niveau d'infection et de détecter également le paludisme dans la salive (**Mharakurwa et al., 2006 ; Nwakanma et al., 2009 ; Cordray & Richards-Kortum, 2012**). En effet, des échanges s'effectuent entre la salive et les substances contenues dans le liquide plasmique à travers une mince couche de cellules épithéliales qui sépare les canaux salivaires de la circulation systémique et cela permet de transférer des substances à la salive par un transport actif contre le gradient de concentration ou par diffusion passive (**Schipper et al., 2007**). Ainsi, l'avènement des techniques moléculaires a vu une augmentation de l'utilisation de la salive pour les enquêtes médicales (**Lima et al., 2010**).

Par ailleurs, les fluides buccaux contiennent des macrophages et le sang et ses composants peuvent pénétrer dans la salive par un saignement intraoral (**Kaufman & Lamster, 2002**). L'ADN plasmodial provenant de parasites lysés peut donc être transporté passivement via le sérum ou dans les phagosomes de macrophages d'hôtes humains infectés par le paludisme (**Sutherland & Hallett, 2009**). Les données publiées antérieurement ont montré que le paludisme à *Plasmodium falciparum* est détectable par PCR sur des échantillons d'urine et de salive humaine (**Mharakurwa et al., 2006**).

Bien que l'ADN plasmodial ait été détecté avec succès dans la salive, les processus biologiques par lesquels l'ADN du parasite atteint la salive restent mal connus. Les mécanismes précis par lesquels des fragments d'ADN plasmodial apparaissent dans la salive doivent être étudiés plus en détail.

### **I-2-2-L'urine**

L'urine est un autre échantillon qui a été évalué pour la détection non invasive du paludisme. L'urine est un liquide biologique résiduel secrétée par les reins après l'infiltration du sang. Elle peut être définie comme un mélange de différentes substances jouant le rôle de transporteur de déchets solubles dans l'eau ainsi que de petites particules en suspension (**Eric, 1996**). L'urine constitue la plus grande part des déchets liquides du métabolisme de l'organisme des

vertébrés. Malgré le fait que l'urine soit un transporteur de déchets, elle est théoriquement stérile, c'est à dire qu'elle ne transporte pas de bactéries. Par contre, lorsque l'urine provient d'un individu malade, c'est à dire lorsqu'il s'agit d'urine pathologique, elle contiendra énormément de bactéries. La composition de l'urine varie d'un individu à l'autre et d'un moment à l'autre de la journée. Elle est fonction des facteurs endogènes métaboliques et des apports aqueux et alimentaires. Les principales substances présentes dans l'urine sont l'eau considérée comme le solvant, l'urée, la créatinine ainsi que plusieurs autres substances. Comme solution aqueuse, l'urine est principalement composée d'eau (> 95%), d'électrolytes, de métabolites et autres composés organiques et non organiques (**Cook et al., 2000**) contrôlés par les reins dans une série d'événements; filtration, réabsorption, sécrétion et excrétion (**Sherwood, 2008**).

Des antisérums dirigés contre l'urine de patients infectés par *P. falciparum* ont montré des résultats positifs avec *P. falciparum* à l'immunofluorescence indirecte et dans le test d'immunoprécipitation d'extraits de métabolites de parasites. Ces résultats suggèrent que divers antigènes du paludisme sont libérés dans l'urine (**Valle et al., 1991**). De plus, les tests dot-blot et western blot ont également révélé la présence d'antigènes du paludisme dans l'urine de patients infectés par *P. vivax*. Il convient toutefois de noter que les antigènes parasitaires restent détectables chez des patients qui n'ont plus de parasitémie détectable après traitement (**Militao et al., 1993**).

Les parasites sont des agents infectieux qui envahissent presque tous les tissus du corps. L'invasion des tissus nerveux et/ou du système optique par certains parasites rend parfois risqués leurs prélèvements. L'obtention d'échantillons de tissus infectés pour le diagnostic a été associée à des dangers et des effets secondaires pour les patients. En raison des risques liés aux méthodes invasives d'échantillonnage, les chercheurs préfèrent utiliser un échantillon d'urine sûr et facile d'accès (**Choi W., 2006**). L'urine est ainsi utilisée de nos jours pour le diagnostic de plusieurs infections parasitaires comme le paludisme (**Buppan et al., 2010**), la toxoplasmose (**Foroghi et al., 2008 ; Suybeng et al., 2011**), l'amibiase, la trichomonase (**Issa, 2006 ; Vatanshenassana et al., 2010**), la leishmaniose, la trypanosomiase, etc. (**Choi, 2006**). L'urine peut être également utilisée pour le diagnostic de maladies congénitales avant la naissance, la surveillance de l'implantation d'organes, le diagnostic du cancer, le typage de micro-organismes, l'évaluation de la résistance aux médicaments, les recherches sur le métabolisme des médicaments, etc. (**Eskandarian, 2013**).

La présence de courts fragments d'ADN dans l'urine humaine a été signalée pour la première fois par le biologiste David Tomei et ses collaborateurs il ya environ deux décennies

**(Botezatu et al., 2000)**. En effet, ces chercheurs ont montré que de courts fragments d'ADN de tout le corps pouvaient traverser les filtres du rein et passer dans l'urine. Une étude anatomo-pathologique ultra-structurale du tissu rénal chez des patients atteints de Paludisme a aussi révélé la présence d'érythrocytes parasités séquestrés dans des vaisseaux glomérulaires et tubulo-interstiaux (**Nguansangiam et al., 2007**) ainsi que des complexes immuns comprenant les IgG, le C3 et les antigènes du paludisme (**Das, 2008**). Ces résultats ainsi que la protéinurie signalée chez les patients infectés par *P. falciparum* conduisent à l'idée que les antigènes et les anticorps parasitaires peuvent être excrétés dans l'urine.

La recherche de la relation entre un ADN spécifique dans le sang et l'urine nécessite plus d'expériences. Une partie de l'ADN du sérum passe les reins et entre dans l'urine. Su et collaborateurs ont évalué l'ADN libéré (ADN libre) dans l'urine chez cinq patients. La quantité d'ADN était d'environ 40 à 200 ng/ ml par spectrophotométrie (**Su et al., 2004**).

## **II - MATERIEL ET METHODES**

## **II-1- SITES DE L'ETUDE**

L'étude a été réalisée dans trois différentes localités de la Côte d'Ivoire : Anonkoua-kouté, Port-bouët et Ayamé.

### **II-1-1- Anonkoua-Kouté**

Anonkoua-kouté (5°25'55.90" N ; 4 02'45.27" W) est un village périurbain du district sanitaire d'Abobo-Nord à Abidjan. Il est situé en zone péri-urbaine à environ 5 km de la commune d'Abobo (**Figure 10 A**). Les précipitations annuelles y excèdent 1700 mm de pluie et la température varie entre 27 et 33 °C. Le village s'est doté d'une Formation Sanitaire Urbaine à base Communautaire, ou FSUCOM, qui sert une population estimée à 98 909 habitants en 2014. Cette année-là, 29520 cas de paludisme ont été enregistrés sur un total de 44.463 consultations, soit 66,39 % des consultations médicales. La FSUCOM d'Anonkoua-kouté a été retenue pour cette étude à cause des incidences annuelles constamment élevées des cas de paludisme. En outre, la formation sanitaire a été considérée pendant plusieurs années comme le site principal de réalisation des tests cliniques multicentriques d'efficacité de l'Unité de Paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

### **II-1- 2- Port-Bouët**

La commune de Port-Bouët 5°15'20" N et 3°57'52" W s'étend sur une superficie de 111,1 km<sup>2</sup> et fait partie du district sanitaire de Port Bouet-Vridi (**Figure 10 B**). La commune se situe dans la partie sud de la ville d'Abidjan en zone urbaine, entre l'océan Atlantique au sud et la lagune Ebrié au nord. Le climat est subéquatorial avec une pluviométrie moyenne de 1660 - 2000 mm de pluie par an. La température moyenne annuelle est de 28° avec un maximum de 38° en Avril. Avec une population estimée en 2014 à 419 033 Habitants (**Anonyme, 2014**), Port-Bouët est l'une des communes du district d'Abidjan qui abrite le plus grand nombre d'étrangers venant surtout des autres états membres de la CEDEAO.

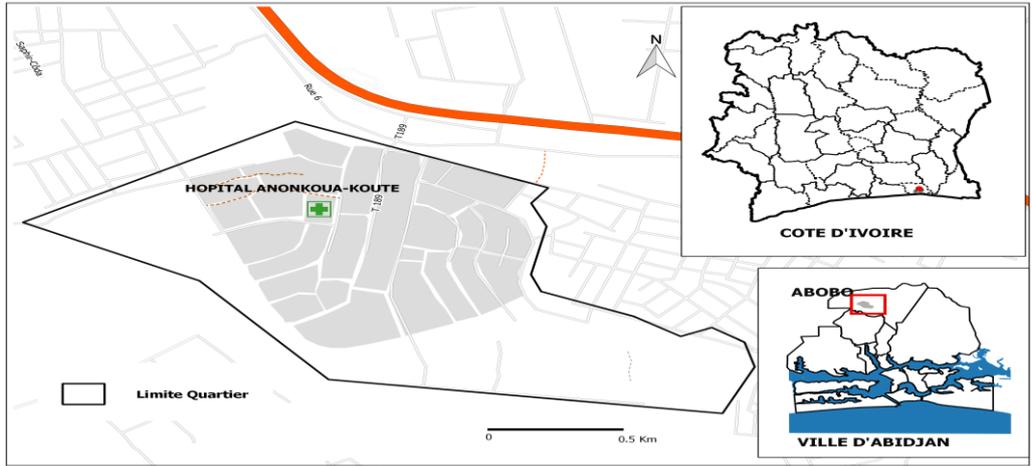
Au plan sanitaire, la commune de Port-Bouët compte en son sein, plusieurs centres de santé dont l'hôpital général où les prélèvements ont été effectués. En 2015, l'hôpital Général de Port-Bouët a enregistré 20 611 cas de paludisme sur un total de 41 201 consultations, soit 50,02 % des consultations médicales. L'hôpital Général de Port-Bouët a été retenu pour cette étude à cause des incidences annuelles constamment élevées des cas de paludisme.

### **II-1-3- Ayamé**

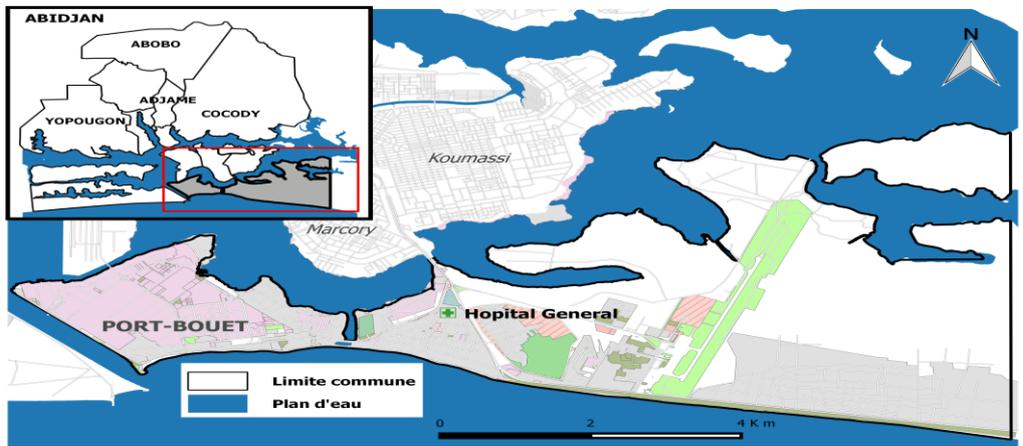
La commune d'Ayamé est située au sud-est de la Côte d'Ivoire, dans la région du sud-comoé, à 20 km de la frontière du Ghana et à 130 km de la ville d'Abidjan. Elle s'étend le long d'une vallée traversée par la rivière Ano-assué sur 9 km environ et sur des pentes de sept (7) collines de 130 m de hauteur. La commune d'Ayamé fait partie du département d'Aboisso et elle a une population de 14 195 habitants en 2014 (**Anonyme, 2014**).

Le climat d'Ayamé est dominé par quatre saisons dont une grande saison sèche de Décembre à Février, une grande saison de pluie de mars à Juillet, une petite saison sèche de mi-Juillet à mi-septembre et une petite saison de pluie de mi-Septembre à mi-novembre. La température moyenne varie entre 26° et 32° avec une hygrométrie allant de 80 à 90 %. La commune d'Ayamé (5°36'12,43" N ; 3°09'19,36" W) (**Figure 10 C**) a été choisie comme site d'étude pour son faciès épidémiologique de type équatorial, son hydrographie et sa végétation propices à une forte densité anophélienne. Les précipitations y varient de 1120 à 2306 mm (**N'diaye et al, 2015**). Un taux élevé d'échec à la CQ de plus de 60 % a été révélé en 2003 à Aboisso, non loin d'Ayamé (**Menan et al., 2007**).

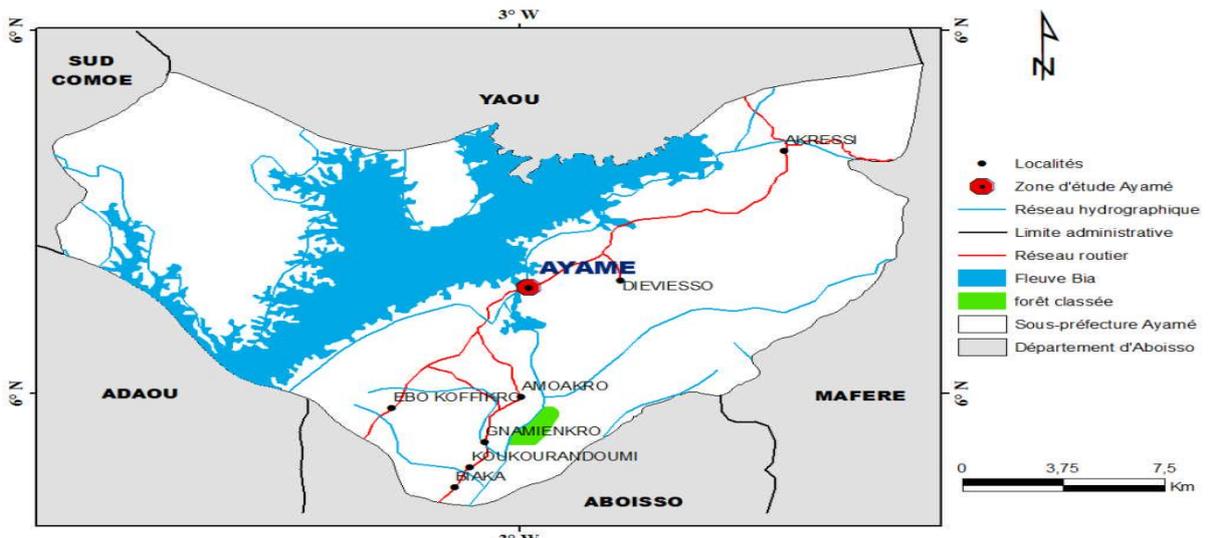
En 2015, l'hôpital Général d'Ayamé a enregistré 1472 cas de paludisme sur un total de 5252 consultations, soit 28,02 % des consultations médicales.



**A : Anonkou-Kouté**



**B : Port-Bouët**



**C : Ayamé**

**Figure 10:** Sites de prélèvement des échantillons de sang, salive et urine

*Source:* Centre Universitaire de Recherche et d'Application en Télédétection (CURAT) de l'Université Félix Houphouët Boigny

## II--2- MATERIEL

### II-2-1- Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué du sang total, de salive totale et d'urines totales. Ce matériel biologique a été prélevé sur des sujets enrôlés de Février à Août 2015 dans les zones d'application de l'étude à savoir la Formation Sanitaire Urbaine à base Communautaire (FSUCOM) de Anonkoua Kouté, l'hôpital général de Port-Bouët et l'hôpital général d'Ayamé. Le sang total a servi à la réalisation des gouttes épaisses, de frottis sanguins et de confettis sanguins tandis que la salive totale et l'urine totale ont servi respectivement à la réalisation des confettis salivaires et urinaires. La collecte de sang total pour les gouttes épaisses et frottis sanguins ainsi que les spots de sang, d'urines et de salive sur papier Whatman 3MM (confettis de sang, d'urines et de salive) ont été réalisés dans les laboratoires des sites d'étude.

Il s'est agi d'une étude transversale portant sur la caractérisation des gènes *pfcr*, *pfdhfr-ts* et *pfK13 propeller* dans le sang, les urines et la salive de sujets atteints de paludisme simple à *Plasmodium falciparum*.

### II-2-2. Gènes de *Plasmodium falciparum* amplifiés

Trois gènes impliqués dans la résistance à la chloroquine, à la pyriméthamine et aux dérivés d'artémisinine ont fait l'objet d'analyses.

#### ➤ Gène *pfcr*

L'amplification du gène *pfcr* [MAL7P1.27(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)] par la technique de PCR a permis d'explorer un domaine de 250 pb (**annexe 3A**) à l'aide d'amorces spécifiques (**Tableau II**). Pour cette séquence, les nucléotides en position 222, 225 et 228 ou les codons en position 74, 75 et 76 ont été analysés. Les mutations M74I, N75E et K76T au niveau du polypeptide PFCRT sont des déterminants génétiques de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine (**Tableau I**).

#### ➤ Gène *pfdhfr*

Quant au gène *pfdhfr* [PFD0830w (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9221804>)], des fragments successifs de 650 pb (**annexe 3B**) ont été amplifiés par PCR à partir de couple d'amorces (**Tableau II**). Les nucléotides en position 153, 177 et 324 ou les codons en position 51, 59 et 108 de cette séquence ont été analysés. Les mutations N51I, C59R et S108N au niveau du polypeptide PFDHFR sont des déterminants génétiques de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine pyriméthamine (**Tableau I**).

➤ **Gène *K13 propeller***

L'amplification du gène *K13 propeller* (K13), PF3D7\_1343700 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) par la technique de PCR a permis d'explorer un domaine de 845 pb (**annexe 3C**) à l'aide d'amorces spécifiques (**Tableau II**). Les nucléotides en position 1428, 1479, 1617, 1629 et 1740 ou les codons 476, 493, 539, 543 et 580 de cette séquence ont été analysés pour rechercher les mutations M476I, Y493H, R539T, I543T, et C580Y. Ces mutations du polypeptides PFK13 PROPELLER sont impliquées dans la résistance de *P. falciparum* aux dérivés d'artémisinine.

### **II-2-3- Autres matériels**

➤ ***Oligonucléotides utilisés***

Les amorces utilisées pour les PCR et celles utilisées pour la réaction de séquençage sont listées dans le tableau II. Toutes ces amorces ont été fournies par la société Eurofins MWG opéron (France) sous forme lyophilisée.

➤ ***Autres matériels, réactifs et consommables utilisés***

Les autres matériels, réactifs et consommables sont classés en fonction des étapes des manipulations.

Le matériel commun à toutes les étapes est constitué de congélateurs -20°C, de réfrigérateurs (Samsung / RZ32M7100S9) (315 litres, 0 - 20°C), de micropipettes (Eppendorf Référence® 2) de différents volumes (5 µL, 10 µL, 20 µL, 100µl, 200 µL et 1000 µL), de cônes à filtre (dominique Dutscher ART-200G) de différents volumes (1-10 µL, 5-200 µL, 100-1000 µL), de balance (EG-220-3NM).

Le matériel utilisé pour collecter les échantillons est constitué de pots stériles (dominique Dutscher-TP30C-012 (TP303PPSCRG)), de tubes EDTA (BD Vacutainer®-367844), de microscope (MIC 10207/LED), de coton, méthanol à 70°C, d'aiguilles (BD Vacutainer®-21G, 0,75 po (19 mm) 7po), de méthanol absolu (M1775-Sigma-Aldrich), de Giemsa (RAL Diagnostics-320310), d'huile à immersion (RAL Diagnostics-340103), de papier Whatman 3 MM (Whatman Inc., Maidstone, United Kingdom), de sachets plastics (contenant des billes de silicate), de cryotubes (1,5 mL) et de marqueurs à pointe fine.

Le matériel pour la découpe des confettis est constitué de paire de ciseaux, de méthanol 70°C, de tubes stériles d'Eppendorf® 1,5 mL et de pinces.

Le matériel pour l'extraction de l'ADN génomique est constitué de méthanol à 70°C, PBS 1X (HARDY Diagnostics- Cat. no. K146), de saponine (142-7425- Sigma-Aldrich), Chelex-100 (Bio-Rad, Cat. no.. 143-2832), de thermo-mixeur de type Compact®, de tubes Eppendorf de 1,5 mL, de microcentrifugeuse (Mikro 220R de Hettich), de spectrophotomètre (NanoDrop™ One microvolume UV-Vis spectrophotometers de Thermo Scientific) et de Cuve de spectrophotométrie ; Uvette pour biophotomètre Eppendorf - sur rack (dominique Dutscher-033952).

L'amplification de l'ADN génomique a nécessité l'utilisation de thermocycleur de type PTC-100™ (Eppendorf Mastercycler, PTC-100 Peltier Thermal Cycler), de micropipettes de différents volumes, de centrifugeuse et microcentrifugeuse, d'amorces spécifiques (tableau 2), Taq polymérase (Solis BioDyne - 5X FIREPol® Blend Master Mix with mM MgCl<sub>2</sub>) et d'eau miliQ (eau sans nucléases).

Pour la réalisation de l'électrophorèse sur gel d'agarose, le matériel est constitué de cuve (BCMSMINI7-MultiSUB mini), de générateur (PS304XL-Cat. n° 160600, 300 volts, 400 mA), de poudre d'agarose (Seaken® LE Agarose, Cambrex Biosciences Rockland, Inc.), de Erlenmeyer 200 mL, de four à micro-ondes (Samsung, modèle SC4340), de transilluminateur à UV (Gel Doc™ EZ Imager), de tampon Tris-Borate-EDTA 1X (1 M Tris-HCl ; 0,8 M acide borique ; 2 mM EDTA ; pH 8,0) et de bromure d'éthidium (A-1151.0001-Grosseron), de tampon de charge (Gel Loading Dye Blue 6X (BioLabs), de marqueur de poids moléculaire (SmartLadder 200 - 10.000 pb (Eurogentec, CA, USA).

**Tableau II** : Séquences des amorces utilisées pour amplifier les différents fragments d'ADN des gènes *dhfr-ts* , *pfk13 propeller* et *pfert* ainsi que pour le Séquençage

Gènes	Amorces	Séquences des amorces (5'-3')	Taille des amplicons
<b><i>pfdhfr-ts</i></b>			
PCR1	dhfr_M1_F	TTTATGATGGAACAAGTCTGC	650
	dhfr_M7_R	CTAGTATATACATCGCTAACA	
Nested PCR	dhfr_M9_F	CTGGAAAAAATACATCACATTCATATG	594
	dhfr_M3_R	TGATGGAACAAGTCTGCGACGTT	
Séquençage	dhfr_M9_F	CTGGAAAAAATACATCACATTCATATG	
	dhfr_M3_R	TGATGGAACAAGTCTGCGACGTT	
<b><i>pfk13 propeller</i></b>			
PCR1	K13_PCR_F	CGGAGTGACCAAATCTGGGA	2097
	K13_PCR_R	GGGAATCTGGTGGTAACAGC	
Nested PCR	K13_N1_F	GCCAAGCTGCCATTCATTTG	849
	K13_N1_R	GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA	
Séquençage	K13_N1_F	GCCAAGCTGCCATTCATTTG	
	K13_N1_R	GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA	
<b><i>Pfert</i></b>			
PCR1	72_97E_F	GAC CTT AAC AGA TGG CTC AC	250
	72_97E_R	TTT TAT ATT GGT AGG TGG AAT AG	
Nested PCR	SecI_F	GGT AAA TGT GCT CAT GTG TTT AAA CTT ATT	250
	SecI_R	TTA CTT TTG AAT TTC CCT TTT TAT TTC CA	
Séquençage	SecI_F	GGT AAA TGT GCT CAT GTG TTT AAA CTT ATT	
	SecI_R	TTA CTT TTG AAT TTC CCT TTT TAT TTC CA	

## **II-3- METHODE**

Le travail réalisé a consisté à recruter d'abord les participants à l'étude dans les trois hôpitaux sélectionnés. Le recrutement a été fait dans tous les services de consultation des hôpitaux sélectionnés pour les examens cliniques et le prélèvement des échantillons dans les laboratoires de ces hôpitaux. Ensuite, des travaux de laboratoire ont été réalisés en utilisant la microscopie pour les examens parasitologiques (gouttes épaisses et frottis sanguins) et les techniques de biologie moléculaire notamment l'extraction d'ADN et l'amplification par PCR ainsi que le séquençage des produits de PCR. Enfin les résultats obtenus ont été soumis à une analyse statistique.

Le choix des participants à l'étude s'est fait de manière aléatoire ; c'est dire à tout venant en consultation.

### **II-3-1- Critères d'inclusion**

Après le consentement éclairé, des échantillons de sang, urine et salive ont été collectés chez 150 patients de plus de 2 ans ayant une température axillaire ou rectale supérieure à 37,5°C et souffrant de paludisme simple à *P. falciparum* confirmé à la microscopie par une goutte épaisse et un frottis sanguin. Tous les patients provenaient des services de consultation des trois sites de l'étude.

Les patients chez lesquels une autre espèce plasmodiale a été observée et/ou ayant pris des antipaludiques dans la semaine de leur inclusion n'ont pas été retenus.

### **II-3-2- Déroulement de l'étude**

Le recrutement des participants à l'étude a été fait dans tous les services de consultation des hôpitaux sélectionnés et le prélèvement des échantillons dans les laboratoires de ces hôpitaux. Après la consultation, l'étude a été expliquée aux patients répondant aux critères d'inclusion ou à un responsable légal pour solliciter son consentement (**Annexe 4**). Une fois le consentement obtenu, le participant a été soumis à un questionnaire (**annexe 5**) pour recueillir les données démographiques et socio-économiques. A la fin du questionnaire, un prélèvement de 2 mL à 5mL de sang veineux a été effectué d'abord sur un tube EDTA. Deux flacons stériles ont ensuite été utilisés pour recueillir 5 à 10 mL d'urines et 2 à 5 mL de salive. Enfin, des confettis de sang, de salive et d'urine ont été réalisés.

### **II-3-3- Questions éthiques et réglementaires**

Les participants ont été informés des objectifs et de la méthodologie de l'étude. Le consentement des parents ou du tuteur légal du participant a été obtenu avant toute inclusion dans l'étude. En cas d'accord, un formulaire de consentement confectionné à cet effet a été remis au participant ou à son tuteur légal (**annexe 4**). Ce formulaire a été signé par le participant ou son tuteur légal et par l'investigateur. Aucun prélèvement n'a été effectué avant l'obtention du consentement éclairé du participant ou du responsable légal du patient. Pour préserver la confidentialité des patients inclus dans l'étude, un code connu seulement par le responsable de l'étude a été utilisé en guise d'identification.

### **II-3-4- Collecte des échantillons**

#### **II-3-4-1- Prélèvement de sang et réalisation de confettis**

Dans le laboratoire de chacun des sites de l'étude, 2 à 5 mL de sang veineux de chaque participant ont été prélevés et recueillis dans un tube contenant un anticoagulant (EDTA). Deux gouttes de sang ont été utilisées pour réaliser une goutte épaisse (GE) et un frottis sanguin (FS).

Chez chaque patient dont le paludisme a été confirmé à la microscopie, 50 µL de sang total ont été déposés sur du papier filtre Whatman 3 MM à l'aide d'une micropipette avec des cônes à filtre. Le papier contenant les spots de sang (confetti de sang) a été séché pendant environ 60 à 120 minutes à température ambiante à l'abri de la poussière.

#### **II-3-4-2- Recueil de la salive et réalisation de confettis**

Dix à quinze minutes après un rinçage de la bouche avec l'eau de robinet, 2 à 5 mL de salive de chaque participant ont été recueillis dans un flacon stérile.

A l'aide d'une micropipette et des cônes à filtre, 50 µL de salive ont été déposés sur du papier filtre Whatman 3 MM. Les confettis ainsi réalisés ont été séchés pendant environ 60 à 120 minutes (min.) à température ambiante et à l'abri de la poussière.

#### **II-3-4-3- Recueil des urines et réalisation des confettis**

Après le prélèvement de sang et le recueil de la salive, 5 à 10 mL d'urine de chaque patient ont été recueillis dans un flacon stérile.

A l'aide d'une micropipette et de cônes à filtre, 50 µL d'urine ont été déposés sur du papier filtre Whatman 3 MM. Les confettis ainsi réalisés ont été séchés pendant environ 60 à 120 min. à température ambiante et à l'abri de la poussière.

#### II-3-4-4- Conservation des produits biologiques et confettis

- *Le sang* : Après la réalisation des confettis de sang, le reste du sang contenu dans le tube EDTA a été conservé dans des cryotubes à - 20 °C pour une éventuelle utilisation ultérieure.

- *La salive* : Dans un cryotube, 1000 µL de méthanol absolu ont été ajoutés à 500 µL de salive contenue initialement dans le flacon stérile puis conservés à - 20°C pour une éventuelle utilisation ultérieure (**Marakhurwa et al., 2006 ; Buppan et al., 2010**).

- *L'urine* : Dans un cryotube 1000 µL de méthanol absolu ont été ajoutés à 500 µL d'urine contenue initialement dans le flacon stérile puis conservés à - 20°C pour une éventuelle utilisation ultérieure (**Marakhurwa et al., 2006 ; Buppan et al., 2010**).

- *Les confettis* : Un confetti représente un morceau rectangulaire de papier filtre Whatman 3 MM (Whatman Inc., Maidstone, United Kingdom) sur lequel se trouve des spots secs de sang, ou d'urine ou de salive. Chaque confetti a été bien étiqueté et conservé dans un sachet plastique contenant des billes de silicate pour absorber l'humidité pendant la conservation. Les confettis réalisés ont été conservés à température ambiante.

#### II-3-5-Examen microscopique des parasites

Des gouttes épaisses (GE) et frottis sanguins (FS) ont été réalisés sur des lames porte-objet à partir des prélèvements sanguins. Les lames ont été ensuite colorées au Giemsa 10% pendant 10 minutes, puis séchées et examinées à l'objectif 100X du microscope sous huile à immersion. Les densités parasitaires (DP), exprimées en nombre de parasites par microlitre (parasites/µL) de sang ont été calculées à partir de la lecture des gouttes épaisses. Le nombre de parasites par microlitre de sang a été établi par rapport au nombre de leucocytes fixé à 8.000 par microlitre de sang. La densité parasitaire (DP) a donc été obtenue suivant la formule :

$$DP = \frac{N \times 8000}{X}$$

**N** = nombre de parasites comptés et **X** = nombre de leucocytes comptés.

Si le nombre de parasites **N** est  $\geq 10$  on compte au moins **X** = 200 leucocytes et la densité parasitaire sera : **DP** = **N** x 8000 / 200 = **N** x 40.

Si le nombre de parasites **N** est  $< 10$ , on compte au moins **X** = 500 leucocytes et la densité parasitaire sera : **DP** = **N** x 8000 / 500 = **N** x 16.

Le FS a servi principalement à l'identification des espèces de *Plasmodium*.

Un contrôle de qualité des densités parasitaires a été effectué par un second microscopiste (un technicien du laboratoire du site) sur 10 % des lames examinées et choisies de manière aléatoire pour déceler une éventuelle discordance entre les résultats. En cas de discordance, un troisième microscopiste procède au recomptage des trophozoïtes..

### **II-3-6- Techniques de biologie moléculaire**

Les spots de papier filtre ont été découpés en fines couches pour extraire l'ADN génomique à partir des confettis.

**Découpage des spots de papier filtre :** Les spots de sang, d'urine ou de salive déposés sur le papier filtre Whatman 3 MM ont été découpés en fines tranches à l'aide d'une paire de ciseaux et d'une pince stérilisées à l'éthanol 70° après chaque usage. Les découpes ont été déposées dans un tube stérile d'Eppendorf® 1,5 mL à l'aide de pinces. Le tube contenant les tranches de confettis a été ensuite étiqueté au code de l'échantillon correspondant. Le découpage a été réalisé dans une salle d'extraction d'ADN génomique de *P. falciparum*. Le découpage et la mise en tube des découpes ont été réalisés avec une paire de ciseaux et une pince stérilisées à l'éthanol 70° avant et après utilisation pour limiter les contaminations éventuelles.

#### **II-3-6-1. Extraction de l'ADN plasmodial à partir des confettis sanguins**

L'ADN plasmodial a été extrait au méthanol à partir des confettis de sang (**Miguel et al., 2013**). Des découpes fines de confettis de sang ont été immergées dans 1 mL de tampon de lavage (950 µL de PBS 1X plus 50 µL de saponine 10%) puis incubées à 4°C pendant une nuit (overnight). Le tampon de lavage a été retiré puis un lavage a été effectué avant d'ajouter 150 µL de méthanol. Après une incubation de 20 min, le méthanol a été délicatement retiré et les échantillons ont été séchés à la température ambiante pendant 2 heures avant d'ajouter 300 µL d'eau stérile. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 99°C dans un thermo-mixeur pendant 30 min. pour éluer l'ADN. Après avoir retiré les débris de confettis, les extraits d'ADN ont été aliquotés dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et conservés à - 20 °C.

#### **II-3-6-2- Extraction de l'ADN plasmodial à partir des confettis de salive et d'urine**

L'extraction de l'ADN plasmodial à partir des confettis d'urine et de salive a été effectuée par la méthode au Chelex®100 (**Kain & Lanar, 1991 ; Plowe & Wellems, 1995**). Un volume de 180 µL de solution de Chelex-100 à 5% (poids / volume) (Bio-Rad, n ° de catalogue.

1422832) a été mis dans un tube de centrifugation de 1,5 mL et chauffé à 100 °C pendant 5 min. Les découpes fines de chaque confetti ont été ajoutées à la solution chaude de Chelex. Le tube fermé a été porté au vortex délicatement pendant 30 sec. puis rechauffé pendant 10 min. . Les tubes contenant les échantillons ont été ensuite centrifugés à 12 000 x g pendant 1,5 min., et le surnageant a été recueilli dans un nouveau tube de microcentrifugation (1,5 mL). Ce surnageant a été centrifugé à nouveau à 12 000 g pendant 1,5 min. Le surnageant de cette deuxième centrifugation a été délicatement recueilli dans un nouveau tube de microcentrifugation et utilisé immédiatement dans la réaction d'amplification par PCR ou conservé à -20 °C.

**Quantification de l'ADN :** L'ADN ainsi extrait a été quantifié au spectrophotomètre. Une unité de densité optique mesurée à une longueur d'onde de 260 nm ( $DO_{260}$ ) d'une solution d'ADN correspondait à une concentration de 40 µg par mL de solution.

Le rapport  $DO_{260} / DO_{280}$  a permis de mesurer le degré de pureté de l'échantillon; il devait être compris entre 1,8 et 2.

### **II-3-6-3- Amplifications par PCR et électrophorèse**

#### **II-3-6-3-1- Préparation des amorces**

La reconstitution des amorces (primers) a été faite selon les recommandations de la société Eurofins MWG opéron (France). En effet, en fonction des poids de chaque lyophilisat, un volume donné d'eau milliQ a été ajouté pour obtenir des solutions mères d'amorces à 100 µM. A partir de la solution mère (SM), des solutions filles ont été préparées par dilution au  $1/10^{\text{e}}$  de ces solutions mères. Ainsi, pour chaque amorce (primer), une solution d'amorce à 10 picomolaires par litre (10 pmol/L) a été utilisée pour la réalisation des PCR.

#### **II-3-6-3-2- Protocole d'amplification des séquences des gènes**

La technique de PCR enchâssée ou nichée (nested-PCR) a été utilisée pour amplifier les fragments d'ADN des gènes étudiés.

La nested PCR est une méthode d'amplification à double paliers qui utilise deux couples d'amorces différents pour l'amplification du gène (deux oligo-nucléotides spécifiques pour la première amplification et deux autres pour la deuxième PCR).

Dans cette expérimentation, pour un volume final de 25 µL, le mélange d'amplification ou « mix » de la première amplification était constitué de 0,625 µL de solutions d'un couple d'amorces spécifiques (10 pmol/L) du domaine à amplifier, de 5 µL de la solution du kit de la

*Taq* polymérase et 3  $\mu\text{L}$  d'ADN plasmodial extrait à partir des confettis. Le tout a ensuite été complété par de l'eau milliQ pour un volume final de 25  $\mu\text{L}$ . Un kit commercial d'ADN polymérase dénommé 5X FIREPol® Blend Master Mix with mM  $\text{MgCl}_2$  a été utilisé. Ce kit est un pré-mix prêt à l'emploi composé d'ADN polymérase (FIREPol® DNA polymerase), de tampon (5 x Blend Master Mix Buffer), de  $\text{MgCl}_2$  (7.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) et de dNTPs (2 mM dNTPs of each).

Pour la deuxième amplification (PCR nichée), le mélange réactionnel était constitué de 1,25  $\mu\text{L}$  de solutions du deuxième couple d'amorces spécifiques (10 pmol/L) du domaine à amplifier, de 5  $\mu\text{L}$  de la solution du kit de la *Taq* polymérase et de 5  $\mu\text{L}$  de produit d'amplification (amplifiât) de la première PCR. Le tout a ensuite été complété par de l'eau milliQ pour un volume final de 50  $\mu\text{L}$ .

Chaque mélange a ensuite été mis dans un thermocycleur de type PTC-100TM (Eppendorf Mastercycler, PTC-100 Peltier Thermal Cycler), programmé à cet effet. Le protocole de la PCR et les programmes d'amplification (températures d'hybridation et durées) sont indiqués respectivement dans les tableaux III et IV.

**Tableau III** : Mélange réactionnel de chaque tube pour l'amplification des séquences des gènes

<b>PCR1</b>			<b>PCR2 OU NESTED PCR</b>		
<b>Mélange réactionnel</b>			<b>Mélange réactionnel</b>		
<b>Réactifs</b>	<b>Concentration</b>	<b>Volumes (μL)</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Concentration</b>	<b>Volumes (μL)</b>
H <sub>2</sub> O miliQ		15,75	H <sub>2</sub> O milliQ		32,5
Amorce1_F	10μM	0,625	Amorce1_N_F	10μM	1,25
Amorce2_R	10μM	0,625	Amorce2_N_R	10μM	1,25
Taq polymérase	5X	5	Taq polymérase	5X	10
ADN extrait		3	Amplicon PCR1		5
<b>TOTAL</b>		<b>25</b>	<b>TOTAL</b>		<b>50</b>

**Tableau IV :** Programme d'amplification des fragments d'ADN des gènes (*pfert*, *pfdhfr* et *pfK13 propeller*)

<b>Programme d'amplification par PCR des gènes (1<sup>ère</sup> PCR)</b>				
<b>Étapes</b>	<b>Cycles</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Temps (min.)</b>	<b>Nombre de cycles</b>
1.	Dénaturation initiale	95	15 min.	1
2.	Dénaturation	95	30 s	30
3.	Hybridation	58	2 min.	
4.	Extension	72	2 min.	
5.	Extension finale	72	10 min.	1
<b>Programme d'amplification par PCR des gènes (2<sup>ème</sup> PCR)</b>				
1	Dénaturation initiale	95	15 min.	1
2	Dénaturation	95	30 s	40
3	Hybridation	60	1 min.	
4	Elongation	72	1 min.	
5	Elongation finale	72	10 min.	1

### **II-3-6-4-Électrophorèse en gel d'agarose**

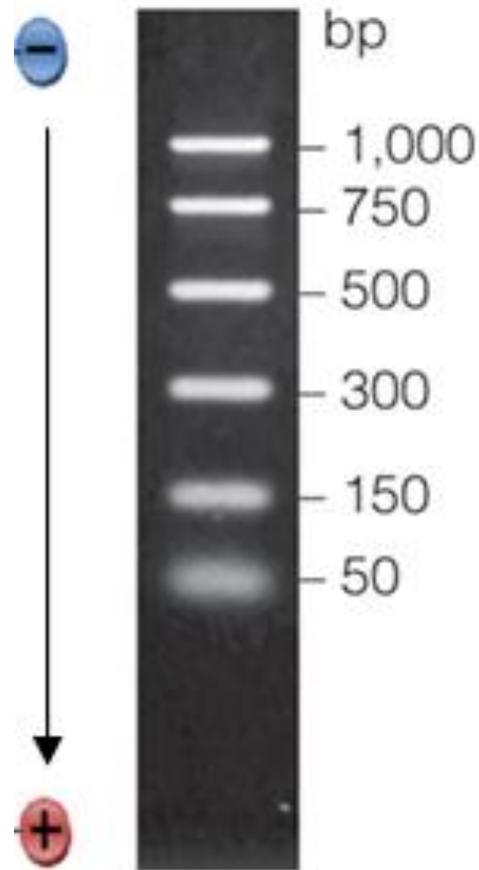
Les produits de la PCR ont été migrés sur un gel d'agarose 1,5% contenant du Bromure d'éthidium (BET). La présence ou l'absence de bandes a permis de juger l'efficacité de la PCR.

