



**HAL**  
open science

**Efficacité thérapeutique de l'association  
artésunateamodiaquine et polymorphisme des gènes  
dihydrofolate réductase, dihydroptéroate synthétase et  
kelch 13 propeller à Pala (République du Tchad)**

Mahamat Souleymane Issa

► **To cite this version:**

Mahamat Souleymane Issa. Efficacité thérapeutique de l'association artésunateamodiaquine et polymorphisme des gènes dihydrofolate réductase, dihydroptéroate synthétase et kelch 13 propeller à Pala (République du Tchad). Parasitologie. Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2018. Français. NNT: . tel-02387676

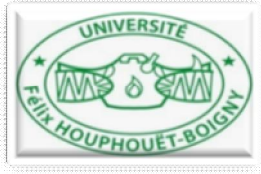
**HAL Id: tel-02387676**

**<https://theses.hal.science/tel-02387676>**

Submitted on 30 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.



Année Universitaire  
2017-2018

# THÈSE

PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ FÉLIX HOUPHOUËT-BOIGNY**

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE HUMAINE TROPICALE  
OPTION : PARASITOLOGIE

Numéro d'ordre  
59

**M. ISSA Mahamat Souleymane**

Efficacité thérapeutique de l'association artésunate-  
amodiaquine et polymorphisme des gènes *dihydrofolate*  
*réductase*, *dihydroptéroate synthétase* et *kelch 13*  
*propeller* à Pala (République du Tchad)

## Composition du jury

Soutenu publiquement  
Le 31 Juillet 2018

Mme DOSSO Mireille	: Professeur Titulaire	UFHB/UFR-SMA	Président
M. DJAMAN Allico Joseph	: Professeur Titulaire	UFHB/ UFR-BioSci	Directeur
M. TOURE André Offianan	: Maître de Recherche	IPCI	Co-Directeur
Mme EDJEME-AKE Angèle	: Maitre de conférences Agrégée	UFHB/ UFR-Sc-Ph.	Rapporteur
M. ADOUBRYN Koffi	: Professeur Titulaire	UAO/ UFR-SMA	Rapporteur
M. KATTIE Aka Louka	: Professeur Titulaire	UFHB/ UFR-OS	Examineur



## **IN MEMORIUM**

A mon Père **ALGONI MAHAMAT CHALTOUT**

Nous (tes enfants) n'avons pas pu longtemps profiter de ta présence. Que ton  
âme repose en paix, que la grâce du Seigneur soit avec toi.

Dors en paix cher Père.

# **DEDICACES**

**Je dédie ce travail à :**

**DIEU**

Comment saurai-je te rendre tout ce que tu m'as fait ? Le moment est approprié pour te rendre grâce pour tout. Je te dédie particulièrement ce travail demande ta constante assistance le long de mon futur parcours.

### **A mon père feu Algoni Mahmat Chaltout**

S'il est encore de ce monde, il sera fier de moi. De son vivant, il m'encourageait dans les études et avait une grande confiance en moi.

Père, tu m'as toujours montré que l'on peut braver les difficultés pour atteindre un objectif précis. Merci cher père de m'avoir inculqué le courage qui m'incite à toujours bien faire une tâche qui m'est confiée. Je prie DIEU afin que les actions que je pose au quotidien soient pour toi cher Père une miséricorde là où tu te trouves auprès de DIEU.

### **A ma mère Djiveria Oumar Ahmat**

Quand j'étais petit, il n'y avait que toi pour me donner l'espoir, pour me permettre de me relever, pour me donner le courage nécessaire afin de réussir. Avec l'aide de Dieu, toutes ces années de labeur, de sacrifice et de réconfort ont porté leur fruit. Je te dédie personnellement ce travail pour ton courage et ta bonté. Je suis fier de t'avoir comme mère et je souhaite que le tout puissant te garde longtemps à nos côtés afin de pouvoir jouir des fruits de longues années d'efforts consentis.

### **A mon guide spirituel Cheick Zakaria Haroun Adiko**

C'est vous qui m'avez montré Dieu le tout puissant, le prophète et les saints quand tout espoir semblait perdu, quand ma réussite semblait utopique. Vous m'avez tenu par le bras, je n'oublierai jamais ces moments. Vos conseils et prières m'aident à avancer dans la vie de tous les jours avec aisance.

### **A mes frères et sœurs**

Vos encouragements et soutiens m'ont aidé à surmonter de nombreuses barrières. Que Dieu vous garde et vous montre le chemin d'une réussite sociale et professionnelle.

### **A ma femme Khadidja Assafi**

Ta patience et ta bonté nous ont permis de passer un agréable moment ensemble. Tu m'as soutenu et réconforté à tout moment et dans n'importe quelle situation. Ce travail est également le tien.

### **A mes enfants Mouzoun et Izza**

Papa vous aime et prie pour vous afin que ce travail vous incite à faire preuve de courage dans la vie. Si Papa est docteur, vous pouvez en faire autant, mieux faire et plus encore.

### **A mes tantes, oncles, cousins et cousines**

Votre soutien ne m'a jamais fait défaut. Que Dieu nous donne la force de resserrer toujours et d'avantage nos liens fraternels. Ce travail est le vôtre.

### **A mon ami et frère Abdoulaye Djidda Abdoulaye**

Je ne saurais te dire merci car en réalité tu as été plus qu'un ami pour moi. Je te considère comme le frère que le Seigneur lui-même a voulu pour moi. Durant tout ce long temps que nous avons vécu et que nous continuons à vivre ensemble tu t'es toujours comporté comme un vrai frère pour moi. Comme j'aime le dire tu es mon frère jumeau. C'est l'occasion pour moi de te témoigner de toute ma sympathie et mon amitié.

# REMERCIEMENTS



Ce travail a reçu un soutien financier de l'OMS dans le cadre de l'évaluation thérapeutique des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTAs) au Tchad. Ce travail résulte de la collaboration entre le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), l'Organisation Mondiale de la Santé Publique (OMS) et l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI).

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à ces différentes institutions et très particulièrement aux personnes citées ci-dessous :

### **HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY**

#### **A notre maître et présidente du jury**

**Mme DOSSO Mireille**, Professeur Titulaire de Bactériologie-Virologie, Enseignante à l'UFR des Sciences Médicales de l'Université Félix Houphouët-Boigny (UFHB), Directeur de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI), qui n'a ménagé aucun effort pour faire de cet institut un pôle africain de référence en matière de recherches 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 vous remercie très sincèrement de votre hospitalité et pour la confiance en me confiant au Pr. DJAMAN pour l'encadrement scientifique. Que le Seigneur vous accorde ses abondantes bénédictions !

#### **A notre maître et directeur de thèse**

**M. DJAMAN Allico Joseph**, Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny et Chef du Département de Biochimie clinique et fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Éminent homme de science, vous êtes sans doute un exemple à suivre. Cher maître, l'occasion est opportune pour moi de vous témoigner toute ma reconnaissance de m'avoir guidé encadré et accompagné dans la voie de la recherche sur le paludisme. Cher maître nous avons beaucoup admiré vos qualités scientifiques, pédagogiques et humaines. Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté mon encadrement et je veillerai à tirer bon profit des enseignements reçus. Votre disponibilité, votre gentillesse, votre accueil toujours courtois et affectif nous ont conquis. Cher Professeur, trouvez ici le témoignage de notre profonde gratitude et l'assurance de notre indéfectible attachement. Que le Seigneur vous accorde ses abondantes bénédictions !

### **A notre maître et co-directeur de thèse**

**M. TOURE André Offianan**, Maître de recherche, Chef du Département Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Cher maître, votre démarche méthodique, votre disponibilité et votre rigueur scientifique m'ont permis d'apprendre énormément pendant ce travail. Grâce à vous, j'ai pu réaliser ce travail consciencieusement. Nous vous en sommes profondément reconnaissants. Merci de m'avoir accepté dans votre Département et également pour l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de co-encadrer cette thèse en dépit de vos occupations multiples. Que le Seigneur vous accorde ses abondantes bénédictions !

### **A notre maître et membre du jury**

**M. ADOUBRYN K. Daho**, Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie, Enseignement chercheur à l'Université Alassane Ouattara de Bouaké. Cher maître, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur et membre de mon jury de thèse et pour la rapidité dans la lecture de mon manuscrit. Vos critiques, vos remarques pertinentes et constructives nous ont permis d'améliorer la qualité de ce document. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

### **A notre maître et membre du jury**

**Mme EDJÈME-AKÉ N. Angèle**, Maître de conférence de Biochimie, Département de Biochimie clinique et fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Enseignant chercheur à l'UFR Pharmacie de l'Université Félix Houphouët-Boigny. Chère maître, c'est un grand honneur pour nous de vous compter parmi les membres du jury. Je vous remercie également d'accepter être rapporteur de cette thèse et d'accepter siéger dans ce jury. Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos analyses et conseils afin de parfaire ce document. Je tiens à vous assurer de ma grande estime et de ma profonde gratitude.

**M. KATTIE Aka Louka**, Professeur titulaire, Enseignant chercheur à l'UFR Odontostomatologie de l'Université Félix Houphouët-Boigny. C'est un grand honneur et un immense plaisir que vous nous faites en acceptant spontanément de juger ce travail de thèse et cela malgré votre emploi du temps bien chargé. Nous vous prions de trouver ici cher Professeur, l'expression de notre profonde reconnaissance.

## **A notre maître au Tchad**

**M. DJIMADOUM Mbang**a, Médecin, Enseignant-Chercheur, Assistant à la Faculté des Sciences de la Santé Humaine (FSSH) à l'Université de N'Djaména, Directeur technique de thèse au Tchad. Cher maître. Je suis entièrement reconnaissant pour l'intérêt régulier que vous avez accordé durant la période d'activités sur le terrain au Tchad. Ainsi, vous avez grandement participé à la rédaction de ce document en acceptant d'y apporter vos corrections et suggestions. Je vous remercie sincèrement. Votre esprit de recherche, votre extrême gentillesse, votre disponibilité infaillible et vos conseils avisés ont "forcé" mon admiration. Merci infiniment cher Maître. Que le Seigneur vous accorde ses abondantes bénédictions !

**M. KÉRAH HINZOUMBÉ Clément**, Entomologiste médicale, Coordonnateur du PNLP ; je n'oublierai jamais les moments difficiles pendant les démarches administratives et financières quand vous avez dit « ne te décourage pas, fonce mon cher Issa, tu y arriveras, je t'aiderai jusqu'à la fin » Ces mots ne peuvent totalement exprimer les sentiments que j'ai à votre égard. Vous avez été non seulement un grand frère pour moi, mais aussi un ami. Grâce à votre soutien multiforme, j'ai réussi à traverser plusieurs épreuves. Profonde est mon admiration, infinie ma reconnaissance et éternelle restera mon affection. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance, et de mon plus profond respect.

**M. RINGWALD Pascal**, Médecin-chercheur à l'OMS/Genève ; vous êtes pour moi un conseiller, un assistant. Votre affection, votre soutien sans mesure tout au long de ce long moment ont été d'un apport important durant tout ce travail. Merci de votre soutien financier et intellectuel, sans lequel ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Trouvez en ce travail l'accomplissement de ma plus profonde reconnaissance, puisse le Seigneur veiller continuellement sur vous et sur votre famille !

**M. DJMRASSENGAR Honoré**, Médecin au bureau de l'OMS/Tchad ; je vous remercie pour vos conseils, votre soutien et votre assistance durant toutes nos démarches administratives et financières du début jusqu'à l'obtention de résultats finaux. Aussi, pour la confiance que vous avez placée en moi et au PNLP pour la réalisation de ces travaux. Merci pour la collaboration entre le PNLP et votre institution. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance, et de mon plus profond respect.

**M. BOUZID Samir**, Médecin, microbiologiste, Coordonnateur du Projet d'Appui à la Lutte Antipaludique au Tchad (PALAT). Je tiens à vous exprimer mes vifs remerciements pour votre soutien à plusieurs égards qui nous ont permis d'achever ce travail de recherche. Je garderai toujours les meilleurs souvenirs de vos immenses contributions et de votre sens du devoir. Vous m'avez impressionné par vos qualités humaines et votre disponibilité tout au long de mes démarches entre l'OMS, le PNLP, le MSP et l'IPCI. Qu'il me soit également permis de vous exprimer aussi mon profond respect et mon intense admiration pour vos qualités humaines exceptionnelles. Que le Seigneur vous accorde ses abondantes bénédictions.

**M. KODJO Morgah**, Médecin, Coordonnateur de l'ONG JHPIEGO Tchad ; je suis entièrement reconnaissant de votre acte et l'intérêt particulier que vous avez accordé à cette étude. Que DIEU vous donne la santé et vous accorde une longue vie au service de l'humanité.

**M. BÉOUROU Sylvain**, Chargé de recherche à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire ; je vous remercie pour vos conseils et votre soutien. Trouvez ici l'expression de ma vive reconnaissance.

**M. AKO Béranger Aristide**, Attaché de recherche à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire ; merci pour vos conseils, votre soutien moral. Vous avez participé à la rédaction et aux analyses statistiques des données de ce travail. Merci de votre permanente disponibilité et d'avoir mis à notre disposition toutes les connaissances nécessaires pour l'interprétation et l'analyse de séquences.

**Mme VANGA Bosson Henriette**, Assistante à l'UFR de Sciences Pharmaceutiques & Biologiques (UFHB) et chercheur à l'IPCI. Votre rigueur scientifique, votre attention particulière à ce travail, votre encouragement ont été d'un grand apport. Je vous remercie infiniment du fond du cœur.

**M. COULIBALY Baba**, doctorant à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire ; vous avez été le noyau central de ce travail en ce qui concerne la biologie moléculaire (BM). Merci de m'avoir appris les différentes techniques de la BM et les logiciels d'analyse des séquences.

### **Au personnel du Département Parasitologie-Mycologie de l'IPCI**

Il s'agit de **Dr TUO Karim, Dr N'GUESAN Landry, Dr IRA Valérie, M. SOUMAHOURO Adama, Mme SYLLA née THANON, Mme MELKI Jihen, M. KOUI Stéphane, M. GNONDJUI Albert, M. YAO Serge, M. ATTEMENE David**. Merci pour l'accueil chaleureux que vous m'avez toujours réservé dans le département. Je souhaite que cette collaboration initiée se poursuive. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

### **Au personnel de la plateforme de Biologie Moléculaire**

**Mme KACOU Solange**, Maître de recherche, Responsable de la plateforme de biologie moléculaire de l'IPCI. Je vous remercie, ainsi que vos collaborateurs, de m'avoir accepté dans votre laboratoire et facilité la réalisation de ce travail. Votre chaleureux accueil, votre disponibilité et votre soutien nous ont été d'une aide inoubliable. Que Dieu vous bénisse !

### **Au personnel du PNLPTchad**

Je vous remercie individuellement de votre soutien et encouragements depuis le début de ce travail jusqu'à ce jour. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude, que Dieu vous récompense.

A mes amis et frères, **Ahmat Hissein, Mahmat Hissein, Mahamat Saleh Oumar, Issa Abdoulaye, Taha Mahamat, Acheik Zakarya, Hamad Brema, Faki seid Ibrahim**. Je vous suis reconnaissant pour toute l'affection et la tendresse que vous avez manifestées à mon égard. Merci pour votre soutien et les moments agréables passés ensemble. Recevez à travers ce travail qui est aussi le vôtre, mon profond attachement et toute ma reconnaissance. Restons toujours unis et solidaires.

### **A mes compatriotes étudiants tchadiens à l'étranger,**

En souvenir des liens étroits et excellents qui nous ont toujours unis pendant nos études à l'étranger. Sachez maintenir autour de vous cette ambiance partout où vous irez.

A tous ceux dont je n'ai pas cité le nom mais pour qui j'ai une pensée en ce moment,

A ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'amélioration de ce document,

A tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, nous ont aidés dans ce travail, Que Dieu vous bénisse abondamment !

# **AVANT-PROPOS**

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre du programme de recherche du PNLN du Tchad portant sur l'étude de l'efficacité thérapeutique des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTAs) utilisées dans les formations sanitaires. Depuis l'introduction officielle des CTAs en 2005 et l'utilisation de la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine (SP) en traitement préventif intermittent (TPI) chez la femme enceinte, très peu d'études ont été réalisées surtout sur les marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques. L'objectif de cette étude est de déterminer d'une part la prévalence des marqueurs génétiques de résistance à la SP (*dhfr*, *dhps*) et à l'artémisinine (*k13 propeller*), et d'autre part d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'ASAQ au cours du paludisme non compliqué à *P. falciparum* à Pala.

L'étude a été réalisée au Sud du pays dans la région de Mayo Kebbi Ouest. Elle s'est déroulée au centre de santé urbain, situé au sein de l'hôpital régional de Pala. Les échantillons de sang ont été prélevés puis déposés sur papier whatman, séchés et conservés à la température ambiante avant d'être envoyés à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) pour la réalisation des tests moléculaires à la plateforme de Biologie moléculaire .

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XIX</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I. GENERALITES</b> .....	<b>6</b>
I.1. Épidémiologie .....	7
I.2. Cycle évolutif .....	9
I.3. Répartition géographique du paludisme .....	12
I.4. Différents types de paludisme .....	19
I.5. Diagnostic du paludisme .....	20
I.6. Principales familles d'antipaludiques et leurs utilisations .....	23
I.7. Directives nationales de traitement au Tchad .....	27
I.8. Modes d'action des antipaludiques et mécanismes de résistance des plasmodies .....	27
I.9. Marqueurs moléculaires de résistance .....	36
I.10. Dynamique des résistances .....	38
I.11. Méthodes d'évaluation des antipaludiques .....	39
<b>II. MATERIEL &amp; METHODES</b> .....	<b>43</b>
II.1. Matériel.....	44
II.2. Méthodes.....	49
<b>III. RESULTATS</b> .....	<b>71</b>
III.1. Efficacité thérapeutique de l'ASAQ .....	72
III.2. Caractérisation des gènes dhfr, dhps et k13-propeller.....	83
<b>IV. DISCUSSION</b> .....	<b>93</b>
<b>V- CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES</b> .....	<b>102</b>
<b>VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>106</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>132</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>A :</b>	Alanine (Ala)
<b>ADN :</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>AL :</b>	Artéméther-Lumefantrine
<b>AMA1 :</b>	Apical Membrane Antigen-1
<b>ARN :</b>	Acide RiboNucléique
<b>ASAQ :</b>	Artésunate-Amodiaquine
<b>C :</b>	Symbole de code de cystéine (Cys)
<b>CDC:</b>	Center for Disease Control and prevention
<b>CTA :</b>	Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
<b>D :</b>	Symbole de code de l'acide aspartique (Asp)
<b>DHFR :</b>	Dihydrofolate Réductase
<b>DHPS :</b>	Dihydroptéroate Synthétase
<b>DSIS :</b>	Division de Système d'Information Sanitaire
<b>E :</b>	Symbole de code de l'acide glutamique (Glu)
<b>ELISA:</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>F :</b>	Symbole de code de la phénylalanine (Phe)
<b>FM :</b>	Frottis Mince
<b>FS :</b>	Frottis Sanguin
<b>G :</b>	Symbole de code de la glycine (Gly)
<b>g :</b>	Gramme
<b>GE :</b>	Goutte Epaisse
<b>GLURP :</b>	Glutamate Rich Protein
<b>H :</b>	Symbole de code de l'histidine (His)
<b>Hb:</b>	Hémoglobine
<b>HRP2:</b>	Histidin Rich Protein 2
<b>I :</b>	Symbole de code de l'isoleucine (Ile)
<b>K :</b>	Symbole de code de la lysine (Lys)
<b>L :</b>	Symbole de code de la leucine (Leu)
<b>L :</b>	Litre
<b>M :</b>	Symbole de code de la méthionine (Met)
<b>DI :</b>	Décilitre
<b>MII :</b>	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide

<b>mmol :</b>	Millimole
<b>MSP1 :</b>	Mérozoite Surface Protein 1
<b>N :</b>	Symbole de code de l'asparagine (Asn)
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>P :</b>	Symbole de code de la proline (Pro)
<b>PCR :</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>Pf :</b>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<b>pH :</b>	Potentiel d'Hydrogène
<b>PLDH :</b>	<i>Plasmodium</i> Lactate déshydrogénase
<b>Q :</b>	Symbole de code de la glutamine (Gln)
<b>R :</b>	Symbole de code de l'arginine (Arg)
<b>S :</b>	Symbole de code de la sérine (Ser)
<b>SNPs :</b>	Single Nucleotide Polymorphisme
<b>SP :</b>	Sulfadoxine-Pyriméthamine
<b>T :</b>	Symbole de code de la thréonine (Thr)
<b>TDR :</b>	Test de Diagnostic Rapide
<b>TPI :</b>	Traitement Préventif Intermittent
<b>μmol:</b>	Micromole
<b>V :</b>	Symbole de code de la valine (Val)
<b>W :</b>	Symbole de code du tryptophane (Trp)
<b>Y :</b>	Symbole de code de la tyrosine (Tyr)

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Schéma du cycle de développement de <i>Plasmodium</i> .....	10
<b>Figure 2 :</b> Distribution mondiale du paludisme .....	13
<b>Figure 3 :</b> Répartition du paludisme en fonction des zones de transmission au Tchad .....	16
<b>Figure 4:</b> Localisation de la ville de Pala .....	18
<b>Figure 5:</b> Localisation du site d'étude .....	45
<b>Figure 6 :</b> Confettis réalisé sur papier filtre Whatman 3 mm .....	55
<b>Figure 7:</b> Laboratoire de la Plate-forme de Biologie moléculaire .....	56
<b>Figure 8:</b> Protocole d'extraction au méthanol.....	58
<b>Figure 9:</b> Protocole d'extraction au Qiagen .....	60
<b>Figure 10 :</b> Profil de l'essai clinique .....	73
<b>Figure 11:</b> Distribution de la température moyenne des patients de J0 à J2 .....	76
<b>Figure 12 :</b> Évolution de la proportion de patients sans fièvre au cours du suivi .....	76
<b>Figure 13:</b> Évolution de la densité parasitaire et des patients porteurs des gamétocytes .....	78
<b>Figure 14:</b> Amplification du fragment d'ADN de <i>m<sub>sp</sub>2</i> de l'échec thérapeutique .....	79
<b>Figure 15:</b> Événements indésirables mis en évidence chez les patients .....	82
<b>Figure 16:</b> Profil électrophorétique des gènes <i>dhfr</i> , <i>dhps</i> et <i>k13-propeller</i> .....	84

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Codons des gènes impliqués dans la résistance <i>P. falciparum</i> .....	34
<b>Tableau II:</b> Marqueurs moléculaires de résistance de <i>P.falciparum</i> .....	37
<b>Tableau III :</b> Amorces et séquences utilisées pour l'amplification des gènes d'étude .....	48
<b>Tableau IV:</b> Dose d'artésunate-amodiaquine administrée aux enfants inclus dans l'étude ...	52
<b>Tableau V:</b> Composition des milieux réactionnels .....	62
<b>Tableau VI:</b> Composition des milieux réactionnels .....	64
<b>Tableau VII:</b> Composition des milieux réactionnels .....	66
<b>Tableau VIII:</b> Programmes d'amplification PCR1 et PCR2 des gènes .....	67
<b>Tableau IX:</b> Caractéristiques des patients à l'inclusion.....	74
<b>Tableau X :</b> Réponse thérapeutique à J28 .....	80
<b>Tableau XI:</b> Bilan de séquençage de fragments d'ADN de <i>P. falciparum</i> .....	85
<b>Tableau XII:</b> Répartition des isolats en fonction des codons <i>dhr</i> et <i>dhps</i> .....	87
<b>Tableau XIII:</b> Prévalence des mutants en fonction des gènes <i>dhfr</i> et <i>dhps</i> .....	89
<b>Tableau XIV:</b> Combinaison des génotypes <i>dhfr/dhps</i> .....	91

# **INTRODUCTION**

Du latin palus ou marais, le paludisme est défini à l'origine comme la fièvre des marais. C'est une maladie parasitaire endémo-épidémique provoquée par un protozoaire du genre *Plasmodium*. Elle est transmise à l'homme par la piqûre des moustiques femelles du genre *Anophèle*. (OMS, 2016). Le paludisme demeure l'un des défis les plus importants en santé publique dans le monde. Plus de 765 millions de personnes restent exposées au risque de paludisme. On estime environ à 216 millions de cas dans le monde et 445 000 décès sont imputables au paludisme. En 2016, 90% des cas de paludisme et 92% des décès ont été enregistrés en Afrique (OMS, 2016). Cependant, les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes sont les plus vulnérables.

Chez les sujets non prémunis que sont les jeunes enfants, et dans le cas de *Plasmodium falciparum* uniquement, l'état clinique peut rapidement s'aggraver pour évoluer vers un paludisme grave qui entraînera la mort de l'enfant. En 2016, environ 285 000 décès d'enfant sont rapportés en Afrique (OMS, 2016).

L'infection paludéenne chez la femme enceinte constitue un très grave problème de santé publique puisqu'elle comporte des risques non négligeables pour la mère, l'enfant à naître et le nouveau-né. En Afrique subsaharienne, plus de 35 millions de femmes enceintes dont 20% de primipares sont confrontées aux conséquences du paludisme (OMS, 2016). Dans les zones de faible transmission de *P. falciparum*, où les taux d'immunité acquise sont faibles, les femmes sont exposées à des accès de paludisme grave qui peuvent conduire à la naissance d'enfant mort-né, à un avortement spontané ou le décès de la mère. Dans les zones de forte transmission de *P. falciparum*, où les taux d'immunité acquise sont généralement élevés, les femmes sont exposées à une infection asymptomatique, qui peut entraîner une anémie maternelle et une parasitémie placentaire et une insuffisance pondérale à la naissance (OMS, 2011). Pour lutter contre le paludisme, l'OMS recommande à l'heure actuelle un ensemble d'interventions dont l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII), le traitement préventif intermittent (TPI) chez la femme enceinte et une bonne prise en charge des cas. Le TPI consiste à administrer à toutes les femmes enceintes au moins trois doses de sulfadoxine-pyriméthamine à chaque visite prénatale programmée après le premier trimestre de grossesse (OMS, 2013). Cependant, le médicament préconisé pour le traitement préventif intermittent est la sulfadoxine-pyriméthamine. Elle est administrée en une seule dose sous observation par un agent de santé. Le Tchad, à l'instar des autres pays d'Afrique, a adopté en 2005 une politique nationale de prise en charge du paludisme non compliqué basée sur l'Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et l'Artéméther-Luméfantrine (AL), respectivement comme traitements de première et deuxième intention, et la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP)

en TPI chez la femme enceinte (MSP, 2014). Les études relatives à l'efficacité thérapeutique restent la norme de référence pour orienter les politiques sur les médicaments. La réalisation régulière, tous les deux ans des Tests d'Efficacité Thérapeutique (TET), couplée aux études moléculaires est un moyen efficace de surveillance de la chimiorésistance dans les pays endémiques. Au Tchad, comme ailleurs dans le monde, les premières notions de diminution de la sensibilité et de résistances ont été documentées pour la première fois avec la chloroquine. En remplacement de la chloroquine, les CTAs ont été introduites en substitution dans les pays comme traitement de première et deuxième intention du paludisme non compliqué à *P. falciparum* (OMS, 2001). Cependant, des cas de résistance aux CTAs ont été rapportés dans certains pays (Ashley *et al.*, 2014 ; Takala-Harrison *et al.*, 2015). A cet effet, le gène *k13-propeller* a été identifié (Ariey *et al.*, 2014) comme marqueur moléculaire de résistance à l'artémisinine. C'est pour la première fois, que les premiers cas de résistance à l'artémisinine ont été notifiés au Cambodge, au Vietnam et au Laos. Quatre mutations ont été identifiées (Cys580Tyr, Arg539Thr, Tyr493His, Ile543Thr) (Denis *et al.*, 2006 ; Menard *et al.*, 2016). Par la suite, la résistance s'est étendue à l'Ouest Thaïlande, à Myanmar et en Chine. Quatre nouvelles mutations ont été identifiées Phe446Leu, Asn458Tyr, Pro574Leu, Arg561His (Menard *et al.*, 2016). En plus de ces mutations, huit mutations non synonymes ont été rapporté au Sud d'Asie et en Chine (Phe 446Leu, Asn458Tyr, Asn 537Asp, Arg539Thr, Ile543Thr, Pro 553Leu, Pro574Leu, Cys580Tyr) avant de se répandre en Asie du Sud-Est et au Sud de la Chine (Thriemer *et al.*, 2014 ; Menard *et al.*, 2016 ). Les études conduites jusque-là en Afrique n'ont pas mis en évidence ces mutations d'Asie. Cependant, des mutations synonymes et non synonymes ont été rapportées (Ashley *et al.*, 2014 ; Taylor *et al.*, 2015 ; Carter *et al.*, 2015 ; Zhou *et al.*, 2017). Au Ghana et Guinée Equatoriale deux mutations synonymes ont été rapportées (Val566Ile, Cys580Tyr) (Kamau *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2017). Ailleurs dans certains pays, des mutations non synonymes ont été rapportées notamment au Kenya en DRC au Gabon au Mali et au Nigeria (Ala578Ser, Cys469Cys, Pro441Leu) (Kamau *et al.*, 2014; Menard *et al.*, 2014). L'émergence et la diffusion des souches résistantes à l'artémisinine dans d'autres pays pourraient conduire à une impasse thérapeutique entraînant des conséquences dramatiques (Strainer, 2014). Concernant la SP, la résistance est due à l'analyse groupée des mutations sur le *pf dhfr* et *pf dhps* (Nagesha *et al.*, 2001 ; Tessema *et al.*, 2015 ; Sharma *et al.*, 2015). Ces gènes sont des marqueurs de surveillance utilisés pour suivre l'évolution des souches résistantes à la SP (Berzosa *et al.*, 2017). Les mutations sur ces gènes résultent d'un changement d'acide aminé qui réduit l'affinité entre les folates et l'enzyme.

Le *P. f dihydrofolate reductase (Pfdhfr)* est un gène situé sur le chromosome 4 qui code pour une enzyme intervenant dans la synthèse de folates. Le mécanisme de résistance est dû à l'action des antifolates (médicaments) qui inhibent l'activité enzymatique entraînant par la suite le blocage de la réplication de l'ADN. L'accumulation des mutations aux codons 16, 51, 59, 108 et 164 confère la résistance à la pyriméthamine.

Le *P. f dihydroptéroate synthase (Pfdhps)* est un gène situé le chromosome 8 qui code pour une enzyme intervenant la synthèse de folates. Cette enzyme est la cible des antifolates qui agit sur celle-ci pour bloquer la réplication de l'ADN. La présence de mutations aux codons 436, 437, 540, 581, 613 confère la résistance à la sulfadoxine.

dès 1950, des souches résistantes ont émergé en Asie du Sud-Est et en Afrique, puis se sont étendues à l'ensemble des zones endémiques où ces molécules sont largement utilisées (**Peterson et al., 1988**). En Afrique, la résistance de *P. falciparum* à la SP est rarement rapportée. Au Mali, au Bénin, au Burina Faso et au Ghana, les études menées ont montré une efficacité élevée de la SP chez la femme enceinte (**Diakite et al., 2011 ; Huynh et al., 2012 ; Bamba et al., 2013**). Néanmoins, dans certains pays comme la RDC, le Cameroun et le Gabon des inquiétudes s'installent sur la prévalence croissante de génotype triple mutant et double mutant, principaux marqueurs de résistance à la SP. Peu d'études portant sur les gènes de résistance à la SP (*dhfr*, *dhps*) et aux dérivés de l'artémisinine (*k13-propeller*) ont été réalisées dans le pays. A l'heure actuelle, le niveau de résistance à la SP ne peut être évalué que par les études moléculaires. La SP est utilisée en TPI chez la femme enceinte et en chimio-prévention saisonnière (CPS). Conformément aux directives nationales, la CPS introduite en 2015 consiste à administrer un traitement complet d'Amodiaquine (AQ) et de Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) aux enfants âgés de 3 à 59 mois (**MSP, 2014**). Face aux problèmes de résistance actuels, plusieurs efforts individuels ou collectifs ont été consentis par les pays endémiques pour surveiller l'émergence ou la diffusion des parasites résistants. Au Tchad, depuis l'introduction des CTA, seulement deux essais cliniques ont été effectués sur l'ASAQ en 2009 et 2011 (**DSIS, 2012 ; Tchonfiene, 2013**). Il est donc important, d'apporter des réponses aux trois questions de recherche suivantes :

1. La réponse thérapeutique de l'ASAQ serait-elle toujours bonne en vue de son maintien en traitement de première ligne ?
2. Existerait-il une émergence ou une diffusion de la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine à Pala au Tchad ?
3. Quel est le niveau de résistance actuel de *P. falciparum* à la SP ?



Pour ce travail, les hypothèses suivantes ont été proposées :

1. L'ASAQ serait toujours efficace dans le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* à Pala au Tchad ;
2. Il n'existerait pas à l'heure actuelle de souches résistantes aux dérivés de l'artémisinine à Pala ;
3. La prévalence des mutations des gènes *dhfr* et *dhps* conférant la résistance à la SP serait faible à Pala.

Les objectifs suivants ont été fixés :

### **Objectif général**

Il s'agit d'une part d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'association artésunate-amodiaquine chez les enfants âgés de 6-59 mois au cours du paludisme simple à *P. falciparum* à Pala et d'autre part de déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la Sulfadoxine-Pyriméthamine et à l'Artémisinine.

### **Objectifs spécifiques**

1. Déterminer la réponse clinique et parasitologique adéquate à J28 après correction PCR et la tolérance clinique de la combinaison artésunate-amodiaquine (ASAQ) chez les patients de Pala (Tchad) souffrant de paludisme simple à *P. falciparum* ;
2. Déterminer la prévalence des mutations affectant les gènes *dhfr*, *dhps* et *k13-propeller* des fragments d'ADN de *P. falciparum* des patients souffrant de paludisme simple à Pala (Tchad) ;
3. Analyser le polymorphisme des gènes *dhfr* et *dhps* marqueurs moléculaires de la résistance à la SP.

# **I. GENERALITES**

## **I.1. Épidémiologie**

Le paludisme est une maladie parasitaire endémo-épidémique provoquée par un protozoaire du genre *Plasmodium*. Elle est transmise à l'homme par la piqûre des moustiques femelles infectés du genre *Anopheles* (OMS, 2013).

### **I.1.1. Agents pathogènes**

#### **❖ Taxonomie**

Les plasmodies sont des protozoaires appartenant :

- Au Phylum : *Apicomplexa* ;
- A la Classe : *Sporozoea* ;
- A la Sous classe : *Coccidia* ;
- A l'Ordre : *Eucoccidiida* ;
- Au Sous ordre : *Haemosporina* ;
- A la famille : *Plasmodiidae*
- Au Genre : *Plasmodium*.
- A l'espèce: *P. falciparum*

#### **❖ Espèces**

Il existe 140 espèces environ et seulement 5 sont responsables de la maladie chez l'homme (Nambeole, 2014) :

1. *P. falciparum*;
2. *P. malariae*;
3. *P. ovale*;
4. *P. vivax*;
5. *P. knowlesi* ;

#### **➤ *Plasmodium falciparum***

Il est largement distribué en Afrique subsaharienne, en Amérique du Sud, et en Asie du Sud-Est (Hay *et al.*, 2009). *P. falciparum* est responsable de la fièvre tierce maligne. Au niveau

du foie, il évolue successivement en stades mérozoïte, trophozoïte, puis en schizonte. *P. falciparum* ne présente pas de réviviscence schizogonique. Au niveau du sang, les hématies parasitées sont séquestrées du fait de leur adhérence à l'endothélium. Chaque schizogonie dure 48 heures et conduit à la destruction du globule rouge hôte et à la libération de nouveaux mérozoïtes (Hay *et al.*, 2009).

➤ *Plasmodium malariae*

Il est rencontré dans les zones endémiques tropicales et subtropicales. Il est responsable de la fièvre quarte bénigne ou fièvre quarte. L'espèce *P. malariae* peut causer à la longue des lésions rénales graves pouvant évoluer vers l'insuffisance rénale (Hay *et al.*, 2009).

➤ *Plasmodium ovale et Plasmodium vivax*

Le *Plasmodium ovale* est essentiellement observé en Afrique intertropicale mais aussi en Asie du Sud-Est.

*P. vivax* sévit en Amérique du centre et du Sud, en Asie du Sud-Est, en Afrique de l'Est (Soudan), au Proche et Moyen-Orient.

L'évolution de ces deux espèces est différente de celle de *P. falciparum*. Au niveau du foie, une partie des trophozoïtes évoluent directement jusqu'aux schizontes matures. Les autres trophozoïtes ont une schizogonie tissulaire retardée et à déclenchement périodique expliquant l'existence des rechutes à long terme (Nambeole, 2014). Ces deux espèces sont responsables de la fièvre tierce bénigne (accès fébriles apparaissant tous les trois jours).

➤ *Plasmodium knowlesi*

Il sévit en Asie du Sud-Est (particulièrement en Malaisie, à Bornéo), en zone forestière car il est étroitement lié à la répartition des singes macaques, son hôte habituel. Il est morphologiquement proche de *Plasmodium malariae*. Il se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24 heures responsable d'une fièvre quotidienne (Hay *et al.*, 2009).

Parmi les cinq espèces de *Plasmodium*, *P. falciparum* représente l'espèce la plus redoutable, car à l'origine des formes graves du paludisme notamment chez les enfants de moins de 5 ans (Nambeole, 2014) et impliqué dans les phénomènes de pharmaco-résistance et de chimiorésistance.

## I.1.2. Agent vecteur

### ❖ Taxonomie

Les vecteurs des plasmodies appartiennent :

- A l'Embranchement : *Arthropoda*
- A la Classe : *Insecta*
- A la Sous-classe : *Pterygota*
- A l'Ordre : *Diptera*
- Au Sous-ordre : *Nematocera*
- A la Famille : *Culicidae*
- A la Sous-famille : *Anophelinae*
- Au Genre : *Anopheles*,

Il existe environ 500 à 600 espèces d'*Anopheles* mais seulement 70 à 80 d'entre elles sont vectrices de *Plasmodium* chez l'homme. Ces vecteurs sont localisés en Afrique subsaharienne, en Asie. Au Tchad, les principaux vecteurs du paludisme couramment rencontrés sont : *Anopheles arabiensis* : ubiquiste, mais prédominant dans les localités situées au nord de Kélo (9°32 N, 15°80 E) et au sud du Sahara ; *Anopheles gambiae s.s* : forme M au sud de Bongor (10°28 N, 15°36 E) et forme S au sud de Kélo (majoritaire à l'extrême-sud) ; *Anopheles funestus* : zone soudanienne et sahélienne ; *Anopheles pharoensis* : ubiquiste (même au Tibesti) ; *Anopheles ziemanni* : zone sahélienne. Au sud du Tchad, dix (10) espèces Anophéliennes ont été mises en évidence : *Anopheles gambiae s.s*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles pharoensis*, *Anopheles funestus*, *Anopheles ziemanni*, *Anopheles rufipes sp.*, *Anopheles wellcomei*, *Anopheles squamosus*, *Anopheles nili*, *Anopheles coustani*. (Kérah, 2010).

## I.2. Cycle évolutif

Le cycle de *Plasmodium* se décompose en une phase sexuée qui se déroule chez l'insecte vecteur, l'anophele femelle et une phase asexuée observée chez l'hôte intermédiaire vertébré (Figure 1).