#### **➤ Préparation du gel d'agarose à 1,5%**

Le gel d'agarose à 1,5% a été préparé en pesant 1,5 mg de poudre d'agarose pure (Seaken® LE Agarose, Cambrex Biosciences Rockland, Inc.) auquel 100 mL de tampon 1X TBE (1 M Tris-HCl ; 0,8 M acide borique ; 2 mM EDTA ; pH 8,0) ont été ajoutés. L'ensemble a été brièvement homogénéisé de façon manuelle et placé au four à micro-ondes. L'Erlenmeyer a été chauffé jusqu'à la dissolution complète de l'agarose. Le gel d'agarose 1,5% ainsi obtenu a été tiédi avant d'ajouter du bromure d'éthidium (BET) .

#### **➤ Electrophorèse**

Le gel tiède contenant le BET a été bien homogénéisé avant de le couler délicatement dans un moule portant un peigne, de sorte à éviter la formation de bulles capables de compromettre la migration des fragments d'ADN. Une fois solidifié, le peigne a été retiré soigneusement du gel qui a alors libéré des puits. L'ensemble gel et moule a été placé dans la cuve de migration contenant du tampon de migration 1X TBE. Un volume de cinq microlitres (5 µL) de produit d'amplification mélangé à un tampon de charge (Gel Loading Dye Blue 6X (BioLabs) a ensuite été délicatement placé dans des puits prévus à cet effet. Le marqueur de poids moléculaire (SmartLadder 200 - 10.000 pb (Eurogentec, CA, USA), le témoin négatif composé essentiellement du premix et un contrôle positif ont été mis dans leurs puits respectifs. Le gel a été déposé dans la cuve de migration pour une électrophorèse à 135 volts pendant 20 min. Après la migration, le gel a été récupéré puis observé sous une lampe UV en utilisant le transluminateur à UV (Gel Doc™ EZ Imager) pour apprécier la présence ou non de bandes. La comparaison des bandes obtenues a été faite avec celles du marqueur de poids moléculaire (**Figure 11**) pour estimer la quantité d'ADN.



**Agarose 1,5%**

**Figure 11 :** Photo du marqueur de taille de 100 à 1500 pb (Smart Ladder<sup>®</sup> Eurogentec).

**Note:** La flèche indique le sens de la migration électrophorétique

### II-3-6-5-Amplification de séquençage

Dans ce travail, les fragments d'ADN amplifiés (*pfcr*, *dhfr* et *K13 propeller*) de *Plasmodium falciparum* ont été séquencés selon la méthode Sanger par la société Eurofins MWG opéron, à la plateforme de séquençage à Cochin. Les échantillons ont été fournis à la plateforme dans des microplaques (Greiner Bio-one-652270B) accompagnées d'un bordereau de dépôt (**annexe 6**) qui a été envoyé à l'adresse électronique de la plateforme. Un milieu réactionnel a été préparé pour chaque amorce sens de PCR-nichée (amorce de séquençage) à partir des produits d'amplification.

#### ➤ Préparation des échantillons

Dans chaque puits de la microplaque, un volume de 13 µL de produit d'amplification a été ajouté à 2 µL d'amorce de séquençage à 10 µM. Les puits contenant le milieu réactionnel du séquençage ont été fermés hermétiquement avec des barrettes de bouchon (4titude-044737) avant de couvrir toute la surface de la microplaque avec un film adhésif (AmpliSeal, Greiner Bio-one-676040). Cette microplaque contenant les échantillons a été envoyée à la plateforme Eurofins MWG opéron, Service de séquençage de Eurofins - Cochin (**Annexe 5**).

#### ➤ Récupération des résultats sur le site Web

Les séquences d'ADN ont été récupérées sous les formes fasta et chromatogramme. L'utilisation du logiciel BioEdit a permis d'analyser les séquences pour la recherche de mutations éventuelles par alignement.

### II-3-7- Analyse des résultats

#### ➤ Analyse statistiques des données recueillies

- Les données ont été recueillies sur un questionnaire standard testé et validé (**annexe 5**). Elles ont été saisies puis analysées dans un premier temps sur le logiciel GraphPad Prism 5. Ensuite le test z-score du logiciel R (**R core team, 2013**) a été utilisé pour comparer les taux des produits d'amplification dans chaque produit biologique puis les taux d'amplification de chaque gène dans chaque produit biologique. Une différence et/ou association statistique était considérée significative si  $p \leq 0,05$ . Pour réaliser ces analyses, différentes fonctions et/ou scripts du logiciel statistique R; version 3.2.2 (**R Core Team , 2013**) et le pipeline pour l'analyse bio-statistique, bio-informatique développée par Dago *et al.* (**2016**) ont été utilisés. De même, l'analyse en composantes principales (analyse biplot) a été faite pour établir le nombre de variables et/ou facteurs nécessaires à expliquer la variabilité observée dans la population d'étude (données expérimentales) (**Zwick & Velicer, 1986 ; Dago et al., 2016**).

La performance de détection des gènes de résistance dans la salive et l'urine par rapport au sang a été évaluée à l'aide des paramètres statistiques suivants :

- **La sensibilité (Se)** : elle est estimée par la proportion de vrais positifs (VP) chez les sujets atteints de paludisme, soit :

$$Se = \frac{VP}{VP + FN} \quad \text{avec} \quad FN : \text{Faux Négatif}$$

- **La spécificité (Sp)** : elle est estimée par la proportion de vrais négatifs (VN) chez les non atteints de paludisme, soit :

$$Sp = \frac{VN}{VN + FP} \quad \text{avec} \quad FP : \text{Faux Positif}$$

- **La précision (P)** : La précision est la capacité d'une méthode à bien confirmer ou infirmer la présence d'un trouble spécifique. Pour cela, il est nécessaire de comparer les résultats obtenus au test clinique avec une référence standard (ou gold standard). Cette précision est exprimée en termes de Valeurs Prédicatives Positives ou Négatives (VPP et VPN), de Sensibilité et de Spécificité, ou encore de Ratio de Vraisemblance (RV). Le ratio de vraisemblance (RV) est un calcul "probabilistique" exprimant à la fois la capacité sensible et spécifique d'un test.

- **La valeur prédictive positive (VPP)** : elle est estimée par la proportion de vrais positifs parmi les sujets atteints de paludisme, soit :

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

- **La valeur prédictive négative (VPN)** : elle est estimée par la proportion de vrais négatifs parmi les sujets non atteints de paludisme, soit :

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

L'analyse ROC (Receiver Operating Characteristic) a également été utilisée pour évaluer la performance de détection des gènes de résistance aux antipaludiques dans la salive et l'urine. En effet, l'analyse ROC est une méthode statistique utilisée dans le domaine médical depuis 1960 (**Delacour et al, 2005**). Elle s'applique dans de nombreux problèmes d'évaluation et permet de comparer la capacité de deux biomarqueurs ou produits biologiques à discriminer des sujets malades et non malades (**Delacour et al, 2005**)

- Pour la comparaison des prévalences des marqueurs moléculaires, nous avons utilisé le test  $\chi^2$  de comparaison de trois proportions. Le test du  $\chi^2$  a été utilisé pour déterminer si les prévalences des marqueurs moléculaires peuvent être considérées comme étant toutes égales (hypothèse nulle  $H_0$ ) ou si au moins deux prévalences sont différentes (hypothèse alternative  $H_a$ ). Lorsque plusieurs cellules du tableau de contingence ont des valeurs faibles, le test du  $\chi^2$  devient peu sûr. Dans ce cas, la méthode de Monte Carlo a été utilisée. La méthode Monte-Carlo permet de calculer une distribution du  $\chi^2$  sur la base de simulations ayant pour contrainte de respecter les effectifs totaux par site ou produit biologique. On obtient donc une distribution empirique donnant une valeur critique plus fiable (à condition que le nombre de simulations soit important) que celle donnée par la distribution théorique du  $\chi^2$ .

- Le test Kappa de Cohen (k) a été utilisé pour apprécier la concordance entre les produits biologiques (salive / urine) pour l'étude de la chimiorésistance aux antipaludiques (**Fermanian, 1984 ; Com Nogue et Rodary, 1987 ; Mazoyer & Mary, 1987**). Le degré de l'accord entre deux tests peut être qualifié comme suit :

- Très bon, le coefficient kappa de Cohen sera  $\geq 0,81$  ;
- Bon, le coefficient kappa de Cohen sera entre 0,61 et 0,80 ;
- Modéré, le coefficient kappa de Cohen sera entre 0,41 et 0,60 ;
- Médiocre, le coefficient kappa de Cohen sera entre 0,21 et 0,40 ;
- Mauvais, le coefficient kappa de Cohen sera entre 0 et 0,20 et,
- Très mauvais  $< 0$ .

Le coefficient kappa de Cohen a été calculé à partir des valeurs d'un tableau de contingence (**Tableau V**).

**Tableau V** : Tableau de contingence pour le calcul du coefficient de Kappa (K)

		Produit biologique Testé		TOTAL
		Sauvage	Mutant	
Produit biologique de référence	Sauvage (n)	A	B	A+B
	Mutant (n)	C	D	C+D
TOTAL		A+C	B+D	E
Coefficient kappa de Cohen				K

$$C_a = \frac{[(A+B) \times (A+C) / E] + (C+D) \times (B+D) / E}{E}$$

$$C_0 = (A+D) / E$$

$$K = \frac{(C_0 - C_a)}{(1 - C_a)}$$

**Note:** Les lettres A, B, C, D et E correspondent à des chiffres.

C<sub>0</sub> :

C<sub>a</sub> :

### ➤ **Analyse des résultats de séquençage**

L'utilisation du logiciel BioEdit a permis d'analyser les séquences pour la recherche de mutations éventuelles. Pour cela, les séquences ont été alignées et les mutations ont été repérées par rapport à la séquence de référence.

\* **L'alignement** : il a consisté à aligner en parallèle deux séquences d'ADN, voire d'avantage, en maximisant le nombre de nucléotides ou de résidus identiques, tout en minimisant le nombre de mésappariement et de vides. Les séquences ont été alignées y compris les séquences de référence des gènes correspondant disponible en ligne dans la banque de données publique GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

\* **Le repérage** : il a consisté à détecter les codons d'intérêt (51, 59, 108) du polypeptide PfDHFR ou les nucléotides en position 153, 177, 324, de la séquence nucléotidique du gène *pfdhfr*. Les codons 74, 75, 76 du polypeptide PFCRT ou les nucléotides en position 222, 225, 228 de la séquence du gène *pfcr*t ont aussi été analysés. De même que les codons 493, 539, 543, 580, 476 du polypeptide PFK13 PROPELLER ou les nucléotides en position 1479, 1617, 1629, 1740, 1428 du gène *K13 propeller*.

## **III- RESULTATS ET DISCUSSION**

### **III-1- RESULTATS**

#### **III-1-1- Evaluation de la performance de la salive et de l'urine pour l'étude des marqueurs de résistance aux antipaludiques.**

##### **- Profil des patients et taux de produit d'amplification en fonction du produit biologique**

Au total, 94 personnes infectées par *Plasmodium falciparum* ont été retenues pour cette étude dont 58 (61,7%) de sexe féminin et 36 (38,3%) de sexe masculin. L'âge des patients a varié de 2 à 62 ans avec un âge moyen à Anonkoua-kouté, Port-bouët et Ayamé de 16,60, 16,69 et 15,84 ans respectivement. Par ailleurs, un total de 459 échantillons de sang, de salive et d'urines ont été collectés sur l'ensemble des trois sites de l'étude (**Tableau VI**).

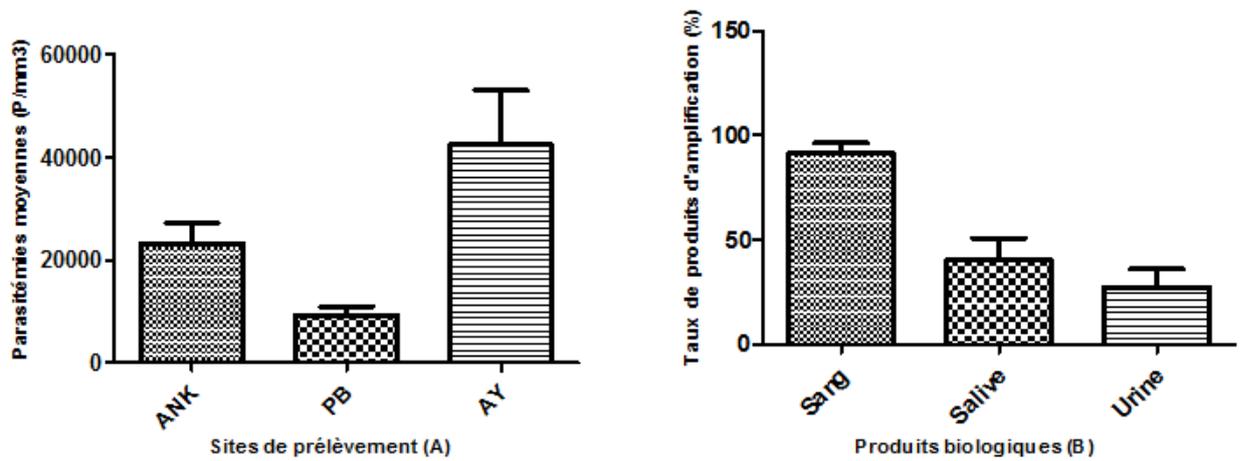
**Tableau VI : Profil des patients et échantillons collectés**

<b>Sites</b>	<b>Période de collecte</b>	<b>Tranches d'âge</b>	<b>Age moyen (ans)</b>	<b>Nombre de patients</b>	<b>Types d'échantillons</b>	<b>Nombre d'échantillons collectés</b>
Anonkoua-kouté	Février - Mars 2015	2 à 53 ans	16,60	52	Sang	52
					Salive	52
					Urine	52
Port - Bouët	Avril - Mai- Juin 2015	2 à 62 ans	16,69	51	Sang	51
					Salive	51
					Urine	51
Ayamé	Juin - Juillet - Août 2015	2 à 55 ans	15,84	50	Sang	50
					Salive	50
					Urine	50
<b>Total</b>				<b>153</b>		<b>459</b>

Les densités parasitaires ont varié de 1200 à 200000 parasites /  $\mu\text{L}$  avec des densités parasitaires moyennes à Anonkoua Kouté, Port-Bouët et Ayamé respectivement de 22900, 9193 et 42327 parasites /  $\mu\text{L}$  (**Figure 12A**). Une différence significative ( $p = 0,002$ ) a été observée entre les densités parasitaires de Port-Bouët et d'Ayamé. La densité parasitaire moyenne sur l'ensemble des trois sites a été de 24 682 parasites /  $\mu\text{L}$ .

L'analyse moléculaire a été réalisée avec 282 isolats sanguins, salivaires et urinaires sélectionnés de façon aléatoire (**Tableau VII**).

Le taux de réussite de l'amplification de l'ADN génomique de *Plasmodium falciparum* par PCR a été de 41,13% (116/282) et 28,01% (79/282) respectivement dans la salive et les urines contre 91,84% (259/282) dans le sang (**Figure 12B**). Une différence significative ( $p < 0,05$ ) a été observée entre les taux de produit d'amplification des extraits salivaires et sanguins et aussi entre ceux (taux d'amplification) des extraits urinaires et sanguins.



**Figure 12.** Densité parasitaire moyenne en fonction du site de prélèvement (A) et taux de réussite de la PCR en fonction du produit biologique (B).

**Note:** ANK, PB et AY désignent respectivement Anonkou-Kouté, Port-Bouët et Ayamé

P/mm<sup>3</sup> designe Parasites par milimètre cube de sang

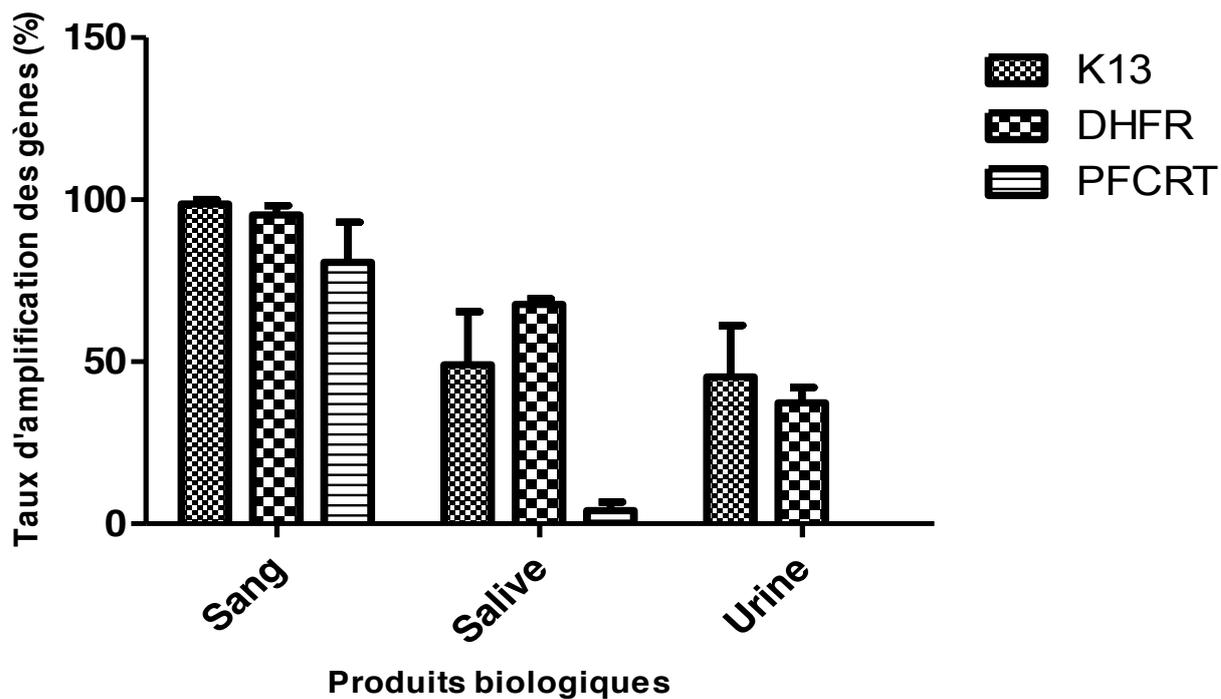
**Tableau VII :** Isolats sélectionnés pour l'analyse moléculaire des marqueurs de la résistance

<b>Sites</b>	<b>Types d'échantillons</b>	<b>Nombre d'échantillons collectés</b>	<b>Nombre d'isolats sélectionnés</b>
Anonkoua-kouté	Sang	52	31
	Salive	52	31
	Urine	52	31
Port - Bouët	Sang	51	32
	Salive	51	32
	Urine	51	32
Ayamé	Sang	50	31
	Salive	50	31
	Urine	50	31
<b>Total</b>		<b>459</b>	<b>282</b>

### - Taux d'amplification des fragments d'ADN de chaque gène par produit biologique

L'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification de chaque fragment de gène a permis de détecter les gènes *Pfcrt* à 80,85% (76/94), *Pfdhfr* à 95,74% (90/94) et *PfK13 Propeller* à 98,93% (93/94) dans le sang. Dans la salive, les niveaux de détection des gènes ont été de 50% (47/94), 69,14% (65/94) et 4,26% (4/94) respectivement pour les gènes *K13 propeller*, *Pfdhfr* et *Pfcrt*. Contrairement au gène *Pfcrt* qui n'a pas été détecté, les gènes *PfK13 Propeller* et *pfdhfr* ont été détectés respectivement à 45,74% (43/94) et 38,30% (36/94) dans l'urine (**Figure 13**).

Pour ce qui concerne l'amplification du gène *PfK13 Propeller*, aucune différence significative entre les taux des produits d'amplification des fragments de ce gène par rapport au produit biologique n'a été notée. Par contre, une différence significative ( $p < 0,05$ ) a été observée entre les taux de produits d'amplification des fragments du gène *Pfdhfr* dans les trois produits biologiques (sang, salive et urine). Concernant le gène *Pfcrt*, une différence significative a été observée entre les taux des produits d'amplification des fragments de ce gène dans le sang et dans la salive et l'urine ( $p < 0,05$ ). Aucune différence significative n'a été observée entre les taux des produits d'amplification de ce gène dans la salive et l'urine.

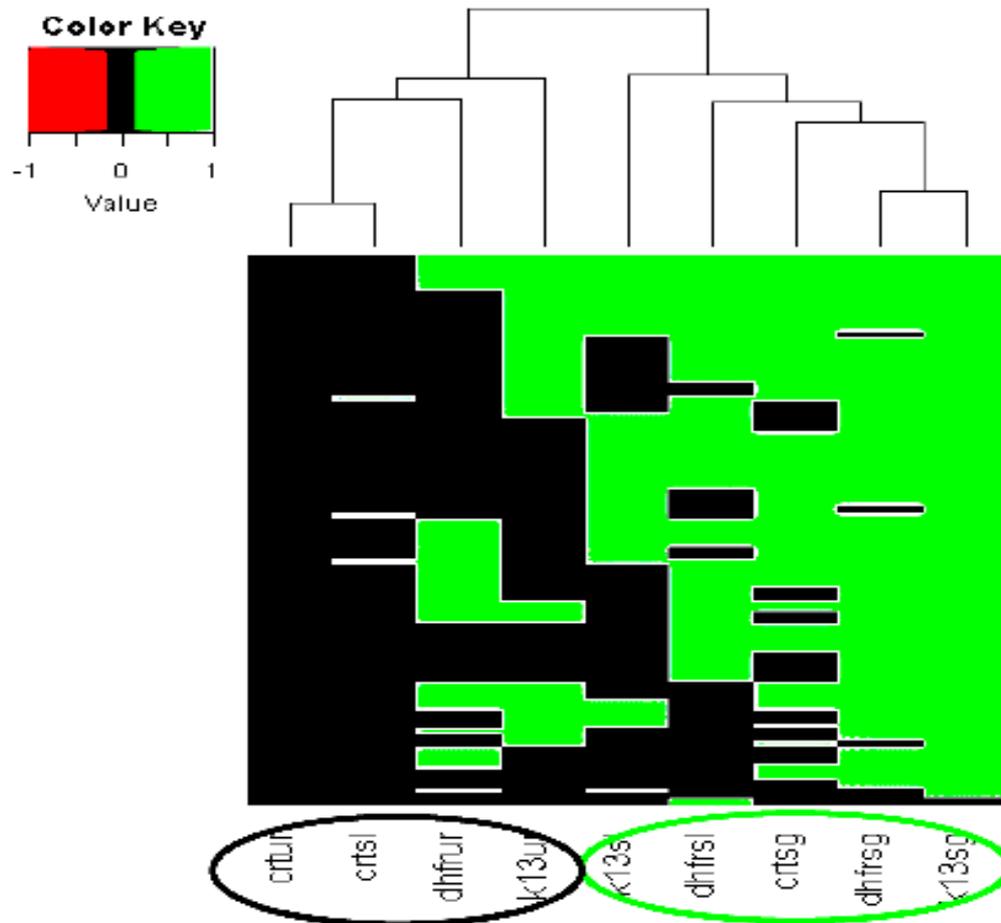


**Figure 13.** Taux des produits d'amplification des gènes *pfK13 propeller*, *pfdhfr* et *pfprt* par produit biologique

**Note:** K13, DHFR et PFCRT désignent respectivement les gènes *pfK13 propeller*, *pfdhfr* et *pfprt*

**- Évaluation du sang, de la salive et de l'urine comme matériel biologique pour la détection des gènes de résistance aux antipaludiques.**

En associant les gènes sur la base de leur présence ou non dans chaque produit biologique, l'analyse a permis de mettre en évidence deux tendances qui suggèrent que le sang est le meilleur échantillon biologique pour la détection des marqueurs *pfcr*, *pfdhfr*, *pfK13 propeller*. Toutefois, pour ce qui concerne la détection des gènes *pfk13 propeller* et *pfdhfr*, la même analyse a montré une performance de la salive proche de celle du sang (**Figure 14**). Ainsi, guidés par ces observations, une analyse de variance a été réalisée entre le sang, la salive et l'urine quant à l'expression des gènes *pfcr*, *pfdhfr* et *pfK13 propeller* chez les patients atteints de paludisme simple. Cette analyse a permis d'identifier deux groupes de marqueurs ; (i) *pfK13 propeller*, *pfdhfr* et *pfcr* et (ii) *pfK13 propeller* et *pfdhfr* mis en évidence dans le sang et la salive respectivement, tout en les identifiant comme des produits biologiques performants pour discriminer les patients exprimant ces gènes ( $p = 0,03$ ). Dans l'ensemble, l'analyse a suggéré que contrairement à l'urine, le sang et la salive constitueraient les échantillons biologiques les plus appropriés pour la détection de ces marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques ( $p < 0,05$ ).



**Figure 14.** Surveillance graphique de l'expression des gènes *pfK13 propeller*, *pfdhfr* et *pfprt* dans les extraits sanguins, salivaires et urinaires.

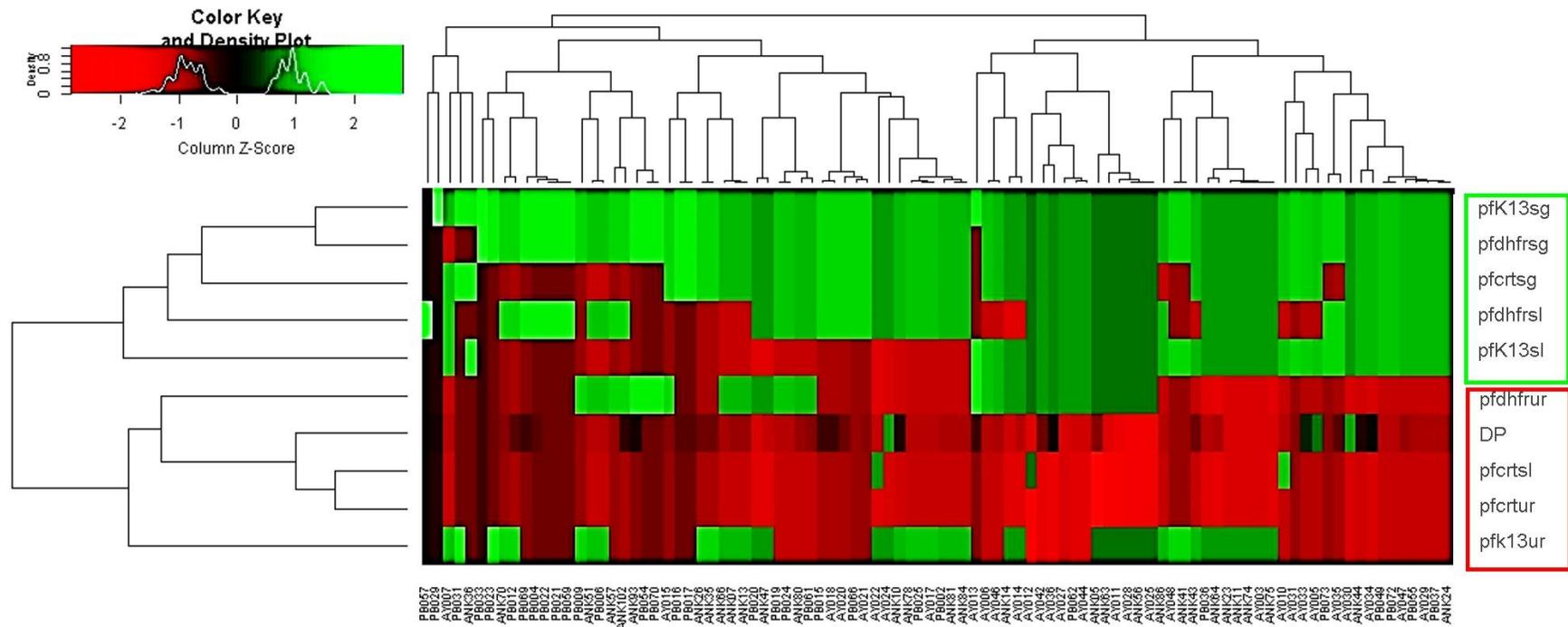
**Note:** “ur”, “sl” et “sg” désignent urine, salive et sang respectivement. “Crtur”, “Crtsl” et “Crtsg” désignent le gène *pfprt* dans l'urine, la salive et le sang respectivement. Il en est de même pour les gènes *pfdhfr* et *pfK13 propeller* dans l'urine, la salive et le sang.

### III-1-2- Analyse comparée de la performance de la salive, l'urine et le sang pour la détection des gènes de résistance aux antipaludiques

#### - Variabilité entre patients sur la base de la détection des gènes *pfk13 propeller*, *pfdhfr* et *pfcr1* dans le sang, la salive et l'urine.

Une analyse comparée a été effectuée en associant la densité parasitaire (DP) aux marqueurs moléculaires. Ainsi, l'analyse graphique par z-score a permis de classer les sujets atteints du paludisme dans deux groupes distincts (**Figure 15**). D'une part, les sujets d'Anonkoua-Kouté et Ayamé chez qui une variabilité a été mise en évidence, et d'autre part ceux de Port-Bouët où aucune variabilité n'a été mise en évidence. En effet, une variabilité a été mise en évidence chez les sujets d'Anonkoua kouté (ANK) (rapport de variance = 2,10 ;  $p = 0,04$ ) et ceux d'Ayamé (AY) (ratio de variance = 1,68 ;  $p = 0,16$ ) comparativement aux sujets de Port-Bouët (PB) (rapport de variance = 0,66 ;  $p = 0,26$ ) (**Figure 15**). Cependant, la cartographie du z-score a montré une prévalence des marqueurs moléculaires (*pfk13 propeller*, *pfdhfr* et *pfcr1*) raisonnablement homogène et constante (fusion de la couleur verte) dans le sang (rapport de variance  $< 0,00$  ;  $p < 0,05$ ). Cette même observation a été faite pour les gènes *pfdhfr* et *pfK13 propeller* dans la salive chez les mêmes patients. Toutefois, l'analyse statistique a montré une forte concordance entre l'expression du gène *pfcr1* dans le sang et l'expression des deux gènes *pfK13 propeller* et *pfdhfr* dans la salive (rapport de variance  $< 0,02$  ;  $p < 0,05$ ) (**Figure 15**).

Cependant, contrairement aux gènes (i) *pfcr1*, *pfK13 propeller* et *pfdhfr* détectés dans le sang et les gènes (ii) *pfK13 propeller* et *pfdhfr* détectés dans la salive, les résultats indexent les gènes *pfK13 propeller* et *pfdhfr* détectés dans l'urine et le gène *pfcr1* détecté dans la salive comme sources potentielles de variabilité entre les sujets de cette étude (**Figure 15 et tableau VIII**). La présente analyse suggère une faible sensibilité de la densité parasitaire (DP) dans le diagnostic moléculaire du paludisme basé sur la détection des gènes *pfcr1*, *pfdhfr* et *pfK13 propeller* dans le sang et la salive ( $p < 0,05$ ). Toutefois, l'ensemble des résultats est en faveur de la détection des gènes *pfK13 propeller* et *pfdhfr* dans la salive comme méthodologie alternative au sang dans le processus de détection des marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques.



**Figure 15.** Évaluation de la variabilité entre patients sur la base de la détection des gènes *pfK13 propeller*, *pfdhfr* et *pfcrt* dans le sang, la salive et l'urine. Les sigles ur, sl et sg indiquent respectivement l'urine, la salive et le sang.

**Note :** Variabilité chez les sujets d'Anonkoua kouté (rapport de variance = 2,10 ; p = 0,04).

Variabilité chez les sujets d'Ayamé (rapport de variance = 1,68 ; p = 0,16)

Pas de variabilité chez les sujets de Port-Bouët (rapport de variance = 0,66 ; p = 0,26).

**Tableau VIII :** Statistique descriptive évaluant l'abondance de l'ADN correspondant aux gènes *pfK13 propeller*, *pfdhfr* et *pfcr1* dans le sang, la salive et l'urine des patients atteints de paludisme

Paramètres Statistiques	Produits biologiques									Dansité Parasitaire (DP)
	Sang			Salive*			Urine*			
	<i>pfcr1</i>	<i>pfdhfr</i>	<i>pfK13 propeller</i>	<i>Pfcr1</i> *	<i>pfdhfr</i>	<i>pfK13 propeller</i>	<i>Pfcr1</i> *	<i>pfdhfr</i>	<i>pfK13 propeller</i>	
Median	1,36	1,07	1,01	0,00	1,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41
¼ Quartile	0,00	1,07	1,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
¾ Quartile	1,36	1,07	1,01	0,00	1,45	2,04	0,00	2,67	2,18	0,93
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,049
Maximum	1,36	1,07	1,01	31,33	1,45	2,04	0,00	2,67	2,18	8,10
Variance	0,37	0,07	0,01	30,66	0,46	1,05	0,00	1,70	1,20	2,51
Deviation Standard	0,61	0,26	0,10	5,54	0,67	1,02	0,00	1,30	1,10	1,59

\* Ne convient ni pour l'analyse statistique descriptive ni pour l'analyse différentielle en raison de la dispersion nulle des données (la distance interquartile est nulle).

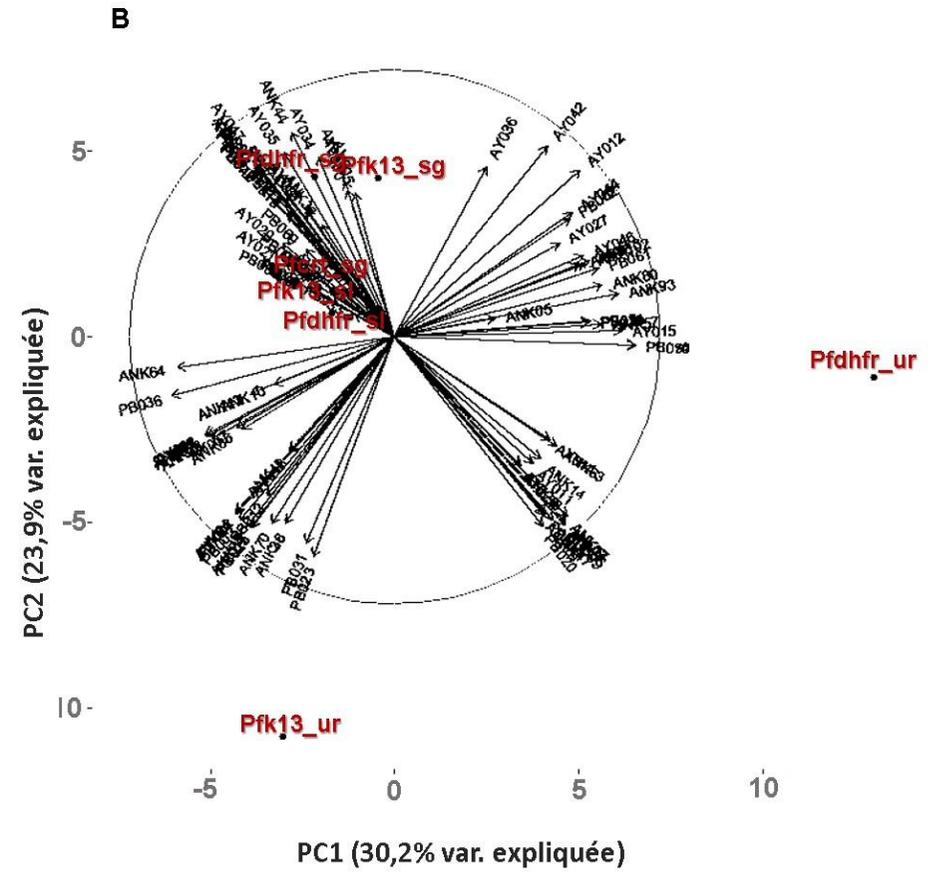
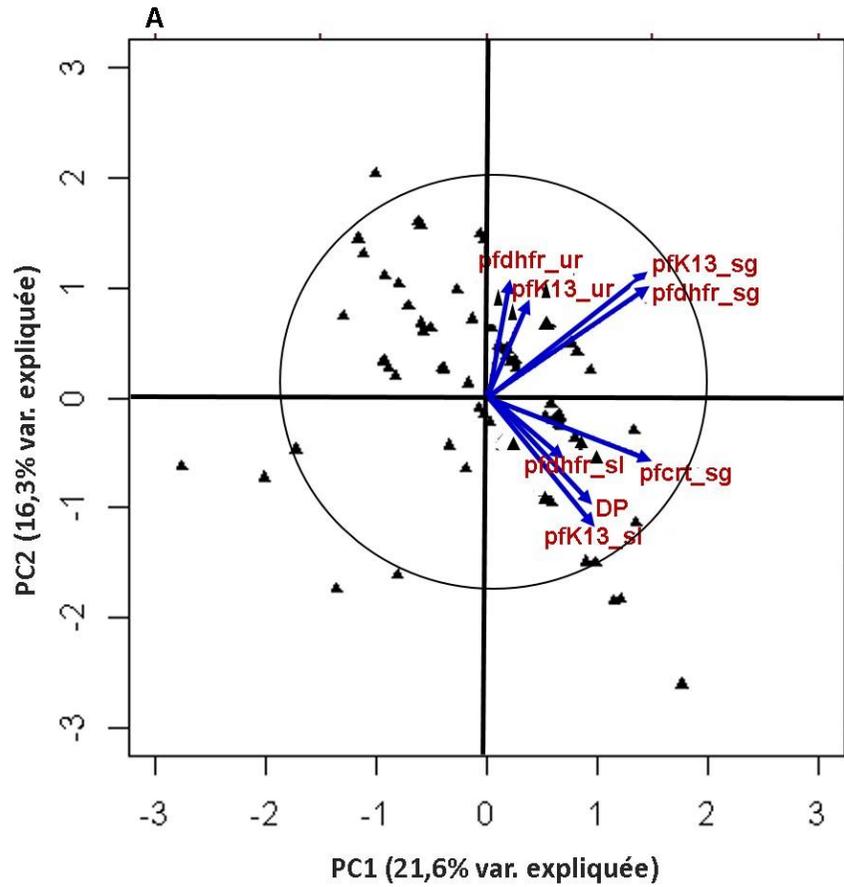
Les données relatives au gène *pfcr1* des isolats de salive et urine n'ont donc pas été considérées dans les analyses statistiques subséquentes

**- Analyse comparative de la relation de détectabilité des gènes *pfK13 propeller*, *pfdhfr*, et *pfcr1* dans le sang, la salive et l'urine.**

Une analyse en composantes principales a été effectuée afin d'évaluer la relation de détectabilité entre les gènes *pfdhfr*, *pfK13 propeller* et *pfcr1* dans le sang, la salive et l'urine des sujets atteints de paludisme simple.

La figure 16A indique qu'il y a une corrélation apparente entre : (i) les gènes *pfdhfr*, *pfK13 propeller* et *pfcr1* dans le sang (axe PC1 (21,6%)) ; (ii) les gènes *pfdhfr* et *pfK13 propeller* dans l'urine (paramètre PC1 (21,6%)) et dans la salive (paramètre PC2 (16,3%)) ; (iii) la densité parasitaire (DP) et le gène *pfcr1* dans le sang, le gène *pfdhfr* et le gène *pfK13 propeller* dans la salive (paramètres PC1(21,6%) et PC2 (16,3%)).

En évaluant la variabilité dans la population d'étude, l'analyse de la figure 16B montre la divergence entre la densité parasitaire (DP) et l'urine et indique que les gènes *pfK13 propeller* et *pfdhfr* dans l'urine pourraient être à l'origine de la variabilité (PC1 et PC2 expliquant plus de 50% de la variabilité) dans cette population d'étude ( $p < 0,05$ ). En outre, les tests statistiques de Pearson (**Tableau IX**) ont montré une faible corrélation entre les gènes *pfdhfr* et *pfK13 propeller* exprimés dans le sang et l'urine contrairement au gène *pfcr1* dans le sang ( $p = 0,09$ ). De plus ces tests statistiques ont exclu l'urine comme produit biologique fiable pour la détection des gènes *pfdhfr* et *pfK13 propeller* chez les sujets atteints de paludisme simple (**Tableau IX**). Cependant, l'analyse a confirmé que les performances de détection des gènes *pfdhfr* et *pfK13 propeller* dans la salive sont proches de celles dans le sang. En somme, l'analyse a révélé que la détection des gènes *pfK13 propeller* et *pfdhfr* de *P. falciparum* dans la salive pourrait être une bonne alternative au sang pour les études de surveillance de la résistance aux antipaludiques (**Figures 15 et 16**).



**Figure 16.** Analyse comparative de la relation entre les gènes *pfk13 propeller*, *pfdhfr*, et *pfcrt* détectés dans le sang, la salive et l'urine

Les sigles ur, sl et sg indiquent respectivement urine, salive et sang

Les axes PC1 et PC2 représentent respectivement la détectabilité et la densité parasitaire

**Tableau IX :** Corrélation de Pearson entre les gènes *pfdhfr*, *pfK13 propeller* et *pfcrf* détectés dans le sang, la salive et l'urine.

	<b>k13sg</b>	<b>k13sl</b>	<b>dhfrsg</b>	dhfrsl	<b>crtsg</b>	DP	k13ur	dhfrur
k13sg	1							
k13sl	0,10	1						
<b>dhfrsg</b>	<b>0,40*</b>	-0,01	1					
<b>dhfrsl</b>	-0,07	0,05	<b>0,20*</b>	1				
<b>crtsg</b>	<b>0,20*</b>	<b>0,30*</b>	0,14	0,12	1			
<b>DP</b>	0,05	<b>0,17*</b>	0,11	0,06	<b>0,21*</b>	1		
k13ur	0,10	-0,04	0,07	0,01	0,12	-0,11	1	
dhfrur	0,08	-0,01	0,11	-0,10	0,02	-0,07	-0,0004	1

\* Valeur significative de la corrélation de Pearson,  $p < 0,1$

\* Les chiffres du tableau renvoient au coefficient de corrélation

**Note:** “ur”, “sl” et “sg” désignent urine, salive et sang respectivement. “k13ur”, “k13sl” et “k13sg” désigne le gène *pfK13propeller* dans l'urine, la salive et le sang respectivement. Il en est de même pour les gènes *pfdhfr* et *pfcrf* dans l'urine, la salive et le sang.

**- Évaluation de la performance de la salive et l'urine par la sensibilité, la spécificité, la précision et les paramètres prédictifs positifs**

La performance des échantillons de salive et d'urine a été évaluée sur la base de la détection des marqueurs moléculaires *pfdhfr*, *pfcr* et *pfK13* par une analyse ROC (*receiver operational characteristic*). Les données ont révélé une forte sensibilité de la salive par rapport à l'urine dans la détection des gènes *pfdhfr*, *pfcr* et *pfK13* (**Tableau X**). En effet, le gène *pfdhfr* dans l'échantillon de salive (*pfdhfr\_sl*) a enregistré la plus grande sensibilité par rapport aux autres gènes analysés. Tous les gènes (*pfdhfr*, *pfcr* et *pfK13*) de *P. falciparum* détectés à la fois dans l'urine et la salive (sauf le gène *pfcr* dans l'échantillon d'urine) semblaient bien prédire l'infection du paludisme lorsque le sang est considéré comme référence (valeur prédictive positive > 0,80). De plus, l'échantillon de salive a enregistré une meilleure précision relative et des paramètres de spécificité évaluant la performance de détection des gènes de *P. falciparum* (**Tableau X**). En outre, l'analyse ROC a confirmé et / ou insisté sur la détection des gènes *pfK13* et *pfdhfr* dans la salive comme méthodologie efficace qui pourrait se substituer au sang pour les études de surveillance de la résistance aux antipaludiques. Finalement, cette analyse a indexé la présence du gène *pfdhfr* dans la salive comme le meilleur paramètre prédisant positivement l'infection du paludisme lorsque le sang est considéré comme référence (**Tableau X**).

**Tableau X** : Évaluation de la performance des échantillons d'urine et de salive comme produits biologiques pour l'étude des marqueurs génétiques de la chimiorésistance

Paramètres	Salive			Urine		
	<i>Pfk13</i>	<i>pfdhfr</i>	<i>pfert</i>	<i>Pfk13</i>	<i>pfdhfr</i>	<i>Pfert</i>
<b>Sensibilité</b>	0,46	<b>0,64</b>	0,05	0,45	0,38	0
<b>Spécificité</b>	0,2	<b>0,5</b>	0,5	0,5	0,5	0,01
<b>Précision</b>	0,43	<b>0,54</b>	0,05	0,45	0,38	0,01
<b>Valeur Prédictive Positive</b>	0,91	<b>0,98</b>	0,8	0,95	0,94	0

### III-1-3-Polymorphisme des gènes *pfcr*, *pfdhfr-ts* et *pfK13 propeller* sur l'ensemble des sites d'étude

#### III-1-3-1- Bilan du séquençage

La sélection aléatoire de 282 isolats pour l'analyse moléculaire (**Tableau VII**) a montré que le nombre de fragments d'ADN d'isolats issus des patients et séquencés a varié en fonction du produit biologique et de la présence des codons d'intérêt sur le fragment obtenu (**Tableau XI**).

Ainsi, un total de 541 fragments d'ADN ont été séquencés dont 205 fragments du gène *pfdhfr*, 78 fragments du gène *pfcr* et 258 fragments du gènes *pfK13 propeller* (**Tableau XI**).

Pour le gène *pfdhfr*, 205 fragments d'ADN ont été séquencés dont 86 fragments d'ADN sanguin, 67 fragments d'ADN salivaire et 52 fragments d'ADN urinaire.

En ce qui concerne le sang, 65 (75,58%), 66 (76,74%) et 81 (94,18%) fragments d'ADN ont été séquencés avec succès respectivement pour les nucléotides en position 153, 177 et 324 qui correspondent aux acides aminés au niveau desquels les mutations Asn-51-**Ile**, Cys-59-**Arg** et Ser-108-**Thr** sont observées.

Par contre, avec la salive, 57 (85,07%), 58 (86,56%) et 63 (94,02%) fragments d'ADN ont été séquencés avec succès respectivement pour les nucléotides en position 153, 177 et 324.

Au niveau de l'urine, 38(73,07%), 42 (80,76%) et 48 (92,30%) fragments d'ADN ont été séquencés avec succès pour les nucléotides en position 153, 177 et 324.

Le séquençage de la région de l'ADN conduisant à la mutation Ser-108-**Asn** a été effectué avec plus de succès dans le sang (94,18 %) par rapport à la salive (94,02%) et l'urine (92,30%).

Pour le gène *pfcr*, 78 fragments d'ADN ont été séquencés dont 74 fragments d'ADN sanguin et 4 fragments d'ADN salivaire. Aucun fragment d'ADN urinaire n'a été séquencé, car les extraits d'ADN urinaire n'ont pas été amplifiés avec succès pour le gène *pfcr*.

Au total, 59 (79,72%), 64 (86,48%) et 64 (86,48%) fragments d'ADN sanguin portant les trois positions d'intérêt de nucléotides (222, 225 et 228) ont été dénombrés respectivement pour les mutations Met-74-**Ile**, Asn-75-**Glu** et Lys-76-**Thr** contre seulement 3, 2 et 3 fragments d'ADN salivaire respectivement pour les mêmes mutations Met-74-**Ile**, Asn-75-**Glu** et Lys-76-**Thr**.

Le séquençage de la région de l'ADN conduisant à la mutation Lys-76-**Thr** a été effectué avec plus de succès dans le sang (64/74, soit 86,48%) par rapport à la salive (3/4, soit 75%).

Pour le gène *pfK13 propeller*, parmi les 258 fragments d'ADN séquencés, 93 provenaient du sang, 87 de la salive et 78 de l'urine.

En ce qui concerne le sang, 84,94% (79/93), 91,39% (85/93), 95,69% (89/93), 100% (93/93) et 82,79% (77/93) des fragments d'ADN portant respectivement les mutations Tyr-493-**Ile**, Arg-539-**Thr**, Ile-543-**Thr**, Cys-580-**Tyr** et Met-476-**Ile** ont été séquencés avec succès.

Dans la salive, 49 (56,32%), 59 (67,81%), 68 (78,16%), 74 (85,05%) et 45 (51,72%) fragments d'ADN ont été séquencés avec succès contre 47 (60,25%), 59 (75,64%), 62 (79,48%), 66 (84,61%) et 45 (57,69%) dans l'urine respectivement pour les séquences portant les mutations Tyr-493-**Ile**, Arg-539-**Thr**, Ile-543-**Thr**, Cys-580-**Tyr** et Met-476-**Ile**.

Les séquences portant la mutation Cys-580-**Tyr** ont donné le plus de succès de séquençage dans les trois produits biologiques (sang, salive et urine). La majorité des séquences obtenues portait la mutation Cys-580-**Tyr**.

**Tableau XI :** Bilan du séquençage de l'ADN extrait d'isolats issus du sang, de la salive et de l'urine en fonction des mutations

		Sang (n=86)		Salive (n=67)		Urine (n=52)	
Fragments séquencés	Mutations	Succès	Échecs	Succès	Échecs	Succès	Échecs
<i>pfdhfr</i> (N=205)	Asn-51-Ile	65	21	57	10	38	14
	Cys-59-Arg	66	20	58	9	42	10
	<b>Ser-108-Asn</b>	<b>81</b>	<b>5</b>	<b>63</b>	<b>4</b>	<b>48</b>	<b>4</b>
<i>Pfcrt</i> (N=78)		Sang (n=74)		Salive (n=04)		Urine (n=0)	
	Met-74-Ile	59	15	3	1	0	0
	Asn-75-Glu	64	10	2	2	0	0
	<b>Lys-76-Thr</b>	<b>64</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>pfk13 propeller</i> (N=258)		Sang (n=93)		Salive (n=87)		Urine (n=78)	
	Tyr-493-Ile	79	14	49	38	47	31
	Arg-539-Thr	85	8	59	28	59	19
	Ile-543-Thr	89	4	68	19	62	16
	<b>Cys-580-Tyr</b>	<b>93</b>	<b>0</b>	<b>74</b>	<b>13</b>	<b>66</b>	<b>12</b>
	Met-476-Ile	77	16	45	42	45	33

**Note:** "N" représente le nombre d'isolats séquencés par gène.

"n" représente le nombre d'isolats séquencés par produit biologique

### III-1-3-2 - Polymorphisme des gènes *pdfhfr* dans les produits biologiques

#### Fréquence des allèles individuels du gène *pdfhfr* et analyse moléculaire des génotypes correspondants

Pour le gène *pdfhfr*, 205 (205/541, soit 37,89%) fragments d'ADN ont été séquencés dont 86 fragments d'ADN sanguin, 67 fragments d'ADN salivaire et 52 fragments d'ADN urinaire (**Tableau XI**).

Les fréquences des mutations Asn-51-**Ile**, Cys-59-**Arg** et Ser-108-**Asn** du polypeptide du gène *pdfhfr* varient en fonction du produit biologique. Ainsi, la fréquence de la mutation Asn-51-**Ile** a varié entre 49 et 62 % selon le produit biologique (**Tableau XII**). La fréquence la plus élevée de cette mutation (Asn-51-**Ile**) était 61,53% dans le sang contre 49,12% et 60,52% dans la salive et l'urine respectivement ( $p = 0,33$ ).

Quant à la mutation Cys-59-**Arg**, sa fréquence est passée de 42,85% dans l'urine à 54,54% dans le sang et 63,79% dans la salive. Toutefois, les fréquences les plus élevées ont été observées au niveau de la mutation Ser-108-**Asn**. Elle a été 74,07% dans le sang contre 79,36% dans la salive et 68,75% dans l'urine. La différence est non significative dans les trois produits biologiques ( $p=0,44$ ).

La fréquence de la souche sauvage (Ser-108) est restée très faible dans les trois produits biologiques (sang, 17,28%, salive, 12,69% et urine, 14,58%).

Des mutations rares (fréquence inférieure à 5%) du gène *pdfhfr* ont été également mises en évidence (**annexe 7**).

L'analyse moléculaire a montré une variation des fréquences des souches sensibles et mutantes en fonction du produit biologique. La forme allélique NCS (haplotype sensible) a été observé dans 24 des 205 isolats, soit 11,71%. Sa prévalence est 13,96% dans le sang contre 13,46% dans l'urine et 7,46% dans la salive (**Tableau XIII**). Au niveau de l'haplotype triple mutant ayant le génotype IRN, il a été observé 61 (29,75%) séquences réparties en 27 séquences d'isolats sanguins, 21 séquences d'isolats salivaires et 13 séquences d'isolats urinaires (**Tableau XIII**) ; soient 31,40%, 31,24% et 25% respectivement. Les fréquences du triple mutant ayant le génotype IRN n'ont pas varié de façon significative dans le sang, la salive et l'urine ( $p = 0,685$ ). Aucune différence significative n'a également été révélée entre les prévalences des haplotypes mutants (simples mutants ( $p = 0,347$ ), doubles mutants ( $p = 0,447$ ) et triples mutants ( $p = 0,827$ )) dans les trois produits biologiques.

D'autres haplotypes simples, doubles et triples mutants ont été mis en évidence mais à des proportions très faibles (proportion inférieure à 5%) (**Annexe 8**).

**Tableau XII** : Fréquence des allèles individuels du gène *pfdhfr* dans le sang, la salive et les urines

Codons	Souches et mutations observées		Produits biologiques			P du test- $\chi^2$
			Sang n = 65 (%)	Salive n = 57 (%)	Urine n = 38 (%)	
dhfr_51	Sauvage	Asn-51	10 (15,38)	17 (29,82)	9 (23,68)	0,159
	Mutants	<b>Ile-51</b>	<b>40 (61,53)</b>	<b>28 (49,12)</b>	<b>23 (60,52)</b>	<b>0,338</b>
		<b>Phe-51</b>	<b>7 (10,76)</b>	6 (10,52)	1 (2,63)	0,674
		Autres	8 (12,30)	6(10,52)	5 (13,15)	
dhfr_59			<b>Sang n = 66 (%)</b>	<b>Salive n = 58 (%)</b>	<b>Urine n = 42 (%)</b>	
	Sauvage	Cys-59	10 (15,15)	10 (17,24)	11 (26,19)	0,7428
	Mutants	<b>Arg-59</b>	<b>36 (54,54)</b>	<b>37 (63,79)</b>	<b>18 (42,85)</b>	<b>0,115</b>
		<b>Gly-59</b>	<b>11 (16,66)</b>	3 (5,17)	0 (0)	-
		Autres	9 (13,63)	8 (13,79)	13 (30,95)	0,271
dhfr_108			<b>Sang n = 81 (%)</b>	<b>Salive n = 63 (%)</b>	<b>Urine n = 48 (%)</b>	
	Sauvage	Ser-108	14 (17,28)	8 (12,69)	7 (14,58)	0,742
	Mutants	<b>Asn-108</b>	<b>60 (74,07)</b>	<b>50 (79,36 )</b>	<b>33 (68,75)</b>	<b>0,443</b>
		Autres	7 (8,64)	5 (7,93)	8 (16,66)	0,259

**Notes** : Les aminoacides issus de la mutation de *pfdhfr* sont en gras et soulignés.

"n" représente le nombre d'isolats séquencés avec succès par codon et par produit biologique.

Ile-51, Arg-59, Asn-108 désignent respectivement les mutations Asn-51-Ile, Cys-59-Arg et Ser-108-Asn

- La liste des autres mutants se trouve dans l'annexe 7 (**annexe 7**).

- Le test  $\chi^2$  n'a pas pu être effectué du fait des valeurs inférieures à 5 dans plusieurs cellules.

**Tableau XIII** : Fréquence des différentes formes alléliques du gène *pfdhfr* dans le sang, la salive et les urines après mutation

Haplotypes <i>pfdhfr</i>	Génotypes			Sang (N=86)		Salive (N=67)		Urine (N=52)		P du test $\chi^2$
	N51I	C59R	S108N	n	%	n	%	n	%	
Haplotypes sensibles	N	C	S	12	13,96	5	7,46	7	13,46	0,4185
Haplotypes simples mutants				9	10,47	9	13,43	10	19,23	0,347
	N	C	<u>N</u>	2	2,33	5	7,46	5	9,62	-
	Autres			7	8,13	4	5,97	5	9,62	-
Haplotypes doubles mutants				26	30,23	25	37,31	14	29,92	0,447
	N	<u>R</u>	<u>N</u>	8	9,30	12	17,91	3	5,77	-
	<u>I</u>	C	<u>N</u>	7	8,14	3	3,48	4	7,69	-
	Autres			11	12,79	10	14,92	7	13,46	-
Haplotypes triples mutants				39	45,34	28	41,79	21	40,38	0,827
	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	27	31,40	21	31,24	13	25,00	0,685
	Autres			12	13,95	7	10,44	8	15,38	-

**Notes** : Une lettre majuscule dans la colonne “génotypes ” représente le code à une lettre des aminoacides (**annexe 2**). Les aminoacides issus de la mutation sont soulignés et en gras. Les fréquences déterminées correspondent au nombre d’observations sur le nombre de succès par gène.

La liste des autres haplotypes mutants se trouve dans l'annexe 8 (**annexe 8**)

Le test  $\chi^2$  n'a pas pu être effectué du fait des valeurs inférieures à 5 dans plusieurs cellules

### III-1-3-3- Polymorphisme du gène *pfcr* dans les produits biologiques

#### Fréquence des allèles individuels du gène *pfcr* et analyse moléculaire des génotypes correspondants

Pour le gène *pfcr*, 78 fragments d'ADN ont été séquencés dont 74 fragments d'ADN sanguin et 4 fragments d'ADN salivaire. Aucun fragment d'ADN urinaire n'a été séquencé.

Le séquençage de la région de l'ADN conduisant à la mutation Lys-76-**Thr** a été effectué avec plus de succès dans le sang (64/74, soit 82,02%) que dans la salive (3/4, soit 75%) et l'urine (0%).

La fréquence des isolats *pfcr* de souche sauvage est plus élevée que celle des isolats portant les mutations Met-74-**Ile**, Asn-75-**Glu** et Lys-76-**Thr** du polypeptide du gène *pfcr* dans le sang. Aussi, 40 des 64 séquences d'isolats sanguins (62,50 %) sont des souches sauvages Lys-76 (**Tableau XIV**).

Dans la salive, seulement trois isolats du gène *pfcr* ont été séquencés avec succès. Aucune séquence de ces isolats ne portait la mutation Lys-76-**Thr**. C'est plutôt la mutation Lys-76-**Gly** qui a été mise en évidence parmi les deux séquences d'isolats salivaires, soit une fréquence de 66,67%.

D'autres mutations du gène *pfcr* portées par les séquences d'isolats sanguins et salivaires ont été observées à des proportions très faibles (inférieure à 5%) (**Annexe 9**).

L'analyse moléculaire des génotypes correspondant au gène *pfcr* montre que la forme allélique MNK (haplotype sensible) a été prédominante dans les isolats sanguins avec une fréquence de 62,50% (**Tableau XV**). Par contre, les haplotypes simples mutants, doubles mutants et triples mutants ont été observés avec des fréquences respectives de 12,5%, 6,25% et 18,75% dans les isolats sanguins.

Dans les haplotypes triples mutants, l'on a enregistré une prédominance des génotypes IET et LKQ avec des fréquences respectives de 6,25% et 9,37%. L'analyse a également permis d'observer les haplotypes simples mutant ayant le génotype MNT (9,3%) et doubles mutant ayant le génotype MYQ (6,25%).

**Tableau XIV** : Fréquence des allèles individuels du gène *pfcr* dans le sang, la salive et les urines

Codons	Souches et mutations observées		Produits biologiques	
			Sang n = 59 (%)	Salive n = 3 (%)
<b>Crt_74</b>	Sauvage	Met-74	<b>47 (79,66)</b>	<b>2 (66,67)</b>
	Mutants	<b><u>Ile-74</u></b>	5 (8,47)	0 (0,00)
		Autres	7 (11,86)	1 (33,33)
<b>Crt_75</b>			Sang n = 64 (%)	Salive n = 2 (%)
	Sauvage	Asn-75	<b>48 (75,00)</b>	<b>1 (50,00)</b>
	Mutants	<b><u>Glu-75</u></b>	5 (7,81)	0 (0,00)
		<b><u>Lys-75</u></b>	6 (9,38)	0 (0,00)
		Autres	5 (7,81)	1 (50,00)
<b>Crt_76</b>			Sang n = 64 (%)	Salive n = 3 (%)
	Sauvage	Lys-76	<b>40 (62,50)</b>	<b>0 (0,00)</b>
	Mutants	<b><u>Thr-76</u></b>	10 (15,63)	0 (0,00)
		<b><u>Gln-76</u></b>	12 (18,75)	0 (0,00)
		<b><u>Gly-76</u></b>	0 (0,00)	<b>2 (66,67)</b>
		Autres	2 (3,12)	1 (33,33)

**Notes** : Les aminoacides issus de la mutation de *pfcr* sont en gras et soulignés.

"n" représente le nombre d'isolats séquencés avec succès par codon et par produit biologique.

Ile-74, Glu-75, Thr-76 désignent respectivement les mutations Met-74-Ile, Asn-75-Glu et Lys-76-Thr

La liste des autres mutants se trouve en annexe 9 (**Annexe 9**)

Le test  $\chi^2$  n'a pas pu être effectué du fait des valeurs inférieures à 5 dans plusieurs cellules

Crt désigne le gène *pfcr*

**Tableau XV** : Fréquence des différentes formes alléliques du *pfcr* dans le sang, la salive et les urines après mutation

	Formes alléliques			Sang N=64		Salive N=03		Urine N=00	
	M74 <b>I</b>	N75 <b>E</b>	K76 <b>T</b>	n	%	n	%	n	%
Haplotypes <i>pfcr</i>									
Haplotypes sensibles	N	N	K	40	62,5	00	00	00	00
Haplotypes simples mutants				8	12,5	2	66,67	00	00
	N	N	<b><u>T</u></b>	6	9,37	00	00	00	00
	Autres			2	3,12	2	66,67	00	00
Haplotypes doubles mutants	N	<b><u>Y</u></b>	<b><u>Q</u></b>	4	6,25	00	00	00	00
Haplotypes triples mutants				12	18,75	00	00	00	00
	<b><u>L</u></b>	<b><u>K</u></b>	<b><u>Q</u></b>	6	9,37	00	00	00	00
	<b><u>I</u></b>	<b><u>E</u></b>	<b><u>T</u></b>	4	6,25	00	00	00	00
	Autres			2	3,12	1	1,33	00	00

**Notes** : Une lettre majuscule dans la colonne “formes alléliques” représente le code à une lettre des aminoacides. Les aminoacides issus de la mutation de *pfcr* sont soulignés et en gras. Les fréquences déterminées correspondent au nombre d’observations sur le nombre de succès par gène. La liste des autres mutants se trouve dans l’annexe 10 (**Annexe 10**).

Le test  $\chi^2$  n’a pas pu être effectué du fait des valeurs inférieures à 5 dans plusieurs cellules

### III-1-3-2-3- Polymorphisme du gène *pfk13 propeller* dans le sang, la salive et les urines

#### Fréquence des allèles individuels du gène *K13 propeller* et analyse moléculaire des génotypes correspondant

Pour le gène *pfK13 propeller*, parmi les 258 fragments d'ADN séquencés, 93 provenaient du sang, 87 de la salive et 78 de l'urine.

Les mutations Tyr-493-**His**, Arg-539-**Thr**, Ile-543-**Thr**, Cys-580-**Tyr** et Met-476-**Ile** du polypeptide du gène *pfK13 propeller* dont l'implication a été décrite dans la résistance aux dérivés d'artémisinine en Asie du Sud Est sont observées à de très faibles proportions (inférieure à 5%) dans les trois produits biologiques (**Tableau XVI**).

L'analyse a montré des fréquences élevées des souches sauvages Tyr-493 (78,49%), Arg-539 (86,02%), Ile-543 (90,32%), Cys-580 (91,39%) et Met-476 (74,19%) dans le sang par rapport à la salive et l'urine. Aucune différence significative n'a été observée entre les fréquences des souches sauvages dans la salive et l'urine ( $p > 0,05$ ). Cependant, les fréquences de ces souches sauvages observées dans le sang étaient différentes de celles observées dans la salive et l'urine de façon significative ( $p < 0,05$ ).

La souche sauvage Cys-580 a enregistré la fréquence la plus élevée dans le sang (91,39%) et la salive (47,29%) tandis que dans l'urine, cette souche sauvage Cys-580 a été mise en évidence à 56,06% .

De très faibles taux (inférieur à 5%) d'autres mutations du gène *pfK13 propeller* ont été également enregistrés (**annexe 11**)

L'analyse moléculaire a montré que la forme allélique YRICM (haplotype sensible) a été prédominante dans les isolats sanguins, salivaires et urinaires avec des fréquences respectives de 78,49%, 33,33% et 37,68%. (**Tableau XVII**). Aucune différence significative n'a été observée entre les fréquences de l'haplotype sensible YRICM dans la salive et les urines ( $p > 0,05$ ). En revanche, une différence significative a été observée entre les fréquences du génotype YRICM (haplotype sensible) des isolats sanguins et celle des isolats salivaires et urinaires ( $p < 0,05$ ).

Les haplotypes simples mutants, doubles mutants et triples mutants, quadruple mutants et quintuple mutants ont été observés avec des fréquences respectives de 10,75%, 7,52%, 3,23%, 00% et 00% dans les isolats sanguins, 17,28%, 13,58%, 16,05%, 8,64% et 11,11% dans les isolats salivaires et 18,84%, 15,94%, 20,29%, 5,80% et 1,45% dans les isolats urinaires. Dans les trois produits biologiques, aucune différence significative n'a été observée entre les fréquences des haplotypes simples mutants ( $p = 0,30$ ) et double mutants ( $p = 0,22$ ).

Cependant, des différences significatives ont été observées entre les fréquences observées pour les autres mutants (triples mutants, quadruple mutants et quintuples mutants) dans le sang et la salive et l'urine ( $p < 0,05$ ). (**Tableau XVII**)

**Tableau XVI:** Fréquence des allèles individuels du gène *pfK13 propeller* dans le sang, la salive et les urines

Codons	Souches et mutations observées		Produits biologiques			p du test- $\chi^2$
			Sang n = 79 (%)	Salive n = 49 (%)	Urine n = 47 (%)	
<b>K13_493</b>	<b>Sauvage</b>	Tyr-493	<b>73 (92,40)</b>	<b>27 (55,10)</b>	<b>34 (72,34)</b>	p < 0,000
	<b>Mutants</b>	<b>His-493</b>	1 (1,26)	3 (6,12)	2 (4,25)	-
		Autres	5 (6,32)	19 (38,77)	11 (23,40)	p < 0,000
<b>K13_539</b>			<b>Sang n = 85 (%)</b>	<b>Salive n = 59 (%)</b>	<b>Urine n = 59 (%)</b>	
	<b>Sauvage</b>	Arg-539	<b>80 (94,11)</b>	<b>30 (50,84)</b>	<b>45 (76,27)</b>	p < 0,000
	<b>Mutants</b>	<b>Thr-539</b>	3 (3,52)	1 (1,69)	0 (0,00)	-
Autres		2 (2,35)	28 (47,45)	14 (23,72)	-	
<b>K13_543</b>			<b>Sang n = 89 (%)</b>	<b>Salive n = 68 (%)</b>	<b>Urine n = 62 (%)</b>	
	<b>Sauvage</b>	Ile-543	<b>84 (94,38)</b>	<b>28 (41,17)</b>	<b>37 (59,67)</b>	p < 0,000
	<b>Mutants</b>	<b>Thr-543</b>	0 (0,00)	2 (2,94)	0 (0,00)	-
Autres		5 (5,61)	38 (55,58)	26 (41,93)		
<b>K13_580</b>			<b>Sang n = 93 (%)</b>	<b>Salive n = 74 (%)</b>	<b>Urine n = 66 (%)</b>	
	<b>Sauvage</b>	Cys-580	<b>85 (91,39)</b>	<b>35 (47,29)</b>	<b>37 (56,06)</b>	p < 0,000
	<b>Mutants</b>	<b>Tyr-580</b>	0 (0,00)	1 (1,35)	1 (1,51)	-
Autres		8 (8,60)	38 (51,35)	28 (42,42)	p < 0,000	
<b>K13_476</b>			<b>Sang n = 77 (%)</b>	<b>Salive n = 45 (%)</b>	<b>Urine n = 45 (%)</b>	
	<b>Sauvage</b>	Met-476	<b>69 (89,61)</b>	<b>27 (60,00)</b>	<b>29 (64,44)</b>	<b>p = 0,000</b>
		<b>Ile-476</b>	1 (1,29)	1 (2,22)	2 (4,44)	-
Autres		7 (9,09)	17 (37,77)	14 (31,11)	P = 0,014	

**Notes :** Les aminoacides issus de la mutation de *pfK13 propeller* sont en gras et soulignés.

"n" représente le nombre d'isolats séquencés avec succès par codon et par produit biologique. La liste des autres mutants se trouve dans l'annexe 11 (**Annexe 11**).

His-493, Thr-539, Thr-543, Tyr-580 et Ile-476 désignent respectivement les mutations Tyr-493-His, Arg-539-Thr, Ile-543-Thr, Cys-580-Tyr et Met-476-Ile

Le test  $\chi^2$  n'a pas pu être effectué du fait des valeurs inférieures à 5 dans plusieurs cellules

**Tableau XVII** : Fréquence des différentes formes alléliques du gène *pfK13 propeller* dans les isolats sanguins, salivaire et urinaires après mutation.

	<b>Sang (N=93)</b>	<b>Salive (N=81)</b>	<b>Urine(N=69)</b>	<b>p du test <math>\chi^2</math></b>
<b>Haplotypes</b>	<b>Effectifs (proportion)</b>	<b>Effectifs (proportion)</b>	<b>Effectifs (proportion)</b>	
Haplotype sensible YRICM	73 (78,49%)	27 (33,33%)	26 (37,68%)	p < 0,000
Haplotype Simple Mutant	10 (10,75%)	14 (17,28%)	13 (18,84%)	p = 0,300
Haplotype Double Mutant	7 (7,52%)	11 (13,58%)	11 (15,94%)	p = 0,225
Haplotype Triple Mutant	3 (3,23%)	13 (16,05%)	14 (20,29%)	p < 0,002
Haplotype Quadruple Mutant	00 (0,00%)	7 (8,64%)	4 (5,80%)	-
Haplotype Quintuple Mutant	00 (0,00%)	9 (11,11%)	1 (1,45%)	-

**Notes** : Les détails des différentes formes alléliques du gène *K13 propeller* dans les isolats de sang, de salive et d'urine sont décrits respectivement dans les annexes 12, 13 et 14 (**Annexes 12, 13 et 14**).

"N" représente le nombre d'isolats séquencés par produit biologique.

Le test  $\chi^2$  n'a pas pu être effectué du fait des valeurs inférieures à 5 dans plusieurs cellules

### **III-1-4- Etude de la relation entre les produits biologiques : Cas de la résistance à la pyriméthamine avec le gène *pfdhfr***

Le test Kappa de Cohen a été utilisé pour apprécier la concordance entre les produits biologiques (salive/urine) pour l'étude moléculaire de la chimiorésistance aux antipaludiques.

#### **III-1-4-1- Rélation entre le sang et la salive pour la détection de la mutation Ser-108-Asn**

Le coefficient kappa de Cohen par rapport à la salive ( $K_{\text{salive}}$ ) a été calculé à partir des valeurs d'un tableau de contingence (**Tableau XVIII**).

Le  $K_{\text{salive}}$  obtenu après calcul est égal à 0,63 ( $K_{\text{salive}} = 0,63$ ).

Ce résultat indique que le degré d'accord entre le sang et la salive pour la détection de la mutation Ser-108-**Asn** est bon.

Ainsi, alternativement au sang, la salive peut être utilisée comme produit biologique pour étudier la résistance à la pyriméthamine à partir du gène *pfdhfr* de *Plasmodium falciparum*.

**Tableau XVIII** : Tableau de contingence pour le calcul du coefficient kappa de Cohen par rapport à la salive ( $K_{\text{salive}}$ )

Haplotype Ser-108-Asn du gène <i>pdfhr</i>		SALIVE		TOTAL
		Sauvage	Mutant	
SANG	Sauvage (n=10)	6	4	10
	Mutant (n=48)	2	46	48
TOTAL		8	50	58
Coefficient kappa de Cohen ( $K_{\text{salive}}$ )				0,63

### **III-1-4-2- Relation entre le sang et l'urine pour la détection de la mutation Ser-108-Asn**

Le coefficient kappa de Cohen par rapport à l'urine ( $K_{urine}$ ) a été calculé à partir des valeurs d'un tableau de contingence (**Tableau XIX**).

Le  $K_{urine}$  obtenu après calcul est égal à 0,10 ( $K_{urine} = 0,10$ ).

Ce résultat indique que le degré d'accord entre le sang et l'urine pour la détection de la mutation Ser-108-**Asn** est mauvais.

Ainsi, l'urine n'est pas une bonne alternative au sang pour étudier la résistance à la pyréméthamine à partir du gène *dhfr* de *Plasmodium falciparum*.

**Tableau XIX** : Tableau de contingence pour le calcul du coefficient kappa de Cohen par rapport à l'urine ( $K_{urine}$ ).

Haplotype Ser-108-Asn du gène <i>pfdhfr</i>		URINE		
		Sauvage	Mutant	TOTAL
SANG	Sauvage (n=10)	2	8	10
	Mutant (n=36)	4	32	36
TOTAL		6	40	46
Coefficient kappa de Cohen ( $K_{urine}$ )				0,10

### **III-1-5- Etude du polymorphisme des gènes *pfdhfr*, *pfcr* et *pfK13 propeller* à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé**

#### **III-1-5-1- Prévalence de la mutation Asn-108 du polypeptide du gène *pfdhfr***

Sur l'ensemble des trois sites, les fréquences les plus élevées de la mutation Ser-108-Asn déterminées dans le sang et l'urine ont été observées à 68,97% et 100% respectivement à Anonkoua-kouté et à 83,33% et 73,08% respectivement à Ayamé (**Tableau XX**). Pour la même mutation, les plus fortes fréquences déterminées dans la salive ont été enregistrées à Anonkoua-kouté (95,24%) et Port-Bouët (84,21%).

L'analyse ne révèle aucune différence significative entre les fréquences de Ser-108-Asn déterminées à partir des isolats issus d'Anonkoua-kouté, de Port-Bouët et d'Ayamé dans le sang ( $p = 0,344$ ). Cependant, il y a une différence significative entre les fréquences de la mutation Ser-108-Asn mesurées dans la salive ( $p = 0,036$ ) (**Tableau XX**). Pour la même mutation, une différence significative a également été observée entre les fréquences mesurées dans l'urine ( $p = 0,000$ ).

#### **III-1-5-2-Prévalence de la mutation Cys-580-Tyr du polypeptide du gène *pfK13 propeller***

Aucune mutation Cys-580-Tyr n'a pas été observée à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé (dans le sang) (**Tableau XX**). Les fréquences de la souche sauvage Cys-580 observées à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé ont été respectivement 93,33%, 90,63% et 90,32% dans le sang, 51,85%, 17,85% et 84,21% dans la salive et 80%, 22,72% et 57,14% dans l'urine (**Annexe 16**). Aucune différence significative n'a été observée entre les fréquences de la souche sauvage déterminées à partir des isolats issus d'Anonkoua-Kouté, de Port-Bouët et d'Ayamé dans le sang ( $p = 0,899$ ). Les seules différences significatives concernent les proportions de la souche sauvage Cys-580 déterminées à partir des isolats salivaires et urinaires issus des trois sites. ( $p < 0,05$  et  $p = 0,000$  respectivement).

**Tableau XX :** Prévalence des mutations Asn-108 du polypeptide du gène *pfdhfr* et Tyr-580 du polypeptide du gène *K13 propeller* à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé.

<b>Gène <i>pfdhfr</i></b>				
<b>Asn-108</b>	<b>Anonkoua-kouté</b>	<b>Port-Bouët</b>	<b>Ayamé</b>	<b>p du test-<math>\chi^2</math></b>
Sang	20/29 (68,97%)	15/22 (68,18%)	25/30 (83,33%)	0,344
Salive	20/21 (95,24%)	16/19 (84,21%)	15/23 (65,22%)	0,036
Urine	12/12 (100%)	2/10 (20%)	19/26 (73,08%)	0,000
<b>Gène <i>pfK13 propeller</i></b>				
<b>Tyr-580</b>	<b>Anonkoua-kouté</b>	<b>Port-Bouët</b>	<b>Ayamé</b>	<b>p du test-<math>\chi^2</math></b>
Sang	0/30 (0,00%)	0/32 (0,00%)	0/32 (0,00%)	-
Salive	0/27 (0,00%)	0/28 (0,00%)	1/19 (5,26%)	-
Urine	0/30 (0,00%)	0/22 (0,00%)	1/14 (7,14%)	-

**Note :** Les fréquences de la souche sauvage Ser-108 et des autres mutations sont décrites en annexe (**Annexe 15**). Celles de la souche sauvage Cys-580 et des autres allèles mutants sont décrites en annexe (**Annexe 17**).

Le test  $\chi^2$  n'a pas pu être effectué du fait des valeurs inférieures à 5 dans certaines cellules

### **III-1-5-3- Prévalence de la mutation Thr-76 du polypeptide du gène *pfcr***

Aucune mutation Thr-76 (Lys-76-Thr) n'a été observée dans le sang à Anonkoua Kouté tandis que cette mutation était portée par 31,25% et 25% des séquences des isolats issus respectivement de Port-Bouët et Ayamé. Les fréquences les plus importantes de la mutation Thr-76 ont été déterminées dans le sang à Port-Bouët (31,25%) et Ayamé (25 %) (**Tableau XXI**).

Par ailleurs, dans le sang, la souche sauvage Lys-76 a été observée à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé respectivement à 60,71%, 62,50% et 65%. Aucune différence significative n'a été observée entre les fréquences de cette souche sauvage Lys-76 à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé ( $p=0,955$ ).

**Tableau XXI :** Prévalence des souches sauvages Lys-76 et mutantes Thr-76 du gène *pfcr* à Anonkoua-Kouté, Port-Bouët et Ayamé

Souches	Sang						
	Anonkoua-Kouté (n = 28)		Port-Bouët (n = 16)		Ayamé (n = 20)		p du test- $\chi^2$
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)	
Lys-76	17	60,71	10	62,50	13	65	0,955
<b><u>Thr-76</u></b>	00	0,00	5	31,25	5	25	-

**Note :** Les fréquences des autres mutations au niveau du codon 76 sont décrites en annexe. (**Annexe 16**). La mutation Lys-76-Thr n'a pas été observée dans la salive et l'urine.

"n" représente le nombre d'isolats séquencés par produit biologique.

Le test  $\chi^2$  n'a pas pu être effectué du fait des valeurs inférieures à 5 dans certaines cellules

## III-2- DISCUSSION

### III-2-1- Performance de détection de l'ADN plasmodial dans la salive, les urines et le sang

Les outils de diagnostic du paludisme développés à ce jour nécessitent tous un prélèvement de sang. Cependant, certains groupes dans la population coopèrent peu au prélèvement de sang du fait de leurs habitudes culturelles (tabou du sang) ; ou de la peur liée au traumatisme de la piqûre surtout lorsque ce prélèvement est répété. Pour lever les obstacles liés à la problématique du prélèvement de sang, il est nécessaire de réfléchir à des méthodes palliatives à utiliser pour répondre à tous les besoins de diagnostic et d'étude de la chimiorésistance.

Cette étude a porté sur une analyse comparée des produits d'amplification des extraits d'ADN urinaires, salivaires et sanguins dans la perspective de trouver une alternative au prélèvement de sang dans le diagnostic moléculaire du paludisme et l'étude des marqueurs génétiques de la résistance aux antipaludiques. Ainsi, l'analyse basée sur la présence ou non de produits d'amplification de l'ADN de *Plasmodium falciparum* extrait à partir du sang, des urines et de la salive de sujets atteints de paludisme simple a montré que l'ADN génomique extrait à partir de ces produits biologiques peut être amplifié à des proportions variables selon le produit biologique. En effet, malgré les faibles taux de produits d'amplification d'ADN plasmodial dans les urines (28,01%) et la salive (41,13%) comparativement au sang (91,84%), ces deux produits biologiques (urines et salive) semblent présenter un réel potentiel pour l'étude des gènes de résistance aux antipaludiques. Ces taux bien que plus faibles sont proches de ceux rapportés par **Zahra et al, (2014)** en Iran (95,8%, 47% et 29% respectivement dans le sang, salive et l'urine) où le niveau de transmission est similaire. Ces résultats concordent avec ceux de **Mharakurwa et al, (2006)** en Zambie et **Nwakanma et al, (2009)** en Gambie qui suggèrent que la sensibilité des méthodes moléculaires pour la détection du paludisme dans la salive et l'urine est affectée par plusieurs facteurs, à savoir les méthodes d'extraction d'ADN, la taille du gène cible, la fraction d'échantillon et la conservation de l'échantillon (**Kwannan, 2014**). Ces chercheurs ont rapporté qu'une extraction d'ADN salivaire avec un kit commercial Qiagen avait un succès d'amplification de 2,6 fois supérieur à celui de l'extraction au Chelex qui a été utilisé dans cette étude. Les faibles taux que nous avons obtenus pourraient ainsi s'expliquer par la méthode utilisée dans cette étude: la méthode Chelex pour l'extraction de l'ADN plasmodial.