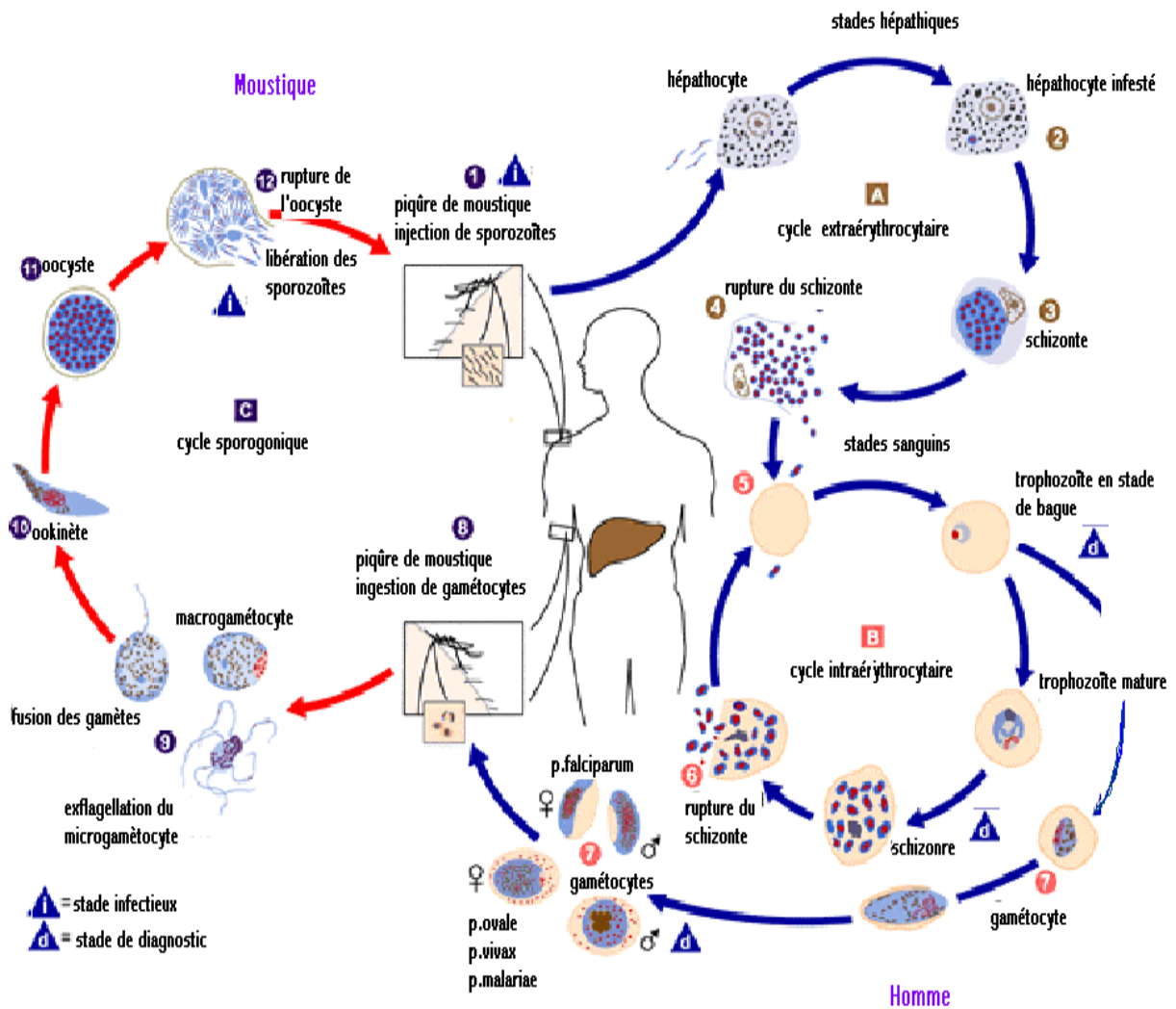


Figure 1: Schéma du cycle de développement de *Plasmodium*

Source : ([https://www.memoireonline.com/Biologie et Médecine](https://www.memoireonline.com/Biologie_et_Médecine)). Consulté le 22/06/2018

### **I.2.1. Phase asexuée**

Elle se déroule chez l'homme. *Anopheles* femelle infesté, au cours de son repas sanguin, inocule des sporozoïtes localisés dans ses glandes salivaires. Le nombre de sporozoïtes inoculés est estimé entre 20 et 200. Après leur pénétration environ une demi-heure, les sporozoïtes gagnent les cellules hépatiques et se divisent.

#### **➤ Cycle hépatique**

Dans les hépatocytes, les sporozoïtes se multiplient et évoluent en schizontes ou « corps bleus » après 8 à 15 jours de maturation selon les espèces. Ces schizontes éclatent et libèrent dans le sang des milliers de mérozoïtes. L'invasion des hépatocytes se fait soit à travers la membrane plasmique soit par la formation d'une vacuole essentielle à sa différenciation (**Prudencio et al., 2006 ; Tardieux et Menard, 2008**). Des études *in vitro* ont montré qu'un changement de température est nécessaire pour l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes. Chez les espèces telles que *P. ovale* et *P. vivax*, certains sporozoïtes peuvent rester quiescents dans les hépatocytes sans se transformer en corps bleu donnant ainsi naissance à des hypnozoïtes responsables des accès de reviviscence tardive (**Siau et al., 2008**).

#### **➤ Cycle érythrocytaire**

La phase érythrocytaire est initiée par la libération des mérozoïtes dans la circulation sanguine suite à la rupture des schizontes hépatiques. C'est un processus complexe faisant intervenir de multiples interactions entre ligands et récepteurs. L'invasion des hématies qui se fait grâce à un processus d'endocytose dure environ 30 secondes (**Tamez et al., 2009**). A maturité, le schizonte encore appelé corps en rosace éclate et les mérozoïtes libérés envahissent immédiatement de nouvelles hématies. Après plusieurs cycles asexués schizogoniques endo-érythrocytaires, certains parasites se différencient en éléments à potentiel sexué, les gamétocytes mâles et femelles, uni nucléés, qui permettront la poursuite du cycle chez le moustique.

### **I.2.2. Phase sexuée chez l'anophèle**

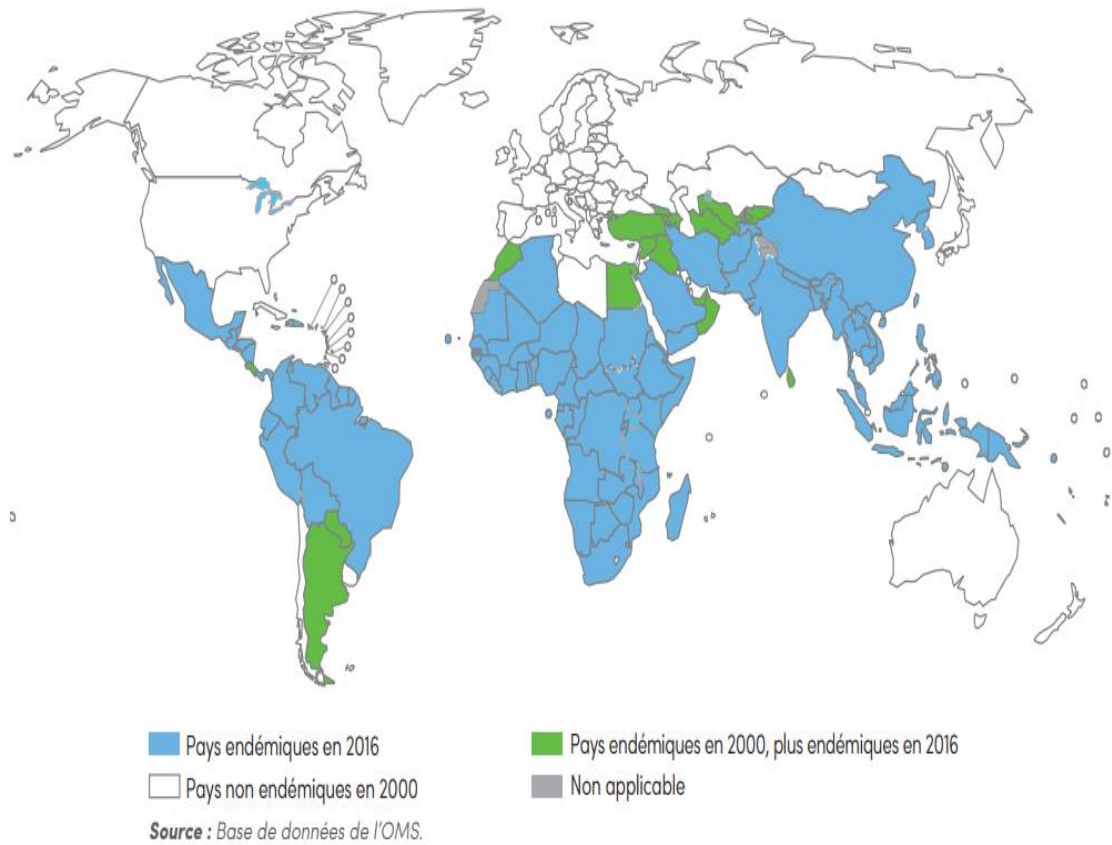
En prenant un repas de sang sur un sujet infesté, l'anophèle femelle absorbe les différents stades du parasite. Les éléments asexués (trophozoïtes et schizontes) sont digérés. Seuls les gamétocytes poursuivent leur développement.

Le gamétocyte mâle, parvenu dans l'estomac du moustique, libère 4 à 8 éléments minces, allongés, flexueux, mobiles: c'est le phénomène de l'exflagellation. Ces éléments sont appelés microgamètes. Quant aux gamétocytes femelles, ils subissent une maturation et deviennent des gamètes femelles ou macrogamètes. L'un des microgamètes pénètre dans le macrogamète ; les deux noyaux fusionnent, il y a fécondation et formation d'un oeuf mobile appelé ookinète. Cet ookinète, grâce à sa mobilité va s'enfoncer dans la paroi de l'estomac du moustique pour finalement s'immobiliser entre l'épithélium et la couche musculaire. Il devient un oocyste qui va grossir pour atteindre et même dépasser 60 micromètres de diamètre. Le noyau de l'oocyste se divise plusieurs fois, puis suivent les divisions cytoplasmiques. Il se forme ainsi à l'intérieur de l'oocyste des milliers d'éléments, qui d'abord arrondis, vont devenir fusiformes, allongés : les sporozoïtes. Parvenu à maturité, l'oocyste éclate et libère les sporozoïtes qui vont envahir les glandes salivaires du moustique. L'anophèle devenu infectant contaminera un nouvel individu en lui inoculant lors d'un repas de sang, des sporozoïtes. La durée du cycle sporogonique est en moyenne de 10 à 40 jours, en fonction de la température, de l'humidité de l'air et de l'espèce plasmodiale (Duraisingh *et al.*, 2008 ; Siau *et al.*, 2008).

### **I.3. Répartition géographique du paludisme**

Il est possible de dresser les grandes lignes de la répartition géographique du paludisme à travers le monde. Toutefois, il est important de comprendre qu'en raison des facteurs influençant l'épidémiologie évoqués précédemment (distribution des *Anopheles*, capacité vectorielle, caractéristiques biologiques des différentes espèces de *Plasmodium*, etc.) la répartition géographique varie d'un continent à l'autre, d'un pays à l'autre, mais aussi d'une région à une autre (figure 2).





**Figure 2 : Distribution mondiale du paludisme (OMS, 2016)**

### **I.3.1. Monde**

Le paludisme sévit d'une manière endémique dans les régions tropicales et subtropicales. En 2016, le nombre de cas de paludisme a été estimé à 216 millions (**figure 2**). La plupart des cas (90 %) ont été enregistrés en Afrique. Sur les 91 pays ayant rapporté des cas de paludisme indigène en 2016, 15 représentent 80 % du nombre de cas de paludisme dans le monde et tous, sauf l'Inde, sont en Afrique subsaharienne. Au niveau mondial, l'incidence du paludisme est estimée en baisse de 18 % ; elle passe en effet de 76 cas de paludisme pour 1 000 habitants exposés au risque de paludisme en 2010 à 63 pour 1 000 en 2016. La région Asie du Sud-Est de l'OMS enregistre la baisse la plus prononcée (48 %), suivie des régions Amérique (22 %) et Afrique (20 %). En 2016, la plupart de ces décès sont survenus dans la région Afrique (91 %), loin devant la région Asie du Sud-Est (6 %) (**OMS, 2017**).

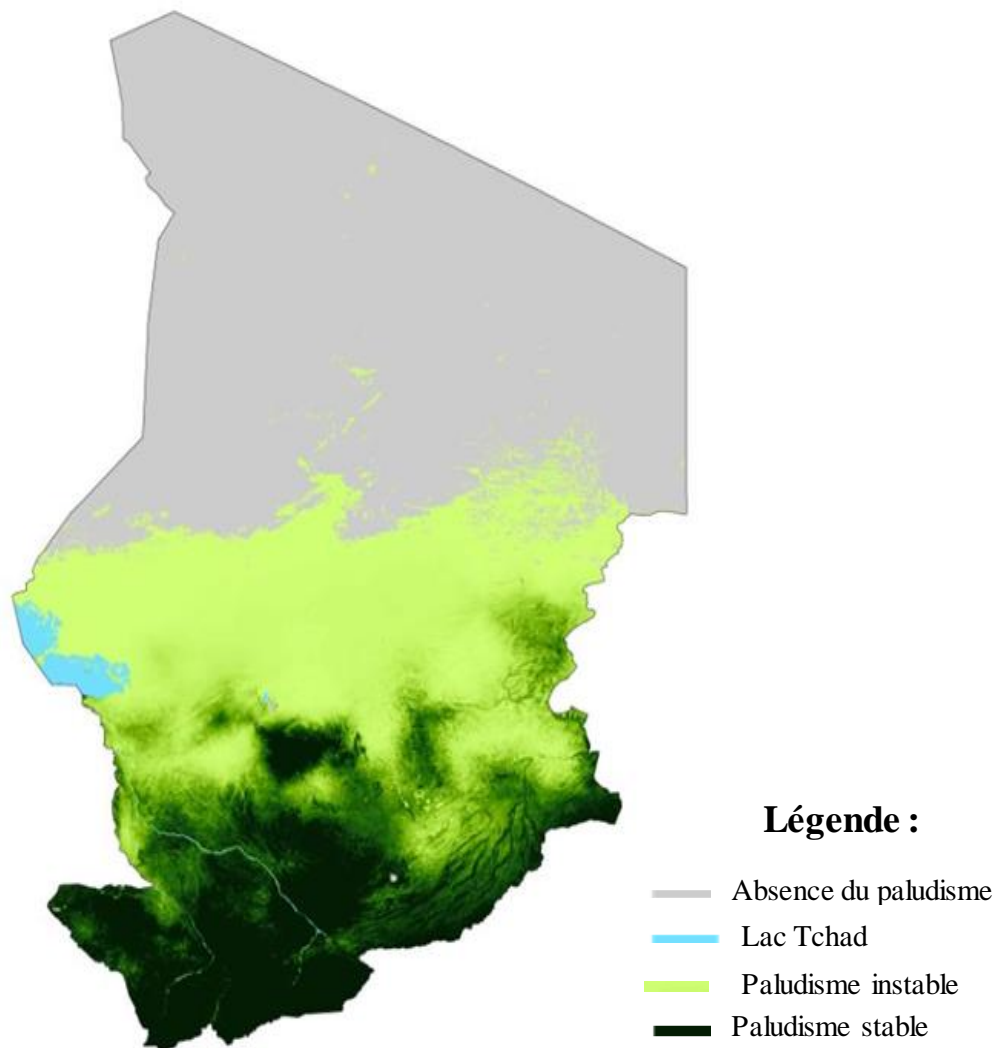
### **I.3.2. Afrique**

L'immense majorité des décès dus au paludisme surviennent en Afrique, au sud du Sahara, où cette maladie fait aussi obstacle au développement économique et social. On estime à plus de 12 milliards la perte annuelle de produit intérieur brute (PIB) due au paludisme en Afrique, alors qu'une fraction de cette somme suffirait à le maîtriser (**OMS, 2010**). Le paludisme est la principale cause de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique (20 %) et il représente 10 % de la charge totale de morbidité du continent. Il est responsable de 40% des dépenses de santé publique, de 30-50% des admissions dans les hôpitaux et de plus de 50% des consultations externes dans les zones de forte transmission (**OMS, 2010**). Le paludisme affecte essentiellement l'Afrique, et ce pour plusieurs raisons. Cette région héberge aussi les espèces de moustiques les plus virulents. De nombreux pays d'Afrique sont en outre privés d'infrastructures et de ressources nécessaires pour organiser des campagnes antipaludiques durables et peu d'entre eux ont donc bénéficié des efforts déployés de longue date pour contrôler le paludisme.

### **I.3.3. Tchad**

Le paludisme constitue la première cause de morbidité dans les formations sanitaires. Dans la population générale estimée à 12 680 772 habitants en 2013, la prévalence du paludisme est de 29,8 %. Cette prévalence varie selon les tranches d'âge, 35,8 % chez les enfants de moins

de 5 ans, 39,3 % chez les enfants de 5 à 14 ans et 15,2 % chez les enfants plus de 15 ans. La prévalence est plus élevée chez les hommes (32,3 %) que chez les femmes (27,8 %). De même la prévalence du paludisme est plus élevée en milieu rural (35,1 %) par rapport au milieu urbain où ce taux se situe à 18,3 %. En zone soudanienne, la prévalence du paludisme est très élevée (43,8 %) (**Figure 3**) alors qu'elle est très faible (6,1 %) en zone sahélo-saharienne (**DSIS, 2012**).



**Figure 3 :** Répartition du paludisme en fonction des zones de transmission au Tchad (DSIS, 2012)

### **I.3.3.1. Pala**

L'étude a été menée dans le District Sanitaire de Pala, région région du Mayo-Kebbi Ouest. Pala est une ville du Tchad, elle est le chef-lieu de la région du Mayo-Kebbi Ouest (9°21'00" N ; 14°58'00" W) et du département du Mayo-Dallah. La ville de Pala, est située à 530 km de N'Djaména. La population était estimée à 108 374 habitants selon le deuxième recensement général de la population et de l'habitat (**Figure 4**).



**Figure 4:** Localisation de la ville de Pala

#### **I.4. Différents types de paludisme**

L'apparition des signes cliniques dépendent de l'état immunitaire de chaque individu, soit du système immunitaire, soit des espèces plasmodiales. Les manifestations cliniques n'apparaissent qu'à la phase endo-érythrocytaire qui correspond à la multiplication des parasites dans le sang.

##### **I.4.1. Paludisme simple**

Le paludisme simple se définit par une fièvre (température axillaire  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  ou un antécédent de corps chaud dans les 72 dernières heures) et la mise en évidence du *Plasmodium* dans le sang par un examen microscopique (GE/FS) ou par un Test de Diagnostic Rapide (TDR) et une absence de signe de gravité (OMS, 2009). Le principal facteur déclenchant la fièvre est la libération, au moment de l'éclatement des hématies parasitées, du pigment malarique (hémozoïne) qui se comporte comme une substance pyrogène et qui agit sur les centres bulbaires de la thermorégulation mais aussi les endotoxines plasmodiales qui stimulent la production du tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) par les macrophages. Le paludisme simple se traduit par un tableau de gastro-entérite aiguë et fébrile. Il s'accompagne d'un malaise général avec myalgies, céphalées, fatigue, nausées, courbatures, diarrhées, vomissements, hépatomégalie, splénomégalie. Ces symptômes peuvent être facilement confondus avec d'autres infections telles que la grippe ou une infection gastro-intestinale, d'où les difficultés de diagnostic. Le foie peut parfois augmenter de volume et être douloureux. On observe ainsi une diminution de la diurèse avec des urines foncées contenant des traces de protéines (Gentilini, 1993).

##### **I.4.2. Paludisme grave**

C'est une urgence médicale car il met en cause le pronostic vital. Selon l'OMS, il se définit par la présence chez un sujet présentant des formes asexuées de *P. falciparum* à l'examen sanguin associée à une ou plusieurs des manifestations cliniques ou biologiques suivantes (OMS, 2013) (Annexe 2).

### **I.4.3. Paludisme chez la femme enceinte**

L'infection palustre pendant la grossesse représente un problème de santé publique majeur, provoquant des risques pour la mère, le fœtus puis le nouveau-né. Les symptômes et les complications liés au paludisme pendant la grossesse varient en fonction des zones de transmissions et de l'immunité. Dans les zones de forte transmission, où les niveaux d'immunité acquise ont tendance à être élevés, l'infection par *P. falciparum* est habituellement asymptomatique pendant la grossesse. Toutefois, les plasmodies peuvent être présentes dans le placenta et contribuer à une anémie maternelle même en l'absence d'une parasitémie périphérique avérée. Une anémie maternelle, comme une parasitémie placentaire peut être responsable d'un faible poids de naissance, un facteur important dans la mortalité infantile. Dans les zones de faible transmission, où les femmes en âge de procréer ont une immunité acquise relativement faible contre le paludisme, une infection palustre pendant la grossesse est associée à une anémie, un risque accru de paludisme sévère, et peut provoquer des avortements spontanés, des mort-nés, des prématurés et des faibles poids de naissance (OMS, 2017).

Les traitements préventifs intermittents pour les femmes enceintes par la sulfadoxine-pyriméthamine réduisent les épisodes de paludisme chez la mère, ainsi que les risques d'anémie maternelle, de parasitémie placentaire, de faible poids de naissance et de mortalité néonatale. En outre, toutes les femmes enceintes devraient recevoir une supplémentation en fer et en acide folique (OMS, 2017).

### **I.5. Diagnostic du paludisme**

L'OMS recommande que tous les cas suspects de paludisme soient confirmés par un test de diagnostic avant tout traitement. La microscopie demeure aujourd'hui un outil technique de référence du diagnostic palustre (Faye *et al.*, 2007).

#### **I.5.1. Diagnostic direct**

C'est la mise en évidence des parasites dans le prélèvement sanguin coloré sur goutte épaisse (GE) ou frottis sanguin mince (FM).



### I.5.1. 1. Goutte Epaisse

La Goutte Epaisse (GE) est une technique de micro-concentration des parasites sur une petite surface. Elle consiste à déposer une goutte de sang sur une lame porte-objet propre. Le sang est écrasé par un mouvement en spirale à l'aide d'un coin d'une autre lame. Après séchage, l'étalement est coloré au Giemsa dilué au 1/10<sup>ème</sup> pendant 10 à 15 minutes. Dont la lecture se fait au microscope optique à l'objectif 100.

Le seuil de détection est de 10 à 20 parasites asexués / $\mu$ L. La GE est plus sensible que le frottis, mais les hématies sont détruites et les parasites sont déformés rendant la reconnaissance de ces derniers plus difficile. Toutefois, elle permet de rattraper des frottis faussement négatifs (Rogier *et al.*, 2009).

### I.5.1. 2. Frottis Sanguin

C'est un étalement mince sur une lame porte-objet. La coloration du frottis sanguin se fait dans les mêmes conditions que celles décrites pour la GE, toutefois, la préparation est préalablement fixée au méthanol avant la coloration au Giemsa dilué au 1/10<sup>ème</sup>. Dans ce cas, les érythrocytes sont conservés avec les parasites. Le frottis permet de mettre en évidence les hématozoaires intra érythrocytaires. Le frottis facilite le diagnostic d'espèces. Il permet également de mettre en évidence les différentes formes évolutives notamment au cours du paludisme à *P. falciparum*, les schizontes et les gamétocytes (Malvy *et al.*, 2000).

### I.5.1.3. Tests de Diagnostic Rapide

- ✓ **Principe** : Les TDRs permettent de détecter la présence d'antigènes spécifiques du parasite dans le sang. C'est une chromatographie sur papier où sont fixés des anticorps dirigés contre l'Histidin Rich Protein 2 (HRP2) de *P. falciparum* et/ou contre la pLDH (lactate déshydrogénase) de *Plasmodium* (Sayang *et al.*, 2009).
- ✓ **Interprétation** : Une goutte de sang est placée sur la bandelette de test, où les anticorps et les antigènes se rencontrent pour créer une ligne distincte indiquant un test positif, négatif ou invalide. Par ailleurs, si une ligne apparaît dans la fenêtre de contrôle et une autre dans la fenêtre test, le test est **positif** même si la ligne de test est très fine. Dans le cas contraire, une ligne apparaît dans la fenêtre de contrôle mais aucune ligne dans la fenêtre test, le test est **négatif**. Par conséquent, le test est **invalide** lorsqu'il n'y a aucune ligne sur les deux

fenêtres (test et contrôle) ou une ligne dans la fenêtre de contrôle mais aucune ligne dans la fenêtre test (**Malvy et al., 2000**). **Avantage** : Les tests TDRs sont simples à utiliser, rapides et n'exigent ni électricité, ni matériel spécial. La spécificité est élevée. Les TDRs sont disponibles sous différentes formes : des bandelettes, cassettes ou cartes. (**Kyabayinze et al., 2008 ; Murray et al., 2008**).

- ✓ **Inconvénients** : Parfois, les TDRs donnent un résultat erroné. En cas de faible parasitémie, le TDR peut révéler un résultat négatif. Le résultat peut être positif après la disparition des parasites. Car, l'HRP2 n'est pas liée à la persistance des parasites circulants et persiste jours après la négativité des tests microscopiques. Les TDRs ne peuvent pas déterminer la quantité de parasites du paludisme présents dans le sang. Ils ne peuvent déterminer que la présence ou l'absence de parasites dans le sang (**Rogier et al., 2009 ; Moody, 2002**).

## **I.5.2. Diagnostic indirect**

### **I.5.2.1. Polymerase Chain Reaction**

Elle est en général réservée pour la recherche en raison de son coût.

- **Principe** : La PCR est une technique d'amplification d'ADN permettant d'obtenir un grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Les produits d'amplification sont révélés par électrophorèse (**Moody, 2002**).
- **Interprétation** : Elle repose sur la présence ou l'absence d'une bande du même poids moléculaire que l'ADN cible (**Aretz et al., 2007**).
- **Avantages** : la technique est rapide avec une grande sensibilité et une spécificité élevée.
- **Inconvénients** : la contamination et la présence d'inhibiteurs peuvent donner respectivement de faux positifs et de faux négatifs. Le manque de fiabilité de la Taq ADN polymérase et les erreurs de réplication peuvent engendrer des résultats erronés. Enfin le coût élevé de la technique constitue une limite (**Moody, 2002**).

### **I.5.2.2. Enzyme linked immunosorbent assay**

- **Principe** : Cette technique permet de mettre en évidence dans le sérum du malade la présence d'anticorps spécifique (IgG , IgM) dirigés contre le *P. falciparum*. La technique ELISA est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps (**Camara et al., 2009**).
- **Interprétation** : Le test ELISA permet d'obtenir un résultat quantitatif qui se visualise par la présence d'une coloration dans les puits où l'organisme pathogène est présent. La présence d'une coloration dans un puits indique que l'anticorps lié à l'enzyme s'est fixé à l'antigène, lequel s'était fixé antérieurement à l'anticorps de recouvrement.
- **Avantage** : L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection spécifique.. L'utilisation d'anticorps secondaires rend la technique sensible. La détection du signal ne nécessite pas la présence d'appareillage spécialisé. La validité des trousse est d'environ un an.
- **Inconvénients** : la limite de détection n'est pas élevée. La réaction enzymatique rend cette technique dépendante de la température, du pH.

### **I.6. Principales familles d'antipaludiques et leurs utilisations**

Un antipaludique est un médicament naturel ou de synthèse pouvant être administré par voie orale, parentérale ou rectale, à dose unique ou répétée, et qui permet de détruire le *Plasmodium* ou de bloquer sa croissance afin de prévenir ou de guérir le paludisme (**Sow S, 2009**). Les antipaludiques sont classés selon leurs modes d'action en schizonticides et gamétocytocides (**Coulibaly, 2008**).

**Schizonticides** : Les schizonticides sont des médicaments qui agissent sur les formes érythrocytaires asexuées. La résistance aux antipaludiques intra-érythrocytaires serait due à des expulsions des antipaludiques par les parasites.

**Gamétocytocides** : Les gamétocytocides sont des antipaludiques actifs sur les gamétocytes qui permettent de lutter contre la transmission du parasite.

La primaquine est un antipaludique dérivé de la quinoléine (amino-8-quinoléine) qui agit sur les gamétocytes présents dans le sang en empêchant leur développement (devenir des gamètes) chez l'anophèle. Plus intéressant est l'activité de la primaquine sur les formes exoérythrocytaires de *P. vivax* et de *P. ovale*. Son association à un schizonticide permet donc

normalement d'assurer une cure radicale de ces affections avec absence du risque de rechutes. Cependant, la primaquine n'est pas d'usage courant comme médicament antipaludique dans les accès palustres à *P. falciparum* (Coulibaly, 2008).

### **I.6.1. Famille des lysomotropes**

Cette famille comprend les dérivés de l'artémisinine, les amino-alcools et les amino-4-quinoléines. Ces différentes molécules se concentrent plus de 100 fois dans la vacuole digestive des parasites. Le nom lysomotrope provient de l'analogie de pH observée dans la vacuole digestive des parasites et dans les lysosomes des cellules de mammifères (Coulibaly, 2008)..

#### ➤ **Dérivés de l'artémisinine**

Depuis plus de 2000 ans, une armoise, *Artemisia annua*, est utilisée en médecine traditionnelle chinoise comme fébrifuge et anti-hémorroïdaire. Sa propriété antipaludique est liée à l'activité d'un principe actif de la famille des endoperoxydes, le qinghaosu ou artémisinine. Son mode d'action n'est pas encore entièrement élucidé mais il interagirait avec l'hème du parasite et certaines protéines parasitaires dont une pompe à calcium ATP dépendante (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). Ces composés ont une action très rapide sur les stades érythrocytaires du parasite, du trophozoïte jeune au schizonte mûre et une activité gamétocytocide. Cette rapidité d'action combinée à une demi-vie très courte permet de limiter l'exposition des parasites à des doses subthérapeutiques de principe actif, ce qui devrait réduire la fréquence d'émergence de parasites résistants. Aujourd'hui sous l'impulsion de l'OMS, la presque totalité des pays d'endémie palustre ont adopté les combinaisons thérapeutiques à base des dérivés de l'artémisinine (CTA) dans les stratégies de traitement de première et de seconde ligne du paludisme simple à *P. falciparum*. L'artéméter injectable et l'artésunate injectable sont préconisés dans le traitement du paludisme grave chez les enfants et les adultes.

#### ➤ **Amino-alcools**

L'écorce de quinquina est aussi utilisée comme fébrifuge depuis de nombreux siècles par les indigènes d'Amérique du Sud. Isolée au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, la quinine reste aujourd'hui un traitement de choix pour le paludisme grave. Dans cette famille on retrouve d'autres

composés majeurs notamment la méfloquine et deux molécules apparentées, l'halofantrine et la luméfantrine.

### ➤ Amino-4-quinoléines

La chloroquine est le premier antipaludique de synthèse. A partir de 1944, ce principe actif sera utilisé en prophylaxie et pour le traitement des accès palustres non compliqués. Peu coûteuse, elle deviendra rapidement l'antipaludique le plus utilisé au cours du XX<sup>ème</sup> siècle. Cette famille comprend également l'amodiaquine, découverte en 1948.

### I.6.2. Famille des antimétabolites

Les antifoliniques et les antifoliques font partie de la grande famille des antimétabolites. Les premiers ont été développés après la seconde guerre mondiale, le proguanil en 1945 et la pyriméthamine en 1952. Les antifoliques, la sulfadoxine et les sulfones, sont le plus souvent utilisés en association avec la pyriméthamine. Ces deux classes de composés agissent au niveau de la synthèse des acides nucléiques des parasites, les antifoliniques au niveau de la dihydrofolate réductase-thymidylate synthase et les antifoliques au niveau de la dihydroptéroate synthase (**Sridaran et al., 2010**). Ils agissent donc sur tous les stades du développement parasitaire nécessitant une synthèse d'acide nucléique.

Les lysosomotropes et les antimétabolites sont des schizonticides qui agissent uniquement sur les formes intra-érythrocytaires asexuées du parasite.

Les hydroxynaphthoquinones sont représentées uniquement par l'atovaquone. C'est un analogue de l'ubiquinone présent dans les mitochondries parasitaires et intervenant dans les réactions d'oxydo-réduction. L'atovaquone forme un complexe irréversible avec le complexe cytochrome bc bloquant ainsi le transport des électrons et par conséquent la synthèse des pyrimidines entrant dans la composition de l'ADN (**Ittarat et al., 1995**). Par ce mécanisme, l'atovaquone présente un large spectre d'activité antiparasitaire sur les plasmodies, les toxoplasmes, et *Pneumocystis carinii*. Contre les plasmodies, l'atovaquone a présenté une bonne activité schizonticide sur les souches chloroquinorésistantes et une absence de résistance croisée avec les autres antipaludiques (**Basco et al., 1995**) mais lorsqu'elle a été administrée en monothérapie, un taux de recrudescence élevé a été observé (**Chiodini et al., 1995 ; Looareesuwan et al., 1999**) ; d'où la nécessité d'association pour une meilleure efficacité (**Chiodini et al., 1995**). Parmi plusieurs antipaludiques testés, le proguanil a montré *in vitro* une bonne synergie d'action et une potentialisation de l'atovaquone (**Looareesuwan**

*et al.*, 1992). L'association atovaquone-proguanil est utilisée en prophylaxie du paludisme avec une certaine activité sur les schizontes intrahépatiques. Cependant, des cas de résistance à cette association ont été signalés.

### **I.6.3. Antibiotiques à activité antipaludique**

En plus de leur propriété bactériostatique ou bactéricide, certains antibiotiques possèdent une activité schizontocide modérée sur les *Plasmodium* humains, propriété exploitée en thérapeutique. Ce sont les cyclines (doxycycline, tétracycline), les macrolides (azithromycine, clindamycine, érythromycine, fosmidomycine) et divers antibiotiques (rifampicine, Micrococcine). Parmi eux, les plus utilisés sont les cyclines et, à un moindre degré, les macrolides. Ces antibiotiques sont actifs sur les formes sanguines et les formes exo-érythrocytaires primaires du *Plasmodium*. Ils sont utilisés en association avec la quinine notamment dans les régions d'Asie du sud-est où la sensibilité de *P. falciparum* à cette molécule est diminuée (**Pukrittayakamee et al.**, 2004). Des associations de la doxycycline et de l'azythromycine sont également proposées avec les dérivés de l'artémisinine (**Noedl et al.**, 2006). La doxycycline est aussi préconisée en chimioprophylaxie antipalustre où son efficacité est comparable à celle de la méfloquine. Cependant, en cas d'utilisation prolongée, elle pourrait agir sur le tissu épidermique, notamment sur la kératine et la mélanine, avec des risques de granulomes cutanés dus à sa phototoxicité, et plus rarement des ulcérations oesophagiennes. En outre, la prise régulière et prolongée de la doxycycline pourrait provoquer une modification de la flore bactérienne voire une sélection de souches résistantes aux cyclines et des troubles digestifs (**Noedl et al.**, 2006).

### **I.6.4. Antipaludiques et grossesse**

Aujourd'hui la plupart des antipaludiques sont contre indiqués chez la femme enceinte par précaution d'ailleurs plutôt que par l'existence de données avérées suggérant une toxicité embryonnaire. Seules la chloroquine, la sulfadoxine-pyriméthamine et la quinine sont clairement indiquées chez la femme enceinte. Par contre la primaquine et les tétracyclines sont absolument contre-indiquées dans cette population. Des essais cliniques portant sur les combinaisons thérapeutiques à base des dérivés de l'artémisinine, l'amodiaquine, la méfloquine ont été conduits chez les femmes enceintes. Ces études ont montré que ces médicaments pourraient être utilisés chez la femme enceinte en particulier au deuxième et troisième trimestre de la grossesse (**GreadyMc et al.**, 2005). En effet, il faudra de nombreuses

études de pharmacovigilance avant de valider l'utilisation de ces médicaments chez la femme enceinte. En plus, des études pharmacocinétiques devraient être conduites simultanément pour adapter les posologies de ces médicaments à la femme enceinte (**Dellicour et al., 2008**). Néanmoins l'OMS recommande les combinaisons thérapeutiques à base de dérivés de l'artémisinine dans cette population au cours des seconds et troisièmes trimestres. Pour le premier trimestre les CTA ne peuvent être administrées à la femme enceinte que si c'est le seul traitement disponible ou en cas d'échec à la quinine (**OMS, 2010**).

## **I.7. Directives nationales de traitement au Tchad**

### **I.7.1. Traitement du paludisme simple**

Le médicament de première intention pour traiter le paludisme simple est la combinaison Artésunate-Amodiaquine pour les enfants à partir de 2 mois, les adultes et les femmes enceintes à partir du deuxième trimestre à tous les échelons de prestation des soins. En cas d'échec thérapeutique, de contre-indication ou d'intolérance, l'Artéméther-Luméfantrine est prescrit. Chez la femme enceinte au premier trimestre, la prise en charge est faite avec la quinine sous forme orale, les CTA étant recommandées seulement à partir du deuxième trimestre de la grossesse.

### **I.7.2. Traitement du paludisme grave**

Le paludisme grave est pris en charge par les centres hospitaliers. Le traitement repose sur l'artésunate, la quinine injectable ou l'artéméther injectable. Les sites communautaires et les Centres de Santé qui reçoivent les patients atteints de paludisme grave doivent les référer en urgence vers un centre de santé ayant un plateau technique adéquat après administration du traitement pré-référentiel : artésunate suppositoire pour les enfants de moins de 5 ans ou artésunate injectable pour les personnes de 5 ans et plus au niveau des centres de santé (**MSP, 2014**).

## **I.8. Modes d'action des antipaludiques et mécanismes de résistance des plasmodies**

La résistance se définit comme étant « l'aptitude d'une souche de parasites du paludisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées, mais comprises dans les limites de tolérance du sujet » (**OMS, 2009**).

## **18.1. Historique et situation actuelle de résistance**

La résistance aux antipaludiques a un réel impact en santé publique. Sur le plan individuel, les échecs thérapeutiques qu'elle génère augmentent la mortalité liée au paludisme (**Trape, 2001**). De plus, la persistance des parasites dans le sang accroît le risque d'anémie sévère et par voie de conséquence la fréquence des transfusions sanguines avec tous les risques que cela comporte. Sur le plan collectif, les résistances augmentent le niveau de transmission du paludisme, ce qui élève le nombre d'accès et donc le coût des consultations par patient. Avec le développement de la médecine humaine ces cinquante dernières années, la pression médicamenteuse engendrée par l'utilisation massive des antipaludiques de synthèse a sélectionné des parasites résistants à la plupart des molécules en circulation. Le premier antipaludique utilisé massivement est la pyriméthamine en Indochine mais la sélection rapide de parasites résistants a conduit à l'utilisation de la chloroquine. L'emploi substantiel de ce principe actif pendant plusieurs dizaines d'années a simultanément sélectionné, à la fin des années 50, des parasites résistants à la frontière Thaïlande/Cambodge et en Colombie puis au Venezuela, en Papouasie-Nouvelle Guinée et aux Philippines. C'est à partir de ces foyers d'émergence asiatiques que la chloroquino-résistance s'est lentement mais graduellement disséminée pour atteindre l'Afrique de l'Est à la fin des années 1970 et l'Afrique de l'Ouest en 1979. Dans les années 80, les antifoliniques, associés à la sulfadoxine, ont pris le relais de la chloroquine comme première ligne thérapeutique des accès palustres non compliqués dans de nombreux pays. 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**).

## **I.8.2. Amino-alcools**

### **I.8.2.1. Quinine**

#### **I.8.2.1.1. Mode d'action**

La quinine se concentre dans le plasma et se fixe sur les hématies dans lesquelles elle pénètre et intercale dans la répllication de l'ADN du parasite. La quinine agit en inhibant l'action de l'hème-polymérase, et donc en permettant l'accumulation de l'hémine, produit cytotoxique de la dégradation de l'hémoglobine dans la vacuole, qui est normalement transformée en pigment



malariaïque inoffensif et utilisable par le parasite grâce à cette enzyme (**Looareesuwan et al., 1992 ; Gushimana et al., 1993**). Le complexe quinine-hème est capable d'endommager les membranes parasitaires (**Sugioka et Suzuki, 1991 ; Atamna et Ginsburg, 1995**). La quinine bloque le cycle schizogonique au niveau des mérozoïtes libres dans le plasma ou encore des trophozoïtes avant leur transformation en schizontes.

#### **I.8.2.1.2. Mécanisme de résistance**

La quinine reste efficace contre des souches résistantes à la chloroquine, indiquant que les phénotypes de réponse à la quinine sont sans doute affectés par d'autres gènes. Le polymorphisme du gène *pfmhe-1* situé sur le chromosome 13 semble associé à la résistance à la quinine. Cependant, la quinine reste le principal antipaludique recommandé dans le traitement du paludisme grave et chez la femme enceinte en Europe et en Afrique (**Pradinesa et al., 2010**). La quinine est un antipaludique efficace cliniquement contre des souches résistantes à la chloroquine ou à la méfloquine.

#### **I.8.2.2. Méfloquine**

##### **I.8.2.2.1. Mode d'action**

La méfloquine, l'halofantrine et la luméfántrine ont un mode d'action très proche de celui de la quinine en se fixant sur des phospholipides de la membrane érythrocytaire. Des récepteurs communs à la quinine, et sans doute à la chloroquine, pourraient être responsables de certains retards d'efficacité de la méfloquine ou de l'halofantrine lorsque ces substances sont préalablement administrées (**Milton, 1989**).

##### **I.8.2.2.2. Mécanisme de résistance**

Des études ont montré une association entre la résistance à la méfloquine et l'amplification du nombre de copies de *pfmdr1* (situé sur le chromosome 5 de *P. falciparum*) dans le génome (**Cowman, 1994 ; Peel, 1994 ; Lim, 2009 ; Picot, 2009**). Cependant, l'association entre le nombre de copies de *pfmdr1* dans le génome ou des mutations sur *pfmdr1* n'est pas absolue (**Lim, 1996**), suggérant l'existence d'autres mécanismes de résistance pour la méfloquine qui impliquent des gènes encore méconnus (**Jeffress, 2005**). De plus, l'association entre la diminution de sensibilité à la méfloquine et l'augmentation du nombre de copies de *pfmdr1* n'a jamais été montrée pour des souches provenant du continent Africain. Lorsque le nombre

de copie du gène *pfmdr1* est augmenté, sa séquence nucléotidique est généralement dépourvue de mutation (présence d'allèle sauvage). Au cours des dernières années, de nouvelles quinoléines ont fait leur apparition sur le marché des antipaludiques, essentiellement utilisées en association avec les dérivés de l'artémisinine ; il s'agit de la luméfantine, la pyronaridine et la pipéraquline (Humphreys, 2007).