Le faible taux d'amplification dans la salive et l'urine peut aussi s'expliquer par le fait que l'ADN plasmodial dans ces produits biologiques est insuffisant pour fournir un modèle

d'amplification utile. En effet, il existerait une perméabilité sélective pour les fragments d'ADN du parasite. Les membranes des muqueuses, telles que la muqueuse buccale et la doublure épithéliale de la cavité buccale ou de la vessie, agiraient comme des filtres qui permettent le passage de certains constituants parasitaires en dehors du parasite entier (**A-Elgayoum et al., 2010**). En outre, l'ADN provenant de parasites lysés entrerait passivement dans la salive via le sérum ou dans les phagosomes des macrophages par saignement intra-buccal ou par le fluide cervical gingival (**Sutherland & Hallett, 2009**). Par ailleurs, une étude pathologique ultra-structurale du tissu rénal des patients infectés par *P. falciparum* a révélé la présence d'érythrocytes parasités séquestrés dans des vaisseaux glomérulaires et tubulo-interstitiels (**Nguansangiam et al., 2007**) et aussi des complexes immuns comprenant des antigènes IgG, C3 et malariques (**Das, 2008**). La libération d'ADN plasmodial dans l'urine pourrait être un phénomène général qui se produit au cours de l'infection. Cependant, étant donné que l'ADN de *Plasmodium* peut être libéré dans l'urine via diverses voies possibles, la voie d'entrée réelle n'a pas encore été définie avec précision (**Kawai et al., 2014**). Bien que l'ADN de *Plasmodium falciparum* ait été détecté dans les échantillons de salive et d'urine avec succès, les mécanismes précis par lesquels les traces d'ADN du parasite apparaissent dans la salive et l'urine doivent faire l'objet d'une étude plus approfondie.

Toutefois, la détection ou non des gènes *pfcr1*, *pfdhfr* et *pfK13 propeller* dans chaque produit biologique a montré que les trois gènes étaient détectables dans le sang et la salive tandis que seuls deux de ces gènes (*pfdhfr* et *pfK13 propeller*) étaient détectables dans l'urine. Ces résultats suggèrent que contrairement à l'urine, le sang et la salive sont des échantillons biologiques appropriés permettant la détection des gènes *pfdhfr* et *pfK13 propeller* pour les études de surveillance de la résistance aux antipaludiques. Des études antérieures utilisant des amorces spécifiques de gènes de résistance aux antipaludiques ont montré que les gènes détectés dans des échantillons de salive ou d'urine étaient identiques à ceux trouvés dans le sang périphérique du même individu (**Mharakurwa et al., 2006 ; Nwakanma et al., 2009 ; Putaporntip et al., 2011**). Ceci permet d'envisager l'urine et la salive comme produits biologiques pour le diagnostic moléculaire du paludisme.

Les résultats de l'analyse statistique multivariée a montré qu'il existe une corrélation entre les produits biologiques et la détection des gènes dans la salive, l'urine et le sang. Cette analyse a permis de mettre en évidence les groupes de gènes (i) *pfK13 propeller*, *pfdhfr* et *pfcr1* et (ii) *pfK13 propeller* et *pfdhfr* détectés respectivement dans le sang et la salive comme système satisfaisant pour discriminer la population d'étude. Les différentes analyses en composante principale combinées à l'analyse des tableaux VIII et IX ont permis de montrer

l'urine comme l'une des sources principales de variabilité dans la population d'étude (patients atteints de paludisme simple) contrairement à la salive et au sang. Ces résultats ont indiqué également que les gènes *pfK13 propeller* et *pfdhfr* détectés dans l'urine sont les deux facteurs qui expliqueraient plus de 95% de la variabilité observée entre les patients atteints de paludisme. Aussi, les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que contrairement à l'urine, la salive présente des taux d'amplification de gènes proches de ceux du sang. En plus, l'analyse biplot combinant les deux composantes principales (PC1 et PC2) indique que le niveau de détection des gènes *pfK13 propeller* et *pfdhfr* dans la salive est similaire à celui du gène *pfcr* dans le sang. Aussi, l'analyse biplot tend à suggérer les mêmes performances entre le sang et la salive en termes de détection des gènes de résistance aux antipaludiques. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse statistique de la corrélation de Pearson qui a dans le même temps mis en évidence une corrélation négative des composantes de l'urine vis-à-vis de ceux du sang et de la salive.

Tous ces résultats montrent que la salive pourrait être la meilleure alternative au sang pour la détection des gènes de résistance aux antipaludiques. Ces résultats sont similaires à ceux de **Kwanna (2014)** qui a observé que la détection moléculaire de l'ADN plasmodial chez des sujets paludéens dans l'urine était moins sensible que dans la salive (**Kwanna, 2014**). Ceci serait lié à la faible quantité de matrice d'ADN dans l'urine par rapport à la salive et au sang. La PCR quantitative en temps réel relève que la quantité moyenne d'ADN plasmodial dans le sang était 600 et 2500 fois plus élevée que celle dans la salive et l'urine respectivement (**Nwakanma et al., 2009**).

La densité parasitaire (DP) a ensuite été intégrée comme outil de contrôle dans la détection des marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques. Ainsi, l'analyse a montré une faible sensibilité du paramètre densité parasitaire dans le diagnostic moléculaire du paludisme basé sur la détection des gènes. En outre, la moyenne des densités parasitaires des différents sites d'étude a été supérieure à 500 parasites/ $\mu$ L de sang ; seuil en deçà duquel l'effet de la densité parasitaire est perceptible dans le diagnostic moléculaire du paludisme (**Bousema et al., 2014**). Ces résultats suggèrent que la détection des gènes *pfKk13 propeller* et *pfdhfr* dans la salive est peu corrélée à la densité parasitaire (DP). Toutefois, la DP affiche les mêmes tendances en termes de corrélation de Pearson vis-à-vis du sang et de la salive contrairement à l'urine. Cet autre résultat confirme que la salive peut être utilisée comme une bonne alternative au sang pour la détection des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques.

Selon les résultats de l'analyse ROC (receiver operational characteristic), contrairement à l'urine, la salive présente de meilleurs paramètres de précision, de spécificité et de prédiction positive confirmant ainsi la haute performance et/ou la tendance de la salive à se substituer au sang dans le diagnostic moléculaire du paludisme (basé sur la détection des gènes de résistance aux antipaludiques). Lorsque le sang était considéré comme référence, les trois gènes *pfK13 propeller*, *pfdhfr* et *pfprt* détectés dans la salive semblaient bien prédire l'infection du paludisme (valeur prédictive positive > 0,80). En outre, l'analyse ROC a confirmé la détection des gènes *pfK13 propeller* et *pfdhfr* dans la salive en tant qu'outil moléculaire efficace pouvant discriminer les patients atteints de paludisme en alternative à l'échantillon de sang. Finalement, l'analyse a indexé la présence de *pfdhfr* dans la salive comme le meilleur paramètre prédisant positivement l'infection du paludisme dans la population d'étude lorsque l'échantillon de sang a été considéré comme référence.

### **III-2-2-Surveillance de la chimiorésistance à la sulfadoxine-pyriméthamine, à la chloroquine et aux dérivés de l'artémisinine**

Après avoir étudié la performance diagnostique du paludisme dans le sang, la salive et l'urine, il était important d'étudier le polymorphisme des gènes détectés dans ces produits biologiques pour mieux apprécier une éventuelle utilisation de la salive et/ou l'urine pour l'étude de la chimiorésistance aux antipaludiques.

#### **III-2-2-1-Surveillance de la chimiorésistance à la sulfadoxine-pyriméthamine**

Cette étude indique qu'en 2015, la fréquence de la mutation Ser-108-Asn (Asn-108) a été importante aussi bien dans la salive (79,36%) et l'urine (68,75%) que dans le sang (74,07%) chez les patients atteints de paludisme simple. Ces résultats consolident ceux de la performance diagnostique de la salive et l'urine préalablement présentés dans la partie qui concerne l'étude de la performance de détection de l'ADN plasmodial dans les trois produits biologiques (sang, salive et urine). En outre, la mutation Asn-108 a été observée à un même niveau de fréquence à Anonkoua-kouté (68,96%), Port-Bouët (68,16%) et Ayamé (83,33%). Ces données pourraient s'expliquer par la présence d'isolats de *P. falciparum* potentiellement pyriméthamino-résistants.

La fréquence de cette mutation dans les isolats sanguins est plus élevée que celles obtenues en 2008 à Anonkoua-Kouté à Abidjan (49%) et Ayamé (54%) dans des isolats sanguins issus d'individus présentant des symptômes du paludisme (Ako *et al.*, 2014). D'autres proportions

plus faibles ont été obtenues par d'autres auteurs en 2001 (50%) et 2006 (46,4%) à Yopougon à Abidjan (**Djaman et al., 2002 ; Djaman et al., 2010**) et à Adzopé (35,4%) en 2010 (**Ouattara et al., 2010**). En outre, une étude de la dynamique des marqueurs a indiqué que la prévalence de la mutation Ser-108-Asn avait augmenté significativement à Anonkoua-kouté entre 2002 et 2008 avec une moyenne de 43% (**Ako et al., 2012 ; Ako, 2014**). Au regard de tous ces résultats, la fréquence de la mutation Asn-108 a beaucoup augmenté dans cette partie du pays. Ce constat est aussi important parce que l'association sulfadoxine-pyriméthamine est encore en circulation parce que préconisée dans le traitement préventif intermittent chez la femme enceinte en Côte d'Ivoire (**MSHP, 2013**). Malgré son interdiction dans le traitement curatif des accès palustres, la SP pourrait encore être utilisée par une frange de la population à Anonkoua-kouté, Port-Bouët et Ayamé et peut être même dans d'autres communes (**Granado et al., 2009 ; Granado et al., 2011**). Les données obtenues pourraient aussi s'expliquer par un recours plus accru à la SP (**Tinto et al., 2007**) au niveau des marchés parallèles du fait du retrait effectif de la chloroquine. Un tel recours à la SP pourrait s'expliquer par des pratiques thérapeutiques comme l'automédication (**Dossou-Yovo et al., 2001**) favorisée par un accès facile à la molécule déjà disponible dans le pays bien avant 1996 (**Henry et al., 1996 ; Henry et al., 2002**). En effet, **Min (2012)** indique que les couches les plus défavorisées de la population préfèrent se tourner vers les marchés parallèles pour se procurer la SP et la CQ qui demeurent des molécules antipaludiques bon marché (**Min, 2012**). Selon **Granado et al. (2009 et 2011)** et **Orostegui et al. (2011)**, les marchés parallèles sont nombreux dans les quartiers précaires retrouvés dans les grandes villes comme Abidjan ou San-Pedro en Côte d'Ivoire (**Granado et al., 2009 ; Granado et al., 2011, Orostegui et al., 2011**). Près de 45 points de vente illicites de produits pharmaceutiques y compris divers antipaludiques ont été dénombrés dans ce type de quartiers à Abidjan en 2005 (**Granado et al. 2011**). Le faible pouvoir d'achat des populations est à l'origine du recours aux détaillants non officiels (**Kizito et al. 2012**). Elles ne peuvent pas se procurer les CTA recommandées dans la prise en charge du paludisme. Cette utilisation non contrôlée de la SP pourrait favoriser le maintien d'une forte pression médicamenteuse à l'origine de la sélection de parasites résistants à Anonkoua-kouté, Port-bouët et Ayamé.

Ailleurs en Afrique sub-saharienne, des taux élevés ont été trouvés. En effet, les résultats de la surveillance de la chimiorésistance de *P. falciparum* ont donné les résultats suivants : au Burkina Faso, le taux de la mutation Asn-108 rapporté était de 63,8% (**Somé et al., 2016**), 51,7% au Gabon avec la présence de mutant *dhfr*-Thr-108 très rare (**Mawili et al., 2001**) ; 33% en Afrique du sud (**Jelinek et al., 2002b**).

A l'instar de la mutation Asn-108, des mutations additionnelles (Asn-51-Ile et Cys-59-Arg) ont été mises en évidence. Toutes les mutations au niveau des codons 51 et 59 ont été associées à celle du codon 108. Les parasites portant ces mutations additionnelles Asn-51-Ile et Cys-59-Arg associées à la mutation Ser-108-Asn ont une résistance à la pyriméthamine 2000 fois plus élevée que ceux portant la mutation Ser-108-Asn seul (**Biswas *et al.*, 2000 ; Gregson & Plowe, 2005**).

Par ailleurs, au niveau des trois produits biologiques, il n'y a pas de différence significative entre les fréquences des génotypes triples mutants IRN (31,4 % dans les isolats de sang, 31,34% dans les isolats salive et 25 % dans les isolats d'urine) d'une part et entre celles des génotypes sensibles NCS (13,96 % dans les isolats de sang, 7,46% dans les isolats salive et 13,46 % dans les isolats d'urine) d'autre part.

Par rapport aux fréquences de 17,33 % et 27,27% rapportées par Ako respectivement pour l'ensemble des sites de Dabakala, Anonkoua-Kouté, Ayamé (**Ako *et al.*, 2012 ; Ako, 2014**) et des sites de Bonoua et Samo (**Ako *et al.*, 2012**), la fréquence du triple mutant IRN a connu une augmentation par rapport à la souche sensible (NCS).

### **III-2-2-2-Surveillance de la chimiorésistance à la chloroquine**

En ce qui concerne le gène *pfcr*, des travaux antérieurs réalisés en Afrique de l'ouest et particulièrement en Côte d'Ivoire ont montré une corrélation marquée entre la mutation Thr-76 et les échecs thérapeutiques d'une part et entre la mutation Thr-76 et la chimiorésistance *in vitro* des isolats de *P. falciparum* à la chloroquine (**Djaman *et al.*, 2007 ; Figueredo *et al.*, 2008 ; Bridges *et al.*, 2009**) d'autre part.

Les résultats obtenus ont montré que la mutation Lys-76-Thr (Thr-76) est associée aux mutations Met-74-Ile (Ile-74) et Asn-75-Glu (Glu-75) dans les isolats sanguins à de très faibles proportions par rapport à celles des souches sauvages Lys-76, Met-74 et Asn-75.

La mutation Thr-76 n'a pas été observée dans le sang à Anonkoua Kouté tandis qu'elle (mutation Thr-76) a été observé à Port-Bouët et Ayamé respectivement à 31,25% et 25%. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus par Djaman et collaborateurs (54% et 65%) à yopougon en 2000 et 2006 (**Djaman *et al.*, 2007 ; Djaman *et al.*, 2010**), par Ouattara et collaborateurs à Adzopé (62%) en 2010 (**Ouattara *et al.*, 2010**) et par Ako et collaborateurs à Bonoua (100%) et Samo (95%) en 2005 (**Ako *et al.*, 2012**). Cependant, nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Gharbi et collaborateurs (2013) qui ont rapporté en 2013 une diminution de la fréquence de l'allèle Thr-76 de 63% à 37% en Côte d'Ivoire entre 2000 et 2011 (**Gharbi *et al.*, 2013**).

En principe, la fréquence de la mutation Thr-76 devrait diminuer parce qu'il a été prouvé que les parasites qui portent la souche sauvage Lys-76 ont un avantage de survie en l'absence de pression médicamenteuse (**Laufer & Plowe, 2004**). En effet, lorsque la pression médicamenteuse est faible, la résistance au médicament s'accompagne d'une réduction des performances génétiques des parasites résistants par rapport aux parasites sensibles (**Gadalla et al., 2010 ; Ord et al., 2007**). Ainsi, lors de l'arrêt de la pression médicamenteuse, la proportion de parasites sensibles augmente et celle des parasites résistants diminue (**Kublin et al., 2003**), ce qui entraîne le rétablissement de l'efficacité de l'antipaludique concerné (**Duraisingh & Cowman, 2005 ; Hayward et al., 2005**).

La faible fréquence qui a été observée pour les isolats portant la mutation Thr-76 pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs dont le principal est l'effectivité de la politique d'abandon de la CQ en Côte d'Ivoire. En effet, il convient de noter que la CQ était toujours prescrite et/ou délivrée pour le traitement du paludisme non compliqué jusqu'en 2007 (**Kiki-barro et al., 2004 ; Yavo et al., 2009**). Ce n'est qu'à cette date qu'un arrêté ministériel a formellement interdit la vente de la CQ comme antipaludique (**MSHP, 2007**). Il fallait donc attendre quelques années pour observer une éventuelle baisse significative du taux d'isolats de *P. falciparum* chloroquinorésistants. Ainsi, les pouvoirs publics ont dû intensifier les campagnes de sensibilisation afin d'informer la population et le personnel soignant, et entreprendre des actions de lutte contre la vente illicite des antipaludiques sur les marchés parallèles (médicaments de rue). Toutes ces actions ont fini par rendre effectif le retrait de la CQ qui serait à la base de la baisse de la fréquence des parasites résistants à la CQ. En plus, le contrôle effectué par le gouvernement sur les modes de distribution pharmaceutique et les chaînes d'approvisionnement des médicaments dans les secteurs public et privé a un impact sur le recours à des médicaments non recommandés comme la CQ (**Talisuna et al., 2012 ; Tougher et al., 2012**). Par exemple, le Malawi, qui a mis en place des campagnes d'information nationales réussies et un contrôle efficace des modes de distribution des médicaments, a pu interdire complètement l'utilisation de la CQ et montrer, après 10 ans, une réémergence complète de la sensibilité à la CQ (**Laufer et al., 2006**). En outre, la prévalence globale du paludisme, la distance entre les patients et les établissements de santé publique, le niveau socioéconomique, l'âge et les migrations des patients ont également été identifiés comme facteurs clés du recours à la CQ (**Baxerres & Le Hesran, 2008 ; Gardella et al., 2008**).

Ces fréquences de la mutation Thr-76 à Port-Bouët et Ayamé pourraient être liées aux effets des mouvements migratoires des populations vers ces localités. En effet, ces deux localités

sont caractérisées par une forte activité agroéconomique (élevage, agriculture, pêche) avec de nombreux cours d'eau, de vastes exploitations agricoles qui attirent de nombreuses forces vives nationales et sous-régionales. Ces populations occupent majoritairement les villages (Ayamé) et les nombreux quartiers précaires (Port-Bouët) où la plupart des ménages n'ont souvent pas accès à l'information nationale les privant ainsi des campagnes de sensibilisation pour l'abandon de la CQ. Ainsi, ces ménages optent pour des traitements antipaludiques sans consultation (automédication) maintenant ainsi une pression médicamenteuse (**Kouadio *et al.*, 2006**). Les populations sous régionales qui migrent vers ces localités peuvent être également des porteurs potentiels de parasites résistants ce qui pourrait expliquer la fréquence de la mutation Thr-76 observée dans ces localités.

Par ailleurs, la baisse de la fréquence de souches portant le gène *pfcr1* triple mutant indique qu'il y a une faible proportion de parasites résistants à la chloroquine qui circule à Anonkouakouté, Ayamé et Port-Bouët. Ainsi, le retrait de la chloroquine et l'introduction des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) semblent en faveur d'une réémergence de souches sensibles à la CQ. Cette situation a été aussi observée au Malawi (**Kublin *et al.*, 2003**), premier pays africain à remplacer en 1993 la chloroquine par l'association sulfadoxine-pyriméthamine. Douze ans après son retrait, une étude réalisée en 2005 incluant 210 enfants souffrant d'accès palustre simple traités avec la chloroquine a révélé une efficacité de 99% et aucune mutation affectant le codon 76 n'a été détectée sur 199 isolats analysés. Aujourd'hui, la chloroquine est de nouveau efficace dans ce pays (**Laufer *et al.*, 2006**).

### **III-2-2-3- Surveillance de la chimiorésistance aux dérivés d'artémisinine**

L'un des objectifs de notre étude a été de déterminer la prévalence des principaux allèles du gène *pfK13 propeller* portant les mutations Tyr-493-His (His-493), Arg-539-Thr (Thr-539), Ile-543-Thr (Thr-543), Cys-580-Tyr (Tyr-580) et Met-476-Ile (Ile-476) dont l'implication dans la résistance aux dérivés d'artémisinine en Asie du Sud-Est a été décrite (**Ariey *et al.*, 2014**).

Pour la mutation His-493, les résultats indiquent des fréquences de 1,26%, 6,12% et 4,25% respectivement dans les isolats sanguins, salivaires et urinaires. Pour les mutations Thr-539 et Thr-543, les fréquences observées sont respectivement 3,32% et 0% dans le sang, 1,69% et 2,94% dans la salive et 0% et 1,51% dans l'urine. Les résultats indiquent également de faibles fréquences des mutations Tyr-580 et Ile-476 soit respectivement 0% et 1,29% dans les isolats sanguins, 1,35% et 2,22% dans les isolats salivaires et 1,51% et 4,44% dans les isolats

urinaires. Pour ces mutations du gène *K13 propeller*, de très faibles fréquences ont été observées à de très faibles proportions dans les trois produits biologiques. Contrairement à Ayamé où une faible fréquence de la mutation Tyr-580 a été observée dans les isolats salivaires (5,25%) et urinaires (7,14%), cette mutation Tyr-580 n'a pas été observée à Anonkoua-kouté et Port-Bouët.

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent de très faibles fréquences des mutations associées à la résistance aux dérivés de l'artémisinine. Dans le cadre de notre étude, nous ne pouvons pas conclure que les mutations observées sont associées à la résistance aux dérivés de l'artémisinine. Toutefois, ces résultats méritent d'être confirmés par le séquençage du brin d'ADN complémentaire et aussi par des tests *in vitro* comme le RSA (Ring-stage Survival Assay).

Cependant, nos résultats sont similaires à ceux obtenus dans des études récentes par Taylor et collaborateurs (2014) et Kamau et collaborateurs (2015). Ces auteurs n'ont trouvé aucun des polymorphismes associés à la résistance aux dérivés de l'artémisinine en Afrique subsaharienne (**Kamau et al., 2015, Taylor et al., 2014**). Ces faibles proportions de mutations connues dans le gène *pfK13propeller* sont en faveur de l'efficacité des CTA en Côte d'Ivoire. Ceci est en conformité avec les études antérieures d'essai d'efficacité clinique (phase IV) de l'Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) et Artémether-Luméfántrine (AL) réalisées en Côte d'Ivoire et qui ont montré une bonne efficacité des CTA (**Touré et al., 2008 ; Brice et al., 2010; Babacar et al., 2010; Menan et al., 2011; Touré et al., 2011**). Une surveillance plus attentive de l'évolution de ces marqueurs de résistance est nécessaire dans les régions endémiques du paludisme d'Afrique et particulièrement en Côte d'Ivoire afin d'anticiper les contre-mesures.

Bien que ce travail nous donne un espoir quant à l'utilisation de la salive comme outil de diagnostic moléculaire du paludisme, il présente des limites. En effet, pour la surveillance de la chimirésistance aux dérivés d'artémisinine, nous n'avons pas réalisé la culture *in vitro* comme le RSA et nous n'avons pas fait le séquençage du brin d'ADN complémentaire de nos produits d'amplification. Cette limite du travail nous a amené à ne pas associer les mutations observées à la résistance aux dérivés d'artémisinine.

De plus, les moyens financiers ne nous ont pas permis d'utiliser beaucoup plus d'échantillons pour la réalisation de ce travail. Cette limite ne nous permet pas de conclure sur la situation de la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine au niveau national.

Malgré les résultats obtenus, quelques difficultés ont été rencontrées au cours de ce travail. En effet, le recueil de la salive et de l'urine chez les enfants de moins de deux ans n'a pas été possible. Pour les futures investigations, il serait intéressant d'envisager des protocoles qui permettent de recueillir convenablement ces produits biologiques chez ces enfants car, les enfants de 0 à 5 ans constituent la cible privilégiée du paludisme. En outre, chez certains patients, des difficultés liées à la peur pour le prélèvement de sang ont également été enregistrées. En effet, bien que ces patients aient donné leur consentement pour participer à l'étude, il a été difficile de prélever leur sang parce qu'ils avaient peur de l'aiguille et il était difficile de repérer leurs veines pour effectuer le prélèvement de sang d'où l'intérêt de la recherche d'une alternative au sang pour les études de surveillance de la résistance aux antipaludiques.

## **IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

L'objectif principal de ce travail est d'analyser le polymorphisme des gènes *pfcr*, *pfdhfr*, *pfK13 propeller* dans la salive et l'urine des patients atteints de paludisme simple. Pour cela, la performance de détection des marqueurs génétiques de résistance aux antipaludiques (*pfcr*, *pfdhfr*, *pfK13 propeller*) dans la salive et l'urine a été évaluée avant de déterminer la prévalence des mutations des gènes *pfcr*, *pfdhfr*, *pfK13 propeller* impliqués respectivement dans la résistance à la chloroquine (CQ), à la sulfadoxine pyriméthamine (SP) et aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA).

L'évaluation de la performance de la salive et de l'urine pour la détection des marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques a été faite en comparant les taux d'amplification de l'ADN génomique de *P. falciparum* extrait à partir des urines, la salive et le sang et les taux de détectabilité des gènes *pfcr*, *pfdhfr* et *pfK13 propeller* dans ces produits biologiques. L'analyse a permis d'identifier la salive comme la meilleure alternative au sang pour l'étude des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques.

En prenant le sang comme produit biologique de référence, l'analyse a révélé des taux élevés de produits d'amplification dans la salive que dans l'urine. Aussi, l'étude a-t-elle permis de détecter les gènes *pfcr*, *pfdhfr* et *pfK13 propeller* dans le sang et la salive tandis que le gène *pfcr* n'était pas détectable dans l'urine. En outre, l'analyse statistique multivariée a permis de mettre en évidence les groupes de gènes (i) *pfK13 propeller*, *pfdhfr* et *pfcr* et (ii) *pfK13 propeller* et *pfdhfr* détectés respectivement dans le sang et la salive comme systèmes satisfaisants pour discriminer les patients atteints de paludisme simple. Enfin cette étude suggère que contrairement à l'urine, la salive a une performance de détection des marqueurs de résistance aux antipaludiques comparable à celle du sang et pourrait constituer une bonne alternative au sang pour les études de surveillance de la résistance aux antipaludiques.

En ce qui concerne l'étude du polymorphisme des marqueurs moléculaires de la chimiorésistance, les fréquences des génotypes conférant la résistance à la pyréméthamine, à la chloroquine et aux dérivés d'artémisinine en 2015 ont atteint des niveaux comparables dans les isolats issus des trois produits biologiques (sang, urine et salive). La prévalence des allèles associés à la chimiorésistance de la chloroquine représentés par la mutation Thr-76 du gène *pfcr* a baissé tandis que celle des allèles associés à la chimiorésistance de la pyriméthamine représentés par la mutation *dhfr-ts* Asn-108 a augmenté. L'approche moléculaire de la résistance a permis de noter une augmentation des isolats potentiellement pyriméthamino-résistants malgré le retrait de la SP comme traitement antipaludique de première ligne. Une importante consommation des antipaludiques conventionnels et une pression médicamenteuse

préoccupante à la SP après son remplacement dans la politique nationale de prise en charge du paludisme simple pourraient justifier ces observations.

L'étude a aussi montré une baisse de la prévalence d'isolats mutants de type *pfprt* Thr-76 suggérant ainsi qu'une faible population de parasites résistants à la chloroquine circulerait à Anonkoua-kouté, Ayamé et Port-Bouët. Ainsi, le retrait de la chloroquine et l'introduction des combinaisons thérapeutiques à base de dérivés d'artémisinine (CTA) semblent modifier la situation de la chloroquine en faveur d'une réémergence de son efficacité.

Quant à la chimiorésistance aux dérivés d'artémisinine, l'étude a montré que les allèles du gène *K13 propeller* portant les mutations associées à la résistance aux dérivés d'artémisinine en Asie du Sud-Est ont été observés à de très faibles proportions aussi bien dans les trois produits biologiques que dans les trois sites de prélèvement (Anonkoua-kouté, Port-Bouët et Ayamé). Cependant, ces mutations ne sauraient être corrélées à une résistance de *P. falciparum* aux dérivés d'artémisinine sans analyses complémentaires. Ces faibles proportions des mutations connues dans le gène *pfK13propeller* sont en faveur de l'efficacité des CTA en Côte d'Ivoire.

**En perspectives**, il serait intéressant de poursuivre ce travail dans le sens de :

1. Réaliser une cartographie nationale des marqueurs de la résistance à la CQ et à la SP en Côte d'Ivoire,
2. Déterminer le polymorphisme des gènes *pfdhfr* et *pfdhps* au cours de l'infection palustre placentaire chez les femmes enceintes afin d'analyser l'étendue de la pression de SP au niveau du génome de *P. falciparum*,
3. Réaliser une méta-analyse relative à la dynamique des marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques en Côte d'Ivoire de 2002 à ce jour,
4. Analyser les signatures laissées par les pressions de sélection à la SP et à la CQ sur le génome de *Plasmodium falciparum* en Côte d'Ivoire.
5. Optimiser les méthodes pour le diagnostic du paludisme avec des tests de diagnostic rapide (TDR) notamment dans la salive.

## **RECOMMANDATIONS**

### **Aux populations**

Il est impératif d'avoir une bonne hygiène domiciliaire et environnementale afin de supprimer les gîtes larvaires. L'utilisation effective de la moustiquaire imprégnée d'insecticide surtout chez les enfants et les femmes enceintes permettra de réduire la morbidité et la mortalité imputables au paludisme. Par ailleurs, il faut éviter le recours à l'automédication surtout lorsqu'il s'agit d'un enfant de moins de 5 ans et d'une femme enceinte. Enfin, la bonne observance des traitements antipaludiques permettra de préserver leur efficacité.

### **Au personnel de santé**

Il doit assurer une prise en charge correcte des cas de paludisme en prescrivant des antipaludiques efficaces à doses correctes. Le personnel de santé doit également éduquer et sensibiliser les populations au respect des schémas thérapeutiques et à l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides.

### **Aux autorités politiques, administratives et sanitaires**

Les autorités politiques et sanitaires doivent renforcer les campagnes de sensibilisation afin d'informer la population et le personnel soignant sur le respect de la politique nationale de prise en charge thérapeutique du paludisme. Elles doivent entreprendre des actions de lutte contre la vente illicite des antipaludiques et aider à assainir le cadre de vie des citoyens par l'aménagement de l'environnement et la collecte des ordures.

### **Au programme national de lutte contre le paludisme (PNLP)**

Le programme doit renforcer et améliorer le système de surveillance de l'évolution des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques en Côte d'Ivoire. Il lui incombe de renforcer en équipements de laboratoire les centres de recherches comme celui de l'Unité de Paludologie de l'IPCI qui ont en charge la surveillance épidémiologique de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques.

### **A l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI)**

Il faut renforcer le plateau technique de l'Institut Pasteur et accorder à l'unité de paludologie les moyens conséquents pour étendre les travaux de recherches sur l'épidémiologie moléculaire de la résistance aux antipaludiques à l'ensemble des sites sentinelles du pays. Il

peut contribuer à la mise en place d'une base de données sur les niveaux de résistance en Côte d'Ivoire. L'Institut Pasteur doit également organiser des conférences institutionnelles pour informer la communauté scientifique de l'intérêt de l'épidémiologie moléculaire dans la recherche sur les pathologies tropicales.

# **V-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abdullah N.R., Furuta T., Taib R., Kita K., Kijima S., Wah J., 1996.-** Development of a new diagnostic method for *Plasmodium falciparum* infection using a reverse transcriptase polymerase chain reaction. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 54: 162-163.
- Adja A.M., N'goran E.K., Koudou B.G., Dia I., Kengne P., Fontenille D., Chandre F., 2011.-** Contribution of *Anopheles funestus*, *An. gambiae* and *An. nili* (Diptera: Culicidae) to the perennial malaria transmission in the southern and western forest areas of Côte d'Ivoire. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 105: 13-24.
- Adl S.M., Simpson A.G., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., 2005.-** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52: 399-451.
- Admin A., 2008.-** Routine urinalysis normal laboratory study values. Nursing news and blog 2008. Disponible sur : <http://nursingcrib.com>.(Consulté le 30 septembre 2016)
- Adugu I.S., Dias F., Pinheiro L., Rombo L., Warhurst V., 1996.-** Guinée Bissau: Association of chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* with the Tyr86 allele of the multi-drug-resistance gene *pfmdr1*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90 : 90-91.
- A-Elgayoum S., El-Rayah el A., Giha, H.A., 2010.-** Towards a noninvasive approach to malaria diagnosis: detection of parasite DNA in body secretions and surface mucosa. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*.18 : 148-55.
- A-Elgayoum S.M., El-Feki Ael-K., Mahgoub B.A., El-Rayah el-A., Giha H.A., 2009.-** Malaria overdiagnosis and burden of malaria misdiagnosis in the suburbs of central Sudan: special emphasis on artemisinin-based combination therapy era. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64(1) : 20- 6.
- Afonso A, Hunt P., Cheesman S., Alves C., Cravo P., 2006.-** Malaria Parasites can Develop Stable resistance to Artemisine but lack Mutation in Genes ATPase, TCTP, MDR, CG10. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50 (2) : 480-489.

- Ako A. A. B., Touré O. A., Johansson M., Koné P. L., Nguetta S. A., Hopkin S. C., 2012.-** Molecular analysis of markers associated with chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites from southeastern Côte-d'Ivoire by the time of Artemisinin-based Combination Therapy adoption in 2005. *Infection and Drug Resistance*, 5: 113-120.
- Ako A. B., Toure O. A., Johansson M., Traore R., Gbessi A. E., Coulibaly M. Y., Nguetta S. A., Koné P. L., and Hopkin S. C., 2014.-** Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistant Haplotypes in Asymptomatically and Symptomatically Malaria Infected Individuals in Côte d'Ivoire. *Malaria Chemotherapy Control & Elimination*. 3:1-10.
- Ako A. B., 2014.-** Evolution des résistances à la sulfadoxine-pyriméthamine et à la chloroquine, et analyse de la complexité des infections à *Plasmodium falciparum* Welch (1897) dans quatre localités de la Côte d'Ivoire. *Thèse de doctorat de l'Université Félix Houphouët Boigny, N° 853/2014*. 163p.
- Amaratunga C., Sreng S., Suon S., 2012.-** Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Pursat province, western Cambodia: a parasite clearance rate study. *The Lancet Infectious Diseases*, 12 : 851-8.
- Andersag G., Breitner L., Craig B., Jones R., 1934.-** Quinoline compound and process making the same. *US Patent* ; 22(33) : 970.
- Anonyme, 2014.-** Rapport d'exécution et de présentation des principaux résultats du recensement général de la population et de l'Habitat. *Institut National de la Statistique*, 49p.
- Arregger A.L., Cardoso E.M., Tumilasci O., Contreras L.N., 2008.-** Diagnostic value of salivary cortisol in end stage renal disease. *Steroids*. 73, 77-82.
- Ariey F., Witkowski B., Amaratunga C., 2014.-** A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 13:50–55.
- Asawamahasakda V. & Yuthavong Y., 1993.-** The methionine synthesis cycle and salvage of methyltetrahydrofolate from host red cells in the malaria parasite (*Plasmodium falciparum*). *Parasitology* 107: 1-10.

- Babacar F., Toure O. A., Ndiaye J. L., Tine R. C., Toure W., Djoman K., Sylla K., Ndiaye P. S., Kone P. L., Gaye O., 2010.-** Efficacy and tolerability of artesunate-amodiaquine (Camoquin plus®) versus artemether lumefantrine (Coartem®) against uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: multisite trial in Senegal and Ivory Coast. *Tropical Medicine and International Health*, volume 15 no 5 pp 608–613.
- Babady N.E., Sloan LM., Rosenblatt J.E., Pritt B.S., 2009.-** Detection of *Plasmodium knowlesi* by real-time polymerase chain reaction. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, Sep; 81(3) : 516-8.
- Babiker H., Pringle S., Abdel-Muhsin A., Mackinnon M., Hunt P., Walliker D., 2001.-** High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr* and the multidrug resistance gene *pfmdr1*. *Journal of Infectious Diseases*, 183 : 1535–1538.
- Bannister L.H., Hopkins J.M., Fowler R.E., Krishna S., Mitchell G.H., 2000.-** A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology Today*, 16, 427- 433.
- Basco L.K. & Ringwald P., 1998.-** Molecular epidemiology of malaria in yaoundé, Cameroun.III Analysis of chloroquine resistance and point mutation in the multidrug resistance 1 *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 59(4): 577-581.
- Basco L. & Ringwald P., 2000.-** Drug-resistant malaria: problems with its definition and technical approaches. *Sante*, 10 (1):47-50.
- Basco L.K., 2007.-** Field application of in vitro assays sensitivity of human malaria parasites antimalarial drugs. Geneva : *World Health Organisation Press*. ISBN: 92 4 159515, 978 92 4 159515 5 202p.
- Baudon D., Robert V., Boudin C., Carnevale P., Gazin P., 1984.-** Moyens de lutte antiplasmodiale. *Etudes. Médicales*, 3: 147-164.
- Baxerres C, Le Hesran J.Y., 2008.-** Where do pharmaceuticals on the market originate? An analysis of the informal drug supply in Cotonou. Benin. *Social Science & Medicine*, 73:1249–1256.

- Bessard G., 2002.-** Les antipaludiques. Disponible sur : <http://www-sante.ujf-grenoble.fr/>  
(Consulté le 18 Janvier 2017)
- Bhakuni D.S., Goel A.K., Jain S., Mehrotra B.N., Patnaik G.K., Prakash V., 1988.-** Screening of Indian plants for biological activity: part XIII. *Indian Journal of Experimental Biology*, 26, 883-904.
- Bhakuni D.S., Goel A.K., Jain S., Mehrotra B.N., Srimal R.C., 1990.-** Screening of Indian plants for biological activity: part XIV. *Indian Journal of Experimental Biology*, 28, 619-637.
- Bharti A.R., Letendre S.L., Patra K.P., Vinetz J.M., Smith D.M., 2009.-** Malaria diagnosis by a polymerase chain reaction-based assay using a pooling strategy. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 81(5):754-7.
- Biswas S., Escalante A., Chaiyaroj S., Angkasekwinai P., Lal A., 2000.-** Prevalence of point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from India and Thailand: a molecular epidemiologic study. *Tropical Medicine and International Health*, 5: 737-743.
- Bitonti A., Sjoerdsma A., Mc Cann P., Kyle D., Cincinnati O., 1988.-** Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desipramine. *Science*, 2(242): 1301-3.
- Botezatu I. S.O., Potapova G., Shelepov V., Alechina R., Molyaka Y., 2000.-** Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from dying cells in an organism. *Clinical Chemistry*, 46:1078-84.
- Bousema T., Okell L., Felger I., Drakeley C., 2014.-** Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(12):833-840.
- Bridges D.J., Molyneux M., Nkhoma S., 2009.-** Low level genotypic chloroquine resistance near Malawi's northern border with Tanzania. *Tropical Medicine and International Health*, 14: 1093-1096.
- Brice B.K., William Y., Lacina O., Félix Y., Hugues A., Léonardo B., André M., Joseph D., 2010.-** In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from Abidjan,

Côte d'Ivoire, to artemisinin, chloroquine, dihydroartemisinin and pyronaridine. *Tanzania Journal of Health Research*, 12(1):73 - 9.

**Bruce-Chwatt L.J., Black R.H., Canfield C.G., Clyde D.F., Peters W., Wensdorf W., 1986.-** Chemotherapy of malaria. *WHO Monographs Series*, 2, 27 pp.

**Buppan P.C., Pattanawong U., Seethamchai S., Jongwutiwes S., 2010.-** Comparative detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. *Malaria Journal*; 9(9):72.

**Bryskier A. & Labro M.T., 1988.-** Paludisme et médicaments. *Paris : Arnette Paris*, 276.

**Carnevale P., Robert V., Molez J.F., Baudon D., 1984.-** Faciès épidémiologique des paludismes en Afrique sub-saharienne. *Etudes Medicales*, 3, 123-133.

**Chen N., Russell B., Staley J., Kotecka B., Nasveld P., Cheng Q., 2001.-** Sequence polymorphisms in *pfprt* are strongly associated with chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Journal of Infectious Diseases*, 183 : 1543–1545.

**Chidi A.P., Chishimba S., Kobayashi T., Hamapumbu H., Mharakurwa S., Thuma P.E., Moss W.J., 2011.-** Validation of oral fluid samples to monitor serological changes to *Plasmodium falciparum*: an observational study in southern Zambia. *Malaria Journal*, 10, 162.

**Choi W., 2006.-** DNA in Urine Can Reveal Disease. *Live science*, ET2006: Disponible sur: <http://www.livescience.com> (consulté le 20 juillet 2017).

**Coatney G.R, Brown V., Christie P., Lange J., Henry D.W., 1972.-** Antimalarial arylaminopropanols. *Journal of Medicinal Chemistry*, 15 : 771-775.

**Colin J., Sutherland, Rachel H., 2009.-** Detecting Malaria Parasites outside the Blood. *Journal of Infectious Diseases*, 199 (1) P 1561.

**Colin L., Mallié M., Bastide J. M., 2000.-** Diagnostic rapide du paludisme par la recherche d'antigènes circulants. *Revue Française des Laboratoires*, 319 : 59-64.

- Com-Nougue C., Rodary C., 1987.-** Revue des procédures pour mettre en évidence l'équivalence de deux traitements. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique*, 35, 416 - 430.
- Cook J.D., Caplan Y.H., LoDico C.P., 2000.-** The characterization of human urine for specimen validity determination in workplace drug testing: a review. *Journal of Analytical Toxicology*, 24(7):579-88.
- Cooper R.A., Ferdig M.T., Su X.Z., Ursos L.M.B., Wellem T.E., 2002.-** Alternative mutations at position 76 of the vacuole transmembrane protein *pfcr* are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine response in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Pharmacology*, 61(1): 35-42.
- Cooper W.C., Myatt A.V., Hernandez T., Jeffery G.M., Coatney G.R., 1953.-** Studies in human malaria. XXXI. Comparison of primaquine, isopentaquine, SN-3883, and pamaquine as curative agents against Chesson strain vivax malaria. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 2, 949-957.
- Cordray M.S., Richards-Kortum R.R., 2012.-** Emerging nucleic acid-based tests for point-of-care detection of malaria. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 87, 223-30.
- Corran P.H., Cook J., Lynch C., Leendertse H., Manjurano A., Griffin J., Cox J., Abeku T., Bousema T., Ghani A.C., Drakeley C., Riley E., 2008.-** Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. *Malaria Journal*. 7:195.
- Cowman & Lew A.M., 1990.-** Chromosomal rearrangement and point mutations in the *DHFR-TS* gene of *Plasmodium chabaudi* under antifolate selection. , 42: 21-30.
- Dago D. N., Diarrassouba N., Nguessan K. A., Baba-Moussa L., 2016.-** Computational Statistics Assessing the Relationship between Different Rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens*) Treatments in Cereal Cultivation. *American Journal of Bioinformatics Research.*, 6(1): 1-13 DOI: 10.5923/j.bioinformatics.20160601.01.
- Das B.S., 2008.-** Renal failure in malaria. *Journal of Vector Borne Diseases*. 45, 83-97.
- Day K.P., Hayward R.E., Dyer M., 1998.-** The biology of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Parasitology*, 116 Suppl, S95-109.

- Delacour H., Servonnet A., Perrot A., Vigezzi J.F., Ramirez J.M., 2005.-** La courbe ROC (receiver operating characteristic) : principes et principales applications en biologie clinique. *Annales de Biologie Clinique*. 63 (2) : 145-54.
- De Gentile L., 2008.-** "[Management of malaria for children in France in 2008]." *Archives de pédiatrie*, 15(9): 1507-1512.
- De Iuo X. & Shen C.C., 1984.-** The chemistry, pharmacology and clinical application of quinghaosu: dihydroqinghaosu, artemether and artesunic acid. *Helvetica Chimica*, 67 : 1515-1522.
- De Pina J.J., Garnotel E., Hance P., Vedy S., Rogier C., Morillon M., 2007.-** Diagnosis of imported malaria in France. *Médecine et maladies infectieuses*, 37(11):710-5.
- Denis M. B., R., Tsuyuoka P., Lim N., Lindegardh P., Yi S. N., Top D., Socheat T., Fandeur, A. Annerberg, E. M. Christophel, Ringwald P., 2006.-** "Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia." *Tropical Medicine and International Health*, 11(12): 1800-1807.
- Diourte Y., Djimde A., Doumbo D., Sagara I., Plowe C., 1999.-** Pyrimethamine sulfadoxine efficacy end selection for mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase in Mali. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 60(3): 475-478.
- Djaman A.J., Basco L., Mazabraud A., 2002.-** Mise en place d'un système de surveillance de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à Yopougon (Abidjan) : étude *in vivo* de la sensibilité à la chloroquine et évaluation de la résistance à la pyriméthamine après analyse de la mutation ponctuelle du gène de la dihydrofolate reductase (*dhfr*). *Cahiers Santé*, 12 : 363-7.
- Djaman J. A., Bla B. K., Yavo W., Yapi H. F., Mazabraud A. and Basco L. K., 2007.-** Polymorphism of *PFCRT* and *PFMDR-1* Genes of *Plasmodium falciparum* and Chloroquine Susceptibility in Côte d'Ivoire. *Acta Protozoologica*, 46: 361–365.
- Djaman J., Ahibo H., Yapi H. F., Bla K. B., Ouattara L., Yavo W., N'guessan J. D., Yapo A., Mazabraud A., 2010.-** Molecular Monitoring of *Plasmodium falciparum* Malaria isolates in Côte d'Ivoire: Genetic Markers (*dhfr*-

*ts, dhps, pfprt, pfmdr-1*) for antimalarial-drugs resistance. *European Journal of Scientific Research*, 40: 461-470.

**Djimde A., Doumbo D., Joseph F., Cortes B.S., Plowe C., 2001.-** A molecular marker for chloroquine resistance *P. falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine*, 344(4): 257-263.

**Dondorp A.M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyo A.P., Tarning J., Lwin K.M., Ariey F., Hanpithakpong W., Lee S.J., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich K., Lim P., Herdman T., An S.S., Yeung S., Singhasivanon P., Day N.P., Lindergardh N., Socheat D., White N.J., 2009.-** Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine*, 30;361(5):455-67. PubMed PMID: 19641202.

**Dossou-Yovo J., Amalaman K., Carnevale P., 2001.-** Itinéraires et pratiques thérapeutiques antipaludiques chez les citadins de Bouaké, Cote d'ivoire. *Medecine Tropicale*, 61, 495-499.

**Duraisingh M.T. & Cowman A.F., 2005.-** Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Tropica*. 94: 181-90.

**Eckstein-Ludwig U., Webb R.J., Van Goethem I.D., East J.M., Lee A.G., Kimura M., O'Neill P.M., Bray P.G., Ward S.A., Krishna S., 2003.-** Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 424(6951):957-61.

**Effert T., Romero M.R., Wolf D.G., Stamminger T., Marin J.J.G., Marschall M., 2008.-** The Antiviral Activities of Artemisinin and Artesunate. *Clinical Infectious Diseases*, 47, 804-811.

**Effert T., 2007.-** Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin - From bench to bedside. *Planta Medicine*, 73, 299-309.

**Eliaz k. & Ira B., 2002.-** The diagnostic application of saliva. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2): 197-212.

**Elliott D.A., Mcintosh M.T., Hosgood H.D., Chen S., Zhang G., Baevova P., Joiner K.A., 2008.-** Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite

*Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 105: 2463-2468.

**Eric Stauffer., 1996.-** Trouver des possibilité de test pour la détection d'urine lors de cas d'agression sexuelle. *Séminaire de 2è année à l'Institut de Police Scientifique et de Criminologie à l'Université de Lausanne*, P2-24.

**Eskandarian, 2013.-** Improving Urine Sample Efficacy as a Convenient alternative for Invasive Samples in Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis. *Iranian Journal of Parasitology*, Vol. 8, No.1, Jan-Mar, pp. 177-181.

**Estevez P.T., Satoguina J., Nwakanma D. C., West S., Conway D. J., Drakeley C. J., 2011.-** Human saliva as a source of anti-malarial antibodies to examine population exposure to *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*. 10, 104.

**Feagin J.E., 2000.-** Mitochondrial genome diversity in parasites. *International Journal for Parasitology* , 30: 371-390.

**Fermanian J., 1984.-** Mesure de l'accord entre deux juges. Cas qualitatif. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique*, 32,140-147.

**Ferone R., 1977.-** Folate metabolism in malaria. *Bulletin of the World Health Organization*, 55, 291-298.

**Fidock D., Nomura T., Talley A., Cooper R., Wellems T., 2000.-** Mutations in the *P.falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *Pfcr* and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, 6(4): 861-871.

**Figueiredo P., Benchimol C., Lopes D., Bernardino L., Do Rosario V. E., Varandas L., Nogueira F., 2008.-** "Prevalence of *pfmdr1*, *pfcr*, *pfdhfr* and *pfdhps* mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola." *Malaria Journal* , 7: 236.

**Fitch C.D., 1986.-** Antimalarial schizonticides: Ferriprotoporphyrin IX. Interaction hypothesis. *Parasitology today*, 2: 330-331.

**Floriano P.N., Christodoulides N., Miller C.S., Ebersole J.L., Spertus J., Rose B.G., Kinane D.F., Novak M.J., Steinhubl S., Acosta S., Mohanty S., Dharshan P., Yeh C.K., Redding S., Furmaga W., Mc Devitt J.T., 2009.-** Use of saliva-based nano-

biochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: a feasibility study. *Clinical Chemistry*, 55, 1530-8.

**Footo S.J., Kyle D.E., Martin S.K., Odula A.M., Cowman A.F., 1990.-** Several alleles of multidrug resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*; 345 : 255-258.

**Foroghi parvar F.K.H., Shojaee S., 2008.-** Detection of *Toxoplasma gondii* Antigens in Sera and Urine of Experimentally Infected Mice by Capture ELISA. *Iranian Journal of Parasitology*, 3(1):1-5.

**Frevert U., 2004.-** Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends in Parasitology*, 20, 417-424.

**Frevert U., Usynin I., Baer K., Klotz C., 2008.-** *Plasmodium* sporozoite passage across the sinusoidal cell layer. (D. S.-F. Barbara A Burleigh, Éd.) *Molecular mechanism of parasite invasion*, pp. 183-197.

**Fung A.O., Damoiseaux R., Grundeen S., Panes J.L., Horton D.H., Judy J.W., Moore T.B., 2012.-** Quantitative detection of *PfHRP2* in saliva of malaria patients in the Philippines. *Malaria Journal*. 11, 175.

**Gadalla N.B., Elzaki S.E., Mukhtar E., Warhurst D.C., El-Sayed B., Sutherland C.J., 2010.-** Dynamics of *pfprt* alleles CVMNK and CVIET in chloroquine-treated Sudanese patients infected with *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 9, 1-10.

**Gardella F., Assi S., Simon F., Bogreau H., Eggelte T., Ba F., Foumane V., Henry M.C., Kientega P.T., Basco L., Trape J.F., Lalou R., Martelloni M., Desbordes M., Baragatti M., Briolant S., Almeras L., Pradines B., Fusai T., Rogier C., 2008.-** Antimalarial drug use in general populations of tropical Africa. *Malaria Journal*, 7:124.

**Gardner M.J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R.W., Carlton J.M., Pain A., Nelson K.E., Bowman S., Paulsen I.T., James K., Eisen J.A., Rutherford K., Salzberg S.L., Craig A., Kyes S., Chan M., Nene V., Shallom S.J., Suh B., Peterson J., Angiuoli S., Pertea M., Allen J., 2002.-** Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419, 498-511.

- Gharbi M., Jennifer A. F., Véronique H., Eric K., Jessica E. M., Lionel B., Philippe J. G., Le Bras J., 2013.-** Longitudinal study assessing the return of chloroquine susceptibility of *Plasmodium falciparum* in isolates from travellers returning from West and Central Africa, 2000–2011. *Malaria Journal*, 12:35
- Gluzman I.Y., Francis S.E., Oksman A., Smith C., Duffin K., Goldberg D.E., 1994.-** Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 93: 1602-1608.
- Goldberg D.E., 1992.-** Plasmodial hemoglobin degradation: an ordered pathway in a specialized organelle. *Infectious Agents and Disease*, 1: 207-211.
- Golvan J.Y., 1983.-** Eléments de parasitologie médicale : Paris : 4ème Ed, Flammarion, 571p.
- Granado S., Manderson L., Obrist B., Tanner M., 2011.-** Appropriating “Malaria”: local responses to malaria treatment and prevention in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Medical Anthropology*, 30, 102-121.
- Granado S., Obrist B., Manderson L., Tanner M., 2009.-** 'The moment of sale: Treating malaria in Abidjan, Côte d'Ivoire'. *Anthropology & Medicine*, 16, 319 - 331.
- Greenwood B.M., Fidock D.A., Kyle D.E., Kappe S.H., Alonso P.L., Collins F.H., Duffy P.E., 2008.-** Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *Journal of Clinical Investigation*, 118, 1266-1276.
- Gregson A., Plowe C.V., 2005.-** Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacological Reviews*, 57, 117–145.
- Halidou T., Jean B., Ouédraogo M., Traoré T., Robert G., 2004.-** Attitude à propos de la résistance parasitologique de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques. *Cahier d'étude et de recherches francophones/Santé*; 14(2) : 69-73.
- Hastings M.D., Bates S.J., Blackstone E.A., Monks S.M., Mutabingwa T.K., Sibley C.H., 2002.-** Highly pyrimethamine-resistant alleles of dihydrofolate reductase in isolates of *Plasmodium falciparum* from Tanzania. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, 674-676.
- Hay S.I., Guerra C. A., Gething P. W., Patil A. P., Tatem A. J., Noor A. M., Kabaria C. W., Manh B. H., Elyazar I. R., Brooker S., Smith D.L., Moyeed R. A., Snow R.**

- W., 2009.-** "A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007." *PLOS Medicine*, **6**(3): e1000048.
- Hayward R., Saliba K.J., Kirk K., 2005.-** *Pfmdr1* mutation associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, **55**: 1285-95.
- Henry M.C., Kone M., Gillet P., Mouchet J., 1998.-** Chloroquinorésistance et lutte antipaludique en Côte d'Ivoire. *Sante*, **8** : 287-91.
- Henry M.C., Eggelte A., Watson P., van Leeuwen D., Bakker D.A., Kluin J., 1996.-** Response of childhood malaria to Chloroquine and Fansidar in an area of intermediate Chloroquine résistance in Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and International Health*, **1**, 610-615.
- Henry M., Briolant S., Zettor A., Pelleau S., Baragatti M., Baret E., Mosnier J., Amalvict R., Fusai T., Rogier C., Pradines B., 2009.-** *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 transporter is involved in reduced susceptibility to quinine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(5):1926-30.
- Henry M.C., Niangué J., Koné M., 2002.-** Quel médicament pour traiter le paludisme simple quand la chloroquine devient inefficace dans l'Ouest de la Côte d'Ivoire ? *Médecine Tropicale*, **62** : 55-7.
- Holmgren G., Gil J.P., Ferreira P.M., Veiga M.I., Obonyo C.O., Björkman A., 2006.-** Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria *in vivo* is associated with selection of *pfprt* 76T and *pfmdr1* 86Y. *Infection, Genetics and Evolution*, **6**(309-314).
- Hsu, E., 2006.-** The history of qing hao in the Chinese materia medica. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **100**, 505-508.
- Hu S., Wang J., Meijer J., Jeong S., Xie Y., Yu T., Zhou H., Henry S., Vissink A., Pijpe J., Kallenberg C., Elashoff D., Loo J.A., Wong D.T., 2007.-** Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis and Rheumatism*. **56**, 3588-600.

- Huaman M.C., Yoshinaga K.A.S., Kanbara H., 2004.-** Polymorphisms in the chloroquine resistance transporter gene in *Plasmodium falciparum* isolates from Lombok, Indonesia. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 71: 40-42.
- Hyde J.E., 2002.-** Mechanisms of resistance on *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. *Microbe and infection*. 4 : 165-174.
- Hyde J.E., 2005.-** Drug-resistant malaria. *Trends in Parasitology*, 21(11): 494-8.
- Issa R.M.S.M.A., 2006.-** Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR *Iranian journal of clinical infectious diseases*,1(4):171-5.
- Jackson K. E., Klonis N., Ferguson J.P., Adisa A., Dogovski C., Tilley L., 2004.-** Food vacuole associated eneous lipid environments in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 54: 109-122.
- Jambou R., Le grand E., Niang M., Nimol K., Pharat L., 2005.-** Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolated to *in vitro* artemether and point mutations of the *SERCA-type PfATPase6*. *Lancet*, 366: 1960-1963.
- Jani D., Nagarkatti R., Beatty W., Angel R., Slebodnick C., Andersen J., Kumar S., Rathore D., 2008.-** HDP-a novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PLoS Pathogens*, 4, e1000053.
- Janse C.J., Van Der Klooster P.F., Van Der Kaay H.J., Van Der Ploeg M., Overdulve J.P., 1986.-** DNA synthesis in *Plasmodium berghei* during asexual and sexual development. *Molecular and Biochemical Parasitology* , 20: 173-182.
- Jelinek T., Aida A.O., Hoffman P., Christophel E.M., 2002a.-** Diagnostic value of molecular markers in chloroquine resistance *Plasmodium falciparum* malaria in south Mauritanie. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 67(5): 449-453.
- Jelinek T., Peyerl-hoffman G., Muhlberger N., Wichmann O., Wilhelm M., Schmider N., Grobusch M.P., Von Sonnenburg F., Gascon J., Laferl H., Hatz C., Alifrangis M., Burchard G., Mcwhinney P., Schulze M., Kollaritsch h., Da Cunha S., Beran J., Kern P., Gjorup I., Cuadros J., 2002b.-** Molecular surveillance of drug resistance through imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *Malaria Journal*, 1: 11.

- Kain K.C. & Lanar D.E., 1991.-** Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 29:1171-1174.
- Kaiser K., Matuschewski K., Camargo N., Ross J., Kappe S.H., 2004.-** Differential transcriptome profiling identifies *Plasmodium* genes encoding pre-erythrocytic stage-specific proteins. *Molecular Microbiology*, 51: 1221-1232.
- Kakkilaya B.S., 2003.-** Rapid Diagnosis of Malaria. *Laboratory Medicine*, 8, 602-608.
- Kamau E., Campino S., Amenga-Etego L., Drury E., Ishengoma D., Johnson K., Mumba, Kekre M., 2014.-** *K13-propeller* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasites from sub-Saharan Africa. *Journal of Infectious Diseases*, epub 2014.
- Kamau E., Campino S., Amenga-Etego L., Drury E., Ishengoma D., Johnson K., Mumba D., Kekre M., Yavo W., Mead D., Bouyou-Akotet M., Apinjoh T., Golassa L., Randrianarivelosia M., Andagalu B., Maiga-Ascofare O., Amambua-Ngwa A., Tindana P., Ghansah A., MacInnis B., Kwiatkowski D., Djimde A. A., 2015.-** *K13-Propeller* Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* Parasites From Sub-Saharan Africa. *Journal of Infectious Diseases*, 211:1352–5.
- Kawai Satoru, Megumi Sato, Naoko Kato-Hayashi, Hisashi Kishi, Michael A. Huffman, Yoshimasa Maeno, Richard Culleton, Shusuke Nakazawa., 2014.-** Detection of *Plasmodium knowlesi* DNA in the urine and faeces of a Japanese macaque (*Macaca fuscata*) over the course of an experimentally induced infection. *Malaria Journal*, 13: 373.
- Kaufman E., Lamster I.B., 2002.-** The diagnostic applications of saliva; a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 13, 197-212.
- Kiki-Barro C.P., Konan F.N., Yavo W., Kassi R.R., Menan E.I.H., Djohan V., Kone M., 2004.-** Antimalarial drug delivery in pharmacies in non severe malaria treatment. A survey on the quality of the quality of the treatment: the case of Bouake (Cote d'Ivoire). *Sante* 14: 75-79.
- Kizito J., Kayendeke M., Nabirye C., Staedke S.G., Clare I.R., Chandler, 2012.-** Improving access to health care for malaria in Africa: a review of literature on what attracts patients. *Malaria Journal*, 11, 1-14.

- Kouadio A.S., Cissé G., Brigit Obrist, Kaspar Wyss, Zingsstag J., 2006.-** Fardeau économique du paludisme sur les ménages démunis des quartiers défavorisés d'Abidjan, Côte d'Ivoire. *Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement*; disponible sur <https://vertigo.revues.org/1776t>. consulté le 22 Août 2017
- Krogstad D. J., Gluzman I. Y., Kyle D. E., 1987.-** Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mecanisme of chloroquine resistance. *Science*; 238(4831): 1283-1285.
- Krungskrai J., webster H. K., Yuthavong Y., 1989.-** De novo and salvage biosynthesis of pteroyl pentaglutamates in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 32: 25-38.
- Kublin J.G., Cortese J.F., Njunju E.M., Mukadam R.A.G., Wirima J.J., Kazembe P.N., Djimdé A.A., Kouriba B., Taylor T.E., Plowe C.V., 2003.-** Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *Journal of Infectious Diseases*, 187, 1870-1875.
- Kublin J. G., Dzinjalama F.K., Kamwendo D.D., Malkin E.M., Cortese J.F., 2002.-** Molecular Markers for failure of sulfadoxine Pyriméthamine and chlorproguanil-Dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases*, 185, 380-388-387.
- Kuhn Y., Rohrbach P., Lanzer M., 2007.-** Quantitative pH measurements in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes using pHluorin. *Cellular Microbiology*, 9: 1004-1013.
- Kwannan Nantavisai, 2014.-** Malaria detection using non-blood samples. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 634 36 (6): 633-641.
- Laufer M.K. & Plowe C.V., 2004.-** Withdrawing antimalarial drugs: impact on parasite résistance and implications for malaria treatment policies. *Drug Résistance Updates*, 7, 279-288.
- Laufer M.K., Thesing P.C., Eddington N.D., Masonga R., Dzinjalama F.K., Takala S.L., Taylor T.E., Plowe C.V., 2006.-** Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *The New England Journal of Medicine*, 355:1959–1966.

- Laveran A., 1881.-** Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme. Description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre. *J-B. Baillière et fils*, Paris.
- Le Bras J., 1995.-** La situation de la résistance du paludisme en Afrique. *Médecine Tropicale*, 55 : 9-13.
- Le Bras J., 1999.-** Mécanismes et dynamique de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*. 57 : 23-25.
- Lee K.S., Cox-Singh J., Brooke G., Matusop A., Singh B., 2009.-** *Plasmodium knowlesi* from archival blood films: further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo. *International Journal of Parasitology*, 39, 1125-1128.
- Levine N.D., 1988.-** Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *The Journal of Protozoology*, 35 , 518 - 520.
- Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F.G., 1980.-** A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, 27: 37-58.
- Lim P., Chy S., Ariey F., Incardona S., Chim P., Sem R., 2003.-** *pfcr* Polymorphism and Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Strains Isolated in Cambodia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 47(1): 87-94.
- Lima D.P., Diniz D.G., Moimaz S.A.S., Sumida D.H., Okamoto A.C., 2010.-** Saliva: Reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases*, 14:184-188.
- Long E.G., 2009.-** Requirements for diagnosis of malaria at different levels of the laboratory network in Africa. *American Journal of Clinical Pathology*, 131(6) : 858-60.
- Malvy D., Djossou F., Receveur M.C., Le Bras M., 2000.-** Plasmodies : Traitement, prévention. *Encyclopédie médico-chirurgicale*. Paris : Elsevier 8: 507-525.
- Martin R.E., Kirk K., 2004.-** The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 1938-1949.

- Matuschewski K., 2006.-** Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the Anopheles vector. *Cellular Microbiology*, 8: 1547-1556.
- Mawili Mboumba D.P., Ekala M.T., Lekoulou F., Ntoumi F., 2001.-** Molecular analysis of *DHFR* and *DHPS* genes in *P. falciparum* clinical isolates from the Haut-Ogooué region in Gabon. *Acta Tropica*. 78: 231-240.
- Mazoyer B., Mary J.Y., 1987.-** Le kappa utilisé comme mesure de reproductibilité: distribution sous l'hypothèse nulle. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique*, 35, 474 - 481.
- Menan EI., Yavo W., Oga S.S., Evi J.B., Kiki-Barro P.C., Kassi R.R., Atissou J.F., Kone M., 2007.-** Open randomized study comparing chloroquine and amodiaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children in Aboisso, Côte d'Ivoire. *Médecine Tropicale*, 67, 309-310.
- Menan H., Faye O., Same-Ekobo A., Oga A.S., Faye B., Kiki Barro C.P., Kuete T., N'diaye J.L., Vicky A.M., Tine R., Yavo W., Kane D., Kassi K.F., Kone M., 2011.-** Comparative study of the efficacy and tolerability of dihydroartemisinin- piperazine - trimethoprim versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Cameroon, Ivory Coast and Senegal. *Malaria Journal*, 10:185.
- Meshnick S., 1994.-** The mode of action of antimalarial endoperoxides. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, S31-S32.
- Meunier B., 2000.-** Les trioxaquinés : nouvelles molécules actives contre le paludisme. *Nouvelles scientifiques*; 17 Novembre; 1-11.
- Mharakurwa S., Simoloka C., Thuma P.E., Shiff C.J., Sullivan D.J., 2006.-** PCR detection of *Plasmodium falciparum* in human urine and saliva samples. *Malaria Journal*, 5:103.
- Miguel R.H.; Coura J.R., Samudio F., Suárez-mutis M.C., 2013.-** Evaluation of three different DNA extraction methods from blood samples collected in dried filter paper in *Plasmodium* subpatent infections from the Amazon region in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55(3): 205-8.

- Militao, D.N., Camargo, L.M. and Katzin A.M., 1993.-** Detection of antigens in the urine of patients with acute *Plasmodium vivax* malaria. *Experimental Parasitology* , 76, 115-20.
- Millet P., 2005.-** Quel avenir pour les antipaludiques. Paludisme (Monographie). *La Revue du Praticien*, 55: 875-879.
- Min, H., 2012.-** Mapping the supply chain of anti-malarial drugs in Sub-Saharan African countries'. *International Journal of Logistics Systems and Management*, 11, 1-23.
- Mita T., 2009.-** Origins and spread of pfdhfr mutant alleles in *Plasmodium falciparum*. *Acta Tropica*. Jul 14. [Epub ahead of print].
- Mota M.M., Pradel G., Vanderberg J.P., Hafalla J.C., Frevert U., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V., Rodríguez A., 2001.-** Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 291, 141-144.
- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Fontenille D., Ravaonjanahary C., Richard A., Robert V., 1993.-** Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers Santé*, 3, 220-238.
- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Mangui S., Richard-Lenoble D., Circoulon J., 2004.-** Biodiversité du paludisme dans le monde. Paris: *John Libbey Eurotext*. 428 pp.
- Moulin F. & Gendrel D., 2009.-** Imported malaria: diagnostic traps and rapid tests. *Archives de pédiatrie*, Oct; 16 Suppl 2:S89-92. French.
- MSHP, 2007.-** Arrêté n°24/CAB/MSHP du 12 janvier 2007 portant institution d'un schéma thérapeutique pour traitement du paludisme en Côte d'Ivoire. Abidjan. *Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique / Programme National de Lutte contre le Paludisme*. 4p.
- MSHP, 2013.-** Directives nationales de prise en charge du paludisme en Côte d'Ivoire. Abidjan, Côte d'Ivoire , *Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique*. 37p.
- MSLS, 2015.-** Plan National de Développement Sanitaire 2016 – 2020 de la république de Côte d'Ivoire. *Ministère de la Santé et de la Lutte contre le Sida*. 88p.

- Murphy J.R., Clyde D.F., Herrington D.A., Baqar S., Davis J.R., Palmer K., Cortese J., 1990.-** Continuation of chloroquine-susceptible *Plasmodium falciparum* parasitemia in volunteers receiving chloroquine therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, 676-679.
- Murray C.K., Gasser R.A. Jr., Magill A.J., Miller R.S., 2008.-** Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 21 : 97-110.
- N'Diaye H. M., Kouassi K. L., Yao A. N., Savane I., 2015.-** Caractérisation des occurrences de sécheresse dans le bassin hydrologique de la Bia transfrontalier entre la Côte d'Ivoire et le Ghana : contribution des chaînes de Markov. *Cahiers Agricultures*, vol. 24, n8 3, mai-juin.
- Nessler S., Friedrich O., Bakonh N., Fink R.H.A., Lanzer, 2004.-** Evidence for activation of endogenous transporters in *Xenopus laevis* oocytes expressing the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporters, *pfcr1*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 3438-3446.
- Ngasala B., Mubi M., Warsame M., Petzold M.G., Masele A.Y., Gustafsson L.L., Tomson G., Premji Z., Bjorkman A., 2008.-** Impact of training in clinical and microscopy diagnosis of childhood malaria on antimalarial drug prescription and health outcome at primary health care level in Tanzania: a randomized controlled trial. *Malaria Journal*, 7:199.
- Nguansangiam S., Day N.P., Hien T.T., Mai N.T., Chaisri U., Riganti M., Dondorp A.M., Lee S.J., Phu N.H., Turner G.D., White N.J., Ferguson D.J., Pongponratn E., 2007.-** A quantitative ultrastructural study of renal pathology in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Tropical Medicine and International Health*. 12, 1037-50.
- Nikaido H., 2001.-** Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 12(3):215-23.
- Noedl H., Se Y., Schaefer K., Smith B.L., Sochat D., Fukuda M.M., 2008.-** Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *The New England Journal of Medicine*, Dec 11; 359 (24):2619-20.

- Nwakanma D.C., Gomez-Escobar N., Walther M., Crozier S., Dubovsky F., Malkin E., Locke E., Conway D.J., 2009.-** Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva, blood, and urine. *Journal of Infectious Diseases*, 199(11):1567-74.
- Nyarango P.M., Gebremeskel T., Mebrahtu G., Mufunda J., Abdulmumini U., Ogbamariam A., 2006.-** A steep decline of malaria morbidity and mortality trends in Eritrea between 2000 and 2004 : the effect of combination of control methods. *Malaria Journal*, 5 : 33.
- Ohnmachr C.J., Patel A.R., Lutz R.E., 1971.-** Antimalarial 7-bis (trifluoromethyl) (2-piperidyl) 4-quinoline methanols. *Journal of Medicinal Chemistry*, 14 : 926-928.
- Olliaro L.P., Yuthavong Y., 1999.-** An overview of chemotherapeutic targets for antimalarial Drug Discovery. *Pharmacology & Therapeutics*, 81: 91-110.
- O.M.S., 2005.-** Sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux médicaments antipaludiques : 1996-2004. *Rapport sur la surveillance globale 1996-2004*. Genève, WHO/MAL/2005.1103135. 135p.
- OMS/AFRO., 2009.-** Stratégie de coopération de l'O.M.S avec les pays 2009-2013, Côte d'Ivoire, juillet 2009, 38p. Disponible sur [http://www.who.int/countryfocus/cooperation\\_strategy/ccsbrief\\_civ\\_fr.pdf](http://www.who.int/countryfocus/cooperation_strategy/ccsbrief_civ_fr.pdf) (consulté le 25 Juillet 2016)
- Ord R., Alexander N., Dunyo S., Hallett R.L., Jawara M., Targett G.A.T., Drakeley C.J., Sutherland C.J., 2007.-** Seasonal carriage of *pfprt* and *pfmdr1* alleles in Gambian *Plasmodium falciparum* imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites. *Journal of Infectious Diseases*, 196, 1613-1619.
- Orostegui L., Balu L., Chevret L., Habes D., Pussard E., 2011.-** Community Management of Anti-malarials in Africa and Iatrogenic Risk. *Journal of Tropical Pediatrics*, 57, 225-226.
- Ouattara L., Bla K.B., Assi S.B., Yavo W., Djaman A.J., 2010.-** *pfprt* and *dhfr-ts* Sequences for Monitoring Drug Resistance in Adzopé Area of Côte d'Ivoire After the Withdrawal of Chloroquine and Pyrimethamine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, December; 9(6): 568.

- Parajuli K., Hanchana S., Inwong M., Pukrittayakamee S., Ghimire P., 2009.-** Comparative evaluation of microscopy and polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis in suspected malaria patients of Nepal. *Nepal Medical College*, 11 (1):23-7.
- Parry J.V., Perry K.R., Panday S., Mortimer P.P., 1989.-** Diagnosis of hepatitis A and B by testing saliva. *Journal of Medical Virology*, 4:255-60.
- Parzy D., Keundjian A., Pradines B., Fusai T., J C. D., 1995.-** Evaluation des résistances de *Plasmodium falciparum* aux antimalariques. *Médecine Tropicale*, 55 : 211-215.
- Payne D., Wernsdorfer W.H., 1989.-** Development of a blood culture medium and a standard *in vitro* microtest for field-testing the response of *Plasmodium falciparum* to antifolate antimalarials. *Bulletin of the World Health Organization*, 67(1):59- 64.
- Phyo A.P., Nkhoma S., Stepniewska K., 2012.-** Emergence of artemisinin resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*, 379 : 1960-6.
- Picot S., 2001.-** Méthodes d'étude de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux quinoléines. *Médecine Tropicale*, 61 : 15-20.
- Pink R., Hudson A., Mouries M-A. Bendig M., 2005.-** Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature reviews* 4.
- Plowe C.V. & Wellems T.E., 1995.-** Molecular approaches to the spreading problem of drug resistant malaria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 390:197-209.
- Plowe C.V., Roper C., Barnwell J.W., Happi C.T., Joshi H.H., Mbacham W., Meshnick S.R., Mugittu K., Naidoo I., Price R.N., Shafer R.W., Sibley C.H., Sutherland C.J., Zimmerman P.A., Rosenthal P.J., 2007.-** World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: molecular markers for drug resistant malaria. *Malaria Journal*, 6; 6:121.
- Plowe C.V., 2003.-** Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *Journal of Experimental Biology*, Nov; 206(Pt 21):3745-52. Review.
- Price R., Robincon G., Brockman A., Cowman A., Krishna S., 1997.-** Assessment of *pfmdr1* gene copy number by tandem competitive polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 5(2): 161-169.

- Putaporntip C., Buppan P., Jongwutiwes S., 2011.-** Improved performance with saliva and urine as alternative DNA sources for malaria diagnosis by mitochondrial DNA-based PCR assays. *Clinical Microbiology and Infection*, 17:1484–1491.
- R Core Team, 2013.-** A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL consulté le 18 Février 2017 sur <http://www.R-project.org>.
- Raso G., Schur N., Utzinger J., Koudou B.G., Tchicaya E.S., Rohner F., N'Goran E.K., Silué K.D., Matthys B., Assi S., Tanner M., Vounatsou P., 2012.-** Mapping malaria risk among children in Cote d'Ivoire using Bayesian geo-statistical models. *Malaria Journal*, 11, 1-11.
- Ridley R.G., 1998.-** Malaria : Dissecting chloroquine resistance. *Current Biology*, 8, R346-R349.
- Ringwald P., 2007.-** Current antimalarial drugs: resistance and new strategies. *Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine*, 191(7):1273-84; discussion 1284. Review.
- Robert A. & Meunier B., 1997.-** Characterisation of the first covalent adduct between artemisinin and a heme model. *Journal of the American Chemical Society, Soc.* 119: 5968-5969.
- Robert V. & Boudin C., 2003.-** Biologie de la transmission homme - moustique du *Plasmodium*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 96, 6-20.
- Roland S., Ferone R., Harvey R.J., Styles V.S., Morrison R.V., 1979.-** The characteristics and significance of sulfamides as substrates for Escherichia coli dihydrofolate synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, 254: 10337-10345.
- Ross R., 1897.-** On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood. *British Medical Journal*, 2(1929): 1786-1788.
- Schipper R., Loof A.J., Harthoorn L., Van Heerde W., Dransfield E., 2007.-** Salivary protein/peptide profiling with SELDI-TOF-MS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098:498–503.
- Schwarzer E., Skorokhod O.A., Barrera V., Arese P., 2008.-** Hemozoin and the human monocyte-a brief review of their interactions. *Parassitologia*, 50: 143-145.

- Sherwood L., 2008.-** Human physiology: from cells to systems. 7 ed: Brooks/Cole, a part of *Cengage Learning Inc.*
- Siau A., Silvie O., Franetich J. F., Yalaoui S., Marinach C., Hannoun L., van Gemert G. J., Luty A.J., Bischoff E., David P. H., Snounou G., Vaquero C., Froissard P., Mazier D., 2008.-** Temperature shift and host cell contact up-regulate sporozoite expression of *Plasmodium falciparum* genes involved in hepatocyte infection. *PLoS Pathogens*, 4:e1000121.
- Siden-kiamos I., Louis C., 2004.-** Interactions between malaria parasite and their mosquito hosts in the midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34 : 679-685.
- Sidhu A.B.S., Pinard V., Fidock D.A., 2002.-** Chloroquine resistance *Plasmodium falciparum* malaria conferred by *pfcrt* mutations. *Science*, 298: 210-213.
- Sinden R.E., 1983.-** Sexual development of malarial parasites. *Advances in Parasitology*, 22: 153-216.
- Sinden R.E., Hartley R.H., 1985.-** Identification of the meiotic division of malarial parasites. *The Journal of Protozoology*, 32: 742-744.
- Sinden R.E., Hartley R.H., Winger L., 1985.-** The development of *Plasmodium* ookinetes *in vitro*: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology*, 91 : 227-244.
- Singh Balbir, Lee Kim Sung, Asmad Matusop, Anand Radhakrishnan, Sunita S.G. Shamsul, Janet Cox-Singh, Alan Thomas,, David J. Conway., 2004.-** A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, 363 :1017-1024.
- Snounou G., Viriyakosol S., Zhu X.P., Jarra W., Pinheiro L., Do Rosario V.E., 1993.-** High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61 : 315-20.

- Somé Anyirékun Fabrice, Sorgho Hermann, Zongo Issaka, Bazié Thomas, Nikiéma Frédéric, Sawadogo Amadé, Zongo Moussa, Compaoré Yves-Daniel, and Ouédraogo Jean-Bosco, 2016.-** Polymorphisms in *K13*, *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, and *pfdhps* in parasites isolated from symptomatic malaria patients in Burkina Faso. *Parasite*, 23, 60.
- Steketee R.W., 2009.-** Good news in malaria control... now what? *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 80(6) : 879-80.
- Stewart L., Gosling R., Griffin J., Gesase S., Campo J., Hashim R., Masika P., Mosha J., Bousema T., Shekalaghe S., Cook J., Corran P., Ghani A., Riley E.M., Drakeley C., 2009.-** Rapid assessment of malaria transmission using age-specific sero-conversion rates. *PLoS One*. Jun 29; 4(6):e6083.
- Sturn A., Amino R., Van De Sand C., Regen T., Retzlaff S., Rennenberg A., Krueger A., Pollok J.M., Menard R., Heussler V.T., 2006.-** Manipulation of host hepatocytes by malaria parasites for delivery into sinusoids. *Science*, 313, 1287-1290.
- Su Yh, Wang M, Brenner DE, Ng A, Melkonyan H, Umansky S, Syngal S, Block TM., 2004.-** Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, May; 6(2):101–7.
- Sutherland C.J., Hallett, R., 2009.-** Detecting malaria parasites outside the blood. *Journal of Infectious Diseases*, 199, 1561-3.
- Suybeng H.L., Wallon M., Rabodonirina M., Peyron F., 2011.-** Use of PCR on urine samples for the diagnosis of toxoplasmosis after allogeneic stem cell transplantation. Mol Diag. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECC-MID) 7th International Congress of Chemo-therapy (ICC) Lyon France.
- Tahar R., Ringwald P., Basco L.K., 2009.-** Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXVIII. *In vitro* activity of dihydroartemisinin against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* and sequence analysis of the *P.falciparum* ATPase 6 gene. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 81(1):13-8.

- Talisuna A.O., Adibaku S., Amojah C.N., Amofah G.K., Aubyn V., Dodoo A., Juma E., Jackou D.H., Mkude S., Okui A.P., Ramarosandratana B., Shija S.J., 2012.-** The affordable medicines facility-malaria-A success in peril. *Malaria Journal*, 11:370.
- Talman A.M., Domarle O., McKenzie F.E., Ariey F., Robert V., 2004.-** Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 3, 24..
- Tanaka M., Gu H.M., Bzik D.J., Li W.B., Inselburg J., 1990.-** Dihydrofolate reductase mutations and chromosomal changes associated with pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 39: 127-134.
- Tangpukdee N., Duangdee C., Wilairatana P., Krudsood S., 2009.-** "Malaria diagnosis: a brief review." *The Korean Journal of Parasitology*, 47(2): 93---102.
- Taylor S.M., Parobek C.M., De Conti D.K., Kayentao K., Coulibaly S.O., Greenwood B.M., 2014.-** Absence of putative artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study. *Journal of Infectious Diseases*, 211:680–8.
- Thomas P.A., Brasseur P., Doumbo O., Julien M., Hommel M., 2005.-** L'Actualité du paludisme. [www.impact-malaria.com/](http://www.impact-malaria.com/). Sanofi synthelabo groupe, 174 avenue de France, 75013 Paris.
- Thomas S.M., Ndir O., Dieng T., Mboup S., WIPIJ M., 2002.-** *In vitro* chloroquine susceptibility and PCR analysis of *pfert* and *pfmdr1* polymorphism of *Plasmodium falciparum* isolates of Sénégal. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 66(5): 474-480.
- Tinto H., Ouédraogo J.B., Zongo I., Van Overmeir C., Van Marck E., Guiguemdé T.R., D'Alessandro U., 2007.-** Sulfadoxine-pyrimethamine efficacy and selection of *Plasmodium falciparum* DHFR mutations in Burkina Faso before its introduction as intermittent preventive treatment for pregnant women. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 76, 608-613.