### **I.8.3. Amino-4-quinoléines**

#### **I.8.3.1. Chloroquine**

##### **I.8.3.1.1. Mode d'action**

La chloroquine est active sur les formes érythrocytaires du parasite. Elle traverse la membrane de l'érythrocyte parasité et se concentre fortement dans la vacuole digestive du parasite où elle s'accumule et devient toxique pour le *Plasmodium* (Pradines *et al.*, 2010). Son activité est liée à ses propriétés d'accumulation sélective dans l'hématie parasitée et sa localisation préférentielle dans la vacuole digestive. La chloroquine, base soluble, traverse les différentes membranes de l'érythrocyte et du parasite et s'accumule dans la vacuole digestive acide, suivant le gradient de pH. A l'intérieur de la vacuole, la chloroquine est prise au piège dans la vacuole, elle y exerce son action létale pour le parasite. Selon ce mécanisme, l'entrée de chloroquine dans la vacuole est directement dépendante du pH. D'autres hypothèses s'accordent sur l'existence d'un transporteur permettant l'entrée de la chloroquine dans la vacuole digestive (Bray, 1999).

##### **I.8.3.1.2. Mécanisme de résistance**

La résistance à la chloroquine est liée à une incapacité à accumuler la chloroquine dans la vacuole digestive du parasite, phénomène lié à un efflux de chloroquine de la vacuole (mutation du gène *pfcr1*) (Pradines *et al.*, 2010). De nombreux travaux suggèrent que différents gènes, codant pour des protéines de transport sont impliqués dans la résistance à la chloroquine (Fidock, 2000 ; Pradines, 2005 ; 2009). Une association entre le génotypage d'isolats et leur phénotype ont mis en évidence l'implication directe du gène *pfcr1* (*P. falciparum* chloroquine résistance transporter situé sur le chromosome 7) dans le phénomène de résistance à la chloroquine (Fidock, 2000). Il existe plusieurs hypothèses concernant la fonction de la protéine PFCRT codée par le gène *pfcr1*. En effet, PFCRT pourrait expulser activement la chloroquine de la vacuole digestive (Sanchez, 2004), altérer le pH vacuolaire

où la chloroquine diprotonée pourrait être transportée passivement à l'extérieur de la vacuole par *Pfcr* muté (**Johnson, 2004**). La mutation Lys76Thr du gène *pfcr* est associée à la résistance à la chloroquine au point qu'elle est présente dans toutes les souches résistantes. Cette mutation est souvent associée à d'autres mutations sur le même gène (Cys72Ser, Met74Ile, Asn75Glu, Ala220Ser, Gln271Glu, Asn326Ser, Ile356Thr, Arg371Ile) dont les rôles ne sont pas clairement connus. Plus de 20 mutations ponctuelles de *pfcr* ont été décrites (**Fidock, 2000 ; Chen, 2003 ; Johnson, 2004**). L'existence de souches de *P. falciparum* sensibles à la chloroquine et portant cependant la mutation Lys76Thr suggère que d'autres gènes pourraient être impliqués dans la résistance à la chloroquine. Il s'agit du gène *pfmdr1*, dont la protéine phosphoglycoprotéine de 170 kdalton qui joue le rôle des pompes d'efflux de médicaments présente dans des cellules résistantes. Cinq mutations ont été décrites au niveau des 5 codons suivants : N86Y, Y184F, S1034C, N1042D et D1246Y.

### **I.8.3.2. Amodiaquine**

#### **I.8.3.2.1. Mode d'action**

Le mode d'action de l'amodiaquine semble être le même que celui de la chloroquine (**Pradinesa, 2010**). L'accumulation de l'amodiaquine est corrélée à celle de la chloroquine et est aussi diminuée chez les isolats chloroquino-résistants (**Bray, 1996**).

#### **I.8.3.2.2. Mécanisme de résistance**

Peu d'études ont exploré les bases moléculaires de la résistance à l'amodiaquine. Les études réalisées émettent l'hypothèse de certains points communs entre l'amodiaquine et la chloroquine. La résistance à l'amodiaquine semble être liée aux gènes *pfcr* et *pfmdr1* (**Gushimana, 1993 ; Happi, 2006 ; Humphreys, 2007 ; Marfurt, 2008 ; Picot, 2009**).

### **I.8.4. Artémisinine et ses dérivés**

#### **I.8.4.1. Mode d'action**

L'artémisinine et ses dérivés agissent au niveau de la membrane parasitaire, dès la 8<sup>ème</sup> heure. L'activité est identique sur des souches de *P. falciparum* sensibles ou résistantes (**Dembélé, 2008**). L'artémisinine et ses dérivés sont des endopéroxydes qui se lient à l'hème dans la vacuole digestive du parasite. Cette interaction provoquerait la libération de radicaux libres

toxiques pour les constituants cellulaires. Elle bloquerait une enzyme qui permet au parasite de pomper le calcium, l'empêchant ainsi de se développer (**Meshnick, 2002**).

#### **I.8.4.2. Mécanisme de résistance**

le gène *k13-propeller* (PF3D71343700) a été identifié comme étant le probable support génétique de la résistance aux dérivés de l'artémisinine. En effet, des mutations situées au niveau du locus « *k13 propeller* » confèrent aux souches qui en sont porteuses une résistance *in vivo* et *in vitro* à l'artémisinine (**Ariey et al., 2014**). Mais déjà, les premiers cas d'échecs cliniques aux ACTs ont été identifiés en Asie du Sud-Est (**Noedl et al., 2008 ; Dondorp et al., 2009**). Des mutations K189T, E252Q, R255K, P441L, F446I, N458Y, P574L, C580Y, A676D et H719N ont été mises en évidence par les chercheurs (**Menard et al., 2016 ; Ariey et al., 2014**).

#### **I.8.5. Anti-métabolites**

Les anti-métabolites sont répartis en deux familles, les antifoliques (sulfamides, dont la sulfadoxine ; sulfones), et les antifoliniques (proguanil, pyriméthamine).

##### **I.8.5.1. Antifoliques**

###### **I.8.5.1.1. Mode d'action**

Les antifoliques (Sulfamides et Sulfones) bloquent chez *Plasmodium*, la synthèse de l'acide dihydrofolique, empêchant l'utilisation de l'acide para-amino-benzoïque de l'hôte nécessaire à la multiplication de l'ADN par le parasite (**Ambroise, 1984 ; laminou, 2009**).

###### **I.8.5.1.2. Mécanismes de résistance**

La dihydroptéroate synthétase (DHPS) est une enzyme qui intervient dans la voie de synthèse du folate de *P. falciparum*. Cette enzyme est codée par le gène *P. falciparum dihydrotéroate synthétase* (*pf dhps*) situé sur le chromosome 8. Des mutations ponctuelles sur ce gène sont associées à la résistance de la sulfadoxine (**Triglia, 1997 ; Sibley, 2001 ; Hyde, 2005**). L'analyse de séquences du gène *dhps* montre des différences d'acides aminés entre des souches sensibles et résistantes à la Sulfadoxine (**Triglia, 1994 ; Brooks, 1994**). Les mutations Ser436Ala, Ser436Phe, Ala437Gly et Lys540Glu du gène *dhps* confèrent une résistance à la Sulfadoxine (**Wang, 1997**). Les mutations Ala581Gly et Ala613Thr/Ser sont

rare, en particulier en Afrique, mais pourraient être associées à des degrés élevés de résistance (Hagos, 1993 ; Picot, 2009).

### **I.8.5.2. Antifoliques**

#### **I.8.5.2.1. Mode d'action**

Le proguanil dont le métabolite actif est le cycloguanil et la pyriméthamine sont des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (DHFR) chez *P. falciparum*, une enzyme bifonctionnelle chez *Plasmodium*, appartenant à la voie de synthèse des folates qui est essentielle à la synthèse de l'ADN (Zolg, 1989 ; Sano, 1994 ; Sirawaraporn, 1997 ; Tangara, 2006).

#### **I.8.5.2.2. Mécanisme de résistance**

Le gène *Pfdhfr* est situé sur le chromosome 4 de *P. falciparum* et code pour la DHFR (Sibley *et al.*, 2001 ; Hyde, 2005). Les travaux sur *Pfdhfr* ont démontré l'existence d'une relation entre la résistance à la pyriméthamine et la présence de mutations ponctuelles dans la région du site actif de l'enzyme ; la mutation clé étant Ser108Asn ou Ser108Thr. Les mutations au niveau des codons Asn51 et Cys59 modèleraient à la hausse le niveau de résistance au (Tableau I). Dans des isolats du Sud-Est Asiatique l'association d'une mutation du codon 108 (serine → thréonine) et du codon 16 (alanine → valine) induiraient une résistance au proguanil avec une sensibilité peu modifiée à la pyriméthamine. Les mutations des codons 16 et 164 présentes dans ces isolats n'ont cependant pas encore été retrouvées dans les souches africaines (Parzy *et al.*, 1997).

**Tableau I:** Codons des gènes impliqués dans la résistance *P. falciparum* aux antimetabolites

Codons <i>dhfr</i> impliqués dans la résistance aux antifoliniques	16	51	59	108	164
	Codon (AA)	Codon (AA)	Codon (AA)	Codon (AA)	Codon (AA)
Sauvage	GCA (Ala)	AAT (Asn)	TGT (Cys)	AGC (Ser)	ATA(Ile)
Mutant	<u>G</u> TA (Val)	A <u>T</u> T (Ile)	<u>C</u> GT (Arg)	A <u>A</u> C(Asn)	<u>T</u> TA (Leu)
				<u>A</u> CC (Thr)	
Codons <i>dhps</i> impliqués dans la résistance aux antifoliques	436	437	540	581	613
	Codon (AA)	Codon (AA)	Codon (AA)	Codon (AA)	Codon (AA)
Sauvage	TCT (Ser)	GCT (Ala)	AAA(Lys)	GCG(Ala)	GCC (Ala)
Mutant	<u>G</u> CT (Ala)	<u>G</u> GT(Gly)	<u>G</u> AA(Glu)	<u>G</u> GG (Gly)	<u>T</u> CC (Ser)
	<u>T</u> TT(Phe)				<u>A</u> CC (Thr)
	<u>C</u> TG (Leu)				<u>C</u> CC (Pro)
	<u>T</u> AT(Tyr)				

## **I.8.6. Hydroxynaphtoquinones (atovaquone)**

### **I.8.6.1. Mode d'action**

L'atovaquone est un inhibiteur de la biosynthèse des pyrimidines. Dans la mitochondrie, il bloque la chaîne de transfert des électrons au niveau de son enzyme clé, la dihydro-orotate réductase, ainsi que le complexe cytochrome bc1 en se substituant à l'ubiquinone (**Musset, 2006**).

### **I.8.6.2 Mécanisme de résistance**

L'analyse de la séquence d'acides aminés constituant le cytochrome b plasmodial montre qu'il diffère de celui des autres organismes (**Vaidya et al., 1993**). Le *Pfcytb* (génome mitochondrial) code pour le cytochrome b qui est la cible moléculaire de l'atovaquone. Ses mutations Tyr268Asn et Tyr268Ser induisent une diminution très importante de la sensibilité du cytochrome b à l'atovaquone et sont associées à la résistance du parasite à cette molécule (**Ekala et al., 2007**). Ces mutations sont très rares dans les populations générales de *P. falciparum* et elles ne sont généralement détectées qu'à l'occasion des échecs thérapeutiques ou prophylactiques de l'association atovaquone-proguanil (**Fivelman et al., 2002**).

## **I.8.7. Antibiotiques (Doxycycline)**

### **I.8.7.1. Mode d'action**

La Doxycycline diminue le taux de nucléotides et de désoxynucléotides (**Yeo, 1998**). Il est à noter que certains antibiotiques dont la Doxycycline et l'azithromycine peuvent inhiber la synthèse protéique par inhibition de certaines fonctions de l'apicoplaste chez *P. falciparum* (**Dahl, 2007 ; Goodman, 2007**).

### **I.8.7.2. Mécanisme de résistance**

Il a été décrit quelques isolats avec des sensibilités *in vitro* diminuées à la Doxycycline mais aucune résistance *in vivo* de *P. falciparum* à la Doxycycline n'a cependant pas encore été décrite à ce jour (**Briolant, 2009, 2007**). Différents gènes pourraient être impliqués dans la diminution de sensibilité *in vitro* à la Doxycycline des isolats de *P. falciparum* (**Briolant, 2010**). *PftetQ* (*P. falciparum* tétracycline résistance TetQ gène) coderait une protéine de la famille des GTPases et possède des similitudes avec des gènes impliqués dans la résistance de

bactéries aux cyclines. *Pfmdt* (*P. falciparum* multidrug transporter) coderait une protéine de transport membranaire de médicaments analogue à la tétracycline résistance protein TetA, une pompe d'efflux responsable de la résistance de bactéries à la doxycycline. Un nombre de copies supérieur du gène *pftetQ* ou du gène *pfmdt*, ainsi qu'un nombre de répétitions inférieures à trois d'un motif de six acides aminés (KYNNNN) de la protéine codée par *pftetQ* ont été trouvées associées à une diminution de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à la doxycycline (**Briolant, 2010**).

### **I.9. Marqueurs moléculaires de résistance**

Ces sont des marqueurs impliqués dans les mécanismes de résistance des produits antipaludiques. Ils occupent une place de choix dans la surveillance des antipaludiques utilisés et permettent de prédire le niveau de résistance d'une espèce parasitaire aux antipaludiques. Il n'en existe que pour un nombre restreint d'antipaludiques (**Pradines *et al.*, 2010 ; Menard, 2013 ; Nambeole, 2014**). Les principaux marqueurs moléculaires utilisés dans la surveillance de l'efficacité aux antipaludiques sont consignés dans le **Tableau II**.



**Tableau II:** Marqueurs moléculaires de résistance de *P.falciparum* selon les antipaludiques (Nambeole, 2014).

Médicaments	Gènes	Allèle associé à la résistance ou à la diminution de sensibilité	Niveau de validation
Chloroquine	<i>Pfcrt</i>	Lys 76Thr	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfmrp</i>	His191Tyr et Ser 437Ala	
Amodiaquine	<i>Pfmdr1</i>	Asn86Tyr	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfmrp</i>	His191Tyr et Ser 437Ala	
Méfloquine	<i>Pfmdr1</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vivo</i>
Sulfadoxine-Pyriméthamine	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Asn	
	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Asn + Asn51Ile +Cys59Arg	
	<i>Pfdhps</i>	Ala437Gly	
	<i>Pfdhps</i>	Ala437Gly + Lys540Glu	
	<i>Pfdhfr + pfdhps</i>	Ser108Asn + Asn51Ile +Cys59Arg + Ala437Glu+Lys540Glu	
<i>Pfmrp</i>	Lys 1466 Arg		
Proguanil	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Thr+Ala16val	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Asn+Asn51Ile et/ou + Cys59Arg	
Atovaquone	<i>Pfcytb</i>	Tyr268Asn ou Tyr268Ser	Association <i>in vivo</i>
Luméfantrine	<i>Pfmdr1</i>	Asn86 & Nombre de copie > 1	Sélection d'allèle en cas d'échec thérapeutique
Quinine	<i>pfnhe-1</i>	Nombre de motifs : DNNND > 2 ou NHNDNHNNDDD < 3	Association <i>in vitro</i>
	<i>Pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	
Doxycycline	<i>pftetQ</i>	Nombre de motif KYNNNN < 3	Association <i>in vitro</i>
	<i>pftetQ</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
	<i>Pfmdt</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
Artéméther	<i>Pfserca</i>	Ser769Asn	Association <i>in vitro</i>
Artémisinine	<i>K13 propeller</i>	M476I, C580Y, R539T, Y493H	Association <i>in vitro</i>

## **I.10. Dynamique des résistances**

Les antipaludiques se fixent sur des récepteurs membranaires de l'hématie, induits par développement de *Plasmodium*. Ces produits se concentrent fortement à l'intérieur du globule rouge puis du parasite et se fixent sur l'ADN pour bloquer la réplication, inhibant aussi diverses enzymes. La résistance provient d'une diminution d'affinité du produit pour les récepteurs érythrocytaires et surtout d'une diminution des mécanismes de concentration ou d'une altération des enzymes parasitaires (Trape, 2001).

Ainsi, malgré les efforts déployés pour la découverte de nouvelles molécules antipaludiques et leur mise en place effective par les différents programmes de lutte contre le paludisme dans différents pays, *P. falciparum* développe des résistances, y compris contre les ACT (Noedl *et al.*, 2008 ; Wongsrichanalai et Meshnick, 2008 ; Dondorp *et al.*, 2009). Ceci s'explique d'abord par la grande diversité génétique de *P. falciparum* due à un taux élevé de mutations dans son génome et par la biomasse parasitaire très importante de parasites portées par les individus infectés. En effet, même si les mutations capables de conférer la résistance à un nouveau médicament sont extrêmement rares et peu probables, le nombre élevé de parasites infectant les humains fait que ces mutations finiront par apparaître et par être sélectionnées par la pression médicamenteuse (Pradines *et al.*, 2010).

### **I.10.1. Facteurs favorisant les chimiorésistances**

Quatre facteurs principaux entrent en jeu pour favoriser l'émergence de résistances :

#### **I.10.1.1. Pression médicamenteuse et la sélection des mutants**

Dans une zone endémique, les parasites mutants sont peu nombreux que les sauvages. L'apparition des souches "mutantes" est favorisée par l'utilisation abusive des produits antipaludiques dans la zone. La consommation de contrefaçons sous dosées, l'indisponibilité des médicaments efficaces ou le déploiement inadéquat des médicaments sous forme de monothérapies. Ainsi, plus les médicaments sont utilisés, plus on sélectionne des mutants résistants (Djaman, 2003 ; Sow, 2009).

En outre, les mauvaises prescriptions et l'automédication sont autant de facteurs à l'origine de la pression exercée sur *P. falciparum*. L'utilisation d'antipaludiques à des doses sub-curatives élimine les parasites sensibles et sélectionne les mutants résistants préexistants. Une

pharmacocinétique similaire s'observe aussi avec les antipaludiques à demi-vie longue utilisés en monothérapie. Ils ont un gradient de concentration élevé et représentent ainsi une opportunité de sélection (Touré, 2012).

#### **I.10.1.2. Degré d'immunité de la population**

Le système immunitaire agit simultanément sur les souches sensibles qu'existantes. Dans une zone où la transmission est endémique, le degré de l'immunité de la population est élevé et les souches résistantes qui échappent aux médicaments sont attaquées par les cellules de défenses. Chez les jeunes enfants, l'immunité n'est pas suffisamment développée, les parasites résistants échappent aux mécanismes de défense, se multiplient et engendrent des manifestations cliniques (Djaman, 2003).

#### **I.10.1.3. Voyages**

Une personne non immunisée va emporter des mutants résistants d'une zone de chimiorésistance vers une zone où les mutants résistants n'existent pas. Les sujets non immunisés et non prémunis de cette zone d'accueil vont permettre le développement et la dissémination de la résistance (Djaman, 2003).

#### **I.10.1.4. Vecteurs *Anopheles***

La multiplication de mutants résistants sera favorisée par les espèces anophéliennes. Les espèces peuvent être vectrices ou non de la maladie en fonction du climat ou les zones auxquelles ces espèces vivent.

### **I.11. Méthodes d'évaluation des antipaludiques**

Trois méthodes sont couramment utilisées pour surveiller la sensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques :

- Les tests *in vivo* ;
- Les tests *in vitro* ;
- Les tests moléculaires

### **I.11. 1. Tests *in vivo***

La méthode de référence de surveillance des résistances est le test *in vivo* de l’OMS développé en 1965 et révisé en 1967, en 1972, en 1996 et enfin en 2001 (OMS, 2009). Ils consistent à administrer une dose standard d’antipaludique à des malades infectés par *P. falciparum* et à suivre pendant au moins 28 jours la disparition des manifestations cliniques et de la parasitémie. Le test *in vivo* standardisé de l’OMS consiste à faire des examens cliniques et parasitologique aux jours J0, J1, J2, J3 puis J7, J14, J21 et J28. Les résultats seront classés selon des critères cliniques et parasitologiques en proportion de patients ayant un échec thérapeutique précoce (ETP), un échec clinique tardif (ECT), un échec parasitologique tardif (EPT) ou une réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA).

Les tests *in vivo* ont un meilleur reflet de la réalité puisqu’ils sont effectués chez le malade. Toutefois, en zone d’endémicité palustre, il n’est pas aisé cliniquement de distinguer une réinfestation d’une recrudescence de l’infestation initiale surtout lorsqu’on utilise le test de 28 jours. Cependant, la PCR constitue aujourd’hui une excellente technique pour en faire la distinction et devrait être associée à toute étude de chimiorésistance (OMS, 2009).

### **I.11. 2. Tests *in vitro***

Le test *in vitro* correspond au test de phénotypage, qui consiste à évaluer la sensibilité des isolats de *Plasmodium* testés en les mettant en culture en présence de concentrations croissantes des molécules antipaludiques étudiées (seule ou en association). Il permet de mesurer l’effet direct d’une drogue sur les parasites. Différentes méthodes permettent de détecter alors la croissance parasitaire, ce sont : la microscopie, l’incorporation d’un isotope radioactif durant la croissance parasitaire (l’hypoxanthine tritiée), la fluorimétrie (liaison de fluorochromes tels le PicoGreen (Kosaisavee *et al.*, 2006) ou le SyberGreen (Bacon *et al.*, 2007) à l’ADN parasitaire), les techniques ELISA (à l’aide d’anticorps anti-HRP2 ou pLDH) (Noedl *et al.*, 2005).

Différentes études utilisant simultanément une évaluation *in vivo* et *in vitro* ont permis de démontrer la relation souvent délicate entre ces deux types de suivi de la sensibilité plasmodiale aux antipaludiques (Ringwald & Basco, 1999). La variété des tests *in vitro* réalisés souvent de façon non standardisée en l’absence de souches de références entretenues en continu au laboratoire, la multiplicité des paramètres pouvant influencer une réponse

clinique, peuvent expliquer la variabilité des résultats constatés. Les techniques *in vitro* fournissent des résultats non corrélés systématiquement aux résultats *in vivo*, surtout chez des sujets immuns. En effet une résistance décelée en laboratoire pour un isolat donné ne sera pas source systématique d'échec clinique et inversement, de même que l'absence de réponse clinique et parasitaire adéquate (RCPA) observée chez un patient ne sera pas systématiquement confirmée lors d'études *in vitro*. Il est donc difficile d'attribuer une probabilité d'échec clinique en fonction de la CI50 ou même de la CI90 calculée lors de l'interprétation de tests *in vitro*. Cependant, à l'échelle de la population, ces résultats vont refléter la sensibilité des souches, et surtout permettre de suivre leur évolution. Ces deux types de surveillance agissent donc de façon complémentaire, et abordent le phénomène de la chimiorésistance sous un angle différent. Les résultats des études *in vitro* doivent servir d'index et constituer ainsi un système d'alarme permettant de prédire l'émergence et la dissémination des souches résistantes. Ils vont permettre de détecter des souches résistantes sur lesquelles des marqueurs moléculaires de cette résistance vont pouvoir être recherchés. Le standard de référence de la surveillance de la résistance reste la classification des réponses thérapeutiques selon le protocole de l'OMS, qui permettra de déclencher l'alerte et de modifier les choix thérapeutiques devant une augmentation importante de la fréquence d'échecs thérapeutiques observés.

### **I.11. 3. Marqueurs moléculaires de résistance**

Ce sont des méthodes de génotypage ou d'identification des variantes génétiques, réalisées sur l'ADN du parasite. Il s'agit de chercher les mutations des gènes du parasite impliqués dans la résistance aux antipaludiques. Grace aux connaissances des outils de biologie moléculaire ces dernières années, les mécanismes de résistance aux antipaludiques sont presque connus. Les génotypes de résistance étant déterminés après amplification de l'ADN par PCR, ces méthodes sont très sensibles et ne nécessitent que très peu de sang. Elles requièrent cependant beaucoup de matériel et de grandes précautions afin d'éviter les amplifications non spécifiques liées à des contaminations par des acides nucléiques d'autres isolats. De plus, excepté les méthodes utilisant des digestions enzymatiques, elles sont également très coûteuses. La présence de ces marqueurs est également peu prédictive de la réponse thérapeutique. Pour de nombreux principes actifs ayant un mécanisme de résistance complexe, le génotype est rarement corrélé avec les résultats des tests *in vitro*. Cependant, pour les anti-métabolites qui

ont généralement un mécanisme de résistance simple, les marqueurs génomiques de résistance peuvent remplacer les tests *in vitro* pour les études épidémiologiques (Touré, 2012).

## **II. MATERIEL & METHODES**

## II.1. Matériel

### II.1.1. Site de l'étude

L'étude a été menée au sud du Tchad dans le district sanitaire de Pala, Région de Mayo-Kebbi Ouest (9°21'00" N ; 14°58'00" W). La région est divisée en trois départements qui sont (Mayo-Dalla ; Lac Léré ; Mayo-Binder). La ville de Pala, chef-lieu de la région, est située à 530 km de N'Djaména. La population était estimée à 108 374 habitants selon le deuxième recensement général de la population et de l'habitat en 2013 (**Figure 5**).

Au Sud, la prévalence du paludisme est très élevée avec 43,8 %, suivie du Centre et du Nord respectivement, 11,65 % et 0,70 % (**DSIS, 2012**). Cette partie du pays correspond à une zone hyper endémique avec une prévalence moyenne du paludisme de 52 % chez les enfants de 0 à 5 ans. Le paludisme sévit d'une manière stable. Au niveau des formations sanitaires du premier échelon, 87,65 % des cas de paludisme simple ont été notifiés (**MSP, 2013**). Pala, le site d'étude a été choisi en raison de la prévalence du paludisme et aussi à cause de sa position géographique. En effet, Pala est une ville frontalière de trois pays que sont : le Cameroun, la RCA et le Nigéria. Des produits antipaludiques non enregistrés par le Ministère de la Santé Publique (MSP) ont été retrouvés sur les marchés de Pala. Le manque de contrôle de ces médicaments, pourrait entraîner une pression médicamenteuse. Le Centre de Santé (CS) de Pala est situé au sein de l'hôpital régional de Pala.

Le sang prélevé à Pala sur papier filtre Whatman a été expédié à l'Unité de Paludologie du Département de Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour les analyses PCR.





**Figure 5:** Localisation du site d'étude (MSP, 2013)

## **II.1.2. Population de l'étude**

L'étude a porté sur des enfants atteints de paludisme à *P. falciparum* non compliqué, âgés de 6 à 59 mois venus en consultation au Centre de Santé Urbain de Pala (CSUP).

### **II.1.2.1. Critères d'inclusion**

Sont inclus dans cette étude les enfants présentant les critères suivants :

- Infestation mono spécifique à *P. falciparum* détectée à l'examen microscopique ;
- Parasitémie comprise entre 1000 à 100000 trophozoïtes/ $\mu$ L de sang (formes parasitaires asexuées) ;
- Température axillaire  $\geq 37,5^\circ$  C, ou antécédent de fièvre au cours des dernières 24 heures ;
- Capacité à prendre des médicaments par voie orale ;
- Possibilité et volonté de respecter le protocole pendant la durée de l'étude et de respecter le calendrier de consultations ;
- Obtention d'un consentement éclairé du père ou de la mère ou du tuteur légal de l'enfant.

### **II.1.2.2. Critères de non inclusion**

N'ont pas été inclus dans cette étude les enfants présentant les signes suivants :

- Présence de signes de paludisme grave ;
- Poids corporel inférieur à 5 kg ;
- Malnutrition sévère ;
- Antécédents d'hypersensibilité à l'un quelconque des médicaments testés ou utilisés comme traitement de remplacement, ou de contre-indication à ces médicaments.

### **II.1.3. Matériel biologique**

Le matériel biologique était constitué de sang prélevé sur une lame pour les frottis sanguin et les gouttes épaisses et sur papiers filtre whatman pour les analyses PCR. La collecte de sang sur papier filtre Whatman 3 mm a été réalisée au laboratoire de l'hôpital de Pala après réception des échantillons.

#### **II.1.3.1. Gènes étudiés et amorces correspondantes**

Trois gènes de résistance ont été étudiés, respectivement, *dhfr* et *dhps* pour la SP et *k13 propeller* pour l'artémisinine. Les amorces utilisées pour l'amplification de ces gènes sont consignées dans le tableau ci-après (**Tableau III**).

Le gène *msp-2*, présent sur le chromosome 2 a été utilisé par distinguer les recrudescences des reinfestations. Ce gène très polymorphe, code pour la synthèse d'une protéine à la surface du mérozoïte (**A-Elbasit et al., 2007**).

**Tableau III :** Amorces et séquences utilisées pour l'amplification des gènes d'étude

Gènes	PCR	Amorces	Séquences	Taille de fragment en paire de base (pb)
<i>Pfdhfr</i>	PCR1	pfdhfr_M1	5'-TTTATGATGGAACAAGTCTGC-3'	650
		pfdhfr_M7	3'-CTAGTATATAACATCGCTAACA-5'	
	Nested	pfdhfr_M9	5'-CTGGAAAAAATACATCACATTCATATG-3'	594
		pfdhfr_M3	3'-TGATGGAACAAGTCTGCGACGTT-5'	
<i>Pfdhps</i>	PCR1	pfdhps_N1	5'-GATTCTTTTTTCAGATGGAGG-3'	770
		pfdhps_N2	3'-TTCCTCATGTAATTCATCTGA-5'	
	Nested	pfdhps_R2	5'-AACCTAAACGTGCTGTTCAA-3'	771
		pfdhps_R/	3'-AATTGTGTGATTTGTCCACAA-5'	
<i>k13-propeller</i>	PCR1	k13_PCR_F	5'-CGGAGTGACCAAATCTGGGA-3'	2097
		k13_PCR_R	3'-GGGAATCTGGTGGTAACAGC-5'	
	Nested	k13_N1_F	5'-GCCAAGCTGCCATTCATTTG-3'	849
		k13_N1_R	3'-GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA-5'	

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Type et période d'étude

Il s'agissait d'une étude transversale à visée analytique basée sur l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de l'ASAQ et expérimentale sur la recherche des mutations affectant les marqueurs moléculaires (*dhfr*, *dhps* et *k13-propeller*) de la chimiorésistance.

Les prélèvements sanguins se sont déroulés de novembre à décembre 2015 au centre de santé de Pala au Tchad.

### II.2.2. Taille de l'échantillon

Si la proportion d'échecs thérapeutiques est déjà connue grâce à des études antérieures, la taille de l'échantillon nécessaire peut être calculée par des méthodes statistiques classiques d'estimation de la proportion dans la population touchée. Il faut trois types d'informations pour déterminer la taille d'échantillon convenable pour estimer une proportion dans une population :

1. la proportion d'échecs cliniques anticipée dans la population (p) ;
2. le niveau de confiance (en général 95 %)
3. et la précision (d) (généralement comprise entre 5 et 10 %).

Pour que l'échantillon soit représentatif, il convient de toujours inclure au minimum 50 malades dans l'étude. Dans notre cas il n'existe aucun chiffre antérieur permettant de valider un taux d'échec thérapeutique de l'ASAQ dans la région.

Toutefois, si nous considérons un taux d'échec thérapeutique inférieur à 15 % (**OMS, 2003**) pour un niveau de confiance de 95% et une précision estimée à environ 10 %, en utilisant la formule ci-après, la taille de l'échantillon est :

$$\frac{Z^2 \times p \times q}{(d)^2}$$

Avec  $p = 0,15$  ;  $q = 0,85$  ;  $z^2 = (1,96)^2$  ;  $d^2 = (0,1)^2$  ; **n = 49**

Si nous considérons 10 % de perdus de vue, 54 patients doivent être inclus et suivis pendant vingt-huit jours.

### **II.2.3. Recrutement des participants**

Le recrutement des patients a été réalisé au centre de santé urbain de Pala (CSUP); les enfants reçus en consultation par le responsable du centre ont bénéficié d'une pesée, d'une mesure de température et d'un examen physique. De plus, ils ont subi un prélèvement de sang nécessaire à la réalisation d'un test de diagnostic rapide (TDR) de paludisme. Le CSUP, est limité uniquement au TDR. Les frottis sanguins et les gouttes épaisses ont été réalisés au laboratoire de l'Hôpital Régional de Pala (HRP).

A cet effet, devant un TDR positif, le patient est amené au Médecin de l'étude pour la prise en charge. À l'hôpital de Pala, après une explication du protocole au parent de l'enfant afin d'obtenir son consentement par le médecin de l'étude, un dossier est constitué pour enregistrer les informations générales et les observations cliniques concernant le patient examiné. Après la confirmation du diagnostic (GE/FS) posé par l'Infirmière responsable du centre, si le patient remplit les critères, il est inclus pour un suivi de 28 jours. Dans ce cas, il lui est administré par voie orale la première dose de l'ASAQ en fonction du poids. Les patients non éligibles sont reversés dans le circuit normal de l'hôpital.

### **II.2.4. Réalisation de la goutte épaisse et du frottis mince**

Avant la réalisation de la goutte épaisse et de frottis sanguin, une lame propre est étiquetée. La pulpe du doigt majeur gauche du patient est désinfectée à l'aide d'un tampon alcoolisé. Après le séchage de l'alcool, le doigt est légèrement massé dans le sens terminal pour ramener le sang au niveau de la pulpe du doigt sans toucher à la partie désinfectée. A l'aide du vaccinostyle, la partie de la pulpe du doigt désinfecté est piquée sur le côté puis le sang est recueilli. Le doigt est déposé délicatement sur la lame étiquetée. Cette première goutte a servi de réaliser la goutte épaisse ; une seconde goutte sur la même lame a été nécessaire pour réaliser le frottis sanguin mince.

Les gouttes épaisses et les frottis minces sont bien séchés puis avec un crayon le code anonyme, la date, le jour du suivi et l'heure de prélèvement sont notés sur la lame du patient (MSP, 2014). Les lames sont ensuite plongées pendant 20 à 30 minutes dans une solution de Giemsa 10% préparée extemporanément chaque jour. Elle est ensuite examinée pour le comptage des plasmodies à la GE et l'identification de l'espèce plasmodiale au frottis sanguin mince. Les gouttes épaisses et frottis sanguin ont été examinés à immersion au grossissement

X1000 pour identifier les espèces. La densité parasitaire (DP) est calculée selon la formule ci-dessous :

$$DP (\mu L) = N \times 8.000 / X$$

**DP** : densité parasitaire ;

**N** : nombre de parasites comptés ;

**X** : nombre de leucocytes comptés.

L'étalement est considéré comme négatif lorsque l'examen de 1000 leucocytes ou 100 champs contenant au moins 10 globules blancs par champ ne met en évidence aucune forme asexuée de plasmodies (OMS, 2003).

#### **II.2.5. Administration du traitement**

Après l'administration du traitement par le médecin, le malade est mis en observation pendant 30 minutes pour surveiller la survenue éventuelle de vomissements. Les enfants recrutés ont été traités par la combinaison fixe (ASAQ-Winthrop®) administrée par voie orale en fonction du poids du patient une fois par jour pendant 3 jours (**Tableau IV**). Lorsque le médecin constate que la température axillaire est supérieure ou égale à 38,5°C à l'inclusion, le patient reçoit du paracétamol systématiquement.

Si des vomissements surviennent au cours des 30 premières minutes après l'administration du médicament, la dose complète est répétée. Les patients ayant vomi la dose de remplacement dans les 30 minutes après l'administration du médicament sont exclus de l'étude et immédiatement orientés en pédiatrie pour une prise en charge appropriée.

**Tableau IV:** Dose d'artésunate-amodiaquine administrée aux enfants inclus dans l'étude

<b>Tranche d'âge et poids</b>	<b>Jour 0</b> Dose artésunate dose amodiaquine	<b>Jour 1</b> Dose artésunate dose amodiaquine	<b>Jour 2</b> Dose artésunate dose amodiaquine
2 à 11 mois ≥ 4,5 à < 9 kg	25 mg 67,5 mg	25 mg 67,5 mg	25 mg 67,5 mg
1 à 5 ans ≥ 9 à < 18kg	50 mg 135 mg	50 mg 135 mg	50 mg 135 mg
6 à 13 ans ≥ 18 à < 36kg	100 mg 270 mg	100 mg 270 mg	100 mg 270 mg



### **II.2.5.1. Traitement de secours**

En cas de vomissements persistants, le patient reçoit un traitement parentéral avec artéméther injectable 3,2 mg / kg en IM le 1<sup>er</sup> jour en prise unique, 1,6 mg/kg tous les jours pendant 3 jours ou l'artésunate injectable 2,4mg/kg à T0, à T12 et T24 puis toutes les 24 heures pendant 3 jours, ou avec de la quinine en perfusion dans 5% ou 10% du glucosé 20mg/kg pendant 4 heures le 1<sup>er</sup> jour ; 10mg/kg toutes les 8 heures et le 2<sup>eme</sup> jour 10mg/kg toutes les 8 heures (3 doses en 24 heures) selon la politique nationale de prise en charge en vigueur.

### **II.2.6. Suivi des patients**

Un calendrier de consultations clairement établi comportant un numéro personnel d'identification est remis au patient. Le calendrier a prévu une réévaluation clinique régulière. Un interrogatoire et un examen physique sont effectués après l'inclusion à J1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28 à la recherche de signes de complication ou d'évènements indésirables.

Toutes les manifestations indésirables observées liées ou non au médicament sont notées dans le dossier individuel du patient.

Les patients ont été informés que des étalements de sang destinés à la numération des plasmodies seront réalisés aux jours 0, 1, 2, 3, 7,14, 21 et 28. Des conseils ont été donnés aux patients de revenir à n'importe quel moment au cours de la période de suivi si les symptômes réapparaissent, et ne pas attendre la consultation suivante programmée.

Si un patient ne venait pas à son rendez-vous tous les efforts étaient déployés afin de le retrouver. Au cas contraire il était considéré comme perdu de vue. En cas de retrait de consentement le patient est exclu de l'étude. Un traitement de remplacement lui est donné selon les directives du PNLP.

### **II.2.7. Critères d'évaluation de l'efficacité thérapeutique de l'ASAQ**

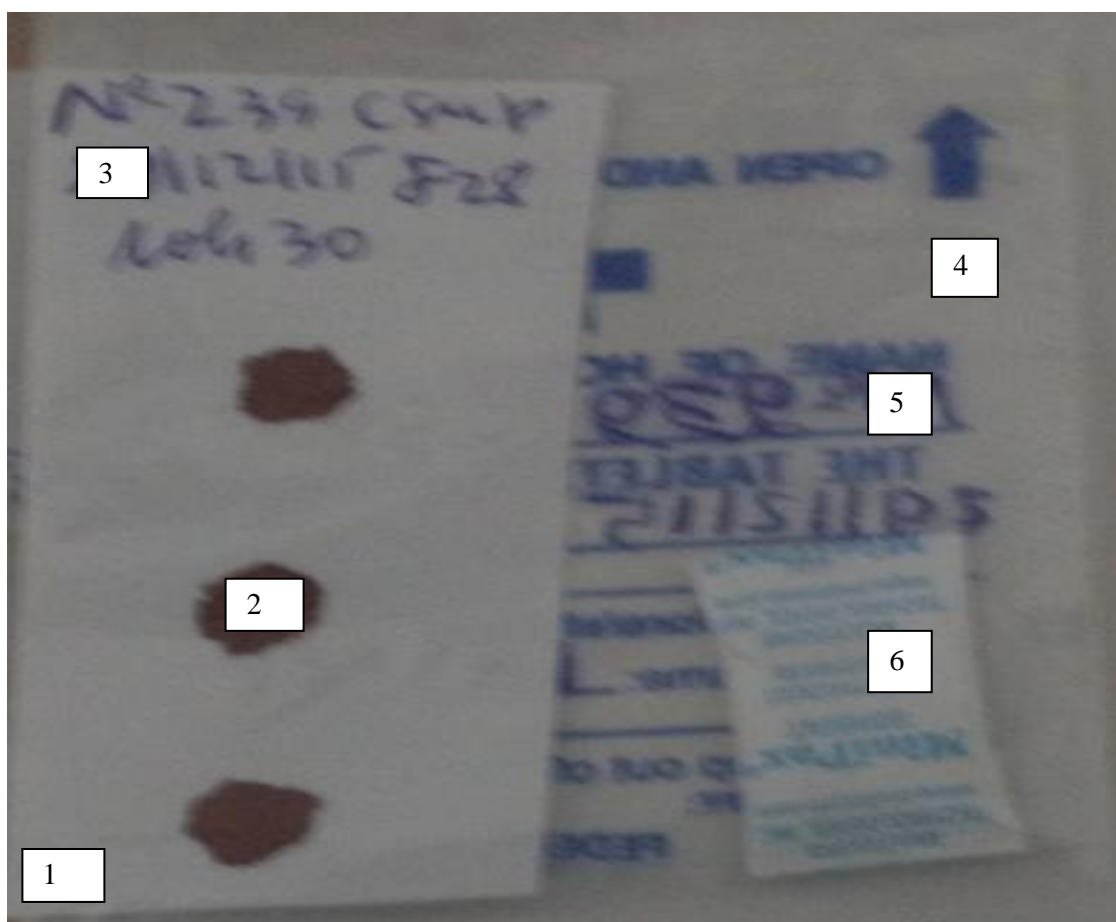
Le principal critère de jugement est la Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (RCPA) après correction PCR à J28. Les critères secondaires sont :

- La RCPA sans correction PCR à J28 ;
- Les clairances thermique et parasitaire ;
- La tolérance clinique.

## **II.2.8. Polymérase Chain Réaction**

### **II.2.8.1. Collecte de sang sur papier filtre Whatman 3mm**

L'étiquetage des prélèvements est anonyme (numéro de dépistage, site de l'étude, jour du suivi, date et heure de prélèvement). Pour la PCR, le sang a été prélevé sur un papier filtre Whatman 3 mm au Jour 0 et en cas de réapparition de parasites à partir de J7. Trois gouttes de sang d'environ 50  $\mu$ L sont déposées sur du papier filtre Whatmann 3 mm. Les papiers ont été étiquetés conformément à l'anonymat avant d'être mis dans les poches de conservation en présence d'un décicant, le silicagel (OMS, 2009). Les mêmes informations ont été portées sur l'emballage. L'ensemble a été conservé au réfrigérateur à + 4° C jusqu'à l'expédition au Département de Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (Figure 6, 7).



**Figure 6 :** Confettis réalisé sur papier filtre Whatman 3 mm

**Légende :**

- (1) Papier filtre Whatman® 3 mm
- (2) Spot de sang séché
- (3) Identifiant de l'échantillon
- (4) Sachet de conservation
- (5) Identifiant sur l'emballage
- (6) Gel de silicate



**Figure 7:** Laboratoire de la Plate-forme de Biologie moléculaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire

**Légende :**

- (1) Salle de manipulation
- (2) Salle d'extraction
- (3) Salle de préparation de mix (mélange)
- (4) Salle d'amplification
- (5) Salle de migration
- (6) Salle de lecture

## II.2.8.2. Extraction de l'ADN plasmodial

L'extraction de l'ADN de *P. falciparum* a été réalisée à partir du papier-filtre Whatman par deux méthodes, le méthanol et le kit Qiagen.

### II.2.8.2.1. Extraction de l'ADN au Méthanol

La méthode décrite par **Bereczky *et al.*, (2005)** a été réalisée. Cette méthode comprend trois étapes décrites ci-après :

#### ➤ Première étape : Phase de lyse cellulaire

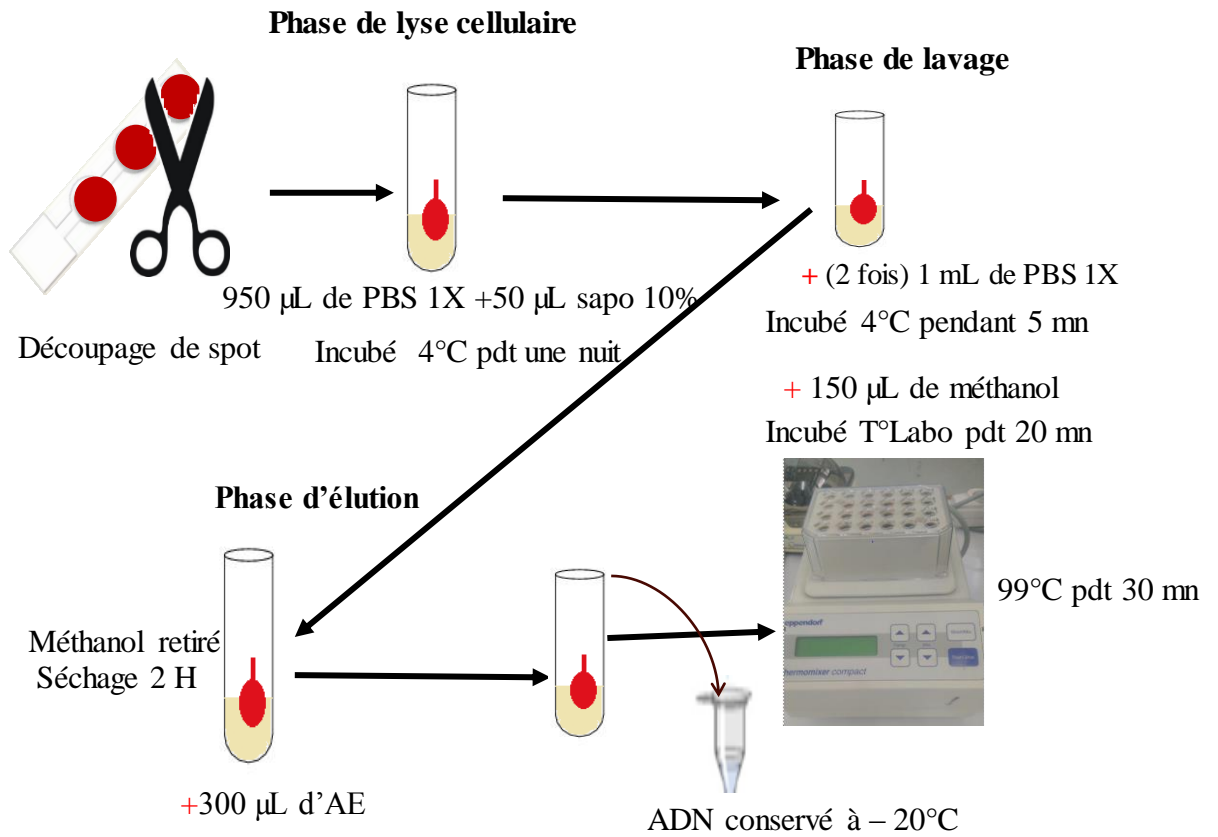
Après le découpage du spot, les morceaux de confettis ont été transférés dans un tube Eppendorf de 1,5 mL en présence du tampon de lavage (950 µL de PBS 1X plus 50 µL de saponine 10 %). L'ensemble a été incubé à 4° C pendant une nuit.

#### ➤ Deuxième étape : Phase de lavage

Le lendemain, le tampon de lavage est retiré, 1 mL de PBS 1X est ajouté à la solution puis incubé une deuxième fois à 4° C pendant 5 min. Le tampon de lavage est retiré puis remplacé par 1 mL de PBS 1X. L'ensemble est incubé à 4° C pendant 5 min puis le tampon de lavage est retiré. Un volume de 150 µL de méthanol sont ajoutés et l'ensemble est ré-incubé à la température ambiante pendant 20 min.

#### ➤ Troisième étape : Phase d'élution

Le méthanol est retiré et les confettis sont laissés à la température ambiante pendant 2 heures puis 300 µL de solution AE sont rajoutées. Les tubes sont placés dans un thermo mixeur à 99° C pendant 30 min, secoués vigoureusement au vortex toutes les 5 min. L'extrait d'ADN est aliquoté dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL puis conservé à -20° C (**Figure 8**).



**Figure 8:** Protocole d'extraction au méthanol

### II.2.8.2.2. Extraction de l'ADN au Kit Qiagen

L'extraction de l'ADN de *P. falciparum* a été réalisée au kit Qiagen selon la procédure du fabricant à partir du papier-filtre Whatman. La méthode s'est déroulée en trois étapes:

#### ➤ Première étape : Phase de lyse cellulaire

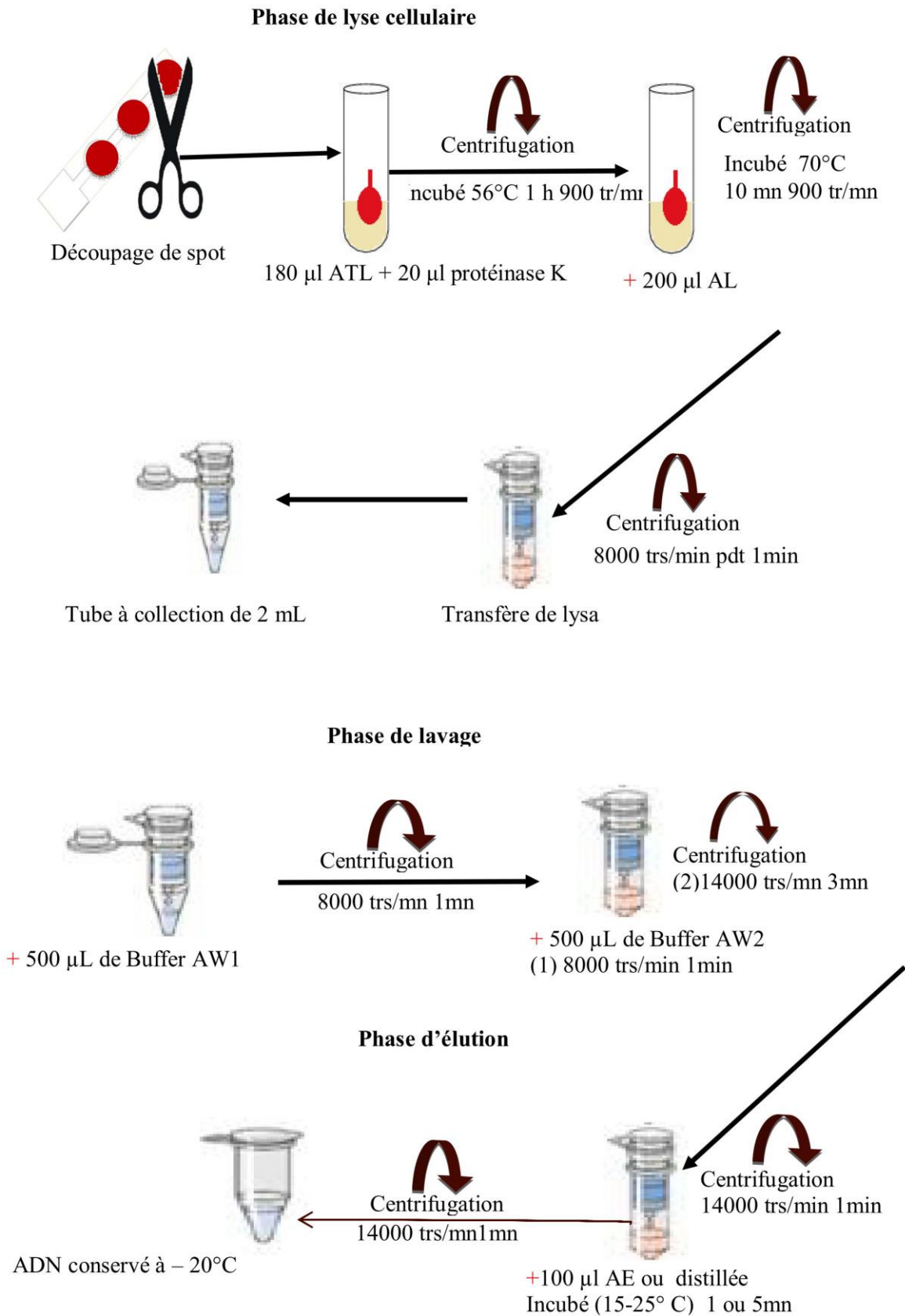
Les confettis découpés sont placés dans un tube Eppendorf 1,5 mL auquel sont ajoutés 180 µL de tampon ATL (Tissue Lysis buffer) et 20 µL de protéinase K. Après homogénéisation du tube au vortex pendant quelques secondes, il est placé sur un mixeur à 56° C pendant une heure à 900 tr/min. Au cours de cette période d'une heure le tube est vortexé pendant quelques secondes par intervalle de 10 min. Il est ensuite sorti du mixeur et centrifugé brièvement pour permettre le mélange des gouttelettes d'eau déposées sur le couvercle du tube au reste du contenu du tube. Un volume de 200 µL du tampon AL (Lysis buffer) est ajouté au tube dont le contenu est homogénéisé à la main pendant quelques secondes. La solution est ensuite placée sur le mixeur à 70° C pendant 10 min à 900 trs/min avec homogénéisation au vortex toutes les 3 min. Cette phase s'est terminée par une brève centrifugation dans le but d'obtenir un mélange homogène. Le lysat est transféré avec prudence sans mouiller le bord du tube dans une colonne fermée puis centrifugé à 8000 trs/min pendant 1 min. La colonne est placée dans un tube à collection de 2 mL.

#### ➤ Deuxième étape : Phase de lavage

Un volume de 500 µL de Buffer AW1 est mis dans la microcolonne puis centrifugé à 8000 trs/min pendant 1 min. Ensuite la colonne est placée dans un tube à collection de 2 mL, puis 500 µL de Buffer AW2 sont ajoutés puis centrifugé à nouveau à 8000 trs/min pendant 1 min. Une deuxième centrifugation à 14000 trs/min pendant 3 min a été nécessaire afin de sécher la membrane de la colonne dont le filtre permet de retenir l'ADN.

#### ➤ Troisième étape : Phase d'élution

La colonne est placée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL stérile et le tube à collection contenant l'impureté est jeté. Un volume de 100 µL de Buffer AE est ajouté au centre de la membrane et incubé. Le tube est incubé à la température ambiante (15-25° C) pendant 1 min. Parfois, le Buffer AE a été remplacé par de l'eau distillée. Dans ce cas, le temps d'incubation a été de 5 min. Après l'incubation, la solution est centrifugée à 14000 trs/min pendant 1 min. et a permis d'éluer l'ADN qui est récupéré dans le tube Eppendorf de 1,5 mL. Les extraits d'ADN sont conservés à -20° C (**Figure 9**).



**Figure 9:** Protocole d'extraction au Qiagen



### II.2.8.3. Amplification des gènes

Les gènes *msp2*, *dhfr*, *dhps* et *k13-propeller* ont été amplifiés par PCR nichée. La PCR nichée est une succession de deux PCR. Elle consiste à utiliser au cours de la première amplification un premier couple d'amorces pour amplifier une séquence plus étendue de la région d'intérêt du gène, puis à la deuxième amplification un second couple d'amorces spécifiques sert à cibler la région polymorphique d'intérêt (**Tableau V**).

#### ➤ Amplification des gènes *dhfr* et *dhps*

La composition du mix de ces gènes est la même pour les deux PCR. Le milieu réactionnel de la première PCR était composé de 12  $\mu\text{L}$  d'eau pure (Promega) ; 2,5 $\mu\text{L}$  de chaque amorce (10 $\mu\text{M}$ ) et 5  $\mu\text{L}$  de la Taq Master Mix (Solis Biodyne, Letonie). Les échantillons sont ensuite placés dans un thermo cycler pour l'amplification. La Nested PCR était composé de 28  $\mu\text{L}$  d'eau pure ; 5 $\mu\text{L}$  de couple d'amorces (10 $\mu\text{M}$ ) et 10  $\mu\text{L}$  de Master Mix (Taq ADN polymérase, dNTPs et Tampon) (**Tableau V**).

**Tableau V:** Composition des milieux réactionnels de la restriction enzymatique de fragments d'ADN

<b>PCR1</b>		<b>PCR2</b>	
<b>Réactifs</b>	<b>Volumes (μL)</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Volumes (μL)</b>
Eau pour PCR	12	Eau pour PCR	28
dhfr N1 (10μM)	2,5	dhfr R1 (10μM)	5
dhfr N2 (10μM)	2,5	dhfr R2 (10μM)	5
Master Mix (Taq 5U/μL)	5	Master Mix (Taq 5U/μl)	10
ADN	3	ADN	2
	<b>25</b>		<b>50</b>

➤ **Amplification de gène *msp2***

Le mix de la première PCR était composé de 2,5 µL de Tampon 10X ; 2,5 µL de *MgCl*<sub>2</sub> (25 µM) ; 1 µL de dNTP (5 µM) ; 2,5 µL de chaque amorce (10 µM) ; 11,8 µL d'eau pure (Promega) et 0,2 µL de Taq 5U/µL (Solis Biodyne, Letonie). Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur pour l'amplification.

Le mix de la deuxième PCR des familles 3D7 et FC27 était identique à la première PCR (**Tableau VI**). Le marqueur de polymorphisme utilisé pour distinguer une recrudescence ou une nouvelle infection était le gène *msp2*. Pour le même patient, la taille de fragments ADN pour les deux familles (3D7, FC27) a été comparée, le nombre et la position des bandes de J0 et du jour d'échec thérapeutique.

**Tableau VI:** Composition des milieux réactionnels de la restriction enzymatique des fragments d'ADN

PCR1		PCR2			
Réactifs	Volumes (μL)	Famille 3D7	Volumes (μL)	Famille FC27	Volumes (μL)
Tampon 10X	2,5	Tampon 10X	2,5	Tampon 10X	2,5
MgcI2 (25μM)	2,5	MgcI2 (25μM)	2,5	MgcI2 (25μM)	2,5
dNTP (5μM)	1	dNTP (5μM)	1	dNTP (5μM)	1
MSP-2_OF (3`)	2,5	MSP-2_3D7 (3`)	2,5	MSP-2_FC27 (3`)	2,5
MSP-2_OR (5`)	2,5	MSP-2_3D7 (5`)	2,5	MSP-2_FC27 (5`)	2,5
Eau pour PCR	11,8	Eau pour PCR	11,8	Eau pour PCR	11,8
Taq 5U/μL	0,2	Taq 5U/μL	0,2	Taq 5U/μL	0,2
ADN	2	ADN	2	ADN	2
<b>25</b>		<b>25</b>		<b>25</b>	

➤ **Amplification du gène *k13-propeller***

Le mix de la première PCR était composé de 13,75  $\mu\text{L}$  d'eau pure (Promega) ; 0,625  $\mu\text{L}$  de chaque amorce (10  $\mu\text{M}$ ) et 5  $\mu\text{L}$  de la Taq Master Mix (Solis Biodyne, Letonie). Les échantillons sont ensuite placés dans un thermo cycler pour l'amplification.

Le mix de la Nested PCR était composé de 32  $\mu\text{L}$  d'eau pure ; 1,5  $\mu\text{L}$  de chaque d'amorce (10  $\mu\text{M}$ ) et 10  $\mu\text{L}$  de la Taq Master Mix (Solis Biodyne, Letonie) (**Tableau VII**). Les programmes d'amplification de la première et de la seconde PCR sont consignés sur le **Tableau VIII**.

**Tableau VII:** Composition des milieux réactionnels de la restriction enzymatique des fragments d'ADN

<b>PCR1</b>		<b>PCR2</b>	
<b>Réactifs</b>	<b>Volumes (μL)</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Volumes (μL)</b>
Eau pour PCR	13,75	Eau pour PCR	32
K13_PCR1_F (10μM)	0,625	K13_N1_F (10μM)	1,5
K13_PCR1_R (10μM)	0,625	K13_N1_R (10μM)	1,5
Master Mix (Taq 5U/μl)	5	Master Mix (Taq 5U/μl)	10
ADN	5	ADN	5
	<b>25</b>		<b>50</b>

**Tableau VIII:** Programmes d'amplification PCR1 et PCR2 des gènes *dhfr*, *dhps*, *k13-propeller* et *msp2* de *Plasmodium falciparum*

Gènes	Programmes
<i>Pfdhfr</i>	
PCR1	93°C x 5min/ (94°C x 30sec - 54°C x 60 sec - 65°C x 60 sec) ×41cycles/ 65° x 5 min/ 15°C x 5 min
Nested	95°C x 5 min/ (93°C x 30 sec - 56°C x 30 sec - 68°C x 75 sec) ×30 cycles/ 75°C x 5 min
<i>Pfdhps</i>	
PCR1	94°C x 3min/ (94°C x 30 sec - 55°C x 30 sec - 65°C x 60 sec) × 30cycles / 65°C x 5min/ 15°C x 5 min
Nested	94°C x 5 min/ (94°C x 30 sec - 60°C x 30 sec - 65°C x 1min) × 30cycles /65°C x 5 min/15°C x 5 min.
<i>K13 propeller</i>	
PCR1	95°C x 15min/ (95°C x 30 sec - 58°C x 2 min- 72°C x 2 min) × 30 cycles/ 72°C x 10 min
Nested	95°C x 15min / (95°C x 30 sec - 60°C x 1min- 72°C x 1min) × 30 cycles/ 72°C x 10 min
<i>MSP2</i>	
PCR1	94°C x 5min / (94°C x 15 sec) × 30 cycles/ 72°C x 10 min
Nested	94°C x 5 min/ (94°C x 15 sec) × 30 cycles/ 72°C x 10 min

#### **II.2.8.4. Électrophorèse**

Nous avons procédé à la migration des produits d'amplification *msp2*, *dhfr*, *dhps* et *k13-propeller* par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% contenant 4 µL de Bromure d'éthidium (BET). Le pourcentage du gel et son volume en solution sont fonction respectivement de la taille de fragment et du nombre d'amplification à migrer.

Pratiquement, 1,5 g ou 2 g de poudre d'agarose selon le gène sont pesés et mis dans un Erlenmeyer puis dilué dans 100 mL de tampon TBE 1X (Tris-Borate-EDTA). L'ensemble a été brièvement homogénéisé de façon manuelle puis chauffé jusqu'à dissolution complète au four à micro-ondes pendant 2 min. L'Erlenmeyer est retiré et déposé sur un bassin d'eau pour tiédir la solution d'agarose et faciliter l'écoulement de gel et sa prise en masse. Une fois le gel tiédi, il est coulé délicatement dans un moule portant un peigne, de sorte à éviter la formation de bulles capables de compromettre la migration des fragments d'ADN. Après solidification du gel, le peigne est retiré délicatement laissant apparaître des puits pour le dépôt des produits de PCR. L'ensemble gel et moule est placé dans une cuve de migration contenant du tampon de migration TBE 1X. Un volume de 8 µL de produit d'amplification et 2 µL de tampon de charge (5x Green Go Taq) sont déposés dans les puits du gel. Le marqueur de poids moléculaire (Bench Top 100 bp-DNA Lader), le témoin négatif composé uniquement du Mix et le contrôle positif sont déposés (référence maison, Plate-forme de biologie moléculaire IPCI) également dans les puits. La migration est réalisée à 135 volts pendant environ 20 min. À la fin de l'électrophorèse, les bandes d'ADN sont visualisées sur un transilluminateur dans un bloc de type (Gel Doc <sup>TM</sup> EZ imager). Le pilote du gel contenant les bandes peut être enregistré sur un ordinateur.

#### **II.2.8.5. Séquençage des gènes**

Les produits de la Nested PCR (amplicons) ont été séquencés de façon automatique par la méthode de Sanger à Eurofins Genomics (France) pour les gènes *dhfr* et *dhps* et à Genewiz en Grande Bretagne pour le gène *k13-propeller*, respectivement. Les échantillons ont été envoyés dans des microplaques (Greiner Bio-one-652270B) selon de protocole de la plateforme de séquençage. Les microplaques ont été accompagnées d'un bordereau de dépôt à l'adresse électronique de chaque plateforme de séquençage.



A Genewiz, les amplicons et les amorces sont envoyés séparément. A cet effet, 10 µL des amplicons des fragments d'ADN du gène *k13-propeller* ont été placés dans chaque puits de la microplaque de 96 puits et 1 µL d'amorces utilisées pour la Nested PCR a été placé dans un micro tube. Par contre à Eurofins Genomics (France), les amplicons et les amorces sont mélangés dans les puits de la microplaque. Un volume de 13 µL des amplicons des fragments d'ADN des gènes *dhfr* et *dhps* a été ajouté à 2 µL d'amorces utilisées pour la Nested PCR. Chaque microplaque contenant le mélange a été fermée hermétiquement avec des barrettes de bouchon (4titude-044737) puis recouverte d'un film adhésif (AmpliSeal, Greiner Bio-one-676040) avant d'être expédiée et déposée à la plateforme de séquençage.

### **II.2.8.5.1. Analyse des séquences**

#### **II.2.8.5.1.1. Alignement**

Les séquences « brutes » correspondant aux gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *k13-propeller* des isolats ont été corrigées à l'aide du logiciel BioEdit 7.0.9.1 puis analysées en parallèle. Toutes les séquences ont été alignées y compris les séquences de référence des gènes correspondant disponibles en ligne dans de la banque de données publiques GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### **II.2.8.5.1.2. Repérage**

Il a consisté à détecter les loci d'intérêt, à savoir les codons en position 16, 51, 59, 108, 164 du gène *pfdhfr* et les codons en position 436, 437, 540, 581 et 613 du gène *pfdhps*, et à rechercher les mutations sur le gène *k13-propeller*.

#### **II.2.8.5.1.3. Détermination des allèles**

La réalisation de la première et Nested PCR ont permis d'amplifier un domaine de 650 pb et 594 pb respectivement pour le gène *pfdhfr*. Ce domaine contient les codons 16, 51, 59, 108 et 164. Concernant le gène *pfdhps*, la première PCR a permis d'amplifier un domaine de 770 pb et la Nested PCR un domaine de 771 pb contenant les codons 436, 437, 540, 581 et 613. Au niveau du gène *k13-propeller*, les domaines 2097 et 849 ont été amplifiés respectivement par PCR1 et Nested PCR.

Cependant, les allèles *pfdhfr* sauvages sont définis par la combinaison Ala-16/Asn-51/Cys-59/Ser-108/Ile-164, tandis que ceux de *pfdhps* par la combinaison Ser-436/Ala-437/Lys-

540/Ala-581/Ala-613. Les codons mutés correspondants sont Val-16/Ile-51/Arg-59/ Asn ou Thr-108 et Leu-164 pour le gène *dhfr* et Ala-Leu-Tyr-ou Phe-436/Gly-437/Glu-540/ Gly-581 et Ser-Thr-ou Pro-613 pour le gène *dhps*. Concernant le gène *k13-propeller*, les allèles sauvages et mutants ne sont pas totalement définis, bien que certains auteurs aient déjà décrits certains codons affectés par les mutations. La recherche est effectuée sur la séquence d'intérêt du gène séquencé pour les caractériser.

### **II.2.9. Analyse statistique**

Le tableur Excel™ développé par l'OMS a été utilisé pour la gestion et l'analyse des données. Les données ont été analysées en per protocole (OMS, 2003), le logiciel Graph Pad Prism 5 (test one way ANOVA) a été utilisé pour comparer les moyennes de température entre J0 et J2.

L'alignement et l'analyse des séquences ont été réalisés avec le logiciel BioEdit version 7.0.9.1.

### **II.2.10. Aspects éthiques et réglementaires**

A l'absence de comité éthique national, cette étude a été approuvée par le Ministère de la Santé Publique et le Programme National de Lutte contre le Paludisme au Tchad. Les parents ou les tuteurs des enfants ont donné leur accord de participation à cette étude en signant le consentement éclairé. La prise en charge médicale des participants était entièrement gratuite et l'anonymat a été garanti durant toutes les analyses de laboratoire.

## **III. RESULTATS**

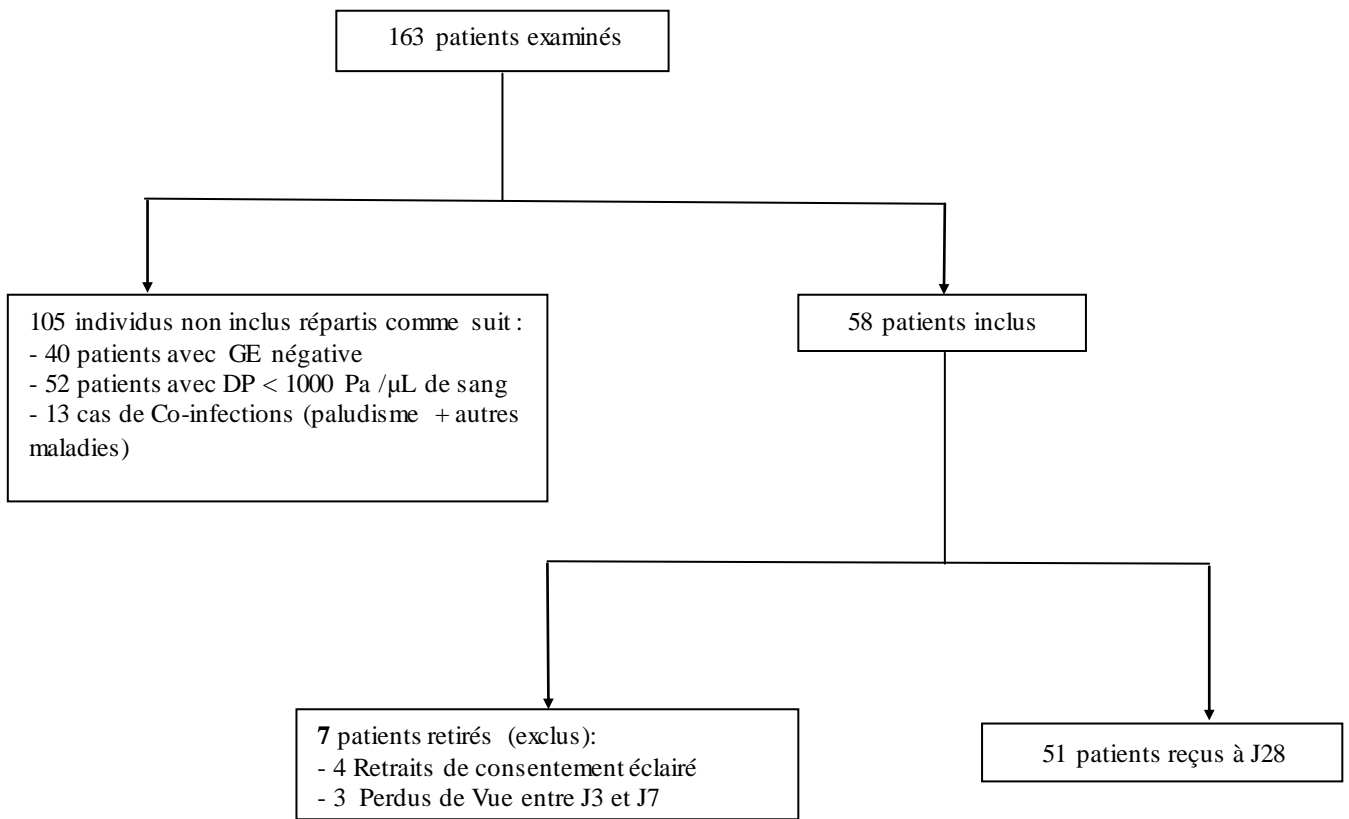
### **III.1. Efficacité thérapeutique de l'ASAQ**

#### **III.1.1. Profil de l'essai**

Durant la période de l'étude, 163 patients ont été examinés pour un paludisme simple au centre de santé urbain de Pala. Parmi eux, 58 (35,6 %) ont été inclus contre 105 non inclus (64,4 %) (**Figure 10**).

#### **III.1.2. Caractéristiques des patients à l'inclusion**

Sur les 58 patients inclus dans l'étude, 32 (55,2 %) étaient de sexe féminin et 26 (44,8 %) étaient de sexe masculin, soit un sexe ratio homme/femme de 0,81. En outre, l'âge moyen, le poids moyen et la température moyenne étaient respectivement de 2,9 ( $\pm 1,4$ ) ans 12,6 ( $\pm 3,7$ ) kg et 38,1 ( $\pm 0,9$ ) °C. De même pour la parasitémie moyenne, elle était de 3509 parasites asexués / $\mu$ L au jour de recrutement (**Tableau IX**)



Nombre de perdus de vue : 5, 17 (3/58)

**Figure 10** : Profil de l'essai clinique

**Tableau IX:** Caractéristiques des patients à l'inclusion

<b>Paramètres</b>	<b>Nombre</b>
Patients examinés	163
Patients inclus	58 (35, 6 %)
Masculin n (%)	26 (44, 8 %)
Féminin n (%)	32 (55, 2 %)
Sexe ratio	0,81
59 mois n (%)	8 (13,8 %)
< 59 mois n (%)	50 (86,2 %)
Age moyen en année ( $\pm$ SD)	2,9 ( $\pm$ 1,4)
Age (Min-max) en année	0,7-5
Poids moyen (kg) ( $\pm$ SD)	12,6 ( $\pm$ 3,7)
Poids (Min-Max) en kg	5-21
Température axillaire moyenne ( $\pm$ SD) °C	38,1 ( $\pm$ 0,9)
Température axillaire (Min-max) °C	36,2-40,3
Parasitémie moyenne (parasites asexués / $\mu$ L)	3509
Parasitémie moyenne (Min-Max) (parasites asexués / $\mu$ L)	1040-20000

### **III.1. 2. Efficacité clinique**

A l'inclusion, la température corporelle moyenne des patients était de 38,2° C avant la prise du médicament. Après l'administration de la première dose, la température corporelle moyenne est passée de 37,1°C à J2. (**Figure 11**).

A l'inclusion, 19 % des sujets inclus avaient un antécédent de fièvre au cours des dernières 24 heures. A la fin de traitement à J2, 80 % des patients étaient apyrétiques (**Figure 12**). Cette baisse significative de la température corporelle moyenne et cette hausse de la proportion de sujets apyrétiques de J0 à J2 a permis de déterminer la clairance thermique est de 48 heures. Entre J3 et J28, la proportion de sujets apyrétiques était comprise entre 80 % et 50 %.

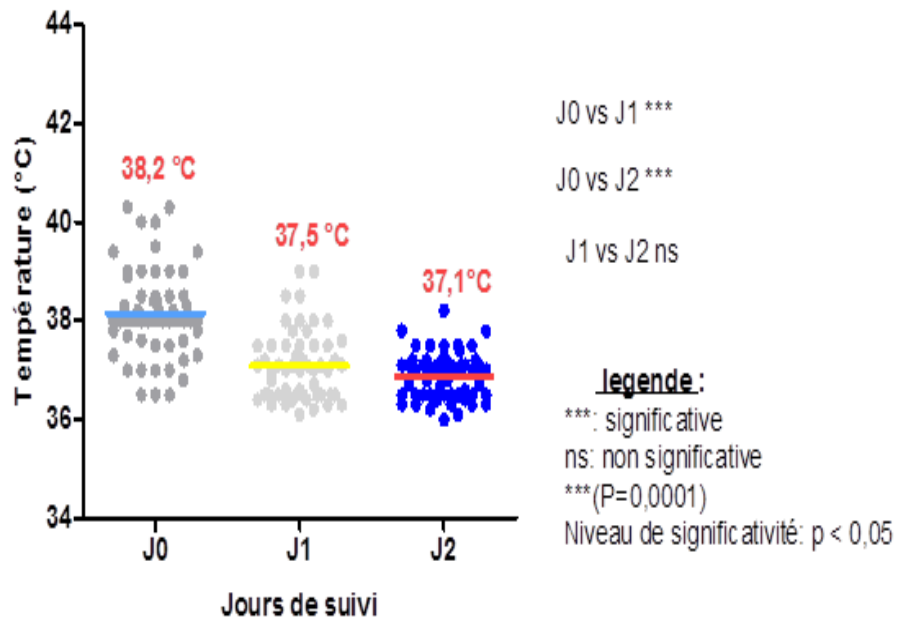


Figure 11: Distribution de la température moyenne des patients de J0 à J2

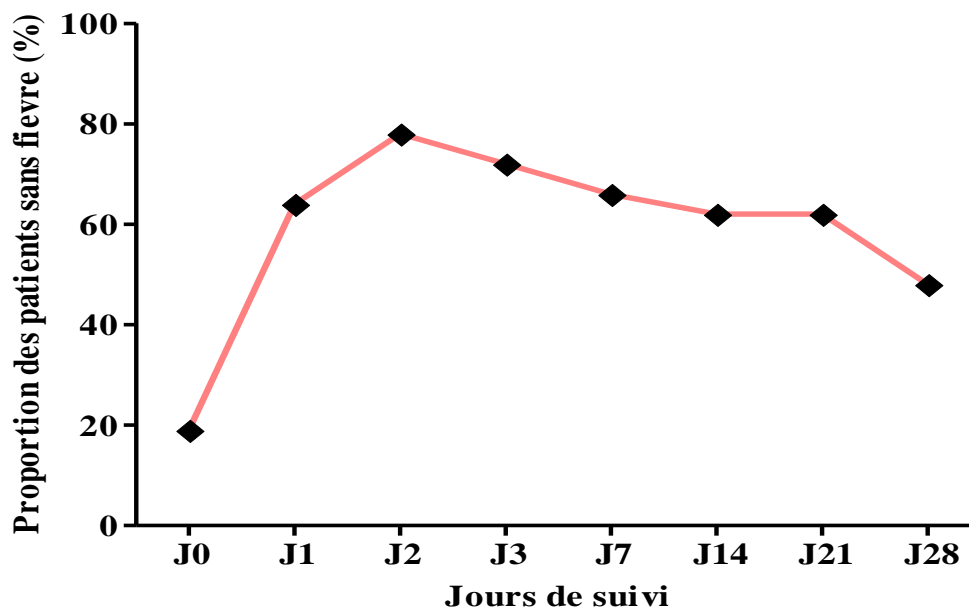


Figure 12 : Évolution de la proportion de patients sans fièvre au cours du suivi



### III.1.3. Efficacité parasitologique

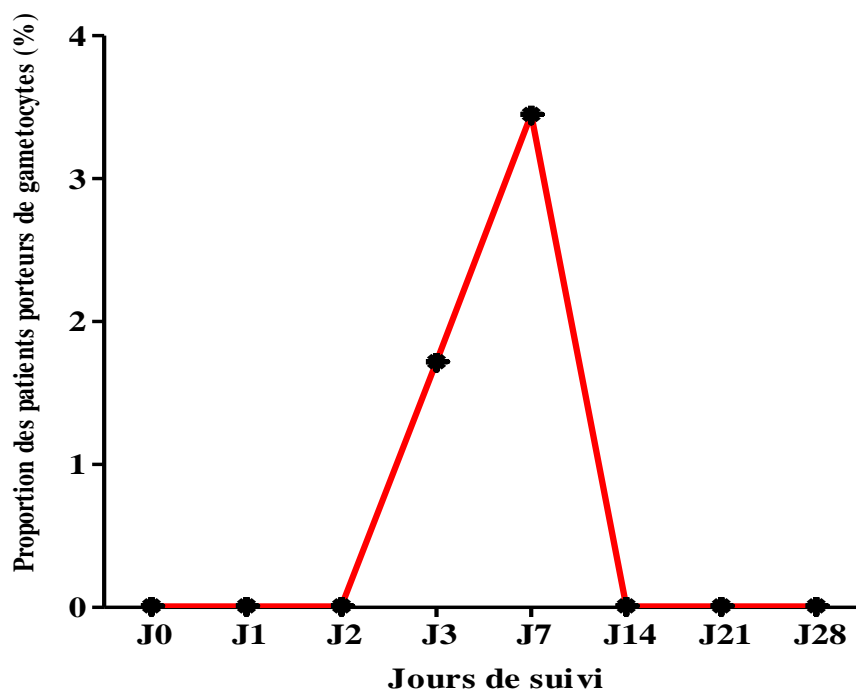
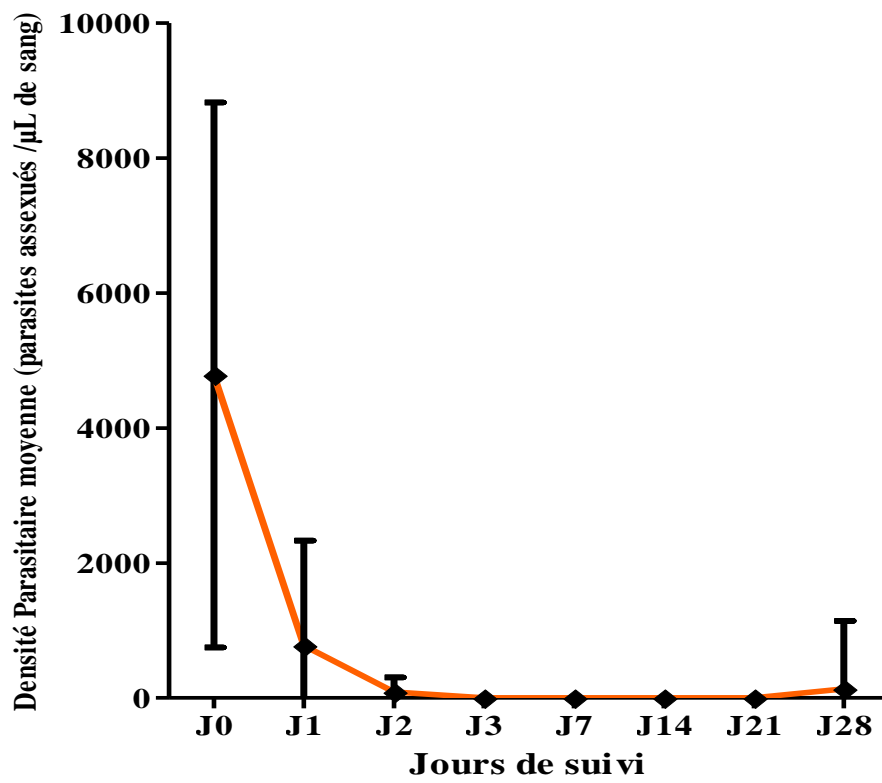
À l'inclusion, la densité parasitaire moyenne (DPM) était de 3509 parasites/ $\mu$ L. L'action de l'ASAQ sur les parasites était rapide, dès J2 la densité parasitaire moyenne était nulle chez tous les patients avec une clairance parasitaire de 48 heures (**Figure 13**). De J2 à J28, la densité parasitaire est restée nulle.