- Tougher S., Ye Y., Amuasi J.H., Kourgueni I.A., Thomson R., Goodman C., Mann A.G., Ren R., Willey B.A., Adegoke C.A., Amin A., Ansong D., Bruxvoort K., Diallo D.A., Diap G., Festo C., Johanes B., Juma E., Kalolella A., Malam O., Mberu B., Ndiaye S., Nguah S.B., Seydou M., Taylor M., Rueda S.T., Wamukoya M., Arnold F., Hanson K., 2012.-** Effect of the Affordable Medicines Facility–malaria (AMFm) on the availability, price, and market share of quality-assured artemisinin-based combination therapies in seven countries: a before-and-after analysis of outlet survey data. *Lancet*, 380:1916–1926.
- Toure O. A., Menan G. K., Yapi J. D., Ako A. B., Khali D., Gomez O. G., Louis K. P., 2011.-** Artesunate/mefloquine paediatric formulation vs. artemether/lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* in Anonkoua route', Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and International Health*, volume 16 no 3 pp 290–297. march.
- Touré O. A., Koné P. L., Jambou R., Konan T. D., Demba S., Beugre G. E., Koné M., 2008.-** Sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à la quinine, l'artésunate et la chloroquine à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Cahiers Santé*, vol. 18, n° 1, janvier-février-mars.
- Touze J.E., Fourcade L., Pradines B., Hovette P., Paule P., Heno P., 2002.-** Les modes d'action des antipaludiques, intérêt de l'association atovaquoneproguanil. *Medecine Tropicale*, 62: 219-224.
- Triglia T., Wang P., Sims P., Hyde J., Cowman A.F., 1998.-** Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthetase in sulfadoxine resistant malaria. *The EMBO Journal*, 17(14): 3807-3815.
- Valle M., Quakyi I., Amuesi J., Quaye J., Nkrumah F., Taylor D., 1991.-** Detection of antigens and antibodies in the urine of humans with *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1236-1242.
- Van Agtmael M.A., Eggelte T.A., Van Boxtel C.J., 1999.-** Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20, 199-205.

- Van Dooren G.G., Marti M., Tonkin C.J., Stimmler L.M., Cowman A.F., Mcfadden G.I., 2005.-** Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 57: 405-419.
- Vatanshenassana M.R.S., Mohebalia M., Niromand N., Kazemic B., Babaeia Z., Rezaeiana M., 2010.-** *Trichomonas vaginalis* : Investigation of a novel diagnostic method in urine samples using *cysteine proteinase 4* gene and PCR technique. *Experimental Parasitology* , 126(2):187-90.
- Vythilingam I., 2010.-** *Plasmodium knowlesi* in humans: a review on the role of its vectors in Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 27, 1-12.
- Warhurst R.D., 1986.-** Antimalarial schizonticides: Why a permease is necessary. *Parasitology today*, 3 : 331-332.
- Wells T.N.C., Alonso P.L., Gutteridge W.E., 2009.-** New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 879-891.
- Wengelnik K., Vidal V., Ancelin M., A.M. C, Vial H., 2002.-** A class of potent antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes. *Science*; 295(5558): 1311-1314.
- Wernsdorfer W.H. & Paye D., 1991.-** The dynamic of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacology*. 50 : 95-101.
- White N.J., Pongtavornpinyo W., 2003.-** The *de novo* selection of drug-resistant malaria parasites. *Proceedings Biological Sciences*, 270, 545-554.
- WHO, 2016.-** World malaria report 2016, ISBN 978-92-4-151171-1, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 186p.
- WHO, 2013.-** Aperçu de la stratégie de coopération avec la Côte d’Ivoire, mai, 2p.  
Disponible sur <http://www.who.int/countries/civ/fr> (Consulté le 20 mars 2015).
- WHO, 2011.-** Guidelines for the treatment of malaria, 2nd ed. WHO : 2011. ISBN 978 92 4 154792 5, 210p.

- WHO, 2009.-** Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva: *WHO Press*, ISBN 978 92 4 159753 1, 90p.
- WHO, 2008.-** The world malaria report 2008. Geneva : World Health Organization, *Report No. : WHO/HTM/GMP/2008.1*, 215p.
- WHO, 2006.-** Guidelines for treatment of malaria. Geneva, *World Health Organization*, WHO/HTM/MAL/2006.1108, 266p.
- WHO, 2003.-** Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Geneva: World Health Organization. *WHO/HTM/RBM/2003.50*. 68 pp.
- WHO, 1973.-** Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. *WHO Technical Report Series*. Report of a WHO Scientific Group. (*WHO Technical Report Series*, No. 529), 124p.
- Wilson N.O., Adjei A.A., Anderson W., Baidoo S., Stiles J.K., 2008.-** Detection of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II in saliva of malaria patients. *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 78, 733-5.
- Wilson R.J., Williamson D.H., 1997.-** Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 1-16.
- Winkler S.C., Brandts W.H., Wernsdorfer W., Graninger U., Bienzle, Kremsner P. G., 1994.-** "Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Gabon. Activity correlations between various antimalarials." *Tropical Medicine and Parasitology*, 45(3): 214-8.
- World Health Organization, 2005.-** Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs : report on global monitoring : 1996-2004. Geneva: WHO. Accessible à: <http://apps.who.int/malaria/whomalariapublications.htm> (consulté le 18 mai 2015).
- Wongsrichanalai C., Barcus M., Muth S., Sutamihardja A., Wernsdorfer W.H., 2007.-** A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *American Journal for Tropical and Medicine Hygiene*, 77 : 119-27.
- Wongsrichanalai C., Meshnick S. R., 2008.-** "Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border." *Emerging Infectious Diseases*, 14(5): 716-719.

- Yavo W., Menan E.I.H., Barro-Kiki P.C., Djohan V., Vanga-Bosson H., Konate A., Kassi R.R., Yapo D.A., Kone M., 2009.-** RE. Habitudes de prescription des antipaludiques dans les structures sanitaires de Yopougon (Abidjan, Cote d'Ivoire), *VI<sup>eme</sup> colloques des Sciences pharmaceutique et biologiques*.
- Yavo W., Ackra K.N., Menan E.I., Barro-Kiki P.C., Kassi R.R., Adjetey T.A., Bamba A., Kone M., 2002.-** Comparative study of four malaria diagnostic techniques used in Ivory Coast. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 95 : 238-240.
- Yuthavong Y., 2002.-** Basis for antifolate action and resistance in malaria. *Microbes and infection*, 4 : 175-182.
- Zhang H., Howard E. M., Roepe P. D., 2002.-** Analysis of the antimalarial drug resistance protein PfCRT expressed in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 49767–49775.
- Zahra G. N., Hormozd O., Lame A., Ahmad R. M., Ahmad R., Zahra R., Mehdi N., Elham R., 2014.-** Mitochondrial PCR-based malaria detection in saliva and urine of symptomatic patients, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 108: 358–362.
- Zwick W. R., Velicer W. F., 1986.-** Comparison of five rules for determining the number of components to retain. *Psychological Bulletin*, 99, 432-442

# **ANNEXES**

## ANNEXES DES PUBLICATIONS

### Article :

**Olefongo Dagnogo**, Aristide Berenger Ako, Noel Dougba Dago, Baba Coulibaly, Solange Ngazoa-Kakou, André Offianan Toure and Joseph Allico Djaman (2017). Comparative analysis of genomic DNA amplification yield for *Plasmodium falciparum* extracted from urine, saliva and blood. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, Vol.9(7), pp. 95-105, July 2017

## **PUBLICATION**

**TITRE :** Comparative analysis of genomic DNA amplification yield for *Plasmodium falciparum* extracted from urine, saliva and blood

**Auteurs :** **Olefongo Dagnogo**, Aristide Berenger Ako, Noel Dougba Dago, Baba Coulibaly, Solange Ngazoa-Kakou, André Offianan Toure and Joseph Allico Djaman

**Année :** 2017

**Revue :** *Journal of Parasitology and Vector Biology*, Vol.9(7), pp. 95-105, July 2017

## Full Length Research Paper

# Comparative analysis of genomic DNA amplification yield for *Plasmodium falciparum* extracted from urine, saliva and blood

Olefongo Dagnogo<sup>1,2</sup>, Aristide Berenger Ako<sup>2</sup>, Noel Dougba Dago<sup>3</sup>, Baba Coulibaly<sup>2</sup>, Solange Ngazoa-Kakou<sup>2</sup>, André Offianan Toure<sup>2</sup> and Joseph Allico Djaman<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>UFR Biosciences, Université Felix Houphouët-Boigny, BP V34 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

<sup>2</sup>Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

<sup>3</sup>UFR Sciences Biologiques, Université Péléforo Gon Coulibaly, BP1328 Korhogo, Côte d'Ivoire.

Received 10 May, 2017; Accepted 19 June 2017

Malaria treatment and/or management remains an essential element as well as strategy controlling this pathology. Since 2005, Côte d'Ivoire has adopted Artemisinin-based Combination Therapies (ACTs) as first-line drugs to treat uncomplicated malaria. Malaria diagnostic mechanism involves blood sampling by using finger prick collection or venipuncture which requires very strict aseptic conditions. However, some groups of people refuse to cooperate with these diagnostic methods because of (i) cultural believe forbidding seeing of blood and (ii) trauma related to the needle sting. Here, two non-invasive sampling and one invasive methods to diagnose malaria using molecular method were tried. Blood, urine and saliva samples were collected in three different localities from patients above 2 years of age having simple *Plasmodium falciparum* malaria confirmed by microscopy. Then, *P. falciparum* genomic DNA was extracted and amplified through *Pfcr1*, *Pfdhfr-ts*, and *PfK13 propeller* genes specific primers. Amplification products were processed by electrophoresis and analyzed according to blood, saliva and urine samples. A multivariate statistical analysis based on R software was carried out with the purpose to assess the aptitude and/or performance of each analyzed biological samples in malaria molecular diagnosis procedure. The results revealed the presence of *P. falciparum* DNA in urine (27.57%) of the amplification products, saliva (40.21%) and blood (91.55%). Assuming blood sample as benchmark, the statistical analysis exhibited saliva as a suitable biological sample fitting for malaria molecular diagnosis ( $p$ -value  $\leq 0.05$ ), and suspected urine as a source of variability analyzing the aforementioned described malaria patient population excluding the latter as a reliable sample in malaria molecular diagnosis. The same results exhibited *Pfdhfr* and *PfK13 propeller* genes amplified from saliva as satisfactory molecular markers for chemo-resistance. The findings suggested *P. falciparum* genomic DNA amplification from saliva sample as closer in comparison to blood and proposed the former (saliva) as an alternative to blood in malaria molecular diagnosis process.

**Key words:** Molecular diagnosis, malaria, *pfcr1*, *pfdhfr-ts*, *pfK13 propeller*, *Plasmodium falciparum*, saliva, urine.

## INTRODUCTION

Despite international efforts to stop malaria, unfortunately it is still one of the most common deadly diseases in the

world. According to the latest World Health Organization (WHO) statistics, 214 million cases of malaria were

recorded in 2015, of which 348,000 did not survive it. Of these deaths, 80% were from Africa, 71% of whom were children under the age of five (WHO, 2015). Management of malaria is an essential key to the strategy for fighting malaria. This management involves early diagnosis and rapid treatment of the disease with effective antimalarial. Despite remarkable progress being made in the development of malaria diagnostic tools, to date, all these tools require blood sampling at finger prick or venipuncture (Snounou et al., 1993; Murray et al., 2008; Putaporntip et al., 2009). Although blood collection does not generally have serious consequences if carried out under strict aseptic conditions, some groups of the population, such as some pregnant women, infants and some young ones, fail to cooperate when it comes to repeated blood collection (Putaporntip et al., 2009; Sutherland et al., 2009). Indeed, blood sampling requires skill personnel and the biological risk, associated with the inevitable use of needles or sharp objects, may result in poor compliance when repeated sampling is required. Blood collections in some communities is often very difficult to achieve due to cultural or religion believe, therefore sets limits for repeated examinations, particularly in young children who are the main target for most malaria epidemiological surveys. In order to get rid of the obstacles to the problem of blood collection, it is necessary to explore alternative methods that can be substituted for blood samples collection and at the same time useful for all diagnostic, therapeutic or epidemiological investigation of malaria. Urine and saliva of people infected with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* have been shown to contain plasmodial DNA amplifiable by polymerase chain reaction (PCR) (Mharakurwa et al., 2006; Buppan et al., 2010). Despite the small amount of plasmodial DNA in these biological fluids compared to blood, these two products appear to have a real potential for diagnosing malaria as well as studying antimalarial resistance genes (Nwakanma et al., 2009). The objective of this study was to compare genomic DNA amplification products of *P. falciparum* isolated from the urine, saliva and blood of patients exhibiting simple malaria pathology from different localities, with the purpose to characterize resistance genes to antimalarial drugs.

## MATERIALS AND METHODS

### Study site

The present prospective study has been realized from February to August 2015 in three different health structures; Anonkoua Kouté (Health Center), Port-Bouët (General Hospital) and Ayamé (General Hospital). Processed sites are located in southern region of Côte

d'Ivoire characterized by a tropical climate with annual rainfall exceeding 1700 mm and the temperature oscillating between 27 and 33°C. Malaria is seasonal, predominant during the rainy season from June to September with peak prevalence and incidence in October-November. *P. falciparum* is the dominant species with more than 90% of the total parasite. The main vectors of malaria in this study area are members of the complexes *Anopheles gambiae* s.l and *Anopheles funestus* s.l (Adja et al., 2011). The Anonkoua-Kouté health center and the Ayamé General Hospital were selected because of the high annual incidence of malaria cases. In addition, these health centers have been used for several years as the main sites for conducting multi-center clinical trials of efficacy by the malaria unit of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire. Port-Bouët site (General Hospital of Port-Bouët) has been included in the present survey because of its swampy environment used for vegetable garden.

### Study population and sample collection

Suspected infected malaria patients from our analyzed sites (Anonkoua Kouté health center and both general hospitals of Port-Bouët and Ayamé localities) were recognized as eligible. After obtaining consent, blood, urine and saliva samples were collected in patients over 2 years of age having an axillary or rectal temperature above 37.5°C with malaria *P. falciparum* evidence confirmed by a microscopy test in a thick drop and blood smear. A total of 459 samples from 153 patients were included in this study (Table 1).

### Blood, saliva and urine collection

#### Blood

Two to five milliliters of venous blood was collected in an EDTA tube for each analyzed malaria patients. Next, 50 µl of whole blood was dropped on Whatman 3 MM filter paper using a micropipette with filter cones. The paper containing the blood spots was dried (60 to 120 min) at room temperature and protected from dust. The unused blood after making the confetti and content in the EDTA tube was centrifuged at 2,000 rpm for 10 min. Whole blood constituent, that is, blood plasma, buffy coat and globular pellet, were separated and stored in cryotubes at -20°C for possible subsequent use.

#### Saliva

Ten to fifteen minutes after washing the mouth with tap water, 5 ml of saliva was collected per patient in a sterile flask. Then, 50 µl of saliva was dropped on Whatman 3 mm filter paper for each patient. Yielded confetti's were dried for approximately 60 to 120 min at room temperature and protected from dust. After preparing confetti, 1000 µl of absolute methanol was added to 500 µl of saliva (contained in the sterile bottle) in a cryotube and then stored at -20°C (Mharakurwa et al., 2006; Buppan et al., 2010) for subsequent use.

#### Urine

After blood and saliva collection, 5 to 10 ml of each patient's urine

\*Corresponding author. E-mail: josephdjaman@pasteur.ci. Tel: 0022545190558.

**Table 1.** Samples used for the molecular analysis of resistance markers

Site	Collection period	Age group (t years)	Sample	Confetti collected
Anonkoua-Kouté	February - March 2015	2 to 53	Blood	52
			Saliva	52
			Urine	52
Port-Bouët	April - May - July 2015	2 to 62	Blood	51
			Saliva	51
			Urine	51
Ayamé	June – July - August 2015	2 to 55	Blood	50
			Saliva	50
			Urine	50
Total				459

were collected in a sterile vial. Next, 50 µl of urine were dropped on Whatman 3 mm filter paper by using a micropipette and filter cones. Then, obtained confetti were dried for 60 to 120 min at room temperature and protected from dust. After completion of the confetti, 1000 µl of absolute methanol was added to 500 µl of urine (contained in the sterile flask) in a cryotube and then stored at -20°C for possible subsequent use (Mharakurwa et al., 2006; Buppan et al., 2010).

#### *P. falciparum* genomic DNA extraction

(i) Blood plasmodial genomic DNA was extracted by adding methanol to previous prepared blood confetti (Miguel et al., 2013). Indeed, fine cuts of blood confetti were immersed in 1 ml of wash buffer (950 µl of 1X PBS plus 50 µL of 10% saponin) and then incubated at 4°C overnight. The wash buffer was removed and then washed before adding 150 µl of methanol. After 20 min incubation, the methanol was gently removed and the samples were dried at room temperature for 2 h before adding 300 µl of sterile water. The samples were then heated at 99°C in a thermo-mixer for 30 min to elute the DNA. After removing the confetti debris, the DNA extracts were aliquoted in a 1.5 ml Eppendorf tube and stored at -20°C.

(ii) Extraction of plasmodial DNA from urine and saliva confetti was performed by using the Chelex®100 method (Kain and Lanar, 1991; Plowe and Welles, 1995). 180 µl of 5% (w/v) Chelex-100 solution (Bio-Rad, Catalog No. 1422832) was placed in a 1.5 ml centrifuge tube and brought to the thermal block at 100°C for 5 min. The fine cuts of each confetti were added to the boiling Chelex 100 solution at the thermal block. After centrifugation at 12,000 g for 90 s, the supernatant was collected and then centrifuged again under the same conditions as mentioned earlier. The resulting supernatant was used for PCR.

#### Amplification of *Plasmodium falciparum* genes resistance

The resistance genes were amplified by a nested PCR using a pair of primers specific for each gene and a commercial kit of DNA polymerase named 5X FIREPol® Blend Master Mix with mM MgCl<sub>2</sub>. The composition of this kit constituted a pre-mix ready to use solution for the reaction mixture. For primary PCR, the pairs of primers used for *pfk13 propeller*, *pfdhfr* and *pfprt* genes were K13\_PCR\_F (5'CGGAGTGACCAATCTGGGA)/K13\_PCR\_R (5'GGGAATCTGGTGGTAACAGC), dhfr\_M1

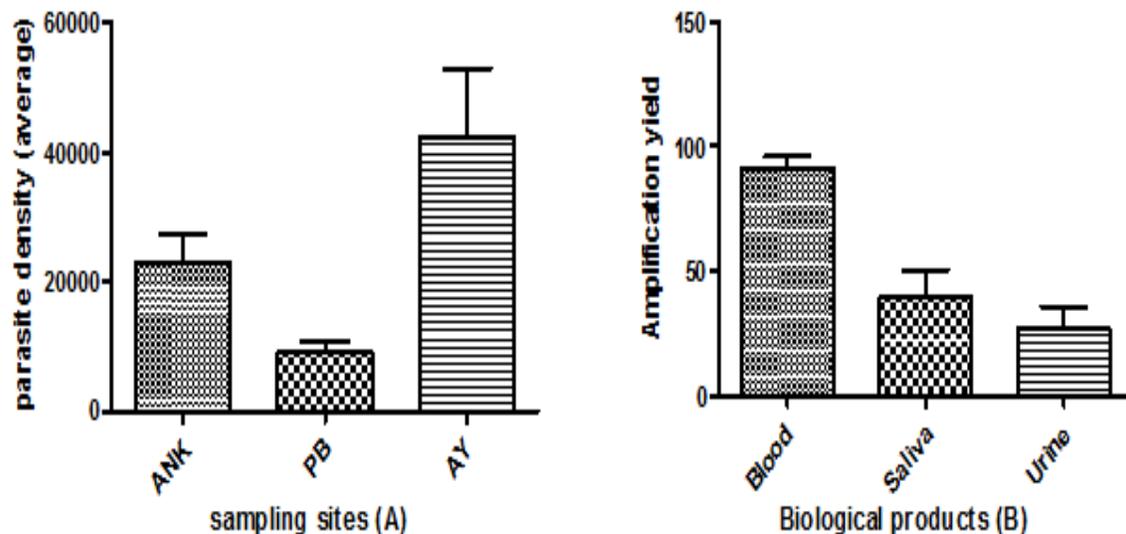
(5'TTTATGATGGAACAAGTCTGC)/dhfr\_M7 (5'CTAGTATATACATCGCTAACA) and 72\_97EF (5'GACCTTAACAGATGGCTCAC)/72\_97ER (5'TTTTATATTGGTAGGTGGAATAG), respectively. The primary PCR of these genes was carried out in a reaction volume of 25 µl containing: 0.625 µl of each primer, 3 µl of *P. falciparum* DNA, 0.5 µl of Taq polymerase and 15.75 µl of milliQ water. The mixture was then placed in a PTC-100TM thermocycler (Eppendorf Mastercycler, PTC-100 Peltier Thermal Cycler), programmed as follows: Initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, hybridization at 58°C for 2 min and extension at 72°C for 2 min. Finally, a terminal extension at 72°C for 10 min. The second PCR was carried out on the products of amplification of the primary PCR in a reaction volume of 50 µl containing: 1.25 µl of each primer, 5 µl of amplification product of the first PCR, of 0.5 µl of Taq polymerase and of 37.5 µl of milliQ water. The primer pairs used for the secondary PCR were K13\_N1\_F (5'GCCAAGCTGCCATTCATTG)/K13\_N1\_R (5'GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA) for the *pfk13 propeller* gene, dhfr\_M9 (5'CTGGAAAAATACATCACATTCATATG)/dhfr\_M3 (5'TGATGGACAAGTCTGCCGACGTT) for the *pfdhfr* gene, and SecIF (5'GGTAAATGTGCTCATGTGTTAAACTTATT)/SecIR (5'TTACTTTTTGAATTTCCCTTTTATTCCA) for the *pfprt* gene. The secondary PCR was carried out with the following program: Initial denaturation at 95°C for 15 min followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, hybridization at 60°C for 1 min and extended at 72°C for 1 min. Finally, a terminal extension at 72°C for 10 min.

#### Detection and analysis of PCR products

The products used for amplification were migrated to a 1.5% agarose gel containing Ethidium bromide (BET). After the migration, the gel was recovered and then observed under a UV lamp using UV translator (Gel DocTMEZ Imager). Presence or absence of bands made it possible to judge the effectiveness of PCR.

#### Statistical analysis

Data collected from standard questionnaire test were first validated before considered for analysis by Graph Pad Prism 5 software. Then, z-score test based on R software (Core team, 2013) was performed to compare the rates of the amplification products in each analyzed biological sample as well as amplification proportion



**Figure 1.** Parasite densities based on the sampling site (A). Amplification yield based on the biological product (B). “ANK”, “PB” and “AY” acronym indicate urine, saliva and blood samples respectively Anonkoua-Kouté; Port-Bouët and Ayamé.

of each processed *pfK13 propeller*, *pfdhfr* and *pfcr1* *P. falciparum* genes in blood, saliva and urine biological samples. A difference and/or statistical association and/or correlation was considered significant for  $p$ -value < 0.05. To carry out these analyses, various functions and/or scripts developed and/or based on R (version 3.2.2) programming environment (Core team, 2013) as well as on our previous developed computational statistical pipeline (Dago et al., 2016) were used. Next, biplot and variance estimation survey and Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis (Swets, 1988) have been executed to evaluate the propensity and/or performance (sensitivity, specificity and accuracy and positive predictive value) of each considered biological samples (blood, saliva and urine) in malaria molecular diagnosis procedure.

#### Ethical considerations

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approval was received from the Ethics and Research National Committee (CNER) of the Health and AIDS Control Ministry of Côte d'Ivoire.

After information and appropriate explanations, adult participants, parents or legal guardians of all children willing to participate in the study gave their written consent before sampling.

## RESULTS

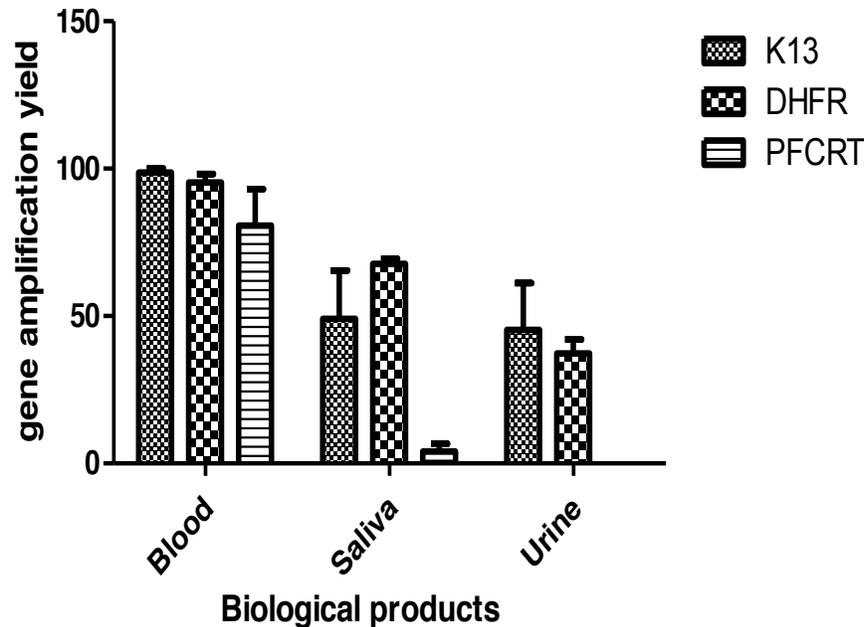
### Patient profile and rate of amplification product according to biological liquid

In total, 94 patients infected by *P. falciparum* were selected for this study, 58 (61.7%) women and 36 (38.3%) men. Age average of processed patient's was around 17 years (age range 2 to 55 years). Malaria *P. falciparum* parasite density proportion (average) in the present analyzed malaria patient population was

estimated to 24682 parasites/ $\mu$ l. However, parasitic densities vary from 1200 to 200000 parasites/ $\mu$ l with an average parasite densities at Anonkoua Kouté, Port-Bouët and Ayamé equal to 22900, 9193 and 42327 parasites/ $\mu$ l, respectively (Figure 1A). Significant and/or substantial difference was observed between (i) Port-Bouët and Ayamé sites in term of malaria *P. falciparum* parasite density ( $p$ -value < 0.05) (Figure 1A). Next, saliva, urine and blood extract samples were processed for PCR survey in separate batches by using primers specific to *pfcr1*, *pfdhfr* and *pfK13 propeller* genes. PCR amplified genes products were loaded into adjacent pathways for each analyzed patient in agarose gel electrophoresis highlighting amplification products. Then, genes amplification results revealed 40.22% ( $n = 286$ ) and 27.56% ( $n=284$ ) amplification ratio in saliva and urine samples, respectively against 91.56% ( $n=258$ ) (amplification products) in blood (Figure 1B). The same analysis suggested a significant difference comparing yielded genes amplification between (i) saliva and blood as well as between (ii) urine and blood biological samples ( $p$ -value  $\leq 0.05$ ).

### Relationship between gene fragments amplification products and blood, saliva and urine samples

The present survey evidenced a substantial presence of amplified DNA fragments in blood sample with the following proportions: (i) *Pfcr1* in 80.66% ( $n = 94$ ), (ii) *Pfdhfr* in 95.33% and (iii) *PfK13 propeller* in 98.66%. The same analysis processing saliva samples recorded the attendance of both genes *PfK13 propeller* in 49% ( $n = 94$ )



**Figure 2.** Ratio of *pfK13 propeller*, *pfdhfr* and *pfcr* genes fragments amplification in blood, saliva and urine biological samples.

and *Pfdhfr* in 67%. It is noteworthy to underline that *Pfcr* gene was not detectable in urine as opposed to blood sample (Figure 2). Proportion analysis regarding *PfK13 propeller* gene amplification suggested a weak difference (no significant difference) in term of gene expression levels in blood, saliva and urine samples. However, *Pfdhfr* gene fragments amplification yield exhibited a significant difference comparing blood, saliva and urine samples ( $p$ -value $<0.05$ ). In addition, the results showed a high expression level of *Pfcr* gene in blood as opposed to both saliva and urine samples ( $p$ -value  $< 0.05$ ). In other word, *Pfcr* gene is weakly expressed and/or not detectable in saliva and urine samples (Figure 2).

#### **Blood, saliva and urine samples as biological samples in malaria molecular process**

A heatmap graphical analysis indicating presence and/or absence of each analyzed *pfK13 propeller*, *pfctr* and *pfdhfr* *P. falciparum* genes markers in blood, saliva and urine samples discriminating malaria patients is implemented.

Results of this survey advised two tendencies suggesting blood as the best biological system performing malaria molecular diagnosis, since *pfK13 propeller*, *pfcr* and *pfdhfr-ts* *P. falciparum* genes are well detected in the latter in a high proportion of processed patient (Figure 1). However, the same analysis showed saliva as an adequate alternative biological sample highlighting a constancy presence of both *pfK13 propeller* and *pfdhfr* *P.*

*falciparum* genes marker in analyzed malaria patients as opposed to urine sample (Figure 3). Guided by these observations, we performed a variance analysis between blood, saliva and urine biological samples by assessing presence and/or absence of *pfcr*, *pfdhfr* and *pfK13 propeller* *P. falciparum* genes marker in malaria molecular diagnosis practice. This survey suggested that blood and saliva could both be used to significantly ( $p$ -value=0.032) discriminate malaria patients based on molecular detection of either (i) the set of genes *pfcr*, *pfdhfr*, and *pfK13 propeller* for blood samples; or (ii) the set of genes *pfdhfr* and *pfK13 propeller* for saliva samples.

Taking together, the present analysis proposed blood and saliva as suitable biological samples to perform malaria molecular diagnosis as opposed to urine ( $p$ -value  $< 0.05$ ).

#### **Variability in malaria patients performing malaria molecular diagnosis in blood, saliva and urine**

A comparative enquiry between analyzed patients was performed by introducing parasitic density (PD) parameter through a z-score analysis. Z-score heatmap graphic clustered malaria patients in two distinct groups (Figure 4). Indeed, detected groups, exhibited a relative evident variability among processed patients from Anonkoua Kouté (variance ratio=2.10;  $p$ -value=0.04) and Ayamé (variance ratio=1.68;  $p$ -value=0.16) districts as opposed to those from Port-Bouët site (variance



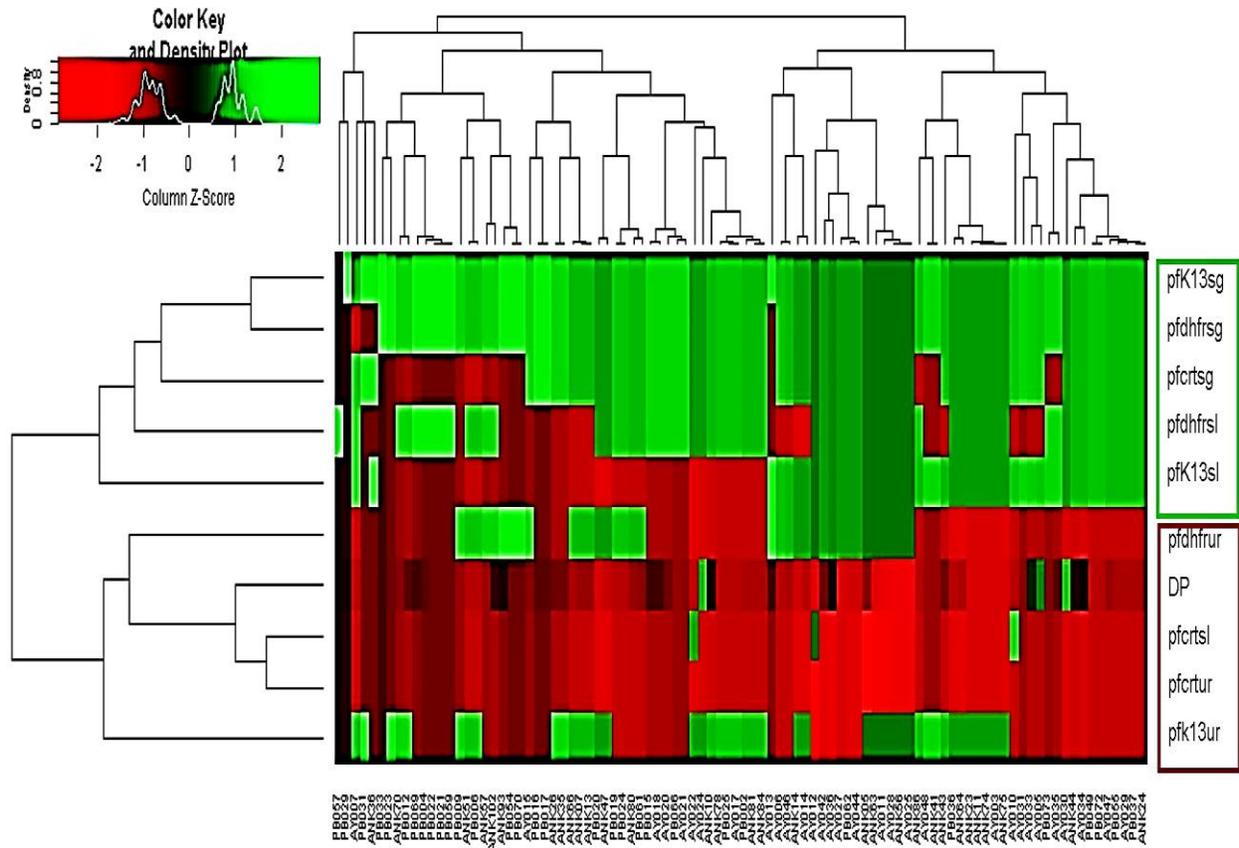
**Figure 3.** Heatmap graphic monitoring *P. falciparum* *pfK13*, *pfdhfr* and *pfprt* genes expression in blood, saliva and urine samples in malaria molecular diagnostic process. “ur”, “sl” and “sg” acronym indicate urine, saliva and blood samples, respectively.

ratio=0.66; p-value=0.26). However, z-score heatmap showed reasonably homogeneous and constancy prevalence of green color merging *pfprt*, *pfdhfr* and *pfK13 propeller* genes prevalence in blood samples (variance ratio<0.001; p-value<0.05). Interestingly, the same tendency has been observed considering *pfdhfr* and *K13 propeller P. falciparum* gene expression in saliva samples by processing the same malaria patients (Figure 4). In addition, our statistical analysis exhibited high concordance between *pfprt P. falciparum* genes expression in blood liquid and both *P. falciparum* *pfdhfr* and *pfK13 propeller* genes expression in saliva sample (variance ratio<0.02; p-value < 0.05). Also, the present survey (Figure 4) suspected (i) *pfdhfr* and *pfK13 propeller P. falciparum* genes detected in urine and (ii) *pfprt P. falciparum* gene marker detected in saliva sample as potential source of variability between analyzed malaria patient population as opposed to (i) *pfprt*, *pfdhfr* and *pfK13 propeller* genes and (ii) *pfdhfr* and *pfK13 propeller* genes in (i) blood and (ii) saliva samples, respectively (Table 2) as well as to parasite density (PD) parameter (Figure 4). Moreover, the present results suggested a low

sensitivity of PD parameters in malaria diagnosis process when molecular diagnosis methodology based on *pfprt*, *pfdhfr* and *pfK13 P. falciparum* genes screening in blood and saliva samples was assumed as reference (p-value<0.05). Considering as a whole, the present survey proposed both *pfdhfr* and *pfK13 propeller P. falciparum* gene markers screening in saliva as an adequate molecular diagnosis methodology discriminating malaria patients.

#### **Biplot PCA analysis assessing the relationship between *pfdhfr*, *pfprt* and *pfK13 propeller* in blood, saliva and urine samples**

The results showed an apparent concordance between (i) *pfdhfr*, *pfprt* and *pfK13 propeller P. falciparum* genes in blood sample by PC1 component and/or factor, (ii) *pfdhfr* and *pfK13 propeller P. falciparum* genes in urine and saliva and parasitological density (PD) parameter evaluating malaria patient distribution (Figure 5). The same analysis based on PC1 component suspected a discrepancy



**Figure 4.** Performance assessment of variability in malaria patient populations performing z-score clustering analysis in malaria molecular diagnosis process by detecting *pfdhfr*, *pfcrt* and *pfK13* *P. falciparum* genes markers in blood, saliva and urine samples. *ur*, *sl* and *sg* acronyms indicate urine, saliva and blood, respectively.

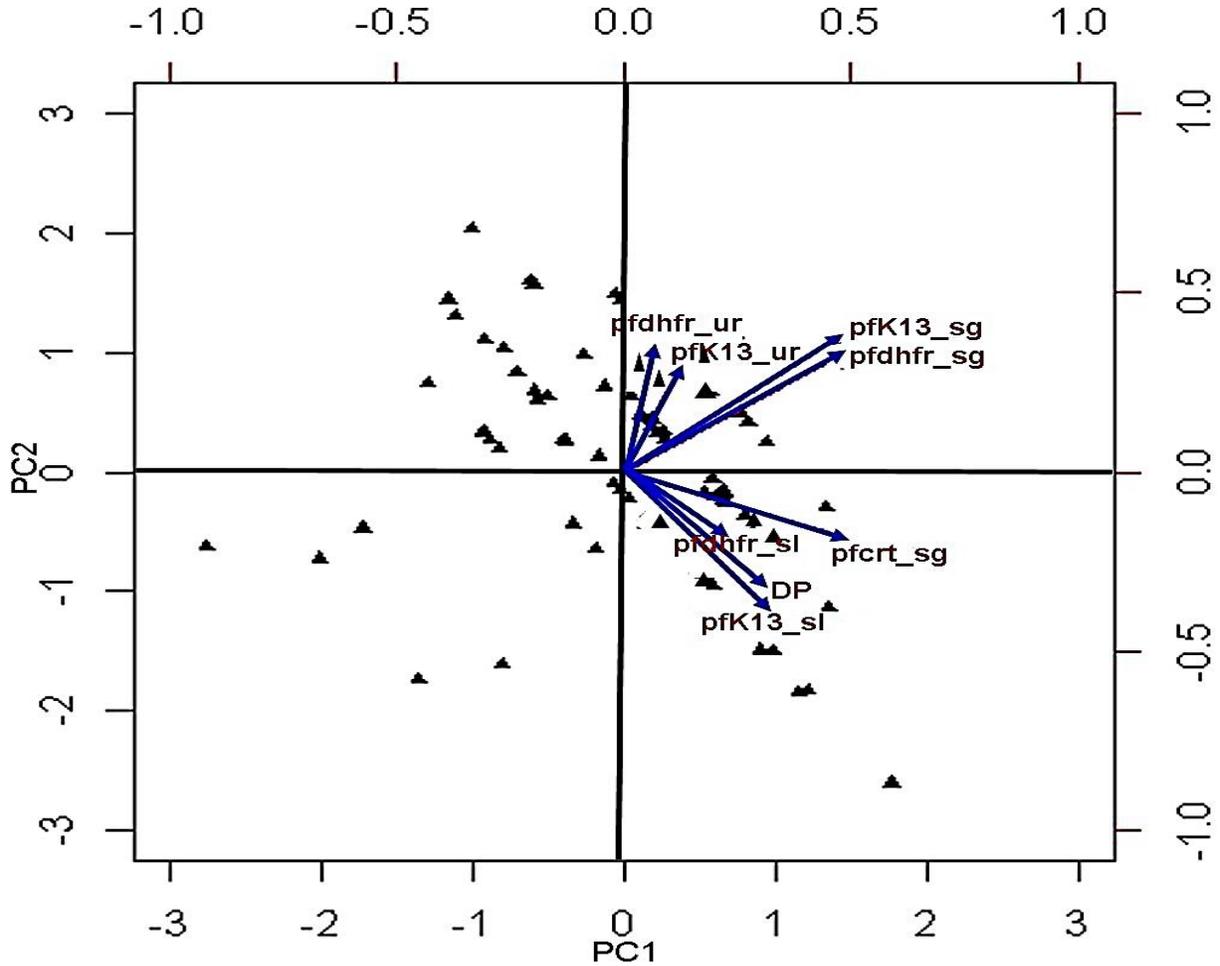
**Table 2.** Descriptive statistic weighing *DHFR*, *CRT* and *K13* *Plasmodium falciparum* genes abundance in blood, saliva and urine samples by screening malaria patients.