Toutefois, il a été observé un cas d'échec clinique tardif à J28 avec une densité parasitaire de 7600 parasites/ $\mu$ L. (**Figure 14**).

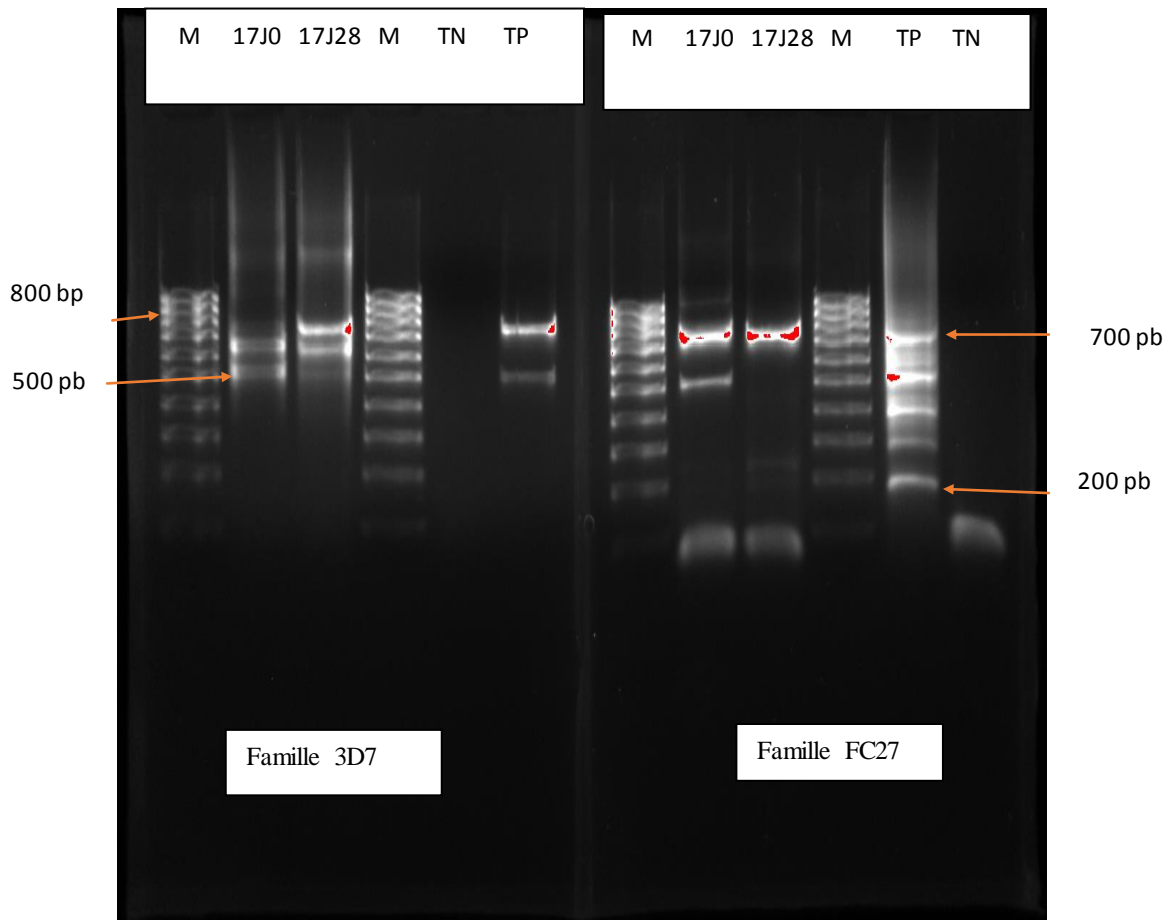
Concernant les gamétocytes, à l'inclusion l'indice gamétocytaire était nul. Mais au cours du suivi, des gamétocytes ont été observés à J3 et J7 respectivement dans les proportions de 1,72 % (1/58) et de 3,45 % (2/58). Cette réapparition des gamétocytes pourrait s'expliquer par la diminution de l'activité anti-gamétocytaire de l'ASAQ. Quelques parasites ont dû échapper pour suivre leur cycle évolutif. Par contre de J14 à J28 aucun patient n'a présenté de gamétocytes (**Figure 13**).

### III.1.4. Réponse thérapeutique des patients à l'ASAQ

Parmi les patients inclus, 51 patients ont été pris en compte dans l'analyse per protocole, car ils ont été suivis jusqu'à J28. Avant la correction PCR, 50 patients ont présenté une RCPA soit un taux d'efficacité de 98 % et 1 cas d'échec clinique tardif soit 2 %. Après la correction PCR, la RCPA était de 100 % (**Tableau X**).



**Figure 13:** Évolution de la densité parasitaire et des patients porteurs des gamétocytes de *P.f*



**Figure 14:** Amplification du fragment d'ADN de *msp2* de l'échec thérapeutique

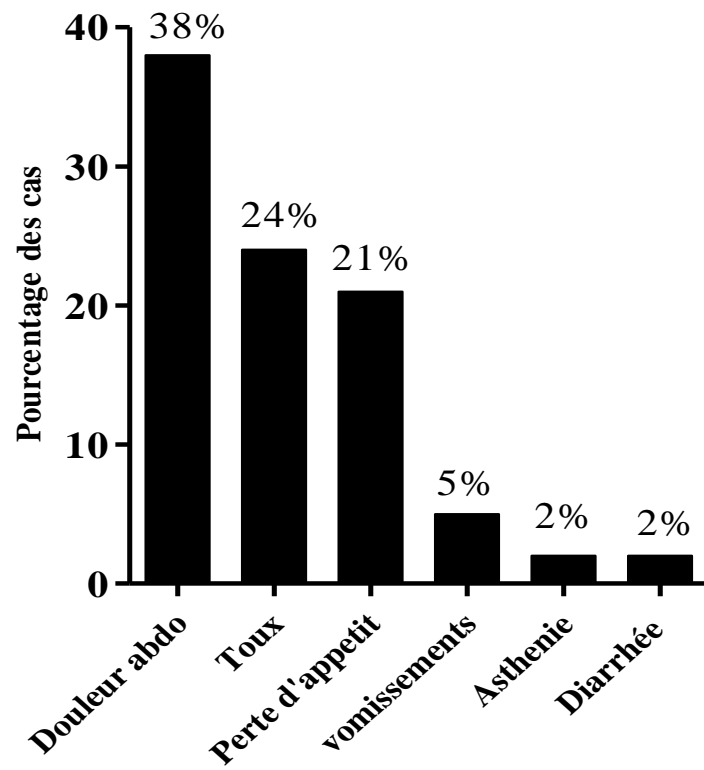
**M** : marqueur moléculaire ; **TP** : témoin positif ; **TN** : témoin négatif

**Tableau XI** : Réponse thérapeutique à J28

<b>Paramètres</b>	<b>Analyse per protocole</b>
Patients vus à J28	51 (87,9 %)
Echec Clinique Tardif (ECT)	1 (2 %)
Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (RCPA) à J28 avant correction PCR	50 (98 %)
Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (RCPA) à J28 après correction PCR	51 (100 %)

### **III.1.5. Tolérance clinique**

Les événements indésirables les plus marqués au cours du suivi sont dominés par des douleurs abdominales (38 %) suivies de la toux (24 %) et des pertes d'appétit (21 %) (**Figure 15**).

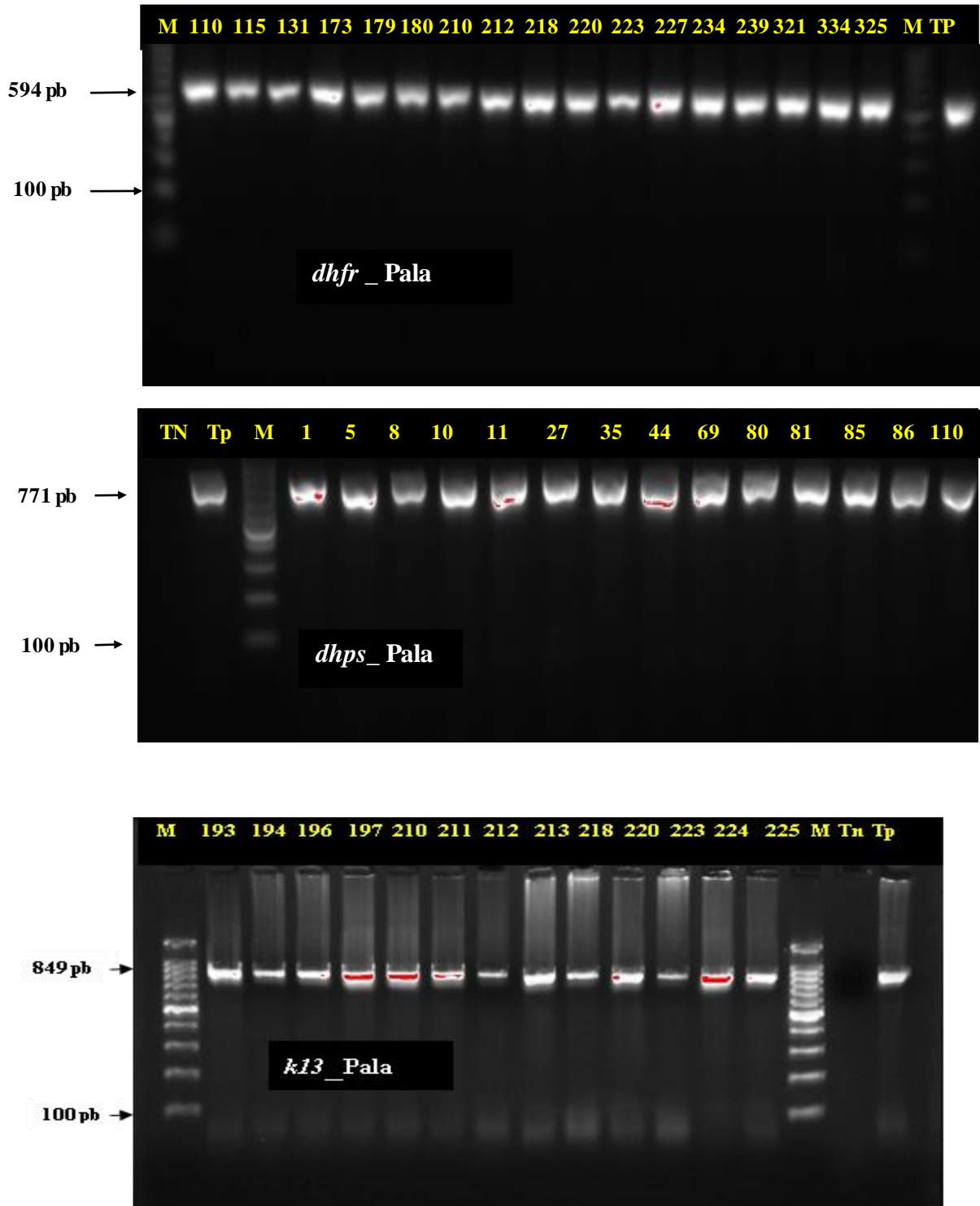


**Figure 15:** Événements indésirables mis en évidence chez les patients

## III.2. Caractérisation des gènes *dhfr*, *dhps* et *k13-propeller*

### III.2.1. Profil des gènes *dhfr* et *dhps*

Sur les 58 isolats de *P. falciparum* amplifiés (**Figure 16**), 30 isolats ont été choisis de façon aléatoire pour le séquençage des gènes *dhfr* et *dhps*. Au niveau du gène *dhfr*, le taux de succès a été de 100 % (30/30) pour les loci N51I, C59R et S108N. De même pour le gène *dhps*, le taux de succès a été de 100 % (30/30) pour les loci S436A, A437G (**Tableau XI**).



**Figure 16:** Profil électrophorétique des gènes *dhfr*, *dhps* et *k13-propeller*



**Tableau XII:** Bilan de séquençage de fragments d'ADN de *P. falciparum* en fonction de gènes *dhfr* et *dhps*

<b>Gènes</b>	<b>Loci</b>	<b>Succès</b>	<b>Échecs</b>
<i>dhfr</i>	N51I	30 (100 %)	0 (00 %)
	C59R	30 (100 %)	0 (00 %)
	S108N	30 (100 %)	0 (00 %)
<i>dhps</i>	S436A	30 (100 %)	0 (00 %)
	A437G	30 (100 %)	0 (00 %)

### III.2.2. Analyse de séquences de *dhfr* et *dhps*

L'analyse du gène *dhfr* a montré une prévalence plus importante d'isolats portant les codons *dhfr* de type sauvage Asn-51 (76,7 %) ; Cys-59 (70 %) et Ser-108 (66,7 %). La prévalence d'isolats Asn-108 était 33,3% (10/33).

Pour le gène *dhps*, les fréquences des allèles sauvages étaient respectivement de 76,7 % et 83,3 % (**Tableau XII**).

**Tableau XIII:** Répartition des isolats en fonction des codons *dhr* et *dhps*

Gènes	Position	Codons	Fréquences (%)
<i>dhfr</i>	Asn-51-Ile	<b>Ile</b>	7/30 (23,3)
		Asn	23/30 (76,7)
	Cys-59-Arg	<b>Arg</b>	9/30 (30)
		Cys	21/30 (70)
	Ser-108-Asn	<b>Asn</b>	10/30 (33,3)
		Ser	20/30 (66,7)
<i>dhps</i>	Ser-436-Ala	<b>Ala</b>	7/30 (23,3)
		Ser	23/30 (76,7)
	Ala-437-Gly	<b>Gly</b>	5/30 (16,7)
		Ala	25/30 (83,3)

### III.2.3. Répartition des types des mutations en fonction des gènes

Sept (7) génotypes *dhfr* ont été mis en évidence, parmi lesquels le génotype sauvage (N<sub>51</sub>C<sub>59</sub>S<sub>108</sub>) représenté à 53,3 % (16/30) et le triple mutant (I<sub>51</sub>R<sub>59</sub>N<sub>108</sub>) avec une fréquence de 3,3 % (1/30) (**Tableau XIII**).

Au niveau du gène *dhps*, 4 génotypes ont été déterminés, les doubles mutants *dhps* (A<sub>436</sub>G<sub>437</sub>) était de 6,7 % (2/30) tandis que les génotypes sauvages (S<sub>436</sub>A<sub>437</sub>) représentent 66,7 % des isolats (**Tableau XIII**).

**Tableau XIV:** Prévalence des mutants en fonction des gènes *dhfr* et *dhps*

Gènes	Mutations	Génotypes	Fréquence (%)
<i>dhfr</i> (N=30)	Sauvage	N <sub>51</sub> C <sub>59</sub> S <sub>108</sub>	16 (53,33)
	Mutants		14 (46, 67)
	Simple mutant	<u>I</u> <sub>51</sub> C <sub>59</sub> S <sub>108</sub>	1 (3,33)
		N <sub>51</sub> C <sub>59</sub> <u>N</u> <sub>108</sub>	2 (7)
	Double mutant	<u>I</u> <sub>51</sub> C <sub>59</sub> <u>N</u> <sub>108</sub>	2 (7)
		<u>I</u> <sub>51</sub> <u>R</u> <sub>59</sub> S <sub>108</sub>	3 (10)
		N <sub>51</sub> <u>R</u> <sub>59</sub> <u>N</u> <sub>108</sub>	5 (17)
	Triple mutant	<u>I</u> <sub>51</sub> <u>R</u> <sub>59</sub> <u>N</u> <sub>108</sub>	1 (3,33)
<i>dhps</i> (N=30)	Sauvage	S <sub>436</sub> A <sub>437</sub>	20 (66,7)
	Mutants		10 (33,3)
	Simple mutant	S <sub>436</sub> <u>G</u> <sub>437</sub>	3 (10)
		<u>A</u> <sub>436</sub> A <sub>437</sub>	5 (16,7)
	Double mutant	<u>A</u> <sub>436</sub> <u>G</u> <sub>437</sub>	2 (6,7)

### III.2.4. Répartition des haplotypes *dhfr* / *dhps*

Dix (10) haplotypes ont été mis en évidence. Les haplotypes sauvages ( $N_{51}C_{59}S_{108}/S_{436}A_{437}$ ) représentent 33,3 % (10/30). Le triple mutant  $I_{51}R_{59}N_{108}$  était associé au double  $A_{436}G_{437}$  n'a pas été observé. Tandis que le génotype triple mutant *dhfr* est retrouvé associé au simple mutant *dhps*. Ces haplotypes ( $I_{51}R_{59}N_{108}/A_{436}A_{437}$ ) représentaient 3,3 % (1/30) (**Tableau XIV**).

**Tableau XV:** Combinaison des géotypes *dhfr/dhps*

Nombre de mutations	Géotype <i>dhfr/dhps</i>	N=30	Fréquence (%)
4	<u>I</u> <sub>51</sub> <u>R</u> <sub>59</sub> <u>N</u> <sub>108</sub> / <u>A</u> <sub>436</sub> <u>A</u> <sub>437</sub>	1	3,3
3	<u>I</u> <sub>51</sub> <u>R</u> <sub>59</sub> <u>S</u> <sub>108</sub> / <u>A</u> <sub>436</sub> <u>G</u> <sub>437</sub>	1	3,3
3	<u>N</u> <sub>51</sub> <u>R</u> <sub>59</sub> <u>N</u> <sub>108</sub> / <u>S</u> <sub>436</sub> <u>G</u> <sub>437</sub>	1	3,3
2	<u>I</u> <sub>51</sub> <u>C</u> <sub>59</sub> <u>N</u> <sub>108</sub> / <u>S</u> <sub>436</sub> <u>A</u> <sub>437</sub>	2	6,7
2	<u>I</u> <sub>51</sub> <u>C</u> <sub>59</sub> <u>S</u> <sub>108</sub> / <u>S</u> <sub>436</sub> <u>G</u> <sub>437</sub>	1	3,3
2	<u>I</u> <sub>51</sub> <u>R</u> <sub>59</sub> <u>S</u> <sub>108</sub> / <u>S</u> <sub>436</sub> <u>A</u> <sub>437</sub>	2	6,7
2	<u>N</u> <sub>51</sub> <u>R</u> <sub>59</sub> <u>N</u> <sub>108</sub> / <u>S</u> <sub>436</sub> <u>A</u> <sub>437</sub>	4	13,3
2	<u>N</u> <sub>51</sub> <u>C</u> <sub>59</sub> <u>S</u> <sub>108</sub> / <u>A</u> <sub>436</sub> <u>G</u> <sub>437</sub>	1	3,3
1	<u>N</u> <sub>51</sub> <u>C</u> <sub>59</sub> <u>S</u> <sub>108</sub> / <u>S</u> <sub>436</sub> <u>G</u> <sub>437</sub>	1	3,3
1	<u>N</u> <sub>51</sub> <u>C</u> <sub>59</sub> <u>N</u> <sub>108</sub> / <u>S</u> <sub>436</sub> <u>A</u> <sub>437</sub>	2	6,7

### **III.2.5. Analyse des séquences du gène *k13-propeller* et efficacité de l'ASAQ**

Cinquante-huit (58) fragments d'ADN de *k13-propeller* ont été amplifiés puis séquencés avec succès. Après alignement avec la séquence de référence PF3D7\_1343700 et repérage, aucune mutation (synonyme, non synonyme) n'a été détectée. Tous les isolats étaient donc de type sauvage.



## **IV. DISCUSSION**

#### IV.1. Essai clinique

L'artésunate-amodiaquine (ASAQ) a été préconisé à toutes les formations sanitaires du pays comme traitement de première intention contre le paludisme simple à *P. falciparum*. Pour garantir un traitement efficace et toléré, l'évaluation des médicaments antipaludiques doit être régulière et continue (OMS, 2010). L'émergence et la rapide diffusion de la résistance de *P. falciparum* aux médicaments antipaludiques les plus couramment utilisés constitue un sérieux obstacle à l'efficacité du traitement comme stratégie prioritaire dans le contrôle du paludisme (Hien *et al.*, 2012 ; Ashley *et al.*, 2014). Pour cette raison, il est important de disposer des données sur les résistances de *P. falciparum* aux CTA au Tchad.

L'ASAQ possède une bonne activité antiplasmodiale chez les participants de cette étude. Les résultats ont montré une bonne efficacité de l'ASAQ. Avant correction PCR, 98% des patients ont présenté une RCPA. Une étude similaire a été menée au sud du pays par Tchonfiene *et al.* (2013). Un taux élevé de guérison de 98% avec l'ASAQ a été obtenu avant la correction PCR. Le seul cas d'échec observé au cours de cette étude était dû à une réinfestation et non une recrudescence. Ainsi, après correction PCR, 100 % de RCPA a été obtenu.

L'évaluation de l'efficacité des CTA a également montré une bonne efficacité de l'ASAQ dans les pays voisins du Tchad. En République Centrafricaine (RCA), en République Démocratique du Congo (RDC) et au Cameroun les résultats similaires ont été obtenus (Swarthout *et al.*, 2006 ; Mbacham *et al.*, 2010 ; Nambei *et al.*, 2013). Au Nigéria, les travaux menés par Oguche *et al.* (2014) ont montré un taux de guérison élevé après correction PCR de 98,3%. Avant correction PCR., le taux était de 97, 4 %. Falade *et al.* (2014) ont rapporté une RCPA avant et après correction PCR de 92% et 95,9% respectivement. En Érythrée, une étude récente a montré un taux de guérison proche de 96 % à J28 (Mohammeda *et al.*, 2017). Ailleurs, certaines études menées en Afrique de l'Ouest ont montré une bonne efficacité de l'ASAQ (Touré *et al.*, 2014 ; Sow D *et al.*, 2016). Ces résultats pourraient s'expliquer par la sensibilité élevée de *P. falciparum* à l'ASAQ.

Toutefois, au Gabon, au Kenya et au Sénégal, au cours d'une étude multicentrique, Ndayiragije *et al.* (2004) ont rapporté un taux faible de RCPA. Ce taux était à J28, respectivement 68%, 82 % et 85% dans chacun de ces pays. De même, les études menées au Burkina Faso ont montré un taux de guérison faible après correction PCR à J28 (Tinto *et al.*,

**2014 ; Sondo et al., 2015**). Ces résultats pourraient indiquer une baisse de sensibilité de *P. falciparum* à l'ASAQ.

Les CTA possèdent des propriétés antiparasitaires (parasites asexués et gamétocytes), antipyrétiques favorisant ainsi la guérison rapide du patient (**White, 2004**). Dans notre étude, à la fin du traitement à J2, la clairance thermique était de 48 heures. Des résultats identiques ont été obtenus par d'autres auteurs (**Ndayiragije et al., 2004 ; Niawanlou, et al., 2008 ; Touré, 2012 ; Tchonfiene et al., 2013**). Cette concordance pourrait s'expliquer par l'activité antipyrétique de l'ASAQ.

Ces résultats pourraient s'expliquer par l'action conjointe de l'ASAQ et de paracétamol administré au cours du traitement. La persistance de la fièvre chez quelques patients au-delà de J2 s'expliquerait par la période d'étude qui coïncidait avec la période de l'Harmattan (vent venant du nord-Est de l'Afrique) où les infections respiratoires aiguës (IRA) sont fréquemment rencontrées. Au Liberia, **Schramm et al., (2013)** ont rapporté un résultat similaire d.

Au Mali, **Dara et al., (2008)** au cours d'un essai clinique randomisé ouvert et multicentrique réalisé avait comparé trois antipaludiques : Artésunate-sulfaméthoxyypyrazine-pyriméthamine (Co-Arinate FDC), Sulfaméthoxyypyrazine-pyriméthamine (SMP) et Artéméther/Luméfántrine (Coartem). Il ressort qu'à partir de J1, plus de 96,5% des patients étaient apyrétiques dans le bras Artésunate-sulfaméthoxyypyrazine-pyriméthamine (Co-arinate FDC) Contrairement à la Sulfaméthoxyypyrazine-pyriméthamine et à l'Artéméther/Luméfántrine. Toutefois, une apyrexie a été obtenue dans les trois bras qu'à partir de J3. Par ailleurs, une autre étude multicentrique réalisée au Kenya, au Gabon et au Sénégal, le résultat identique. Entre J1 et J2, 97 % de patients traités étaient apyrétiques (**Adjuik et al., 2002**).

Les gamétocytes ont été mis en évidence à J3 et à J7 chez les patients après le traitement. La présence de ces gamétocytes mérite d'être analysée, vu la propriété gamétocytocide de l'artémisinine. Dans ce même pays, les résultats de **Tchonfiene et al. (2013)** ont révélé la présence des gamétocytes à J7 et à J14.

Ces résultats pourraient s'expliquer par une bonne activité gamétocytocide de l'artémisinine. Car jusqu'à la fin du suivi les gamétocytes n'ont plus été mis en évidence. Les gamétocytes sont considérés comme un facteur de dissémination de la résistance à cause du risque de leur transmission (**Price et al., 1999**). En Côte d'Ivoire et au Mali, les travaux menés

respectivement par **Touré et al. (2012)** et **Dara et al. (2008)** ont montré un résultat identique. En effet aucun gamétocyte n'a été observé à J28 dans ces deux études. Les CTA réduisent rapidement et significativement la biomasse parasitaire et entraînent consécutivement la disparition des signes cliniques (**White, 2004 ; Arnolds, 2014**).

L'ASAQ est en général mal toléré malgré une bonne efficacité (**OMS, 2009**). Toutefois, dans cette étude, les évènements indésirables sévères liés au médicament (étourdissement, insomnie, nausée, vomissement) n'ont pas été rencontrés. Les signes cliniques étaient observés entre J0 et J28. Ainsi, ils sont dominés par les douleurs abdominales, la toux et les pertes d'appétits, respectivement dans 38%, 24% et 21% des cas. Les signes observés ne sont pas forcément imputables à l'ASAQ. Dans le paludisme, les douleurs abdominales, les pertes d'appétits (anorexies) sont également retrouvées. Ces résultats sont en accord à ceux obtenus par **Touré et al. (2012)**, qui n'a enregistré aucun effet indésirable sévère. Mais, quelques signes cliniques ont été notés comme l'asthénie, les douleurs abdominales et les vomissements, respectivement dans 14%, 7% et 6% des cas. Au Tchad, **Tchonfiene et al. (2013)** ont observé les mêmes signes cliniques, dominés par les vomissements (54,5%). Aucun effet indésirable grave n'a été noté dans ces études, cela pourrait être dû à la bonne tolérance de l'ASAQ.

#### **IV.2. Mutation affectant les gènes et la sensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques**

Parallèlement à l'étude de l'efficacité thérapeutique de l'ASAQ, la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) a été déterminée.

Au Tchad, la SP n'a pas été utilisée en curatif. Elle est utilisée en prophylaxie chez la femme enceinte et en chimio-prévention saisonnière. En effet, la stratégie du TPI à la SP a été instaurée pour protéger les femmes enceintes contre le paludisme afin de réduire les effets du paludisme sur la grossesse et le fœtus notamment le faible poids à la naissance, l'avortement, la naissance prématurée, la mort périnatale et la mortalité maternelle (**Hommerich et al., 2007 ; Madanitsa et al., 2016**). Cependant, le taux de couverture en TPI reste très faible, respectivement, 15,3% de TPI1 et 13,6% de TPI2. Au niveau du TPI3 aucune information n'a été rapportée (**MSP, 2014**). Cette couverture est assez insuffisante par rapport aux objectifs fixés par le plan stratégique national (PSN) 2014 - 2018 de lutte contre le paludisme au Tchad qui a prévu une couverture de 80 % (**MSP, 2014**). Dans certains pays, les études ont rapporté

que la résistance à la SP augmente continuellement (**Venkatesan et al., 2013 ; Muleta et al., 2017**). Par contre au Tchad, la situation de la résistance à la SP est mal connue. Les données sont très rares sur la SP. Dans cette étude, la prévalence des allèles mutants n'était pas élevée. Cependant, les allèles *dhfr* et *dhps* sauvages ont été majoritairement observés, respectivement, 67%, 70% et 77% pour les codons Ser-108, Cys-59 et Asn-51 et, 76% et 83% pour les codons Ser-436 et Ala-437.

En considérant le gène *dhfr*, le codon Asn-108 est susceptible de jouer un rôle clé dans la résistance à la pyriméthamine associée aux mutations Ile-51, Arg-59 et Leu-164 (**Kümpornsin et al., 2014 ; Sharma et al., 2015**). Dans notre étude, la mutation Asn-108 était de 33 %. Une proportion relativement proche a été observée au niveau de la mutation Arg-59 (30 %). Quant à la mutation Ile-51, elle a été rencontrée dans 23 % des isolats. Ces résultats pourraient s'expliquer par une diminution de la sensibilité du *P. falciparum* à la SP. Plusieurs travaux ont montré qu'au cours des tests *in vivo* et *in vitro*, les mutations Asn-51-Ile; Cys-59-Arg et Ser-108-Asn étaient fréquemment retrouvées chez les isolats résistants à la SP (**Ndiaye et al. 2017 ; Gutman & Slutsker, 2017**). Cependant, nos résultats sont contraires à ceux trouvés au Gabon et au Burkina Faso. Une forte prédominance des mutations Asn-108 et Arg-59 ont été rapportées, respectivement 97,8%, 96,7%, dans l'étude de **Ndong et al. (2016)** et 87,23 %, 69,56 % dans celle de **Nambeole et al. (2014)**. En Guinée équatoriale, des proportions plus élevées ont été aussi rapportées, 63% pour Arg-59 et 99% pour Asn-108 (**Berzosa et al., 2017**). Les allèles du gène *dhfr* portant ces mutations pourrait provoquer un retard de clairance parasitaire. Ce sont des mutations clés impliquées dans la résistance de la SP (**Hailemeskela et al., 2013**). En comparaison avec les mutations *dhps*, les mutations *dhfr* provoquent un échec thérapeutique plus important que ceux du gène *dhps* (**Kümpornsin et al., 2014**). Des travaux ont montré que chez les patients ayant présenté des échecs thérapeutiques, la mutation Ser-108-Asn et Cys-59-Arg ont été souvent retrouvées à une proportion importante, presque à 100% (**Anthony et al., 2015 ; Berzosa et al., 2017 ; Ngondi et al., 2017**).

Ces fréquences élevées des allèles mutant observées, pourraient être dues probablement à une diminution de l'efficacité de la SP qui s'expliquerait par une large utilisation de la SP à la suite de l'apparition de la résistance à la chloroquine.

La mise en évidence de la mutation 108-Asn est particulièrement importante dans cette étude. Les études antérieures ont signalé l'importance de la mutation Ser-108-Asn qui est un marqueur essentiel dans l'évaluation de l'efficacité de la SP. Elle est la première mutation

découverte au cours d'une évaluation de la SP conférant la résistance à la Pyriméthamine (**Carter et al., 2012 ; Sirawaraporn et al., 1997 ; Lozovsky et al., 2009**). Ailleurs, la mutation Asn-108 est directement associée à la résistance de *P. falciparum* aux antifoliniques (**Mawili-Mboumba et al., 2001**). En RCA, les isolats présentant la mutation Asn-108 seule ont été associés à un échec Parasitologique Tardif (EPT) et ceux ayant la mutation Arg-59 ont présenté une RCPA. En accord avec l'observation de **Harrington et al. (2013)** et de **Ngondi et al., (2017)** une seule mutation ponctuelle, facilement sélectionnée par la pression médicamenteuse, suffit pour provoquer une résistance.

En fait, les mutations mis en évidence ne permettent pas une évaluation aisée de l'efficacité de la SP. Le triple mutant est considéré comme le meilleur facteur prédictif de la résistance *in vivo* à la SP (**Happi et al., 2006 ; Lucchi et al., 2015**). Cependant, l'étude a montré un faible niveau de parasites avec le génotype triple mutant **IRN** (3 %) par rapport au type sauvage **NCS** (53 %). La faible prévalence du triple *dhfr* indique qu'à Pala, la sensibilité du *P. falciparum* à la SP est élevée.

Les études liées à la résistance à la SP menées en République du Congo voisine (**Taylor et al., 2013; Artimovich et al., 2015 ; Gutman et al., 2015; Koukouikila-Koussounda et al., 2015**) ont montré des fréquences élevées de triple mutant. L'augmentation de la fréquence de triple mutant est liée à l'usage de la SP (**Yeboah et al., 2016 ; Orobato et al., 2016**). Dans les pays où la pression médicamenteuse est forte, ces mutations sont la cause principale de la diminution de l'efficacité de la SP (**Harrington et al., 2013 ; Minja et al., 2013 ; Lucchi et al., 2015**).

Aussi, dans certaines régions où la transmission du paludisme est stable, des fréquences non négligeables de triple mutant ont été observées. C'est le cas en République Démographique du Congo (RDC), où on a noté une prévalence de 46,2 % de triple mutant (**Swarthout et al., 2006**) comparable à celle retrouvée en Côte d'Ivoire, au cours des travaux de **Touré (2012) en (2012)** avec une prévalence de 46,6 %. Ces résultats indiquent une baisse de sensibilité de *P. falciparum* à la SP dans ces pays.

Concernant les mutations affectant le gène *dhps*, elles sont responsables de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine (**Carter et al., 2012**). En effet, selon les auteurs, les mutations Ala-436, Gly-437 associées à la mutation Lys-540-Glu confèrent une résistance à la SP (**Sowunmi et al., 2017 ; Ould et al., 2017**).

Les résultats de notre étude ont montré que 23% des isolats séquencés portaient la mutation Ala-436 et 16% la mutation Gly-437. Les prévalences ainsi observées, pourraient s'expliquer par un niveau faible de résistance à la sulfadoxine dans la zone.

Par ailleurs, en zone d'endémicité palustre, la mutation Gly-437 pourrait être un bon prédicteur de la résistance à la SP en l'absence de l'allèle Glu-540 (**Sow D et al., 2016 ; Sondo et al., 2015**). Selon certains auteurs, la mutation Ala-437-Gly est associée à une augmentation du risque de résistance à la SP (**Lucchi et al., 2015 ; Bonnet et al., 2007**). Si tel est le cas, la mutation au codon 437 serait impliquée de la même manière dans la résistance à la SP que la mutation Lys-540-Glu. Dans certaines régions du Kenya, la mutation *dhps* A437G seule prédit un échec clinique de la SP (**Omar et al., 2001 ; Parise et al., 1998**).

De plus, en République Centre africaine (RCA) et en République Démocratique du Congo (RDC) les études réalisées sur l'efficacité thérapeutique de la SP ont révélé la présence de la mutation Gly-437 dans tous les isolats d'échecs thérapeutiques (**Nambei et al., 2013 ; Nsimba et al., 2005**). D'après les observations de certains auteurs, la mutation *dhps* Gly-437 associée aux mutations affectant le gène *dhfr* aux codons 59 et 108 prédit un échec clinique de SP (**Kayentao et al., 2013 ; Yeboah et al., 2016 ; Orobato et al., 2016**).

Au niveau de génotype double mutant (Ala-436/Gly-437), il a été observé une faible prévalence des parasites portant ce génotype (6 %). La faible prévalence du double mutant pourrait résulter d'une faible pression médicamenteuse à la sulfadoxine. Aucun isolat n'a porté la double mutation *dhps* aux positions 437 et 540, communément associée à la résistance à la sulfadoxine (**Tessema et al., 2015**). La mutation DHPS-437Gly survenant habituellement en premier dans la sélection progressive des parasites résistants, a été observée dans 3 isolats (10 %).

La mutation 437G seule ou associée au K540E, pourrait entraîner un échec thérapeutique avec la SP (**Adeel et al., 2016**). Dans cette étude la prévalence de la mutation 437G était faible. La SP pourrait être déployée sans risque majeur à tous les districts sanitaires du pays dans le cadre du TPI et de la CPS. En outre, les principaux déterminants de la résistance à la SP liés à l'échec thérapeutique *in vivo* de la Sulfadoxine-Pyriméthamine étaient le triple mutant *dhfr* aux codons (51, 59, 108) associé au double mutant aux codons (437, 540) *dhps* (**Venkatesan et al., 2013 ; Matondo et al., 2014 ; Adeel et al., 2016 ; Madanitsa et al., 2016 ; Muleta et al., 2017**). Dans les pays de forte résistance, le génotype triple mutant *dhfr* et double mutant *dhps* a été observé à une prévalence élevée, entraînant le retrait de la SP (**Marks et al., 2005 ;**

**Hailemeskela et al., 2013, Ruizendaal et al., 2017 ; Ngondi et al., 2017).** Des études ont rapporté que la baisse l'efficacité de la SP est bien liée à la forte prévalence des génotypes résistants *dhfr* et *dhps* (**Gesase et al., 2009; Minja et al., 2013 ; Oguike et al., 2016**).

Au niveau de la combinaison *dhps / dhfr*, l'haplotype sauvage (NCS/SA) était prédominant dans la population étudiée (33%). Par contre, le quadruple mutant (**IRN/AA**) était faiblement représenté (3%). Le quintuple, **IRN/AG** n'a pas été observé. A cet effet, le quadruple et quintuple mutant sont les principaux déterminants impliqués dans la résistance à la SP (**Falade et al., 2014 ; Mohamed et al., 2017**).

En tenant compte des prévalences faibles de triple mutant *dhfr, dhps* quadruple mutant et l'absence de quintuple, la sélection de mutants est très lente témoignant ainsi l'efficacité élevée de la SP à Pala. Toutefois une attention particulière doit être accordée aux allèles mutants observés en surveillant régulièrement leur évolution.

En ce qui concerne le gène *k13-propeller*, le résultat de cette étude n'a montré aucune mutation (synonyme et non synonyme) affectant la séquence d'intérêt. Toutefois, les travaux de Menard *et al* en 2016 portant sur les isolats prélevés au Lac/Tchad, des mutations non synonymes ont été observées (**Menard et al., 2016**). On peut donc émettre l'hypothèse qu'il serait probable que les parasites portant les mutations non synonymes observés au Lac Tchad par Menard *et al.* en 2016 pourraient être observés ailleurs en raison du déplacement de la population entre ces pays frontaliers et la libre circulation du commerce en particulier les produits antipaludiques, facteurs favorisant la résistance. La mise en évidence de ces mutations non synonyme au Tchad peut donc encourager la recherche des parasites résistants à l'artémisinine dans tout le pays.

Cependant, les mutations affectant *k13-propeller* associée à la résistance à l'artémisinine n'ont pas été observées partout (**Hien et al., 2012 ; Phyto et al., 2012 ; Chatterjee et al., 2015**). En Guinée Équatoriale, la découverte récente d'un nouveau cas de résistance à l'artémisinine paraît inquiétant car cela peut se propager rapidement dans le reste des pays africains. Ailleurs, des études récentes ont rapportés des mutations non-synonyme au Kenya, RDC, Gabon, Ghana, Mali et Ouganda (**Taylor et al., 2015**). Par contre, nos résultats sont semblables à ceux rapportés au Benin par Ogouyèmi-Hounto *et al.* en 2016 où tous les isolats analysés étaient du type sauvage (**Ogouyèmi-Hounto et al., 2016**).



En revanche, quelques insuffisances ont été notées. L'étude s'est déroulée sur un seul site. La taille de l'échantillon était relativement faible. Ces deux paramètres pourraient avoir un impact sur les résultats obtenus.

## **V- CONCLUSION & PERSPECTIVES**

## Conclusion

Malgré les efforts consentis afin de le contrôler, le paludisme demeure un grave problème de santé publique. En zone d'endémie palustre, les femmes enceintes constituent avec les enfants de moins de cinq ans, les deux populations à risque. Les conséquences du paludisme gestationnel sont désastreuses non seulement pour la femme enceinte mais également pour l'enfant à naître. Depuis très longtemps, presque la totalité des pays d'endémie palustre ont adopté le TPI avec la SP comme l'une des stratégies essentielles de prévention du paludisme chez la femme enceinte. Cette stratégie a montré son efficacité dans la prévention des effets morbides du paludisme chez la femme enceinte. Mais l'augmentation de la résistance de *P. falciparum* à la SP rend hypothétique la poursuite de la stratégie du TPI chez la femme enceinte et de la CPS chez l'enfant. Aussi la résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine constitue une menace qui pourrait entraver les avancées acquises ces dernières années dans la lutte contre le paludisme.

L'objectif de ce travail était d'une part d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'ASAQ au cours du paludisme non compliqué à *P. falciparum* à Pala chez les enfants âgés 6 à 59 mois et d'autre part de déterminer la prévalence des marqueurs génétiques de résistance à la SP (*dhfr*, *dhps*) et à l'artémisinine (*k13-propeller*).

La première partie du travail s'est intéressée à l'efficacité thérapeutique de l'ASAQ dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* chez les enfants âgés 6 à 59 mois. Les résultats ont montré une efficacité élevée de l'ASAQ. La RCPA après correction PCR était de 100%. Les clairances thermiques et parasitologiques étaient de 48 heures. La tolérance de l'ASAQ a été bonne. Les événements indésirables sévères liés au médicament (étourdissement, insomnie, nausée, vomissement) n'ont pas été rencontrés. Par contre, les signes cliniques observés étaient dominés par les douleurs abdominales, la toux et les pertes d'appétits. Les signes cliniques ainsi notés sont dus au paludisme et non liés au traitement.

La deuxième partie a porté sur l'analyse moléculaire par séquençage des gènes *dhfr*, *dhps* et *k13-propeller*. Les résultats ont montré une prévalence élevée des allèles sauvages que mutants. Au niveau du gène *dhfr*, le triple mutant (IRN) n'a été observé qu'à une faible proportion dans 3,33% des fragments d'ADN des isolats plasmodiaux. Les simples mutants (ICS ; NCN) et les doubles mutants (ICN ; IRS ; NRN) sont respectivement de 10,3% et 34%. Concernant le gène *dhps*, les simples mutants (SG ; AA) et les double mutants (AG) sont respectivement de 26,7 % et 6,7 %.

Au niveau de la combinaison *dhps/dhfr*, l'haplotype sauvage (NCS/SA) était le plus représenté dans la population étudiée (33,3%). Par contre, le quadruple mutant (IRNA/A) était faiblement représenté (3,3 %). Le quintuple (IRN/AG) n'a pas été observé.

Pour l'analyse du gène *k13-propeller*, aucune mutation (synonyme, non synonyme) n'a été rencontrée. Tous les isolats étaient du type sauvage.

En définitive, ce travail a permis de générer des données cliniques et biologiques. Ces données sont essentielles à la fois au PNLP et au MSP afin de suivre, contrôler et guider au mieux la lutte contre le paludisme au Tchad.

### **Recommandations**

À la fin de cette étude, il est important de formuler les recommandations suivantes :

#### **Au Ministère de la Santé Publique (MSP)**

- Faciliter l'accès aux financements de tests d'efficacité thérapeutique (TET) des antipaludiques en cours d'utilisation dans les formations sanitaires;
- Impliquer les partenaires locaux de lutte contre le paludisme dans les réalisations des TET ;
- Prévoir un fonds spécial des TET.

#### **Au Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP)**

- Former une équipe spéciale en technique des TET ;
- Mener régulièrement (chaque deux ans) des TET dans les districts sanitaires;
- Actualiser la base de données.

#### **A l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)**

- Continuer à appuyer les projets du PNLP ;
- Financer les projets sur les TET des médicaments antipaludiques recommandés par PNLP;
- Former l'équipe technique en TET ;
- Appuyer l'équipe du terrain par des consultants spécialistes en TET.

## Perspectives

Nous proposons comme perspectives de :

1. Cartographier les gènes de résistance *dhfr*, *dhps* et *k13-propeller* avec un échantillonnage plus grand à Pala et dans d'autres régions du Tchad ;
2. Evaluer l'efficacité thérapeutique de la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) en Traitement Préventif Intermittent (TPI) chez la femme enceinte ;
3. Comparer l'efficacité thérapeutique de l'Artésunate-amodiaquine (ASAQ) *versus* Artéméther-Luméfantrine (AL) ;
4. Evaluer le polymorphisme des gènes *pfcr* et *pfmdr1* marqueurs de résistance de l'association artésunate-amodiaquine (ASAQ).

## **VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Adeel AA, Elnour FA , Elmardi KA, Abd-Elmajid MB , Elhelo MM , Ali MS , Adam MA , Atta H, Zamani G, Warsame M, Barrette A, El Mohammady H, Nada RA (2016).** High efficacy of artemether-lumefantrine and declining efficacy of artesunate + sulfadoxine-pyrimethamine against *Plasmodium falciparum* in Sudan (2010–2015): evidence from in vivo and molecular marker studies. *Malaria Journal*, 15: 285

**Adjuik M, Agnamey P, Babiker A, Borrmann S, Brasseur P, Cisse M, Cobelens F, Diallo S, Faucher JF, Garner P, Gikunda S, Kremsner PG, Krishna S, Lell B, Loolpapit M, Matsiegui PB, Missinou MA, Mwanza J, Ntoumi F, Olliaro P, Osimbo P, Rezbach P, Some E, Taylor WR (2002).** Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomised, multicentre trial. *Lancet*, 359: 1365-1372

**A-Elbasit IE, El Ghazali G, A-Elgadir TM, Hamad AA, Babiker HA, Elbashir MI, Giha HA (2007).** Allelic polymorphism of MSP2 gene in severe *P.falciparum* malaria in an area of low and seasonal transmission. *Parasitology Research*, 102 : 29-34

**Ambroise-Thomas P, Carnevale P, Felix H, Mouchet J (1984).** Le Paludisme. Traitement Encyclopédie médico-chirurgicale. (Paris), Maladies Infectieuses, 8089, 9 : A10 et A20

**Anthony KM, Birungi J, Stéphanie KY, Shokoples S, Malamba S, Alifrangis M, Magnussen P (2015).** Prevalence of *Plasmodium falciparum* Resistance Markers to Sulfadoxine-Pyrimethamine among Pregnant Women Receiving Intermittent Preventive Treatment for Malaria in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59: 5475-5482

**Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Stolte M, Entius MM, Loff S, Back W, Kaufmann A, Keller KM, Blaas SH, Siebert R, Vogt S, Spranger S, Holinski-Feder E, Sunde L, Propping P, Friedl W (2007).** High proportion of large genomic deletions and a genotype phenotype update in 80 unrelated families with juvenile polyposis syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 44: 702-709

**Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chhor CM, Bout DM, Menard S, Rogers WO, Genton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale JC, Fairhurst RM, Benoit VF, Mercereau PO, Menard D (2014).** A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 505 : 50-55

**Arnolds KA (2014).** Randomized comparative study of artemisinin (qinghaosu) suppositories and oral quinine in acute Plasmodium falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84 : 499-502

**Artimovich E, Schneider K, Taylor TE, Kublin JG, Dzinjalama FK, Escalante AA, Plowe CV, Laufer MK, Takala-Harrison S (2015).** Persistence of Sulfadoxine-Primethamine Resistance despite Reduction of Drug Pressure in Malawi. *Journal of Infectious Diseases*, 212: 694-701

**Ashley E A, Dhorda M , Fairhurst, RM. Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Mao S, Sam B, Sopha C, Chuor CM, Nguon C, Sovannaroeth S, Pukrittayakamee S, Phil D, Jittamala P, Chotivanich K, Chutasmit K, Suchatsoonthorn C, Runchaoren R, Hien TT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, Phu NH, Htut Y, Han KT, Aye K H, Mokuolu OA, Olaosebikan RR, Folaranmi OO, Mayxay M, Khanthavong M, Hongvanthong B, Newton PN, Onyamboko MA, Fanello CI, Tshefu AK, Mishra N, Valecha N, Phy AP, Nosten F, Yi P, Tripura R, Borrmann S, Bashraheil M, Peshu J, Abul Faiz M, Ghose A, Amir Hossain M, Samad R, Rahman MR, Hasan MM, Islam A, Miotto O, Amato R, MacInnis B, Stalker J, Kwiatkowski DP, Bozdech Z, Jeeyapant A, Cheah PY, Sakulthaew T, Chalk J, Intharabut B, Silamut K, Lee SJ, Vihokhern B, Kunasol C, Imwong M, Tarning J, Taylor WJ, Yeung S, Woodrow CJ, Flegg JA, Das D, Smith J, Venkatesan M, Plowe CV, Stepniewska K, Guerin PJ, Dondorp AM, Day NP, White NJ (2014).** Spread of Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *New England Journal of Medicine*, 371: 411–423

**Atamna H & Ginsburg H (1995).** Heme degradation in the presence of glutathione. *Journal Of Biological Chemistry*, 270: 24876-24883

**Bacon DJ, Latour C, Lucas C, Colina O, Ringwald P, Picot S (2007).** Comparison of aSYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for in vitro antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 1172-1178



**Basco LK, de Eldin Pecoulas P, Wilson CM, Le Bras J, Mazabraud A (1995).** Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 69:135-138

**Bereczky S, Mårtensson A, Gil JP, Färnert A (2005).** Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72: 249–251

**Berzosa P, Esteban-Cantos A, García L, González V, Navarro M, Fernández T, Barja MR, Herrador Z, Rubio JM, Ncogo P, Santana-Morales M, Valladares B, Riloha M, Benito A (2017).** Profile of molecular mutations in *pf dhfr*, *pf dhps*, *pf mdr1*, and *pf crt* genes of *Plasmodium falciparum* related to resistance to different anti-malarial drugs in the Bata District (Equatorial Guinea). *Malaria Journal*, 16: 28

**Bonnet M, Roper C, Félix M, Coulibaly L, Kankolongo GM, Guthmann JP (2007).** Efficacy of antimalarial treatment in Guinea: *in vivo* study of two artemisinin combination therapies in Dabola and molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine in N'Zérékoré. *Malaria Journal*, 6: 54

**Bray PG, Ward SA, Ginsburg H (1999).** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, chloroquine uptake and drug resistance: inconsistencies in a newly proposed model. *Parasitology Today*, 15: 360-363

**Briolant S, Almeras L, Fusai T, Rogier C, Pradines B (2007).** Cyclines and malaria. *Medecine Tropicale*, 67: 86-96

**Briolant S, Baragatti M, Parola P, Simon F, Tall A, Sokhna C, Hovette P, Mamfoumbi MM, Koeck JL, Delmont J, Spiegel A, Castello J, Gardair JP, Trape JF, Kombila M, Minodier P, Fusai T, Rogier C, Pradines B (2009).** Multinormal *in vitro* distribution model suitable for the distribution of *Plasmodium falciparum* chemosusceptibility to doxycycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 688-695

**Briolant S, Wurtz N, Zettor A, Rogier C, Pradines B (2010).** Susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to doxycycline is associated with *pftetQ* sequence polymorphism and copy numbers of *pftetQ* and *pfmdt*. *Journal of Infectious Diseases*, 201: 153-159

**Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE (1994).** Sequence variation in the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *European Journal of Biochemistry*, 224: 397-405

**Bursaux E (1997).** La recherche antipaludéenne : un parent très pauvre de la recherche biomédicale. *Médical Sciences*, 13 : 683-684

**Camara B, Kantambadouno JB, Martin-Blondel G, Berry A, Alvarez M, Benoit VF, Delmont J, Bouchaud O, Marchou B (2009).** Hyperreactive malarial splenomegaly: three clinical cases and literature review. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 39: 29-35

**Carter TE, Warner M, Mulligan CJ, Existe A, Victor YS, Memnon G, Boncy J, Oscar R, Fukuda MM, Okech BA (2012).** Okech. Evaluation of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genotypes that confer resistance to sulphadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* in Haiti. *Malaria Journal*, 11: 275

**Carter TE, Boulter A, Existe A, Romain JR, Victor JY, Mulligan CJ, Okech BA (2015).** Artemisinin resistance-associated polymorphisms at the *K13-propeller* locus are absent in *Plasmodium falciparum* isolates from Haiti. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92: 552-554

**Chatterjee M, Ganguly S, Saha P, Bankura B, Basu N, Das M, Guha SK, Maji AK (2015).** No Polymorphism in *Plasmodium falciparum* K13 Propeller Gene in Clinical Isolates from Kolkata, India. *Journal of Pathogens*, 2015: 3743-3754

**Chen N, Kyle DE, Pasay C, Fowler EV, Baker J, Peters JM, Cheng Q (2003).** Pfcrt Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 3500-3505

**Chiodini PL, Conlon CP, Hutchinson DB, Farquhar JA, Hall AP, Peto TE, Birley H, Warrell DA (1995).** Evaluation of Atovaquone in the treatment of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36 :1073-1078

**Coulibaly BF (2008).** Prescriptions et disponibilité des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine au centre de référence et au centre de santé catholique de Kati. *Thèse de doctorat en pharmacie*. Université de Bamako (Mali), 110 p.

**Cowman AF, Galatis D, Thompson JK (1994).** Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the pfmdr1 gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 1143-1147

**Dahl EL, Rosenthal PJ (2007).** Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 3485–3490

**Dara N (2008).** Essai clinique randomisé ouvert et multicentrique réalisé en Afrique, visant à comparer trois combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine [Artésunate-Sulfaméthoxypyrazine-Pyriméthamine (dose fixe sur 3 jours) Artésunate-Sulfaméthoxypyrazine-Pyriméthamine (dose fixe sur 24 heures) Artémether-Luméfantrine (dose fixe sur 3 jours) sur des patients atteints de paludisme simple à *Plasmodium falciparum*. *Thèse de doctorat en pharmacie*. Université de Bamako (Mali), 115 p.

**Dellicour S, Ter Kuile FO, Stergachis A (2008).** Pregnancy exposure registries for assessing antimalarial drug safety in pregnancy in malaria-endemic countries. *PLoS Medecine*, 5: e187.

**Dembélé KD, (2008).** Fréquence de prescription des antipaludiques dans le centre de référence de kati « de décembre 2006 a février 2007 ». *Thèse de doctorat en Pharmacie*, Université de Bamako (Mali), 68 p.

**Denis MB, Tsuyuoka R, Lim P, Lindegardh N, Yi P, Top SN, Socheat D, Fandeur T, Annerberg A, Christophel EM, Ringwald P (2006).** Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia. *Tropical Medicine & International Health*, 11 : 1800-1807

**Division de Système d'Information Sanitaire (DSIS) du Tchad (2012).** *Rapport 2012*, 45 p.

**Djaman AJ (2003).** Évaluation de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à différents antipaludiques (chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine, quinine) et profil génétiques des isolats correspondants. *Thèse*, Université Paris 12 (France), 175 p.

**Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ (2009).** Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*. 361: 455-467

**Duraisingh MT, DeSimone T, Jennings C, Refour P, Wu C (2008).** Erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*: multiple ligand-receptor interactions and phenotypic switching. *Subcellular Biochemistry*, 47: 46–57

**Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S (2003).** Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 424: 957-961

**Ekala MT, Khim N, Legrand E, Randrianarivelojosia M, Jambou R, Fandeur T, Menard D, Assi SB, Henry MC, Rogier C, Bouchier C, Mercereau-Puijalon O (2007).** Sequence analysis of *Plasmodium falciparum* cytochrome b in multiple geographic sites. *Malaria Journal*, 6:164

**Falade CO, Dada-Adegbola HO, Ogunkunle OO, Oguike MC, Nash O, Ademowo OG (2014).** Evaluation of the comparative efficacy and safety of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine and artesunate-amodiaquine-chlorpheniramine (Artemoclo™) for the treatment of acute uncomplicated malaria in Nigerian children. *Medical Principles and Practice*, 23: 204-211

**Faye B, Ndiaye JL, Ndiaye D, Dieng Y, Faye O, Gaye O (2007).** Efficacy and tolerability of four antimalarial combinations in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Senegal. *Malaria Journal*, 6: 80

**Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE (2000).** Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, 6: 861-871

**Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS, Warhurst DC, Pasvol G (2002).** Malarone treatment failure and *in vitro* confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malaria Journal*, 1:1

**Gentilini M. (1993) :** Médecine Tropicale, 5ème édition : Flammarion science médecine, 928p.

**Gesase S, Gosling RD, Hashim R, Ord R, Naidoo I, Madebe R, Mosha JF, Joho A, Mandia V, Mrema H, Mapunda E, Savael Z, Lemnge M, Mosha FW, Greenwood B, Roper C, Giboda M, Denis MB (1988).** Response of Kampuchean strains of *Plasmodium falciparum* to antimalarials: *in-vivo* assessment of quinine and quinine plus tetracycline; multiple drug resistance *in vitro*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91: 205-211

**Goodman CD, Su V, McFadden GI (2007).** The effects of anti-bacterials on the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 152: 181–191

**Guiguemde T, Aouba A, Ouedrago J, Iamizani I (1994).** Ten-year surveillance of drug-resistant malaria in Burkina Faso (1982-1991). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50: 699-704

**Gushimana Y, Doepner B, Martinez-Hackert E, Ilgenfritz G (1993).** Kinetics of quinine-deuteriohematin binding. *Biophysical Chemistry*, 47:153-162

**Gutman J& Slutsker L (2017).** Intermittent Preventive Treatment with Sulfadoxine–Pyrimethamine: More than Just an Antimalarial. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96: 9-10

**Gutman J, Kalilani L, Taylor S, Zhou Z, Wiegand RE, Thwai KL, Mwandama D, Khairallah C, Madanitsa M, Chaluluka E, Dzinjalama F, Ali D, Mathanga DP, Skarbinski J, Shi YP, Meshnick S, ter Kuile FO (2015).** The A581G Mutation in the Gene Encoding *Plasmodium falciparum* Dihydropteroate Synthetase Reduces the Effectiveness of Sulfadoxine-Pyrimethamine Preventive Therapy in Malawian Pregnant Women. *Journal of Infectious Diseases*, 211: 1997–2005

**Hagos B, Khan B, Ofulla AV, Kariuki D, Martin SK (1993).** Response of falciparum malaria to chloroquine and three second line antimalarial drugs in a Kenyan coastal school age population. *East African Medical Journal*, 70: 620-623

**Hailemeskela E, Kassab M, Taddesseb G, Mohammedb H, Woyessab A, Tasewb G, Sleshib M, Kebedeb A, Petros B (2013).** Prevalence of sulfadoxine–pyrimethamine resistance-associated mutations in dhfr and dhps genes of Plasmodium falciparum three years after SP withdrawal in Bahir Dar, Northwest Ethiopia. *Acta Tropica*, 128: 636– 641

**Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Bolaji OM, Sowunmi A, Kyle DE, Milhous W, Wirth DF, Oduola AM (2006).** Association between mutations in Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter and *P. falciparum* multidrug resistance 1 genes and in vivo Amodiaquine resistance in *P. falciparum* malaria-infected children in Nigeria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 155-161

**Harrington WE, Morrison R, Fried M, Duffy PE (2013).** Intermittent preventive treatment in pregnant women is associated with increased risk of severe malaria in their offspring. *PLoS One*, 8: e56183

**Hay SI, Guerra CA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Noor AM, Kabaria CW, Manh BH, Elyazar IR, Brooker S, Smith DL, Moyeed RA, Snow RW (2009).** A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in. *PLOS Medicine*, 6: e1000048

**Hien TT, Thuy-Nhien NT, Phu NH, Boni MF, Thanh NV, Nha-Ca NT, Thai LH, Thai CQ, Toi PV, Thuan PD, Long LT, Dong LT, Merson L, Dolecek C, Stepniwska K, Ringwald P, White NJ, Farrar J, Wolbers M (2012).** In vivo susceptibility of Plasmodium falciparum to artesunate in Binh Phuoc Province, Vietnam. *Malaria Journal*, 11: 355

**Hommerich L, von Oertzen C, Bedu-Addo G, Holmberg V, Acquah PA, Eggele TA, Bienzle U, Mockenhaupt FP (2007).** Decline of placental malaria in southern Ghana after the implementation of intermittent preventive treatment in pregnancy. *Malar Journal*, 6:144

**Huang F, Takala-Harrison S, Jacob CG, Liu H, Sun X, Yang H, Nyunt MM, Adams M, Zhou S, Xia Z, Ringwald P, Bustos MD, Tang L, Plowe CV (2015).** A single mutation in K13 predominates in southern China and is associated with delayed clearance of *Plasmodium falciparum* following artemisinin treatment. *Journal of Infectious Diseases*, 212: 1629-1635

**Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJM, Mutabingwa TK, Sutherland C, Hallet RL (2007).** Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 : 991-997

**Hyde J (2005) :** Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Tropica*, 94:191-206

**Ibrahim ML, (2009) :** analyse de la chimiorésistance moléculaire de *plasmodium falciparum* au Niger. Impact sur le profil clinique et de l'intensité de la transmission vectorielle. *Thèse de doctorat en biologie animale*. Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal), 171p.

**Ittarat I, Asawamasakda W, Bartlett MS, Smith JW, Meshnick SR (1995).** Effects of Atovaquone and other inhibitors on *Pneumocystis carinii* dihydroorotate dehydrogenase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:325-328

**Jeffress M & Fields S (2005).** Identification of putative *Plasmodium falciparum* mefloquine resistance genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 139: 133-139

**Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, Lakshmanan V, Sidhu AB, Bray PG, Ward SA (2004).** Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Molecular Cell*, 15 : 867-877

**Kayentao K1, Garner P, van Eijk AM, Naidoo I, Roper C, Mulokozi A, MacArthur JR, Luntamo M, Ashorn P, Doumbo OK, ter Kuile FO (2013).** Intermittent preventive therapy for malaria during pregnancy using 2 vs 3 or more doses of sulfadoxine-pyrimethamine and risk of low birth weight in Africa: systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, 309:594-604

**Kérah HC (2010).** Bio-écologie des vecteurs de paludisme et sensibilité d'*Anopheles gambiae* s.l aux insecticides dans les districts sanitaires de Guelendeng, Bongor et Kélo au sud-ouest du Tchad. *Thèse de doctorat en Entomologie Médicale*. Université de Yaoundé (Cameroun), 185 p.

**Kosaisavee V, Suwanarusk R, Nosten F, Kyle DE, Barrends M, Jones J, Price R, Russell B, Lek-Uthai U (2006).** *Plasmodium vivax*: isotopic, PicoGreen, and microscopic assays for measuring chloroquine sensitivity in fresh and cryopreserved isolates. *Experimental Parasitology*, 114: 34-39

**Koukouikila-Koussounda F, Bakoua D, Fesser A, Nkombo M, Vouvongui C, Ntoumi F (2015).** High prevalence of sulphadoxine–pyrimethamine resistance associated mutations in *Plasmodium falciparum* field isolates from pregnant women in Brazzaville, Republic of Congo. *Infection Genetics and Evolution*, 33:32–36

**Kümpornsin K, Modchang C, Heinberg A, Eklund EH, Jirawatcharadech P, Chobson P, Suwanakitti N, Chaotheing S, Wilairat P, Deitsch KW, Kamchonwongpaisan S, Fidock DA, Kirkman LA, Yuthavong Y, Chookajorn T (2014).** Origin of Robustness in Generating Drug-Resistant Malaria Parasites. *Molecular Biology and Evolution*, 31: 1649-1660

**Kyabayinze DJ, Tibenderana JK, Odong GW, Rwakimari JB, Counihan H (2008).** Operational accuracy and comparative persistent antigenicity of HRP2 rapid diagnostic tests for *Plasmodium falciparum* malaria in a hyperendemic region of Uganda. *Malaria Journal*, 7: 221

**Lim AS, Galatis D, Cowman AF (1996).** *Plasmodium falciparum*: amplification and overexpression of *pfmdr1* is not necessary for increased mefloquine resistance. *Experimental Parasitology*, 83:295-303

**Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, Yi P, Bouth DM, Bouchier C, Puijalon OM, Meshnick SR, Wongsrichanalai C, Fandeur T, Le Bras J, Ringwald P, Ariey F (2009).** *Pfmdr1* copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in *falciparum* malaria in Cambodia. *Malaria Journal*, 8: 11



**Looareesuwan S, Wilairatana P, Vanijanonta S, Kyle D, Webster K (1992).** Efficacy of quinine-tetracycline for acute uncomplicated falciparum malaria in Thailand. *Lancet*, 339: 369

**Looareesuwan S, Chulay JD, Canfield CJ, Hutchinson DB (1999).** Malarone (Atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60: 533-541

**Lozovsky ER, Chookajorn T, Brown KM, Imwong M, Shaw PJ, Kamchonwongpaisan S, Neafsey DE, Weinreich DM, Hartl DL (2009).** Stepwise acquisition of pyrimethamine resistance in the malaria parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 12025–12030

**Lucchi NW, Okoth SA, Komino F, Onyona P, Goldman IF, Ljolje D, Shi YP, Barnwell JW, Udhayakumar V, Kariuki S (2015).** Increasing Prevalence of a Novel Triple-Mutant Dihydropteroate Synthase Genotype in *Plasmodium falciparum* in Western Kenya. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59: 3995-4002

**Madanitsa M, Kalilani L, Mwapasa V, van Eijk AM, Khairallah C, Ali D, Pace C, Smedley J, Thwai KL, Levitt B, Wang D, Kang'ombe A, Faragher B, Taylor SM4, Meshnick S, Ter Kuile FO (2016).** Scheduled Intermittent Screening with Rapid Diagnostic Tests and Treatment with Dihydroartemisinin-Piperaquine versus Intermittent Preventive Therapy with Sulfadoxine-Pyrimethamine for Malaria in Pregnancy in Malawi: An Open-Label Randomized Controlled Trial. *PLoS Medicine*, 13:e1002124

**Malvy D, Djossou F, Thiébaud R, Lebras M (2000).** Plasmodies-Malaria: Formes cliniques, diagnostic in *Encyclopédie médico-chirurgicale, Maladies infectieuses*, 8-507-520

**Marfurt J, Muller I, Sie A, et al (2008):** The usefulness of twenty-four molecular markers in predicting treatment outcome with combination therapy of amodiaquine plus sulphadoxine-pyrimethamine against falciparum malaria in Papua New Guinea. *Malaria Journal*, 7:61

**Marks F, Evans J, Meyer CG, Browne EN, Flessner C, von Kalckreuth V, Eggelte TA, Horstmann RD, May J (2005).** High prevalence of markers for sulfadoxine and pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in the absence of drug pressure in the Ashanti region of Ghana. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49: 1101-1105

**Matondo S, Temba SG, Kavishe AA, Kauki SJ, Kalinga K, Zwetselaar VM, Reyburn H, Kavishe AR (2014).** High levels of sulphadoxine-pyrimethamine resistance *Pfdhfr-Pfdhps* quintuple mutations: a cross sectional survey of six regions in Tanzania. *Malaria Journal*, 13: 152

**Mawili-Mboumba DP, Ekala MT, 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

**Mbacham WF, Evehe MS, Netongo PM, Ateh IA, Mimche PN, Ajua A, Nji AM, Irene D, Echouffo-Tcheugui JB, Tawe B, Hallett R, Roper C, Targett G, Greenwood B (2010).** Efficacy of Amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine and their combination for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children in Cameroon at the time of policy change to artemisin-based combination therapy. *Malaria Journal*, 9: 34

**McGready R, Ashley EA, Moo E, Cho T, Barends M, Hutagalung R, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F (2005).** A randomized comparison of artesunate-atovaquone-proguanil versus quinine in treatment for uncomplicated *falciparum* malaria during pregnancy. *Journal of Infectious Diseases*, 192 : 846-853

**Menard D, Ariey F, Mercereau-Puijalon O (2013).** Étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (*RIIP-Palu*). *Medicine Sciences*, 29 : 647–655

**Menard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, Rahim-Awab G, Barnadas C, Berry A, Boum Y, Bustos MD, Cao J, Chen JH, Collet L, Cui L, Thakur GD, Dieye A, Djallé D, Dorkenoo MA, Eboumbou-Moukoko CE, Espino FE, Fandeur T, Ferreira-da-Cruz MF, Fola AA, Fuehrer HP, Hassan AM, Herrera S, Hongvanthong B, Houzé S, Ibrahim ML, Jahirul-Karim M, Jiang L, Kano S, Ali-Khan W, Khanthavong M, Kremsner PG, Lacerda M, Leang R, Leelawong M, Li M, Lin K, Mazarati JB, Ménard S, Morlais I, Muhindo-Mavoko H, Musset L, Na-Bangchang K, Nambozi M, Niaré K, Noedl H, Ouédraogo JB, Pillai DR, Pradines B, Quang-Phuc B, Ramharter M, Randrianarivelojosia M, Sattabongkot J, Sheikh-Omar A, Silué KD, Sirima SB, Sutherland C, Syafruddin D, Tahar R, Tang LH, Touré OA, Tshibangu-wa-Tshibangu P, Vigan-Womas I, Warsame M, Wini L, Zakeri S, Kim S, Eam R, Berne**

**L1, Khean C, Chy S, Ken M, Loch K, Canier L, Duru V, Legrand E, Barale JC, Stokes B, Straimer J, Witkowski B, Fidock DA, Rogier C, Ringwald P, Ariey F, Mercereau-Puijalon O; KARMA Consortium. (2016).** A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms, for the KARMA Consortium. *New England Journal of Medicine*. 374:2453-2464

**Meshnick, SR (2002).** Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal for Parasitology*, 32: 1655-1660

**Milton KA, Edwards G, Ward SA, Orme ML, Breckenridge AM (1989).** Pharmacokinetics of halofantrine in man effects of food and dose size. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 28:71-77

**Ministère de la santé du Tchad (2013).** Annuaire statistique. Tome A, 27ème Edition, 264 p.

**Ministère de la santé du Tchad (2014).** Programme Nationale de Lutte Contre le Paludisme (PNLP). Plan Stratégique National de lutte contre le paludisme 2014-2018. *Document, N'Djaména*, 148 p.

**Minja DT, Schmiegelow C, Mmbando B, Bostrom S, Oesterholt M, Magistrado P, Pehrson C, John D, Salanti A, Luty AJ, Lemnge M, Theander T, Lusingu J, Alifrangis M (2013).** *Plasmodium falciparum* mutant haplotype infection during pregnancy associated with reduced birthweight, Tanzania. *Emerging Infectious Diseases*, 19: 1446–1454

**Mohamed AO, Abdel Hamid MM, Mohamed OS, Elkando NS, Suliman A, Adam MA, Ali Elnour FA, Malik EM (2017).** Efficacies of DHA–PPQ and AS/SP in patients with uncomplicated *Plasmodium Falciparum* malaria in an area of an unstable seasonal transmission in Sudan. *Malaria Journal*, 16:163

**Mohammeda AO, Te wolde S, Estifanos D, Tekeste Y, Osman MH (2017).** Therapeutic efficacy of artésunate - amiodaquine for treating uncomplicated *falciparum* malaria at Ghindae Zonal Referral Hospital, Eritrea. *Acta Tropica*, 177: 94–96

**Moody A (2002).** Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 66-78.

**Muleta KT, Rouse MN, Ryneerson S, Chen X, Buta BG, Pumphrey MO (2017).** Characterization of molecular diversity and genome-wide mapping of loci associated with resistance to stripe rust and stem rust in Ethiopian bread wheat accessions. *BMC Plant Biology*, 17: 134

**Murray CK, Gasser Jr RA, Magill AJ, Miller RS (2008).** Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 21: 97–110

**Musset L (2006).** Contribution a l'étude de la résistance Plasmodium falciparum à l'atovaquone-proguanil. *Thèse de doctorat unique*. Université Paris V - René Descartes (France), 135 p.

**Nagesha HS, Din-Syafuruddin, Casey GJ, Susanti AI, Fryauff DJ, Reeder JC, Cowman AF (2001).** Mutations in *pfmdr1*, *dhfr* and *dhps* genes of *Plasmodium falciparum* are associated with in-vivo drug resistance in west Papua, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 43-49

**Nambei WS, Lango Yaya E, Pounguinza S, Achonduh O, Bogon A, Lengande R, Evehe MS, Ekollo Mbangé AH, Mbacham W (2013).** Efficacité et tolérance des associations d'antipaludiques dans le traitement du paludisme simple chez les enfants à Bangui, République centrafricaine. *Médecine et Sante Tropicales*, 23:313-319

**Nambeole Some AF (2014).** Efficacité thérapeutique de trois antipaludiques et sélection des marqueurs de résistance de *Plasmodium falciparum* à Bobo- Dioulasso, Burkina Faso. *Thèse de doctorat unique*. Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, 114 p.

**Ndayiragije A, Niyungeko D, Karenzo J, Niyungeko E, Barutwanayo M, Ciza A, Bosman A, Moyou-Somo R, Nahimana A, Nyarushatsi JP, Barihuta T, Mizero LV, Ndaruhutse J, Delacollette C, Ringwald P, Kamana J (2004).** Efficacité de combinaisons thérapeutiques avec des dérivés de l'artémisinine dans le traitement de l'accès palustre non-compliqué au Burundi. *Tropical Medicine and International Health*, 9: 673–679

**Ndiaye YD, Diédhiou CK, Bei AK, Dieye B, Mbaye A, Mze NP, Daniels RF, Ndiaye IM, Déme AB, Gaye A, Sy M, Ndiaye T, Badiane AS, Ndiaye M, Premji Z, Wirth DF, Mboup S, Krogstad D, Volkman SK, Ahouidi AD, Ndiaye D (2017).** High resolution melting: a useful field-deployable method to measure *dhfr* and *dhps* drug resistance in both highly and lowly endemic *Plasmodium* populations. *Malaria Journal*, 16:153

**Ndong Ngomo JM, Mawili-Mboumba PD, M'Bondoukwe NP, Nikiéma Ndong Ella R, Bouyou Akotet MK (2016).** Increased Prevalence of Mutant Allele Pfdhps 437G and Pfdhfr Triple Mutation in Plasmodium falciparum isolates from a Rural Area of Gabon, Three Years after the Change of Malaria Treatment Policy. *Malaria Research and Treatment*, 9: 1-6

**Ngondi JM, Ishengoma DS, Doctor SM, Thwai KL, Keeler C, Mkude S, Munishi OM, Willilo RA, Lalji S, Kaspar N, Kitojo C, Paxton LA, Hathaway NJ, Bailey JA, Juliano JJ, Meshnick SR, Gutman J (2017).** Surveillance for sulfadoxine-pyrimethamine resistant malaria parasites in the Lake and Southern Zones, Tanzania, using pooling and next-generation Sequencing. *Malaria Journal*, 16:236

**Noedl H, Bronnert J, Yingyuen K, Attlmayr B, Kollaritsch H, Fukuda M (2005).** Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 3575-3577

**Noedl H, Krudsood S, Chalermratana K, Silachamroon U, Leowattana W, Tangpukdee N, Looareesuwan S, Miller RS, Fukuda M, Jongsakul K, Sriwichai S, Rowan J, Bhattacharrya H, Oohet C, Knirsh C (2006).** Azythromycin combination therapy with artesunate or quinine for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in adults: a randomized, phase 2 clinical trial in Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, 43: 1264-1271

**Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM (2008).** Evidence of artemisinin resistance in western Cambodia. *New England Journal of Medicine*, 359:2619–2620

**Nsimba B, Jafari-Guemouri S, Malonga DA, Mouata AM, Kiori J, Louya F, Yocka D, Malanda M, Durand R, Le Bras J (2005).** Epidemiology of drug-resistant malaria in Republic of Congo: using molecular evidence for monitoring antimalarial drug resistance combined with assessment of antimalarial drug use. *Tropical Medicine & International Health*, 10:1030-1037

**Ogouyèmi-Hounto A, Damien G, Deme AB, Ndam NT, Assohou C, Tchoulin D, Mama A, Hounkpe VO, Moutouama JD, Remoué F, Ndiaye D, Gazard DK (2016).** Lack of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* in northwest Benin after 10 years of use of artemisinin-based combination therapy. *Parasite*, 23:28

**Oguche S, Okafor HU, Watila I, Meremikwu M, Agomo P, Ogala W, Agomo C, Ntadom G, Banjo O, Okuboyejo T, Ogunrinde G, Odey F, Aina O, Sofola T, Sowunmi A (2014).** Efficacy of artemisinin-based combination treatments of uncomplicated falciparum malaria in under-five year-old Nigerian children. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91:925–935

**Oguike MC, Falade CO, Shu E, Enato IG, Watila I, Baba ES, Bruce J, Webster J, Hamade P, Meek S, Chandramohan D, Sutherland CJ, Warhurst D, Roper C (2016).** Molecular determinants of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in Nigeria and the regional emergence of dhps 431V. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6:220e229

**Omar SA, Adagu IS, Warhurst DC (2001).** Can pretreatment screening for dhps and dhfr point mutations in *Plasmodium falciparum* infections be used to predict sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95:315-319

**OMS (2001).** Informal consultation on monitoring resistance to antimalarial drugs in the Mekong Region. Manila, (*document (WP)MVP/ICP/MVP/022-E*)

**OMS (2003) :** *Evaluation et surveillance de l'efficacité des antipaludiques pour le traitement du paludisme à Plasmodium falciparum non compliqué.* Genève, Organisation mondiale de la Santé, (WHO/RBM/HTM/2003.50) (<http://www.who.int/malaria/resistance>). Dernière consultation le 07 août 2018

**OMS (2009):** *Method for surveillance of antimalarial drug efficacy*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, (<http://www.who.int/malaria/resistance>). Dernière consultation le 07 août 2018

**OMS (2010).** Guidelines for the treatment of malaria-2nd edition. (<http://www.who.int/malaria/resistance>). Dernière consultation le 07 août 2018

**OMS (2011).** World Malaria. Geneva: World Health Organization. *Report 2011* (<http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/fr/>). Dernière consultation le 07 août 2018

**OMS (2016).** Initiative pour la Recherche des Vaccins. « Candidate malaria vaccines in clinical development, <http://www.who.int/vaccine-research/documents/RainbowTable-ClinicalTrials-December2006.pdf>. Dernière consultation le 07 août 2018

**OMS (2017).** Rapport mondiale sur le paludisme (<http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/fr/>). Dernière consultation le 07 août 2018

**Orobaton N, Austin AM, Abegunde D, Ibrahim M, Mohammed Z, Abdul-Azeez J, Ganiyu H, Nanbol Z, Fapohunda B, Beal K (2016).** Scaling-up the use of sulfadoxine-pyrimethamine for the preventive treatment of malaria in pregnancy: results and lessons on scalability, costs and programme impact from three local government areas in Sokoto State, Nigeria. *Malaria Journal*, 15:533

**Ould MS, Mint LK, Bouchiba H, Pascual A, Pradines B, Ould Mohamed BA, Briolant S, Basco LK, Bogreau H (2017).** Characterization of *Plasmodium falciparum* genes associated with drug resistance in Hodh Elgharbi, a malaria hotspot near Malian–Mauritanian border. *Malaria Journal*, 16:140

**Parise ME, Ayisi JG, Nahlen BL, Schultz LJ, Roberts JM, Misore A, Muga R, Oloo AJ, Steketee RW (1998).** Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of placental malaria in an area of Kenya with a high prevalence of malaria and human immunodeficiency virus infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 59:813-822

**Parzy D, Doerig C, Pradines B, Rico A, Fusai T, Doury JC (1997).** Proguanil resistance in *Plasmodium falciparum* African isolates: assessment by mutation-specific polymerase chain

reaction and in vitro susceptibility testing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 57: 646-650

**Peel SA, Bright P, Yount B, Handy J, Baric RS (1994).** A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glycoprotein gene homolog (*pfmdr*) *Plasmodium falciparum* in vitro. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51:648-658

**Peterson DS, Walliker D, Wellems TE (1988).** Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85:9114-9118

**Phyo AP, Nkhoma S, Stepniowska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, Ler Moo C, Al-Saai S, Dondorp AM, Lwin KM, Singhasivanon P, Day NP, White NJ, Anderson TJ, Nosten F (2012).** Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*, 379:1960-1966

**Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, Bienvenu AL, Price RN, Ringwald P (2009).** A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. *Malaria Journal*, 8:89

**Pradines B (2009):** ABC proteins involved in protozoan parasite resistance. In ABC Transporters and Multidrug Resistance, 195-238 p.