Biological Samples	Blood	Blood	Blood	Saliva*	Saliva	Saliva	Urine*	Urine	Urine	Parasitological Density (DP)
	<i>CRT Gene</i>	<i>DHFR Gene</i>	<i>K13 Gene</i>	<i>CRT Gene</i>	<i>DHFR Gene</i>	<i>K13 Gene</i>	<i>CRT Gene</i>	<i>DHFR Gene</i>	<i>K13 Gene</i>	
Median	1.36	1.07	1.01	0.00	1.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41
¼ Quartile	0.00	1.07	1.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20
¾ Quartile	1.36	1.07	1.01	0.00	1.45	2.04	0.00	2.67	2.18	0.93
Minimum	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.049
Maximum	1.36	1.07	1.01	31.33	1.45	2.04	0.00	2.67	2.18	8.10
Variance	0.37	0.07	0.01	30.66	0.46	1.05	0.00	1.70	1.20	2.51
Standard Deviation	0.61	0.26	0.10	5.54	0.67	1.02	0.00	1.30	1.10	1.59

\*Not suitable for following descriptive as well as inferential statistical analysis because of data's null dispersion (inter-quartile distance is null).

between PD and urine sample as well as between urine and saliva samples assessing processed malaria patient population dispersion and/or distribution (p-value<0.05). In addition, performed biplot PCA survey subtly exhibited *pfdhfr* and *pfcrt* *P. falciparum* genes in urine as a potential source of the variability observed in the analyzed

malaria patient population (Figure 5 and Table 2). Also, correlation analysis based on Pearson's test displayed lowest agreement between *pfdhfr* and *pfK13 propeller* *P. falciparum* gene markers expressed in both blood and urine samples (p-value=0.3) as opposed to *pfcrt* *P. falciparum* gene abundance in blood and saliva (p-



**Figure 5.** PCA comparative analysis assessing relationship between *pfdhfr*, *pfCRT* and *pfK13* Propeller genes of *P. falciparum* in malaria molecular diagnosis. *ur*, *sl* and *sg* acronym indicate urine, saliva and blood liquid, respectively.

**Table 3.** Pearson’s correlation between the *pfdhfr*, *pfK13* propeller and *pfCRT* genes in blood, saliva and urine for the molecular diagnosis of malaria

Correlation	PfK13_sg	PfK13_sl	Pfdhfr_sg	Pfdhfr_sl	PfCRT_sg	DP	PfK13_ur	Pfdhfr_ur
PfK13_sg	1	-	-	-	-	-	-	-
PfK13_sl	0.10	1	-	-	-	-	-	-
Pfdhfr_sg	0.40*	-0.01	1	-	-	-	-	-
Pfdhfr_sl	-0.07	0.05	0.20*	1	-	-	-	-
PfCRT_sg	0.20*	0.30*	0.14	0.12	1	-	-	-
DP	0.05	0.17*	0.11	0.06	0.21*	1	-	-
PfK13_ur	0.10	-0.04	0.07	0.01	0.12	-0.11	1	-
Pfdhfr_ur	0.08	-0.01	0.11	-0.10	0.02	-0.07	-0.0004	1

\*Significant at a p-value <0.1.

value=0.09) excluding urine as competitive biological sample in malaria molecular diagnosis process (Table 3). Interestingly, our analysis reinforced *pfdhfr* and *pfK13* propeller *P. falciparum* genes expression in saliva as

acceptable system in malaria molecular diagnosis process when blood sample was assumed as reference. Moreover, our findings evidence a positive correlation between DP parameter and all analyzed *P. falciparum* gene

**Table 4.** Performance assessment of urine and saliva samples in malaria molecular diagnosis based *pfdhfr*, *pfprt* and *pfK13* *P. falciparum* genes.

Parameter	Saliva			Urine		
	<i>pfk13</i>	<i>pfdhfr</i>	<i>pfprt</i>	<i>pfk13</i>	<i>pfdhfr</i>	<i>pfprt</i>
Sensitivity	0.46	0.64	0.05	0.45	0.38	0
Specificity	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.01
Accuracy	0.43	0.54	0.05	0.45	0.38	0.01
Positive predictive value	0.91	0.98	0.8	0.95	0.94	0

markers discriminated in both blood and saliva samples evoking data normalization process as a suitable statistical practice allowing parasitological density (PD) parameter to be considered and/or accepted as potential metric tool controlling malaria molecular diagnosis by both blood and saliva samples (Figure 5). Based on both PC1 and PC2 parameters our findings revealed both *pfdhfr* and *pfK13* propeller *P. falciparum* genes expression in saliva sample as a satisfactory alternative system to *pfprt* *P. falciparum* gene marker expressed in blood sample discriminating malaria patient (Figures 4 and 5) and excluded urine sample as adequate biological sample for malaria molecular diagnosis (Figure 5).

#### **Assessment of *P. falciparum* genes markers discriminating malaria patients by sensitivity, specificity, accuracy and positive predictive parameters**

The aptitude of both saliva and urine samples exhibiting *P. falciparum* *pfdhfr*, *pfprt* and *pfK13* propeller gene markers discriminating accurately malaria patients by a receiver operational characteristic (ROC) analysis is evaluated. Data revealed a high sensitivity of saliva with respect to urine sample in malaria molecular diagnosis process (Table 4). Indeed, *pfdhfr* in saliva sample (*pfdhfr\_sl*) recorded the highest sensitivity with respect to the other's analyzed gene markers. All analyzed *pfdhfr*, *pfprt* and *pfK13* propeller *P. falciparum* gene markers detected in both saliva and urine samples (except *pfprt* gene marker in urine sample) claimed to perfectly predict malaria infection, when blood was assumed as reference (positive predictive value > 0.80). Moreover, saliva sample exhibited a relative best accuracy and specificity parameters to evaluate attendance performance of processed *P. falciparum* gene markers analyzing the present malaria patient population (Table 4). In addition, the present ROC survey endorsed and confirmed and/or emphasized *P. falciparum* *pfK13* propeller and *pfdhfr* gene markers detection in saliva as an efficient molecular system discriminating malaria patients in alternative to blood sample. Finally, our survey suspected *pfdhfr* presence in saliva as the best parameter predicting positively malaria pathology occurrence in our process

patient populations when blood sample was assumed as reference (Table 4).

#### **DISCUSSION**

Malaria disease represents a major public health issue in several tropical areas worldwide. Malaria cure remains an essential strategy controlling this disease, since efficient malaria management involves early diagnosis and effective treatment. Generally, currently developed malaria diagnostic tools and/or protocols need blood sampling. This practice obfuscates patients collaboration for malaria diagnosis procedure because of some cultural believe regarding blood taboo (for some people) as well as fear related to sting trauma, especially when blood sampling has to be repeated. In order to contrast these tendencies, we evaluated more than a few palliative methods based on urine and saliva sampling performing malaria molecular diagnosis. Indeed, the present study proposed a comparative analysis by assessing *P. falciparum* genomic DNA amplification yield extracted from urine, saliva and blood samples with the purpose to find an alternative to blood sampling executing malaria diagnosis protocol. Thus, we quantified malaria patient's *P. falciparum* genomic DNA amplification yield, extracted to blood, saliva and urine samples. This survey suggested different aptitudes and/or performances of previous mentioned biological samples in term of presence and/or absence of *P. falciparum* genomic DNA amplification product. Without a doubt, despite the low levels of plasmodial DNA amplification yield in urine (27%) and saliva (40%) compared to blood (91%), the present analysis suggested a good propensity as well as a real potential of both saliva and urine samples in malaria molecular diagnosis process advising their suitability for antimalarial resistance genes study. However, it is noteworthy to underline that the proportion of amplified *P. falciparum* genomic DNA in blood, saliva and urine samples by handling our malaria patient population is comparable with those obtained by Ghayour-Najafabadi et al. (2014) in Iran (95, 47 and 29% respectively in blood, saliva and urine), where malaria transmission level is similar. Also, our findings resulted to be in agreement with those of Mharakurwa et al. (2006)

in Zambia and Nwakanma in the Gambia (Nwakanma et al., 2009) suggesting that the sensitivity of molecular methods discriminating malaria patients via saliva and urine samples was affected by several factors, such as DNA extraction methods, target gene size, sample fraction and/or type and sample conservation methodology (Nantavisai, 2014). A commercial *Qiagen* kit saliva extraction had a 2.6-times success rate compared to the Chelex, which we have used.

Then, the low level of *P. falciparum* genomic DNA amplification yield in saliva and urine samples could be related to DNA fragment size to be amplified. Indeed, the possibility of detection of amplification yield increases with shorter fragments (Mharakurwa et al., 2006; Poe et al., 2011). The low level of amplification yield in urine and saliva can also be explained by the fact that either the plasmodial DNA in these biological products (saliva and urine) was not enough to provide a useful amplification model and/or that new genomic DNA isolation, purification or concentration methods are necessary. However, while *pfprt*, *pfdhfr* and *pfK13 propeller* antimalarial resistance genes were clearly detectable in blood and saliva, only two of these genes were measurable in the urine. These results suggested blood and saliva as suitable biological samples detecting *pfdhfr* and *pfK13 propeller* genes in malaria patients. Nevertheless, previous studies using specific primers of antimalarial resistance genes have shown that infection detected in saliva or urine samples was consistently identical to that found in the corresponding peripheral blood of the same individual and/or malaria patient advising the former's as potential biological samples for the molecular diagnosis of malaria (Mharakurwa et al., 2006; Nwakanma et al., 2009; Putaporntip et al., 2011). Also, we performed a multivariate statistical analysis via a z-score test with the purpose to establish an association and/or link between processed biological samples and antimalarial resistance genes detection in saliva, urine and blood by processing our above described malaria patient populations. This survey highlighted (i) *pfK13 propeller*, *pfdhfr* and *pfprt* and (ii) *pfK13 propeller* and *pfdhfr* gene groups, detected in blood and saliva samples respectively as a satisfactory system discriminating malaria patient and/or malaria pathology through molecular methodology. In addition, merging our descriptive statistical results reported in Table 2 with those of Pearson's correlation test by weighing *pfdhfr*, *pfprt* and *pfK13 propeller P. falciparum* genes abundance and/or proportion in blood, saliva and urine samples discerning malaria patients, the present study indexed urine sample as a potential sources of variability in the studied malaria population as opposed to saliva and blood. In the same tendency we performed a biplot dispersion analysis. Considering as a whole, the same survey suggested a comparable performance between blood and saliva in terms of malaria patient population dispersion by measuring the aptitude of *pfdhfr*, *pfprt* and

*pfK13 propeller P. falciparum* genes in the previous mentioned biological samples (blood and saliva). These results and/or tendency were relatively confirmed by processed Pearson correlation test, which at the same time suggested a negative correlation between urine components and those of both blood and saliva samples. Taking together, these results indicate saliva as the best alternative to blood for malaria molecular diagnosis procedure. Our results are consistent with those of Nantavisai (2004) who observed that molecular detection of plasmodial DNA in malarial subjects' urine was less sensitive than in saliva. This is probably due to the small amount of DNA matrix in the urine compared to blood and saliva. Furthermore, a quantitative real-time PCR survey showed that plasmodial DNA amount in blood sample was 600 and 2,500 fold higher than in saliva and urine respectively (Nwakanma et al., 2009). Next, parasite density (PD) parameter was integrated as control element discriminating malaria patients by molecular diagnosis. Thus, our statistical analysis evoked a low propensity of PD parameter assessing malaria molecular diagnosis methodology since exhibiting high variance and/or variability assessing malaria patient. Indeed, PD average of our considered experimental sites (see material and methods chapter) is greater than 500 parasites/ $\mu$ l of blood; threshold below which the effect of parasite density is perceptible in the molecular diagnosis of malaria (Bousema et al., 2014). Also, our findings suggested that the detectability of both *pfdhfr* and *pfKk13 propeller* genes in saliva sample was poorly correlated with the prevalence of PD. However, it is interesting to note that PD parameter showed the same trends in Pearson's correlation survey with both blood and saliva as opposed to urine sample confirming the susceptibility of saliva as a biological sample for processing malaria molecular diagnosis alternatively to blood sample. Our performed receiver operational characteristic (ROC) analysis evaluating *P. falciparum* gene markers in discriminating malaria patients by sensitivity, specificity, accuracy and positive predictive parameters assuming blood sample as reference, evidenced the high performance and/or tendency of saliva sample to substitute blood in malaria molecular diagnosis procedure as opposed to urine. Interestingly it is noteworthy to underline that the same analysis exhibited *pfdhfr-ts* gene as the best molecular marker discerning and predicting accurately malaria patients since displaying the highest sensitivity, specificity, accuracy as well as positive predictive value with respect to urine sample.

## Conclusion

Assuming blood sample as biological reference product, our findings revealed high levels of *pfprt*, *pfdhfr* and *pfK13 propeller* antimalarials resistance-conferring genes amplification yield in saliva with respect to urine sample.

Also, we were able to easily detect *pfcr1*, *pfdfhr* and *pfK13 propeller* genes in both blood and saliva, while the *pfcr1* gene was not detectable in the urine sample. Next, performed multivariate statistical analysis proposed saliva as the best alternative to blood for the molecular diagnosis of malaria as well as for the study of molecular markers of antimalarial resistance. The same investigation revealed that blood and saliva could both be used to significantly discriminate malaria patients based on molecular detection of either (i) the set of genes *pfcr1*, *pfdfhr*, and *pfK13 propeller* for blood samples; or (ii) the set of genes *pfdfhr* and *pfK13 propeller* for saliva samples. Finally, this study suggested saliva as a valid alternative to blood sample to detect malaria patients by molecular approach as well as emphasized the recurrence of *pfdfhr* gene in saliva as a reliable biomarker calling accurately malaria patient.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors express their profound gratitude to Professor Mireille DOSSO (Director of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire) who allowed them to use the facilities of the molecular biology platform of the Institut Pasteur of Côte d'Ivoire to perform the PCR tests. The authors also thank Professor Nafan DIARRASSOUBA (Director of the Training and Research Unit of the Péléforo Gon Coulibaly University in Korhogo) who assisted in the statistical analysis of our data. Finally, acknowledged the staff-members of the study sites (Anonkoua-kouté, Port-Bouët and Ayamé) for their efforts and co-operation in patient's enrollment and samples collection.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interest.

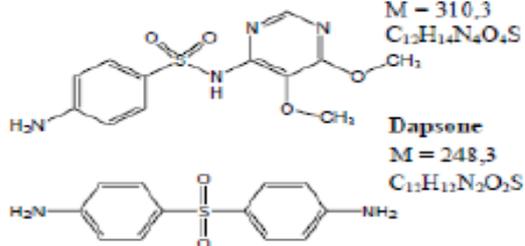
## REFERENCES

- Adja AM, N'goran EK, Koudou BG, Dia I, Kengne P, Fontenille D, Chandre F (2011). Contribution of *Anopheles funestus*, *An. gambiae* and *An. nili* (Diptera: Culicidae) to the perennial malaria transmission in the southern and western forest areas of Côte d'Ivoire. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 105(1):13-24.
- Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C (2004). Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(12):833-840.
- Buppan P, Putaporntip C, Pattanawong U, Seethamchai S, Jongwutiwes S (2010). Comparative detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. *Malar. J.* 9:72.
- Core Team R (2013). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Dago ND, Diarrassouba N, Nguessan AK, Lamine BM (2016). Computational Statistics Assessing the Relationship between Different Rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens*) Treatments in Cereal Cultivation. *Am. J. Bioinf. Res.* 6(1):1-13.
- Ghayour-Najafabadi Z, Oormazdi H, Akhlaghi L, Meamar AR, Raeisi A, Rampisheh Z, Nateghpour M, Razmjou E (2014). Mitochondrial PCR-based malaria detection in saliva and urine of symptomatic patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 108(6):358-362.
- Kain KC, Lanar DE (1991). Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *J. Clin. Microbiol.* 29:1171-1174.
- Mharakurwa S, Simoloka C, Thuma PE, Shiff CJ, Sullivan DJ (2006). PCR detection of *Plasmodium falciparum* in human urine and saliva samples. *Malar. J.* 5:103.
- Miguel RH, Coura JR, Samudio F, Suárez-mutis MC (2013). Evaluation of three different DNA extraction methods from blood samples collected in dried filter paper in *Plasmodium* subpatent infections from the Amazon region in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 55(3):205-208.
- Murray CK, Gasser RA Jr, Magill AJ, Miller RS (2008). Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:97-110.
- Nantavisai K (2014). Malaria detection using non-blood samples. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 36(6):633-641.
- Nwakanma DC, Gomez-Escobar N, Walther M, Crozier S, Dubovsky F, Malkin E, Locke E, Conway DJ (2009). Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva blood and urine. *J. Infect. Dis.* 199:1567-1574.
- Plowe CV, Welles TE (1995). Molecular approaches to the spreading problem of drug resistant malaria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 390:197-209.
- Pooe OJ, Shonhai A, Mharakurwa S (2011). A PCR screen for malaria carrier infections using human saliva samples. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5(28):5120-5126.
- Putaporntip C, Buppan P, Jongwutiwes S (2011). Improved performance with saliva and urine as alternative DNA sources for malaria diagnosis by mitochondrial DNA-based PCR assays. *Clin. Microbiol. Infect.* 17(10):1484-1491.
- Putaporntip C, Hongsrimuang T, Seethamchai S, Kobasa T, Limkittikul K, Cui L, Jongwutiwes S (2009). Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. *J. Infect. Dis.* 199(8):1143-1150.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaitong S, Brown KN (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61(2):315-20.
- Sutherland CJ, Hallett R (2009). Detecting malaria parasites outside the Blood. *J. Infect. Dis.* 199(11):1561-1563.
- Swets J (1988). Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240(4857):1285-1293.
- World Health Organisation (WHO) (2015). World Malaria Report 2015, 243 p.

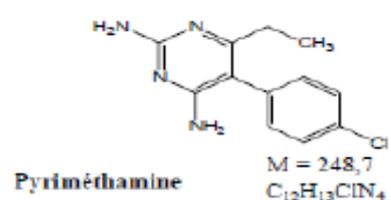
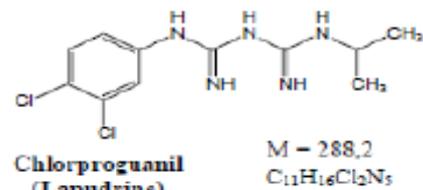
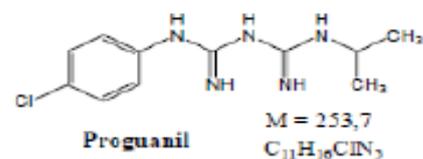
## AUTRES ANNEXES

### ANTIMETABOLITES

#### ANTIFOLIOUES

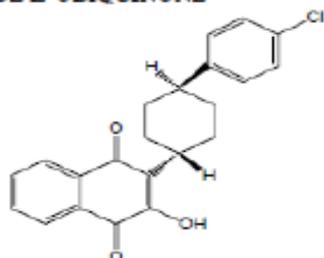


#### ANTIFOLINIQUES

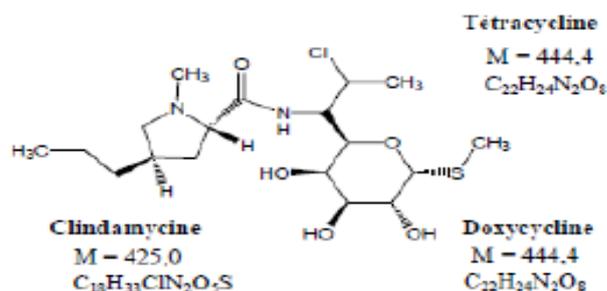


#### ANALOGUES DE L'UBIQUINONE

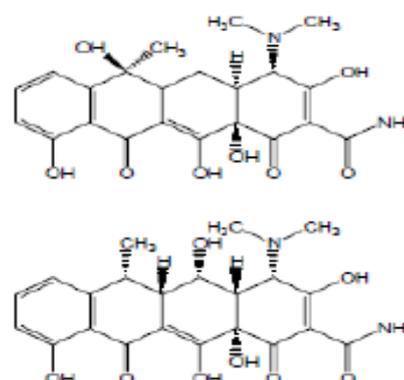
**Atovaquone**  
M = 366,8  
C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>ClO<sub>3</sub>



#### ANTIBIOTIQUES

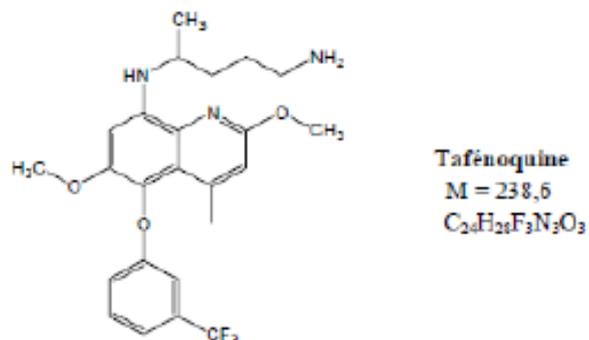
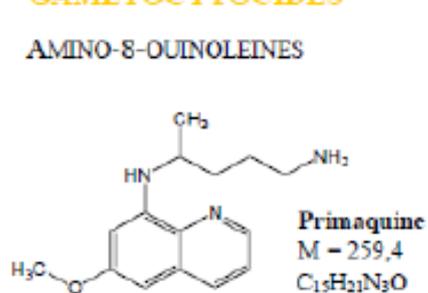


**Doxycycline**  
M = 444,4  
C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>



### GAMETOCYTOCIDES

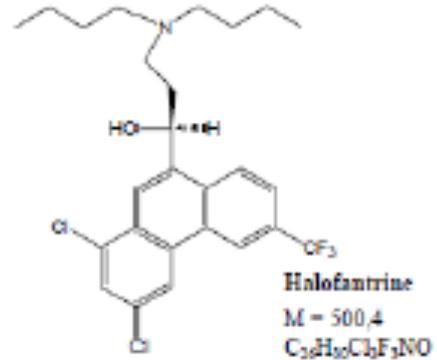
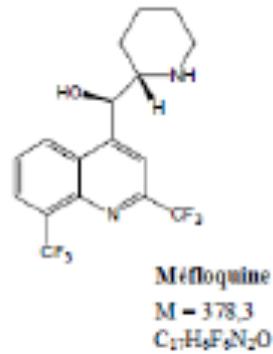
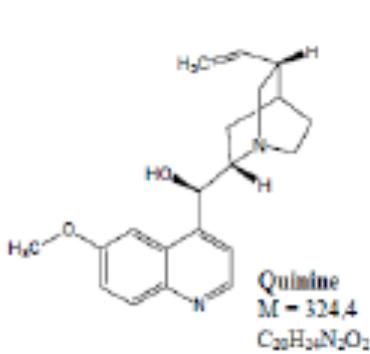
#### AMINO-8-QUINOLEINES



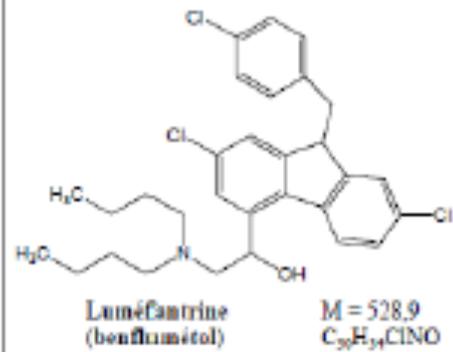
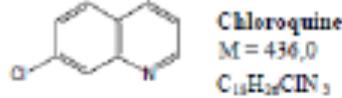
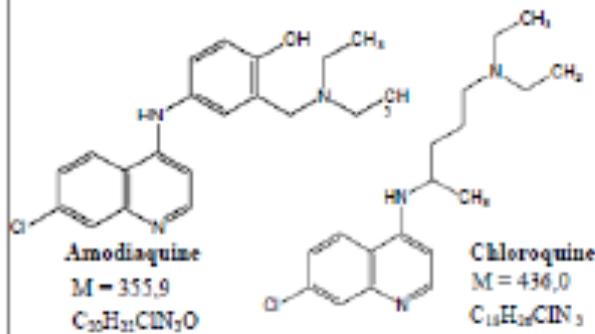
A : Structures des antimétabolites et des gamétocytocides.

## LYSOSOMOTROPES

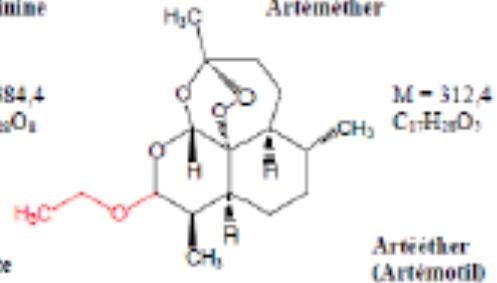
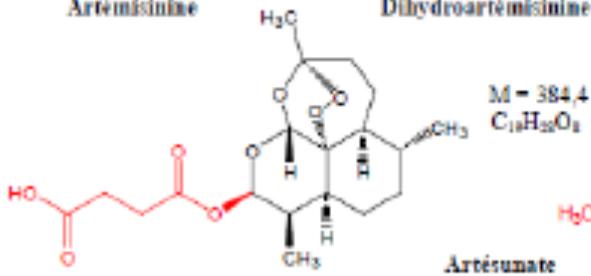
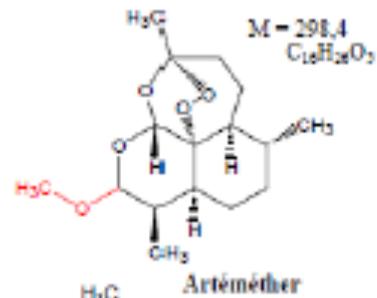
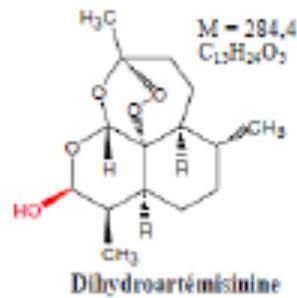
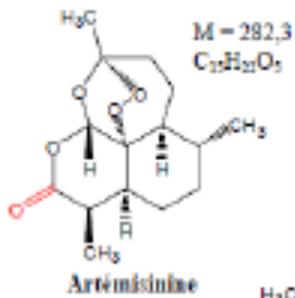
### AMINO-ALCOOLS



### AMINO-4-QUINOLEINES



### SESQUITERPENES



**B** : Structures des lysosomotropes.

**Annexe 1** : Structures des schizonticides érythrocytaires et tissulaires.

<b>Acides aminés</b>	<b>Abréviations 3-Lettres</b>	<b>Abréviations 1 -Lettre</b>	<b>Codon(s)</b>
Alanine	Ala	A	GCA, GCC, GCG, GCT
Arginine	Arg	R	CGA, CGC, CGG, CGT, AGA, AGG
Acide Aspartique	Asp	D	GAC, GAT
Asparagine	Asn	N	AAC, AAT
Cystéine	Cys	C	TGC, TGT
Acide Glutamique	Glu	E	GAA, GAG
Glutamine	Gln	Q	CAA, CAG
Glycine	Gly	G	GGA, GGC, GGG, GGT
Histidine	His	H	CAC, CAT
Isoleucine	Ile	I	ATA, ATC, ATT
Leucine	Leu	L	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
Lysine	Lys	K	AAA, AAG
Méthionine	Met	M	ATG
Phénylalanine	Phe	F	TTC, TTT
Proline	Pro	P	CCA, CCC, CCG, CCT
Serine	Ser	S	TCA, TCC, TCG, TCT, AGC, AGT
Thréonine	Thr	T	ACT, ACC, ACG, ACT
Tryptophane	Trp	W	TGG
Tyrosine	Tyr	Y	TAC, TAT
Valine	Val	V	GTA, GTC, GTG, GTT

**Annexe 2:** Les abréviations d'une lettre pour chaque acide aminé et leur correspondance aux codons ADN

M K F A S K K N N Q K N S S K N D E 18  
 ATG AAA TTC GCA AGT AAA AAA AAT AAT CAA AAA AAT TCA AGC AAA AAT GAC GAG 54  
 R Y R E L D N L V Q E G N G S R L G 36  
 CGT TAT AGA GAA TTA GAT AAT TTA GTA CAA GAA GGA AAT GGC TCA CGT TTA GGT 108  
 G G S C L G K C A H V F K L I F K E 54  
 GGA GGT TCT TGT CTT **GGT AAA TGT GCT CAT GTG TTT AAA CTT ATT** TTT AAA GAG 162  
 I K D N I F I Y I L S I I Y L S V C 72  
 ATT AAG GAT AAT ATT TTT ATT TAT ATT TTA AGT ATT ATT TAT TTA AGT GTA TGT 216  
**74 75 76**  
 V **M N K** I F A K R T L N K I G N Y S 90  
 GTA **ATG AAC AAA** ATT TTT GCT AAA AGA ACT TTA AAC AAA ATT GGT AAC TAT AGT 270  
 F V T S E T H N F I C M I M F I V 108  
 TTT GTA ACT TCC GAA ACT CAC AAC TTT ATT TGT ATG ATT ATG TTC TTT ATT GTT 324  
 Y S L F G N K I T F E F **P** F L F **P** F 126  
 TAT TCC TTA TTT GGA AAT AAA **ATT ACT TTT GAA TTT CCC TTT TTA TTT CCA TT**T 378  
 N L Q F F A I S M L D A C S V I L A 144  
 AAT TTA CAA TTT TTT GCT ATA TCC ATG TTA GAT GCC TGT TCA GTC ATT TTG GCC 432  
 F I G L T R T A G N I Q S F V L Q L 162  
 TTC ATA GGT CTT ACA AGA AAT GCT GGA AAT ATC CAA TCA TTT GTT CTT CAA TTA 486  
 R I P I N M F F C F L I L R Y R Y H 180  
 AGG ATT CCT ATT AAT ATG TTC TTC TGC TTT TTA ATA TTA AGA TAT AGA TAT CAC 540  
 L Y N Y L G A V I I V V T I A L V E 198  
 TTA TAC AAT TAT CTC GGA GCA GTT ATT ATT GTT GTA ACA ATA GCT CTT GTA GAA 594  
 M K L S F E T Q E E N S I I F N L V 216  
 ATG AAA TTA TCT TTT GAA ACA CAA GAA AAT TCT ATC ATA TTT AAT CTT GTC 648  
 L I S S L I P V C F S N M T R E I V 234  
 TTA ATT AGT TCC TTA ATT CCT GTA TGC TTT TCA AAC ATG ACA AGG GAA ATA GTT 702  
 F K K Y K I D I L R L N A M V S F F 252  
 TTT AAA AAA TAT AAG ATT GAC ATT TTA AGA TTA AAT GCT ATG GTA TCC TTT TTC 756  
 Q L F T S C L I L P V Y T L P F L K 270  
 CAA TTG TTC ACT TCT TGT CTT ATA TTA CCT GTA TAC ACC CTT CCA TTT TTA AAA 810  
 E L H L L Y N E I W T N I K N G F A 288  
 GAA CTT CAT TTA CTA TAT AAT GAA ATA TGG ACA AAT ATA AAA AAT GGT TTC GCA 864  
 C L F L G R N T V V E N C G L G M A 306  
 TGT TTA TTC TTG GGA AGA AAC ACA GTC GTA GAG AAT TGT GGT CTT GGT ATG GCT 918  
 K L C D D C D G A W K T F A L F S F 324  
 AAG TTA TGT GAT GAT TGT GAC GGA GCA TGG AAA ACC TTC GCA TTG TTT TCC TTC 972  
 F S I C D N L I T S Y I I D K F S T 342  
 TTT GAC ATT TGT GAT AAT TTA ATA ACC AGC TAT ATT ATC GAC AAA TTT TCT ACC 1026  
 M T Y T I V S C I Q G P A I A I A Y 360  
 ATG ACA TAT ACT ATT GTT AGT TGT ATA CAA GGT CCA GCA ATA GCA ATT GCT TAT 1080  
 Y F K F L A G D V V I E P R L L D F 378  
 TAC TTT AAA TTC TTA GCC GGT GAT GTT GTA ATA GAA CCA AGA TTA TTA GAT TTC 1134  
 V T L F G Y L F G S I I Y R V G N I 396  
 GTA ACT TTG TTT GGC TAC CTA TTT GGT TCT ATA ATT TAC CGT GTA GGA AAT ATT 1188  
 I L E R K K M R N E E N E D S E G E 414  
 ATC TTA GAA AGA AAA AAA ATG AGA AAT GAA GAA AAT GAA GAT TCC GAA GGA GAA 1242  
 L T N V D S 420  
 TTA ACC AAC GTC GAT TCA 1260

**A: Séquence complète du gène *pfcr1* (1260 nucléotides).**

M M E Q V C D V F D I Y A I C **16**  
**ATG ATG GAA CAA GTC TGC GAC GTT** TTC GAT ATT TAT GCC ATA TGT **GCA** TGT TGT 54  
 K V E S K N E G K K N E V F N N Y T 36  
 AAG GTT GAA AGC AAA AAT GAG GGG AAA AAA AAT GAG GTT TTT AAT AAC TAC ACA 108  
**51**  
 F R G L G N K G V L P W K C **N** S L D 54  
 TTT AGA GGT CTA GGA AAT AAA GGA GTA TTA CCA TGG AAA TGT **AAT** TCC CTA GAT 162  
**59**  
 M K Y F **C** A V T T Y V N E S K Y E K 72  
 ATG AAA TAT TTT **TGT** GCA GTT ACA ACA TAT GTG AAT GAA TCA AAA TAT GAA AAA 216

L K Y K R C K Y L N K E T V D N V N 90  
TTG AAA TAT AAG AGA TGT AAA TAT TTA AAC AAA GAA ACT GTG GAT AAT GTA AAT 270  
108  
D M P N S K K L Q N V V V M G R T S 108  
GAT ATG CCT AAT TCT AAA AAA TTA CAA AAT GTT GTA GTT ATG GGA AGA ACA AGC 324  
W E S I P K K F K P L S N R I N V I 126  
TGG GAA AGC ATT CCA AAA AAA TTT AAA CCT TTA AGC AAT AGG ATA AAT GTT ATA 378  
L S R T L K K E D F D E D V Y I I N 144  
TTG TCT AGA ACC TTA AAA AAA GAA GAT TTT GAT GAA GAT GTT TAT ATC ATT AAC 432  
K V E D L I V L L G K L N Y Y K C F 162  
AAA GTT GAA GAT CTA ATA GTT TTA CTT GGG AAA TTA AAT TAC TAT AAA TGT TTT 486  
164  
I I G G S V V Y Q E F L E K K L I K 180  
ATT ATA GGA GGT TCC GTT GTT TAT CAA GAA TTT TTA GAA AAG AAA TTA ATA AAA 540  
K I Y F T R I N S T Y E C D V F F P 198  
AAA ATA TAT TTT ACT AGA ATA AAT AGT ACA TAT GAA TGT GAT GTA TTT TTT CCA 594  
E I N E N E Y Q I I S V S D V Y T S 216  
GAA ATA AAT GAA AAT GAG TAT CAA ATT ATT TCT GTT AGC GAT GTA TAT ACT AGT 648  
N N T T L D F I I Y K K T N N K M L 234  
AAC AAT ACA ACA TTG GAT TTT ATC ATT TAT AAG AAA ACG AAT AAT AAA ATG TTA 702  
N E Q N C I K G E E K N N D M P L K 252  
AAT GAA CAA AAT TGT ATA AAA GGA GAA GAA AAA AAT AAT GAT ATG CCT TTA AAG 756  
N D D K K D T C H M K K L T E F Y K N 270  
AAT GAT GAC AAA GAT ACA TGT CAT ATG AAA AAA TTA ACA GAA TTT TAC AAA AAT 810  
V D K Y K I N Y E N D D D D E E E D 288  
GTA GAC AAA TAT AAA ATT AAT TAT GAA AAT GAT GAT GAT GAT GAA GAA GAA GAT 864  
D F V Y F N F N K E K E E K N K N S 306  
GAT TTT GTT TAT TTT AAT TTT AAT AAA GAA AAA GAA GAG AAA AAT AAA AAT TCT 918  
I H P N D F Q I Y N S L K Y K Y H P 324  
ATA CAT CCA AAT GAT TTT CAA ATA TAT AAT AGC TTG AAA TAT AAA TAT CAT CCT 972  
E Y Q Y L N I I Y D I M M N G N K Q 342  
GAA TAC CAA TAT TTA AAT ATT ATT TAT GAT ATT ATG ATG AAT GGA AAT AAA CAA 1026  
S D R T G V G V L S K F G Y I M K F 360  
AGT GAT CGA ACG GGA GTA GGT GTT TTA AGT AAA TTC GGA TAT ATT ATG AAA TTT 1080  
D L S Q Y F P L L T T K K L F L R G 378  
GAT TTA AGT CAA TAT TTC CCA TTA TTA ACT ACG AAG AAA TTA TTT TTA AGA GGA 1134  
I I E E L L W F I R G E T N G N T L 396  
ATT ATT GAA GAA TTG CTT TGG TTT ATT AGA GGA GAA ACA AAT GGT AAT ACG TTG 1188  
L N K N V R I W E A N G T R E F L D 414  
TTA AAT AAG AAT GTA AGG ATA TGG GAA GCT AAT GGT ACT AGG GAA TTT TTA GAT 1242  
N R K L F H R E V N D L G P I Y G F 432  
AAT AGA AAA TTA TTT CAT AGA GAA GTT AAC GAT TTA GGA CCT ATT TAT GGT TTT 1296  
Q W R H F G A E Y T N M Y D N Y E N 450  
CAA TGG AGA CAT TTC GGT GCT GAA TAT ACA AAT ATG TAT GAT AAT TAT GAA AAT 1350  
K G V D Q L K N I I N L I K N D P T 468  
AAA GGA GTG GAT CAA TTA AAA AAT ATA ATA AAT TTA ATT AAA AAT GAT CCT ACA 1404  
S R R I L L C A W N V K D L D Q M A 486  
AGT AGA AGA ATT CTT TTG TGT GCA TGG AAT GTA AAA GAT CTT GAC CAA ATG GCA 1458  
L P P C H I L C Q F Y V F D G K L S 504  
TTA CCT CCT TGT CAT ATT TTA TGT CAG TTT TAT GTT TTC GAT GGG AAA TTA TCA 1512  
C I M Y Q R S C D L G L G V P F N I 522  
TGT ATT ATG TAT CAA AGA TCA TGT GAT TTA GGG CTA GGA GTA CCT TTT AAT ATT 1566  
A S Y S I F T H M I A Q V C N L Q P 540  
GCT TCT TAT TCT ATT TTT ACT CAT ATG ATT GCA CAA GTC TGT AAT TTG CAA CCT 1620  
A Q F I H V L G N A H V Y N N H I D 558  
GCG CAG TTC ATA CAC GTT TTA GGA AAT GCA CAT GTT TAT AAT AAT CAC ATT GAT 1674  
S L K I Q L N R I P Y P F P T L K L 576  
AGT TTA AAA ATT CAA CTT AAC AGA ATA CCC TAT CCA TTC CCA ACA CTT AAA TTA 1728  
N P D I K N I E D F T I S D F T I Q 594  
AAT CCA GAT ATT AAA AAT ATT GAA GAT TTT ACA ATT TCG GAT TTT ACA ATA CAA 1782  
N Y V H H E K I S M D M A A \* 609  
AAT TAT GTT CAT CAT GAA AAA ATT TCA ATG GAT ATG GCT GCT TAA 1827

**B: Séquence complète du gène *dhfr-ts* (1827 nucléotides).**

M E G E K V K T K A N S I S N F S M 18  
ATG GAA GGA GAA AAA GTA AAA ACA AAA GCA AAT AGT ATC TCG AAT TTT TCT ATG 54  
T Y D R E S G G N S N S D D K S G S 36  
ACG TAT GAT AGG GAA TCT GGT GGT AAC AGC AAT AGT GAT GAT AAA AGC GGA AGT 108  
S S E N D S N S F M N L T S D K N E 54  
AGT AGC GAG AAT GAT TCT AAT TCA TTT ATG AAT CTA ACT AGT GAT AAA AAT GAG 162  
K T E N N S F L L N N S S Y G N V K 72  
AAA ACG GAA AAT AAT AGT TTC CTT TTA AAT AAT AGT AGT TAT GGA AAT GTT AAA 216  
D S L L E S I D M S V L D S N F D S 90  
GAT AGC CTA TTA GAA TCC ATT GAT ATG AGT GTA TTA GAT TCG AAC TTT GAT AGT 270  
K K D F L P S N L S R T F N N M S K 108  
AAA AAA GAT TTT TTA CCA AGT AAT TTA TCA AGA ACA TTT AAT AAT ATG TCT AAA 324  
D N I G N K Y L N K L L N K K K D T 126  
GAT AAT ATA GGA AAT AAA TAT TTA AAT AAA TTG TTA AAT AAA AAA AAA GAT ACT 378  
I T N E N N N I N H N N N N N L T 144  
ATT ACA AAT GAA AAT AAT AAT ATT AAT CAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT CTG ACA 432  
A N N I T N N L I N N N M N S P S I 162  
GCA AAT AAT ATA ACT AAT AAT CTT ATT AAT AAT AAT ATG AAT TCT CCA TCA ATT 486  
M N T N K K E N F L D A A N L I N D 180  
ATG AAT ACC AAC AAA AAA GAG AAT TTT TTA GAT GCA GCA AAT CTT ATA AAT GAT 540  
D S G L N N L K K F S T V N N V N D 198  
GAT TCT GGA TTA AAC AAT TTA AAA AAA TTT TCA ACT GTA AAT AAT GTA AAT GAT 594  
T Y E K K I I E T E L S D A S D F E 216  
ACT TAT GAA AAG AAA ATT ATT GAA ACG GAA TTA AGT GAT GCT AGT GAT TTT GAA 648  
N M V G D L R I T F I N W L K K T Q 234  
AAT ATG GTA GGT GAT TTA AGA ATT ACA TTT ATT AAT TGG TTA AAA AAG ACA CAA 702  
M N F I R E K D K L F K D K K E L E 252  
ATG AAT TTT ATT CGA GAA AAA GAT AAA TTA TTT AAA GAT AAG AAA GAA CTA GAA 756  
M E R V R L Y K E L E N R K N I E E 270  
ATG GAA AGA GTA CGA TTG TAC AAA GAA TTA GAA AAC CGT AAA AAT ATT GAA GAA 810  
Q K L H D E R K K L D I D I S N G Y 288  
CAG AAA TTA CAT GAT GAA AGA AAG AAA TTA GAT ATT GAT ATA TCT AAT GGT TAT 864  
K Q I K K E K E E H R K R F D E E R 306  
AAA CAA ATA AAA AAA GAA AAA GAA GAA CAT AGG AAA CGA TTT GAT GAA GAA AGA 918  
L R F L Q E I D K I K L V L Y L E K 324  
TTA AGA TTT TTA CAA GAA ATC GAT AAA ATT AAA TTA GTA TTA TAT TTA GAA AAA 972  
E K Y Y Q E Y K N F E N D K K K I V 342  
GAA AAA TAT TAT CAA GAA TAT AAA AAT TTT GAG AAT GAT AAA AAA AAA ATT GTT 1026  
D A N I A T E T M I D I N V G G A I 360  
GAT GCA AAT ATT GCT ACT GAA ACT ATG ATT GAT ATT AAT GTT GGT GGA GCT ATT 1080  
F E T S R H T L T Q Q K D S F I E K 378  
TTT GAA ACA TCT AGA CAT ACC TTA ACA CAA CAA AAA GAT TCA TTT ATA GAG AAA 1134  
L L S G R H H V T R D K Q G R I F L 396  
TTA TTA AGT GGA AGA CAT CAT GTA ACC AGA GAT AAA CAA GGA AGA ATA TTC TTA 1188  
D R D S E L F R I I L N F L R N P L 414  
GAT AGG GAT AGT GAG TTA TTT AGA ATT ATA CTT AAC TTC TTA AGA AAT CCG TTA 1242  
T I P I P K D L S E S E A L L K E A 432  
ACT ATA CCC ATA CCA AAA GAT TTA AGT GAA AGT GAA GCC TTG TTG AAA GAA GCA 1296  
E F Y G I K F L P F P L V T C I G G 450  
GAA TTT TAT GGT ATT AAA TTT TTA CCA TTC CCA TTA GTA TTT TGT ATA GGT GGA 1350  
F D G V E Y L N S M E L L D I S Q Q 468  
TTT GAT GGT GTA GAA TAT TTA AAT TCG ATG GAA TTA TTA GAT ATT AGT CAA CAA 1404  
  
C W R M C T P 476 S T K K A Y F G S A 486  
TGC TGG CGT ATG TGT ACA CCT ATG TCT ACC AAA AAA GCT TAT TTT GGA AGT GCT 1458  
  
V L N N F L Y V F G G N N Y D Y K A 504  
GTA TTG AAT AAT TTC TTA TAC GTT TTT GGT GGT AAT AAC TAT GAT TAT AAG GCT 1512  
L F E T E V Y D R L R D V W Y V S S 522  
TTA TTT GAA ACT GAG GTG TAT GAT CGT TTA AGA GAT GTA TGG TAT GTT TCA AGT 1566  
  
L L N I P R R N N C G V T S N G 539 I 540  
AAT TTA AAT ATA CCT AGA AGA AAT AAT TGT GGT GTT ACG TCA AAT GGT ACA ATT 1620  
  
Y C I G G Y D G S S I I P N V E A Y 558  
TAT TGT AAT GGG GGA TAT GAT GGC TCT TCT ATT ATA CCG AAT GTA GAA GCA TAT 1674

D	H	R	M	K	A	W	V	E	V	A	P	L	N	T	P	R	S	576
GAT	CAT	CGT	ATG	AAA	GCA	TGG	GTA	GAG	GTG	GCA	CCT	TTG	AAT	ACC	CCT	AGA	TCA	1728
			<b>580</b>															
S	A	M	C	V	A	F	D	N	K	I	Y	V	I	G	G	T	N	594
TCA	GCT	ATG	TCT	GTT	GCT	TTT	GAT	AAT	AAA	ATT	TAT	GTC	ATT	GGT	GGA	ACT	AAT	1782
G	E	R	L	N	S	I	E	V	Y	E	E	K	M	N	K	W	E	612
GGT	GAG	AGA	TTA	AAT	TCT	ATT	GAA	GTA	TAT	GAA	GAA	AAA	ATG	AAT	AAA	TGG	GAA	1836
Q	F	P	Y	A	L	L	E	A	R	S	S	G	A	A	F	N	Y	630
CAA	TTT	CCA	TAT	GCC	TTA	TTA	GAA	GCT	AGA	AGT	TCA	GGA	GCA	GCT	TTT	AAT	TAC	1890
L	N	Q	I	Y	V	V	G	G	I	D	N	E	H	N	I	L	D	648
CTT	AAT	CAA	ATA	TAT	GTT	GTT	GGA	GGT	ATT	GAT	AAT	GAA	CAT	AAC	ATA	TTA	GAT	1944
S	V	E	Q	Y	Q	P	F	N	K	R	W	Q	F	L	N	G	V	666
TCC	GTT	GAA	CAA	TAT	CAA	CCA	TTT	AAT	AAA	AGA	TGG	CAA	TTT	CTA	AAT	GGT	GTA	1998
P	E	K	K	M	N	F	G	A	A	T	L	S	D	S	Y	I	I	684
CCA	GAG	AAA	AAA	ATG	AAT	TTT	GGA	GCT	GCC	ACA	TTG	TCA	GAT	TCT	TAT	ATA	ATT	2052
T	G	G	E	N	G	E	V	L	N	S	C	H	F	F	S	P	D	702
ACA	GGA	GGA	GAA	AAT	GGC	GAA	GTT	CTA	AAT	TCA	TGT	CAT	TTC	TTT	TCA	CCA	GAT	2106
T	N	E	W	Q	L	G	P	S	L	L	V	P	R	F	G	H	S	720
ACA	AAT	GAA	TGG	CAG	CTT	GGC	CCA	TCT	TTA	TTA	GT	CCC	AGA	TTT	GGT	CAC	TCC	2160
V	L	I	A	N	I													727
GTT	TTA	ATA	GCA	AAT	ATA	TAA												2181

**C:** Séquence complète du gène *pfK13 propeller* (2181 nucléotides).

**Annexe 3:** Séquences des gènes (*pfcr1*, *dhfr-ts* et *K13 propeller*) utilisées.

## FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

**Titre du projet :** Caractérisation des gènes *pfcr1*, *pfdhfr-ts* et *K13 propeller* de *plasmodium falciparum* dans la salive et l'urine de sujets atteints de paludisme simple

**Investigateur Principal:** M. DAGNOGO Oléfongo, BP V 34 Abidjan 01,

Téléphone 22 48 00 70

Je soussigné ~~M~~, Mme, ~~Mlle~~ Yapi Achie Sylviane

Atteste avoir reçu toutes les informations sur cette étude dont le but est d'étudier le polymorphisme des gènes *pfcr1*, *pfdhfr-ts* et *K13 propeller* de *Plasmodium falciparum* dans la salive et l'urine de sujets atteints de paludisme simple

J'ai compris ce qu'on demande à moi en participant à l'étude.

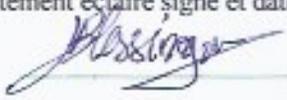
J'ai également compris que je pourrai décider de retirer mon consentement à n'importe quel moment sans aucun préjudice.

Je suis d'accord que des échantillons de sang, de salive et d'urines soient conservés au laboratoire pour une utilisation ultérieure mais uniquement dans un but purement scientifique avec respect de la confidentialité et sous réserve de l'approbation préalable du Comité National d'Ethique de Côte d'Ivoire (CNER)

J'ai reçu une copie de ce formulaire de consentement éclairé signé et daté.

\_\_\_\_\_  
Empreinte digitale

ou

  
Signature du Participant

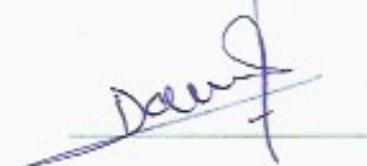
25/07/2015

date

  
Signature du témoin

25/07/2015

date

  
Signature de l'investigateur

25/07/2015

date

**Annexe 4 : Formulaire de consentement**

FICHE D'ENQUETE

Date d'inclusion... 25/07/2015	N° du Patient... AY003
Site du Prélèvement... AYAME	
Symptomatique <input type="checkbox"/>	Asymptomatique <input type="checkbox"/>   Température 37,9 °C

<b>DONNEES DEMOGRAPHIQUES</b>	
Date de Naissance 27/03/1991	Age 24 ans ou ..... mois
Poids 59 Kg ou ..... g	Cél ..... /mm <sup>3</sup>
Sexe Masculin <input type="checkbox"/>	Féminin <input checked="" type="checkbox"/>
Quartier d'habitation	

<b>CONDITIONS SOCIO-ECONOMIQUE DES PARENTS</b>	
Profession du Père Instituteur	Quartier de travail AYAME
ou tuteur	
Profession de la mère Ménagère	Quartier de travail AYAME
ou tutrice	
Quartier d'habitation des parents ou tuteurs	

<b>ANTECEDENTS MEDICAUX</b> ASTHME

<b>ANTECEDENTS DE PALUDISME</b>	
Date de l'accès précédent Novembre 2014	Date inconnue <input type="checkbox"/>
Anti-paludique utilisé: oublié	
Posologie oubliée	Durée du traitement 03 Jour(s)
	Du ..... au .....

<b>PREVENTION CONTRE LE PALUDISME</b>		
Oui: <input type="checkbox"/>	Non: <input checked="" type="checkbox"/>	
Moustiquaire imprégnée d'insecticide <input type="checkbox"/>	Repellent <input type="checkbox"/>	Autre <input type="checkbox"/>

<b>DONNEES BIOLOGIQUES</b>					
Infection à	P.f <input checked="" type="checkbox"/>	P.m <input type="checkbox"/>	P.o <input type="checkbox"/>	P.v <input type="checkbox"/>	
Parasitémie: 16200	Tpz/mm <sup>3</sup> de sang		Gamétocytémie: ..... /mm <sup>3</sup> de sang		
	Sang	Confettis <input checked="" type="checkbox"/>	Culot globulaire <input checked="" type="checkbox"/>	Volume ..... µl	
Pour PCR	Salive	Confettis <input checked="" type="checkbox"/>	Salive + Ethanol <input checked="" type="checkbox"/>	Volume ..... mL	
	Urine	Confettis <input checked="" type="checkbox"/>	Urine + Ethanol <input checked="" type="checkbox"/>	Volume ..... mL	

<b>INVESTIGATEUR:</b>		
Nom Dagnogo Olesongo	Signature 	Date 25/07/2015

## Plate forme de séquençage Cochin

Service de séquençage de Eurofins-Cochin

3è étage du Bâtiment G. Roussy,

27, rue du faubourg saint-jacques

75014 PARIS,

Tel : 01 43 54 49 08

[sequencagecochin@eurofins.com](mailto:sequencagecochin@eurofins.com)

### VOS COORDONNEES

Institut	Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
Unité	Paludologie
Adresse Postale	01 BP 490 Abidjan 01
Bénéficiaire	Dagnogo Oléfongo
N° du bon de commande ou carte EVO	6801
Nombre de séquences commandées	86
E-mail du bénéficiaire	olefongo@yahoo.fr
Téléphone bénéficiaire	+225 07 61 34 35

### BORDEREAU DE DEPOT

Initiales_NomSeq+oligo	N° puits	X si primer à ajouter	Type de matrice (P, R, B)	X si purification souhaitée	X si structure
D0_J93AB+K13NF	A1		R (800pb)		
DO_J102AB+K13NF	B1		R (800pb)		
DO_J24AS+K13NF	C1		R (800pb)		
DO_J41AS+K13NF	D1		R (800pb)		
DO_J43AS+K13NF	E1		R (800pb)		
DO_J44AS+K13NF	F1		R (800pb)		
DO_J56AS+K13NF	G1		R (800pb)		
DO_J63AS+K13NF	H1		R (800pb)		
DO_J64AS+K13NF	A2		R (800pb)		
DO_J74AS+K13NF	B2		R (800pb)		
OD_J75AS+K13NF	C2		R (800pb)		
OD_J86AS+K13NF	D2		R (800pb)		
OD_J26AU+K13NF	E2		R (800pb)		
OD_J41AU+K13NF	F2		R (800pb)		
OD_J43AU+K13NF	G2		R (800pb)		
OD_J47AU+K13NF	H2		R (800pb)		
OD_J51AU+K13NF	A3		R (800pb)		

Annexe 6 : Bordereau de dépôt pour séquençage

			Sang (N=86)	Salive (N=67)	Urine (N=52)
Codons	Souches et mutations observées		effectifs (%)	effectifs (%)	effectifs (%)
dhfr_51			<b>Sang (n=65)</b>	<b>Salive (n=57)</b>	<b>Urine (n=38)</b>
	Sauvage(N)	Asn-51	10 (15,38)	17 (29,82)	9 (23,68)
	Mutants	<b>Ile-51</b>	<b>40 (61,50)</b>	<b>28 (49,12)</b>	<b>23 (60,52)</b>
		Phe-51	7 (10,76)	6 (10,52)	1 (2,63)
		Lys-51	1 (1,53)	0 (0)	0 (0)
		Leu-51	3 (4,61)	0 (0)	0 (0)
		Pro-51	3 (4,61)	5 (8,77)	0 (0)
		Ser-51	1 (1,53)	0 (0)	0 (0)
		Met-51	0 (0)	1 (1,75)	0 (0)
		Thr-51	0 (0)	0 (0)	3 (7,89)
Val-51	0 (0)	0 (0)	2 (5,26)		
dhfr_59			<b>Sang (n=66)</b>	<b>Salive (n=58)</b>	<b>Urine(n=42)</b>
	Sauvage(C)	Cys-59	10 (15,15)	10 (17,24)	11 (26,19)
	Mutants	<b>Arg-59</b>	<b>36 (54,54)</b>	<b>37 (63,79)</b>	<b>18 (42,85)</b>
		Ala-59	1 (1,51)	1 (1,72)	0 (0)
		Gly-59	11 (16,66)	3 (5,17)	0 (0)
		Leu-59	1 (1,51)	1 (1,72)	2 (4,76)
		Ser-59	5 (7,57)	0 (0)	0 (0)
		Trp-59	2 (3,03)	2 (3,44)	4 (9,52)
		Pro-59	0 (0)	2 (3,44)	2 (4,76)
		Asn-59	0 (0)	0 (0)	1 (2,38)
		Val-59	0 (0)	0 (0)	1 (2,38)
		Phe-59	0 (0)	2 (3,44)	2 (4,76)
Tyr-59	0 (0)	0 (0)	1 (2,38)		
dhfr_108			<b>Sang (n=81)</b>	<b>Salive (n=63)</b>	<b>Urine (n=48)</b>
	Sauvage(S)	Ser-108	14 (17,28)	8 (12,69)	7 (14,58)
	Mutants	<b>Asn-108</b>	<b>60 (74,07)</b>	<b>50 (79,36)</b>	<b>33 (68,75)</b>
		Ala-108	2 (2,46)	0 (0)	0 (0)
		Phe-108	1 (1,23)	1 (1,58)	0 (0)
		His-108	2 (2,46)	0 (0)	0 (0)
		Thr-108	1 (1,23)	0 (0)	0 (0)
		Val-108	1 (1,23)	0 (0)	1 (2,08)
		Asp-108	0 (0)	1 (1,58)	1 (,08)
		Lys-108	0 (0)	0 (0)	3 (6,25)
		Gly-108	0 (0)	1 (1,58)	0 (0)
		Pro-108	0 (0)	0 (0)	1 (2,08)
		Ile-108	0 (0)	1 (1,58)	0 (0)
Arg-108	0 (0)	1 (1,58)	2 (4,16)		

**Annexe 7:** Fréquence des autres allèles mutants du gène *pdfhfr* dans le sang, la salive et les urines



TM	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<b>39</b>		<b>28</b>	<b>41,79</b>	<b>21</b>	<b>40,38</b>
	1	1,16	0	0,00	0	0,00			
	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	1	1,16	0	0,00	0	0,00
	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>H</u>	1	1,16	0	0,00	0	0,00
	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	2	2,33	0	0,00	0	0,00
	<b>27</b>	<b>31,40</b>	<b>21</b>	<b>31,34</b>	<b>13</b>	<b>25</b>			
	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>H</u>	1	1,16	0	0,00	0	0,00
	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	1	1,16	0	0,00	0	0,00
	<u>I</u>	<u>W</u>	<u>N</u>	1	1,16	0	0,00	1	1,92
	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	1	1,16	0	0,00	0	0,00
	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	2	2,33	0	0,00	0	0,00
	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	1	1,16	1	1,49	0	0,00
	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	0	0,00	1	1,49	0	0,00
	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	0	0,00	1	1,49	0	0,00
	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	0	0,00	1	1,49	1	1,92
	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	0	0,00	1	1,49	0	0,00
	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	0	0,00	1	1,49	0	0,00
	<u>F</u>	<u>W</u>	<u>N</u>	0	0,00	1	1,49	1	1,92
	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	0	0,00	0	0,00	1	1,92
	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	0	0,00	0	0,00	1	1,92
<u>V</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	0	0,00	0	0,00	1	1,92	
<u>T</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	0	0,00	0	0,00	1	1,92	
<u>T</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	0	0,00	0	0,00	1	1,92	

**Annexe 8:** Fréquence des autres génotypes mutants correspondant au gène *pfdhfr* dans le sang, la salive les urines

		Sang (N=74)	Salive (N=4)	
Codons	Souches et mutations observées	Effectifs (%)	Effectifs (%)	
Crt_74			<b>Sang (n=59)</b>	<b>Salive (n=3)</b>
	Sauvage	Met-74	<b>47 (79,66)</b>	2 (66,67)
	Mutants	<b>Ile-74</b>	5 (8,47)	0,00
		Lys-74	1 (1,69)	0,00
		Leu-74	5 (8,47)	0,00
		Pro-74	0,00	1 (33,33)
		Trp-74	1 (1,69)	0,00
Crt_75			<b>Sang (n=64)</b>	<b>Salive (n=2)</b>
	Sauvage	Asn-75	<b>48 (75,00)</b>	1 (33,33)
	Mutants	<b>Glu-75</b>	5 (7,81)	0,00
		Lys-75	6 (9,38)	0,00
		Gln-75	0,00	1 (33,33)
		Tyr-75	5 (7,81)	0,00
Crt_76			<b>Sang (n=64)</b>	<b>Salive (n=3)</b>
	Sauvage (K)	Lys-76	<b>40 (62,50)</b>	0,00
	Mutants	<b>Thr-76</b>	10 (15,63)	0,00
		Gly-76	1 (1,56)	2 (66,67)
		Ile-76	1 (1,56)	0,00
Glu-76		12 (18,75)	1 (33,33)	

**Annexe 9:** Fréquence des autres allèles mutants du gène *pfCRT* dans le sang, la salive et les urines

	Génotypes			Sang (N=64)		Salive (N=03)		Urine (N=00)	
	<b>M74I</b>	<b>N75E</b>	<b>K76T</b>	n	%	n	%	n	%
Haplotypes dhfr									
Haplotypes sensibles	N	N	K	40	62,5	00	00	00	00
Haplotypes simples mutants				8	12,5	2	66,67	00	00
	N	N	<u>T</u>	6	9,37	00	00	00	00
	M	N	<u>Q</u>	2	3,16	00	00		
	M	N	<u>G</u>	0	00	2	66,67	00	00
Haplotypes doubles mutants	N	<u>Y</u>	<u>Q</u>	4	6,25	00	00	00	00
Haplotypes triples mutants				12	18,75	01	33,33	00	00
	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	6	9,37	00	00	00	00
	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>T</u>	4	6,25	00	00	00	00
	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	1	1,56	00	00	00	00
	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>I</u>	1	1,56	00	00	00	00
	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	00	00	1	33,33	00	00

**Annexe 10:** Fréquence des autres génotypes mutants correspondant au gène *pfcr*

Codons	Souches et mutations observées		Sang (N=93)	Salive (N=87)	Urine (N=78)
			Effectifs (%)	Effectifs (%)	Effectifs (%)
<b>K13_493</b>			<b>Sang (n=79)</b>	<b>Salive (n=49)</b>	<b>Urine (n=47)</b>
	<b>Sauvage</b>	Tyr-493	<b>73 (92,40)</b>	<b>27 (55,10)</b>	<b>34 (72,34)</b>
	<b>Mutants</b>	<b>His-493</b>	1 (1,26)	3 (6,12)	2 (4,25)
		Pro-493	1 (1,26)	4 (8,16)	1 (2,12)
		Phe-493	3 (3,79)	1 (2,04)	2 (4,25)
		Cys-493	1 (1,26)	1 (2,04)	1 (2,12)
		Thr-493	0(0)	1 (2,04)	1 (2,12)
		Arg-493	0(0)	4 (8,16)	2 (4,25)
		Val-493	0(0)	1 (2,04)	1 (2,12)
		Glu-493	0(0)	1 (2,04)	0,00
		Leu-493	0(0)	1 (2,04)	0,00
		Gly-493	0(0)	1 (2,04)	1 (2,12)
		Ala-493	0(0)	1 (2,04)	0,00
		Asn-493	0(0)	2 (4,08)	1 (2,12)
		Ile-493	0(0)	1 (2,04)	0,00
Ser-493	0(0)	0 (0)	1 (2,12)		
<b>K13_539</b>			<b>Sang (n=85)</b>	<b>Salive (n=59)</b>	<b>Urine (n=59)</b>
	<b>Sauvage</b>	<b>Arg-539</b>	<b>80 (94,11)</b>	<b>30 (50,84)</b>	<b>45 (76,27)</b>
	<b>Mutants</b>	<b>Thr-539</b>	3 (3,52)	1 (1,69)	0,00
		Gly-539	1 (1,17)	2 (3,38)	2 (3,38)
		Pro-539	1 (1,17)	1 (1,69)	4 (6,77)
		Ile-5399	0,00	3 (5,08)	1 (1,69)
		Met-539	0,00	0 (0)	1 (1,69)
		Lys-539	0,00	1 (1,69)	1 (1,69)
		His-539	0,00	1 (1,69)	0,00
		Glu-539	0,00	2 (3,38)	0,00
		Val-539	0,00	4 (6,77)	0,00
		Gln-539	0,00	2 (3,38)	0,00
		Ser-539	0,00	2 (3,38)	3 (5,08)
		Phe-539	0,00	4 (6,77)	1 (1,69)
		Asp-539	0,00	3 (5,08)	0,00
Cys-539	0,00	1 (1,69)	1 (1,69)		
Ala-539	0,00	1 (1,69)	0,00		
Tyr-539	0,00	1 (1,69)	0,00		
<b>K13_543</b>			<b>Sang (n=89)</b>	<b>Salive (n=68)</b>	<b>Urine (n=62)</b>
	<b>Sauvage</b>	Ile-543	<b>84 (94,38)</b>	<b>28 (41,17)</b>	<b>37 (59,67)</b>
	<b>Mutants</b>	<b>Thr-543</b>	0,00	2 (2,94)	0,00
		Met-543	2 (2,24)	0 (0)	0,00
		Phe-543	2 (2,24)	6 (8,82)	2 (3,22)
		Ser-543	1 (1,12)	3 (4,41)	6 (9,67)
		<b>Arg-543</b>	0,00	6 (8,82)	1 (1,61)
		<b>Pro-543</b>	0,00	3 (4,41)	2 (3,22)
Glu-543	0,00	1 (1,47)	1 (1,61)		

		Gly-543	0,00	4 (5,88)	3 (4,83)
		Leu-543	0,00	4 (5,88)	1 (1,61)
		Gln-543	0,00	2 (2,94)	0,00
		Val-543	0,00	3 (4,41)	1 (1,61)
		Asp-543	0,00	1 (1,47)	0,00
		Ala-543	0,00	1 (1,47)	4 (6,45)
		Cys-543	0,00	1 (1,47)	2 (3,22)
		Asn-543	0,00	1 (1,47)	2 (3,22)
		Lys-543	0,00	1 (1,47)	0,00
		Trp-543	0,00	1 (1,47)	0,00
<b>K13_580</b>			<b>Sang (n=93)</b>	<b>Salive (n=74)</b>	<b>Urine (n=66)</b>
	<b>Sauvage</b>	Cys-580	<b>85 (91,39)</b>	<b>35 (47,29)</b>	<b>37 (56,06)</b>
	<b>Mutants</b>	<b>Tyr-580</b>	0,00	1 (1,35)	1 (1,51)
		Ser-580	3 (3,22)	4 (5,40)	5 (7,57)
		Pro-580	3 (3,22)	2 (2,70)	4 (6,06)
		Gly-580	1 (1,07)	8 (10,81)	4 (6,06)
		Arg-580	1 (1,07)	11 (14,86)	1 (1,51)
		Trp-580	0,00	3 (4,05)	2 (3,03)
		Gln-580	0,00	2 (2,70)	1 (1,51)
		His-580	0,00	1 (1,35)	0,00
		Thr-580	0,00	2 (2,70)	4 (6,06)
		Asn-580	0,00	1 (1,35)	1 (1,51)
		Val-580	0,00	1 (1,35)	2 (3,03)
		Ala-580	0,00	1 (1,35)	0,00
		Asp-580	0,00	1 (1,35)	0,00
Phe-580	0,00	1 (1,55)	1 (1,51)		
Leu-580	0,00	0,00	3 (4,54)		
<b>K13_476</b>			<b>Sang (n=77)</b>	<b>Salive (n=45)</b>	<b>Urine (n=45)</b>
	<b>Sauvage</b>	Met-476	<b>69 (89,61)</b>	<b>27 (60,00)</b>	<b>29 (37,18)</b>
	<b>Mutants</b>	<b>Ile-476</b>	1 (1,29)	1 (2,22)	2 (4,44)
		Gly-476	2 (2,59)	1 (2,22)	1 (2,22)
		Lys-476	1 (1,07)	1 (2,22)	0,00
		Arg-476	2 (2,59)	2 (4,44)	4 (8,88)
		Thr-476	1 (1,29)	0,00	0,00
		Ser-476	1 (1,29)	1 (2,22)	1 (2,22)
		Leu-476	0,00	5 (11,11)	2 (4,44)
		Gln-476	0,00	1 (2,22)	0,00
		Val-476	0,00	2 (4,44)	1 (2,22)
		Phe-476	0,00	1 (2,22)	1 (2,22)
		Pro-476	0,00	3 (6,66)	0,00
		Ala-476	0,00	0,00	2 (4,44)
		Cys-476	0,00	0,00	1 (2,22)
Asn-476	0,00	0,00	1 (2,22)		

**Annexe 11:** Fréquence des autres allèles mutants du gène *K13 propeller* dans le sang, la salive et les urines

Haplotypes	Y493H	R539T	I543T	C580Y	M476I	n	proportion
Haplotype sensible	Y	R	I	C	M	<b>73</b>	<b>78,49</b>
Haplotypes simples mutants						<b>11</b>	<b>11,83</b>
	Y	R	I	R	<u>G</u>	1	1,08
	Y	R	I	C	<u>T</u>	1	1,08
	<u>P</u>	*	I	C	*	1	1,08
	Y	R	I	C	<u>K</u>	1	1,08
	*	R	<u>M</u>	C	*	1	1,08
	Y	R	I	C	<u>R</u>	1	1,08
	<u>C</u>	R	I	C	*	1	1,08
	Y	R	I	C	<u>S</u>	1	1,08
	Y	<b>R</b>	I	<u>G</u>	M	1	1,08
	*	R	*	<u>S</u>	M	1	1,08
	Y	*	I	<u>R</u>	*	1	1,08
Haplotypes doubles mutants						<b>6</b>	<b>6,45</b>
	<u>H</u>	R	I	<u>C</u>	I	1	1,08
	*	<u>G</u>	I	<u>S</u>	*	1	1,08
	*	*	<u>M</u>	<u>P</u>	*	1	1,08
	*	R	<u>F</u>	<u>P</u>	*	1	1,08
	<u>F</u>	<u>T</u>	I	C	*	1	1,08
	<u>F</u>	R	I	C	<u>R</u>	1	1,08
Haplotypes triples mutants						<b>3</b>	<b>3,23</b>
	*	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	*	1	1,08
	*	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	*	1	1,08
	<u>F</u>	<u>T</u>	*	C	<u>G</u>	1	1,08

**Annexe 12:** Fréquence des génotypes correspondant au gène *pfK13* propeller dans les isolats sanguins

Haplotype	Y493H	R539T	I543T	C580Y	M476I	n	proportion
Haplotype sensible	Y	R	I	C	M	<b>27</b>	<b>33,33</b>
Haplotypes simples mutants						<b>14</b>	<b>17,28</b>
	*	R	I	<u>W</u>	*	1	1,23
	*	R	*	<u>P</u>	M	1	1,23
	Y	R	*	<u>H</u>	*	1	1,23
	Y	*	I	<u>N</u>	M	1	1,23
	Y	R	*	<u>G</u>	M	1	1,23
	Y	R	*	<u>R</u>	M	2	2,47
	Y	R	I	<u>S</u>	M	2	2,47
	Y	R	I	<u>R</u>	M	1	1,23
	Y	<u>F</u>	I	*	M	1	1,23
	*	R	<u>F</u>	*	*	1	1,23
	Y	<u>E</u>	I	C	M	1	1,23
	*	R	<u>W</u>	C	*	1	1,23
				-			
Haplotypes doubles mutants						<b>11</b>	<b>13,58</b>
	Y	<u>E</u>	<u>R</u>	C	*	1	1,23
	Y	R	<u>E</u>	<u>G</u>	M	1	1,23
	Y	*	<u>G</u>	<u>G</u>	*	1	1,23
	Y	R	<u>V</u>	<u>R</u>	M	1	1,23
	<u>H</u>	*	<u>F</u>	C	*	1	1,23
	Y	R	<u>C</u>	<u>G</u>	*	1	1,23
	Y	R	<u>T</u>	C	<u>P</u>	1	1,23
	Y	<u>V</u>	<u>R</u>	*	M	1	1,23
	*	<u>G</u>	<u>R</u>	C	*	1	1,23
	<u>R</u>	*	I	<u>Y</u>	M	1	1,23
	Y	<u>V</u>	<u>K</u>	*	M	1	1,23
Haplotypes triples mutants						<b>13</b>	<b>16,05</b>
	<u>R</u>	*	<u>F</u>	C	<u>V</u>	1	1,23
	<u>F</u>	*	<u>G</u>	<u>W</u>	*	1	1,23
	*	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	*	1	1,23
	<u>R</u>	R	<u>V</u>	C	<u>V</u>	1	1,23
	Y	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	M	1	1,23
	*	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	M	1	1,23
	Y	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	*	1	1,23
	Y	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	M	1	1,23
	Y	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	*	1	1,23
	Y	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	M	1	1,23
	<u>N</u>	*	<u>G</u>	C	<u>L</u>	1	1,23
	Y	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	M	1	1,23
	<u>I</u>	<u>G</u>	I	C	<u>I</u>	1	1,23
	-		-				

Haplotypes quadruples mutants	*	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<b>7</b>	<b>8,64</b>
	<u>E</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	*	<u>P</u>	1	1,23
	<u>H</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	*	1	1,23
	<u>P</u>	*	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	1	1,23
	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	*	1	1,23
	<u>C</u>	R	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	1	1,23
	<u>R</u>	<u>Q</u>	<u>F</u>	<u>Q</u>	M	1	1,23
	-	-	-	-	-		
Haplotypes quintuples mutants	-		-	-	-	<b>9</b>	<b>11,11</b>
	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	1	1,23
	<u>T</u>	<u>H</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>Q</u>	1	1,23
	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	1	1,23
	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>	1	1,23
	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	1	1,23
	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	1	1,23
	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	1	1,23
	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	1	1,23
	<u>H</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	1	1,23

**Annexe 13:** Fréquence des génotypes correspondant au gène *pfK13* propeller dans les isolats salivaires

Haplotype	Y493H	R539T	I543T	C580Y	M476I	n	proportion
Haplotypes sensibles	Y	R	I	C	M	<b>26</b>	<b>37,68</b>
Haplotypes simples mutants						<b>13</b>	<b>18,84</b>
	*	R	I	<u>R</u>	*	1	1,45
	Y	R	I	<u>S</u>	*	1	1,45
	*	R	I	C	<u>L</u>	1	1,45
	<u>H</u>	R	I	C	M	1	1,45
	*	R	*	<u>P</u>	*	1	1,45
	Y	R	I	<u>V</u>	M	2	2,90
	*	R	*	<u>Q</u>	*	1	1,45
	Y	*	I	<u>S</u>	*	1	1,45
	*	R	I	<u>T</u>	*	2	2,90
	Y	R	<u>S</u>	C	M	1	1,45
	Y	R	I	C	<u>I</u>	1	1,45
						-	
Haplotypes doubles mutants						<b>11</b>	<b>15,94</b>
	<u>S</u>	R	I	<u>S</u>	*	1	1,45
	Y	R	<u>G</u>	<u>T</u>	M	1	1,45
	*	R	<u>V</u>	<u>P</u>	*	1	1,45
	Y	R	<u>L</u>	<u>S</u>	M	1	1,45
	*	<u>P</u>	I	<u>L</u>	*	1	1,45
	Y	<u>C</u>	<u>A</u>	*	M	1	1,45
	Y	R	<u>N</u>	*	<u>N</u>	1	1,45
	<u>F</u>	R	I	C	<u>G</u>	1	1,45
	*	R	<u>P</u>	<u>W</u>	*	1	1,45
	Y	R	<u>R</u>	<u>G</u>	*	1	1,45
	*	R	<u>S</u>	<u>G</u>	M	1	1,45
Haplotypes triples mutants						<b>14</b>	<b>20,29</b>
	Y	<u>G</u>	<u>S</u>	C	<u>R</u>	1	1,45
	<u>F</u>	R	<u>S</u>	C	<u>L</u>	1	1,45
	<u>N</u>	R	I	<u>L</u>	<u>R</u>	1	1,45
	<u>G</u>	R	<u>F</u>	C	<u>F</u>	1	1,45
	*	<u>P</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	*	1	1,45
	Y	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	M	1	1,45
	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	C	*	1	1,45
	Y	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>P</u>	M	1	1,45
	Y	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	M	1	1,45
	<u>T</u>	R	<u>S</u>	C	<u>R</u>	1	1,45
	Y	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	1	1,45
	Y	*	<u>C</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	1	1,45
	Y	<u>M</u>	<u>F</u>	C	<u>R</u>	1	1,45



SANG						
	Anonkoua-Kouté (n=29)		Port-Bouët (n=22)		Ayamé (n=30)	
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)
Ser-108	3	10,34	6	27,27	5	16,67
<b>Asn-108</b>	<b>20</b>	<b>68,97</b>	<b>15</b>	<b>68,18</b>	<b>25</b>	<b>83,33</b>
Ala-108	1	3,44	1	4,54	0	0
Phe-108	1	3,44	0	0	0	0
His-108	2	6,89	0	0	0	0
Thr-108	1	3,44	0	0	0	0
Val-108	1	3,44	0	0	0	0
SALIVE						
	Anonkoua-Kouté (n=21)		Port-Bouët (n=19)		Ayamé (n=23)	
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)
Ser-108	1	4,76	2	10,53	4	17,39
<b>Asn-108</b>	<b>20</b>	<b>95,24</b>	<b>16</b>	<b>84,21</b>	<b>15</b>	<b>65,21</b>
Asp-108	0	0	0	0	1	4,34
Phe-108	0	0	0	0	1	4,34
Gly-108	0	0	0	0	1	4,34
Ile-108	0	0	0	0	1	4,34
Arg-108	0	0	1	5,26	0	0
URINE						
	Anonkoua-Kouté (n=12)		Port-Bouët (n=10)		Ayamé (n=26)	
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)
Ser-108	0	0	7	70	0	0
<b>Asn-108</b>	<b>12</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>73,08</b>
Asp-108	0	0	0	0	1	3,84
Lys-108	0	0	0	0	3	11,53
Pro-108	0	0	0	0	1	3,84
Arg-108	0	0	1	10	1	3,84
Val-108	0	0	0	0	1	3,84

**Annexe 15:** Fréquences de la souche sauvage Ser-108 et des autres mutations du codon 108 du polypeptide du gène *pdfhfr*

	SANG						SALIVE	
	Anonkoua-Kouté (n=29)		Port-Bouët (n=16)		Ayamé (n=20)		Ayamé (n=03)	
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)
Lys-76	17	60,71	10	62,5	13	65	0	0
<b>Thr-76</b>	<b>0</b>	<b>0,00</b>	<b>5</b>	<b>31,25</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Glu-76	0	0,00	0	0	0	0	1	33,33
Gly-76	0	0,00	1	6,25	0	0	2	66,67
Ile-76	0	0,00	0	0	1	5	0	0
Gln-76	11	39,29	0	0	1	5	0	0

**Annexe 16:** Fréquences des autres mutations du codon 76 du polypeptide du gène *pfprt*

SANG						
	Anonkoua-Kouté (n=30)		Port-Bouët (n=32)		Ayamé (n=31)	
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)
Cys-580	28	93,33	<b>29</b>	90,63	<b>28</b>	90,32
<b>Tyr-580</b>	<b>0</b>	0,00	0	0,00	0	0,00
Ser-580	1	3,33	1	3,13	1	3,23
Pro-580	1	3,33	2	6,25	0	0,00
Gly-580	0	0,00	0	0,00	1	3,23
Arg-580	0	0,00	0	0,00	1	3,23
SALIVE						
	Anonkoua-Kouté (n=27)		Port-Bouët (n=28)		Ayamé (n=19)	
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)
Cys-580	<b>14</b>	51,85	<b>5</b>	17,86	<b>16</b>	84,21
<b>Tyr-580</b>	0	0,00	0	0,00	1	5,26
Trp-580	3	11,11	0	0,00	0	0,00
Arg-580	5	18,52	6	21,43	0	0,00
Gly-580	2	7,41	6	21,43	0	0,00
Pro-580	1	3,70	1	3,57	0	0,00
Gln-580	1	3,70	1	3,57	0	0,00
Ser-580	<b>1</b>	3,70	<b>3</b>	10,71	<b>0</b>	0,00
His-580	0	0,00	1	3,57	0	0,00
Thr-580	0	0,00	2	7,14	0	0,00
Asn-580	0	0,00	1	3,57	0	0,00
Val-580	0	0,00	1	3,57	0	0,00
Ala-580	0	0,00	1	3,57	0	0,00
Asp-580	0	0,00	0	0,00	1	5,26
Phe-580	0	0,00	0	0,00	1	5,26
URINE						
	Anonkoua-Kouté (n=30)		Port-Bouët (n=22)		Ayamé (n=14)	
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)
C580Y	<b>24</b>	80,00	<b>5</b>	22,73	<b>8</b>	57,14
C580R	0	0,00	0	0,00	1	7,14
C580S	1	3,33	0	0,00	0	0,00
C580P	<b>2</b>	6,67	<b>3</b>	13,64	<b>0</b>	0,00
C580L	<b>1</b>	3,33	<b>2</b>	9,09	<b>1</b>	7,14
C580T	2	6,67	1	4,55	0	0,00
C580G	<b>0</b>	0,00	<b>4</b>	18,18	<b>0</b>	0,00
C580V	<b>0</b>	0,00	<b>2</b>	9,09	<b>2</b>	14,29
C580Q	0	0,00	2	9,09	0	0,00
C580N	0	0,00	1	4,55	0	0,00
C580F	0	0,00	1	4,55	0	0,00
C580W	0	0,00	1	4,55	0	0,00

**Annexe 17:** Fréquences de la souche sauvage Cys-580 et des mutations du codon 580 du polypeptide du gène *pfK13 propeller*