**Pradines B, Dormoia J, Briolanta S, Bogreau H, Rogier C (2010).** La résistance aux antipaludiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, 422: 51-62

**Pradines B, Pages JM, Barbe J (2005):** Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance. *Curr Drug Targets – Infect Disorders*; 5:411-431

**Price R, Nosten F, Simpson JA, Luxemburger C, Phaipun L, ter Kuile F, van Vugt M, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ (1999).** Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated falciparum malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60:1019-1023



**Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F, Krishna S (2004).** Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*, 364:438-447

**Prudencio M, Rodriguez A , Mota MM (2006).** The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 849-856

**Pukrittayakamee S, Imwong M, Looareesuwan S, White NJ (2004).** Therapeutic responses to antimalarial and antibacterial drugs in vivax malaria. *Acta Tropica*, 89: 351-356

**Ringwald P (2007).** Current antimalarial drugs: resistance and new strategies. *Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine*, 191:1273-1284

**Ringwald P, Basco LK (1999).** Comparison of in vivo and in vitro tests of resistance in patients treated with chloroquine in Yaounde, Cameroon. *Bull World Health Organ*, 77: 34-43

**Rogier C, Henry MC, Trape JF (2009).** Evaluation épidémiologique du paludisme en zone d'endémie. *Médecine Tropicale*, 69:123-142

**Ruizendaal E, Tahita MC, Geskus RB, Versteeg I, Scott S, d'Alessandro U, Lompo P, Derra K, Coulibaly MT, de Jong MD, Henk DF, Schallig H, Tinto H, Mens PF (2017).** Increase in the prevalence of mutations associated with sulfadoxine–pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates collected from early to late pregnancy in Nanoro, Burkina Faso. *Malaria Journal*, 16:179

**Sanchez CPI, McLean JE, Stein W, Lanzer M (2004).** Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in chloroquine resistant. *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry*, 43:16365-16373

**Sano G, Morimatsu K, Horii T (1994).** Purification and characterization of dihydrofolate reductase of *Plasmodium falciparum* expressed by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63:265-273

**Sayang C, Soula G, Tahar R, Basco LK, Gazin P, Moyou-Somo R, Delmont J (2009).** Use of a Histidine-Rich Protein 2-Based Rapid Diagnostic Test for Malaria by Health Personnel during Routine Consultation of Febrile Outpatients in a Peripheral Health Facility in Yaoundé, Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 343-347

**Schramm B, Valeh P, Baudin E, Mazinda CS, Smith R, Pinoges L, Dhorda M, Boum Y 2nd, Sundaygar T, Zolia YM, Jones JJ, Comte E, Houzé P, Jullien V, Carn G, Kiechel JR, Ashley EA, Guérin PJ (2013).** Efficacy of artesunate-amodiaquine and artemether-lumefantrine fixed-dose combinations for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria among children aged six to 59 months in Nimba County, Liberia: an open-label randomized non-inferiority trial. *Malaria Journal*, 12: 251

**Sharma D, Lather M, Mallick KP, Adak T, Dang AS, Valecha N, Singh OP (2015).** Polymorphism in drug resistance genes dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in *Plasmodium falciparum* in some states of India. *Parasit Vectors*, 8: 471

**Siau A., Silvie O, Franetich JF, Yalaoui S, Marinach C, Hannoun L, van Gemert GJ, Luty AJ, Bischoff E, David PH, Snounou G, Vaquero C, Froissard P, Mazier D (2008).** Temperature shift and host cell contact up-regulate sporozoites expression of *Plasmodium falciparum* genes involved in hepatocyte infection. *PLOS Pathogens*, 4: e1000121

**Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, Cowman AF, Winstanley PA, Watkins WM, Nzila AM (2001).** Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*, 17:582-8.

**Sirawaraporn W, Sathitkul T, Sirawaraporn R, Yuthavong Y, Santi DV (1997).** Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:1124-1129

**Sondo P, Derra K, Diallo-Nakanabo S, Tarnagda Z, Zampa O, Kazienga A, Valea I, Sorgho H, Owusu-Dabo E, Ouedraogo JB, Guiguemde TR, Tinto H (2015).** Effectiveness and safety of artemether-lumefantrine versus artesunate-amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in patients of all age groups in Nanoro, Burkina Faso: a randomized open label trial. *Malaria Journal*, 14: 325

**Sow D, Ndiaye JL, Sylla K, Ba MS, Tine RCK, Faye B, Pene M, Ndiaye M, Seck A, Lo AC, Abiola A, Dieng Y, Gaye O (2016).** Évaluation de l'efficacité et de la tolérance des combinaisons artesunate-amodiaquine, dihydroartémisinine-pipéraquline et artémetherluméfantrine pour le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* non compliqué au Sénégal. *Medecine et Sante Tropicales*, 26 : 45-50

**Sow S (2009).** L'application des combinaisons thérapeutiques a base d'artémisinine dans le traitement du paludisme simple dans les formations sanitaires de la commune i du district de bamako. *Thèse de doctorat en médecine.* Université de Bamako (Mali), 113 p.

**Sowunmi A, Akano K, Ntadom G, Ayede AI, Ibironke FO, Aderoyeje T, Adewoye EO, Fatunmbi B, Oguche S, Okafor HU, Watila I, Meremikwu M, Agomo P, Ogala W, Agomo C, Folarin OA, Gbotosho GO, Happi CT (2017).** Therapeutic efficacy and effects of artemisinin-based combination treatments on uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria -associated anaemia in Nigerian children during seven years of adoption as first-line treatments. *Infectious Diseases of Poverty*, 6:36

**Sridaran S, McClintock SK, Syphard LM, Herman KM, Barnwell JW, Udhayakumar V (2010).** Anti-folate drug resistance in Africa: Meta-analysis of reported dihydrofolate reductase (dhfr) and dihydropteroate synthase (dhps) mutant genotype frequencies in African *Plasmodium falciparum* parasite populations. *Malar Journal*, 9:247

**Straimer J, Gnädig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP, Dacheux M, Khim N, Zhang L, Lam S, Gregory PD, Urnov FD, Mercereau-Puijalon O, Benoit-Vical F, Fairhurst RM, Ménard D, Fidock DA (2014).** K13-Propeller Mutations Confer Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Clinical Isolates. *Science*, 347:428-431

**Sugioka Y & Suzuki M (1991).** The chemical basis for the ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex induced lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1074:19-24

**Swarthout TD, van den Broek IV, Kayembe G, Montgomery J, Pota H, Roper C (2006).** Artésunate + amodiaquine and artésunate + sulphadoxine–pyrimethamine for treatment of uncomplicated malaria in Democratic Republic of Congo: a clinical trial with determination of sulphadoxine and pyrimethamine-resistant haplotypes, *Tropical Medicine and International Health*, 11: 1503–1511

**Takala-Harrison S, Jacob CG, Arze C, Cummings MP, Silva JC, Dondorp AM, Fukuda MM, Hien TT, Mayxay M, Noedl H, Nosten F, Kyaw MP, Nhien NT, Imwong M, Bethell D, Se Y, Lon C, Tyner SD, Saunders DL, Ariey F, Mercereau-Puijalon O, Menard D, Newton PN, Khanthavong M, Hongvanthong B, Starzengruber P, Fuehrer HP, Swoboda P, Khan WA, Phyto AP, Nyunt MM, Nyunt MH, Brown TS, Adams M, Pepin CS, Bailey J, Tan JC, Ferdig MT, Clark TG, Miotto O, MacInnis**

**B, Kwiatkowski DP, White NJ, Ringwald P, Plowe CV (2015).** Independent emergence of artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia. *Journal of Infectious Diseases*, 211: 670-9

**Tamez PA, Liu H, Fernandez Pol S, Haldar K, Wickrema A. (2009).** Stage-specific susceptibility of human erythroblasts to *Plasmodium falciparum* malaria infection. *Blood*, 114:3652-3655

**Tangara A, (2006).** Prescription et disponibilité des antipaludiques dans les CSCOM de la commune urbaine de Kati. *Thèse de doctorat en pharmacie*. Université de Bamako (Mali), 100 p.

**Tardieux I & Menard R. (2008).** Migration of Apicomplexa across biological barriers: the Toxoplasma and Plasmodium rides. *Traffic*, 9: 627-635

**Taylor SM, Antonia AL, Parobek CM, Juliano JJ, Janko M, Emch M, Alam MT, Udhayakumar V, Tshefu AK, Meshnick SR (2013).** Plasmodium falciparum sulfadoxine resistance is geographically and genetically clustered within the DR Congo. *Scientific Reports*, 3:1165

**Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, Tagbor H, Williams J, Bojang K, Njie F, Desai M, Kariuki S, Gutman J, Mathanga DP, Mårtensson A, Ngasala B, Conrad MD, Rosenthal PJ, Tshefu AK, Moormann AM, Vulule JM, Doumbo OK, Ter Kuile FO, Meshnick SR, Bailey JA, Juliano JJ (2015).** Absence of putative artemisinin resistance mutations among Plasmodium falciparum in Sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study. *Journal of Infectious Diseases*, 211 : 680-688

**Tchonfiene P (2013).** Efficacité et tolérance de Coarsucam® dans le traitement du paludisme simple à Plasmodium falciparum (étude sur 117 enfants de 6-59 mois à Koyom, Mayo Kebbi Est). *Thèse de doctorat en médecine*, Université de N'Djaména (Tchad), 60 p.

**Tessema SK, Kassa M, Kebede A, Mohammed H, Leta GT, Woyessa A, Guma GT, Petros B (2015).** Declining trend of Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (dhfr) and dihydropteroate synthase (dhps) mutant alleles after the withdrawal of Sulfadoxine-Pyrimethamine in North Western Ethiopia. *PLoS One*, 10 : e0126943

**Thriemer K, Hong NV, Rosanas-Urgell A, Phuc BQ, Ha do M, Pockele E, Guetens P, Van NV, Duong TT, Amambua-Ngwa A, D'Alessandro U, Erhart A (2014).** Delayed parasite clearance after treatment with dihydroartemisinin-piperazine in *Plasmodium falciparum* malaria patients in central Vietnam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58: 7049-7055

**Tinto H, Diallo S, Zongo I, Guiraud I, Valea I, Kazienga A, Kpoda H, Sorgho H, Ouédraogo JB, Guiguemdé TR, D'Alessandro U (2014).** Effectiveness of artesunate–amodiaquine vs. artemether–lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Nanoro, Burkina Faso a noninferiority randomised trial. *Tropical Medicine and International Health*, 19 : 469–475

**Touré OA (2012).** Traitement préventif intermittent chez les femmes enceintes et chimiorésistances de *P. falciparum* en Côte d'Ivoire. *Thèse de doctorat Unique*, Université F. Houphouët-Boigny, 222 p.

**Touré OA, Assi SB, N'Guessan TL, Adjé GE, Ako AB, Brou MJ, Ehouman MF, Gnamien LA, Coulibaly MA, Coulibaly B, Beourou S, Bassinka I, Soumahoro A, Kadjo F, Tano MA (2014).** Open-label, randomized, non-inferiority clinical trial of artesunate-amodiaquine *versus* artemether-lumefantrine fixed-dose combinations in children and adults with uncomplicated falciparum malaria in Côte d'Ivoire. *Malaria Journal*, 13: 439

**Trape JF (2001).** The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*: 64(1-2 Suppl):12-7

**Triglia T, Cowman AF (1994).** Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 7149-7153

**Triglia T, Menting JG, Wilson C, Cowman AF (1997).** Mutations of dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 13944-13949

- Vaidya AB, Lashgari MS, Pologe LG, Morrisey J (1993).** Structural features of Plasmodium falciparum cytochrome b that may underlie susceptibility to 8-aminoquinolines and hydroxynaphthoquinones. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58: 33-42
- Venkatesan M, Alifrangis M, Roper C, Plowe CV (2013).** Monitoring antifolate resistance in intermittent preventive therapy for malaria. *Trends in Parasitology*, 29: 497-504
- Wang P, Lee CS, Bayoumi R, Djimde A, Doumbo O, Swedberg G, Dao LD, Mshinda H, Tanner M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE (1997).** Resistance to antifolates in Plasmodium falciparum monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89: 161-177
- White NJ (2004).** Antimalarial drug resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 113: 1084-1092
- Wongsrichanalai C, Meshnick SR (2008).** Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 716-719
- Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P (2007).** Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular Microbiology*, 9: 1215-1222
- Yeboah DF, Afoakwa R, Nwaefuna E, Verner O, Boampong JN (2016).** Quality of Sulfadoxine-Pyrimethamine Given as Antimalarial Prophylaxis in Pregnant Women in Selected Health Facilities in Central Region of Ghana. *Journal of Parasitology Research*, 19:1-6
- Yeo AE, Rieckmann KH, Christopherson RI (1998).** Indirect inhibition by antibiotics of nucleotide and deoxynucleotide biosynthesis in Plasmodium falciparum. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 29: 24-26
- Zhou H, Zhu G, Tang J, Liu Y, Wang W, Cao Y, Xu S, Gu Y, Li J, Zhang C, Gao Q, Menard D, Pain A, Abdullah K, Yang H, Zhang Q, Cao J (2017).** Emergence of Indigenous Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum in Africa. *New England Journal of Medicine*, 376: 10

**Zolg JW1, Plitt JR, Chen GX, Palmer S (1989).** Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36: 253-262

# ANNEXES



# **Annexe 1 : Table des matières**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>DEDICACES.....</b>	<b>III</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>VII</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XX</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XXI</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>I. GENERALITES.....</b>	<b>6</b>
I.1. Épidémiologie.....	7
I.1.1. Agents pathogènes.....	7
I.1.2. Agent vecteur.....	9
I.2. Cycle évolutif.....	9
I.2.1. Phase asexuée.....	11
I.2.2. Phase sexuée chez l'anophele.....	11
I.3. Répartition géographique du paludisme.....	12
I.3.1. Monde.....	14
I.3.2. Afrique.....	14
I.3.3. Tchad.....	14
I.4. Différents types de paludisme.....	17
I.4.1. Paludisme simple.....	17
I.4.2. Paludisme grave.....	17
I.4.3. Paludisme chez la femme enceinte.....	18
I.5. Diagnostic du paludisme.....	18
I.5.1. Diagnostic direct.....	18
I.5.2. Diagnostic indirect.....	20
I.6. Principales familles d'antipaludiques et leurs utilisations.....	21
I.6.1. Famille des lysomotropes.....	22
I.6.2. Famille des antimétabolites.....	23
I.6.3. Antibiotiques à activité antipaludique.....	24
I.6.4. Antipaludiques et grossesse.....	24

I.7. Directives nationales de traitement au Tchad.....	25
I.7.1. Traitement du paludisme simple.....	25
I.7.2. Traitement du paludisme grave.....	25
I.8. Modes d'action des antipaludiques et mécanismes de résistance des plasmodies	25
18.1. Historique et situation actuelle de résistance.....	26
I.8.2. Amino-alcools.....	26
I.8.3. Amino-4-quinoléines.....	28
I.8.4. Artémisinine et ses dérivés.....	29
I.8.5. Anti-métabolites.....	30
I.8.6. Hydroxynaphtoquinones (atovaquone).....	33
I.8.7. Antibiotiques (Doxycycline).....	33
I.9. Marqueurs moléculaires de résistance.....	34
I.10. Dynamique des résistances.....	36
I.11. Méthodes d'évaluation des antipaludiques.....	37
I.11. 1. Tests in vivo.....	38
I.11. 3. Marqueurs moléculaires de résistance.....	39
<b>II. MATERIEL &amp; METHODES.....</b>	<b>40</b>
II.1. Matériel.....	41
II.1.1. Site de l'étude.....	41
II.1.2. Population de l'étude.....	43
II.1.3. Matériel biologique.....	44
II.2. Méthodes.....	46
II.2.1. Type et période d'étude.....	46
II.2.3. Recrutement des participants.....	47
II.2.4. Réalisation de la goutte épaisse et du frottis mince.....	47
II.2.5. Administration du traitement.....	48
II.2.6. Suivi des patients.....	50
II.2.7. Critères d'évaluation de l'efficacité thérapeutique de l'ASAQ.....	51
II.2.8. Polymérase Chain Réaction.....	51
II.2.8.1. Collecte de sang sur papier filtre Whatman 3mm.....	51
II.2.8.2. Extraction de l'ADN plasmodial.....	53
II.2.8.3. Amplification des gènes.....	57
II.2.8.4. Électrophorèse.....	59

II.2.8.5. Séquençage des gènes.....	65
II.2.9. Analyse statistique.....	66
II.2.10. Aspects éthiques et réglementaires.....	66
<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>67</b>
III.1. Efficacité thérapeutique de l'ASAQ.....	68
III.1.1. Profil de l'essai.....	68
III.1.2. Caractéristiques des patients à l'inclusion.....	70
III.1. 2. Efficacité clinique.....	72
III.1.3. Efficacité parasitologique.....	76
III.1.4. Réponse thérapeutique des patients à l'ASAQ.....	79
III.1.5. Tolérance clinique.....	82
III.2. Caractérisation des gènes dhfr, dhps et k13-propeller.....	84
III.2.1. Profil des gènes dhfr et dhps.....	84
III.2.2. Analyse de séquences de dhfr et dhps.....	87
III.2.3. Répartition des types des mutations en fonction des gènes.....	89
III.2.4. Répartition des haplotypes dhfr / dhps.....	91
III.2.5. Analyse des séquences du gène k13-propeller et efficacité de l'ASAQ.....	93
<b>IV.DISCUSSION.....</b>	<b>94</b>
<b>V- CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>103</b>
<b>VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>106</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>132</b>

## **Annexe 2 : Autorisation de recherche**

REPUBLIQUE DU TCHAD

\*\*\*\*\*

PRESIDENCE DE LA REPUBLIQUE

\*\*\*\*\*

PRIMATURE

\*\*\*\*\*

SECRETARIAT GENERAL

\*\*\*\*\*

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET  
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

\*\*\*\*\*

DIRECTION GENERALE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

\*\*\*\*\*

DIRECTION DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET  
TECHNIQUE

\*\*\*\*\*

N° 004/PR/PM/ MESRS/SG/DGESRS/DRST/15

UNITE - TRAVAIL - PROGRES

\*\*\*\*\*

وحدة - عمل - تقدم



جمهورية تشاد

\*\*\*\*\*

رئاسة الجمهورية

\*\*\*\*\*

رئاسة الوزراء

\*\*\*\*\*

الأمانة العامة

\*\*\*\*\*

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

\*\*\*\*\*

الإدارة العامة للتعليم العالي والبحث العلمي

\*\*\*\*\*

إدارة البحث العلمي والتقني

\*\*\*\*\*

N'Djaména, le 23/03/2015

## AUTORISATION DE RECHERCHE

Il est délivré à Monsieur **ISSA MAHAMAT SOULEYMANE**, Assistant Médical au laboratoire du Programme National de Lutte Contre le Paludisme (PNLP), une autorisation de recherche d'une durée de quatre (4) mois pour compter du 01 juin au 01 septembre 2015 sur le thème : « *Efficacité in vivo de l'Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et caractérisation de quelques marqueurs moléculaires de résistance de plasmodium falciparum au Tchad* ». Cette recherche s'effectuera dans la ville de Massakory, N'Djaména, Bol, Abéché, Moundou et Am-timan.

A cet effet, il est demandé aux autorités administratives, militaires et traditionnelles de la région de faciliter le travail de l'intéressé.

Par ailleurs, l'intéressé est tenu de déposer un exemplaire de son rapport de recherche à la Direction de la Recherche Scientifique et Technique (DRST).

En foi de quoi, la présente autorisation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Le Directeur de la Recherche  
Scientifique et Technique

**Dr. MOUSSA ISSEINI**



## **Annexe 3 : Critères de classification de la réponse au traitement**

## **Critères de classification de la réponse au traitement**

### **❖ Echec thérapeutique précoce**

- ✓ signes de danger ou paludisme grave au jour 1, 2 ou 3, en présence d'une parasitémie ;
- ✓ parasitémie au jour 2 supérieure à celle du jour 0, quelle que soit la température axillaire ;
- ✓ parasitémie au jour 3 et température axillaire  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  ; et
- ✓ parasitémie au jour 3  $\geq 25\%$  par rapport à la numération du jour 0.

### **❖ Echec thérapeutique tardif**

#### **• Echec clinique tardif**

- ✓ signes de danger ou paludisme grave en présence d'une parasitémie à n'importe quel jour entre le jour 4 et le jour 42 chez des patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce ; et
- ✓ présence d'une parasitémie à n'importe quel jour entre le jour 4 et le jour 42 avec une température axillaire  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  chez des patients qui ne répondaient auparavant à aucun critère d'échec thérapeutique précoce.

#### **❖ Echec parasitologique tardif**

Présence d'une parasitémie entre le jour 7 et le jour 42 avec une température  $< 37,5^{\circ}\text{C}$  chez des patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce ou d'échec clinique tardif.

#### **• Réponse clinique et parasitologique adéquate**

Absence de parasitémie au jour 42 quelle que soit la température axillaire, chez des patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec thérapeutique précoce, d'échec clinique tardif ou d'échec parasitologique tardif.



## **Annexe 4 : Critères du paludisme grave**

## **Critères du paludisme grave**

### **❖ Manifestations cliniques**

- ✓ prostration,
- ✓ troubles de la conscience,
- ✓ détresse respiratoire (acidose respiratoire),
- ✓ crises convulsives,
- ✓ collapsus circulatoire,
- ✓ œdème pulmonaire (radiologique),
- ✓ saignement anormal,
- ✓ ictère (jaunisse),
- ✓ hémoglobinurie.

### **❖ Résultats de laboratoire:**

- ✓ anémie sévère (hémoglobine <5 g/dl, hématocrite <15 %) ;
- ✓ hypoglycémie (glucose sanguin <2,2 mmol/l ou 40 mg/dl) ;
- ✓ transaminase (supérieure à la normale) ;
- ✓ bilirubine totale (supérieure à la normale) ;
- ✓ hyperparasitémie (>4 % chez les patients non immunisés) ;
- ✓ insuffisance rénale (créatininémie et Urée sont supérieures à la normale).

## **Annexe 5 : Publications**

## ARTICLE 1

Therapeutic Efficacy of Artésunate-Amodiaquine and Polymorphism of *Plasmodium falciparum* *k13-Propeller* Gene in Pala (Tchad).

Publié à l'**International Journal of Open Access Clinical (symbiosis Group)**  
**Int J Open Access Clin Trials (2017), 1(1): 1-6.**

# Therapeutic Efficacy of Artesunate-Amodiaquine and Polymorphism of *Plasmodium falciparum* k13-Propeller Gene in Pala (Tchad)

ISSA Mahamat Souleymane<sup>1,2\*</sup>, AKO Aristide Berenger<sup>2</sup>, KERAH Hinzoumbé Clément<sup>1</sup>, DJIMADOUM Mbanga<sup>3</sup>, COULIBALY Baba<sup>2</sup>, MBAITOLOUM Modobé Denis<sup>1</sup>, DJOUMBE Ephraim<sup>1</sup>, TCHONFIENE Passiri<sup>4</sup>, DJIMRASSENGAR Honoré<sup>5</sup>, YAMEOGO V. Jean Marie<sup>5</sup>, BOUZID Samir<sup>6</sup>, RINGWALD Pascal<sup>7</sup>, DOSSO Mireille<sup>8</sup>,

TOURE André Offianan<sup>2</sup>, DJAMAN Allico Joseph<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Chad National Malaria Control Programm (NMCP)

<sup>2</sup>Malariology Unit/ Parasitology and Mycology Department, Institut Pasteur of Côte d'Ivoire

<sup>3</sup>University of N'Djaména, Faculty of Medicine, NCBT

<sup>4</sup>Emergency service of Pala Hospital

<sup>5</sup>WHO / Tchad

<sup>6</sup>PALAT / UNDP

<sup>7</sup>GMP / WHO, Geneva, Switzerland

<sup>8</sup>University of Félix Houphouët-Boigny, Abidjan - Institute Pasteur of Côte d'Ivoire

<sup>9</sup>University of Félix Houphouët-Boigny, Abidjan, Department of Biochemistry- Institute Pasteur of Côte d'Ivoire

Received: August 29, 2017; Accepted: October 16, 2017; Published: October 30, 2017

\*Corresponding author: Issa Mahamat Souleymane, Programme National de Lutte contre le Paludisme au Tchad. mail:issa.mahamatsoul@gmail.com

## Abstract

ACTs was recommended as a first-line treatment for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in many malaria-endemic countries. Regular monitoring of ACTs is recommended by the World Health Organization (WHO) to help early detection of resistant parasite strains and contain their rapid spread. The aim of this study was to assess therapeutic efficacy of Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) the first line treatment of uncomplicated falciparum malaria in Chad and analyze the polymorphism of Kelch13-propeller gene.

A single-arm prospective study of a 28-days follow-up was conducted among children aged 6- 59 months with uncomplicated *P. falciparum* malaria at Pala site from November to December 2015. The primary outcome was ACPR PCR-corrected at day28 and the secondary endpoints were the Parasite Clearance Time (PCT), Fever Clearance Time (FCT) and tolerability of the drug Kelch13-propeller was amplified and sequenced in all *Plasmodium falciparum* isolates.

A total of 58 children were enrolled and 51 reached the study endpoint. Crude Adequate and clinical response was 98% at day 28 and after PCR correction this rate was 100%. Treatment was well tolerated. No mutations neither synonymous nor non synonymous were detected on k13 gene, after alignment with the reference sequence PF3D7\_1343700.

ASAQ was proved to be efficacious and well tolerated in Pala children and no mutation was observed in the Kelch 13-propeller gene. Further studies are needed across the country to enhance resistance surveillance.

**Key Word:** Malaria, *P. falciparum*, Artesunate-Amodiaquine, k13-propeller, Chad

## Introduction

Malaria remains one of the most important public health challenges in the world. Malaria is the leading cause of morbidity and mortality in Africa, particularly in children under 5 years old and pregnant women. Artemisinin-Based Combination Treatments (ACTs) are now the recommended first-line treatments for uncomplicated falciparum malaria worldwide. The worldwide use of ACTs has contributed in recent years to a substantial reduction in deaths related to *falciparum* malaria. Resistance to artemisinin however has emerged in Southeast Asia [1-5].

Monitoring the efficacy of ACTs becomes particularly important in the light of emergence of artemisinin resistance in South-East Asia [6,5]. Artemether-Lumefantrine (AL) and Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) are widely available drugs, which are recommended by most malaria endemic countries in the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria [7]. Chad National Malaria Control Programm (NMCP) recommends, since 2005, ASAQ and AL respectively as first and second line treatments for uncomplicated *P. falciparum* malaria. The World Health Organization recommends a regular assessment of the efficacy of the first- and second-line antimalarial drugs for an early detection and prevention of the spread of resistant parasite populations [8].

*In vivo* therapeutic efficacy study is the gold standard for detecting the emergence and spread of malaria drug resistance.

Discovery of mutations in the *Kelch*-13 propeller region protein in correlation with delayed clearance phenotype is a major advance. Surveillance of artemisinin resistance to date relied on *in vivo* studies to measure early clearance of peripheral parasitaemia by light microscopy and K13 propeller gene mutations. Since the introduction of ACTs in 2004 in Chad, very few studies have been conducted on ACTs efficacy and *Kelch13*-propeller gene [9,20]. The aim of this study was to assess the *in vivo* therapeutic efficacy of Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) and analyze the polymorphism of the *Kelch* 13 propeller gene conferring artemisinin-resistance to *Plasmodium falciparum* the Pala hospital.

## Methods

### Study design

This study was a prospective, one-arm assessment of clinical and tolerability of ASAQ according to WHO guidelines [8]. Follow up was for 28 days. The study was conducted at Pala site country in the Mayo-Kebbi west region (9 ° 21'00 "N; 14 ° 58'00" W) of Chad from November to December 2015.

In the study site malaria transmission occurs from July to December during the raining season. The majority of malaria cases in the area is caused by *P. falciparum*, while *Anopheles gambiaes.s.* and to a lesser extent *Anopheles funestus* are the major vectors. The key malaria control interventions in the district include use of LLNIs, malaria case management with ACTs Intermittent Preventive Treatment during pregnancy (IPTp).

To assess the treatment effect on parasites mutations that modulate treatment response, mutation in k13 propeller gene the molecular marker associated with decrease artemisinin sensitivity were investigated [10,11]. The resistance was investigated by examining polymorphisms in the k13 propeller domain at day 0. The method used was nested PCR protocol followed by Sanger Sequencing using primers specific to *P. falciparum*. The amplicon used for sequencing covered 740 pb which included the k13 propeller domain [12].

### Study population

Children aged from 6 to 59 months presenting to the facility were enrolled if mono-specific *P. falciparum* infestation was confirmed by microscopy with parasite density between 1000 and 200000 asexual parasites /  $\mu$ L of blood and they had fever axillary  $\geq 37.5$  ° C, or history of fever over the last 24 hours. The others inclusion criteria were ability to take oral medications; able to come to come to health facility for follow -up; informed consent of parent or legal guardian. Children with severe malaria symptoms according to the WHO case definition and symptoms of severe malnutrition and chronic diseases or with mixed infection were excluded [8].

### Study treatments

Treatment was three-day oral regimen dosed by weight according to the manufacturer's instructions: ASAQ Winthrop® 5 to <9 kg: one tablet/day of Artesunate (AS) 25 mg/Amodiaquine (AQ) 67.5 mg; 9 to <18 kg: one tablet/day of AS 50 mg/AQ 135 mg; 18 to <36 kg: 1 tablet/ day of AS 100 mg/AQ 270 mg.

Children who vomited during the observation period were retreated with the same dose of medicine and observed for an additional 30 minutes. Children with repeated vomiting were excluded and were treated according National Control Program treatment guidelines and excluded from the study. All children were allowed use of antipyretics.

### Follow-up procedure

Children enrolled in the trial was followed up for 28 days. Children was seen after the day of enrollement (day 0) on days 1, 2, 3, 7, 14, 21 and 28. At each day visit children were clinically examined by a study physician who recorded findings in a Case Report Form (CRF). Parasitaemia (asexual and sexual) was assessed on days 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 and any day within the 28 days follow-up period that the child is brought to the health facility with fever.

Thick and thin blood smears were stained with 5% Giemsa for 30 minutes. Parasitaemia was determined by reading the thick blood smear and counting the number of asexual parasites per 200 White Blood Cells (WBCs), assuming a WBC count of 8000/  $\mu$ l. Slides were considered negative if no parasite was found after reading 100 high-powered fields. Presence of gametocytes was also recorded.

All blood samples were read by two qualified independent microscopist. Slides were quality controlled at the Swiss Tropical Institute and Public Health. Discordance was defined as differences between the first and second microscopist regarding parasite density >50%, species diagnosis or any difference that affected recruitment or study outcome. The first or second reading was taken as final depending on whichever agrees with the third reading.

Filter paper blots were collected at day 0 and at recurrence of parasitaemia for PCR genotyping.

Merozoite surface proteins 1 and 2 (*msp1* & *msp* 2) and Glutamate-Rich Protein (*glurp*) were used to distinguish re-infection and recrudescence.

### Safety

At each follow-up visit, any new or worsening symptom was assessed. An adverse event was defined as any unfavorable and unintended sign, symptom or disease temporally associated with the use on investigational product, not present at day 0, but occurred during follow -up, or was present at day 0 but became worse during follow-up. Serious adverse event was defined as any event that resulted in patient hospitalization, death, life-threatening experience, persistent /significant disability or specific medical surgical intervention to prevent serious outcome.

### Outcomes

Treatments outcomes were classified based on clinically and parasitological outcomes assessment as recommended by WHO [8]. Therapeutic responses on day 28 were classified as either Adequate Clinical And Parasitological Response (ACPR), or Treatment Failure (TF) designated as Early Treatment Failure

(ETF), Late Clinical Failure (LCF), or Late Parasitological Failure (LPF). The primary outcome endpoint was ACPR, corrected for re-infection using PCR genotyping at day 28.

### DNA extraction and PCR

The parasite DNA was extracted from the blood sampled on filter paper on D0 and at failure by a Qiagen DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The k13 gene and msp2 were amplified by a Polymerase Chain Reaction (PCR). For Pfk13 gene, amplified PCR products were sent to GENEWIZ in UK for Sanger sequencing. Subsequent analysis of delivered sequences was executed in comparison with the PF3D7\_1343700 sequence. The following codon positions were checked for mutations [10,11].

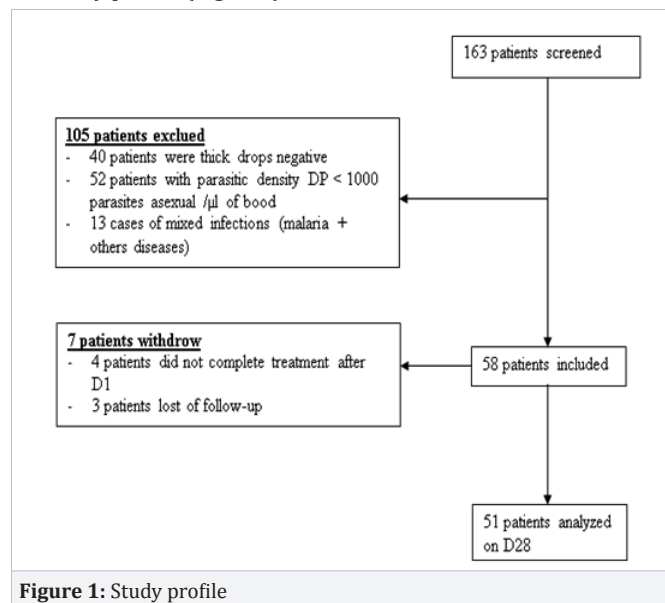
### Statistical analysis

Data management and analysis were completed with Epi Info 6.0.4 adapted to the Who excel-based applications [7]. BioEdit was used for sequences analysis and GraphPad Prism 5 (one way ANOVA test) was used to compare the 3 mean temperatures from Day 0 to Day 2.

## Results

### Profile of Study Patients

During the study period from November to December 2015, 163 patients were examined for uncompleted malaria at the Urban Health Center in Pala. Among them, 58 were randomized and 105 were excluded from the study for the reasons detailed on the study profile (Figure 1).



**Figure 1:** Study profile

### Characteristics of the study

Of the 58 randomized patients, 32 (30.5%) were female and 26 (24.8%) were male, with a sex ratio of 0.81; Mean age (ds) 2.9 (1.3%), average weight (ds) 13.2 (3.6%), average temperature (ds) 38 (0.9%) and mean parasite density of 3.840 asexual parasites/µL on the day of enrolment (Table 1).

Parameters	Items
Screened	163
Included n (%)	58 (35.6 %)
Male n (%)	26 (44.8 %)
Female n (%)	32 (55.2 %)
Sex ratio	0.81
59 months n (%)	8 (13.8 %)
< 59 months n (%)	50 (86.2 %)
Mean age (± SD) years	2.9 (±1.3)
Age (min - max) years	0.7 - 5
Mean weight (± SD) kg	13.2 (± 3.6)
Weight (min - max) kg	5 - 21
Mean axillary temperature (± SD) ° C	38 (± 0.9)
Axillary temperature (min - max) ° C	36.2 - 40.3
Mean parasitemia (asexual parasites / µL)	3840
Parasitemia (min - max) asexual parasites / µL	1.040 - 20.000

### Therapeutic efficacy

A total of 58 patients were included and 51 patients were analyzed per protocol. Prior to PCR correction, 50 patients were ACPR that is 98. % treatment success with only one (2.0 %) Late Clinical Failure. After PCR correction, the failure reported on Day 28 was in fact a re-infestation. Thus, all treated patients were 100 % ACPR on Days 28 (Table 2).

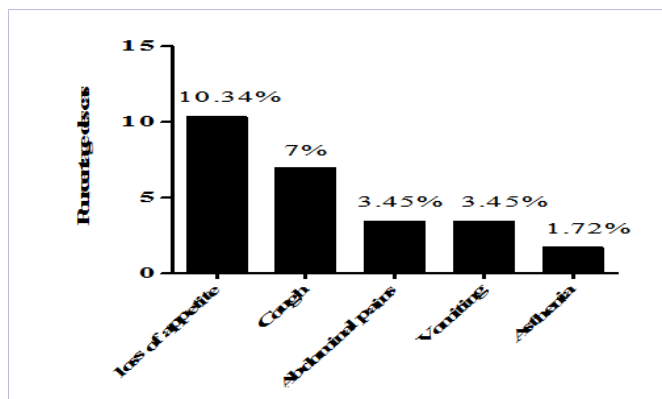
	Per-protocol analysis
Patients screened at D28	51 (87.9%)
Late clinical failure	1 (2%)
Adequate Clinical and Parasitological Response at D28	50 (98%)
Adequate Clinical and Parasitological Response at D28 after PCR	51 (100%)

### Fever and parasites clearance time

Fever decreased very significantly during treatment period, from day 0 to day 2. On the day of enrollment, axillary temperature run from a minimum of 36.2 ° C (history of fever) to a maximum of 38 ° C (Table 1).

### Tolerability and safety

A predominance of loss of appetite (10.3%) followed by cough (7%) abdominal pain and vomiting (3.5%) were reported (Figure 2). No deaths and no cases of severe malaria were seen during the study. All adverse events observed were mild (Figure 2).



**Figure 2:** Adverse events

### Polymorphism of the K13-propeller gene

The K13-propeller gene was amplified and sequenced in 58 isolates of *P. falciparum*. After alignment with the reference sequence PF3D7\_1343700, all were of the wild type, without detectable polymorphism.

### Discussion

Malaria remains a major public health problem in developing countries. Prompt access to effective antimalarial treatment such as Artemisinin Based-Combination Therapies (ACT) proves to be an essential tool for controlling the disease. In this study, ASAQ was proved to be effective treatment for uncomplicated falciparum malaria, as evidenced by a PCR-corrected parasitological efficacy of 100 %.The present study was conducted to provide supporting evidence for the clinical efficacy of ASAQ, which was adopted and implemented with AL as anti-malarial drug policy in Chad since 2005. The efficacy assessment of ACT has also shown a high efficacy level of ASAQ in neighboring countries of Chad. In Nigeria, a bordering country of Chad, Oguiche et al, found a polymerase chain reaction-corrected parasitologic cure rates on Day 28 of 98.3% with ASAQ [11]. In the same country a ACPR-corrected results on day 28 was 95.8% has been observed with ASAQ during a study conducted by Falade et al, [13]. In Central African Republic, another bordering country, a 28-day therapeutic efficacy study of ASAQ conducted by Djalle et al, in Bangui indicated 93% of ACPR-corrected at day 28 [14]. It seemed that ASAQ is more efficacious in Chad than in Central African Republic potentially due to drug pressure higher in this country. Some studies conducted elsewhere in Africa showed good efficacy of ASAQ [11,15,16,17].In addition to high cure rates, rapid PCT and FCT have been observed with the drug. Although numerous studies carried out in malaria endemic countries had shown good efficacy and safety of ACT for the treatment of uncomplicated malaria, the conditions of clinical trials do not fully reflect real field situation. Results from studies conducted with unsupervised malaria treatment showed low cure rate after adjustment by day 28 [16,18,19,23].ASAQ was well-tolerated, similar to many other studies with AEs mostly mild and not linked to the administrated treatment [20,17,11].Safety and tolerability monitoring of ASAQ and other forms of ACT should continue in a standardized manner. Unfortunately pharmacovigilance networks are not

implemented in most settings where ACT is routinely used. This therapeutic efficacy study had several limitations. First this study of drug efficacy have limited follow-up to 28 days, the minimum recommended by WHO, and thus only the short-term effectiveness has been assessed [24]. Any additional recurrences beyond this time frame were not captured (42 days). Secondly drug levels were not tested and challenge of getting reliable safety recall information from children our study population. The results of this study demonstrate that ASAQ remain efficacious treatments for uncomplicated *P. falciparum* malaria in Chad. There is no evidence at this time that a change in regimens is warranted. However, continued monitoring of drug efficacy, following WHO recommendations, is needed. In the bulk of the sub-Saharan African countries, malaria drug policies relay mostly on the use of the artemisinin combination drugs treatment. To avoid the pitfall known with chloroquine and to preserve as long as possible the effectiveness of these ACTs, a better understanding of the underlying mechanisms associated with resistance or loss of susceptibility to these combinations is necessary to ensure an optimal use [14]. Thus, in the present study, the DNA of 58 isolates of *P. falciparum* was analyzed to check mutations associated with resistance to the ACTs. As previously reported and in line with some previous work implemented within sub-Saharan Africa, no parasite of the analyzed sample harbored any mutation neither synonymous nor non-synonymous. This result is in conformity with the clinical data with no records of any therapeutic failure. Our result is similar to that reported in Benin and India where the analysis of *Kelch* 13-propeller sequences indicated that all isolates were of wild type [20-22]. All were no synonymous mutations [25]. The absence of mutation in the gene k13-propeller in our study could explain the sensitivity of the parasite to ASAQ. However, the results of our study could not be inferred to the whole country, even to the Western Mayo-Kebbi region, since only one Pala site hosted the study. The geographical and epidemiologic settings within this Western Mayo-Kebbi region differed from one point to another. Thus, additional studies are needed in order to increase samples size for robust analysis and relevant resistant data from Chad.

### Conclusion

Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) has been shown to be safe and highly effective in the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria for children in Pala. No evidence of the emergence of artemisinin resistance in Tchad was found upon investigation of mutations in the k13 propeller domain. However, additional clinical and molecular studies need to be performed in different parts of the country to provide clear and relevant data related to drug resistance in Chad.

### Acknowledgements

This study was supported financilay by the Bill & Melinda Gates Foundation through WHO and implemented by the NPME with the support of the Minister of health.



## Conflict of interest

The authors state that there is no conflict of interest.

DH and PR are staff members of the World Health Organization. DH and PR alone are responsible for the views expressed in this publication and they do not necessarily represent the decisions, policy or views of the World Health Organization.

## Ethics

The procedures followed were in accordance with the ethical standards of Helsinki Declaration. Consent form was signed by parent or legal guardian of children included in the study.

Approval was given by the Ministry of Public Health under ethical clearance N° 2192/PR/PM/MSP/SE/SG/DGAS/DSPELM/DMTNT/PNLP/15 and by WHO ERC.

## Abbreviations

ASAQ: Artesunate-Amodiaquine; SP: Sulfadoxine-Pyrimethamine; AL: Artemether-Lumefantrine; TBS: Thick Blood Smear; NPME: National Program For Malaria Eradication In Chad; MPH: Ministry Of Public Health; DS: Sanitary District; SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms; IPCI: Institut Pasteur Of Côte d'Ivoire; NCBT: National Center For Blood Transfusion; WHO: World Health Organization; PALAT: Support Project For Malaria Control In Chad; UNDP: United Nations Development Program; GMP: Global Malaria Program; ACT: Artemisinin-Based Combination Therapy; ACPR: Adequate Clinical And Parasitological Response; LPF: Late Parasitological Failure; LCF: Late Clinical Failure; ETF: Early Therapeutic Failure; LPV: Lost Patient View; PRS: Patient Removed From Study; MPD: Mean Parasite Density; DP: Parasite Density; CI: Confidence Index; Ds: Standard Deviation.

## References

- Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D and Fukuda MM. Evidence of artemisinin resistance in western Cambodia. *N Engl J Med*. 2008;359(24):2619–2620. doi:10.1056/NEJMc0805011
- Noedl H, Se Y, Sriwichai S, Schaefer K, Teja-Isavatharm P, Smith B. Artemisinin resistance in Cambodia: a clinical trial designed to address an emerging problem in Southeast Asia. *Clin Infect Dis*. 2010;51(11):82–89. doi:10.1086/657120
- Carrara VI, Zwang J, Ashley EA, Price RN, Stepniewska K, Barends M, et al. Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment. *PLoS One*. 2009;4(2):e4511. doi:10.1371/journal.pone.0004551
- Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, et al. Pfm-dr1 copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia. *Malar J*. 2009;8(11). doi:10.1186/1475-2875-8-11.
- Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*. 2012;379(9830):1960–1966. doi:10.1016/S0140-6736(12)60484-X
- Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014;505(7481):50–55. doi:10.1038/nature12876.
- Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2014;371:411–423. doi:10.1056/NEJMoa1314981
- WHO. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva: World Health Organization. 2009:85
- Chatterie M, Ganguly S, Saha P, Bankura B, Basu N, Das M, et al. No polymorphism in *Plasmodium falciparum* K13 propeller gene in clinical isolates from Kolkata, India. *J Pathog*. 2015;2015(374354). doi:10.1155/2015/374354
- WHO. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring: 1996–2004. Geneva: World Health Organisation. 2005;133.WHO/HTM/MAL/.1103
- Oguche S, Okafor HU, Watila I, Meremikwu M, Agomo P, Ogala W, et al. Efficacy of artemisinin-based combination treatments of uncomplicated falciparum malaria in under-five year-old Nigerian children. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91(5):925–935. doi:10.4269/ajtmh.13-0248
- Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2013;505(7481):50–55. doi:10.1038/nature12876
- Falade CO, Dada-Adegbola HO, Ogunkunle OO, Oguike MC, Nash O, Ademowo OG. Evaluation of the comparative efficacy and safety of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine and artesunate-amodiaquine-chlorpheniramine (Artemoclo™) for the treatment of acute uncomplicated malaria in Nigerian children. *Med Princ Pract*. 2014;23(3):204–211. doi:10.1159/000360578
- Djallé D, Njuimo SP, Manirakiza A, Laganier A, Le Faou A and Rogier. Efficacy and safety of artemether + lumefantrine, artesunate + sulphamethoxypyrazine-pyrimethamine and artesunate + amodiaquine and sulphadoxinepyrimethamine + amodiaquine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Bangui, Central African Republic: a randomized trial. *Malaria Journal*. 2014;13:9. doi:10.1186/1475-2875-13-9
- Sondo P, Derra K, Diallo-Nakanabo S, Tarnagda Z, Zampa O, Kazienga A, et al. Effectiveness and safety of artemether-lumefantrine versus artesunate-amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated falciparum malaria in patients of all age groups in Nanoro, Burkina Faso: a randomized open label trial. *Malaria Journal*. 2015;14:325. doi:10.1186/s12936-015-0843-8
- Tinto H, Diallo S, Zongo I, Guiraud I, Valea I, Kazienga A, et al. Effectiveness of artesunate-amodiaquine vs. artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Nanoro, Burkina Faso: a noninferiority randomized trial. *Trop Med Int Health*. 2014;19(4):469–475. doi:10.1111/tmi.12274
- Lise MUSSET. Contribution à l'étude de la résistance *Plasmodium falciparum* à l'atovaquone-proguanil. 2006.
- Sowunmi A, Akano K, Ntadom G, Ayede AI, Ibironke FO, Aderoyeje T, et al. Therapeutic efficacy and effects of artemisinin-based combination treatments on uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria-associated anaemia in Nigerian children during seven years of adoption as first-line treatments. *Infectious Diseases of Poverty*. 2017;6:36.

19. Zenglei W, Sony S, Xiaolian L, Jun M, Lili Y, Mynthia C, et al. Prevalence of K13-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* from China-Myanmar border in 2007–2012. *Malaria Journal*. 2015;14:168. doi:10.1186/s12936-015-0672-9
20. Aurore O, Georgia D, Awa BD, Nicaise TN, Constance A, Didier T, et al. Lack of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* in northwest Benin after 10 years of use of artemisinin-based combination therapy. *Parasite*. 2016;23:28. doi:10.1051/parasite/2016028
21. WHO/Communicable diseases cluster. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94:51–90
22. World Health Organization. Status report on artemisinin and ACT resistance. Geneva: World Health Organization 2015.
23. Offianan A Toure, Serge B Assi, Tiacoh L N'Guessan, Gbessi E Adji, Aristide B Ako, Marie J Brou, et al. Open-label, randomized, non-inferiority clinical trial of artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine fixed-dose combinations in children and adults with uncomplicated falciparum malaria in Côte d'Ivoire. *Malaria Journal*. 2014;13:439. doi:10.1186/1475-2875-13-439
24. WHO. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva: World Health Organization. 2009;85.
25. Ménard D, Khim J, Beghain AA, Adegnik M, Shafiul-Alam O, Amodu G, et al. : A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms, for the KARMA Consortium. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(25):2453-2464. doi:10.1056/NEJMoa1513137

## ARTICLE 2

Prevalence of Sulfadoxine–pyriméthamine resistance-associated mutations in dhfr and dhps gene of Plasmodium falciparum isolates collected in Pala west region of Chad.

Publié à **African Journal of Parasitology Research (International Scholars Journals)** (2018), 5 (1), pp. 271-277

Full Length Research Paper

# Prevalence of Sulfadoxine–pyrimethamine resistance-associated mutations in *dhfr* and *dhps* gene of *Plasmodium falciparum* isolates collected in Pala west region of Chad

ISSA Mahamat Souleymane<sup>1\*</sup>, Offianan Andre TOURE<sup>2</sup>, DJIMADOUM Mbanga<sup>3</sup>, KERAH Hinzoumbé Clément<sup>1</sup>, AKO Aristide Berenger<sup>2</sup>, COULIBALY Baba<sup>2</sup>, MBAITOLOUM Modobé Denis<sup>1</sup>, DJOUMBE Ephraïm<sup>1</sup>, TCHONFIENE Passiri<sup>4</sup>, DJIMRASSENGAR Honoré<sup>5</sup>, V. YAMEOGO Jean Marie<sup>5</sup>, BOUZID Samir<sup>6</sup>, RINGWALD Pascal<sup>7</sup>, DOSSO Mireille<sup>8</sup>, DJAMAN Allico Joséph<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Chad National Malaria Control Programme (NMCP); <sup>2</sup>Malariology Unit/ Parasitology and Mycology Department, Institut Pasteur of Côte d'Ivoire; <sup>3</sup>University of N'Djaména, Faculty of Medicine, NCBT; <sup>4</sup>Emergency service of Pala Hospital; <sup>5</sup>WHO / Chad; <sup>6</sup>PALAT / UNDP; <sup>7</sup>GMP / WHO, Geneva, Switzerland; <sup>8</sup>University of Félix Houphouët Boigny, Abidjan - Institute Pastor of Côte d'Ivoire; <sup>9</sup>University of Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Department of Biochemistry- Institut Pasteur of Côte d'Ivoire.

Accepted 20 December, 2017

Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP) is the recommended drug for Intermittent Preventive Therapy (IPT) in pregnant women in Chad since 2005. There are few published reports of mutations in dihydropteroate synthetase (*dhps*) and dihydrofolate reductase (*dhfr*) genes in *P.falciparum* populations in Chad. This study was assessed to determine prevalence of *dhfr* and *dhps* polymorphisms in *P. falciparum* isolates collected in Pala west region of Chad. *P. falciparum* isolates were collected from children under five years with a confirmed diagnosis of malaria at Pala hospital in the western region of Chad. The parasite DNA was extracted from the blood sampled on Whatman® filter paper by the Qiagen DNA Mini Kit method (Qiagen, Valencia.CA) according to the manufacturer's instructions. *dhfr* and *dhps* gene were amplified using nested PCR and subsequently sequenced. A total of 30 isolates were sequenced and analyzed. The prevalence of the Asn-51-Ile, Cys-59-Arg and Ser-108-Asn mutations of the *dhfr* gene were 23.3 %, 30% and 33.3%, respectively. The mutations Ala-16-Val, Ile-16-Leu and Ser-108-Thr were not detected. Ser-436-Ala, Ala-437-Gly mutations of the *dhps* gene were found in 23.3% and 16.7%. Lys-540-Glu, Ala-581-Gly, Ala-613-Ser mutations and Phe-436 codon were not observed. The wild type *dhfr* and *dhps* isolates represented 53.3% and 66.7% of the analyzed sequences. The triple mutant *dhfr* and double mutant *dhps* were respectively 3.33% and 6.7%. This study provide baseline prevalence *dhfr* and *dhps* polymorphisms in Chad. Deployment of SP for IPTp should be encouraged in Chad, and the corresponding resistance markers be regularly monitored.

**Key words:** Malaria, Sulfadoxine-Pyriméthamine, Pala/Chad.

## INTRODUCTION

Malaria remains an important cause of morbidity and

mortality worldwide, in particular in sub-Saharan Africa (WHO, 2016). Children under five years of age and pregnant women, are more at risk of developing clinical malaria.

The World Health Organization (WHO) currently recommends

IPTp with Sulfadoxine-pyrimethamine (IPTp- SP) in areas with moderate to high malaria transmission in Africa at each scheduled antenatal care (ANC) visit, starting as early as possible in the second trimester until the time of delivery, with doses given at least 1 month apart, so that women receive at least three doses of SP during pregnancy (WHO, 2014). This recommendation has been adopted and implemented in Chad since 2005.

Important progress in the control of malaria in pregnancy has been made by vector control with long-lasting insecticide-treated bednets (LLIN) and the use of intermittent preventive treatment during pregnancy (IPTp) in areas with moderate to high malaria transmission. However, growing resistance to SP threatens the effectiveness of IPTp-SP (Nnaemeka et al., 2012; Mockehaupt et al., 2008). Accumulation of mutations in dihydrofolate reductase (*dhfr*) and dihydropteroate synthetase (*dhps*) is strongly associated with sulfadoxine-pyrimethamine (SP) treatment failure. Mutations in *dhfr* confer resistance to pyrimethamine while mutations in *dhps* confer resistance to sulphadoxine and other sulpha drugs. There are variations in SP mutations. The presence of three mutations in the *dhfr* gene (codons 51, 59, and 108) and two mutations in the *dhps* gene (codons 437 and 540), together referred to as the “quintuple mutation,” has been strongly associated with potential resistance in sub-Saharan Africa (Bwijo et al., 2003; Roper et al., 2003).

In Africa, previous studies showed high frequencies of mutations to confer resistance to SP (Anthony et al., 2015; Elena et al., 2015; Naomi et al., 2015). Data related to mutations in dihydropteroate synthetase (*dhps*) and dihydrofolate reductase (*dhfr*) genes in *P. falciparum* populations in Chad are lacking. The prevalence of Sulfadoxine-pyrimethamine resistance-associated mutations in *dhfr* and *dhps* gene in parasite populations in Chad is currently unknown. The present study investigated the prevalence of relevant *dhfr* and *dhps* gene polymorphisms in parasite isolates from the western region of Chad in order to fill the gap in SP resistance surveillance data in Chad. Results from this study will enable the MPH and malaria control institutions to have a database SP for the first time.

## METHODS

### Study area, subjects and sample collection

Samples were collected at regional hospital of Pala from November to December 2015. Pala is located in the south of the country in the Mayo-Kebbi West Region (9 ° 21'00 "N; 14°58"W 00). Malaria prevalence reaches 43.8% in this region.

In the study site, malaria transmission occurs from July to December during the raining season. The majority of malaria cases in the area is caused by *P. falciparum*, while *Anopheles gambiaes.s.* and to a lesser extent *Anopheles funestus* are the major vectors. The key malaria control interventions in the district include the use of LLNIs, malaria case management with ACTs and IPTp-SP.

### Samples collection

Samples were collected from children coming for visit at the Hospital with signs and symptoms of malaria microscopically confirmed. Three drops of 50 µL of blood were collected onto a Whatman® 3 MM filter paper on the day of visit (D0), after obtaining a written informed consent from children parents or legal guardians. The collected blood was dried at room temperature and then put into a zipped pouch containing silicate desiccant to keep sample away from moisture. Samples were sent to Institut Pasteur of Côte d'Ivoire for molecular biology analyses.

### DNA isolation and PCR amplifications

Parasite genomic DNA was isolated from the DBS (dot blood samples) with Qiagen DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia.CA) according to the manufacturer's instructions. The procedure included three steps. Briefly, for the first steporlysis step, a volume of 180µl of ATL buffer and 20 µL of proteinase K were added to the sample already put into a 1.5 µL Tube. The tube was then placed onto a heating block at 56 ° C for one hour at 900 rpm. A volume of 200 µL of AL buffer was added to the tube which was heated at 70 ° C for 10 min at 900 rpm. During the washing step, 500 µL Buffer AW1 were added, and centrifuged at 8000 rpm for 1 min. A volume of 500 µL of Buffer AW2 was then added and centrifuged at 8000 rpm for 1 min. The tube was centrifuged at high speed (14.000 rpm) for 3 min. In the last step, a volume of 20 µL of AE Buffer were added. The tube was incubated at 15-25 ° C for 1 min and then centrifuged at high speed (14.000 rpm) for another 1 min in order to collect the DNA. The extracted DNA was stored at -20 ° C.

For the *dhfr* gene to be amplified by nested-PCR, an aliquot of 3 µL of DNA extract was added to a 22 µL master mix comprising, for the first round, 12 µL of pure water (Promega), 2.5 µL of 10 µM primers (M1:5'-TTTATGATGGAACAAGTCTGC-3' and M7: 3'-CTAGTATATACATCGCTAACA-5'), 5 µL of Master Mix (Solis Biodyne, Letonie). For the second round of amplification, 2 µL of PCR product was added to a 48 µL mix, that is 28 µL of pure water (Promega), 5 µL of each primer (10 µM), 10 µL of Master Mix (Solis Biodyne,

Letonie). Here, the primers used were the following M9: 5'-CTGGAAAAAATACATCACATTCATATG-3' and M3: 3'-TGATGGAACAAGTCTGCGACGTT-5') both of the PCR rounds were performed according to the following program: 95°C for 5 min; 35 times the cycle of 95°C for 40 sec, 45°C for 40 sec, 72°C for 1 min. The final extension was run at 72°C for 10 min. Amplification solution was conducted likewise for *dhps* gene, except for the first round primers (N1: 5'-GATTCTTTTTTCAGATGGAGG-3' and N2: 3'-TTCCTCATGTAATTCATCTGA-5') and for the second round primers (R2: 5'-AACCTAAACGTGCTGTTCAA-3'; R/: 3'-AATTGTGTGATTTGTCCACAA-5'). The first and second PCR rounds were programmed with 95°C (5 min); 35 cycles of 95°C (40 sec), 56°C (40 sec), and 72°C (2 min); and final extension at 72°C (15 min). A 1.5 % agarose gel was prepared and an electrophoresis was run to check for a 594 bp fragment length for *dhfr* gene, or a 771 bp fragment length corresponding to *dhps* gene.

### Sequencing and alignment

Nested-PCR products were sent to GENEWIZ (United Kingdom) for Sanger sequencing. Fasta and ab1 files were received back and underwent quality control before alignment with BioEdit v. 7.0.9.1 against the corresponding reference sequences of *P. falciparum* 3D7 (PlasmoDB : PF3D7\_0417200 pour *dhfr*; PF3D7\_0810800 pour *dhps*).

### Ethics

The procedures followed were in accordance with the ethical standards of Helsinki Declaration. Consent form was signed by parent or legal guardian of children included in the study.

Approval was given by the Ministry of Public Health under ethical clearance N° 2192/PR/PM/MSP/SE/SG/DGAS/DSPELM/DMTNT/PNL P/15 and by WHO ERC.

### RESULTS

Table 1 indicates that, overall, the frequencies of wild alleles predominate over the frequency of mutant alleles. These values are two-fold, the frequencies of wild-type alleles at the *dhfr* gene 70% (for Cys-59) and 66.7% (for Ser-108) against Asn-108 (33.3%) and Arg-59 (30%) for key mutations related to resistance to Pyrimethamine from *P. falciparum*. Similarly, for the *dhps* gene, the frequencies of the wild-type alleles Ser-436 (76.7%) and Ala-437 (83.3%) predominated over those of the Ala-436 alleles (23.3 %) and Gly-437 (16.7 %) (Table 1).

Seven (7) genotypes were identified, including the wild type (N<sub>51</sub>C<sub>59</sub>S<sub>108</sub>) of 53.3% (16/30) and the triple mutant (I<sub>51</sub>R<sub>59</sub>N<sub>108</sub>) with a frequency of 3.3% (1/30). The results indicate that the triple mutant genotype is rare. At the level of the *dhps* gene, among the 4 genotypes found, the double *dhps* mutants (A<sub>436</sub>G<sub>437</sub>) was represented at 6.7% (2/30) while the wild type genotype (S<sub>436</sub>A<sub>437</sub>) have a predominant frequency of 66.7%. (Table 2).

In this section, a haplotype is defined as a combination of genotypes across the two genes. Thus, twelve haplotypic combinations were described, with the combinations I<sub>51</sub>R<sub>59</sub>N<sub>108</sub> / A<sub>436</sub>A<sub>437</sub> represented at 3.3%, i.e. 1 over (N<sub>51</sub>C<sub>59</sub>S<sub>108</sub> / S<sub>436</sub>A<sub>437</sub>) having a frequency of 33.3% (i.e. 10/30). Moreover, this latter frequency also corresponds to the cumulative frequencies of all the genotypes carrying two mutations (Table 3).

### DISCUSSION

The Chadian national malaria policy recommends the use of the SP in IPTp with the goal of reducing maternal and infant mortality. In fact, the SP IPTp strategy was evidenced to protect pregnant women against malaria with benefits consisting in reduced LBW, abortion, premature birth, perinatal death, and maternal mortality (Menendez et al., 2010; WHO-MPA, 2012). The strategy consists in a free administration of three doses of SP to any pregnant women in visit for antenatal care during the second and the third trimester of pregnancy. Unfortunately, this strategy covers a very low rate, 15.3% in TPIp1 and 13.6% in IPTp2, and no information for the IPTp3. This coverage is quite insufficient and irregular to decide the use SP by medical districts. This result does not correlate with the objectives of the strategic plan 2006 - 2018 to fight against malaria in Chad which recommended a cover rate of 80% for SP (Anonymous, 2014). More, SP resistance is reported to continuously increase and subsequently reduce protection in areas where SP resistance is high (Gosling et al., 2009; Griffin et al., 2010; Harrington et al., 2011).

This study conducted in Pala where SP is used for IPTp demonstrated low prevalence of *dhfr* and *dhps* resistance mutations.

Considering polymorphisms in *dhfr* gene, codon ser108asn is likely to play a key role in pyrimethamine resistance; with mutations at Ile-51, Arg-59 and Leu-164 modulating the level of resistance (Plowe et al., 1997; Tsumori et al, 2011). The present study indicates a predominance of wild-type alleles Ser-108 (76.7%), Cys-59 (70%) and Asn-51 (76.7 %). The *dhfr* triple mutation Ile-51, Arg-59, Asn-108 was shown to be associated with SP treatment failure, regardless *pfdhps* genotype. Here, we report a low level of parasites with the triple mutant genotype I<sub>51</sub>R<sub>59</sub>N<sub>108</sub>(3.33%) compared to the wild type

**Table 1.** Frequency of mutant alleles of the *pfdhfr* and *pfdhps* genes.

gènes	Mutations	Alleles	Frequencies (%)
<i>pfdhfr</i>	Asn-51-Ile	<b>Ile</b>	7/30 (23.3)
		Asn	23/0 (76.7)
	Cys-59-Arg	<b>Arg</b>	9/30 (30)
		Cys	21/30 (70)
	Ser-108-Asn	<b>Asn</b>	10/30 (33.3)
		Ser	20/30 (66.7)
<i>pfdhps</i>	Ser-436-Ala	<b>Ala</b>	7/30 (23.3)
		Ser	23/30 (76.7)
	Ala-437-Gly	<b>Gly</b>	5/30 (16.7)
		Ala	25/30 (83.3)

**Table 2.** Prevalence of mutant genotypes of the *pfdhfr* and *pfdhps* genes.

Genes	Mutations	Genotypes	Frequency (%)
<i>dhfr</i> (N=30)	Sauvage	N <sub>51</sub> C <sub>59</sub> S <sub>108</sub>	16 (53,33)
	Simple mutant	<b>I</b> <sub>51</sub> C <sub>59</sub> S <sub>108</sub>	1 (3,33)
		N <sub>51</sub> C <sub>59</sub> <b>N</b> <sub>108</sub>	2 (7)
	Double mutant	<b>I</b> <sub>51</sub> C <sub>59</sub> <b>N</b> <sub>108</sub>	2 (7)
		<b>I</b> <sub>51</sub> <b>R</b> <sub>59</sub> S <sub>108</sub>	3 (10)
		N <sub>51</sub> <b>R</b> <sub>59</sub> <b>N</b> <sub>108</sub>	5 (17)
	Triple mutant	<b>I</b> <sub>51</sub> <b>R</b> <sub>59</sub> <b>N</b> <sub>108</sub>	1 (3,33)
<i>dhps</i> (N=30)	Sauvage	S <sub>436</sub> A <sub>437</sub>	20 (66,7)
	Simple mutant	S <sub>436</sub> <b>G</b> <sub>437</sub>	3 (10)
		<b>A</b> <sub>436</sub> A <sub>437</sub>	5 (16,7)
	Double mutant	<b>A</b> <sub>436</sub> <b>G</b> <sub>437</sub>	2 (6,7)

N<sub>51</sub>C<sub>59</sub>S<sub>108</sub> (53.3%). This low prevalence of the triple *dhfr* indicates that in Pala SP continue to be efficient and should be kept for IPTp. At first sight, the low prevalence of the triple *dhfr* mutation seems surprising since SP was

accessible more than a decade ago in Chad. This may suggest a low level of SP pressure favored by an access to ACT treatment. However, studies related to SP resistance conducted in neighboring Republic of Congo

**Table 3.** Combination of the *pfdhfr* and *pfdhps* genotypes.

Number of mutations	Genotype <i>dhfr/dhps</i>	N=30	frequency (%)
4	I <sub>51</sub> R <sub>59</sub> N <sub>108</sub> /A <sub>436</sub> A <sub>437</sub>	1	3.3
3	I <sub>51</sub> R <sub>59</sub> S <sub>108</sub> /A <sub>436</sub> G <sub>437</sub>	1	3.3
3	N <sub>51</sub> R <sub>59</sub> N <sub>108</sub> /S <sub>436</sub> G <sub>437</sub>	1	3.3
2	I <sub>51</sub> C <sub>59</sub> N <sub>108</sub> /S <sub>436</sub> A <sub>437</sub>	2	6.7
2	I <sub>51</sub> C <sub>59</sub> S <sub>108</sub> /S <sub>436</sub> G <sub>437</sub>	1	3.3
2	I <sub>51</sub> R <sub>59</sub> S <sub>108</sub> /S <sub>436</sub> A <sub>437</sub>	2	6.7
2	N <sub>51</sub> R <sub>59</sub> N <sub>108</sub> /S <sub>436</sub> A <sub>437</sub>	4	13.3
2	N <sub>51</sub> C <sub>59</sub> S <sub>108</sub> /A <sub>436</sub> G <sub>437</sub>	1	3.3
1	N <sub>51</sub> C <sub>59</sub> S <sub>108</sub> /S <sub>436</sub> G <sub>437</sub>	1	3.3
1	N <sub>51</sub> C <sub>59</sub> N <sub>108</sub> /S <sub>436</sub> A <sub>437</sub>	2	6.7
0	N <sub>51</sub> C <sub>59</sub> S <sub>108</sub> /S <sub>436</sub> A <sub>437</sub>	10	33.3
0	N <sub>51</sub> C <sub>59</sub> S <sub>108</sub> /A <sub>436</sub> A <sub>437</sub>	4	13.3

(Nsimba et al., 2005; Ndounga et al., 2007; Koukouikila-Koussounda et al., 2015; Tsumori et al., 2011) showed high frequencies of *dhfr* point mutations at codons 51, 59 and 108 while the mutation at codon 164 was absent.

Analysis of the polymorphisms in *dhps* also showed low prevalence of the mutation at codon 437 and 436. The low frequency of double mutant **AG** (6.7%) could result from a low drug pressure to sulfadoxine. No isolate have the *dhps* double mutation at position 437 and 540, commonly associated with sulfadoxine resistance (Plowe et al., 2004; Kublin et al., 2002). The 437 mutation, which usually occurs first in the progressive selection of resistant parasites was observed in 3 isolates (10%). Such mutation, alone or combined with the K540E, has been associated with treatment failure with SP (Pearce et al., 2009). Nevertheless, in Pala, the A437G prevalence was low compared to that found in Nigeria (Oguike et al., 2016) a bordering country of Chad.

In addition, the wild-type allele of the *pfdhps* / *pfdhfr* combination, i.e genotype N<sub>51</sub>C<sub>59</sub>S<sub>108</sub>/S<sub>436</sub>A<sub>437</sub>, was pre-dominant in the study population. Quintuple mutations

I51R59N108 / A<sub>436</sub>G<sub>437</sub> were not observed.

In high-resistance countries, the triple mutant *dhfr* and double mutant *dhps* genotype were observed at high prevalence, leading to the withdrawal of SP (Elifaged et al., 2013; Jeremiah et al., 2017; Esmée et al., 2017).

## CONCLUSION

This study showed higher prevalence of susceptible parasites than those harboring mutations in the study area. However, further studies are needed to strengthen these data. Thus, the deployment of SP for IPTp should be encouraged, and the corresponding resistance markers be regularly monitored.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported financially by the Bill & Melinda Gates Foundation through WHO and implemented by the NPME with the support of the Minister of health.



## Conflict of interest

The authors state that there is no conflict of interest. DH and PR are staff members of the World Health Organization. DH and PR alone are responsible for the views expressed in this publication and they do not necessarily represent the decisions, policy or views of the World Health Organization.

## ABBREVIATIONS

ASAQ: Artesunate-Amodiaquine; SP: Sulfadoxine-Pyrimethamine; AL: Artemether-lumefantrine; TBS: Thick blood smear ; NPME: National Program for Malaria Eradication in Chad; MPH: Ministry of Public Health; DS: Sanitary District; SNPs: Single nucleotide polymorphisms; IPCI: Institut Pasteur of Côte d'Ivoire; NCBT: National Center for Blood Transfusion; WHO: World Health Organization; PALAT: Support Project for Malaria Control in Chad; UNDP: United Nations Development Program; GMP: Global Malaria Program; ACT: Artemisinin-based Combination Therapy; ACPR: Adequate Clinical and Parasitological Response; LPF: Late Parasitological Failure; LCF: Late Clinical Failure; ETF: Early Therapeutic Failure; LPV: Lost Patient View; PRS: Patient Removed from Study; MPD: Mean Parasite Density; DP: Parasite Density; CI: Confidence Index; Ds: standard deviation.

## REFERENCE

Anonymous, (2014). Plan Stratégique National de lutte contre le paludisme 2014-2018. PNL P

Anthony K., Mbonye A, Josephine Birungi, B Stephanie K, Yanow C,D, Sandra Shokoples, Samue C, Malamba, E Michael Alifrangis, F Pascal Magnussen F (2015). Prevalence of Plasmodium falciparum Resistance Markers to Sulfadoxine-Pyrimethamine among Pregnant Women Receiving Intermittent Preventive Treatment for Malaria in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59 (9): 5475-5482. DOI: 10.1128/AAC.00507-15

Bwijo B , Kaneko A , Takechi M , Zungu IL , Moriyama Y , Lum JK , Tsukahara T , Mita T , Takahashi N , Bergqvist Y , Bjorkman A , Kobayakawa T (2003) . High prevalence of quintuple mutant dhps/dhfr genes in Plasmodium falciparum infections seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. *Acta Trop* 85: 363 – 373.

Elena Artimovich, Kristan Schneider; Terrie E. Taylor, James G. Kublin, Fraction K. Dzinjalama, Ananias A. Escalante, Christopher V. Plowe, Miriam K. Laufer, and Shannon Takala-Harrison (2015). Persistence of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance Despite Reduction of Drug Pressure in Malawi. *JID*, 212: 694-701. DOI: 10.1093/infdis/jiv078.

Elifaged Hailemeskela,, Moges Kassab, Gemechu Tadesse, Hussien Mohammedb, Adugna Woyessab, Geremew Tasewb, Markos Sleshib, Amha Kebedeb, Beyene Petros (2013). Prevalence of sulfadoxine-pyrimethamine resistance-associated mutations in dhfr and dhps genes of Plasmodium falciparum three years after SP withdrawal in Bahir Dar, Northwest Ethiopia. *Acta Tropica* 128: 636– 641

Esmée Ruizendaal , Marc C. Tahita, Ronald B. Geskus, Inge Versteeg, Susana Scott, Umberto d'Alessandro, Palpouguini Lompo, Karim Derra, Maminata Traore-Coulibaly, Menno D. de Jong, Henk D. F. H. Schallig, Halidou Tinto and Petra F. Mens (2017). Increase in the prevalence of mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Plasmodium falciparum isolates collected from early to late pregnancy in Nanoro, Burkina Faso. *Malar J*;16:179. DOI 10.1186/s12936-017-1831-y

Gosling RD, Gesase S, Moshia JF, Carneiro I, Hashim R, Lemnge M, Moshia FW, Greenwood B, Chandramohan D (2009). Protective efficacy and safety of three antimalarial regimens for intermittent preventive treatment for malaria in infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 374:1521–1532.

Griffin JT, Cairns M, Ghani AC, Roper C, Schellenberg D, Carneiro I, Newman RD, Grobusch MP, Greenwood B, Chandramohan D, Gosling RD (2010). Protective efficacy of intermittent preventive treatment of malaria in infants (IPTi) using sulfadoxine-pyrimethamine and parasite resistance. *PLoS One*. 5:e12618.

Harrington WE, Mutabingwa TK, Kabyemela E, Fried M, Duffy PE (2011). Intermittent treatment to prevent pregnancy malaria does not confer benefit in an area of widespread drug resistance. *Clin Infect Dis*, 53:224–230.

Jeremiah M. Ngondi, Deus S. Ishengoma, Stephanie M. Doctor, Kyaw L. Thwai, Corinna Keeler, Sigsbert Mkude, Oresto M. Munishi, Ritha A. Willilo, Shabbir Lalji, Naomi Kaspar, Chonge Kitojo, Lynn A. Paxton, Nicholas J. Hathaway, Jeffrey A. Bailey, Jonathan J. Juliano, Steven R. Meshnick and Julie Gutman (2017). Surveillance for sulfadoxine-pyrimethamine resistant malaria parasites in the Lake and Southern Zones, Tanzania, using pooling and next-generation Sequencing. *Malar J*, 16:236. DOI 10.1186/s12936-017-1886-9

Koukouikila-Koussounda F, Bakoua D, Fesser A, Nkombo M, Vouvougui C, Ntoumi F (2015). High prevalence of sulphadoxine-pyrimethamine resistance associated mutations in Plasmodium falciparum field isolates from pregnant women in Brazzaville, Republic of Congo. *Infect Genetics Evol*.33:32–6

Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, Mukadam RA, Rogerson SJ, Lescano AG, Molyneux ME, Winstanley PA, Chimpeni P, Taylor TE, Plowe CV(2002): Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of Plasmodium falciparum malaria. *J*

- Infect Dis.; 185:380–388. PMID: 11807721
- Menendez C, Bardaji A, Sigauque B, Sanz S, Aponte JJ, Mabunda S, Alonso PL (2010). Malaria prevention with IPTp during pregnancy reduces neonatal mortality. *PLoS One*, 5:e9438.
- Mockenhaupt FP., Bedu-Addo G, Eggelte TA, Hommerich L, Holmberg V, Von Oertzen C, BienzleUlrich (2008). Rapid increase in the prevalence of sulphadoxinepyrimethamine resistance among *Plasmodium falciparum* isolated from pregnant women in Ghana. *J Infect Dis.*; 198:1545–9.doi.org/10.1086/592455
- Naomi W, Lucchi B, Sheila Akinyi, Okoth B, Franklin Komino C, Philip Onyona C, Ira F. Goldman A, DraganLjolje B, Ya Ping Shi, a John W, Barnwell A, Venkatachalam U, dhayakumar B, Simon Kariukic (2015). Increasing Prevalence of a Novel Triple-Mutant Dihydropteroate Synthase Genotype in *Plasmodium falciparum* in Western Kenya. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59 (7): 3995-4002. DOI: 10.1128/AAC.04961-14
- Ndonga M, Tahar R, Basco LK, Casimiro PN, Malonga DA, Ntoui F (2007). Therapeutic efficacy of sulfadoxine–pyrimethamine and the prevalence of molecular markers of resistance in under 5-year olds in Brazzaville, Congo. *Trop Med Int Health.*;12:1164–71
- Nnaemeka C Iriemenam, Monica Shah, Wangeci Gatei, Anna M van Eijk, John Ayisi, Simon Kariuki, Jodi Vanden Eng, Simon O Owino, Ashima A Lal, Yusuf O Omosun, Kephass Otieno, Meghna Desai, Feiko O terKuile, Bernard Nahlen, Julie Moore, Mary J Hamel, Peter Ouma, Laurence Slutsker, Ya Ping Shi (2012). Temporal trends of sulphadoxine-pyrimethamine (SP) drug resistance molecular markers in *Plasmodium falciparum* parasites in Western Kenya. *Malar J.* 11:34.
- Nsimba B, Jafari-Guemouri S, Malonga DA, Mouata AM, Kiori J, Louya F, Yocka D, Malanda M, Durand R, Le Bras J (2005). Epidemiology of drug-resistant malaria in Republic of Congo: using molecular evidence for monitoring antimalarial drug resistance combined with assessment of antimalarial drug use. *Trop Med Int Health.*;10:1030–7
- Oguike MC, Falade CO, Shu E, Enato IG, Watila I, Baba ES, Bruce J, Webster J, Hamade P, Meek S, Chandramohan D, Sutherland CJ, Warhurst D, Roper C (2016). Molecular determinants of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in Nigeria and the regional emergence of dhps 431V. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 6 :220e229
- Pearce RJ, Pota H, Evehe MS, Bâ el-H, Mombo-Ngoma G, Malisa AL, Ord R, Inojosa W, Matondo A, Diallo DA, Mbacham W, van den Broek IV, Swarthout TD, Getachew A, Dejene S, Grobusch MP, Njie F, Dunyo S, Kweku M, Owusu-Agyei S, Chandramohan D, Bonnet M, Guthmann JP, Clarke S, Barnes KI, Streat E, Katokele ST, Uusiku P, Agboghoroma CO, Elegba OY, Cissé B, A-Elbasit IE, Giha HA, Kachur SP, Lynch C, Rwakimari JB, Chanda P, Hawela M, Sharp B, Naidoo I, Roper C (2009). Multiple origins and regional dispersal of resistant dhps in African *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Med.*; 6:e1000055. doi: 10.1371/journal.pmed.1000055 PMID: 19365539
- Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo RE, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK (1997). Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolatereductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis*, 176:1590–1596.
- Plowe CV, Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DS, Mukadam RA, Chimpeni P, Molyneux ME, Taylor TE (2004). Sustained clinical efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated *falciparum* malaria in Malawi after 10 years as first line treatment: five year prospective study. *BMJ*.328:545. PMID: 14757706
- Roper C , Pearce R , Bredenkamp B , Gumedde J , Drakeley C , Mosha F , Chandramohan D , Sharp B (2003) . Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet* 361: 1174 – 1181.
- Tsumori Y, Ndonga M, Sunahara T, Hayashida N, Inoue M, Nakazawa S, Casimiro P, Isozumi R, Uemura H, Tanabe K, Kaneko O, Culleton R (2011). *Plasmodium falciparum*: differential selection of drug resistance alleles in contiguous urban and peri-urban areas of Brazzaville, Republic of Congo. *PLoS ONE.*; 6:e23430.
- WHO (2014). WHO policy brief for the implementation of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy using sulfadoxine-pyrimethamine (IPTp-SP). 2013 (Revised January 2014). Available: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/iptp-sp-updated-policy-brief-24jan2014.pdf>. Accessed 14 Sept 2014.
- WHO (2016). World Malaria Report 2016. (Accessed 4 September, 2017) [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2016/report/fr/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2016/report/fr/)
- WHO-MPAC (2012). Malaria Policy Advisory Committee to the WHO: conclusions and recommendations of September 2012 meeting. *Malar J.* 11:424.

## RESUME

Le paludisme demeure l'un des défis les plus importants en santé publique dans le monde. Les conséquences sont dramatiques aussi bien chez les femmes enceintes que chez les enfants de moins de 5 ans. Le Ministère de la Santé Publique du Tchad, recommande les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine pour la prise en charge du paludisme simple et la Sulfadoxine-Pyriméthamine en traitement préventif intermittent (TPI) chez la femme enceinte et en chimioprévention saisonnière chez les enfants. L'objectif principal de ce travail était de déterminer d'une part l'efficacité thérapeutique de l'association artésunate-amodiaquine (ASAQ) au cours du paludisme simple à *P. falciparum* à Pala et d'autre part la prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) et à l'artémisinine. L'étude s'est déroulée de novembre à décembre 2015 chez les enfants âgés de moins de 59 mois. Le protocole OMS de 28 jours a été utilisé. Au total, 58 enfants ont été inclus dans l'essai clinique parmi lesquels, 51 ont été suivis jusqu'à J28. Les résultats ont montré une bonne efficacité ainsi qu'une bonne tolérance de l'ASAQ. Un seul cas d'échec thérapeutique à J28 a été rapporté. Après correction PCR, le taux de RCPA était de 100%. Concernant les marqueurs moléculaires de la SP, après l'analyse des séquences, les résultats ont montré une prédominance des allèles sauvages pour les trois marqueurs étudiés. Le triple mutant *dhfr* et le double mutant *dhps* étaient portés respectivement par 3,3% et 6,7 % des isolats. Le quadruple mutant était relativement faible (3,3 %). Le quintuple n'a pas été observé. Au niveau du gène *k13-propeller*, aucune mutation (synonyme, non synonyme) n'a été observée.

**Mots clé:** Malaria *falciparum* efficacité artésunate-amodiaquine *dhfr*, *dhps* *k13-propeller*

## ABSTRACT

Malaria remains one of the most important public health challenges in the world. Consequences are dramatic in pregnant women as in children under 5 years. Ministry of Public Health of Chad recommends artemisinin-based combination therapies as first line treatment in uncomplicated *falciparum* malaria. Sulfadoxine-Pyrimethamine is the main drug for intermittent preventive treatment (IPT) in pregnant women and seasonal chemoprophylaxis in infants in combination with amodiaquine. The main objective of this work was to evaluate firstly the therapeutic efficacy of artesunate-amodiaquine (ASAQ) during uncomplicated malaria *P. falciparum* in Pala and secondly to determine the prevalence of molecular markers resistance of *P. falciparum* to Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP) and artemisinin. The study was conducted from November to December 2015 in children under 59 months. 28-day WHO protocol was used. A total of 58 children were included in the clinical trial, and 51 among this population completed the study up to 28 days. Results showed a good efficacy and tolerability of ASAQ in the study population. Only one case of treatment failure at D28 has been reported. After PCR correction, ACPR was 100%. Molecular markers of SP, after the sequence analysis, results showed more wild alleles than mutants. Triple mutant *dhfr* and the double mutant *dhps* were observed in respectively, 3.3% and 6.7% isolates. Quadruple mutant was relatively small (3.3%). quintuple mutant was not reported. *K13-propeller* gene, no mutations (synonymous, not synonymous) were observed.

**Key words:** Malaria *P. falciparum* efficacy artesunate-amodiaquine polymorphism *dhfr* *dhps* *k13 propeller*